De Rhodomonas alg

OVER DE RELATIE TUSSEN
GOLFLENGTE EN GROEI

Door:
Tjitske Pol

De Rhodomonas Alg

OVER DE RELATIE TUSSEN GOLFLENGTE EN GROEI

Profiel:

Natuur en Techniek

Natuur en Gezondheid

Begeleider:

Arjen de Bruin

Vakken:

Biologie en Scheikunde

In samenwerking met:

G. Verbeeke, W. Brilman, T. Tjalsma,

Wageningen University and Research,

HZ University of Applied Sciences

Door:
Tjitske Pol, 6 VWO

Atheneum College Hageveld
Heemstede

27 januari 2020

‘The simplest organism on the planet could be the solution to the World’s largest problem’

- AlgaeLink

Dankwoord

Tijdens het maken van dit werkstuk, heb ik ontzettend waardevolle hulp gehad van verschillende mensen. Omdat ik zonder hen dit werkstuk niet had kunnen maken tot wat het nu is, wil ik graag een dankwoord uitspreken naar deze mensen.

Allereerst wil ik mijn begeleider, Arjen de Bruin, bedanken voor de bijdrage die hij geleverd heeft aan het proces van dit werkstuk. Voor vragen kon ik altijd naar hem toe komen om vervolgens met een nuttig antwoord weer te vertrekken. Ook heeft het mij geholpen dat Arjen erg enthousiast was en dat hij met mij meegedacht heeft. Dit onder andere door te informeren bij andere mensen en door te helpen met het verkrijgen van informatie over verschillende vlakken waarop algen een belangrijke rol spelen. Wat ik erg fijn vond aan onze samenwerking, was dat het makkelijk was om over het onderwerp te praten. Dit was mogelijk omdat Arjen zichzelf ook verdiept heeft in het onderwerp, wat ik erg waardeer en waardoor zijn hulp erg waardevol is geweest.

Daarnaast gaat mijn dank uit naar Gabriëlle Verbeeke van HZ University of Applied Sciences. Gabriëlle heeft mij rondgeleid op het SeaLab in Vlissingen waar wij samen mijn onderzoek doorgesproken hebben, wat zorgde dat ik extra alert gemaakt ben op bepaalde aspecten en wat enkele fouten tijdens het praktisch onderzoek heeft voorkomen. Ook zij heeft erg met mij meegedacht en haar enthousiasme heeft mij nog enthousiaster gemaakt over het onderwerp. Ook na mijn bezoek, hebben Gabriëlle en ik nog contact gehouden. Ik ben erg dankbaar voor de tijd die zij heeft genomen om mij te helpen.

Ook de Hellen Bakker, Benita Davids en Nicole Verhagen wil ik erg bedanken voor hun hulp. Zij hebben mij onwijs geholpen bij het praktische onderzoek. Tot in de latere uren ben ik hier met hen op school mee bezig geweest.

Ten slotte wil ik graag mijn ouders bedanken voor hun hulp tijdens het maken van dit werkstuk. Mijn vader heeft mij erg geholpen wanneer ik vastliep tijdens het proces. Ook heb ik de afgelopen zes jaar veel geleerd van de manier waarop hij projecten aanpakt. Dit heb ik bij dit werkstuk zelf kunnen toepassen en dit is iets waar ik heel veel aan heb gehad. Ook bedank ik mijn moeder, die mij ontzettend heeft geholpen met het verzorgen van de algen en het meedenken over de proefopstelling. Met mijn beide ouders kon ik erg goed praten over het onderwerp. Door er hardop over te kunnen praten en af en toe gedachte uit te kunnen spreken, werd het grotere overzicht weer duidelijk. Zo is voor mij duidelijk geworden wat de problemen waren waar ik tegenaan liep. Met dat in gedachte, kon ik opzoek naar een passende oplossing om het onderzoek te optimaliseren.

Veel dank!

Samenvatting

In dit onderzoek is onderzocht wat de invloed van de golflengte op de celdichtheid van de cultuur van de Rhodomonas sp. alg is. De Rhodomonas is tijdens de kweek blootgesteld aan drie golflengten 460, 520 en 630 nm. Deze representeren de kleuren blauw, groen en rood.

Voor de kweek is een fotobioreactor gemaakt en hierbij is rekening gehouden met verschillende factoren die van invloed zijn op de groei van de algen. Dit onderzoek richt zich specifiek op de invloed van licht. De algen zijn gecultiveerd in bekerglazen en deze zijn constant belicht met de betreffende golflengte. Door een doos over de opstelling te plaatsen, is de cultuur enkel blootgesteld aan deze golflengte. De temperatuur van de cultuur was 22 graden Celsius en de saliniteit was 30 g/L. De celdichtheid is gemonitord met behulp van een microscopische bepaling. Hiervoor is de telkamer gebruikt.

Gevonden is dat na vijf meetdagen de celdichtheid van de Rhodomonas sp. algen de hoogste is wanneer deze blootgesteld is aan groen licht. Dit zal komen door het fycoetrine pigment dat de Rhodomonas bevat. Dit pigment absorbeert het best licht met een golflengte van 545 nm. Dit is groen licht. Verder is gevonden dat hoe verder de golflengte afwijkt van 545 nm, hoe minder hoog de celdichtheid van de cultuur is na vijf dagen.

Summary

In this research it has been investigated how the wavelength could affect the cell density of a Rhodomonas sp. algae culture. During the cultivation, the Rhodomonas is exposed to three wavelengths: 460, 520 en 630 nm. These represent the colors blue, green and red.

For the cultivation, a photobioreactor has been made and while making this, it has been taking into account that there are different factors that could affect the growth of the algaes. This study specifically aims on the effects of light on the growth of the Rhodomonas. The algaes were cultivated in beakers and they were constantly exposed to the specific wavelength. By placing a box over the photobioreactor, the algae cultures were only exposed to this specific wavelength. The temperature of the culture was 22 degree Celsius and the salinity was 30 g/L. The cell density was measured by using a hemocytometer.

It has been found that after five days of measuring the cell density of the Rhodomonas sp. Algaes will be the highest when exposed to green light. This will occur because of the phycoerythrin pigment in the Rhodomonas. This pigment absorbs the best light with a wavelengte of 545 nm. This represents green light. Furthermore it has been found that after five days of measuring the more the wavelength exposed to different value than 545 nm, the less high the cell density of the culture became.

Inhoudsopgave

Inleiding **12**

Theoretische kader **14**

Hoofdstuk 1: Wat is een alg **14**

1.1 De Rhodomonas sp. Alg 15

1.2 De Chlorella Sorokiniana alg 16

Hoofdstuk 2: Factoren die van invloed zijn op de groei **17**

2.1 Nutriënten 17

2.1.1 Nitraat 17

2.1.2 Fosfaat 18

2.1.3 Natriumion, kaliumion en chloride 18

2.1.4 Sulfaat en zink 19

2.1.5 Mangaanion 19

2.1.6 Ijzer - EDTA 19

2.1.7 Boorzuur 20

2.2 Temperatuur 20

2.3 CO_2-toevoer en pH-waarde 21

2.3.1 De pH-waarde 21

2.3.2 Koolstofdioxide in oplossing 21

2.3.3 De invloed van koolstofdioxide op de pH-waarde 21

2.3.4 CO_2-toevoer bij de proefopstelling 22

2.3.5 Ingenieurs problemen uit het gidsexperiment 23

2.4 Beluchting en bacteriën 24

2.4.1 De oplossing in beweging 24

2.4.2 Watten als bescherming tegen bacteriën 25

2.4.3 Aquariumpomp als bron van beweging 25

2.4.4 Weerstand bij gesplitste beluchting 26

2.5 O_2-afvoer 26

2.6 Zout 26

Hoofdstuk 3: Fotosynthese **27**

3.1 De lichtreactie 27

3.2 De donkerreactie, ofwel de calvincyclus 28

Hoofdstuk 4: Licht **29**

4.1 Fycobilinen als pigmenten van de Rhodomonas 29
4.2 Voordelen van de fycobilinen 30
4.3 Het absorptiespectrum van de pigmenten 31
4.4 Licht bij de proefopstelling 32
4.5 Fotoinhibitie 33
4.6 De gekozen golflengten 33
Hoofdstuk 5: De fases van groei 35
5.1 De LAG-fase 35
5.2 De exponentiële fase 35
5.3 De gestationeerde fase 35
5.4 De eindfase 35
Hypothese voor het praktisch onderzoek 36
Hoofdstuk 6: De gehanteerde methode 37
6.1 Introductie en uitleg 37
6.2 De plaats van de opstelling 37
6.3 Het gidsexperiment van de metingen 37
6.4 Gemaakte keuzes bij het praktisch onderzoek 37
6.5 Materialen en methoden 39
Hoofdstuk 7: Resultaten 44
7.1 Waarnemingen 44
7.2 Meetgegevens 46
Hoofdstuk 8: Verwerking van de resultaten 47
Hoofdstuk 9: Conclusie 53
Hoofdstuk 10: Discussie 55
10.1 Betrouwbaarheid 55
10.2 Onnauwkeurigheden 55
10.2.1 Het verplaatsen van de proefopstelling 55
10.2.2 Onderscheid tussen levende en dode algen 55
10.2.3 Meetapparatuur voor de temperatuur en pH-waarde 55
10.2.4 Bacteriën 56
10.2.5 Het uitgezonden spectrum 56
10.2.6 Samples nemen 56
10.3 Resultaten 57
10.4 Vervolgonderzoek 57
10.5 Verwachtingen 57
Hoofdstuk 11: Bijlagen 58

11.1 Medium van de Rhodomonas alg 58
11.2 Medium van de Chlorella Sorokiniana 61
11.3 PH en temperatuur gedurende de groei 62
11.4 Ingenieurs problemen en bijbehorende oplossingen 62
11.4.1 Ingenieurs problemen en oplossingen wat betreft de CO_2-toevoer 62
11.4.2 Ingenieurs problemen en oplossingen wat betreft de beluchting 63
11.5 Benodigde hoeveelheden voor medium van Chlorella Sorokiniana. 64
11.6 Logboek 65
11.7 Reflectie 82
11.8 Eigen werk-verklaring 83
Literatuurlijst **84**

Inleiding

De afgelopen decennia is de wereldbevolking fors gestegen. Door deze toenemende wereldbevolking neemt de vraag naar brandstof ook sterk toe. Tegelijkertijd neemt de beschikbare hoeveelheid fossiele brandstoffen aanzienlijk af en op relatief korte tijd zal deze zelfs opraken. Het is deze eeuw daarom noodzakelijk dat er gebruik gemaakt zal gaan worden van alternatieve energiebronnen om van te kunnen leven, want op het moment komt 90% van al onze energie uit fossiele brandstoffen.[1] Om deze alternatieve bronnen te vinden, doet de wereldbevolking een steeds groter beroep op de natuurlijke hulpbronnen van de aarde, zoals de zon of de wind. Een andere duurzame energiebron waar tegenwoordig erg veel focus op ligt, zijn de biobrandstoffen. Deze kunnen gemaakt worden uit etenswaren, zoals maïs of sojabonen. 'Een andere alternatieve energiebron die een grote bijdrage kan leveren in het verduurzamen van onze samenleving, is de alg', aldus de Wageningen University and Research.[2] De kweek van algen gaat ten slotte niet ten koste van de landbouwgrond die ter beschikking staat voor voedsel, terwijl dit bij maïs en sojabonen wel zo is. Zo is de microalg die tijdens dit onderzoek gecultiveerd is, de Rhodomonas sp. alg, een zoutwateralg. Dit houdt in dat deze alg in staat is om te groeien in zout water, waarvan op aarde genoeg is. Zo is 97,5% van al het water op aarde zout water.[3]

Algen zijn een geschikte bron voor biobrandstoffen, omdat ze in staat zijn lipiden te produceren. Dit zijn vetachtige stoffen die uit de alg gehaald kunnen worden om omgezet te worden tot biobrandstof. Wanneer deze biobrandstof verbruikt wordt, zal dit niet bijdragen aan het versterkt broeikaseffect, aangezien de koolstofdioxide die vrijkomt bij de verbranding gelijk is aan de opgenomen hoeveelheid koolstofdioxide tijdens de fotosynthese.[4] Ook andere componenten uit de alg, zoals bijvoorbeeld de pigmenten, kunnen waardevol zijn.[5] Deze kunnen verwerkt worden tot kleurstoffen voor in voedingswaren. Daarnaast kunnen algen fungeren als afvalverwerkers. Algen zijn namelijk in staat om vervuild water of rookgassen te verwerken tot bruikbare stoffen voor onder andere energie of voeding.[6] Op deze manier gebruiken algen stoffen die mensen als niet meer bruikbaar beschouwen. Algen vormen hierdoor een interessante cradle-to-cradle bron. Er is daarom veel wetenschappelijke belangstelling naar algen.

[1] *Enkele feiten over fossiele brandstoffen op een rij | Essent*. (z.d.). Geraadpleegd op 28 november 2019, van https://www.essent.nl
[2] Lemmers, M., Schots, A., Van Kooten, O., Van Seters, J., Linssen, G. (2013). *Algen voor het leven*. Geraadpleegd op 5 april 2019, van https://www.wur.nl
[3] Wikipedia contributors. (2020, 7 januari). *Water distribution on Earth*. Geraadpleegd op 20 november 2019, van https://en.wikipedia.org/wiki/Water_distribution_on_Earth
[4] Mooij, P. (2016, 15 januari). *Algen kansrijk voor productie biodiesel via 'survival of the fattest'*. Geraadpleegd op 12 september 2019, van https://www.tudelft.nl/2016
[5] Markou, G., Nerantzis, E. (2013, 6 april). *Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions.* Geraadpleegd op 14 september 2019, van https://www.sciencedirect.com

Bij de groei van algen zijn verschillende factoren van invloed, zoals temperatuur, licht, en voedingsstoffen. Voor ieder van deze factoren kan ‘aan de knoppen’ gedraaid worden. In dit onderzoek wordt specifiek gekeken naar de invloed van licht op de groei van algen.

De hoofdvraag van dit onderzoek luidt: Hoe beïnvloed de golflengte van licht de groei van de Rhodomonas sp. alg wanneer specifiek gekeken wordt naar groen, blauw en rood licht. Deze kleuren worden respectievelijk gerepresenteerd door de volgende golflengten: 520 nm, 460 nm en 630 nm.

Om antwoord te kunnen geven op deze hoofdvraag, worden de volgende deelvragen beantwoord in het theoretische kader:

- Welke factoren kunnen de groei van de Rhodomonas sp. alg beïnvloeden tijdens het groeiproces en hoe worden de meest optimale waarden van deze factoren gehanteerd in een eigen fotobioreactor?
- Hoe nemen algen licht op? En welke rol heeft het opgenomen licht van de algen in het fotosyntheseproces?
- Wat beïnvloed de (optimale) absorptiewaarden van de alg?
- Wat zijn drie kleuren die voor nauwkeurige meetresultaten zullen zorgen en waarom?
- Hoe kan de golflengten de groei beïnvloeden?

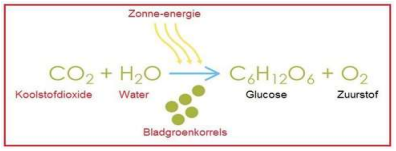
Ook zal zelf praktisch onderzoek gedaan worden met de Rhodomonas alg. Deze alg zal gecultiveerd worden en hierbij zal de theorie toegepast worden. Tijdens het cultiveren van de algen, worden de meest optimale omstandigheden (tot waar mogelijk) gehanteerd. Ook zal de invloed van de golflengte bepaald worden in het praktisch onderzoek.

Theoretische kader

Hoofdstuk 1: Wat is een alg

Microalgen, ofwel fytoplankton, zijn eencellige organismen die aanwezig zijn in wateren. Met het blote oog zijn ze niet waar te nemen, want ze variëren in grootte tussen de 2 en 50 micrometer, maar wanneer ze zich bevinden in nutriëntrijk water en de temperatuur, lichtintensiteit en pH in orde zijn, kan er een waarneembare algenbloei plaatsvinden.[7] Dit zorgt voor wat men kent als de groene laag die zich op het wateroppervlak bevindt. Wat algen uniek maakt, is dat ze geen bladeren, wortels of bloemen hebben. Ondanks de geringe afmetingen van algen, spelen ze een belangrijke rol in de chemische samenstelling en de ecologie van wateren en staan zij aan de basis van de voedselpiramide. Hierdoor vormen ze een belangrijke schakel tussen de organische en de anorganische wereld. Dat algen de connectie vormen tussen de levende en de niet-levende wereld, komt omdat algen heterotroof zijn: ze zetten anorganische stoffen om in organische stoffen. De groei van organismen, in dit geval algen, die zonlicht gebruiken om energie vast te leggen in een vorm van organische verbindingen wordt de primaire productie genoemd. Dit vormt de basis van al het leven in zee. Mensen en dieren zijn hiertoe niet in staat en zijn daarom afhankelijk van planten, waaronder algen, voor belangrijke stoffen als koolhydraten, eiwitten en vetten.[8] Algen vormen zo, indirect, ook een belangrijke bron voor de mens: algen worden gegeten door zoöplankton, zoals krill of watervlooien. Krill vormt in zoute wateren de belangrijkste voedselbron voor zoogdieren, zoals vissen. Deze vormen de voedselbron voor roofvissen en andere (zee)zoogdieren, zoals beren en de mens.

Net als in planten, vindt in algen fotosynthese plaats. In dit proces worden koolstofdioxide en water, onder invloed van zonlicht, omgezet tot glucose en zuurstof, zoals te zien in Figuur 1. Op wereldschaal wordt naar schatting 73 tot 78 procent van de op aarde beschikbare zuurstof geproduceerd tijdens de fotosynthese van algen.[9] Naast heterotroof zijn algen ook fototroof: ze hebben enkel licht en anorganische stoffen nodig om van te leven.[10] Dit zonlicht wordt opgenomen door pigmenten van de alg.

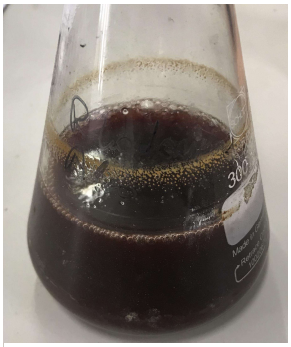


Figuur 1: Het proces van fotosynthese.
(Börger & Broekhuisen, z.d.)

Naast de pigmenten, zoals chlorofyl, heeft de alg meerdere overeenkomstige organellen met planten. Zo hebben algen ook een celkern, chloroplasten waarin de fotosynthese plaatsvindt, mitochondriën waar de energie in vrijkomt voor de alg en een celwand die de cel stevigheid biedt. Enkele algen hebben ook een flagel, die dient als staart om zich mee voort te bewegen.

[7] De Bode, M., Leyenaar, A., Verbeek, I., Van der Wal, L. (2014, september). *Toekomst met algen, waarom algen de mensen de mensheid kunnen redden.* Geraadpleegd op 17 augustus 2019, van https://edepot.wur.nl
[8] Hoekstra, W., Lamers, P. (2013). *De groene belofte: algen.* Geraadpleegd op 2 april 2019, van https://www.biomaatschappij.nl/wordpress/wp-content/uploads/2016/05/Algen_72dpi.pdf
[9] Lemmers, M., Schots, A., Van Kooten, O., Van Seters, J., Linssen, G. (2013). *Algen voor het leven*. Geraadpleegd op 5 april 2019, van https://www.wur.nl
[10] Wikipedia-bijdragers. (2019, 31 december). Fotosynthese. Geraadpleegd op 12 september 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Fotosynthese

1.1 De Rhodomonas sp. Alg



Figuur 2: De kleur van een gezonde Rhodomonas cultuur.

De Rhodomonas sp. alg is een zoutwateralg die een rode kleur heeft. Bijzonder aan de Rhodomonas is dat deze geen celwand heeft, maar een periplast.[11] Dit kan gezien worden als een 'muur' die gebouwd is uit verschillende blokken die elkaar overlappen. Dit vormt, in combinatie met het celmembraan van de alg, de buitenwand van de cel. Daarnaast heeft deze alg twee flagellen.[12]

De Rhodomonas wordt vaak geassocieerd met de aquacultuur. Dit komt omdat de Rhodomonas in principe gekweekt wordt voor voedseldoeleinden; het is een marine alg. Zo wordt de Rhodomonas bij de HZ University of Applied Sciences ook gekweekt voor de aquacultuur. Dit houdt in dat de algen gekweekt worden als voedsel voor bijvoorbeeld vislarven of schelpdieren. Dit is in de huidige maatschappij van steeds groter belang, aangezien er zo meer zeeleven kan blijven leven of zelfs kan ontstaan, waardoor aan de voedselbehoefte van de mens kan worden voldaan.

De eigenschap van de Rhodomonas sp. die hem geschikt maakt voor de aquacultuur is dat deze alg zijn pigmenten om zal zetten tot vetzuren wanneer hij onder ongunstige omstandigheden groeit.[13] Het groeien in ongunstige omstandigheden heet het 'stressen' van de alg.[14] Dit kan bijvoorbeeld door een tekort aan stikstof in het groeimedium[15], een te hoge lichtintensiteit[16], een extreme temperatuur[17] of een onaangename zoutconcentratie.[18] De vetzuren die door het stressen gevormd zijn, zijn waardevol voor de aquacultuur.

---

[11] Hausmann, K. (1979). *The function of the periplast of the Cryptophyceae during the discharge of ejectisomes.* Geraadpleegd op 11 oktober 2019, van https://www.sciencedirect.com

[12] Wikipedia-bijdragers. (2019, 3 december). *Cryptomonad.* Geraadpleegd op 23 oktober 2019, van https://en.wikipedia.org/wiki/Cryptomonad

[13] Da Silva, A. F., Lourenco, S. O., & Chaloub, R. M. (2009, 1 november). *Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga Rhodomonas sp. (Cryptophyceae)*. Geraadpleegd op 6 september 2019, van https://www.sciencedirect.com

[14] De Bode, M., Leyenaar, A., Verbeek, I., Van der Wal, L. (2014, september). *Toekomst met algen, waarom algen de mensen de mensheid kunnen redden.* Geraadpleegd op 17 augustus 2019, van https://edepot.wur.nl

[15] Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W. (2000, 1 november). *Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium.* Geraadpleegd op 2 oktober 2019, van https://www.sciencedirect.com

[16] Solovchenko, A.E., Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., Reshetnikova, I.V., Khozina-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. (2008). *Effects of illumination and nitrogen starvation on accumulation of arachidonic acid by the microalgae parietochloris incisa.* Geraadpleegd op 14 september 2019, van https://link.springer.com

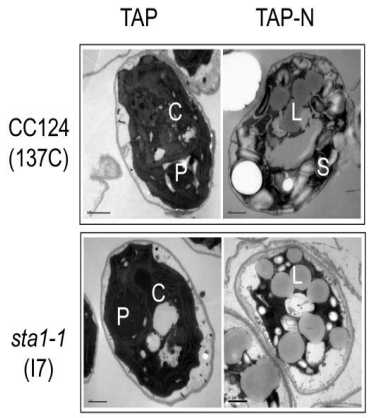
[17] Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G., Parry, D.L. (2002, 23 augustus*). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian Microalgae grown in batch cultures*. Geraadpleegd op 12 oktober 2019, van https://www.sciencedirect.com

[18] Takagi, M., Karseno, Yoshida T. *(2006, maart). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine algae Dunaliella cells*. Geraadpleegd op 12 oktober 2019, van https://www.sciencedirect.com

1.2 De Chlorella Sorokiniana alg

De Chlorella Sorokiniana is een groene zoetwateralg die met name gebruikt wordt voor brandstof doeleinden. Want waar de Rhodomonas vetzuren zal produceren onder stress, daar zal de Chlorella Sorokiniana lipiden vormen onder stress.[19]

Wanneer de Chlorella groeit onder optimale omstandigheden, wordt energie die vrijkomt tijdens de dissimilatie, de stapsgewijze afbraak van brandstof voor een cel, zoals glucose, geïnvesteerd in het groei-metabolisme. Hierin wordt de energie gebruikt om membranen te vormen en zo het aantal algen te laten vermeerderen; de biomassa neemt toe. De ontstane algen bevatten echter slechts enkele procenten lipiden. Deze hoeveelheid lipiden neemt toe wanneer een alg gestresst wordt, want er zullen dan lipiden opgehoopt worden in de vorm van triglyceriden.[20] De keerzijde hiervan is dat het totale aantal algen aanzienlijk lager wordt wanneer de algen lipiden zullen produceren.[21] De gevormde triglyceriden maken algen tot een potentiële brandstofbron, want deze kunnen omgezet worden tot biodiesel. Zo is ook in figuur 3 weergegeven dat er meer lipiden geproduceerd worden wanneer de alg zich in een nutriënt-arm medium bevindt, wat ervaren wordt als een van de stresscondities. Dit is aangegeven met het TAP-N medium.



Figuur 3: Er ontstaan lipidenblaasjes bij de algen in het TAP-N medium. De 'L' duidt op het lipidenblaasje. De vergroting is 1 bar. (Siaut et al., 2011)

De reden dat de Chlorella Sorokiniana ook gecultiveerd is gedurende dit onderzoek, is omdat het een een robuuste alg is.[22] Uiteindelijk is besloten om tijdens de definitieve uitvoering de Rhodomonas alg te gebruiken. Verdere informatie over deze keuze is weergegeven in paragraaf 4.3.

Figuur 4: De groene Chlorella Sorokiniana alg, gecultiveerd bij de HZ University of Applied Sciences.

[19] Markou, G., Nerantzis, E. (2013, 8 augustus). *Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions*. Geraadpleegd op 14 september 2019, van https://www.sciencedirect.com
[20] Li, Y., Horsman, M., Wang, B., (2008, 16 september). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga Neochloris oleoabundans. Geraadpleegd op 16 september, van https://link.springer.com
[21] Markou, G., Nerantzis, E. (2013, 8 augustus). *Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions*. Geraadpleegd op 14 september 2019, van https://www.sciencedirect.com
[22] Hoekstra, W., Lamers, P. (2013). *Algen kweken voor doe-het-zelvers*. Geraadpleegd op 12 april, van https://edepot.wur.nl

Hoofdstuk 2: Factoren die van invloed zijn op de groei

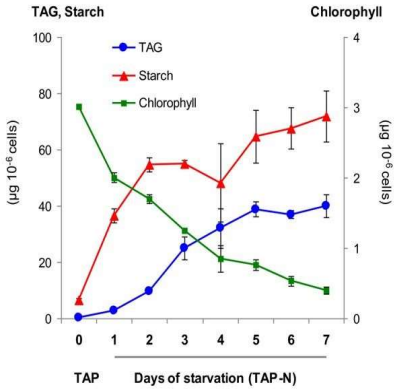
De mate van groei van de alg en de chemische samenstelling van deze gevormde alg zijn afhankelijk van verschillende factoren. Zo spelen nutriënten, temperatuur, pH-waarde, CO_2-toevoer en O_2-afvoer een belangrijke rol in het groeiproces van de alg. Ook licht kan de groei van de algen sterk beïnvloeden. De rol van licht wordt apart in hoofdstuk 4: *Licht* besproken, want in dit onderzoek wordt specifiek ingezoomd op de rol van licht in het groeiproces van de Rhodomonas alg. Gedurende het opstellen van de proefopzet is aan bovenstaande factoren veel aandacht geschonken om te zorgen voor de meest optimale omstandigheden. Onderstaand wordt de relevante informatie over deze factoren behandeld.

2.1 Nutriënten

Algen hebben om in leven te blijven verschillende nutriënten nodig. In dit onderzoek zijn de Rhodomonas sp. alg en de Chlorella Sorokiniana alg gecultiveerd. De media waarin deze algen optimaal groeien, staan beschreven in bijlage *11.1 Medium van de Rhodomonas alg*. Van belangrijke elementen in dit medium wordt hieronder de functie beschreven, zodat helder is waarvoor deze dienen tijdens het groeiproces.

2.1.1 Nitraat

Uit nitraat is het voornamelijk de stikstof die de alg tot zich zal nemen. Stikstof wordt in de alg onder andere gebruikt voor de eiwitsynthese. Hierin worden de bouwstenen van eiwitten, aminozuren, aan elkaar gekoppeld waardoor langere polypeptideketens ontstaan; de eiwitten. Ieder aminozuur heeft dezelfde vaste eenheid en deze bevat een stikstofmolecuul. Wanneer de alg verkeert in een medium waarin hij geen stikstof tot zijn beschikking heeft, zal de eiwitsynthese daarom gestopt worden. Dat nitraat de stikstofbron is in het medium van de Rhodomonas sp. is te verklaren. Het gebruik van nitraat als stikstofbron resulteert in een een snellere celdeling dan wanneer gebruik gemaakt wordt van urea.[23] Dit zorgt dat de dichtheid van de algencultuur eerder zal toenemen. Daarnaast groeien algen beduidend minder goed wanneer ammonia als stikstofbron dient in plaats van nitraat.[24]

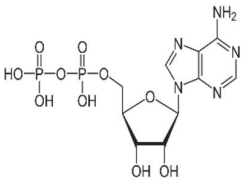


Figuur 5: De hoeveelheid chlorofyl, zetmeel en triglyceriden in algen bijgehouden gedurende zeven dagen in een stress medium (TAP-N). (Siaut et al., 2011)

Stikstof draagt ook bij aan de productie van het pigment chlorofyl.[25] In figuur 5 is te zien dat wanneer de alg geen stikstof tot zijn beschikking heeft, de hoeveelheid geproduceerd chlorofyl zal dalen. Hierdoor zal de efficiëntie van de fotosynthese afnemen. Het is daarom van belang dat er voldoende stikstof aanwezig is in de media.

[23] Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L., Zeng, C. (2001). Effects of nitrogen sources and concentration on growth rate and fatty acid composition of Ellipsoidion sp. Geraadpleegd op 13 november 2019, van https://link.springer.com
[24] Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Carvalho, J.C.M., Sato, S. (2002, Oktober). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by Spirulina platensis. Geraadpleegd op 13 november 2019, van https://www.sciencedirect.com
[25] Leurs, R. (z.d.). *Oppassen met te veel stikstof*. Geraadpleegd op 13 november 2019, van https://edepot.wur.nl/59

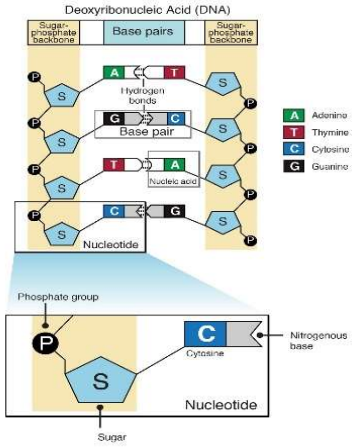
2.1.2 Fosfaat



Figuur 6: De structuurformule van het ADP-molecuul. (Wikipedia-bijdragers, 2019)

Voor alle processen in een cel is energie nodig, zo ook bij de alg. Ook zijn er in de alg ADP-moleculen aanwezig; adenosinedifosfaat moleculen. Deze bestaan uit adenosine en twee fosfaatgroepen. ADP kan echter nog een derde fosfaatgroep binden, waardoor ADP omgezet zal worden in ATP, adenosinetrifosfaat; de energiebron voor cellen. De energie zit opgeslagen in de chemische binding tussen het ADP-molecuul en de derde fosfaatgroep.[26] Wanneer de cel energie nodig heeft, zal de gevormde chemische binding verbroken worden en hierbij komt energie vrij die de cel kan gebruiken. Als reactieproducten blijven het ADP-molecuul en een losse fosfaatgroep over. Nu kan het proces opnieuw plaatsvinden waarbij een nieuw ATP-molecuul ontstaat.

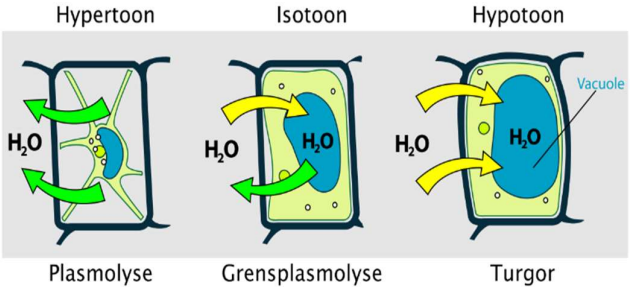
Daarnaast heeft fosfaat een rol bij de DNA-synthese. Zoals weergegeven in figuur 7 is DNA opgebouwd uit nucleotiden. Een nucleotiden bestaat uit een stikstofbase; cytocine, guanine, adenine en thymine, een fosfaatgroep en een deoxyribose groep.[27] Fosfaat is daarom essentieel voor het maken van nieuw DNA voor nieuwe algen tijdens de deling.



Figuur 7: De opbouw van een nucleotide uit het DNA. Hierin speelt fosfaat een essentiële rol. (Brody, z.d.)

2.1.3 Natriumion, kaliumion en chloride

Het natriumion, kaliumion en chloride-ion zijn voor de alg van belang, omdat zij een juiste vochthuishouding verzorgen. Allen hebben namelijk invloed op de osmotische waarde en daardoor op de bewegingsrichting van het water binnen de cel. Dit zorgt ervoor dat de turgor, de kracht van de celinhoud op de celwand, een juiste waarde heeft waardoor de cel niet krimpt, zoals bij plasmolyse, maar ook niet breekt omdat de cel meer water opneemt dan het aankan; figuur 8. Van turgor is echter enkel sprake bij de Chlorella Sorokiniana alg en niet bij de Rhodomonas sp, want de Rhodomonas heeft geen celwand zoals al eerder benoemd, maar een periplast. Deze is flexibeler dan een celwand, waardoor er geen sprake is van turgor. De periplast zal meebewegen met de beweging van het water.



Figuur 8: De invloed van turgordruk. Gewenst is de situatie van de grensplasmolyse. (Wikipedia-bijdragers, 2019)

[26] Bouwman, M., van Goor, H., Jongmans, W., Strikwerda, J., Weeda, A., Wolfswinkel, T., Zweverink, Y. (2014). *Nectar 3e editie biologie 5VWO* (3de editie). Groningen/Houten, Nederland: Noordhoff

[27] BiNaS & *Replicatie.* (z.d.). Geraadpleegd op 30 november, van https://biologielessen.nl/index.php/dna/639-replicatie

2.1.4 Sulfaat en zink

Het zout zinksulfaat zal uiteenvallen bij aanraking met water tot het zinkion en sulfaat aangezien dit een goed oplosbaar zout is. Het zinkion speelt een rol bij de opbouw van diverse eiwitten en het zorgt voor stevigheid van de celmembranen. Daarnaast is het zinkion van groot belang bij de celgroei, omdat dit de productie van de natuurlijke groeihormonen van de alg beïnvloed die essentieel zijn voor de groei. Een teveel aan zink zal de ijzeropname uit het medium verhinderen.[28]

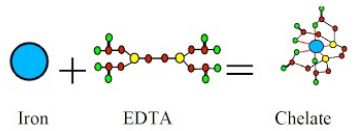
Sulfaat dient met name als bron van zwavel voor de cel. Zwavel wordt in de eiwitsynthese gebruikt om het aminozuur cysteïne te maken. Dit aminozuur is van belang bij de aanmaak van verschillende vitaminen, zoals thiamine (vitamine B1), dat ook onderdeel uitmaakt van het medium van de Rhodomonas sp. Ook is zwavel essentieel voor de productie van bladgroenkorrels en zorgt het ervoor dat er zwavelbruggen kunnen ontstaan binnen moleculen.[29] Dit kan de tertiaire structuur van een molecuul veranderen, wat invloed heeft op de vorm. Met de tertiaire structuur wordt de ruimtelijke bouw van een molecuul bedoeld. Deze ontstaat door de interactie tussen moleculen.

2.1.5 Mangaanion

Mangaan vormt een bouwsteen voor meerdere enzymen en eiwitten van de alg. Ook speelt het een rol bij de fotosynthese en is het essentieel voor de vorming van bladgroenkorrels. Verder is het belangrijk voor de sterkte van de celwanden van de alg, zoals bij de Chlorella Sorokiniana alg. [30]

2.1.6 Ijzer - EDTA

Als ijzerbron wordt $Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ gebruikt in het medium van beide algen. Ijzer is van belang voor de vorming van chlorofyl in de alg en speelt daarom indirect een belangrijke rol bij de fotosynthese. EDTA is een chelaat. Een chelaat is een complex molecuul dat bindt met een metaalion, waardoor dit niet meer kan neerslaan. Normaliter zouden deze metaalionen namelijk reageren met een ander ion waardoor neerslag zou ontstaan. Hierdoor zouden beide ionen niet meer opgenomen kunnen worden door de alg.[31] In dit onderzoek kan het ijzerion met het fosfaat, dat ook aanwezig is in het medium, neerslag vormen, waardoor beide niet meer opgenomen kunnen worden. Chelaten zorgen ervoor dat het metaalion, hier het ijzerion, opneembaar blijft voor de alg en deze daardoor kan gebruiken.[32]



Figuur 9: De werking van een chelaat. (Biogenetic, 2019)

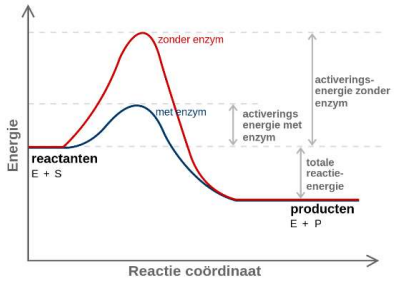
[28] *Sporenelementen.* (z.d.). Geraadpleegd op 23 november, van https://edepot.wur.nl/206643
[29] Leurs, R. (z.d.). *Het element zwavel onder de loep nemen*. Geraadpleegd op 13 september 2019, van https://edepot.wur.nl/245461
[30] *Sporenelementen.* (z.d.). Geraadpleegd op 23 november, van https://edepot.wur.nl/206643
[31] Wikipedia-bijdragers. (2018, 25 juli). *Chelatie*. Geraadpleegd op 14 november 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Chelatie
[32] Biogenetic. (2019, 21 maart). *Chelaten wat zijn het en hoe werken zij voor snellere opname*. Geraadpleegd op 12 september 2019, van https://biogenetic.nl/chelaten/

2.1.7 Boorzuur

Zoals in bijlage *11.2 Medium van de Chlorella Sorokiniana* weergegeven, hoort het medium van de Chlorella Sorokiniana H_3BO_3 te bevatten. Dit is echter een van de micronutriënten en het wordt daarom in erg kleine hoeveelheden toegevoegd. In het medium van de Chlorella Sorokiniana zou 0,00006183 gram toegevoegd moeten worden. De analytische balans die gebruikt is, gaat echter maar tot vier cijfers achter de komma. Dit is voor H_3BO_3 te weinig, want het eerste getal is pas het vijfde getal achter de komma. Er is daarom besloten H_3BO_3 niet toe te voegen aan het medium.

2.2 Temperatuur

Temperatuur is een belangrijke factor bij chemische processen van algen. Veel processen vinden pas plaats wanneer een bepaalde waarde, de drempelwaarde, overschreden is. Vaak is deze drempelwaarde te hoog voor een cel om zelf te kunnen behalen. De reactie zal dan niet plaatsvinden. Om te zorgen dat dit wel gebeurt, zijn bij veel reactie enzymen betrokken. Een enzym verlaagt de activeringsenergie. Deze activeringsenergie is onder meer afhankelijk is van de temperatuur. Enzymen zijn eiwitten en ze zijn daarom erg gevoelig voor temperatuur. Ieder enzym heeft een optimum temperatuur waarbij hij het beste werkt. Wanneer teveel van deze waarde wordt afgeweken, zal het enzym zijn vorm, en daardoor ook zijn functie, verliezen; het enzym is niet meer werkzaam, omdat de tertiaire structuur is veranderd en de reactie zal aanzienlijk minder tot niet uitgevoerd worden.[33] Voor de Rhodomonas sp. geldt een optimale groeitemperatuur van 22 graden Celsius.[34] Wel moet opgemerkt worden dat de temperatuur in principe enkel tussen de 19-26 graden Celsius moet liggen, maar voor optimale groei, wordt een temperatuur van 22 graden Celsius gehanteerd. Voor de Chlorella Sorokiniana moet de temperatuur in ieder geval tussen 30-38 graden Celsius liggen; het optimum bevindt zich bij 36 graden Celsius.[35]



Figuur 10: Enzymen zorgen ervoor dat er een lagere activeringsenergie nodig is. (Wikipedia-bijdragers,2019)

Om de optimale temperatuur te handhaven in de proefopstelling, is gebruik gemaakt van een verwarmingselement voor in een aquarium. Hoe groter de inhoud van het aquarium is, hoe makkelijker het is de temperatuur constant te houden en zo te voorkomen dat deze (erg) gaat schommelen. Er is daarom gekozen om de bekerglazen waarin de algen zich bevinden in een grote vissenkom te plaatsen en deze vissenkom te vullen met water. Het volume van deze vissenkom is aanzienlijk groter dan dat van het bekerglas, waardoor de temperatuur van het water op de optimale waarde zal blijven die ingesteld is op het verwarmingselement. Voor controle van de temperatuur is tegenover het verwarmingselement, dus zo ver mogelijk van de warmtebron af, een thermometer bevestigd en de temperatuur is iedere dag gemeten.

[33] Bouwman, M., van Goor, H., Jongmans, W., Strikwerda, J., Weeda, A., Wolfswinkel, T., Zweverink, Y. (2014). *Nectar 3e editie biologie 5VWO* (3de editie). Groningen/Houten, Nederland: Noordhoff
[34] Marraskuranto, E., Raharjo, J., Kasiamdar, R. S., & Nuringtyas, R. (2018, 28 oktober). *Influence of Salinity on Growth and Phycoerythrin Production of Rhodomonas salina*. Geraadpleegd op 17 november 2019, van https://pdfs.semanticscholar.org
[35] Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., Steyer, J-P. (2015). *Growth of Chlorella Sorokiniana on a mixure of volatile fatty acids: The effects of light and temperature.* Geraadpleegd op 10 oktober, van https://www.deepdyve.com/lp/elsevier

2.3 CO_2-toevoer en pH-waarde

Ook de pH en het CO_2-gehalte kunnen de groei van algen beïnvloeden. Om te voorkomen dat deze factoren een negatieve invloed zouden hebben op het praktisch onderzoek, is gekeken wat de optimale waarde is van deze factoren en hoe zij de groei kunnen beïnvloeden.

2.3.1 De pH-waarde

Iedere algensoort heeft een optimale pH-waarde. Dit is de waarde waarbij de enzymen van de alg optimaal werken en de processen snel en efficiënt kunnen plaatsvinden. Voor de Rhodomonas sp. moet de pH-waarde tussen de 7 en 8 liggen. Voor de Chlorella Sorokiniana is de optimale pH 6.7, maar ook deze zal groeien bij een pH rond de 7.[36] Het is van belang iedere dag de pH te meten om zo een goed inzicht te krijgen in de groeiomstandigheden waar de algen aan blootgesteld zijn en om eventuele bijzonderheden te kunnen verklaren. De pH is gedurende het proces bijgehouden met behulp van pH-papier, aangezien dit thuis gebruikt kon worden.

2.3.2 Koolstofdioxide in oplossing

Aangezien algen kunnen leven door middel van fotosynthese, is het van belang dat er genoeg CO_2 beschikbaar is. In de atmosfeer zit echter slechts 0,04% CO_2.[37] Volgens de Wet van Henry zal er, wanneer de concentratie van het gas dusdanig laag is, ook weinig CO_2 oplossen in het oplosmiddel; in dit geval het medium waarin de algen zich bevinden. In formulevorm luidt de wet van Henry als volgt:

Concentratie opgeloste stof = H * gasconcentratie,

Waarbij H de Henry-constante is. Deze constante is te vergelijken met de evenwichtsconstante. Het geeft namelijk de verhouding weer tussen de gasconcentratie en de concentratie van de oplossing. De Henry-constante heeft daarom geen vaste waarde. De eenheid die voor deze constante gebruikt wordt, is aantal molair opgeloste stof per mol per liter lucht.[38] Gezien het lage percentage CO_2 in de atmosfeer, zal ook de concentratie opgeloste CO_2 in het medium laag zijn, want deze zijn omgekeerd evenredig met elkaar. Er zal daarom extra CO_2 toegevoegd moeten worden om de concentratie opgeloste stof te verhogen en zo de algen te voorzien van voldoende CO_2.

2.3.3 De invloed van koolstofdioxide op de pH-waarde

Wanneer algen gaan groeien, wordt de oplossing basischer. Dit is te verklaren doordat algen van HCO_3^-, dat gevormd wordt als CO_2 met water reageert, OH^- afsplitsen om de CO_2 die op deze manier overblijft te kunnen consumeren.[39] De OH^- die overblijft in de oplossing, zorgt voor de hoge pH-waarde; een basische oplossing. Om tegen te gaan dat de pH te hoog wordt, wordt

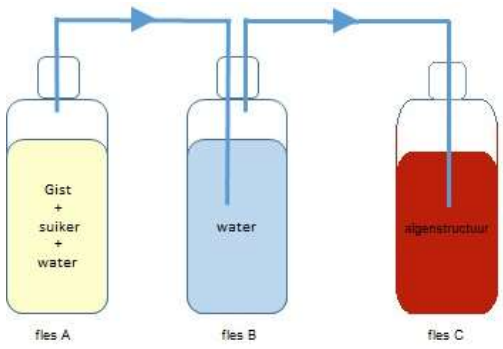
[36] Ruano, T. T., & Linssen, G. (2018 september). *Reader: algen op school*. Geraadpleegd op 1 juni 2019, van https://www.wur.nl/upload_mm/e/d/a/a
[37] Ruano, T. T., & Linssen, G. (2018 september). *Reader: algen op school*. Geraadpleegd op 1 juni 2019, van https://www.wur.nl/upload_mm/e/d/a/a ; Uit deze bron zijn meerdere feiten gehaald voor deze pagina.
[38] Wikipedia-bijdragers. (2019b, 9 juni). *Wet van Henry*. Geraadpleegd op 1 oktober 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Wet_van_Henry
[39] Ruano, T. T., & Linssen, G. (2018 september). *Reader: algen op school*. Geraadpleegd op 1 juni 2019, van https://www.wur.nl/upload_mm/e/d/a/a

extra CO_2 toegevoegd. CO_2 reageert namelijk met water, waardoor koolzuur ontstaat volgens de volgende reactie: $CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$. Het gevormde koolzuur is erg instabiel en valt daarom snel uit een; $H_2CO_3 + H_2O \rightleftarrows HCO_3^- + H_3O^+$ Het hier gevormde hydroxonium-ion draagt bij aan de verzuring van het water, want de pH wordt als volgt berekend: $pH = -Log[H_3O^+]$; wanneer de concentratie hydroxonium-ionen toeneemt, zal de pH-waarde dalen. Een pH-waarde van 7 is neutraal, waar een pH van hoger dan zeven basisch is en onder zeven een zure oplossing is. Echter kan het gevormde bicarbonaat-ion ook uiteenvallen: $HCO_3^- + H_2O \rightleftarrows CO_3^{2-} + H_3O^+$, wat ook bijdraagt aan een verandering van de pH-waarde, want ook hier ontstaat een hydroxonium-ion. Het HCO_3^- dat gevormd wordt in de tweede reactie, splits de alg tot OH^- en CO_2, zoals eerder beschreven. Wanneer er onvoldoende CO_2 is om te reageren met water, zal daarom de pH stijgen.

2.3.4 CO_2-toevoer bij de proefopstelling

In de proefopstelling is de CO_2-toevoer geregeld met behulp van alcohol fermentatie, zoals in figuur 11 is weergegeven. In fles A is een liter gekookt water aanwezig waarin 100 gram witte suiker wordt opgelost. Door het water op warmere temperatuur te houden, lost de suiker sneller op, is gebleken uit het gidsexperiment. Vervolgens wordt een zakje gist van 7 gram toegevoegd. De fles wordt afgesloten en in de dop is een slangetje bevestigd. In fles A zal het gist de suiker gaan fermenteren tot ethanol en CO_2. Het bevestigde slangetje hangt boven de oplossing van fles A zodat het ontstane CO_2 door het slangetje en in een waterfles, fles B, geleid wordt. In fles B zit 1L water. Dit om te voorkomen dat het schuim, dat ontstaat in bij de alcohol fermentatie in fles A, bij de algen kan komen. Wanneer dit zou gebeuren, zal het gist in het schuim de algen direct vernietigen waardoor de cultuur zal sterven. Wanneer de koolstofdioxide door het water geleid is, wordt het met behulp van een tweede slangetje naar de algencultuur geleid, waar het opgenomen kan worden door de algen voor fotosynthese.

Zoals in figuur 11 staat afgebeeld, bevinden zich in de dop van fles B twee slangetjes. Een hiervan is afkomstig uit fles A en deze eindigt in het water van fles B en de ander hangt boven het water van fles B om de koolstofdioxide op te vangen en dit naar de algencultuur te leiden. De gevormde alcohol blijft over in fles A. Dit is ook waar te nemen wanneer deze fles wordt geopend na enige tijd, want er is dan een sterke alcoholgeur te ruiken.



Figuur 11: De opstelling van de CO2-toevoer.

2.3.5 Ingenieurs problemen uit het gidsexperiment

Er is een gidsexperiment uitgevoerd, waarin de CO_2-toevoerinstallatie getest is door het tweede slangetje uit fles B naar een tweede fles met water (fles C) te leiden in plaats van direct naar de algencultuur. Zo kon waargenomen worden of er bellen uit het slangetje zouden ontstaan in de fles C. Tijdens het gidsexperiment zijn enkele ingenieurs problemen ontdekt waar vervolgens een oplossing voor is bedacht, zodat de opstelling optimaal zou werken wanneer de algen met het medium in fles C zouden zitten, in plaats van het water.

In bijlage 11.4 wordt een verkorte weergave gegeven van de problemen en de bijbehorende oplossingen. Onderstaand is uitgebreider te lezen over de ingenieurs problemen, waarnemingen en gemaakte keuzes.

Tijdens de eerste uitvoering van het gidsexperiment is gewerkt met de producten die in huis waren. Dit hield in dat er bruine suiker is gebruikt. Achteraf is gebleken dat de opstelling beter werkt wanneer gebruik gemaakt wordt van witte suiker, dus in het definitieve experiment is gebruik gemaakt van witte suiker. Daarnaast is er tijdens het gidsexperiment gebruik gemaakt van twee flessen, fles A en B, van 1 L. In fles A zat daardoor minder dan 1 L water, want er moest ook gist en suiker bij en er moest een kleine hoeveelheid lucht overblijven, want het slangetje uit fles A mag niet in de oplossing hangen. Het gidsexperiment was om te bekijken of de fermentatie plaats zou vinden, waarbij het belang van de goede verhouding is onderschat. Wel heeft de fermentatie van suiker plaatsgevonden tijdens het gidsexperiment, maar er bleek later dat de reactie langer stand kan houden wanneer gebruik gemaakt wordt van een 1,5 L fles voor fles A, aangezien dan de juiste verhouding gehanteerd kan worden. Ook ontstaat er tijdens de fermentatie behoorlijk wat schuim. In de 1L fles is dit schuim via het slangetje in fles B gekomen. Dat is niet de bedoeling. Er is daarom gekozen om fles A een 1,5 L fles te maken, zodat er ook genoeg ruimte boven de oplossing zou zijn en dat het schuim dat ontstaat niet in het slangetje terecht komt. Ook de lengte van het slangetje heeft invloed gehad op de snelheid waarmee de reactie tot stand kwam. Toen de slangetjes korter gemaakt werden en de opstelling voor een tweede keer getest werd, en de reactie dus opnieuw moest opstarten, kwam de reactie eerder tot stand. Ook de gaatjes die geboord waren in de doppen van de flessen zijn extra dichtgemaakt met behulp van wat kit aan de binnen- en buitenzijde van de dop. Dit omdat er tijdens het gidsexperiment wel bubbels waar te nemen waren in fles B, maar deze niet in fles C zijn gekomen. Na het kitten van de doppen, waren wel bubbels waar te nemen in fles C. Er zal dus sprake zijn geweest van lekkage bij de doppen. Dit is door de kit verholpen.

Er is gekozen voor doorzichtige slangetjes zodat zichtbaar was wat er in de slangetjes gebeurde. Dit resulteerde in het feit dat zichtbaar werd dat wanneer de slangetjes bevestigd werden en deze in de fles gehangen werden, er water van onderen in het slangetje kwam. Na enige tijd was te zien dat het waterpeil in het slangetje daalde. Even later waren de bubbels zichtbaar in de fles. Het zakkende waterpeil in het slangetje zal geduid hebben op de kracht die de CO_2 uitoefent op het water in het slangetje.

Verder is het proces van de alcohol fermentatie ook getest met demiwater in plaats van kraanwater. In zowel fles A als fles B bevonden zich nu demiwater. Dit maakte in vergelijking met kraanwater geen verschil. Er is daarom gekozen voor kraanwater voor in het vervolg, aangezien dit niet uit de winkel afkomstig hoeft te zijn.

Ook was tijdens de eerste uitvoering van het gidsexperiment het water uit fles A niet meer warm toen de suiker toegevoegd werd en de gist is toen te snel toegevoegd, want zowel de suiker als het gist zakten direct naar de bodem, waar het uiteindelijk weggekomen is door de fles enkele tijd goed te schudden. Toen is geconcludeerd dat het handig zou zijn als het water nog wat warmer zou zijn tijdens het oplossen van het suiker, zodat dit sneller zou verlopen.

Na de tweede uitvoering van het gidsexperiment is de opstelling nog tweemaal getest. Eenmaal om te kijken hoelang de fermentatie CO_2 zou kunnen leveren. Dit bleek rond de twee dagen te zijn. De andere keer om te bevestigen dat er CO_2 door slangetje twee in fles C kwam. Dit omdat, zoals eerdergenoemd, CO_2 met water reageert tot HCO_3^- en H_3O^+. Ook HCO_3^- valt dan uiteen tot CO_3^{2-} en H_3O^+. Het was daarom de vraag of er daadwerkelijk CO_2 bij de algen zou komen. Om dit te bekijken is slangetje twee bevestigd in een bekerglas met kalkwater. Kalkwater is een heldere oplossing en deze wordt troebel wanneer er (genoeg) CO_2 in komt. De oplossing is inderdaad troebel en wit geworden, wat bevestigd heeft dat er CO_2 door slangetje twee komt. Dat CO_2 hier niet volledig reageert met water, zoals hierboven beschreven staat, komt omdat de reactie van koolstofdioxide met water een evenwichtsreactie is. Dit wil zeggen dat slechts een klein deel van de koolstofdioxide met het water reageert en de rest zal dit niet doen. Het koolstofdioxide dat niet reageert, gaat via het slangetje naar de algencultuur en voorziet deze zo van CO_2. Zo is de CO_2-toevoer geoptimaliseerd voordat de definitieve proef uitgevoerd werd.

2.4 Beluchting en bacteriën

Het is van belang dat de algencultuur in beweging blijft, om te voorkomen dat de algen bezinken. Wanneer dit gebeurt, is er minder contact tussen de algen en het medium, waardoor de efficiëntie van de lichtopname en de opname van nutriënten zal verminderen. De opstelling is in de loop van de tijd geoptimaliseerd, waardoor dit voorkomen is.

2.4.1 De oplossing in beweging

Op grotere schaal wordt geregeld dat de algen niet naar de bodem zakken met behulp van trilplaten. Deze bewegen constant waardoor ook de oplossing constant in beweging is. Dit is echter voor op kleinere schaal een kostbare aangelegenheid en daarom wordt vaak gekozen voor een aquariumpomp als alternatief. Deze wordt met behulp van een slangetje aangesloten op de cultuur waardoor de pomp constant lucht in het medium zal blazen en deze zo in beweging kan houden. Daarnaast voegt de aquariumpomp de kleine hoeveelheid CO_2 uit de atmosfeer toe aan het medium.

Figuur 12: Op grotere schaal, zoals bij de HZ University of Applied Sciences, wordt de algencultuur in beweging gehouden met behulp van trilplaten.

2.4.2 Watten als bescherming tegen bacteriën

Het gebruik van een aquarium pomp heeft echter ook een keerzijde. De lucht die de aquariumpomp in het medium blaast, is namelijk lucht uit de atmosfeer. In deze lucht bevinden zich tal van bacteriën. De Rhodomonas alg is een erg gevoelige alg en zou daarom heftig kunnen reageren op eventuele bacteriën.[40] Om dit te voorkomen wordt op de HZ University of Applied Sciences gewerkt met stops op de erlenmeyers waarin de cultuur zich bevindt. Door deze stops komt wel lucht, maar vrijwel geen bacteriën. Door Gabriëlle Verbeeke, Projectmedewerkster Aquacultuur bij HZ University of Applied Sciences, is aangeraden gebruik te maken van trekwatten door deze over het bekerglas, waarin de cultuur zich bevindt, te spannen om te zorgen voor zo min mogelijk contact met de atmosfeer. Door de watten kunnen wel zuurstofmoleculen komen, maar het houdt een groot deel van de bacteriën tegen. De watten zijn over het bekerglas gelegd en bevestigd door er een elastiek overheen te doen. Zonder het elastiek verschoven de watten en daardoor was er een klein plukje van de watten aan de binnenzijde van het bekerglas gekomen. Door handschoenen aan te doen en deze te spoelen met alcohol is het plukje van de wand verwijderd, zodat er geen risico was op bacteriën vanaf de hand. Om in het vervolg te voorkomen dat de watten tegen het bekerglas zouden komen, zijn de watten vastgemaakt. Zo konden de watten niet meer verschuiven.

2.4.3 Aquariumpomp als bron van beweging

De Rhodomonas is tweemaal gecultiveerd. Dit is gedaan met behulp van twee aparte samples. Wanneer er met een sample algen gecultiveerd wordt, wordt dit sample verdeeld over twee bekerglazen. Bij Rhodomonas is echter tijdens de eerste proef bij geen van beide bekerglazen een vorm van automatische beluchting geweest, vanwege het gebrek aan een trilplaat en de gedachten dat deze algen erg gevoelig zijn voor bacteriën, is het risico op een bacterie-infectie voorkomen door geen aquarium pomp aan te sluiten. Wel zijn beide bekerglazen gedurende de dag vaak handmatig bewogen om zo toch het bezinken te voorkomen.

Van de Chlorella Sorokiniana was slechts een sample beschikbaar. Bij dit sample is in een van beide bekerglazen de aquariumpomp bevestigd om te bekijken wat de invloed hiervan zou zijn op de algengroei. Er is zo gekeken of de opstelling verder geoptimaliseerd kon worden door een bepaalde factor te veranderen tussen de beide bekerglazen en hiervan de invloed te bepalen. Het aansluiten van de aquariumpomp bij een van de bekerglazen met de Chlorella Sorokiniana is specifiek bij de Chlorella Sorokiniana gedaan, omdat deze alg een stuk robuuster is dan de Rhodomonas sp.[41] Na twee dagen oogde de oplossing waar beluchting in was geweest groener. Dit betekent dat hier meer algen in zitten, waaruit geconcludeerd kan worden dat deze oplossing betere omstandigheden had. Er is toen besloten door middel van kraantjes en een T-stuk de aquariumpomp twee toevoeren te geven, zodat beide algen oplossingen belucht konden worden.

Bij de tweede uitvoering met de Rhodomonas is gekozen de cultuur wel te beluchten met behulp van een aquariumpomp, omdat waargenomen is dat bij de eerste uitvoering met de Rhodomonas, de algen toch bezonken waren wanneer er enkele uren geen beweging was geweest, bijvoorbeeld door school.

[40] Gabrielle Verbeeke van HZ University of Applied Sciences, te Vlissingen
[41] Hoekstra, W., Lamers, P. (2013). Algen kweken voor doe-het-zelvers. Geraadpleegd op 12 april, van https://edepot.wur.nl/2

De algen bezonken in de loop der tijd steeds meer en steeds sneller. Dat zal mede zijn gekomen doordat de algen doodgingen. Dan zakken ze namelijk naar beneden. Dit verklaart dat er in de loop van de tijd meer algen bezonken. Uiteindelijk is deze cultuur geel geworden in plaats van bordeauxrood. Dit duidt op een dode cultuur en deze is toen weggegooid. Onder andere de automatische beluchting in de tweede Rhodomonas cultuur zal gezorgd hebben voor een aanzienlijk betere groei dan bij de eerste uitvoering, want de cultuur werd in de loop van tijd steeds roder in plaats van steeds geler.

2.4.4 Weerstand bij gesplitste beluchting

Bij de eerste hantering van de kraantjes, bleek alle lucht naar een bekerglas te gaan en niets van de lucht naar het andere bekerglas. Door aan de kraantjes te draaien kon dit in lichte mate verholpen worden, maar nog steeds bleef de luchttoevoer in het ene bekerglas aanzienlijk beter dan in het andere. Later is bedacht dat dit zal komen door weerstand. De lucht van de aquariumpomp zal altijd de weg volgen waar de minste weerstand is. Deze weerstand kan door meerdere factoren beïnvloed worden, onder andere door de lengte van de slangetjes van de luchttoevoer van de pomp naar het bekerglas. Wanneer het ene slangetje langer is dan het andere, wat in eerste instantie zo was, zal de lucht de weg van het korte slangetje kiezen. Ook de hoogte van het waterpeil speelt een rol. Wanneer het waterpeil in het ene bekerglas hoger is dan in het andere (en de andere factoren bij beide bekerglazen gelijk zijn, zoals de lengte van het slangetje), zal de lucht de weg kiezen naar het bekerglas met het lagere waterpeil, omdat het hier minder weerstand krijgt. Deze ontdekkingen meegenomen, is de luchttoevoer geoptimaliseerd zodat in beide bekerglazen de beluchting gelijk was.

2.5 O_2-afvoer

Tijdens de fotosynthese wordt zuurstof gevormd. Het is van belang dat deze zuurstof uit het bekerglas kan, want een hoge concentratie zuurstof zal uiteindelijk toxisch worden voor de algen. Ook zal het de fotosynthese, en indirect dus de groei, van de algen verhinderen.[42] Er is daarom gebruik gemaakt van watten op het bekerglas. Zo konden de zuurstofmoleculen uit het bekerglas. Toen de algen nog in het verkregen flesje zaten, is de dop meerdere keren opengedraaid, zodat het zuurstof kon vrijkomen.

2.6 Zout

De Rhodomonas sp. alg is een zoutwater alg. Dit houdt in dat de alg zout nodig heeft in het medium om te kunnen groeien. Er is daarom 30 g/L aquariumzout (tetra marine sea salt) toegevoegd aan het medium, wat verkregen is van de HZ University of Applied Sciences. Er is gekozen voor aquarium zout, omdat de Rhodomonas niet groeit wanneer natriumchloride wordt gebruikt.[43] De Chlorella Sorokiniana is een zoetwateralg en er is daarom in het medium van de Chlorella geen toevoeging van zout nodig.

[42] Janssen, M. (2016, 1 juli). *Beter licht op algen*. Geraadpleegd op 10 oktober 2019, van https://www.nemokennislink.nl/publicaties/beter-licht-op-algen/
[43] Gabrielle Verbeeke van HZ University of Applied Sciences, te Vlissingen

Hoofdstuk 3: Fotosynthese

Fotosynthese is het proces dat zorgt dat algen kunnen leven. Tijdens de fotosynthese wordt uit CO_2 en water, zuurstof en glucose gevormd. De energie uit glucose gebruikt de alg voor chemische processen. Hierdoor kan de alg leven. De fotosynthese die plaatsvindt, bestaat uit twee verschillende reacties: de lichtreactie en de donkerreactie, ofwel de calvincyclus. De fotosynthese vindt plaats in de chloroplasten van de alg. Deze hebben een binnen- en buitenmembraan. Daartussen bevindt zich het stroma. Dit is net als het cytoplasma van een cel, een vloeistof met opgeloste stoffen.

In het stroma liggen meerdere thylakoïden bijeen die samen de grana van de chloroplast vormen.[44] De binnenzijde van de thylakoïde, het lumen, wordt van de rest van de chloroplast gescheiden door het thylakoïdmembraan; figuur 15.

3.1 De lichtreactie

In het thylakoïdmembraan zijn meerdere eiwitcomplexen gelokaliseerd die samenwerken om ADP en NADH, de gewenste producten van de lichtreactie, te kunnen vormen. Hiertoe behoren onder andere de twee fotosystemen, de reactiecentra en het antenne complex; het light-harvesting complex (LHC).[45] Met het antenne complex (LHC) worden verschillende fotopigmenten bedoeld. De lichtreactie start wanneer de verschillende pigmenten uit fotosysteem II fotonen uit licht absorberen. Hierdoor worden de elektronen van de pigmenten aangeslagen; ze komen in de aangeslagen toestand door de opgenomen energie. Wanneer elektronen in de aangeslagen toestand verkeren, zullen de elektronen uit het pigment naar een elektronenacceptor in het thylakoïdmembraan gaan. Deze elektronenacceptor zal de elektronen, zoals de naam zegt, accepteren door ze op te nemen. Vervolgens doneert de elektronenacceptor de elektronen aan een volgende elektronendrager. Dit wordt een redoxsysteem genoemd, omdat er sprake is van elektronenoverdracht. Echter, wanneer de elektronen van de ene elektronendrager naar de volgende gaan, zal een deel van de aangeslagen energie verloren gaan. Uiteindelijk komen de elektronen bij fotosysteem I dat zich ook in het thylakoïdmembraan bevindt. Ook hierin worden de elektronen aangeslagen door de door pigmenten opgenomen fotonen en zo zullen de elektronen uiteindelijk bij een $NADP^+$-molecuul aankomen dat zich bevindt in het stroma van de chloroplast.

Enzymen in fotosysteem II splitsen water tot zuurstof, protonen en elektronen volgens de volgende reactie: $2\ H_2O \rightarrow O_2 + 4\ H^+ + 4\ e^-$. De protonen die ontstaan zijn, zullen binden aan het $NADP^+$-molecuul dat zich in het stroma bevindt met behulp van de energierijke elektronen en de volgende reactie zal plaatsvinden: $NADP^+ + 2H^+ + 2\ e^- \rightarrow NADPH, H^+$. Dit is een door een organisme gewenst product.

[44] Bijsterbosch, J., de Jong, H., Jongmans, W., Strikwerda, J., Weeda, A., van Wijk, P., … Wolters, J. (2015). *Nectar 3e editie biologie 6VWO* (3de editie). Groningen/Houten, Nederland: Noordhoff. ; Deze bron is voor meerdere feiten op deze pagina gebruikt.
[45] Wikipedia-bijdragers. (2019, 21 november). *Lichtreacties*. Geraadpleegd op 26 november 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Lichtreacties

De ontstane zuurstof zal de chloroplast verlaten. Dit zal uiteindelijk, wanneer het een hoge concentratie heeft gekregen, toxisch worden voor de algen. Het is daarom van belang algen die in een afgesloten flesje zitten af en toe te luchten. Zo zal het zuurstof ontsnappen. De gevormde elektronen zullen de plekken opvullen waar eerder een elektron is weggegaan door naar een volgend pigment te gaan. Normaliter blijven de protonen in het lumen, tenzij ze gaan binden aan $NADP^+$; dit gebeurt namelijk in het stroma. De hoeveelheid protonen in het lumen zorgt dat de pH-waarde daar (pH 4) aanzienlijk lager is dan in het stroma (pH 8).[46] Het thylakoïdmembraan zorgt dat dit gescheiden blijft. De energie die ontstaan door het concentratieverschil van protonen, wordt door het eiwit ATP-synthase gebruikt om het eerdergenoemde ATP te vormen. De energie wordt gebruikt om de derde fosfaatgroep aan ADP te binden; ATP is ontstaan.

3.2 De donkerreactie, ofwel de calvincyclus

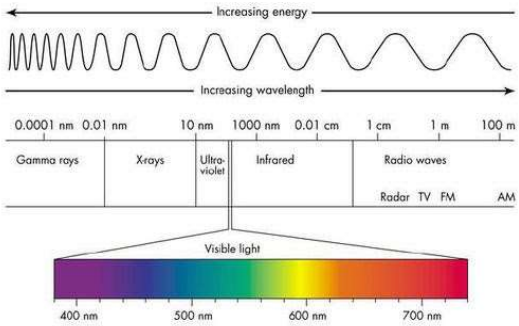
De donkerreactie hoeft niet per definitie plaats te vinden in het donker. Er is echter geen licht nodig om de reactie plaats te laten vinden, maar dit kan wel aanwezig zijn. Wel zijn de gevormde stoffen van de lichtreactie nodig om voor de uitvoering van de donkerreactie.[47] Uit deze stoffen zal na verschillende stappen van de donkerreactie glucose ontstaan; de energiebron voor onder andere algen. Zo is er, uiteindelijk, glucose en zuurstof gevormd uit de fotosynthese. Deze glucose gebruikt de alg om in leven te blijven.

[46] Wikipedia-bijdragers. (2019, 21 november). *Lichtreacties*. Geraadpleegd op 26 november 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Lichtreacties

[47] Bijsterbosch, J., de Jong, H., Jongmans, W., Strikwerda, J., Weeda, A., van Wijk, P., … Wolters, J. (2015). *Nectar 3e editie biologie 6VWO* (3de editie). Groningen/Houten, Nederland: Noordhoff.

Hoofdstuk 4: Licht

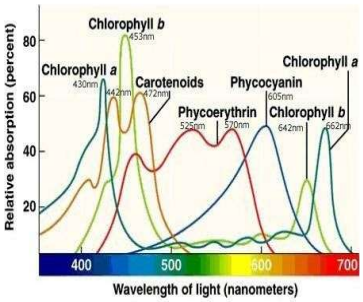
Fotosynthese kan alleen plaatsvinden in aanwezigheid van licht, want alleen dan kan de lichtreactie gestart worden en de reactieproducten van de lichtreactie zijn nodig om de donkerreactie te starten. Lichtenergie wordt opgenomen door de fotopigmenten van de alg, waarna het redoxsysteem op gang zal komen. De drie meest voorkomende pigmenten in algen zijn chlorofyl, carotenoïden en fycobilinen, waarvan in de Rhodomonas sp. alg voornamelijk de fycobilinen aanwezig zijn.[48] De drie pigmenten bevinden zich allen in de chloroplasten van de alg. Chloroplasten behoren tot de plastiden, evenals de chromoplasten, die als kleurstof dienen, en amyloplasten, die van belang zijn bij de opslag van energierijke stoffen als opslag.[49] Uit het elektromagnetische spectrum absorberen algen enkel golflengtes vanuit het zichtbare licht.[50] Het spectrum van zichtbaar licht ligt tussen 400-800 nm.



Figuur 13: Het zichtbare spectrum. Vanuit dit deel van het elektromagnetisch spectrum absorberen algen licht.

4.1 Fycobilinen als pigmenten van de Rhodomonas

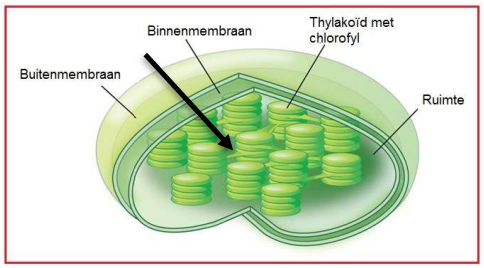
De fycobilinen kunnen onderverdeeld worden in drie subgroepen; de fycoerythrine, fycocyanine en allofycocyanine. Allen absorberen een andere golflengte uit het zichtbare lichtspectrum. Zo absorbeert fycoerythrine licht met golflengte tussen 540-570 nm; groen licht, en deze is zelf rood. Fycocyanine heeft een blauwe kleur en absorbeert daarom oranje licht met golflengte tussen 610-620 nm en het groene allofycocyanine neemt rood licht op dat golflengten heeft tussen 650-655 nm.[51] Dit is weergegeven in de grafiek van figuur 14, evenals de maximale absorptiewaarden voor chlorofyl a, chlorofyl b en carotenoïden. De fycobilinen vormen samen tot fycobiline eiwitten.[52]



Figuur 14: Het absorptiespectrum van verschillende pigmenten die algen bevatten.

[48] Robertson, D. (z.d.). *Algal Pigments*. Geraadpleegd op 16 oktober 2019, van https://wordpress.clarku.
[49] Börger, B. (z.d.). *Plastiden*. Geraadpleegd op 19 augustus 2019, van https://biologielessen.nl/index.php/a-11/1681-plastiden
[50] Hoekstra, W., Lamers, P. (2013). *De groene belofte: algen.* Geraadpleegd op 2 april 2019, van https://www.biomaatschappij
[51] Viskari, P. J., & Colyer, C. L. (2003). *Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. Analytical Biochemistry*, *319*(2), 263–271. https://doi.org/10
[52] Glazer, A. N., & Stryer, L. (1984). *Phycofluor probes*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 9(10), 423–427. https://doi.org

4.2 Voordelen van de fycobilinen



Figuur 15: De chloroplast. De pijl wijst op het thylakoïdmembraan

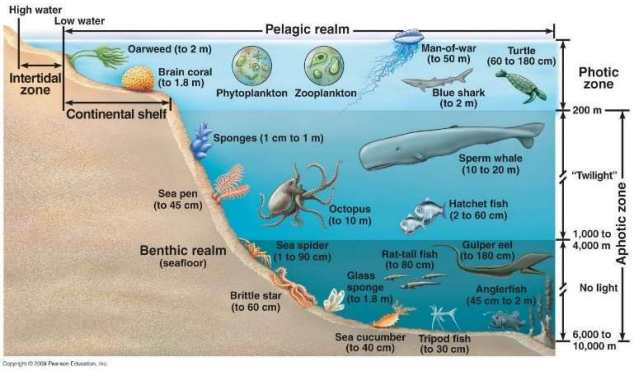
In figuur 15 is een chloroplast weergegeven. Hierin is het thylakoïdmembraan aangeduid met een pijl. In het thylakoïdmembraan bevinden zich de fycoerythrine-pigmenten van de alg. De positie van de deze pigmenten is uniek, want normaliter bevinden de pigmenten zich in het stroma van de chloroplast in plaats van in de zijde van het lumen. De eerder genoemde fycobiline eiwitten dienen als een antenne en bevinden zich op de reactiecentra. De reactiecentra bevinden zich ook in het thylakoïdmembraan en in de reactiecentra vindt uiteindelijk de reactie plaats waarin lichtenergie omgezet wordt in chemische energie.[53] De pigmenten in de fycobiline eiwitten zijn in staat lichtenergie op te vangen en dit naar het reactiecentrum te transporteren. Ook chlorofyl is hiertoe in staat, maar beiden absorberen een andere golflengte; figuur 14. Hierdoor kunnen de verschillende pigmenten fotonen absorberen met verschillende golflengten.[54]

In de fycobiline eiwitten van de Rhodomonas is met name fycoerythrine aanwezig als 'Light-Harvesting-Complex; (LHC), dat fungeert als pigment dat lichtenergie opvangt.[55] De golflengte die door de fycoerythrine pigmenten het meest geabsorbeerd wordt, is 545 nm; dit is groen licht.[56] Tegelijk verklaart dit de rode kleur van de Rhodomonas algen. Het licht dat niet rood is, zal geabsorbeerd worden. Van dit licht wordt groen het best geabsorbeerd. Het rode licht zullen de algen niet opnemen maar weerkaatsen, waardoor de kleur rood waargenomen kan worden.

In figuur 14 is te zien dat fycoerythrine, het pigment dat het meest aanwezig is in Rhodomonas algen, licht kan absorberen met golflengte tussen 410-530 nm. Dit is in overeenstemming met het bovenstaande. Fycoerythrine absorbeert dus vrijwel al het licht uit het zichtbare spectrum, behalve rood licht. Chlorofyl daarentegen absorbeert rood licht (+/- 700 nm). Rood licht heeft, zoals te zien in figuur 14, een langere golflengte, waardoor het minder energie bevat ten opzichte van groen licht, dat een kortere golflengte heeft, en daardoor fotonen bevat met meer energie, want hoe langer de golflengte, hoe minder energie de fotonen van die golflengte bevatten. Hoe meer energie de fotonen bevatten, hoe dieper het licht door kan dringen in het water waarin de algen leven. Hierdoor kan de golflengte van licht de groei beïnvloeden.

[53] Wikipedia-bijdragers. (2019, 10 maart). *Fotosysteem*. Geraadpleegd op 29 november 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Fotosysteem
[54] Mirkovic, T. (2009). Synthesis, Dynamics and Photophysics of Nanoscale systems. University of Toronto, Toronto.
[55] Robertson, D. (z.d.). *Algal Pigments*. Geraadpleegd op 16 oktober 2019, van https://wordpress.clarku
[56] Gantt, E., & Lipschultz, C. A. (1973, 5 april). *Energy transfer in phycobilisomes from phycoerythrin to allophycocyanin*. Geraadpleegd op 1 november 2019, van https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005272873900364

In figuur 16 zijn de verschillende lagen van wateren weergegeven. Algen, fytoplankton, leven in de fotische zone. In deze bovenste laag kan licht doordringen voor fotosynthese.[57] De maat van doordringen hangt echter af van de energie van de fotonen. Dit zorgt ervoor dat algen die het fycoerythrine pigment hebben, zoals de Rhodomonas sp. alg, in staat zijn om dieper in de fotische zone te kunnen leven, want ook hier kunnen zij licht absorberen, terwijl chlorofyl het licht dat dieper in de fotische zone komt niet op kan nemen.[58] Dat komt omdat ieder pigment een bepaalde golflengte op kan nemen. Chlorofyl neemt voornamelijk rood licht op. Rood licht dringt echter niet door tot diep in de fotische zones. Het is daarom voor algen met als voornaamste pigment chlorofyl niet mogelijk te overleven op grotere diepte. Dat de Rhodomonas dit wel kan, valt te verklaren met behulp van het absorptiespectrum van de pigmenten die het bevat. Het deel van het witte daglicht dat doordringt tot een diepere laag in het water, zal slechts fotonen bevatten met hoge energieën, die chlorofyl niet op kan nemen. Dat de algen in de natuur niet op dezelfde diepte leven, kan gunstig zijn voor beiden, want zo vormen zij bijvoorbeeld op gebied van nutriënten geen concurrentie voor elkaar.



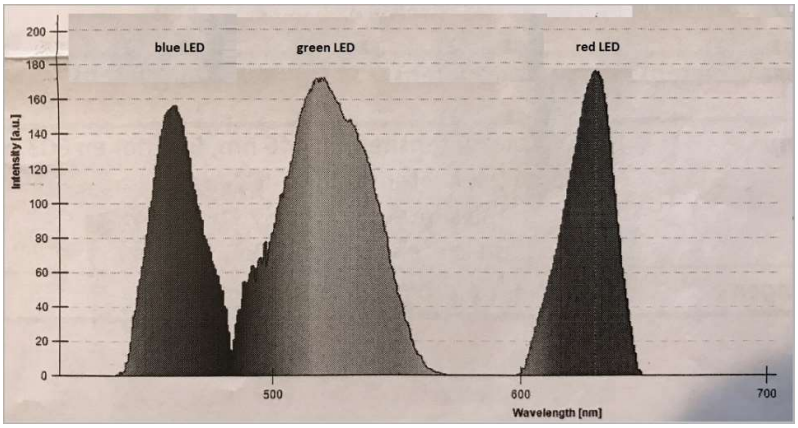
Figuur 16: Wateren zijn opgedeeld in verschillende lagen. Algen leven in de fotische zone, omdat zij hier licht kunnen ontvangen. (De Veer, 2018)

4.3 Het absorptiespectrum van de pigmenten

Zoals te zien in figuur 14, hebben chlorofyl en carotenoïden een specifieke golflengte waarbij de absorptie erg hoog kan zijn, maar wanneer er niet veel afgeweken wordt van deze optimumwaarde, zal de absorptie van het licht aanzienlijk lager worden. De exacte golflengte van het licht kan de efficiëntie van de absorptie van licht door deze pigmenten daardoor sterk beïnvloeden, want deze moet voor optimaal resultaat exact overeenkomen met de optimum golflengte van het pigment, bijvoorbeeld chlorofyl b. In de Chlorella Sorokiniana is chlorofyl b het voornaamste pigment is.[59] De optimale absorptie golflengte voor chlorofyl b ligt tussen 445-455 nm. Bij fycoerythrine is het optimum gebied een stuk breder, waardoor de exacte golflengte minder invloed zal hebben op de absorptie van het licht, want ook wanneer de golflengte van het licht iets afwijkt van de optimumwaarde, zal vrijwel dezelfde hoeveelheid licht geabsorbeerd worden. Wel heeft fycoerythrine, dat voornamelijk aanwezig is in de Rhodomonas alg, drie waarden waarbij de absorptie iets hoger zal zijn. Dit is te zien aan de pieken (460 nm, 520 nm en 570 nm) in figuur 14.

[57] Wikipedia-bijdragers. (2018, 26 juni). *Fotische zone*. Geraadpleegd op 21 november 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Fotische_zone
[58] Mirkovic, T. (2009). Synthesis, Dynamics and Photophysics of Nanoscale systems. Geraadpleegd op 19 november 2019, van https://ui.adsabs.harvard
[59] Robertson, D. (z.d.). *Algal Pigments*. Geraadpleegd op 16 oktober 2019, van https://wordpress.clarku

Er is tijdens het proces gekozen de definitieve uitvoering te doen met de Rhodomonas alg. Ondanks dat het spectrum van de gebruikte lichtbron bekend was, zullen er factoren zijn die invloed kunnen hebben op de betrouwbaarheid van dit gevonden spectrum. Dit omdat het niet mogelijk was het spectrum van de lichtbron zelf nogmaals te meten om het te vergelijken met het verkregen spectrum vanuit de bijsluiter van de lichtbron. Factoren die bijvoorbeeld van invloed kunnen zijn geweest, zijn het water uit de vissenkom waar het licht doorheen is gegaan voor het de algen bereikte, het glas waar het doorheen moest en eventueel ouderdom of slijtage van de lichtbron. Zoals vermeld, kan de exacte golflengte bij de groei van de Chlorella Sorokiniana erg bepalend zijn voor de mate van absorptie van het licht. Bij de Rhodomonas is dit minder het geval. Omdat het mogelijk is dat de lichtbron een (iets) andere golflengte uitgezonden heeft dan in het spectrum zichtbaar is, zonder dat dit merkbaar is, is gekozen om de Rhodomonas alg te gebruiken voor zo betrouwbaar mogelijke resultaten.



Figuur 17: Het spectrum van blauw, groen en rood licht van de gebruikte lichtbron

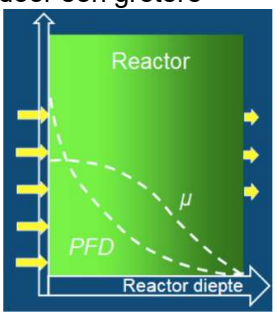
4.4 Licht bij de proefopstelling

Tijdens het proces is gekozen om een LED-lamp te gebruiken voor de verlichting van de algen. Dit omdat de lamp 24 uur per dag heeft moeten branden en dit niet ideaal zou zijn met een gloeilamp, vanwege brandgevaar en het hoge energieverbruik. Ook is gekozen voor LED, omdat slechts 4-6% van de elektrische energie van de lamp gebruikt wordt voor fotosynthese in de alg.[60] Er is gekozen om de lichtbron 24 uur per dag aan te laten staan, omdat voor fotosynthese licht nodig is; anders kan de lichtreactie niet gestart worden. Voor de donkerreactie is geen licht nodig, maar om te voorkomen dat de lichtreactie niet kon plaatsvinden, en daardoor ook de donkerreactie niet, is gekozen de lamp altijd aan te houden. Er is voor deze lichtbron gekozen, vanwege het spectrum dat goed overeenkwam met de hoge absorptiewaarden van fycoerythrine.

[60] Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2013). *Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. Algal Research.* Geraadpleegd op 1 november 2019, van https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004

4.5 Fotoinhibitie

Een nadeel van de gekozen lichtbron was echter dat het een vierkant was dat voor de ronde vissenkom stond. Toen de algen gegroeid waren en de oplossing daardoor een grotere dichtheid gekregen had, was het lastig alle algen voldoende licht te bieden voor de groei. In figuur 18 is het verband tussen lichtintensiteit (PFD; Photon Flux Density) en groeisnelheid (μ) weergegeven. Hierin is te zien dat de algen minder snel zullen groeien wanneer de lichtintensiteit afneemt; dit is aan de achterkant van het medium. Dit probleem zal niet opgelost worden wanneer de intensiteit van lichtbron hoger wordt, want het aantal algen dat zich aan het oppervlak bevindt en dus in staat is deze hoeveelheid licht op te nemen, blijft gelijk. Een hoop van het licht zal op deze manier onnodig verloren gaan, bijvoorbeeld aan carotenoïden. Het kan namelijk gebeuren dat algen die van nature groen zijn, zoals de Chlorella Sorokiniana, een oranje kleur aannemen. Dit gebeurt wanneer een alg aan dusdanig veel licht wordt blootgesteld dat hij fotoinhibitie gaat vertonen. Tijdens fotoinhibitie is er meer licht dan door het pigment, chlorofyl b in het geval van de Chlorella Sorokiniana, opgevangen kan worden, waardoor de alg deze hoeveelheid licht niet meer om kan zetten in energie, omdat de fotosystemen niet meer werken. Er zullen dan carotenoïden ontstaan en de oplossing zal oranje kleuren. De alg produceert carotenoïden aangezien deze licht tegenhouden zonder hier energie uit te winnen.[61] Zo zal voorkomen worden dat de overige lichtenergie de cel binnenin zal beschadigen. Het licht kan dan echter niet meer gebruikt worden voor groei.



Figuur 18: Het verband tussen de lichtintensiteit en de groeisnelheid van algen. (Linssen & Ruano, 2018)

Om te voorkomen dat er fotoinhibitie zou optreden, is er gehandeld volgens de aangeraden verhouding van Gabrielle Verbeeke; dit houdt in dat 10% van een x-volume algencultuur moet zijn en dat de overige 90% van het x-volume vers medium is. Wanneer er minder dan 10% algen overgeënt zouden worden, zal er teveel licht zijn voor de algen en zal fotoinhibitie optreden, terwijl als er meer dan 10% algen oplossing overgeënt wordt, er op den duur te weinig voeding en licht zal zijn om de algen optimaal te laten groeien. Wat echter erg belangrijk is, is om ten alle tijden de stockcultuur te onderhouden. Dan is er altijd een zuivere reserve.

4.6 De gekozen golflengten

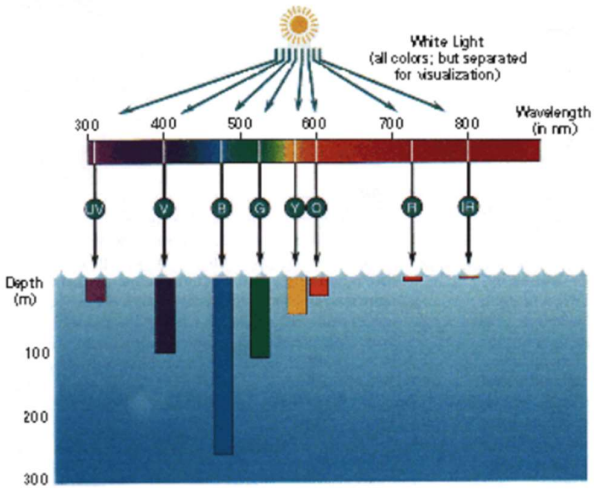
In dit onderzoek wordt de invloed van verschillende golflengten op de groei van de Rhodomonas sp. alg onderzocht. Er is gekozen om te kijken naar de golflengten die de kleuren rood, blauw en groen representeren. Er wordt hier respectievelijk verwezen naar de pieken uit het spectrum van de lichtbron: 630 nm, 460 nm en 520 nm. Deze kleuren zijn gekozen vanwege het spectrum van de gebruikte lichtbron. De pieken van het uitgezonden blauwe en groene licht komen vrijwel exact overeen met de pieken van de absorptie van fycoerythrine; er wordt hier respectievelijk verwezen naar de piek bij 460 nm en bij 520 nm. Dit vergroot de kans dat fycoerythrine het licht zal absorberen en zo een hoge efficiëntie kan bereiken. Ook heeft de lichtbron een piek bij 630 nm; rood licht. Deze golflengte valt niet in het absorptiegebied van fycoerythrine en zal daarom niet (goed) geabsorbeerd worden. Dit is in overeenstemming met

[61] Ruano, T. T., & Linssen, G. (2018 september). *Reader: algen op school*. Geraadpleegd op 1 juni 2019, van https://www.wur.nl/upload_mm/e/d/a/a ; Er zijn meerdere feiten van deze bron gebruikt op deze pagina

het feit dat licht dat de kleur van een voorwerp heeft niet goed geabsorbeerd wordt door dat voorwerp en dat dit daarom weerkaatst zal worden waardoor deze kleur zichtbaar is voor de mens. Er is gekozen om ook te kijken naar de invloed van rood licht, om te kijken of de theorie ook daadwerkelijk overeen zal komen met de gevonden resultaten.

De golflengte van licht heeft een verband met de hoeveelheid energie van de fotonen die dat licht bevat, want hoe groter de golflengte, hoe minder energie de fotonen bevatten. In het zichtbare spectrum heeft blauw licht de kortste golflengte en daarom de meeste energie. Fotonen van rood licht daarentegen bevatten de minste energie.

De golflengte is ook van invloed op de mate van doordringen door water, want hoe korter de golflengte is, hoe dieper het licht kan doordringen. Dit heeft te maken met de hoeveelheid energie. Op basis van deze gegevens, kan gedacht worden dat bijvoorbeeld rood licht, dat gebruikt is in dit onderzoek, niet volledig door het bekerglas zou komen. Dit zou daarom erg van invloed kunnen zijn op de resultaten. In afbeelding 19 is dit principe weergegeven. Hier is te zien dat het rode licht dat in het onderzoek gebruikt wordt, met een golflengte van 620 nm, tot ongeveer 20 meter door kan dringen in water. Op basis hiervan, is geconcludeerd dat alle gebruikte golflengten, 520 nm, 460 nm en 630 nm, door het bekerglas zullen dringen, want de diameter van het bekerglas is kleiner dan 20 meter. Dit is van groot belang voor de conclusie.

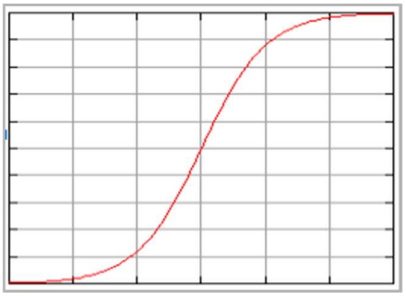


Figuur 19: Het verschilt per golflengte tot hoever licht kan doordringen in water. (Rennie, 2017)

Daarnaast is er expliciet gekozen om geen geel licht te gebruiken, wat wel voor de hand zou liggen aangezien de derde absorptiepiek van fycoerythrine bij geel licht ligt. Deze keuze is gemaakt, omdat geel in het zichtbare spectrum direct tegen groen aan ligt. Hierdoor zou onduidelijkheid kunnen ontstaan door welke golflengte een waarneming is veroorzaakt. De lichtbron kan immers ook een geel licht uitstralen dat meer naar groen neigt, of andersom en dit is niet te controleren, want er is geen apparatuur beschikbaar waarmee het licht dat een lichtbron uitzendt gemeten kan worden. Om zo nauwkeurig mogelijke resultaten te vinden is daarom besloten geen geel licht te gebruiken.

Hoofdstuk 5: De fases van groei

In een gezonde cultuur waar de omstandigheden voor de algen in orde zijn, zullen de algen gaan groeien. De groei van algen kan bijgehouden worden door de dichtheid van de oplossing als maatstaf te gebruiken. Door deze uit te zetten tegen de tijd ontstaat een groeicurve. Deze groeicurve heeft een karakteristieke vorm. De groeicurve van de alg bestaat uit vier fasen: de LAG-fase, de exponentiële fase, de gestationeerde fase en de eindfase.



Figuur 19: De karakteristieke vorm van de groeicurve van algen. De y-as geeft de celdichtheid en de x-as geeft de tijd.(Wikipedia-bijdragers, 2016)

5.1 De LAG-fase

In de LAG-fase is weinig verschil in dichtheid waar te nemen in de groeicurve. Dit komt omdat de algen in de LAG-fase aan het acclimatiseren zijn. Ze wennen aan de omstandigheden en groeien daardoor nog niet zo hard.[62]

5.2 De exponentiële fase

De exponentiële fase is de fase waarin de algen zich ongeremd kunnen delen. Dit is de ideale fase voor de alg en hierin zal de dichtheid van de oplossing het sterkst veranderen. De exponentiële fase duurt maximaal een halve dag. Er is daarom gekozen om op dag 2 tweemaal per dag de dichtheid te meten; eenmaal ‘s ochtends en eenmaal ‘s middags. Zo kon de exponentiële fase goed in beeld gebracht worden.

5.3 De gestationeerde fase

Wanneer de dichtheid van de oplossing sterk toegenomen is, belanden de algen in de gestationeerde fase. Hierin zijn de omstandigheden niet meer geheel optimaal, waardoor de algen in lichte mate gelimiteerd zijn en er een lineair verband ontstaat in plaats van een exponentieel verband. Wanneer verder geëxperimenteerd zal worden met de algen, moeten deze aan het einde van de gestationeerde fase overgeënt worden. Dit gebeurt door een deel van de oplossing weg te nemen en dit te vervangen door nieuw medium. Hier zitten weer nutriënten is die de algen nodig hebben om verder in leven te kunnen blijven.

5.4 De eindfase

Wanneer er niets gedaan wordt met de algencultuur, zal deze zich de eindfase naderen. In deze fase neemt de dichtheid van de oplossing af. Dit komt omdat de algen doodgaan, doordat ze te weinig nutriënten hebben of omdat er een andere fatale factor is geweest, zoals te weinig licht. Wanneer algen sterven, bezinken ze. Hierdoor zal de algehele dichtheid van de oplossing sterk afnemen; de eindfase is waar te nemen.

---

62 Ruano, T. T., & Linssen, G. (2018 september). *Reader: algen op school*. Geraadpleegd op 1 juni 2019, van https://www.wur.nl/upload_mm/e/d/a/a ; Er zijn meerdere feiten van deze bron gebruikt op deze pagina

Hypothese voor het praktisch onderzoek

Aan de hand van het bovenstaande theoretische kader, is de volgende hypothese opgesteld: De Rhodomonas sp. algen zullen het best groeien wanneer zij blootgesteld worden aan het groene licht van de gebruikte lichtbron. Het best wordt hier gedefinieerd als de hoogste celdichtheid van een algencultuur binnen vijf meetdagen. Dit wordt verwacht, omdat het voornaamste pigment in de Rhodomonas sp. alg fycoerythrine is en dit het licht met een golflengte van 545 nm direct op kan nemen. Hierdoor gaat er weinig van de lichtenergie verloren, wat zorgt dat er relatief veel chemische energie gevormd kan worden door de algen. Met deze energie kunnen de algen vermeerderen.

Verder wordt verwacht dat het van de golflengte afhangt hoeveel lichtenergie de Rhodomonas om kan zetten tot chemische energie. Dit vanwege het fycoerythrine pigment dat het best licht kan absorberen met een golflengte van 545 nm. Wanneer veel van deze golflengte afgeweken wordt, kan het pigment niet alle fotonen van het licht opnemen. Zo gaat een deel van de lichtenergie verloren. Dit zorgt ervoor dat er minder chemische energie geproduceerd kan worden en hierdoor zal er minder energie beschikbaar zijn voor de groei, waardoor de algen minder vaak zullen vermeerderen.

Hoofdstuk 6: De gehanteerde methode

6.1 Introductie en uitleg

Tijdens dit onderzoek is gewerkt aan een fotobioreactor waarin een gezonde algencultuur gekweekt kon worden. Deze gezonde cultuur is vervolgens overgeënt in nieuw medium, zodat meerdere bekerglazen met de algencultuur konden ontstaan en deze aan verschillende golflengten blootgesteld konden worden.

Figuur 20: De opstelling waarmee gewerkt is tijdens het praktisch onderzoek. Hier stond echter nog een doos overheen tegen het daglicht.

6.2 De plaats van de opstelling

Om te voorkomen dat de kou van de vloer de temperatuur van het water zou beïnvloeden, is gekozen om de opstelling hoger, op de piano tafel, te plaatsen. Zo is er lucht tussen de opstelling en de grond geweest. Wanneer de opstelling op de grond gestaan had, zou 's nachts de kou uit de grond de groei beïnvloed kunnen hebben, omdat het water dan af zou koelen en daardoor van de optimale temperatuur af zou wijken. Daarnaast is de fotobioreactor afgesloten van het daglicht door middel van een doos die over de gehele opstelling stond. Zo ontvingen de algen enkel licht waarvan de golflengte bekend was. Op deze manier is voorkomen dat daglicht dat de opstelling had kunnen bereiken wanneer er geen doos over de opstelling stond de algengroei beïnvloed heeft. Dit is gedaan om zo nauwkeurig mogelijke meetresultaten te verkrijgen. Op deze manier wordt gekeken naar de invloed van de specifieke kleur van licht op de groei van een algencultuur van de Rhodomonas sp. alg.

6.3 Het gidsexperiment van de metingen

De mate van groei wordt weergegeven in een groeicurve waarin de dichtheid van de algencultuur uitgezet wordt tegen de tijd. Om zeker te zijn dat de algen groeien, wordt de groei eerst een week waargenomen wanneer deze blootgesteld wordt aan wit licht. Hier is destijds groei waargenomen, aangezien de oplossing aanzienlijk donkerder was aan het eind van de week ten opzichten van het begin van de week. Dit meegenomen, wordt 10% van de cultuur (15 mL) overgeënt in nieuw medium (135mL) om nu de groei van de Rhodomonas bij wit licht waar te gaan nemen aan de hand van metingen in plaats van aan de hand van het blote oog. Dit dient ook als gidsexperiment voor de gekozen metingsmethode.

6.4 Gemaakte keuzes bij het praktisch onderzoek

Als blanco is de dichtheid van de cultuur gemeten toen deze net overgeënt was en daarom nog aan geen specifieke kleur was blootgesteld. Zo kon de invloed van de lichtkleur goed gemonitord worden. De cultuur die al even gecultiveerd was voordat het definitieve experiment gestart was, is namelijk overgeënt in drie verschillende bekerglazen. Deze zijn aangevuld met vers medium en toen hebben allen in een aparte opstelling gestaan waar zij allemaal aan een aparte golflengte zijn blootgesteld. Allen begonnen daardoor met dezelfde 'blanco' dichtheid, waarna gekeken kon worden wat een specifieke golflengte gedaan heeft met de groei.
Er is, zoals eerder uitgelegd, gekozen de algen te cultiveren bij rood, blauw en groen licht. De invloed van de kleur licht wordt bepaald door groeicurven te maken van al de situaties en deze te vergelijken met elkaar. Een situatie wordt hier gedefinieerd als een groeiperiode van 5 dagen

waarin een bepaalde hoeveelheid algen wordt blootgesteld aan een zuivere kleur licht waarvan het spectrum afgebeeld staat in figuur 17. Er is voor vijf dagen gekozen, omdat de bepaling uitgevoerd moest worden op school. In het weekend was het daardoor niet mogelijk metingen te doen. Dit zou een grote onnauwkeurigheid veroorzaken. Ook is in dit onderzoek de verhouding van meer belang dan de absolute getallen. Het is belangrijk dat al de culturen in verhouding tot elkaar evenlang aan een bepaalde golflengte blootgesteld worden. Het experiment wordt in triplo uitgevoerd, wat inhoudt dat van iedere situatie drie groeicurven zijn gemaakt. Hier is voor gekozen, omdat de betrouwbaarheid zo toe zal nemen.

Biomassa is een term die beschrijft hoeveel gram algen er per liter aanwezig is. Wanneer de algen erg groot en ‘dik’ zijn, zal de biomassa logischerwijze hoger zijn dan wanneer de algen klein zijn. De celdichtheid daarentegen neemt toe als de algen gaan delen, want celdichtheid geeft aan hoeveel algen er in een mL zitten.

Er is in dit onderzoek gekozen om te kijken naar de celdichtheid, aangezien deze gemeten kan worden. Voor de biomassa was dit, door een gebrek aan materialen en tijd, niet mogelijk.
In de groeicurven wordt de dichtheid van de algencultuur uitgezet tegen de tijd in dagen. Er is gekozen voor de dichtheid op de y-as, omdat dit een meetbare variabele is in het proces. De dichtheid van de oplossing zou gemeten kunnen worden aan de hand van fotospectrometrie en aan de hand van een microscopische bepaling met behulp van een telkamer. Er is gekozen voor de tweede bepalingsmethode, want dit zal gezien de beperkte hoeveelheid algencultuur nauwkeuriger zijn. Bij de fotospectrometrie zal voor een nauwkeurig resultaat gewerkt moeten worden met verdunningen. Het was niet haalbaar om dusdanig veel cultuur te maken dat er iedere dag meerdere verdunningen gemaakt zouden kunnen worden om de cuvetten te vullen voor de fotospectrometrie. Er zou dan meer van de cultuur uitgaan dan dat er bij komt, wat uiteindelijk zal zorgen dat de cultuur opraakt. Met de 150 mL cultuur zou dit moment binnen de drie weken van het experiment vallen, waardoor dit niet mogelijk zou zijn. Voor de microscopische bepaling met behulp van de telkamer is slechts 10 micromililiter nodig om een meting te doen. Hierdoor kon iedere dag gemeten worden, wat een goed beeld heeft kunnen geven van het groeiproces.

6.5 Materialen en methoden

De Rhodomonas sp. alg is verkregen van de HZ University of Applied Sciences, te Vlissingen. Iedere 5 à 6 dagen is 10% van de cultuur overgeënt in nieuw medium om de algen te voorzien van genoeg nutriënten.
Benodigde materialen bij het maken van de fotobioreactor

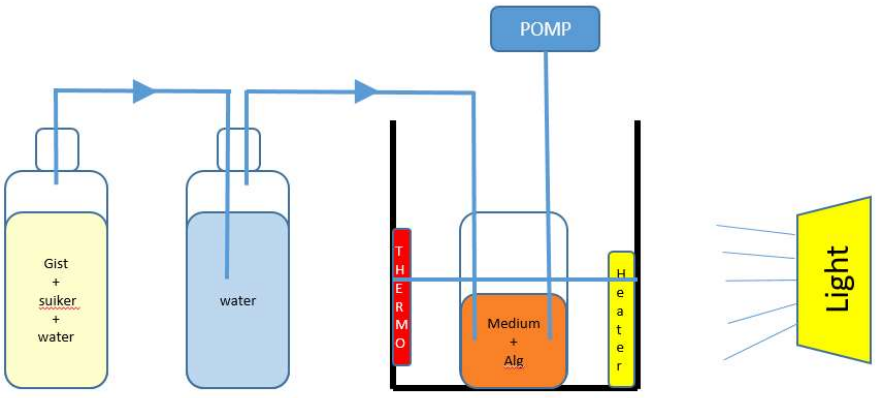
- vier 1L flessen
- vier 1,5 L flessen
- 14 meter slang; diameter: 6 mm
- 2 zakken trek watten
- 2 verlengsnoeren
- 1 fotosynthese lamp
- Spuitkit
- 2 aquariumpompen
- 2 thermometers
- 2 verwarmingselementen voor een aquarium
- 2 bakstenen
- 1 tupperware doos
- 4 elastieken
- 2 vissenkommen
- 2 T-stukjes
- 6 kraantjes om hoeveelheid lucht mee af te stellen
- 3 à 4 kilo witte kristalsuiker
- 42 zakjes gist van 7 gram
- algencultuur
- demiwater
- 70% alcohol
- kraanwater
- 4 bekerglazen 600 mL
- 1 diffuser voor lucht

Methode voor het maken van de fotobioreactor
! Vele belangrijke aspecten van de fotobioreactor zijn verwerkt in de theorie. Daarin zijn ingenieurs problemen beschreven, met bijbehorende oplossingen. Ook is daar te lezen over meerdere waarnemingen die zijn gedaan tijdens het proces en keuzes die gemaakt zijn. Hier volgt daarom slechts een korte weergave waarin enkel beschreven staat hoe de bouw van de fotobioreactor verlopen is. Voor de uitgebreidere weergave, zie het theoretische kader.

- Vul de vissenkom met enkele liters water; zodat het ongeveer tot de helft gevuld is
- Plaats de tupperware doos, met hierin een baksteen en water, zodat deze zal zinken, op de bodem van de vissenkom. Dit wordt gedaan zodat de algencultuur zich onder water bevindt en zo de temperatuur van het opgewarmde water kan aannemen. Wanneer de tupperware doos weggelaten wordt, zit er dusdanig veel water in de vissenkom dat de bekerglazen om zullen vallen of vol zullen lopen met water. Door de doos, bevinden de algen zich wel onder water, maar oefent het bekerglas genoeg druk uit, ten opzichten van het omringende water, om stabiel te blijven staan.
- Bevestig het verwarmingselement aan de ene zijde van de vissenkom en stel deze in op 21 graden voor de Rhodomonas; voor de Chlorella wordt een temperatuur van 35 graden gehanteerd. LET OP: zorg dat het verwarmingselement zich geheel onder water bevindt. Wanneer hier niet aan wordt voldaan, zal het doorbranden en een gevaar vormen!
- Bevestig aan de andere zijde van de vissenkom, zo ver mogelijk van het verwarmingselement, de thermometer

- Sluit de bekerglazen waar de algencultuur zich in bevindt af door hier trek watten overheen te leggen. Sluit dit geheel af met behulp van een elastiek
- Plaats de bekerglazen met de algencultuur op de tupperware doos.
- Boor 2 gaten met een diameter van ongeveer 6,5 mm in de dop van de 1L fles en in die van de 1,5 L fles
- Bevestig de doorzichtige slangen, zoals in figuur 11 is weergegeven
- Kit de geboorde gaten dicht wanneer de slangetjes hierin bevestigd zijn. Doe dit zowel aan de binnen- als aan de buitenzijde om lekkage van lucht te voorkomen
- Vul de 1L fles met kraanwater
- Vul de 1,5 L voor 1L met lauw tot warm kraanwater
- Weeg 100 gram kristalsuiker af en voeg dit toe aan het water in de 1,5L fles
- Schud totdat de suiker opgelost is in het water
- Voeg een zakje van 7 gram gist toe aan de 1,5 L fles.
- Schud opnieuw tot het geheel is vermengd
- Bevestig de slang die uit de 1,5L fles komt in de algencultuur
- Knip 1 stuk slang van ongeveer 8 cm
- Knip dit stuk in tweeën en bevestig het eerste kraantje tussen beide stukken
- Aan het einde van het tweede stukje wordt het T-stuk bevestigd
- Knip 2 gelijke, korte stukken slang
- Bevestig deze aan beide zijden van het T-stuk
- Knip 2 gelijke, langere stukken slang
- Bevestig deze aan beiden andere zijden van het T-stuk
- Bevestig aan het einde van de slang aan beide kanten een kraantje toe
- Knip twee lange, gelijke stukken van de slang en bevestig deze aan de andere zijde van het kraantje
- Plaats de uiteinden van deze slangen in het alge medium. LET OP: het is van belang dat de lucht, afkomstig van de aquariumpomp, de bodem van de cultuur bereikt, want anders wordt hier niet belucht. Bevestig daarom de slang zo aan de vissenkom, met tape, dat deze eindigt op de bodem van de cultuur!
- Plaats de lamp op enkele centimeters afstand van de vissenkom en zet deze aan
- Zorg dat de lamp de gewenste kleur licht uitzendt
- Plaats een doos over het geheel, waar een kijkgat en een gat aan de bovenkant in zit. Het gat aan de bovenkant van de doos moet dusdanig groot zijn, dat er een hand doorheen past om een sample uit de bekerglazen te nemen voor de bepaling. Het kijkgat is enkel om doorheen te kijken.

Onderstaand is een gemaakte tekening bijgevoegd. Hierop is een beknopte weergave te zien van de gemaakte fotobioreactor. De horizontale lijn boven de algencultuur stelt hierin het waterniveau voor. De zwarte bakt is de vissenkom die gebruikt is.



Figuur 21: Een schematische weergave van de proefopstelling.

Benodigde materialen bij het maken van het medium voor de Rhodomonas

- 1 mL Kaliumfosfaat
- 1 mL Natriumnitraat
- 0,5 mL vitaminen-oplossing; zie bijlage 11.1
- 1 mL sporenelementen-oplossing; zie bijlage 11.1
- 500 mL maatkolf met stop
- Handmatige pipet; 0,5 mL en 0,25 mL
- Kokend water
- Demiwater
- Trechter
- Aquarium zout; tetra marine sea salt
- 70% alcohol
- Druppelpipet
- Steriele spuit
- Steriel filter 0,2 um

Methode bij het maken van het medium voor de Rhodomonas

! Al het glaswerk moet voor en na gebruik schoon gespoeld worden met demiwater en gedroogd worden.

! De benodigde oplossingen, kaliumfosfaat, natriumnitraat, vitaminen-oplossing en de sporenelementen-oplossing, zijn verkregen van HZ University of Applied Sciences, te Vlissingen, evenals het aquarium zout.

- Spoel de 500 mL maatkolf met kokend water
- Spoel de 500 mL maatkolf met 70% alcohol
- Spoel de 500 mL maatkolf driemaal met demiwater
- Vul de 500 mL maatkolf aan tot ongeveer 450 mL met demiwater
- Weeg 30 gram tetramarine seasalt af
- Breng dit kwantitatief over in de 500 mL maatcilinder en homogeniseer
- Pipetteer 0,5 mL kaliumfosfaat
- Breng dit kwantitatief over in de 500 mL maatcilinder en homogeniseer
- Pipetteer 0,5 mL natriumnitraat
- Breng dit kwantitatief over in de 500 mL maatcilinder en homogeniseer
- Neem 0,5 mL van de sporenelementen-oplossing met de steriele spuit
- Pers de 0,5 mL door het steriele filter van 0,2 um
- Breng de door het filter geperste oplossing van sporenelementen kwantitatief over in de 500 mL maatcilinder en homogeniseer
- Pipetteer 0,25 mL van de vitaminen-oplossing
- Breng dit kwantitatief over in de 500 mL maatkolf en homogeniseer
- Vul de oplossing tot 500 mL aan met demiwater

! Tussen het toevoegen van stoffen aan de maatkolf moet telkens enkele tijd gewacht worden, zodat de toegevoegde stof eerst goed kan oplossen. Wanneer dit niet gedaan wordt, zal er een reactie ontstaan tussen het nitraat of fosfaat en de sporenelementen. Er is gekozen telkens een halve minuut te wachten.

! Spoel de randen van de trechter, wanneer deze gebruikt is, met demiwater, zodat de volledige hoeveelheid van de stof in de oplossing terechtkomt.

Benodigde materialen bij het maken van het medium voor de Chlorella sorokiniana

! Al het glaswerk moet voor en na gebruik schoon gespoeld worden met demiwater en gedroogd worden.

- $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
- KH_2PO_4
- $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$
- $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$
- $Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$
- $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
- $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
- H_3BO_3
- $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$
- Ureum
- 1 L maatkolf met stof
- Kokend water
- 70% alcohol
- Analytische balans
- Spatel
- 9 afweegpapiertjes
- Trechter
- Maatkolf
- Druppelpipet

Methode bij het maken van het medium voor de Chlorella sorokiniana

- Spoel de 1L maatkolf met kokend water
- Spoel de 1L maatkolf met 70% alcohol
- Spoel de 1L maatkolf driemaal met demiwater
- Vul de 1L maatkolf aan tot ongeveer 950 mL met demiwater
- Weeg de hoeveelheden die weergegeven zijn in bijlage 11.2 af met behulp van de analytische balans en een spatel
- Breng bovenstaande hoeveelheden een voor een kwantitatief over en homogeniseer tussentijds
- Wanneer alle stoffen toegevoegd zijn; vul de oplossing aan tot 1L met demiwater en homogeniseer nogmaals

! Spoel de randen van de trechter, wanneer deze gebruikt is, met demiwater, zodat de volledige hoeveelheid van de stof in de oplossing terechtkomt.

Benodigde materialen bij de microscopische bepaling van de dichtheid van de algencultuur

- Glazen pipet
- Euromex BioBlue 40-1000x lichtmicroscoop
- Dekglaasje
- Bürker telkamer; ofwel de hemocytometer
- Algencultuur
- Resultatentabel
- Aceton

Methode voor het uitvoeren van de microscopische bepaling met behulp van de telkamer

1. Maak het preparaat klaar
- Bevestig het dekglaasje onder de klemmen van de Bürker telkamer. Doe dit zo dat er regenboogkleuren waar te nemen zijn aan de zijkanten van het dekglaasje. Ook zullen er Newtonringen ontstaan door de druk van de beide klemmen op het dekglaasje.
- Pipetteer met de glazen pipet de algencultuur door de glazen pipet tegen het dekglaasje te zetten.
- Pipetteer door tot de ruimte tussen de bruggen van de telkamer gevuld is
- Doe dit ook aan de andere kant van de brug in het midden van de telkamer; zie figuur 23, met dezelfde algencultuur

2. Maak de opstelling klaar
- Zet het licht van de microscoop aan
- Zorg dat het diafragma van de microscoop volledig gesloten is
- Zorg dat de microscoop op de rode vergroting staat (40x vergroot)
- Zorg dat de resultatentabel bij de hand is

3. Voer de bepaling uit
- Zoek beeld bij de rode vergroting van de microscoop; beeld is hier gedefinieerd als het zicht dat waarneembaar is wanneer gelijkvormige, lichtgrijze lijnen te zien zijn. Ook zijn de algen zichtbaar als er gesproken wordt van 'beeld'.
- Wanneer juist beeld is gevonden bij de rode vergroting, kan deze vervangen worden door eerst de gele vergroting (100x vergroot) en uiteindelijk de blauwe vergroting (400x vergroot); beweeg hierbij niet de ligging van het preparaat!
- Zorg dat bij de blauwe vergroting ook juist beeld ontstaat door aan de grote scherpstelknop te draaien.
- Tel het aantal algen aan beide kanten van de brug van de telkamer in 12 gelijkvormige vakjes
- Noteer het aantal getelde algen per vakje in de resultatentabel

! Voeg tijdens het klaarmaken van het preparaat aan de algencultuur een druppel toe. Dit om te zorgen dat de algen zullen sterven en deze daardoor niet zullen bewegen tijdens het tellen van de algen.

Figuur 22: De lichtmicroscoop waarmee gewerkt is.

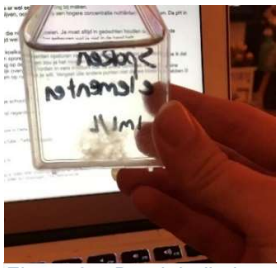
Figuur 23: De telkamer. De horizontale streep in het midden vormt de brug. De Oplossing wordt gepipeteerd in beide rechthoeken naast de burg.

Hoofdstuk 7: Resultaten

Tijdens het praktisch onderzoek zijn de Rhodomonas sp. algen gecultiveerd. Hierbij zijn iedere dag nieuwe waarnemingen gedaan. Velen zijn al benoemd in het theoretisch kader, maar hier zal een overzicht volgen van enkele belangrijke waarnemingen aan de hand van foto's. Ook is het aantal algen van een cultuur gedurende vijf dagen bijgehouden. In dit hoofdstuk zullen deze gegevens verwerkt worden.

7.1 Waarnemingen

In eerste instantie is gewerkt met de Rhodomonas alg. Hiervoor is het medium gemaakt, maar in het verkregen flesje met de sporenelementen was een vlok ontstaan; figuur 24. Dit zou geen schimmel moeten zijn, maar een chemische reactie tussen verschillende elementen in het flesje waardoor de samenklontering is ontstaan. Het zou in het uiteindelijke medium op moeten lossen. Dit werd onderbouwd door de manier waarop in Vlissingen gewerkt wordt met de algen. Wel zag de vlok eruit als een schimmel en het kon niet uitgesloten worden dat dit geen schimmel was. Er is daarom gekozen tweemaal een halve liter van het medium te maken in plaats van eenmaal 1 L. Zo kon de kans dat een deel van de vlok in het uiteindelijke medium terecht zou komen, gespreid worden, waardoor de kans op zuiver medium, en daardoor indirect goed groeiende algen, toenam. Ook is de oplossing met de sporenelementen door een steriel filter van 0,2 µm gespoten met behulp van een steriele spuit. Zo zou de kans ook afnemen dat een deel van de vlok in het uiteindelijke medium terecht zou komen. De algen zijn overgeënt in het gemaakte medium en het overige medium dat nog niet gebruikt was, is apart gehouden voor later. Na enkele dagen bleek het overige medium echter troebel te zijn geworden zonder dat er iets mee gedaan was en zonder dat het blootgesteld was aan de atmosfeer, en dus eventuele bacteriën. Deze waarneming is gedaan in de periode dat de Rhodomonas algen niet naar wens groeiden. De cultuur was op dit moment al gelig. Dit wees erop dat de sporenelementen waarschijnlijk toch niet goed waren. Dit ook omdat deze in de koelkast bewaard hadden moeten worden, bleek achteraf. Dit zal de eerste uitvoering met de Rhodomonas beïnvloed hebben, want ook het medium dat bij de algen zat zal op zijn manier troebeler zijn geworden, wat niet gunstig is voor de algen.



Figuur 24: De vlok die in de oplossing met de sporenelementen is ontstaan.

Figuur 25: De manier waarop het sample verkregen is in Vlissingen.

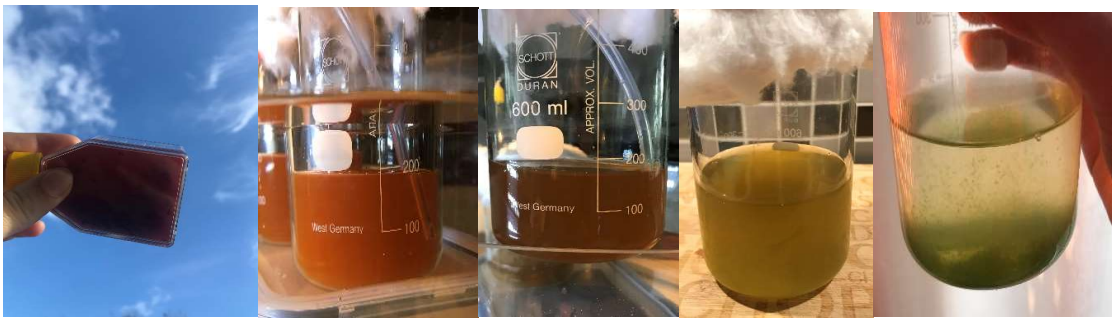
Figuur 25: Het troebel geworden medium.

Bij de tweede uitvoering met de Rhodomonas zat er opnieuw eenzelfde vlok in de oplossing van de sporenelementen, terwijl deze oplossing nu wel in de koelkast bewaard was. Ook nu is deze door het steriele filter van 0,2 µm gespoten met de steriele spuit, waarna het toegevoegd is aan het nieuw gemaakte medium. Tijdens de tweede uitvoering van de Rhodomonas algen, zijn de algen echter wel goed gegroeid. Hieruit is geconcludeerd dat het waarschijnlijk toch niet de vlok in de sporenelementen is geweest die de algen fataal is geworden bij de eerste uitvoering, maar dat dit eerder aan het gebrek aan beluchting heeft gelegen. Dit is meegenomen in het vervolg van de proef. Uiteindelijk is er toch gekozen om de definitieve uitvoering van het onderzoek te doen met de Rhodomonas sp. alg. In hoofdstuk 4: *Licht* wordt verder ingegaan op deze keuze.

Voor de CO_2-toevoer is getest of er daadwerkelijk CO_2 door het tweede slangetje kwam. Dit is gedaan met behulp van kalkwater. Dit is troebel en wit geworden, wat bevestigd dat er CO_2 toegevoerd wordt. De volgende reactie vindt dan plaats: $Ca(OH)_2 + CO_2 \rightarrow CaCO_3 + H_2O$. $CaCO_3$ is een zout dat zorgt voor het troebel worden van de oplossing.

Figuur 26: Het troebel geworden kalkwater.

In onderstaande vijf foto's wordt de levensloop van de eerste Rhodomonas cultuur weergegeven. Te zien is dat de kleur van bordeauxrood steeds bruiner wordt, tot deze uiteindelijk zelfs groen wordt, zoals op de vijfde afbeelding. Hier is ook duidelijk te zien dat de algen vrijwel allemaal bezonken zijn. Deze cultuur is niet meer gezond. Tijdens de tweede uitvoering met de Rhodomonas hebben de algen het gehele meetproces de bordeauxrode kleur van afbeelding een gehad.



Figuur 27: De levensloop van het eerste sample Rhodomonas algen. Uiteindelijk zijn deze overleden.

Toen de Chlorella Sorokiniana nog gecultiveerd werd, is eenmaal duidelijke condens waargenomen op de watten, zoals in het logboek beschreven. Ook werden er algen waargenomen op de watten. Dit duidt op condensatie. De foto laat de watten zien die over het bekerglas gespannen waren.

Figuur 28: De watten met de algen en het condens.

Figuur 29: De gebruikte opstelling

De opstelling waarmee gewerkt is tijdens het praktisch onderzoek. Hier stond echter nog een doos overheen tegen het daglicht. Achter de vissenkom staat de lichtbron en op de bodem van de vissenkom liggen stenen. Deze zorgen ervoor dat het verwarmingselement geheel onder water kan staan, net als de culturen, maar dat deze niet omvallen vanwege de opwaartse kracht van het water op het bekerglas. Aan beide zijden staat een CO_2-toevoer waarin de fermentatie plaatsvindt.

De microscopische bepaling is gedaan met behulp van een lichtmicroscoop. Op deze afbeelding is te zien wat waargenomen kon worden tijdens de bepaling. De algen zijn met behulp van aceton gedood, waardoor ze niet meer bewogen tijdens de bepaling.

Figuur 30: De algen bekeken door een microscoop.

7.2 Meetgegevens

Tijdens het praktisch onderzoek is het aantal algen van een cultuur gedurende vijf dagen bijgehouden. Dit is, zoals eerder besproken, gedaan met behulp van de telkamer.
De inhoud van de telkamer bedraagt 0,25 x 0,25 x 0,1 = 6,3 x 10^{-3} mm^3. Dit staat gelijk aan 6,3 x 10^{-6} mL. Er is gekozen de celdichtheid weer te geven in aantal cellen per mL, omdat dit praktischer is. In onderstaande tabel is het getelde aantal cellen in 1 mL weergegeven. Dit is berekend door het aantal getelde cellen (in 6,3 x 10^{-3} mm^3) te vermenigvuldigen met 160000. Dit omdat 6,3 x 10^{-3} maal 160000 1mL geeft.

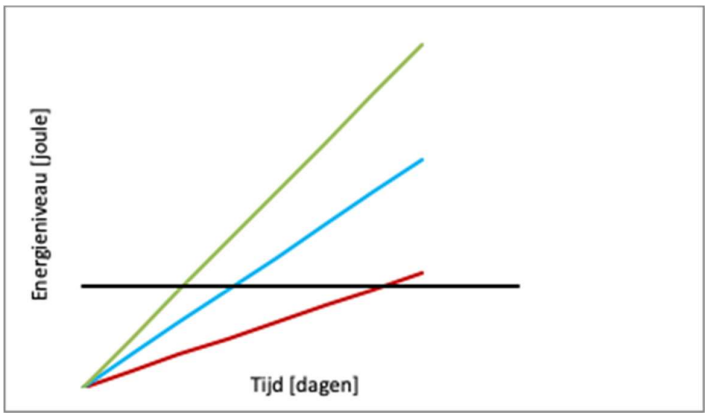
De metingen van het praktisch onderzoek zijn in triplo uitgevoerd. Er wordt daarom bij de tabellen en de grafieken gesproken over meting 1, meting 2 en meting 3. De getallen in de tabellen geven de gemeten celdichtheid weer in 10^6 cellen per mL.

Voordat de culturen blootgesteld werden aan een specifieke kleur licht, zijn ze gecultiveerd onder wit licht. Dit is gedaan zodat bevestigd kon worden dat de Rhodomonas algen leefden onder de beschreven omstandigheden. Vervolgens is de cultuur overgeënt. Na het overenten, dus nog voordat de cultuur aan een bepaalde lichtkleur was blootgesteld, is de dichtheid gemeten. Dit was de blanco meting. Dat deze blanco meting bij meting een zowel bij blauw als bij rood en groen 0,50 is, komt omdat alle drie deze culturen afkomstig zijn van dezelfde stock cultuur. Deze heeft een bepaalde dichtheid en daarom zijn deze drie waarden gelijk. Dit geldt ook voor meting 2 en 3.

Hoofdstuk 8: Verwerking van de resultaten

Het licht dat algen opnemen met behulp van pigmenten wordt omgezet in energie en vervolgens enerzijds gebruikt voor de groei van de alg, waarin deze in grootte en gewicht toe zal nemen, onder andere door de toenemende hoeveelheid olie die gebruikt kan worden voor brandstof. Anderzijds wordt energie gebruikt voor het vermeerderen van de alg; het delen. Wanneer algen zich in stress omstandigheden bevinden, wordt het voornaamste deel van de beschikbare energie gebruikt voor de groei. Als de omstandigheden optimaal zijn, gaat de meeste energie zitten in het delen.
In dit onderzoek zijn de omstandigheden, voor zover mogelijk, optimaal gehouden, waardoor de algen zich voornamelijk zullen hebben gedeeld.

Voor het delen van cellen, en zo ook algen, is een bepaalde energie nodig. Er kan niet gedeeld worden als deze waarde niet bereikt is, omdat de alg dan niet genoeg energie heeft. Wanneer de waarde van energie die bereikt moet worden voor het delingsproces kan beginnen x wordt gesteld kan onderstaande grafiek gemaakt worden. Hierin vertegenwoordigen de kleuren van de lijnen de kleuren van het gebruikte licht; groen, blauw en rood. De zwarte lijn is de gestelde x-waarde die nodig is om het delingsproces van de alg te starten. Er is expliciet gekozen de getallen weg te halen, omdat het gaat om de verhouding.



Er is hier weergegeven dat het bij rood licht het langst duurt tot de x-waarde bereikt is. Dit is te verklaren met het feit dat het pigment dat met name aanwezig is in de Rhodomonas, fycoerythrine, het best licht met een golflengte van 545 nm op kan nemen. In BiNaS tabel 19A wordt weergegeven dat het groene licht een golflengte heeft tussen 520-550 nm, blauw licht tussen 500-460 nm en rood tussen 620-750 nm. De golflengte die fycoerythrine voornamelijk opneemt, ligt dus in het groene spectrum. Groen licht bevat daardoor fotonen die fycoerythrine direct op zou kunnen nemen, waardoor groen licht in verhouding met rood licht aanzienlijk sneller de x-waarde kan bereiken, wat groen licht erg efficiënt maakt. Rood licht zal, onder andere door andere pigmenten die aanwezig zijn in de Rhodomonas, zoals chlorofyl, ook wel opgenomen worden, maar beduidend minder, omdat deze pigmenten ook beduidend minder aanwezig zijn in de alg. Wel wordt er dezelfde hoeveelheid rood licht gebruikt als groen licht; er worden van beide kleuren evenveel fotonen afgeschoten door de lichtbron. Omdat er van deze hoeveelheid fotonen bij rood licht minder opgenomen worden door fycoerythrine dan bij groen en blauw licht, wordt het rendement van het rode licht lager en zal het langer duren tot de alg de energie heeft die nodig is zodat deze kan beginnen met delen.
Blauw licht zal beter opgenomen worden dan rood licht, omdat 545 nm relatief dicht bij het blauwe spectrum ligt, wanneer dit vergeleken wordt met het rode spectrum.
Deze gegevens en het rendement zijn van invloed op hoe snel de algen beginnen met delen; het moment dat de groeicurve gaat stijgen.

Zoals in hoofdstuk vijf weergegeven, kan de mate van delen van algen weergegeven worden in een groeicurve waarin de celdichtheid uitgezet wordt tegen de tijd. Deze curve heeft een vaste vorm die is opgebouwd uit de verschillende fases die in hoofdstuk vijf besproken zijn. Zoals te zien is in de groeicurven hebben deze fases, afhankelijk van de gebruikte lichtkleur, een specifieke tijdsduur. Ook is enkel bij groen licht de gehele curve te zien.

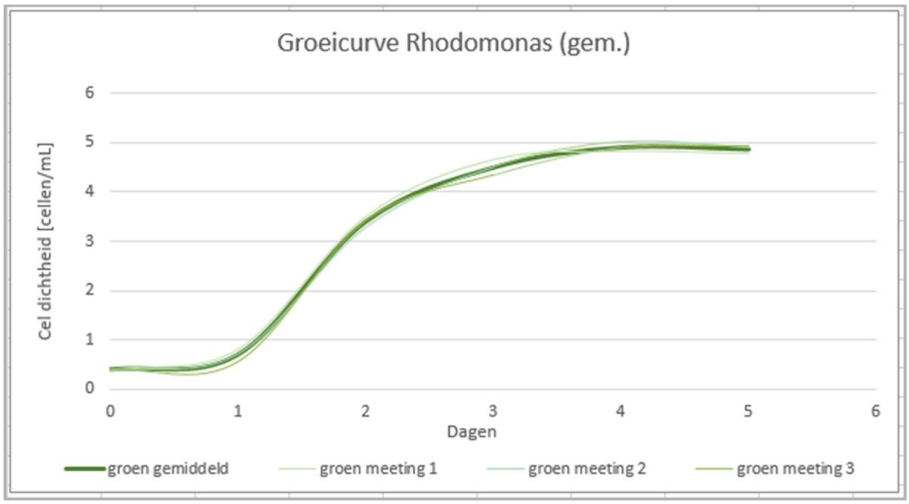
Onderstaand zijn de tabellen en de grafieken bijgevoegd die horen bij de metingen die gedaan zijn. De kolom 'gemiddeld' geeft de gemiddelde gemeten dichtheid aan. Rechts van deze kolom worden de specifieke waarden weergegeven voor de aparte metingen uit het triplo. Zo is direct te zien hoeveel de gemeten dichtheid van een meting verschilt van de gemiddelde gemeten dichtheid van de cultuur die gecultiveerd is onder deze kleur.

De groeicurve van de algen onder bestraling van groen licht

Dagen	groen gemiddeld	groen meeting 1	groen meeting 2	groen meeting 3
0 (blanco)	0,45	0,50	0,40	0,44
1	0,72	0,81	0,73	0,62
2	3,40	3,49	3,29	3,42
3	4,53	4,64	4,56	4,41
4	4,91	4,81	5,02	4,9
5	4,87	4,76	4,91	4,94

Figuur 31: De gemeten dichtheden van de Rhodomonas cultuur die gecultiveerd is onder groen licht. De waarden zijn in 10^6 cellen per mL.

De meetgegevens uit de figuur 31 zijn gebruikt om onderstaande grafiek te maken. Hierin is de onderlinge afwijking weergegeven met verschillende kleuren.



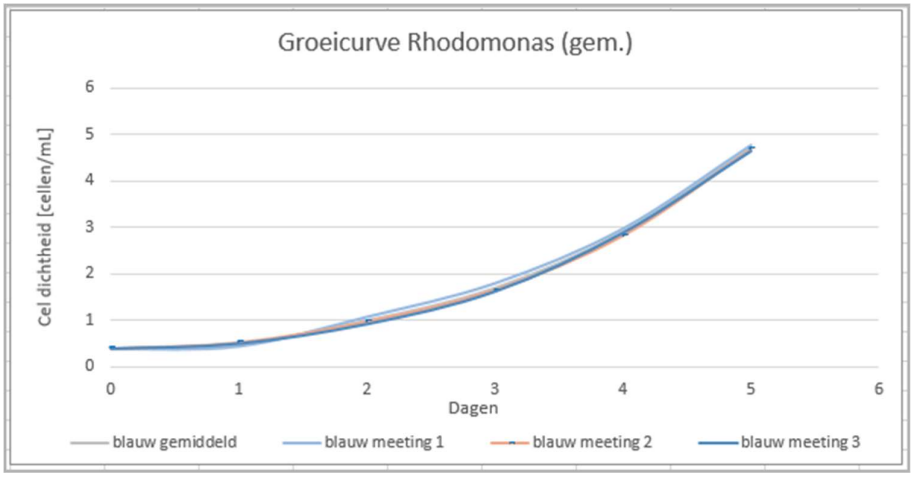
Opmerkelijk aan de groene curve is dat deze het eerste zijn piek bereikt. Dit zal komen door het eerder uitgelegde principe. Het spectrum van het groene licht dat gebruikt is tijdens het onderzoek is in figuur 17 weergegeven. De piek bevindt zich bij 520 nm, maar zoals weergegeven, wordt 545 nm ook uitgezonden door het groene licht. Dit zal direct opgenomen worden door fycoerythrine en omgezet worden in energie. Van 545 nm is het rendement optimaal. Bij 520 nm zal dit rendement wat lager zijn, maar nog steeds erg hoog, omdat 520 relatief dichtbij 545 ligt. Dit verklaart dat bij groen licht de energie die nodig is om te delen het eerst behaalt zal worden. Wanneer dit vertaald wordt naar de groeicurven, is te zien dat de grafiek in de exponentiële fase relatief erg stijl omhoog loopt in vergelijking met de rode en blauwe curve. Dit zal komen door het hoge rendement tussen de hoeveelheid energie die uitgezonden wordt door de lichtbron en de hoeveelheid energie die omgezet wordt en daardoor beschikbaar is voor de alg om te kunnen delen. Dit hoge rendement wordt veroorzaakt door het pigment fycoerythrine, dat voornamelijk 545 nm opneemt. Ook is bij de groene curve de gestationeerde fase waar te nemen. Dit zal komen omdat de algen in vijf dagen dusdanig gegroeid zijn, dat de oplossing een grote dichtheid heeft bereikt. Hierdoor is waarschijnlijk een tekort aan licht de beperkende factor geworden waardoor de algen niet meer ongeremd konden delen, maar dit is niet met zekerheid te zeggen, omdat dit niet te meten is. Wel kan gezegd worden dat er een beperkende factor is geweest, omdat er een traditionele gestationeerde fase waar te nemen is, deze wordt veroorzaakt door een beperkende factor. Ook is de eindfase te zien in de groene curve. De dichtheid werd hier minder, zoals te zien in figuur 31. Dit duidt op een stervende cultuur. De algen bezinken dan, waardoor de algehele dichtheid afneemt.

De groeicurve van de algen onder bestraling van blauwe licht

Ook voor blauw licht zijn de tabel en de grafiek met de meetgegevens bijgevoegd.

Dagen	Blauw gemiddeld	Blauw meeting 1	Blauw meeting 2	Blauw meeting 3
0 (blanco)	0,45	0,50	0,40	0,44
1	0,50	0,46	0,53	0,51
2	1,00	1,09	0,98	0,95
3	1,72	1,88	1,65	1,63
4	2,91	2,98	2,81	2,92
5	4,66	4,77	4,78	4,45

Figuur 32: De gemeten dichtheden van de Rhodomonas cultuur die gecultiveerd is onder blauw licht. De waarden zijn in 10^6 cellen per mL.



Gebaseerd op vijf meetdagen bestaat de blauwe groeicurve uit een LAG-fase en exponentiële fase. Hierin ontbreken de gestationeerde fase en de eindfase. Ook loopt de grafiek in de exponentiële fase minder stijl omhoog dan bij de groene groeicurve. Er is geen sprake van een beperkende fase, want er is geen gestationeerde fase waargenomen. Wel loopt de grafiek exponentieel, maar het rendement van de energie zal lager liggen dan bij groen licht waardoor de algen onder blauw licht minder energie bevatten dan algen onder groen licht als gekeken wordt naar een willekeurig tijdstip Y. Hierdoor zal de deling minder snel verlopen dan bij algen onder groen licht: de grafiek loopt minder stijl. Dit komt overeen met de waarnemingen. De cultuur die vijf dagen blootgesteld was aan blauw licht, was minder donkerrood dan de cultuur die gegroeid is onder groen licht. Doordat de cultuur minder donker van kleur was, was ook de celdichtheid lager. Dit kan ervoor gezorgd hebben dat het licht nog door de oplossing is gekomen en het daardoor geen beperkende factor vormde. Na vijf dagen, was de groeicurve van de algen die blootgesteld zijn aan blauw licht nog niet compleet.

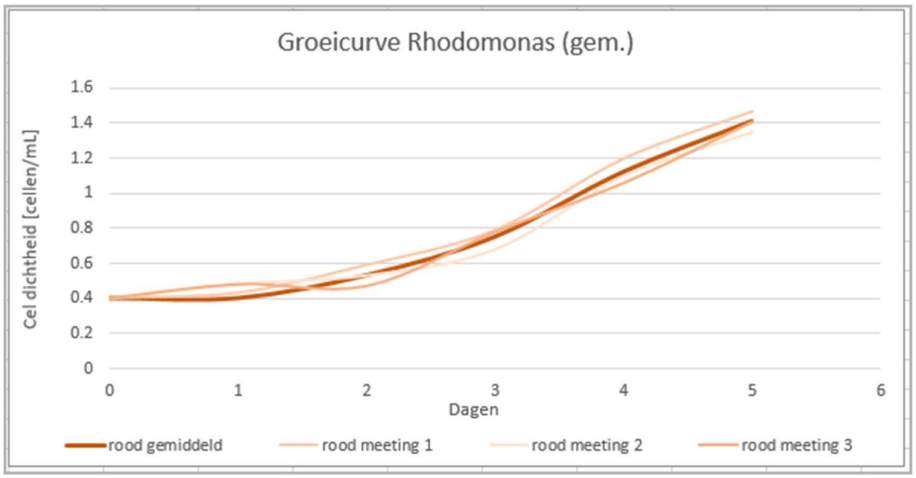
De groeicurve van de algen onder bestraling van rood licht

Hetzelfde is gedaan voor de cultuur die gecultiveerd is onder rood licht.

Dagen	Rood gemiddeld	Rood meeting 1	Rood meeting 2	Rood meeting 3
0 (blanco)	0,45	0,50	0,40	0,44
1	0,40	0,43	0,48	0,48
2	0,53	0,59	0,53	0,47
3	0,75	0,79	0,68	0,78
4	1,12	1,20	1,10	1,06
5	1,41	1,47	1,35	1,41

Figuur 33: De gemeten dichtheden van de Rhodomonas cultuur die gecultiveerd is onder rood licht. De waarden zijn in 10^6 cellen per mL.

Deze waarden zijn omgezet tot onderstaande grafiek.



Het verloop van de rode groeicurve is erg afwijkend ten opzichte van de groene en blauwe groeicurve. Bij de rode groeicurve komen de algen niet in de exponentiële fase terecht. Wel is er groei waargenomen, maar dit vertaald zich meer naar een lineaire lijn dan een exponentiële lijn. Een afwijking bij rood licht is wel in overeenstemming met de gevonden literatuur. Omdat de Rhodomonas een rode kleur heeft, kan gezegd worden dat deze alg rood licht weerkaatst. De Rhodomonas bevat echter ook andere pigmenten, zoals chlorofyl a en b, maar deze pigmenten zijn beduidend minder aanwezig in de alg. Chlorofyl is een pigment dat juist rood licht absorbeert en hierdoor zal wel een deel van het rode licht geabsorbeerd worden. Dit zorgt dat er wel energie gevormd wordt met behulp van fotosynthese waardoor groei kan plaatsvinden. Dat deze groei zich niet in een exponentiële lijn vertaalt, kan verklaard worden doordat chlorofyl relatief minder aanwezig is in de Rhodomonas, als dit vergeleken wordt met fycoerythrine. Er zal dus sprake zijn van een laag rendement. Bij de cultuur die blootgesteld is aan rood licht, zal het gebrek aan genoeg energie de beperkende factor zijn geweest die heeft gezorgd dat er niet voldoende energie is om ongeremd te delen, zoals bij de exponentiële fase hoort.

Verder is opvallend dat bij alle golflengten de LAG-fase vrijwel even lang duurt. Dit zal komen doordat het telkens dezelfde soort alg is die gebruikt is gedurende het onderzoek. In de LAG-fase wendt de alg aan de omgeving, de duur hiervan wordt daarom voornamelijk bepaald door de soort alg en niet door de lichtkleur.

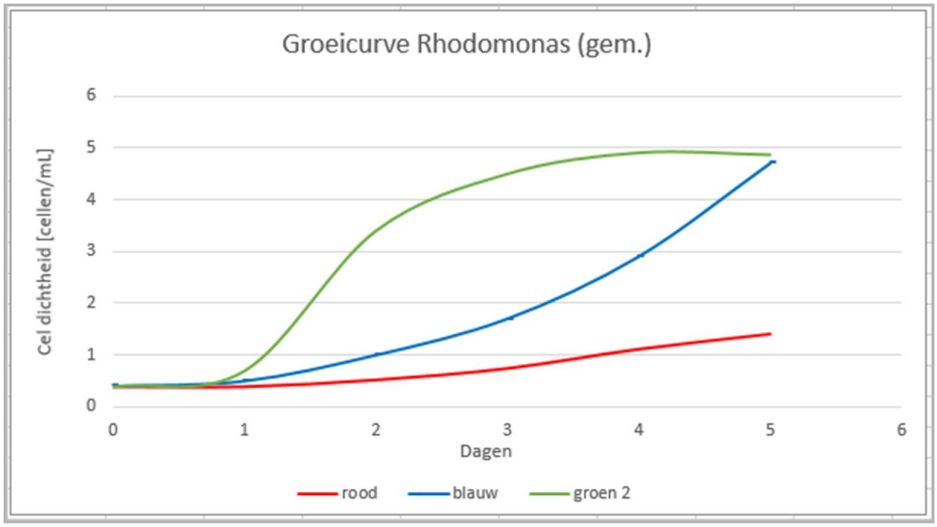
De gemiddelde groeicurve van de algen onder bestraling van rood, groen en blauw licht

Om in een oogopslag een duidelijk beeld te geven van de groei van de culturen onder aanwezigheid van verschillende kleuren licht, zijn de gemiddelden van de meetwaarden berekend. Deze zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Dagen	Rood	Blauw	Groen
0 (blanco)	0,45	0,45	0,45
1	0,40	0,50	0,72
2	0,53	1,00	3,40
3	0,75	1,72	4,53
4	1,12	2,91	4,91
5	1,41	4,66	4,87

Figuur 34: De gemiddelde gemeten dichtheden van de Rhodomonas cultuur onder verschillende lichtkleuren. De waarden zijn in 10^6 cellen per mL.

Deze waarden zijn verwerkt tot een grafiek waarin de gemiddelde groei van de culturen weergegeven is. Hierin is een verschil te zien in de vorm van de groeicurve van de verschillende culturen, gecultiveerd onder verschillende kleuren licht. Dit is per lichtkleur apart besproken.
De kleur van de lijn vertegenwoordigt in deze grafiek het gebruikte licht voor de betreffende cultuur. De exacte waarden van de punten uit de grafiek zijn te vinden in de bovenstaande tabel.



Hoofdstuk 9: Conclusie

Voorafgaand aan dit onderzoek zijn enkele deelvragen opgesteld die samen antwoord moesten geven op de gestelde hoofdvraag, wat uiteindelijk gelukt is.

Zo is gebleken dat nutriënten, temperatuur, CO_2-toevoer, pH, beluchting, O_2-afvoer en zoutgehalte van invloed zijn op de groei. Om voor deze factoren de beste waarde te hanteren en deze waarde constant te houden, is aan verschillende knoppen gedraaid gedurende het proces, zoals beschreven in het theoretische kader.
Ook kan geconcludeerd worden dat de pigmenten van een alg een belangrijke functie hebben in het proces waarin algen licht opnemen. Zo kunnen pigmenten de lichtenergie omzetten tot chemische energie die vervolgens beschikbaar is voor de algen om te gebruiken. Met deze energie kunnen de algen vermeerderen, waardoor de celdichtheid toeneemt.

De mate waarin de lichtenergie opgenomen wordt, hangt echter sterk af van de pigmenten die de algen bevatten. Zo bevat de Rhodomonas voornamelijk fycoerythrine en dit absorbeert het best licht met een golflengte 545 nm. Hoe verder de golflengte van deze waarde afwijkt, hoe minder van de uitgezonden energie opgenomen zal worden en dit zal zorgen voor een lager rendement waardoor de algen minder snel zullen vermeerderen. Dit is ook terug te zien in de resultaten van het praktisch onderzoek.
De vooraf opgestelde deelvragen luidden:

- Welke factoren kunnen de groei van de Rhodomonas sp. alg beïnvloeden tijdens het groeiproces en hoe worden de meest optimale waarden van deze factoren gehanteerd in een eigen fotobioreactor?
- Hoe nemen algen licht op? En welke rol heeft het opgenomen licht van de algen in het fotosyntheseproces?
- Wat beïnvloed de (optimale) absorptiewaarden van de alg?
- Wat zijn drie kleuren die voor nauwkeurige meetresultaten zullen zorgen en waarom?
- Hoe kan de golflengten de groei beïnvloeden?

Deze vragen zijn uitgebreid beantwoord in het theoretische kader. Het totale theoretische kader heeft bijgedragen aan de beantwoording van de hoofdvraag, die luidde: Hoe beïnvloed de golflengte van licht de groei van de Rhodomonas sp. alg wanneer specifiek gekeken wordt naar groen, blauw en rood licht. Deze kleuren worden respectievelijk gerepresenteerd door de volgende golflengten: 460 nm, 520 nm en 630 nm.

Na de uitvoering van het onderzoek kan geconcludeerd worden dat Rhodomonas algen, in de beschreven omstandigheden, het snelst het hoogtepunt wat betreft celdichtheid bereikt hebben wanneer deze worden gecultiveerd onder groen licht. Ook is geconcludeerd dat de golflengte, in combinatie met het pigment, erg van invloed is op het rendement tussen de uitgezonden lichtenergie en de energie die de alg tot zijn beschikking heeft; de chemische energie. Dit verschil in rendement heeft invloed gehad op het verloop van de groeicurven. Hoe dichter de golflengte bij 545 nm ligt, hoe hoger het rendement en hoe stijler de groeicurve daardoor zal lopen in de exponentiële fase. Ook is geconcludeerd dat rood licht geen traditionele groeicurve heeft gegeven. Dit zal komen omdat het rendement van rood licht erg laag ligt. Dat omdat de Rhodomonas zelf rood is, en dus rood licht, voornamelijk, weerkaatst. Hieruit kan de conclusie getrokken worden dat een golflengte die een voor de mens waarneembare kleur representeert, niet goed geabsorbeerd wordt.

Onder groen licht hebben de Rhodomonas algen, binnen vijf meetdagen, de hoogste celdichtheid bereikt. Dit zal komen omdat het gebruikte groene licht, volgens het spectrum, ook 545 nm uitzendt. Dit zal direct opgenomen worden, wat zorgt voor een hoog rendement en daardoor een stijle groeicurve.

Hoofdstuk 10: Discussie

Aan dit onderzoek zijn een aantal dingen die verbeterd kunnen worden voor een volgende uitvoering. Ook zijn er tijdens het uitvoeren van dit onderzoek ideeën ontstaan voor een vervolgonderzoek.

10.1 Betrouwbaarheid

In dit onderzoek zijn er factoren geweest die de betrouwbaarheid beïnvloed zullen hebben. De betrouwbaarheid van dit onderzoek betreft twee onderdelen, namelijk het theoretische kader en het praktische onderzoek. De betrouwbaarheid van het praktische onderzoek wordt beschreven in paragraaf *10.2 Onnauwkeurigheden*.
Bij het schrijven van het theoretische kader zijn voornamelijk Engelse wetenschappelijke artikelen geraadpleegd. Deze zijn afkomstig van een database waar tegen betaling gebruik van gemaakt kon worden en die specifiek gericht is op wetenschappelijke onderzoeken. Dit vormt daarom een betrouwbare bron van literatuur. Ook zijn er vaak meerdere artikelen gevonden die dezelfde conclusie trokken. Dit zorgt voor een toenemende betrouwbaarheid. Daarnaast zijn er meerdere documenten geraadpleegd die afkomstig zijn van universiteiten. Het gaat hier om Wageningen University and Research, de Vrije Universiteit in Amsterdam, en de Universiteit van Twente. Deze drie universiteiten doen zelf ook onderzoeken naar algen. Daarom was het mogelijk relatief recente en betrouwbare bronnen te verkrijgen.

10.2 Onnauwkeurigheden

Tijdens het praktisch onderzoek zijn er verschillende onnauwkeurigheden ontstaan. Een deel van deze onnauwkeurigheden kon tijdens het onderzoek verholpen worden. Dit is beschreven in het theoretisch kader en in bijlage *11.4 Ingenieurs problemen en bijbehorende oplossingen.* Onnauwkeurigheden die niet tijdig verholpen zijn, kunnen de betrouwbaarheid van het de gevonden resultaten beïnvloed hebben.

10.2.1 Het verplaatsen van de proefopstelling

De proefopstelling is meerdere keren verhuisd tussen mijn moeders huis en mijn vaders huis. Dit zal gezorgd hebben voor een bepaalde onnauwkeurigheid. Tijdens deze verhuizing werd de cultuur namelijk even blootgesteld aan daglicht. Wel hebben de culturen hier allen evenveel last van gehad. Ditzelfde is gebeurd toen een kleine hoeveelheid van de cultuur van huis naar school gebracht moest worden voor de meting. Daarnaast moest het omringende water na de verhuizing opnieuw op temperatuur komen en dit was daarom niet direct 22 graden Celsius toen de algen erin geplaatst werden.

10.2.2 Onderscheid tussen levende en dode algen

Tijdens de uitvoering van de metingen is gewerkt met de lichtmicroscoop. Achteraf bleek dat met een indicator aangetoond kan worden welke algen levend zijn en welke dood zijn. Zo kan de celdichtheid nauwkeuriger bepaald kunnen worden. Nu zullen er ook dode algen meegeteld zijn, wat niet de bedoeling was.

10.2.3 Meetapparatuur voor de temperatuur en pH-waarde

In het onderzoek is de pH gemeten met behulp van pH-papier. Deze meetmethode is destijds gekozen, omdat dit thuis gebruikt kon worden. Met pH-papier kan de pH bepaald worden op hele cijfers nauwkeurig. Een andere methode om de pH te meten, is met behulp van een automatische pH-meter. Deze zou de pH op twee decimalen nauwkeurig kunnen bepalen, wat zorgt voor een beter inzicht in de pH schommelingen gedurende het onderzoek. Nu kan het zijn

dat de pH de ene dag 7,10 was en de andere dag 7,80. Dit is beide zeven, maar het verschilt toch erg van elkaar.
Ditzelfde geldt voor de temperatuur. Met behulp van een automatisch verwarmingselement dat ingesteld kon worden op de gewenste temperatuur is het water op temperatuur gehouden. De temperatuur van het water is gemeten met behulp van een thermometer. De temperatuur is hiervan afgelezen. Dit kan echter nauwkeuriger wanneer de benodigde materialen beschikbaar zijn.

10.2.4 Bacteriën

Ook het in beweging houden van de oplossing met behulp van de aquariumpomp zal voor onnauwkeurigheid gezorgd hebben. Het was niet mogelijk de lucht uit de atmosfeer te filteren voordat deze in de cultuur geblazen werd door de aquariumpomp. Hierdoor zullen er bacteriën in de cultuur gekomen zijn die de groei beïnvloed kunnen hebben.
De watten die gebruikt zijn om onnodig contact met de atmosfeer te voorkomen, zullen het grootste deel van de bacteriën tegengehouden hebben. Er zullen echter ook bacteriën doorgelaten zijn die de groei van de algen hebben kunnen beïnvloeden. Om dit te voorkomen kan gewerkt wordt met stops op erlenmeyers die geen bacteriën doorlaten. Deze zijn echter erg kostbaar.
Verder kan er onnauwkeurigheid ontstaan zijn bij de CO_2-toevoer. Zo waren de slangetjes die hier gebruikt zijn niet steriel. Ook zijn de slangetjes niet dagelijks vervangen, maar eens in de 3 dagen. Hier zullen daarom bacteriën in gezeten hebben.

10.2.5 Het uitgezonden spectrum

Verdere onnauwkeurigheid kan veroorzaakt zijn door de lichtbron. Het uitgezonden spectrum kan door meerdere factoren afwijken van het bijgevoegde spectrum. Zo kan het zijn dat de lichtbron vanwege slijtage een andere golflengte heeft uitgezonden. Ook stond de vierkante lichtbron voor een ronde vissenkom. Dit kan hebben gezorgd voor een bepaalde afbuiging van het licht. Ook de zuiverheid van het glas kan hier invloed op hebben gehad. Er is daarom overwogen een LED-strip rondom de vissenkom te bevestigen. Op deze manier zou ook de gehele cultuur evenveel licht ontvangen op een bepaald moment. Er is uiteindelijk besloten dit niet te doen, omdat het spectrum van de LED-strip niet bekend was. Dit was essentieel voor dit onderzoek. Wanneer de geschikte middelen beschikbaar zijn, kan er wel gewerkt worden met een LED-strip. Dan kan namelijk het spectrum gemeten worden van deze lichtbron. Door het meten van het spectrum zal de betrouwbaarheid toenemen. Ook helpt dit bij het verklaren van de gevonden resultaten.

10.2.6 Samples nemen

Voor de microscopische bepaling moest telkens een sample genomen worden uit de betreffende cultuur. Voordat dit sample genomen werd, is de oplossing handmatig extra bewogen. Dit om te zorgen voor een gelijkmatige verdeling van de algen in de cultuur, wat zou zorgen voor een betrouwbare weergave van de celdichtheid. De bekerglazen hebben echter geen stop of deksel en deze konden daarom niet omgekeerd worden. Deze zijn daarom enkel gedraaid. Ondanks de automatische beluchting zal de celdichtheid aan de onderkant van het bekerglas daardoor groter zijn geweest. Dit omdat de algen, vanwege de zwaartekracht, naar beneden zakken. Het sample is voornamelijk genomen uit het midden van het bekerglas. Voor een nauwkeurigere weergave van de celdichtheid zal de oplossing regelmatig omgekeerd worden of zal er gewerkt moeten worden met automatische beluchting vanuit de ondergrond van het bekerglas, waardoor er geen algen op de bodem kunnen komen te liggen.

10.3 Resultaten

Wat opvalt aan de resultaten is dat bij zowel rood als blauw licht de dichtheid nog toeneemt bij de laatste meting. De gehele groeicurven onder blauw en rood licht kon echter niet vastgesteld worden. Vanwege het benodigde materiaal, moest de meting uitgevoerd worden op school. Het was daarom niet mogelijk de dichtheden langer dan vijf dagen te monitoren. Wanneer dit wel gedaan zou worden en de metingen van het weekend zouden overgeslagen worden, zou dit zorgen voor een grote onnauwkeurigheid. Er is daarom besloten vijf dagen te meten. Het kan echter zijn dat de blauwe groeicurve uiteindelijk (aanzienlijk) boven de groene groeicurve uit komt. Dat zou de conclusie kunnen beïnvloeden. Het is dan namelijk de vraag of men in een bepaalde tijd zo veel mogelijk algen gecultiveerd wil hebben of dat de totale opbrengst zo hoog mogelijk moet zijn, ongeacht de tijd en kosten die gemaakt worden voor het onderhoud.

10.4 Vervolgonderzoek

De aanbevelingen na de verkregen resultaten zijn om verder onderzoek te doen naar de invloed van de licht- en donkercyclus op de groei van de Rhodomonas sp. alg. Tijdens het onderzoek heeft de lichtbron 24 uur per dag aangestaan. Dit om te voorkomen dat de lichtreactie niet meer plaats kon vinden, en daardoor ook de donkerreactie niet. Deze reacties vormen samen de fotosynthese: een essentieel proces dat leven voor algen mogelijk maakt. Daarentegen leven de Rhodomonas sp. algen in de natuur ook meerdere uren per etmaal in het donker. De positieve invloed van de constante verlichting is niet wetenschappelijk bepaald. Het is daarom interessant om te kijken of de algen beter gedijen in een omgeving die ook af en toe donker wordt.

Verder wordt aangeraden om onderzoek te doen naar de relatie tussen de golflengte en de hoeveelheid vetzuren die ontstaat wanneer de Rhodomonas onder stress gecultiveerd wordt. De Rhodomonas is een marine alg die gecultiveerd voor voedsel doeleinden. Vetzuren maken de Rhodomonas hier geschikt voor. Er kan onderzocht worden of er in stress meer vetzuren geproduceerd worden onder een bepaalde golflengte. Dit is interessant, omdat de organismen die de algen consumeren dan eventueel minder algen nodig hebben om van te leven. Er wordt zo gekeken naar de relatie tussen de golflengte en de kwaliteit van de alg.

Ook kan onderzocht worden wat de invloed is van de lichtintensiteit en de groei.

Een vervolgonderzoek dat een andere kant van de algen belicht, zou te maken hebben met de marketing. Het is momenteel financieel nog niet haalbaar om als mensen over te stappen op biobrandstof uit algen. In een vervolgonderzoek kan gekeken worden hoe de kosten van de algenkweek eventueel verminderd kunnen worden.

10.5 Verwachtingen

Voorafgaand aan het praktisch onderzoek werd verwacht dat de Rhodomonas sp. algen de hoogste celdichtheid zouden behalen wanneer zij blootgesteld zouden worden aan groen licht. Uit de resultaten is gebleken dat dit waar is. Ook is het zo dat hoe meer de golflengte van 545 nm afwijkt, hoe lager celdichtheid is na vijf dagen. Deze conclusie is in overeenstemming met de hypothese. Er kan daarom gezegd worden dat de hypothese aangenomen kan worden. Ook werd verwacht dat de algen het minst goed zou groeien onder rood licht, omdat dit de kleur is die de Rhodomonas weerkaatst en omdat de golflengte van rood licht het meest afwijkt van 545 nm wanneer gekeken wordt naar rood, blauw en groen licht. Dit is uitgekomen en is daarom in overeenstemming met de verwachtingen.

Hoofdstuk 11: Bijlagen

11.1 Medium van de Rhodomonas alg

Bijgevoegd is het medium van de Rhodomonas alg waarnaar gehandeld is in het onderzoek. Dit is verkregen van de HZ University of Applied Sciences.

Guillard and Hargraves (1993) - please see note at the bottom of this page

This enriched seawater medium is based upon f/2 medium (Guillard and Ryther 1962) but has additional trace metals. It is a general-purpose marine medium for growing coastal algae.

To prepare, begin with 950 mL of filtered natural seawater. Add the quantity of each component as indicated below, and then bring the final volume to 1 liter using filtered natural seawater. The trace element solution and vitamin solutions are given below. Autoclave. Final pH should be 8.0 to 8.2.

Component	Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
$NaNO_3$	75.00 g L-1 dH_2O	1 mL	8.82 x 10-4 M
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	5.00 g L-1 dH_2O	1 mL	3.62 x 10-5 M
$Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$	30.00 g L-1 dH_2O	1 mL	1.06 x 10-4 M
trace element solution	(see recipe below)	1 mL	---
vitamin solution	(see recipe below)	0.5mL	---

L1 Trace Element Solution

To 950 mL dH_2O add the following components and bring final volume to 1 liter with dH_2O. Autoclave.

Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
---	4.36 g	1.17 x 10-5 M
---	3.15 g	1.17 x 10-5 M
178.10 g L-1 dH_2O	1 mL	9.09 x 10-7 M
23.00 g L-1 dH_2O	1 mL	8.00 x 10-8 M
11.90 g L-1 dH_2O	1 mL	5.00 x 10-8 M
2.50 g L-1 dH_2O	1 mL	1.00 x 10-8 M
19.9 g L-1 dH_2O	1 mL	8.22 x 10-8 M
1.29 g L-1 d dH_2O	1 mL	1.00 x 10-8 M
2.63 g L-1 dH_2O	1 mL	1.00 x 10-8 M
1.84 g L-1 dH_2O	1 mL	1.00 x 10-8 M
1.94 g L-1 dH_2O	1 mL	1.00 x 10-8 M

f/2 Vitamin Solution

(Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975)

First, prepare primary stock solutions. To prepare final vitamin solution, begin with 950 mL of dH_2O, dissolve the thiamine, add the amounts of the primary stocks as indicated in the quantity column below, and bring final volume to 1 liter with dH_2O. At the NCMA we autoclave to sterilize. Store in refrigerator or freezer.

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
thiamine · HCl (vit. B_1)	--	200 mg	2.96×10^{-7} M
biotin (vit. H)	0.1g L-1 dH_2O	10 mL	2.05×10^{-9} M
cyanocobalamin (vit. B_{12})	1.0 g L-1 dH_2O	1 mL	3.69×10^{-10} M

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA.

Guillard, R.R.L. and Hargraves, P.E. 1993. Stichochrysis immobilis is a diatom, not a chrysophyte. Phycologia **32:** 234-236.

Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms.

I. Cyclotella nana Hustedt and Detonula confervacea Cleve. Can. J. Microbiol. **8:** 229-239.

Please note:

In April 2013, it was brought to our attention that the recipe for L1 medium on the NCMA website differs from the original publication of L1 medium (Guillard, R. R. L., and P. E. Hargraves. "Stichochrysis immobilis is a diatom, not a chrysophyte." Phycologia 32.3 (1993): 234-236). The intended final concentration for K_2CrO_4 was 10^{-9} molar. There is an inconsistency in the 1993 paper as the directions for making the chromium stock solution that are in that paper result in a 10^{-8} molar final concentration in the medium. We have been using those directions for making our L1 trace metal mix for almost 15 years, resulting in a final concentration of 10^{-8} molar. We plan to continue to do so as a matter of consistency.

This error was corrected by Guillard in 2003.The corrected recipe can be found in the Manual on Harmful Marine Microalgae,Edited by G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson and A.D. Cembella,Technical director: H.O. Enevoldsen,Oceanographic Methodology series, 2nd revised edition, 2003, 978-92-3-103871-6, UNESCO Publishing. Note that this L1 recipe uses a different vanadium compound (ammonium metavanadate, NH_4VO_3) to make the vanadium stock solution than the 1993 paper, which used sodium orthovanadate, Na_3VO_4. According to Sigma Aldrich, the concentration of vanadium ionic species depends upon the pH and redox potential of the environment. Sodium orthovanadate is more soluble in water than ammonium metavanadate. The concentration of vanadium in both recipes is more or less the same. Since the concentration of vanadium in seawater is 1.0-4.0 X 10^{-8}molar with an average of 3.2 X 10^{-8}molar (Abbasse, Ghiasse, Baghdad Ouddane, and Jean Fischer. "Determination of trace levels of dissolved vanadium in seawater by use of synthetic complexing agents and inductively coupled plasma–atomic emission spectroscopy (ICP–AES)." Analytical and bioanalytical chemistry 374.5 (2002): 873-878), the L1 trace metal addition of vanadium should not elevate the concentration of vanadium in L1 medium much above that of natural seawater.

11.2 Medium van de Chlorella Sorokiniana

Bijgevoegd is het medium van de Chlorella Sorokiniana alg waarnaar gehandeld is in het onderzoek. Dit is verkregen van de Wageningen University and Research.

Concentratie (M)	**Naam**
$6{,}00 \cdot 10^{-2}$	Urea
$5{,}44 \cdot 10^{-3}$	KH_2PO_4
$1{,}46 \cdot 10^{-3}$	$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
$1{,}62 \cdot 10^{-3}$	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
$9{,}00 \cdot 10^{-5}$	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$
$3{,}16 \cdot 10^{-4}$	EDTA ferric sodium salt
$9{,}00 \cdot 10^{-5}$	$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$
	Micronutrients:
$1{,}00 \cdot 10^{-6}$	H_3BO_3
$6{,}56 \cdot 10^{-5}$	$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$
$1{,}11 \cdot 10^{-5}$	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$
$7{,}33 \cdot 10^{-6}$	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$
$8{,}41.10^{-5}$	$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$

11.3 PH en temperatuur gedurende de groei

Gedurende het onderzoek is in een schrift iedere dag de pH van de cultuur en de temperatuur van het omringende water bijgehouden. Uit de gevormde tabel is geconcludeerd dat de temperatuur en de pH vrijwel de gehele periode gelijk zijn gebleven. Er is daarom besloten deze gegevens weer te geven in onderstaande grafiek in plaats van in een tabel. Dit geeft direct een indicatie. De pH is vrijwel de hele periode 6,5 à 7 geweest en de temperatuur was gemiddeld 22 graden Celcius.

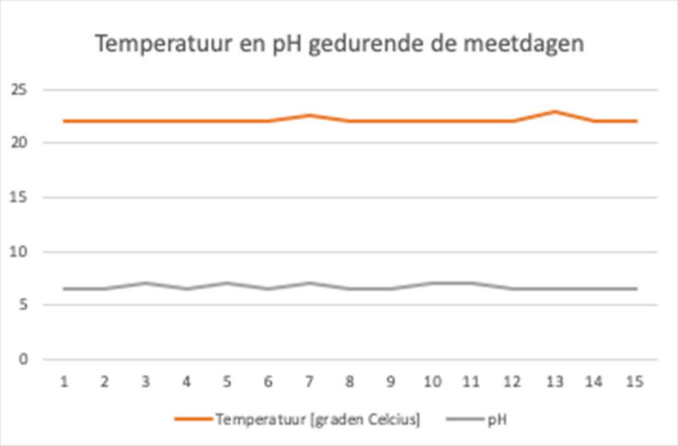


Figure 25: De gemeten temperatuur en pH gedurende het meetproces.

11.4 Ingenieurs problemen en bijbehorende oplossingen

Onderstaande tabellen bevatten een beknopte weergave van de ingenieurs problemen waar gedurende het proces tegen aan gelopen is. Om de opstelling te optimaliseren zodat betrouwbare resultaten verkregen konden worden, is gestreefd om ieder probleem op te lossen. De bedachte oplossingen staan ook weergegeven in onderstaande tabellen.

11.4.1 Ingenieurs problemen en oplossingen wat betreft de CO_2-toevoer

Probleem	**Oplossing**
Er is eenmaal, tijdens het gidsexperiment, gewerkt met bruine suiker voor de alcoholfermentatie, in plaats van met witte suiker, maar dit leverde een ongewenst resultaat op, want de fermentatie ging erg langzaam: het duurde telkens erg lang voordat er een belletje CO_2 vrijkwam uit fles A.	Er is gekeken of het van invloed zou zijn als de bruine suiker vervangen zou worden door witte suiker. Dit gaf een aanzienlijk betere CO_2-toevoer. De CO_2 bubbels kwamen regelmatig uit het slangetje van fles A. Er is gekozen om bij de definitieve uitvoering gebruik te maken van witte suiker.
Fles A en B waren beide 1L flessen. Het is gebleken dat de verhouding tussen suiker, gist en water van belang is om de alcoholfermentatie zo lang mogelijk te laten	Fles B wordt bij de definitieve uitvoering vervangen door een 1,5 L fles waardoor er meer ruimte is boven de oplossing

duren. Met twee 1L flessen, was de reactie eerder afgelopen. Ook is de hoeveelheid schuim die ontstaat tijdens de fermentatie onderschat. Dit is daardoor eenmaal in het slangetje gekomen, wat voorkomen moest worden. Dit gebeurde tijdens het gidsexperiment	waar het schuim in kan ontstaan zonder dat dit in het slangetje komt.
De lengte van de slangetjes was bij het eerste gidsexperiment te lang. Het duurde lang voordat de reactie op gang kwam.	Bij de tweede uitvoering van het gidsexperiment zijn de slangetjes korter gemaakt. Dit heeft positief effect gehad.
Er ontstonden geen bubbels in fles C, maar wel in fles B.	De doppen van alle flessen zijn gekit, zodat de koolstofdioxide niet kon ontsnappen door lekkage. Er bleek sprake te zijn geweest van lekkage, want na het dicht kitten van de doppen, ontstonden in dezelfde opstelling wel bubbels in fles C.
Het duurde relatief lang voordat de 100 gram suiker opgelost was in het water van fles A.	Het water in fles A moet wat warmer zijn, zodat de suiker gemakkelijker oplost.

11.4.2 Ingenieurs problemen en oplossingen wat betreft de beluchting

Ingenieurs probleem	Oplossing
Er was geen constante, automatische beweging van de cultuur, waardoor de algen konden bezinken.	Er is een aquariumpomp aangesloten op de cultuur die constant luchtbellen in de oplossing blies. Hierdoor kon de cultuur constant in beweging blijven. Dit gaf een dichtere cultuur, dus deze aanpassing heeft een positieve werking op het groeiproces van de cultuur gehad.
Al de lucht van de aquariumpomp ging naar een bekerglas waardoor slechts een van de twee bekerglazen beluchting kreeg, ondanks de kraantjes die gelijk afgesteld stonden. Dit ging ten koste van het andere bekerglas.	De slangetjes zijn even lang gemaakt, want dit was nog niet zo. Daardoor zal in eerste instantie weerstand zijn ontstaan. De lucht koos voor de weg met de minste weerstand en dit was de weg van het kortste slangetje.

Ondanks dat de slangetjes een gelijke lengte hadden, ging nog steeds naar het ene bekerglas meer lucht dan naar het andere bekerglas.	Dit zal zijn gekomen door een verschil in waterpeil tussen de twee bekerglazen. Het hogere waterpeil zorgt voor meer weerstand. Hierdoor zal de lucht de weg hebben gekozen naar het lage waterpeil, want daar ondervond het minder weerstand. Zo zijn de factoren die de weerstand hebben veroorzaakt verholpen en werden beide bekerglazen belucht.

11.5 Benodigde hoeveelheden voor medium van Chlorella Sorokiniana.

Met behulp van de molaire massa van de onderstaande stoffen is berekend hoeveel van deze stoffen nodig was om de cultuur te kunnen maken die zou voldoen aan het voorgeschreven medium. De molaire massa van de stoffen is specifiek van toepassing op de op school gebruikte stoffen. De benodigde hoeveelheden zijn verkregen uit het voorgeschreven medium, *zie bijlage 11.3.* De analytische balans die gebruikt is, heeft slechts vier cijfers achter de komma. Voor de berekening is het volledige getal van de molaire massa gebruikt. Deze tabel geldt voor de stoffen die gebruikt zijn voor de cultuur van de Chlorella Sorokiniana. Voor de Rhodomonas was het niet nodig deze berekeningen te maken, omdat de oplossingen al gemaakt waren op de HZ University of Applied Sciences.

Stof	**Hoeveelheid (gram)**
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,3992976
KH_2PO_4	0,00111631
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,0132318
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,00623646
$Na_2EDTA \cdot H_2O$	0,06480774
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,00319169
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,00183015
H_3BO_3	0,00006183
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	0,0129829
Ureum	3,6036

11.6 Logboek

Datum	Duur	Locatie	Procesbeschrijving	Opmerkingen
6/5	2 u	thuis en bibliotheek	Onderwerp vastgesteld en naar de bibliotheek geweest voor informatie.	Ik heb besloten mij met mijn profielwerkstuk te gaan verdiepen in algen.
7/5	1 u	thuis	De geleende boeken lezen.	
10/5	3 u	thuis	Brainstormen hoofdvraag, informatie verzamelen en oriëntatie voor proef	
30/7	1 u	Australië	Inlezen	
2/8	2 u	Australië	Inlezen Engelse artikelen	
3/8	2 u	Australië	Inlezen Engelse artikelen	
10/8	2 u	Australië	Brainstormen over hoofd- en deelvragen	
	5 u	thuis	totaalsom van tijd die nodig is geweest voor het sturen van alle mails in de periode van in de zomervakantie tot aan 2 december	Het versturen van alle mails wordt niet meer los benoemd. Dit is gedaan gedurende de hele periode. Voor het overzicht is het op deze manier weergegeven.
9/9	5u	school	De eerste PWS-dag. Ik heb alle Engelse artikelen gelezen om informatie te krijgen. Uiteindelijk is de hoofdvraag vastgesteld.	Het is lastig dat alles in het Engels staat. Er wordt lastige vakjargon gebruikt. Uiteindelijk ben ik er zelf uitgekomen, maar het kostte erg veel tijd.

10/9	5u	school	De tweede PWS-dag. Ik ben verder gegaan met het vertalen van de literatuur en heb deelvragen opgesteld.	
12/9	5u	school	De hoofd- en deelvragen zijn definitief. Ik heb een opzet voor een onderzoek bedacht en overlegd met benita; niet alles mogelijk en mijn idee is best complex, volgens haar. Ook samen met Roshan gezeten om te kijken wat er mogelijk was.	Na mijn gesprek met Roshan denk ik dat een scheikundige begeleider mij beter kan helpen dan een biologische begeleider. Ik heb Arjen gemaild.
22/10	1 u	thuis	Schrijven deelvraag ‘wat is een alg’ en ‘voordelen’.	
23/10	1,5 u	thuis	Ordenen van alle gevonden literatuur en verdiepen in de opties voor een proefinstallatie met behulp van YouTube en internet.	
25/10	3 u	thuis	Het schrijven de deelvraag ‘stress’	Later is besloten deze deelvraag toch weg te laten uit het verslag vanwege weinig toegevoegde waarde bij de uiteindelijk uitgevoerde proef. In eerste instantie is deze deelvraag wel gemaakt, omdat toen het idee voor de proef nog anders was. Het is wel kort aangestipt, omdat ik het erg interessant vind

				en het iets vertelt over de alg zijn 'gedrag', zie *De Chlorella Sorokiniana alg.*
26/10	2 u (en 4u reistijd)	allerlei winkels (vissen/aquariumwinkels tot supermarkt) en thuis	Thuis een schets maken van de proefinstallatie en een 'boodschappenlijstje' maken. Rest van de dag bezig geweest met benodigde producten kopen voor groei-installatie en deze installatie bouwen. 'S avonds eerste uitvoering gidsexperiment CO_2-installatie.	Het vinden van de juiste producten/winkels was niet zo eenvoudig als het leek. Hele dag bezig geweest in Hoofddorp, Haarlem en Nieuw-Vennep. 'S avonds tijdens gidsexperiment 1 meerder bevindingen gedaan die verbeterd moeten worden, zie *Ingenieurs problemen en oplossingen.* Wel CO_2 zien ontstaan→ blij mee; goed begin van het onderzoek!
27/10	2 u	thuis	Lezen verschillende Engelse wetenschappelijke artikelen en hierin de belangrijke informatie markeren/verwerken. Ook de proefopstelling van het gidsexperiment verbeteren naar aanleiding van gister. Verder alvast materialen bij elkaar gelegd en de dingen die van thuis gebruikt gaan worden verzameld, zoals de vissenkom en dozen	Opstelling werkt beter na verschillende aanpassingen; zie *Ingenieurs problemen en oplossingen.*
28/10	1,5 u	thuis	Voorbereidende vragen opschrijven voor afspraak in	Weer enkele verbeterpunten

			Vlissingen. Ook proefopstelling schoongemaakt en enkele nieuwe producten, zoals het slangetje, gehaald bij Ranzijn. Daarna gidsexperiment tweede uitvoering.	ontdekt en verbeterd.
29/10	11 u (incl 7,5u reistijd)	HZ University of Applied Sciences	Afspraak met Gabriëlle waarin ik een rondleiding heb gekregen bij de kweekinstallaties en zij geholpen heeft bij de vordering van mijn project. Verder hebben we mijn proef aangepast, aangezien bleek dat mijn idee niet haalbaar zou zijn. Ik ga nu de invloed van verschillende golflengten bekijken op de groei. Verder veel besproken met Gabriëlle wat betreft het proces en de algen.	Sample Rhodomonas algen en benodigdheden voor kweekmedia meegekregen. Het was heel erg lang rijden! Ik moet nu snel medium gaan maken en zorgen dat alles van de installatie af is, want anders zullen de algen het niet overleven. Dat ga ik morgen gelijk doen. Heel leuk om zo alles in het echt te zien en fijn om met iemand te kunnen praten die begrijpt wat ik bedoel; heel enthousiast naar huis gegaan en met een fijn gevoel. Ik heb heel veel zin in mijn eigen project! Nuttige en leuke dag gehad!
30/10	0,5 uur	school	Met Nicole overleggen welke benodigdheden we hebben op school. Overleg over	Veel van de gekochte spullen waren ook op school al aanwezig…

			fotosynthese lamp, telkamer, glaswerk, trilplaat en de gevonden 'schimmel' → wat daarmee doen + Gabrielle gemaild erover.	'S ochtends een 'schimmelvlok' gevonden in het flesje van de sporenelementen. . Vanwege de vlok durfde ik het medium nog niet te maken. Ik was bang dat het een schimmel zou zijn en dat deze de algen zou doden. Daarom heb ik een dag gewacht tot ik antwoord had van Gabriëlle. Erg slechte nacht gehad vanwege licht en warmte die de algen nodig hebben. De hele nacht stond de verwarming aan naast mijn bed en het licht aan om voor de algen optimale omstandigheden te creëren; zorgen voor de algen eist veel energie!!
31/10	3,5 u	school en thuis	Gesprek met Arjen over de vordering en over dinsdag (afspraak Vlissingen). Verder tot half 7 op school geweest om het medium te maken voor de Rhodomonas algen en de CO_2-opstelling nogmaals getest. Ook getest of het daadwerkelijk CO_2 was dat in de	Gabriëlle heeft gezegd dat het waarschijnlijk een samenklontering is en geen schimmel. Desalniettemin is het medium twee keer gemaakt om de kansen te spreiden wat betreft de vlok. Hierdoor is ook het medium verdeeld in tweeën en zijn er

			slangetjes zat met behulp van kalkwater. Vervolgens thuis de definitieve opstelling gemaakt voor de algengroei. Ook tweede CO_2-toevoer gemaakt. Rhodomonas in medium gedaan en in opstelling geplaatst; de proef is begonnen.	dus twee bekerglazen. Er moet een tweede CO_2-toevoer gemaakt worden. Algen in medium zijn erg oranje (ipv bordeaux rood); apart. Komt misschien vanwege verdunnen. Ik vind het erg spannend met de algen aangezien ik echt onwijs veel moeite gedaan heb om ze te krijgen. Ik hoop dat ze in leven blijven en dat ik mijn onderzoek kan uitvoeren!
2/11	4 u	thuis	Lezen van de benodigde literatuur over de proef die ik wil gaan uitvoeren met behulp van Engelse artikelen. Verder gewerkt aan de deelvraag over de groeiomstandigheden ; nutriënten bijna af, CO_2-toevoer + pH, beweging + bacteriën en temperatuur wel al af. Algencultuur is een oranje/bruin van kleur. Zeker niet rood dat het was. Inlezen over de C. sorokiniana	Algen (Chlorella Sorokiniana) van Tjalling ontvangen. Deze algen zijn eigenlijk tweede keuze, maar desondanks ben ik er heel erg blij mee→ dan heb ik in ieder geval nog een plan B als de Rhodomonas niet bijkleuren naar rood. Proberen verklaring te vinden voor de bruine kleur van de algen aan de hand van literatuur.

3/11	2 u	thuis	De CO_2-toevoeren zijn vernieuwd. De opstelling is verplaatst van mijn vader naar mijn moeder en hier is deze opnieuw geïnstalleerd. Ook is het theoretische deel over de nutriënten afgemaakt.	De kleur van de oplossing is nog steeds bruinig… Gescheiden ouders is een heel groot minpunt in dit onderzoek; erg onhandig.
4/11	3,5 u	school	Voor de C. sorokiniana algen is het medium gemaakt. Dit is gedaan door uit het voorschrift de gegevens om te rekenen naar gram, de stoffen te zoeken op school en deze nauwkeurig af te wegen.	Arjen gesproken over dat hij eventueel nog algen voor mij kan bestellen. Dit is nu al gevraagd omdat ervaring leert dat er wel wat tijd overheen gaat tot mensen (van de WUR) reageren. Zo zou het in de planning nog goed gaan. Het medium van de Chlorella maken was een stuk meer werk dan dat van de Rhodomonas aangezien alles handmatig afgewogen moest worden.
4/11	3u (incl 2,5u schoonmaken)	thuis	Chlorella in medium brengen. Toen ik de CO_2-toevoer wilde aansluiten door een fles met gist die niet gebruikt was leeg te laten lopen, is de fles 'ontploft'. De CO_2 oefende dusdanig veel druk uit op de fles dat toen de dop een heel klein beetje open ging, het gist door de gehele	Alles was he-le-maal vies; kookboeken, kastjes, binnenkant van de kastjes, de grond, het plafond, het aanrecht, glazen; alles.

			keuken is gevlogen en het werkelijk o-ve-ral vies was en alles zat onder het 'alcohol' dat overgebleven was. Dit moest uiteraard opgeruimd worden voordat ik verder kon. Toen alles opgeruimd was, heb ik de Chlorella alsnog in de opstelling gebracht, zodat deze zou kunnen groeien.	
5/11	4 u	Thuis	Gebrainstormd over hoe het kan dat de Rhodomonas niet groeit. Besloten het medium opnieuw te maken met hogere concentratie van de meegegeven oplossingen (6 mL/1000 mL ipv 1mL/1000 mL) op aanraden van Gabrielle om te kijken of ze dan wel zouden groeien. Bij de winkel demiwater gehaald om glaswerk mee om te spoelen en op school een tweede 0,2 micrometer steriel filter gekregen. Verder besloten de aquariumpomp te halen bij mijn vader en deze aan te sluiten op een van de twee Chlorella culturen, zodat deze verschilde van elkaar (Rhodomonas verschillen doordat het medium 2x is gemaakt). Bekerglazen onderling laten	Rhodomonas wordt steeds geliger.

			verschillen om te kijken welke omstandigheden optimaal zijn. CO_2-toevoer x4 vervangen. Aan Gabriëlle gevraagd of het evt mogelijk is een nieuw algen sample te krijgen, omdat ik heel graag aan de slag wil met deze alg. De cultuur die ik nu heb ziet er niet veelbelofend uit en Gabriëlle weet ook niet waar het door kan komen.	
6/11	2 u	thuis	Een T-stukje gehaald om beide Chlorella culturen te kunnen voorzien van de aquariumpomp. Logboek bijgewerkt en verder gegaan met de theorie (deelvraag Licht) De Rhodomonas algen waren groen en bezonken toen ik wakker werd… Deze zijn daarom weggegooid. Dit was volgens Gabriëlle namelijk niet meer te redden.	De Chlorella cultuur met beluchting ziet er beter uit dan die zonder pomp. Besloten om beide bekerglazen van de Chlorella te beluchten. Eerste echte lichtpuntje in het onderzoek na erg veel energie; de groene cultuur met lucht ziet er groener uit dan 2 dagen geleden. Dit duidt op groei. Heel blij mee! Ik ben vastberaden dit onderzoek te laten slagen.
7/11	1,5 u	thuis	Werken aan de theorie: zout, O_2-afvoer en fotosynthese: algemeen en	Vannacht bij mijn vriend geslapen dus de algen niet in de gaten kunnen houden ‘s

			donkerreactie. Alvast informatie verzamelt over lichtreactie zodat ik dat morgen kan maken	avonds laat en ‘s ochtends vroeg. Toen ik thuiskwam uit school was de helft van de Chlorella oplossing verdwenen.. Ook uit de vissenkom was veel water verdwenen. Dit zal waarschijnlijk verdampt zijn, want er zaten ook algen op de watten met condens en temp van het water is 35 graden. Vanaf nu iedere dag wat water (en evt medium) toevoegen bij Chlorella.
10/11	3 u	thuis	De hele installatie van moeder naar vader verhuizen en opnieuw installeren. Thuis gewerkt aan de theorie: fotosynthese: lichtreactie, de Rhodomonas alg en hoofdstuk over groeicurve. Ook nogmaals nalezen wat ik tot nu toe allemaal heb. Geschreven tekst verbeteren.	
11/11	2 u	thuis en school	Nieuwe Rhodomonas ontvangen van Gabriëlle. Hier opnieuw het medium voor gemaakt en de tweede installatie gebouwd. Overleg met Nicole over telkamer en mogelijkheden om deze (zelfstandig) te	

			gebruiken. Alles klaarmaken voor morgen; eerste meting.	
12/11	1,5 u	thuis	S'ochtends de Chlorella en Rhodomonas overgeënt in nieuw medium voor het experiment. Op school eerste meting gedaan met behulp van de telkamer.	Eerste keer werken met telkamer; was even inkomen en duurde wat langer, want Nicole was bezig met practicum, dus moest het met YouTube doen.
13/11	1 u	school en thuis	Tweede meting Chlorella en Rhodomonas uitvoeren en beide installaties bijwerken/opruimen (oude algen weg, verwarmingselement checken etc). Ook aan theorie gewerkt.	
14/11	0,5 u	school	Meting drie Chlorella en Rhodomonas. Arjen gesproken over voortgang.	Erg groot verschil in aantal getelde cellen ten opzichte van eerder; fijn!
15/11	2,5 u	school en thuis	Meting vier Chlorella en Rhodomonas. Eerste schets van de gegevens van deze week gemaakt. Ook alle theorie tot nu toe nogmaals kritisch gelezen en dingen verbeterd en/of aangepast. Gewerkt aan hoofdstuk over Licht.	Verschil getelde cellen iets minder groot, wel nog groei aanwezig.
17/11	2,5 u	thuis	Ordenen document, ongebruikte informatie verwijderen zodat er weer orde is. Opstelling van vader naar moeder	

			verplaatst en opnieuw klaargemaakt. Verwerking van de meetgegevens van deze week als 'gidsexperiment' om te kijken of het lukt met het maken van de groeicurve. Extra dozen gekocht voor over de installatie zodat deze alleen de kleur ontvangt waarvan ik de golflengte weet→ nauwkeurigheid	
18/11	1 u	thuis en op school	's Ochtends algen overgeënt in vers medium en op school eerste meting gedaan van deze week. De culturen staan nu in ieder een eigen installatie waar een doos overheen is geplaatst. Zo is uitvoering 1 van de triplo van het onderzoek begonnen.	
19/11	3u	thuis	Meting 2 deze week. Aan de theorie gewerkt en de inhoudsopgave gemaakt, zodat duidelijk overzicht ontstond over wat nog gedaan moest worden.	
20/11	3,5u	thuis	Meting 3 deze week. De gehanteerde methode en materialen zijn beschreven. Ook hoofdstuk 1 en 2 kritisch gelezen en verbeterd aan de hand van vragen die ik aan Arjen gesteld had. Verder ook stuk	

			over Chlorella bijgevoegd, omdat ik deze alg ook heb gecultiveerd en tabel gemaakt met ingenieurs problemen en oplossing op aanraden van Arjen.	
21/11	0,5 u	school	Meting 4 gedaan.	
22/11	1,5 u	thuis	Meting 5 uitgevoerd. In veel voetnoten wordt Gabriëlle genoemd. Ik ben op zoek gegaan naar wetenschappelijke artikelen die bewijzen wat zij gezegd heeft, zodat ik de wetenschappelijke artikelen kan benoemen; ziet er beter uit.	Vrijwel alles is in het Engels. Dat is af en toe erg lastig en zorgt dat het veel tijd in beslag neemt. Er is duidelijk groei zichtbaar in de resultaten. Ook is er aanzienlijk verschil tussen de verschillende kleuren!
23/11	3u	thuis	Hoofdstuk 3 en 4 zijn kritisch doorgenomen en verbeterd. Ook zijn nog wat stukken toegevoegd, waar deze ontbraken. Verder is het document weer even geordend.	
24/11	1u	thuis	Opstelling van moeder naar vader verplaatsen.	
25/11	0,5 u	school en thuis	‘s Ochtends cultuur overgeënt en op school eerste meting gedaan. Nu begint de duplo uitvoering. Ook nog enkele vragen aan Arjen gesteld over de theorie, zodat ik deze kan verbeteren.	
28/11	2,5 u	school en thuis	Meting 4 gedaan en hoofdstuk 5 en	

			gehanteerde methode nogmaals nalezen en aanpassen waar nodig. Er is vandaag tijd besteed aan het nadenken over de conclusie. Dit is complexer dan het leek en zal vervolgd worden als alle resultaten bekend zijn.	
29/11	x	thuis	Meting 5. Nog eenmaal is alle geschreven tekst doorgenomen, zodat het foutloos is.	
30/11	3 u	thuis	Er is gewerkt aan de lay-out, inleiding en het logboek is bijgewerkt/netjes gemaakt. Ook zijn alle linkjes uit de voetnootjes onder elkaar gezet bij de literatuurlijst (nog niet in APA).	Het onderzoek krijgt nu echt uitstraling. Ik ben er tot nu toe erg blij mee. Het heeft wel heel erg veel tijd in beslag genomen de afgelopen tijd! Maar als ik het dan nu zie, ben ik er wel erg trots op!
2/12	x	school	De conceptversie van het PWS is ingeleverd.	
2/12 - 6/12	2,5u	school	De triplo-uitvoering is deze week uitgevoerd. Alle resultaten zijn nu verzameld en deze zijn geordend, zodat ik hier na de PEP mee verder kan.	Alle metingen zijn gedaan! Ik ben blij dat het gelukt is en vind het erg leuk om de resultaten te gaan verwerken. Dit zal wel moeten wachten totdat de PEP over is. Ik kan in ieder geval al zeggen dat het praktisch onderzoek gelukt

				is, waar ik heel blij mee ben.
27/12	2u	thuis	De literatuurlijst in APA gezet.	
29/12	1u	thuis	De inleiding is verbeterd.	
30/12	3u	thuis	Het hele theoretische kader is nu helemaal af.	
4/1	1u	thuis	De afbeeldingen die ik in mijn theoretisch kader wil, heb ik verzameld.	
7/1	0,5u	thuis	Het dankwoord is geschreven.	
9/1	2u	thuis	Er is nagedacht over de resultaten verwerking.	
10/1	2u	thuis	Ik weet hoe ik de resultaten wil weergeven en heb nagedacht hoe ik de gevonden resultaten kan verklaren.	
14/1	2,5u	thuis	Ik heb de tabellen en grafieken in excel gemaakt en een begin gemaakt aan de verklaring van de resultaten.	
15/1	2u	thuis	De resultaten en de verwerking van de resultaten is af.	
16/1	1u	thuis	Ik heb het feedback van Arjen verwerkt. Dit was erg nuttig. Hierbij zijn ook alle index cijfertjes aangepast.	Vandaag heb ik met Arjen mijn conceptversie doorgesproken. Dit was erg positief en dat vond ik heel leuk om te horen! Het harde werken wordt beloond!

17/1	1u	thuis	Ik ben begonnen aan de discussie en de conclusie.	
19/1	2u	thuis	De conclusie is af. Ook heb ik de bijlagen bijna allemaal afgemaakt en ik heb mijn eigen aantekeningen verwerkt.	
20/1	0,5u	thuis	De hypothese is uitgeschreven en toegevoegd	
21/1	2u	thuis	De voetnoten zijn netjes gemaakt, de paginanummers zijn geplaatst, de bijlagen zijn allemaal af en de resultaten, verwerking van resultaten en conclusie zijn nog eens kritisch doorgenomen.	
23/1	1,5u	thuis	De discussie is af en het logboek is bijgewerkt.	
24/1	4u	thuis	De samenvatting is in het Nederlands en Engels geschreven, het hele verslag is nog eens doorgenomen, de afbeeldingen zijn toegevoegd met bijschrift, de totale lay-out is gedaan en de puntjes zijn op de i gezet.	Het verslag is af! Ik ben er echt onwijs blij mee en vond dit een onwijs gaaf proces. Dit wordt ook in de evaluatie benoemd. Ik heb nu nog genoeg tijd om het te laten lezen door mijn ouders en eventuele spelfouten te verbeteren. Ook kan ik het bij een winkel laten inbinden en dan is het officieel af!

27/1	x	school	De definitieve versie van het PWS is ingeleverd!	
Totaal	131 uur	X	X	X

11.7 Reflectie

Wat een onwijs leerzaam en bijzonder proces was dit!
Tijdens het maken en uitvoeren van dit profielwerkstuk heb ik enorm veel nieuwe dingen geleerd. Niet alleen op theoretisch vlak weet ik nu een stuk meer over algen en over het schrijven van een onderzoek, ook op praktisch vlak heeft dit onderzoek mij erg veel geleerd. Het doen van onderzoek brengt namelijk bepaalde aspecten met zich mee die in eerste instantie onderschat worden. Zo ben ik tijdens dit proces vaak tegen 'hobbels' aan gelopen en ben ik er achter gekomen dat het niet altijd even makkelijk was om deze hobbels te verklaren, en er vervolgens een oplossing voor te vinden. Zo ben ik in het begin van het proces erg afhankelijk geweest van personen van buitenaf. Dit voor theoretische vragen, maar ook voor de algen zelf en het eventueel uitvoeren van mijn praktisch onderzoek bij deze instanties. Dit contact liep over het algemeen erg stroef tot niet, wat best lastig is geweest en wat heeft gezorgd dat ik relatief laat met mijn praktisch onderzoek kon starten. Ook tijdens het onderzoek zijn veel waarnemingen gedaan waar een oplossing voor bedacht moest worden, zoals de vlok in de sporenelementen, het troebele medium en de gelijkmatige luchttoevoer. Wat ik lastig vond aan dit onderzoek is het verzorgen van de algen. Dit in verband met mijn privé leven en school. Het zijn erg kleine en gevoelige organismen waardoor het erg veel tijd kost om ze te verzorgen. Het is niet mogelijk 'een dagje over te slaan'. Je hebt nu eenmaal te maken met levende organismen. Hier had ik vooraf niet (lang genoeg) bij stilgestaan. Desondanks ben ik achteraf erg blij dat ik doorgegaan ben en dat het praktisch onderzoek gelukt is. Later heb ik ook erg fijn contact gehad met personen van buitenaf, wat mij enthousiasmeerde en ik vond het erg leuk als er iets gelukt was tijdens het onderzoek.
Dit verslag zie ik als een afsluiting van het VWO. De afgelopen zes jaar heb ik veel geleerd, zowel op het gebied van gedocumenteerd schrijven als op het gebied van het weergeven van gegevens. Ook heb ik voor mijzelf een manier gevonden waarop ik grote projecten aanpak. Deze dingen zijn allemaal samengekomen in dit PWS, wat zorgt voor een voldaan en afsluitend gevoel.

Als ik terugkijk op dit proces, vond ik dit een heel bijzonder traject. Doorzettingsvermogen en nieuwschierigheid hebben er uiteindelijk voor gezorgd dat ik tot dit resultaat ben gekomen waar ik ontzettend trots op ben.

11.8 Eigen werk-verklaring

Ondergetekende verklaart:

Naam: Tjitske Pol

- Dat dit PWS eigen werk is;
- Ddat alles wat overgenomen is uit enige bron voorzien is van een correcte bronvermelding.

Heemstede, 27 februari 2020.

Handtekening:

Literatuurlijst

- Algae Research and Supply. (z.d.). *Lighting for Algae Cultures.* Geraadpleegd op 24 november 2019, van https://algaeresearchsupply.com/pages/lighting-for-algae-cultures
- *Algen*. (2018, 15 oktober). Geraadpleegd op 14 september 2019, van https://wikikids.nl/Algen
- *Aminozuren*. (z.d.). Geraadpleegd op 13 oktober, van https://home.kpn.nl/b1beukema/aminozuren.html
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2013). *Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. Algal Research.* Geraadpleegd op 1 november 2019, van https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004
- Bijsterbosch, J., de Jong, H., Jongmans, W., Strikwerda, J., Weeda, A., van Wijk, P., … Wolters, J. (2015). *Nectar 3e editie biologie 6VWO* (3de editie). Groningen/Houten, Nederland: Noordhoff.
- Biogenetic. (2019, 21 maart). *Chelaten wat zijn het en hoe werken zij voor snellere opname*. Geraadpleegd op 12 september 2019, van https://biogenetic.nl/chelaten/
- Bouwman, M., van Goor, H., Jongmans, W., Strikwerda, J., Weeda, A., Wolfswinkel, T., … Zweverink, Y. (2014). *Nectar 3e editie biologie 5VWO* (3de editie). Groningen/Houten, Nederland: Noordhoff.
- Bouwens, R. E. A., de Groot, P. A. M., Kranendonk, W., van Lune, J. P., Prop-van den Berg, C. M., van Riswick, J. A. M. H., & Westra, J. J. (Red.). (2013). *BiNaS* (6de editie). Groningen/Houten, Nederland: Noordhoff.
- Brody, L. C. (z.d.). *Nucleotide*. Geraadpleegd op 11 september 2019, van https://www.genome.gov/genetics-glossary/Nucleotide
- Chader, S., Mahmah, B., Chetehouna, K., & Mignolet, E. (2011, 25 maart). *Biodiesel production using Chlorella sorokiniana a green microalga*. Geraadpleegd op 3 augustus 2019, van https://www.cder.dz/download/Art14-1_3.pdf\
- *Chelaten*. (z.d.). Geraadpleegd op 6 november 2019, van https://biogenetic.nl/chelaten/
- *Daarom is zink essentieel voor uw planten*. (2018, 12 februari). Geraadpleegd op 11 oktober 2019, van https://chelal.com/nl/blog/daarom-zink-essentieel-voor-uw-planten
- Da Silva, A. F., Lourenco, S. O., & Chaloub, R. M. (2009, 1 november). *Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga Rhodomonas sp. (Cryptophyceae)*. Geraadpleegd op 6 september 2019, van https://www.sciencedirect.com
- Danesi, E.D.G., Rangel-Yagui, C.O., Carvalho, J.C.M., Sato, S. (2002, oktober). *An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by Spirulina platensis.* Geraadpleegd op 3 oktober, van https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953402000545
- Dahmen, L. (z.d.). *Energiecarriers*. Geraadpleegd op 18 september 2019, van https://www.biodoen.nl/lesmateriaal.php?go_to=314161
- De Bode, M., Leyenaar, A., Verbeek, I., Van der Wal, L. (2014, september). *Toekomst met algen, waarom algen de mensen de mensheid kunnen redden.* Geraadpleegd op 17 augustus 2019, van https://edepot.wur.nl
- *Enkele feiten over fossiele brandstoffen op een rij | Essent*. (z.d.). Geraadpleegd op 28 november 2019, van https://www.essent.nl/kennisbank/stroom-en-gas/energiebronnen/fossiele-brandstoffen
- *Focus op voedingselementen ijzer*. (2018, 28 april). Geraadpleegd op 4 oktober 2019, van https://www.rhp.nl/nl/focus-op-voedingselementen-ijzer
- *Fotosynthese.* (z.d.). Geraadpleegd op 27 november 2019, van https://www.rug-a-pien.be/docs/fotosynthese.pdf
- Gantt, E., & Lipschultz, C. A. (1973, 5 april). *Energy transfer in phycobilisomes from phycoerythrin to allophycocyanin*. Geraadpleegd op 1 november 2019, van https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005272873900364

- Hausmann, K. (1979). *The function of the periplast of the Cryptophyceae during the discharge of ejectisomes.* Geraadpleegd op 11 oktober 2019, van https://www.sciencedirect.com
- Glazer, A. N., & Stryer, L. (1984). *Phycofluor probes*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 9(10), 423–427. https://doi.org/10.1016/0968-004(84)90146-4
- *Discharge of ejectisomes. Archiv Für Protistenkunde.* https://doi.org/10.1016/S0003-9365(79)80033-0
- Hoekstra, W., Lamers, P. (2013). *Algen kweken voor doe-het-zelvers*. Geraadpleegd op 12 april, van https://edepot.wur.nl/287239
- Hoekstra, W., Lamers, P. (2013). *De groene belofte: algen.* Geraadpleegd op 2 april 2019, van https://www.biomaatschappij.nl/wordpress/wp-content/uploads/2016/05/Algen_72dpi.pdf
- Huisman, J. (2014, 26 juni). *De basis van de voedselketen.* Geraadpleegd op 14 september van https://www.nemokennislink.nl/publicaties/de-basis-van-de-voedselketen/
- Illman, A.M., Scragg, A.H., Shales, S.W. (2000, 1 november). *Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium.* Geraadpleegd op 2 oktober 2019, van https://www.sciencedirect.com
- Janssen, M. (2016, 1 juli). *Beter licht op algen*. Geraadpleegd op 10 oktober 2019, van https://www.nemokennislink.nl/publicaties/beter-licht-op-algen/
- Lemmers, M., Schots, A., Van Kooten, O., Van Seters, J., Linssen, G. (2013). *Algen voor het leven*. Geraadpleegd op 5 april 2019, van https://www.wur.nl
- Leurs, R. (z.d.). *Oppassen met te veel stikstof*. Geraadpleegd op 13 november 2019, van https://edepot.wur.nl/59
- Leurs, R. (z.d.). *Het element zwavel onder de loep nemen*. Geraadpleegd op 13 september 2019, van https://edepot.wur.nl/245461
- *Lighting for algae cultures, about light and photosynthesis.* (z.d.). Geraadpleegd op 24 november 2019, van https://algaeresearchsupply.com/pages/lighting-for-algae-cultures
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q. (2008). *Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga Neochloris oleoabundans.* Geraadpleegd op 10 september 2019, van https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-008-1681-1
- Lin, Q., & Lin, J. (2010, 7 september). *Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a Scenedesmus rubescens like microalga*. Geraadpleegd op 3 augustus 2019, van https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410015208
- Ludwig, M., & Gibbs, S. P. (1989, 1 maart). *Localization of phycoerythrin at the lumenal surface of the thylakoid membrane in Rhodomonas lens. | The Journal of Cell Biology | Rockefeller University Press*. Geraadpleegd op 19 november 2019, van https://rupress.org/jcb/article/108/3/875/55550/Localization-of-phycoerythrin-at-the-lumenal
- *Mangaangebrek*. (z.d.). Geraadpleegd op 6 november 2019, van https://wiki.groenkennisnet.nl/display/BEEL/Mangaangebrek
- Markou, G., Nerantzis, E. (2013, 6 april). *Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions.* Geraadpleegd op 14 september 2019, van https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975013001250
- Marraskuranto, E., Raharjo, J., Kasiamdar, R. S., & Nuringtyas, R. (2018, 28 oktober). *Influence of Salinity on Growth and Phycoerythrin Production of Rhodomonas salina*. Geraadpleegd op 17 november 2019, van https://pdfs.semanticscholar.org
- Mirkovic, T. (2009). *Synthesis, Dynamics and Photophysics of Nanoscale systems.* Geraadpleegd op 19 november 2019, van https://ui.adsabs.harvard
- Mooij, P. (2016, 15 januari). *Algen kansrijk voor productie biodiesel via 'survival of the fattest'*. Geraadpleegd op 12 september 2019, van https://www.tudelft.nl/2016
- Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G., Parry, D.L. (2002, 23 augustus). *Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical*

Australian Microalgae grown in batch cultures.Geraadpleegd op 5 oktober, van https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848601008754
- Rennie, J. (2017, 2 maart). *What penetrates deeper in water? Blue or voilet?* Geraadpleegd op 18 november 2019, van https://physics.stackexchange.com/questions/315842/what-penetrates-deeper-in-water-blue-or-voilet
- *Replicatie.* (z.d.). Geraadpleegd op 30 november, van https://biologielessen.nl/index.php/dna/639-replicatie
- *Rhodomonas baltica karsten.* (z.d.). Geraadpleegd op 1 oktober 2019, van https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=59526
- Robertson, D. (z.d.). *Algal Pigments*. Geraadpleegd op 16 oktober 2019, van https://wordpress.clarku
- Rowan, K. S. (1989). *Photosynthetic Pigments of Algae*. Geraadpleegd op 17 augustus 2019, van https://books.google.nl/books?hl=nl&lr=&id=aZNOAAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=role+of+the+photosynthetic+pigments+algae&ots=YiSIGJ6xxk&sig=DTX0GgzWOfpz7_JadAH9JulPxoQ#v=onepage&q=role%20of%20the%20photosynthetic%20pigments%20algae&f=false
- Ruano, T. T., & Linssen, G. (2018 september). *Reader: algen op school*. Geraadpleegd op 1 juni 2019, van https://www.wur.nl/upload_mm/e/d/a/a
- Schils, R. (2016). *30 vragen en antwoorden over zwavel*. Geraadpleegd op 23 oktober 2019, van https://www.wur.nl/upload_mm/e/1/b/3ed5573a-26ce-4407-8de8-181d497e66ea_30-vragen-en-antwoorden-over-zwavel.pdf
- Siaut, M., Cuiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., … Peltier, G. (2020, 24 januari). *Oil accumulation in the model green alga Chlamydomonas reinhardtii: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves*. Geraadpleegd op 20 oktober 2019, van https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3036615/#__ffn_sectitle
- Solovchenko, A.E., Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., Reshetnikova, I.V., Khozina-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. (2008). *Effects of illumination and nitrogen starvation on accumulation of arachidonic acid by the microalgae parietochloris incisa.* Geraadpleegd op 14 september 2019, van https://link.springer.com
- Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z.,Merzlyak, M.N. (2007, 21 november*). Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalgae Parietochloris incisa*. Geraadpleegd op 14 september 2019, van https://link.springer.com
- Solovchenko, A.E., Merzlyak, M.N., Chivkunova, O.B., Reshetnikova, I.V., Khozina-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z. (2007). *Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalgae parietochloris incisa. G*eraadpleegd op 14 september 2019, van https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-007-9233-0
- *Sporenelementen.* (z.d.). Geraadpleegd op 23 november, van https://edepot.wur.nl/206643
- Takagi, M., Karseno, Yoshida, T. (2006, maart). *Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine algae Dunaliella cells. Geraadpleegd op 2 november 2019, van https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172306705709*
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., & Steyer, J. P. (2015, 1 december). *Growth of Chlorella sorokiniana on a mixture of volatile fatty acids: The effects of light and temperature, Bioresource Technology*. Geraadpleegd op 6 september 2019, van https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/growth-of-chlorella-sorokiniana-on-a-mixture-of-volatile-fatty-acids-5N0uVEMv30?articleList=%2Fsearch%3Fquery%3Dgrowth%2Btemperature%2Bc.%2Bsorokiniana

- Van Beveren, E. (2012, 31 oktober). *Teledetectie* . Geraadpleegd op 24 oktober 2019, van http://www.marinespecies.org/introduced/wiki/Teledetectie
- Van der Weij-de Wit, C. D., Ihalainen, J. A., van Grondelle, R., & Dekker, J. P. (2007, 28 maart). *Excitation energy transfer in native and unstacked thylakoid membranes studied by low temperature and ultrafast fluorescence spectroscopy*. Geraadpleegd op 5 november 2019, van https://research.vu.nl/ws/portalfiles/portal/2471835/fulltext.pdf
- Van Rhijn, J., Heutmekers, T., van Kempen, P., Rus, G., Spillane, B., & Veldema, Y. (2016). *Chemie overal 5VWO* (4de editie). Groningen/Houten, Nederland: Noordhoff.
- Verhagen, H. (2018, 29 mei). *Focus op voedingselementen mangaan*. Geraadpleegd op 16 september 2019, van https://www.rhp.nl/nl/focus-op-voedingselementen-mangaan
- Viskari, P. J., & Colyer, C. L. (2003). *Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. Analytical Biochemistry*, *319*(2), 263–271. https://doi.org/10.1016/s0003-2697(03)00294-x
- *Waterkwantiteit.* (z.d.). Geraadpleegd op 20 november 2019, van https://www.lenntech.nl/water-kwantiteit
- Wikipedia-bijdragers. (2018, 25 juli). *Chelatie*. Geraadpleegd op 14 november 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Chelatie
- Wikipedia contributors. (2019, 3 december). *Cryptomonad*. Geraadpleegd op 10 oktober 2019, van https://en.wikipedia.org/wiki/Cryptomonad
- Wikipedia-bijdragers. (2019, 10 maart). *Fotosysteem*. Geraadpleegd op 29 november 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Fotosysteem
- Wikipedia-bijdragers. (2018, 26 juni). *Fotische zone*. Geraadpleegd op 21 november 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Fotische_zone
- Wikipedia-bijdragers. (2019, 21 november). *Lichtreacties*. Geraadpleegd op 26 november 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Lichtreacties
- Wikipedia-bijdragers. (2019, 24 september). *Methionine.* Geraadpleegd op 2 oktober 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Methionine
- Wikipedia-bijdragers. (2019b, 9 juni). *Wet van Henry*. Geraadpleegd op 1 oktober 2019, van https://nl.wikipedia.org/wiki/Wet_van_Henry
- Xu, N., Zhang, X., Fan, X., Han, L., Zeng, C. (2001). *Effects of nitrogen sources and concentration on growth rate and fatty acid composition of Ellipsoidion sp. (Eustigmatophyta).* Geraadpleegd op 7 oktober, van https://link.springer.com/article/10.1023/A:1012537219198
- *Zink.* (z.d.). Geraadpleegd op 21 oktober, van https://www.voedingscentrum.nl/encyclopedie/zink.aspx
- Wikipedia contributors. (2020, 7 januari). *Water distribution on Earth*. Geraadpleegd op 20 november 2019, van https://en.wikipedia.org/wiki/Water_distribution_on_Earth