

# **Prozessentwicklung für das Wachstum von Torfmoosen in Bioreaktoren zur groß-skaligen Biomasseproduktion**

zur Erlangung des akademischen Grades einer  
DOKTORIN DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN

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

genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Ingrida Melková  
aus Banská Bystrica

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2022

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralf Reski



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):  
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

*Hinterher ist man immer schlauer.*

*(Anonymous)*

# Vorwort

Der Weg einer wissenschaftlichen Arbeit ist wie die Erstbesteigung eines Gipfels. Zunächst gilt es sich vorzubereiten, sich mit dem Ziel vertraut zu machen, Profis zu befragen und schlussendlich loszulegen. Stehend an der Spitze des wissenschaftlichen Gipfels würde ich gerne an dieser Stelle mein Dank an folgende Personen aussprechen:

... an meinen Expeditionsleiter Herrn Prof. Posten für die Möglichkeit, an der Expedition zu diesem wissenschaftlichen Gipfel teilzuhaben und dafür, dass er das Vertrauen nie verloren hat. Danke für die vierjährige Begleitung und Unterstützung bei jedem Wetter, vor allem in der Zeit, wo kaum Weg zu sehen war.

... an Herrn Professor Reski für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit. Vielen Dank.

... an meinen Bergsteigerspezialisten, unseren Institutsingenieur Christian Steinweg. Dank seiner technischen Unterstützung und Geduld war der Rucksack nie zu schwer zu tragen.

... an die Expeditionsteilnehmer, meine Kolleginnen und Kollegen am Institut: Andi, Mirco, Christoph, Nikolas, Kira, Franzi, Johanna und Artem, die aus dieser Reise ein unvergessliches Abenteuer gemacht haben 😊

... an meine kleinen Expeditionsteilnehmer, welche bei mir ihre Bachelor- und Masterarbeiten angefertigt haben: Selima, Carolin, Julian, Denys, Dominik, Paul, Clarissa, Holger, Jonas und Sandra, die mit ihren Arbeiten sehr gute Wanderkarten erstellt haben. Ohne ihr Engagement und die anregenden Diskussionen mit ihnen hätte die Expedition bestimmt länger gedauert.

... an alle Mitglieder der parallellaufenden Expedition MOOSzucht der Uni Greifswald, der Uni Freiburg und der Nira GmbH. Die positive Atmosphäre und die produktive Zusammenarbeit waren ein bedeutsamer Beitrag entlang des Weges.

... an alle Mitarbeiter im Tourenhochlager, von anderen Instituten und Einrichtungen, die mir weitere Wege zum Gipfel gezeigt haben: Frau Abbt-Braun und Herr Weber (Institut für Wasserschmie und Wassertechnologie, KIT), Frau Jürges (Botanisches Institut, KIT), Ioannis Papachristou (Institut für Hochleistungsimpuls und Mikrowellentechnik, KIT), Olga Gorte und Christin Kubisch (Institut für Technische Biologie, KIT), Mira Kohl (Institut für Botanik und Landschaftsökologie, Universität Greifswald), Melanie Heck (Institut für Pflanzenbiotechnologie, Universität Freiburg) und Frau Bleyer (Geomar Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung). Ohne sie wäre die Aussicht nicht so klar gewesen.

... an meine Outdoorblog-Leser: Susi, Nikolas, Christoph, Franzi und Mirco G.. Auch dank ihren Anregungen und Korrekturen ist diese Arbeit entstanden. 😊 Mega Dankeschön hierfür!

... an meine Follower, meine Freunde, in Deutschland sowie in der Slowakei, die mich die vier Jahre auf der Reise unterstützt haben und aus dieser Zeit eine wunderschöne Lebensetappe gemacht haben.

... an meine Familie, die mich trotz der Distanz unterstützt hat, immer an mich geglaubt hat und geduldig mit mir war. Vaša bezhraničná obetavosť a dôvera mi umožnili dosiahnuť jeden z ďalších cieľov, ktoré som si predsavzdala. Ďakujem zo srdca mami a oci!

... an meinen besten Freund, der die ganze Zeit mit mir gelaufen ist und mir dabei andere Horizonte aufgezeigt hat. Shoukran baaarcha sa7bi min 9albi, dima uu na momenty winti!

Karlsruhe, im März 2022

Ingrida Melková





---

# Zusammenfassung

Die Wiederaufforstung der abgetorften Moorflächen in Deutschland benötigt eine große Menge an Torfmoos-Saatgut, welche aus den Naturreservaten nicht sofort gedeckt werden kann. Die Bereitstellung der ausreichenden Torfmoosbiomasse kann in Photobioreaktoren realisiert werden.

Zu einer optimalen Vermehrung von Torfmoosen im Bioreaktor ist es notwendig, zunächst die Kultivierungsparameter zu finden, welche das Wachstum der Torfmoose und ihre Produktivität unter *in-vitro* Bedingungen beeinflussen. In von unten beleuchteten 500 mL Schüttelkolben gelang es, wichtige biologische Aspekte für die *in-vitro* Vermehrung von *S. palustre* sowie *S. rubellum* aufzudecken. Bislang war eine Kultivierung von *Sphagnen* im anorganischen Knop-Medium nicht realisierbar. Mit einer kontinuierlichen Begasung (0,1 vvm,  $x_{\text{CO}_2}=1\%$ ) war es möglich, *S. palustre* reproduzierbar zu kultivieren. Fünfwochige Kultivierungen im anorganischen Knop-Medium mit  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  bei einer Photonenflussdichte (PFD) von  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  produzierten eine durchschnittliche Biomassekonzentration von  $6,85 \pm 0,62 \text{ gBTM}\cdot\text{L}^{-1}$ . Bei einem wöchentlichen Medienwechsel (Knop-Medium 20 % (v/v),  $V_M=250 \text{ mL}$ ) ließen sich auch weitere Torfmoos-Spezies wie *S. rubellum* *in-vitro* im Schüttelkolben vegetativ vermehren und vergleichbare Biomassekonzentration ( $c(\text{BTM})=5,97 \pm 0,41 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) wie der *S. palustre* erreichen. Für das photoautotrophe Wachstum benötigte *S. palustre* 1 % des  $\text{CO}_2$  im Zugas (v/v) bei einer Photonenflussdichte von  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , während bei PFD =  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  der molare  $\text{CO}_2$ -Anteil im Zugas mindestens 2 % betragen musste, um das Wachstum von Torfmoosen zu stimulieren. Die reine Luftbegasung der Mooskultur unabhängig von der getesteten eingestrahlten Photonenflussdichte ( $100 - 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), zeigte sich für die Biomasseproduktion als nicht ausreichend. Eine Erhöhung der Lichtverfügbarkeit ( $200 \rightarrow 500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) verbesserte nicht die Biomasseproduktion, sondern traten Chlorophyllabbauerscheinungen auf. Die spektrale Zusammensetzung der LED-Module zur künstlichen Beleuchtung der Mooskultur war ein wichtiger Parameter für das Wachstum von *S. palustre*. Eine minimale Photonenflussdichte von  $18,9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  im Blaubereich ( $\lambda=430$  und  $490 \text{ nm}$ ) war notwendig, um das Wachstum von *S. palustre* zu stimulieren. Daher eigneten sich die kaltweißen LEDs statt der Warmweißen für das Wachstum von Torfmoosen mit künstlicher Beleuchtung. Eine Dauerbeleuchtung war nicht erforderlich und ähnliche Biomassekonzentration wurden bei einem Hell/Dunkel-Zyklus von 16/8 ( $\text{h}\cdot\text{h}^{-1}$ ) erreicht. Zwei unterschiedliche Stickstoffquellen (Ammonium und Nitrat) waren für das Wachstum von *S. palustre* essentiell. Das Wachstum von *S. palustre* im Knop-Medium mit Nitrat als N-Quelle ( $c(\text{KNO}_3) = 10,94 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) erwies sich als nicht zufriedenstellend, sowie eine Ammoniumkonzentration von  $10,94 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  war für das Moos toxisch. Neben der Produktivität wirkte sich die Ammoniumkonzentration auf die Morphologie der Mooskultur aus, welche durch eine sphärische Struktur mit mehreren Capitula und reduziertem Längenwachstum gekennzeichnet war. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Stickstoffquellen den Pigmentgehalt beeinflussen, wobei eine Senkung des Gehalts an Chlorophyll mit Nitrat als einzige N-Quelle auftrat. Die übliche pH-Senkung im Knop-Medium war auf die Ammonium-Aufnahme zurückzuführen und nicht auf den Kationenaustausch an der Zellwand der Moospflanze. Die Verringerung des pH-Wertes war für das Wachstum von Torfmoosen nicht notwendig, da eine Kultivierung bei einem konstanten pH-Wert durch Zugabe eines Puffers (Piperazin-1,4-bis(propansulfonsäure)) die produzierte Biomasse nicht signifikant beeinflusste. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der neue Ausgangspunkt für die weitere Optimierung der Prozessparameter von *S. palustre* in Submerskultur im Batchprozess bestimmt: LED-Beleuchtung durch kaltweiße LEDs, mit einer PFD= $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16/8 Hell-Dunkel-Zyklus; Begasung mit einem molaren  $\text{CO}_2$ -Anteil von 2 % im Zugas und einer Begasungsrate von 0,08 vvm; 1,0faches Knop-Medium mit  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  mit einem Anfang-pH-Wert von 4,0.

Bislang war ein kontrollierter emerser Photobioreaktor zur Torfmooskultivierung, der auf den Kultivierungsbedingungen im Hochmoor basiert, nicht bekannt. Auf Grundlage des Konzepts des *Trickle-Bed*-Reaktors wurde ein 1,5 L emerser Photobioreaktor (Moosbettreaktor) entwickelt, welcher eine axenische Kultivierung unter kontrollierten Bedingungen (PFD, Temperatur,  $\text{CO}_2$ ) ermöglichte. Im Moosbettreaktor wuchsen die Torfmoose auf einem wasserdurchlässigen Speichervlies aus Polypropylen und wurden von unten stündlich mit Medium versorgt. Die Nährstoffzufuhr der Torfmoosbiomasse von oben mittels einer Zerstäubungsdüse war für *S. palustre* schädlich. Das für die Photosynthese benötigte  $\text{CO}_2$  wurde am Reaktorboden eingeleitet und nach dessen Durchströmen der Torfmooschicht, zusammen mit dem produzierten Sauerstoff von oben aus dem Reaktor ausgetragen. Die Energiequelle für das photoautotrophe Wachstum von

Torfmoosen wurde von oben von einem Lichtmodul bereitgestellt, des mit kaltweißen LEDs ausgestattet war. Der Moosbettreaktor ermöglichte es, das Torfmoos *S. palustre*, sowie die zwei anderen Moospezies *S. rubellum* und *S. fimbriatum*, welche langsam in Submerskultur im Batchverfahren wuchsen, emers und axenisch zu kultivieren. Bei einer Dauerbeleuchtung mit einer PFD von  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und einer Begasungsrate von  $25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit  $x_{\text{CO}_2}=2 \%$  erreichte *S. palustre* eine durchschnittlichen Längenzuwachsrate von  $0,17 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ , *S. rubellum* von  $0,09 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$  und *S. fimbriatum* von  $0,20 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ . Als Kulturmedium wurde 0,2faches Knop-Medium mit  $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  mit einem Volumen von 800 mL verwendet und um  $0,216 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Mg}(\text{NO}_3)_2$  erweitert, um den Chlorophyllabbau in den oberen Mooschichten zu vermeiden. Unter diesen Bedingungen zeigte der Moosbettreaktor eine hohe Flächenproduktivität von  $12,6 \text{ gBTM}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $312 \text{ gFM}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ) im Vergleich zum Freilandmooswachstum. Mit dem entwickelten Reaktorsystem ist es gelungen, die Moose in einem ausdifferenzierten Zustand in einem kompakten Moosteppich wachsen zu lassen. Der Moosbettreaktor eröffnet die Möglichkeit zur kostengünstigen Produktion von Torfmoosbiomasse mit naturnaher Morphologie, da nur niedrige Betriebskosten, welche lediglich durch die Begasung zum Gaseintrag bestimmt werden, erwartet werden. Darüber hinaus hat der Moosbettreaktor das Hochskalierungspotenzial durch Stapeln baugleicher Reaktoretagen.

Anschließend wurde im Rahmen diese Arbeit die Produktion von Torfmoospflanzen mit vielen Innovation und Capitula im Labormaßstab fokussiert, weil sich Pflanzen mit dieser Morphologie für die Aussaat am besten eignen. In einem horizontal betriebenen 5 L Wave-Photobioreaktor betrug die volumetrische Produktivität  $2,8 \text{ gFM}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  und die Moose wuchsen in sphärischer Struktur mit vielen Innovationen. Trotz der erfüllten Saatgutqualität ist dieser Reaktortyp für die zukünftige groß-skaligen Torfmoosproduktion aufgrund der hohen Betriebskosten und eingeschränkten Maßstabvergrößerung ungeeignet.

Die zweite Alternative eines submersen Kultivierungssystems zur Maßstabvergrößerungen war der vertikal aufgebaute 60 L Schlauchreaktor aus der Mikroalgenkultivierung. Im Reaktor wuchs das Torfmoos *S. palustre* unter konstanter Temperatur im offenen Betrieb, wobei auf die Autoklavierung des Mediums (anorganisches 1,0faches Knop-Medium mit  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ ) verzichtet wurde. Ein LED-Lichtmodul, bestehend aus kaltweißen LEDs, beleuchtete den Reaktor ganztätig mit einer PFD= $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Begast wurde mit einer Begasungsrate von 0,03 vvm und mit einem  $x_{\text{CO}_2}=2 \%$ . So erzeugte der Schlauchreaktor Torfmoosbiomasse mit vielen Capitula. Da im Schlauchreaktor wesentlich weniger Turbulenz vorliegt, entstanden lockere Moosstrukturen. Die erreichte Produktivität von  $0,02 \text{ gBTM}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $0,43 \text{ gFM}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) war jedoch gering, da die Torfmoose durch die Gasblasen starken Auftrieb erfuhren und dadurch nicht die gesamte Leuchtfläche zum Wachstum nutzen konnten. Trotz der Tatsache, dass sich der Schlauchreaktor in Hinsicht auf die Produktivität als nicht zufriedenstellend erwies, sollte dieser Reaktortyp zur Produktion von Torfmoosbiomasse weiterverfolgt werden. Erstens unterscheidet sich der Schlauchreaktor grundlegend von vorhandenen submersen Photobioreaktoren, bei denen die Maßstabvergrößerung technisch nicht möglich ist. Die Erhöhung der Produktionskapazität kann durch Reihenkultivierung der einzelnen Schlauchreaktoren realisiert werden, ohne die Lichtverhältnisse im Reaktor negativ zu beeinflussen. Zweitens kann die volumetrische Produktivität erhöht werden, indem Konzepte des Airliftreaktors mit verbesserter axialer Durchmischung in das System integriert werden und die Kultivierung als Fed-Batch mit sequenzierter Teilernte erfolgt.

Es zeigte sich, dass *S. palustre* in der Lage ist, in verschiedenen Reaktortypen zu wachsen, und dass sich alle drei getesteten Reaktortypen für die Herstellung von Torfmoosbiomasse im kleinen Maßstab eignen. Die verschiedenen Verhältnisse innerhalb der Photobioreaktoren rufen Variationen der Torfmoosmorphologie hervor, die vermutlich auf die unterschiedlichen Licht- und Krafteinwirkung zurückzuführen sind. Je nach erwünschter Saatgutqualität können die drei vorgestellten Photobioreaktoren weiterentwickelt und hochskaliert werden, um für die zukünftige industrielle Torfmoosproduktion verwendet zu werden.

---

# Abstract

The renaturation of the depleted peat bogs in Germany requires a large amount of peat moss biomass, which cannot be covered from the natural reserves. The supply of sufficient biomass can be realized in photobioreactors.

For an optimal propagation of *Sphagnum* mosses in the bioreactor, first of all it is necessary to find the main in vitro cultivation parameters, that influence the peat moss growth and productivity. In 500 mL shake flasks illuminated from below, it was possible to lay the information foundation for the in vitro growth of *S. palustre* as well as *S. rubellum*. So far, cultivation of *Sphagnum* was not feasible in inorganic Knop-Medium. With continuous gassing (0.1 vvm,  $x_{\text{CO}_2}=1\%$ ) it was possible to cultivate *S. palustre* reproducibly. Five-week cultivations in inorganic Knop-Medium containing  $1.25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  at a photon flux density (PFD) of  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  yielded an average biomass concentration of  $6.85 \pm 0.62 \text{ gDW}\cdot\text{l}^{-1}$ . With a weekly medium change (Knop-Medium 20 % (v/v),  $V_M=250 \text{ mL}$ ), other *Sphagnum* species such as *S. rubellum* could also be propagated vegetatively in the shake flasks, with a comparable biomass concentration ( $c(\text{DW})=5.97 \pm 0.41 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) as *S. palustre*. For the photoautotrophic growth, *S. palustre* required 1 % of  $\text{CO}_2$  in the gas mixture (v/v) at a photon flux density of  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , whereas at  $\text{PFD} = 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , the molar  $\text{CO}_2$  content in the gas mixture had to be at least 2 % to stimulate peat moss growth. Without additional  $\text{CO}_2$  aeration the moss growth was insufficient, regardless of the tested irradiated photon flux density ( $100\text{-}200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Increasing the light availability ( $200 \rightarrow 500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) did not improve biomass production, but chlorophyll degradation occurred. The spectral composition of the LED modules used for the artificial illumination of the moss culture was an important parameter for *S. palustre* growth. A minimum photon flux density of  $18.9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  in the blue spectral region ( $\lambda=430$  and  $490 \text{ nm}$ ) was necessary to stimulate *S. palustre* growth. Therefore, the cool white LEDs were more suitable than the warm white LEDs for the growth of *Sphagnum* mosses with artificial illumination. Continuous illumination was not required and similar biomass concentrations were achieved with a light/dark cycle of 16/8 ( $\text{h}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Both nitrogen sources (ammonium and nitrate) were mandatory for *S. palustre* growth. The growth of *S. palustre* in Knop-Medium with nitrate as only nitrogen source ( $c(\text{KNO}_3) = 10.94 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) proved to be unsatisfactory. Also, an ammonium concentration of  $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 10.94 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  was toxic to the mosses. Beside the low reached productivity, the ammonium concentration affected the morphology of the moss culture, which was characterized by a spherical structure with several capitula and reduced length growth. In addition, nitrogen sources were shown to affect pigment content, with a decrease in chlorophyll content occurring in the medium with nitrate as the only nitrogen source. The usual pH decrease in the Knop-Medium was caused by the ammonium uptake and not by the cation exchange capacity of the moss plant. The pH reduction was not necessary for the growth of *Sphagnum* mosses, since a cultivation at a constant pH by adding a buffer (1,4-Piperazine bispropanesulfonic acid) did not significantly lower the amount of produced biomass. Based on these results, the new standard condition for a further optimization of the process parameters of *S. palustre* in submerge culture in batch process was determined: cold warm LED lighting,  $\text{PFD}=200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16/8 light-dark cycle; 2 % mixture of air and  $\text{CO}_2$  and aeration rate of 0.08 vvm; Knop-Medium containing  $1.25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  with start pH of 4.0.

Until now, a controlled emerge photobioreactor for peat moss cultivation, based on cultivation conditions similar to peat bogs, was not known. Starting from the concept of a trickle-bed reactor, a 1.5 l emerge photobioreactor (moss-bed reactor) was developed, which allowed axenic cultivation under controlled conditions (PFD, temperature,  $\text{CO}_2$ ). In the moss-bed reactor, peat mosses grew on a water-permeable storage fleece made of polypropylene and were supplied with medium from below every hour. Sprinkling the peat moss biomass using a full-cone nozzle was detrimental to *S. palustre*. The  $\text{CO}_2$  required for photosynthesis was introduced at the bottom of the reactor and, after flowing through the peat moss layer, was discharged from the top of the reactor, along with the produced oxygen. The energy source for photoautotrophic growth of moss was provided from above by a LED lighting module, which consisted of cool white LEDs. With the moss-bed reactor, it was possible to cultivate *S. palustre*, as well as the two other moss species *S. rubellum* and *S. fimbriatum*, which grew slowly in submerged culture in batch processes, emerge and axenic. Under continuous illumination at a PFD of  $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , with an aeration rate of  $25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  and carbon dioxide concentration of  $x_{\text{CO}_2}=2\%$  in gas mixture, *S. palustre* achieved an average length growth rate of  $0.17 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ , *S. rubellum* of  $0.09 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ , and *S. fimbriatum* of  $0.20 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ . The culture medium with a volume of 800 ml was 0.2 fold Knop-Medium containing  $0.25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  and extended by  $0.216 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Mg}(\text{NO}_3)_2$  to avoid chlorophyll degradation in the upper moss layers. Under these conditions,

the moss-bed reactor showed a high area productivity of  $12.6 \text{ gDW}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $312 \text{ gFW}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ) compared to field mosses. With the developed reactor system, it was possible to grow the mosses in a compact moss carpet with a differentiated growth habit. The moss-bed reactor opens an access to the cost-effective production of peat moss biomass with near-natural morphology because of the low operating costs, which are determined only by the aeration for gas supply. In addition, the moss-bed reactor has the upscaling potential by stacking identical reactor stages.

Subsequently, this work focused on the production of peat moss biomass with many innovations and capitula at laboratory-scale because this morphology has been found to be best for seeding material. In a horizontally operated 5 L wave photobioreactor, the volumetric productivity was  $2.8 \text{ gFW}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  and *S. palustre* grew in spherical growth habit with many innovations. Despite the suitable seed quality, this type of reactor is not suitable for large scale production of peat mosses due to the limited scale-up and the high operating costs caused by mixing.

The second alternative of a submerged cultivation system for scale-up was the vertically constructed 60 L tubular reactor from microalgae cultivation. In the reactor, *S. palustre* grew under constant temperature, in hygienised operation in which the medium (inorganic 1.0fold Knop-Medium containing  $1.25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ ) was not pre-autoclaved. The tubular reactor produced peat moss biomass with many capitula under continuous illumination with an LED lighting module consisting of cool white LEDs, at a PFD= $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , with aeration rate of 0.03 vvm containing 2 %  $\text{CO}_2$ . Since there was much less turbulence in the tubular reactor, loose moss structures were produced. However, the achieved productivity of  $0.02 \text{ gDW}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  ( $0.43 \text{ gFW}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) was low because the peat mosses experienced strong buoyancy due to the gas bubbles and thus did not use the entire lighting area for growth. Despite the fact that the tube reactor proved to be unsatisfactory in terms of productivity, this type of reactor should be pursued for peat moss biomass production. First, the tubular reactor is fundamentally different from existing submerged photobioreactors, where scale-up is not technically feasible. The increase in production capacity can be realized by placing the individual tube reactors side by side without negatively affecting the light conditions in the reactor. Secondly, volumetric productivity can be increased by improved axial mixing and partial harvest of the produced moss biomass.

It was shown, that *S. palustre* is able to grow in different reactor types and all three reactor types tested are suitable for small-scale production of peat moss biomass. Thus, larger scale cultivation should be feasible. The different hydrodynamic condition in the photobioreactors cause variations in peat moss morphology, which are probably explained by the exposure to the light and gravity in the first case and to the rotation, buoyancy in the second case. Depending on the desired quality of the seed, the three presented photobioreactors can be further designed and used for up-scaling for future industrial peat moss production.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b> .....	<b>i</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>vii</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
2.1 Das Ökosystem Moor.....	3
2.2 Torfmoose.....	5
2.2.1 Fortpflanzung.....	8
2.2.2 Torfmoosarten.....	9
2.2.3 Nutzung.....	10
2.3 <i>Sphagnum</i> -Kultivierungsverfahren.....	11
2.3.1 <i>In-vitro</i> Kultivierungsverfahren.....	13
2.3.2 <i>Ex-situ</i> Kultivierungsmethoden.....	15
2.3.3 <i>In-situ</i> Kultivierungsmethoden.....	17
2.4 Energie- und Stoffwechsel.....	18
2.4.1 Wassertransport und Wassergehalt der Moose.....	19
2.4.2 Lichteinfluss.....	20
2.4.3 CO <sub>2</sub> -Assimilation.....	22
2.4.4 Nährstoffaufnahme.....	24
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.1 Kulturmedium.....	28
3.2 Pflanzenmaterial und Stammhaltung.....	29
3.3 Kultivierungsverfahren.....	29
3.3.1 Schüttelkolben.....	29
3.3.2 <i>Wave</i> -Photobioreaktor.....	32
3.3.3 Schlauchreaktor.....	35
3.3.4 Moosbetteaktor.....	37
3.4 Analytische Methoden.....	40
3.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse.....	40
3.4.2 Bestimmung der Feuchtmasse.....	40
3.4.3 Sterilitätstest.....	40
3.4.4 Zellaufschluss.....	41
3.4.5 Lichtmikroskopie und Binokular.....	41
3.4.6 Bestimmung des Kohlenstoff-, Stickstoff- und Magnesiumgehalts der Torfmoospflanzen.....	41
3.4.7 Bestimmung des spezifischen Pigmentgehalts der Biomasse.....	41
3.4.8 Bestimmung der ionischen Komponenten im Medium mittels Ionenchromatographie.....	42
3.4.9 Bestimmung der Eisenkonzentration.....	42
3.4.10 Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffes (DOC).....	42
3.4.11 Ermittlung des Emissionsspektrums.....	42
3.5 Berechnungen.....	43
3.5.1 Signifikanzberechnung.....	43
3.5.2 Produktivität.....	43
3.5.3 Medien-Design.....	43

3.5.4 Volumetrische Kohlenstoffdioxidaufnahmerate (CUR) und Sauerstoffproduktionsrate (OPR)

44

3.5.5 Nährstoffaufnahme .....44

#### **4 Untersuchung der physiologischen Randbedingungen des Wachstums von Torfmoosen in Submerskultur**

**zur Realisierung eines Photobioreaktors.....45**

4.1 Photoautotrophe Kultivierung im Batchprozess .....45

4.2 Ansäuerung des Kulturmediums .....48

4.3 Kultivierung bei einem konstanten pH-Wert .....50

4.4 Lag-Phase .....51

4.5 Einfluss der Licht- und Kohlenstoffverfügbarkeit.....53

4.5.1 Einfluss der Lichtqualität.....54

4.5.2 Variation der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Zugas .....55

4.5.3 Variation der eingestrahlte Photonenflussdichte .....58

4.5.4 Einfluss von Hell/Dunkel-Zyklen .....60

**5 Anpassung des Kulturmediums hinsichtlich der großtechnischen Umsetzung .....63**

5.1 Einfluss der Stickstoffquelle und -konzentration auf das Wachstum von Torfmoosen .....63

5.1.1 Variation der Stickstoffquelle.....63

5.1.2 Variation der Ammoniumkonzentration .....70

5.2 Einfluss des wöchentlichen Medienwechsels auf das Wachstum von Torfmoosen.....71

**6 Wachstum von Torfmoosen unter definierten Prozessbedingungen im Moosbettreaktor .....74**

6.1 Reaktorkonzeption .....74

6.2 Entwicklung des Moosbettreaktors.....75

6.3 Etablierung der Prozessführungsstrategie im Moosbettreaktor .....79

6.4 Etablierung des Kulturmediums .....82

6.4.1 Experiment I .....82

6.4.2 Experiment II .....84

6.5 Einfluss von der Licht-, CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit und Tag/Nacht-Zyklen .....87

6.5.1 Variation der Photonenflussdichte.....87

6.5.2 Variation der CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit im Kulturmedium .....88

6.5.3 Variation der Hell-Dunkel-Zyklen .....90

6.6 Charakterisierung des Wachstums von Torfmoosen im Moosbettreaktor .....90

6.6.1 Wachstumsverlauf, Morphologie und Zellzusammensetzung der Torfmoospflanze .....91

6.6.2 Wachstumskurve von *S. palustre* .....96

6.6.3 Korrelation des Wachstums von Torfmoosens mit der Nährstoffaufnahme .....97

6.7 Wachstum von drei Torfmoos-Spezies im MBR-Medium .....98

**7 Photobioreaktoren zur Torfmoosproduktion im Pilotmaßstab .....103**

7.1 Wave-Photobioreaktor .....103

7.2 Schlauchreaktor .....106

7.3 Vergleich der Reaktorsysteme .....109

**8 Ausblick .....113**

**9 Literaturverzeichnis .....114**

**Abbildungsverzeichnis.....126**

**Tabellenverzeichnis.....131**

**Abkürzungsverzeichnis.....132**

**Symbolverzeichnis.....134**

**Anhang.....136**

---

# 1 Einleitung

Hochmoore, als eines der wichtigsten Ökosysteme der Welt [1], befinden sich derzeit in einem ungünstigen Zustand. [2] Ungefähr zwei Drittel der Moorfläche in Deutschland wird land- und forstwirtschaftlich genutzt, ca. 4 % dient der Torfgewinnung für den Einsatz als Kultursubstrat im Erwerbsgartenbau und nur 8 % der Gesamtfläche der Hochmoore gilt noch als intakt. [3]. Die anthropogene Nutzung der Moorflächen bedingt die Entwässerung dieser Fläche, was mit der Zeit zur Bodendegradation, zur Veränderung der hydrodynamischen Bedingungen des Ökosystems und im Endeffekt zur Verringerung der Biodiversität führt. [4] Ein weiterer negativer Effekt der Entwässerung der Moorflächen ist der Kontakt der obersten Torfschicht mit atmosphärischem Sauerstoff, der zu einer Oxidierung der organischen Substanzen führt und in einen damit verbundenen Ausstoß von Treibhausgasen wie CO<sub>2</sub> resultiert. [5] Dieser Ausstoß beträgt 5 % der weltweit ermittelten anthropogenen Treibhausgase und sogar 32 % der gesamten Emissionen aus dem Ackerland, obwohl die Moore nur 0,5 % der Landoberfläche der Erde bedecken. [3, 6, 7] Damit der Kohlenstoff wieder in den Hochmooren fixiert werden kann, müssen die Moorflächen mit einer torfbildenden Vegetation besiedelt werden. Jedoch erfolgt eine natürliche spontane Wiederbesiedlung sehr langsam und stark zeitverzögert. [8] Hinzu kommt, dass aufgrund der Kombination einer zuvor durchgeführten Trockenlegung der Flächen und der Torfentfernung die natürliche Wiederbesiedlung von *Sphagnen* (Torfmoosen), als Hauptbesiedler der Hochmoore [1], nicht möglich ist. [9] Deshalb werden heutzutage abgetorfte Moorflächen so präpariert, um mit künstlich angepflanzten Torfmoosen zu einer Renaturierung der Hochmoore beitragen zu können. [6, 8, 9]

Die Renaturierung reduziert den CO<sub>2</sub>-Ausstoß aus den Moorflächen deutlich [10], die Torfbildung findet durch die angepflanzten Torfmoosen jedoch nur sehr langsam statt. In einem Jahr wird ungefähr 1 mm Torfschicht in einem lebenden Hochmoor gebildet [11], was bei weitem den jährlichen Bedarf an Torf (8 – 9 Mio. m<sup>3</sup>) als Kultursubstrat in Deutschland nicht decken kann. [7, 10] Deshalb wird Torf heutzutage überwiegend aus baltischen Staaten und Skandinavien importiert. [7, 10] Um die Transportwege zu verringern und auch einen vollständigen Abbau der Torfreserven zu vermeiden, soll eine Torfalternative für den Gartenbau gefunden werden. Die *Sphagnen* ähneln in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften jenen des Weißtorfs [12, 13], welcher als das meist verwendete Kultursubstrat im Erwerbsgartenbau gilt. [7] Der Einsatz der Torfmoosbiomasse als Kultursubstrat zeigte sich bereits für Setzlinge einiger Gemüsesorten, Kräuter und Zierpflanzen als geeignet. [6, 14]

Die dafür benötigte Torfmoosbiomasse kann direkt aus den natürlichen Beständen der Moore in Ländern wie Chile, Neuseeland und China entnommen werden. [6] In Deutschland ist jedoch die Gewinnung der Torfmoose aus den intakten Habitaten untersagt, da die Standorte in Naturschutzgebieten (92/43/EEC) liegen und die *Sphagnen* eine geschützte Gattung sind. [15] Einen Lösungsansatz hierfür bietet das sogenannte *Sphagnum farming*. Dabei handelt es sich um einen kommerziellen Anbau von Torfmoosen auf abgetorften und zuvor als Grünland genutzten Hochmoorflächen. [16] Nach einer gewissen Wachstumsphase können die Torfmoose abgeerntet und vermarktet werden. [6, 12, 16] Um mit dieser Anbaumethode einen nachwachsenden, dauerhaft verfügbaren Rohstoff als Torfersatz zur Verfügung stellen zu können, muss hierfür ausreichend Torfmoosbiomasse als Saatgut für das *Sphagnum farming* bereitgestellt werden. [1] An der nötigen Saatgutmenge fehlt es jedoch derzeit noch.

Aus diesem Grund wurde das Verbundprojekt MOOSzucht ins Leben gerufen, welches die Züchtung und die Biomasseproduktion von Torfmoosen zur industriellen Herstellung eines nachwachsenden Substratausgangsstoffes für den Gartenbau als Ziel hat. Die Saatgutproduktion soll axenisch in einem großskaligen Photobioreaktor erfolgen. Der große Vorteil von einer *in-vitro* Torfmooskultivierung ist die schnelle Bereitstellung des Saatgutes, weil dort die *Sphagnen* deutlich schneller wachsen als in der Natur. [17–20] Außerdem können die Moose über das ganze Jahr, unabhängig von den Witterungsbedingungen produziert werden, in einer artenreinen und reproduzierbaren Qualität. Bisher gelang es erst die Torfmoosbiomasse im kleinen Forschungsmaßstab zu produzieren. [17, 19] Um das Saatgut bei minimalen Kosten großskalig produzieren zu können, ist es notwendig ein kostengünstiges und nachhaltiges Produktionsverfahren zu etablieren.



Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines solchen kostengünstigen Photobioreaktorssystems und einer Prozessführungsstrategie zur groß-skaligen Kultivierung und Produktion von Torfmoosen. Für die Verfahrensentwicklung sollen zunächst Untersuchungen zu den physiologischen Bedingungen für das Wachstum der Torfmoose durchgeführt werden. Viele der bis jetzt aus der Literatur bekannten Experimente widmeten sich den Freilandtorfmoosen. [17, 21] Für künstlich gezüchtete *Sphagnen* sind erste Kenntnisse über ihr Wachstumsverhalten [17–19, 22–24] vorhanden, jedoch wurden viele Hauptbedürfnisse der Torfmoospflanzen noch nicht erforscht. Daher sollen zunächst grundlegende Erkenntnisse über das Wachstum von *in-vitro* kultivierten Torfmoosen gewonnen und die physiologischen Randbedingungen für ein photoautotrophes Wachstum der Torfmoose untersucht werden. Die zu erforschenden Wachstumsparameter sind beispielweise die Lichtverfügbarkeit, der Kohlenstoffbedarf, der pH-Wert, sowie die Hell/Dunkel-Zyklen. Die Experimente hierfür werden in beleuchteten und geschüttelten Erlenmeyerkolben durchgeführt, was eine hohe Versuchsanzahl ermöglicht und gleichzeitig homogene Wachstumsbedingungen gewährleistet.

Aufbauend auf den Untersuchungen zu den physiologischen Bedingungen des Wachstums soll ein *Trickle-Bed*-Photobioreaktor zur Torfmooskultivierung entwickelt werden, in welchem die Torfmoose naturnah unter kontrollierten Wachstumsbedingungen kultiviert werden können. Um erste Informationen darüber zu erhalten, nach welchen Kriterien die Auslegung des großen *Trickle-Bed*-Photobioreaktors erfolgen soll, wird zunächst ein Reaktor in einem kleineren Maßstab entwickelt. Mit einem *Scale-Down*-Ansatz werden die Wachstumsparameter und die Prozessparameter (z.B. Medienzufuhr) in diesem emersen Photobioreaktor untersucht, mit dem Ziel, eine hohe Wachstumsrate bei geringeren Betriebskosten zu begünstigen. Darüber hinaus soll die Möglichkeit der Hochskalierbarkeit des *Trickle-Bed*-Reaktors demonstriert werden.

Zur groß-skaligen submersen und axenischen Kultivierungen kommen für den Fall, dass reaktorspezifisch Einflüsse eine hohe Torfmoos-Wachstumsrate im *Trickle-Bed*-Reaktor verhindern, zwei verschiedene im Einsatz. Dies ist auf der einen Seite ein horizontal betriebener *Wave*-Photobioreaktor, welcher bereits für andere Moosarten (z.B. *Physcomitrella patens*) erfolgreich industriell etabliert wurde [25]. Dieser Reaktortyp wurde bisher noch nicht für Torfmoose getestet. Als zweites Konzept soll ein Schlauchreaktor aus der Mikroalgenkultivierung eingesetzt werden, welcher eine ähnliche Hydrodynamik mit entsprechenden Stoff- und Energieströmen aufweist, wie der für die Torfmooskultivierung bereits eingesetzte Blasensäulenreaktor [17]. Durch den Einsatz von transparenten Kunststoffen für die Reaktorwand anstatt Glas, soll der Lichteintrag verbessert und gleichzeitig die Investitionskosten des Reaktorbaus gesenkt werden. Eine Testkultivierung in beiden entwickelten Kultivierungssystemen wird am Ende der Entwicklung durchgeführt.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollten im Rahmen des MOOSzucht-Projekts zur als Grundlage für eine weitere Maßstabvergrößerung eines relevanten Photobioreaktors zur groß-skaligen Torfmooskultivierung für als einen nachwachsender Substratausgangsstoff für den Gartenbau diene.

## 2 Theoretische Grundlagen

Die Betrachtung des natürlichen Habitats von Torfmoosen, ihrer wichtigsten morphologischen Merkmale, sowie ihres Wachstumsverhaltens dient einem besseren Verständnis der Pflanzen und liefert anhand ihrer daraus abgeleiteten Bedürfnisse Informationen über eine optimale Umgebung für ein *in-vitro* Kultivierungssystem. Aus diesem Grund wird in diesem Kapitel auf das natürliche Habitat der Torfmoose eingegangen und deren Wachstumsmechanismen betrachtet. Anschließend erfolgt die Darstellung des Standes der Forschung zur technischen Produktion von Torfmoosbiomasse, sowie zu den Hauptmechanismen der Energie- und Nährstoffumwandlung der besagten Moose.

### 2.1 Das Ökosystem Moor

Das Moor (siehe Abbildung 2-1) ist eine einzigartige Landschaft, welche ca. 1 bis 2 % der Festlandfläche bedeckt. [26, 27] Die Moore sind durch die Anreicherung von Torf, also organischer humifizierter Pflanzenmaterialien, gekennzeichnet. Als Moor wird ein Gebiet dann eingestuft, wenn dieses eine zumindest 30 cm dicke Torfschicht enthält [28]. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zu herkömmlichen Sümpfen dar.

Die Moore können in mehrere Klassen nach ihren morphologischen, hydrologischen, chemischen und ökologischen Merkmalen unterteilt werden [28, 29]. Basierend auf der Morphologie eines Moores wird zwischen Niedermooren (*fen*) und Hochmooren (*bog*) (siehe Abbildung 2-1) unterschieden. Die Niedermoore befinden sich in Senken und ihre Landschaft liegt nicht über dem normalen Grundwasserspiegel. Dem gegenüber ist das Relief eines Hochmoores selten gleichmäßig eben und besteht aus wassergefüllten, seichten Dellen (*hollows*), sogenannte Schlenken, wo sich das Niederschlagwasser ansammeln kann. In sehr langen Trockenzeiten kann es dazu kommen, dass die Schlenken austrocknen. Angrenzend an die wassergefüllten Schlenken erheben sich kissenförmige Buckel, sogenannte Bulte (*hummocks*), mit einem Durchmesser von 0,5- 3 m. Dieses schwammartige Polster besteht aus wenigen Pflanzen-Arten und Moosen, wie beispielweise aus gewissen *Sphagnum*-Arten (siehe Kapitel 2.2) [1] und ist wasserdurchlässig. Die Wasserbewegung erfolgt durch die Mooschicht [30] mit einer Geschwindigkeit von ungefähr  $0,3 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ . [31] Die Niedermoore stehen in ständigem Kontakt zu Oberflächen-, Grund oder Meerwasser. Dadurch verfügen sie über ein höheres Nährstoffangebot [32] und weisen eine hohe Pflanzenvielfalt auf. Den Hochmooren fehlt dieser Kontakt zu Gewässern. Aus diesem Grund hängen die Hochmoore von ausreichend Niederschlagwasser ab weswegen sie auch als Regenwassermoore (ombrotrophe Moore) bezeichnet werden. Da im Regen keine gelösten Stoffe vorhanden sind und die Luft nur in Spuren der Mineralien enthält, sind die Hochmoore nährstoffarme Gebiete. [1, 28, 29]



Abbildung 2-1: Intaktes Hochmoor in Shippagan, New Brunswick, Canada. Foto: Melková

Anhand der Betrachtung der ökologisch relevanten Parameter, wie zum Beispiel dem pH-Wert und der Trophie (Stickstoffverfügbarkeit) werden die Hochmoore in unterschiedliche ökologische Moortypen gegliedert (siehe Tabelle 2-1). Für die Bestimmung der Trophie eines Moors wird das C/N-Verhältnis in der oberen Schicht eines Moores (Akrotelm) bestimmt. Die oligotrophen Moore weisen einen niedrigen Stickstoffgehalt mit einem C/N-Verhältnis von etwa 33-50 auf, wobei die nährstoffreichen (eutrophen) Moore ein C/N-Verhältnis von 10-20 besitzen. Dabei stehen andere Nährelemente wie Magnesium (Mg), Kalium (K) oder Kalzium (Ca) in der Regel in mitteleuropäischen Mooren nicht in einem engen Zusammenhang mit der angegebenen Trophiestufe [4].

Je nach dem pH-Wert wird bei den deutschen Mooren zwischen drei Aziditätsstufen unterschieden: sauer, subneutral und kalkhaltig. Die saure Aziditätsstufe wird weiter als extrem sauer – mäßig sauer (< 2,8 – 4,8) gegliedert, subneutral in schwach sauer – sehr schwach sauer (4,8 – 6,4) und basisch in neutral-basisch mit einem pH- Wert von 6,4 bis max. 7,2 [1, 33, 34]. In Hochmooren wird oft ein pH-Wert oft zwischen 3,3 – 4,5 gemessen [35], wobei eine Schwankung des pH-Wertes aufgrund von unterschiedlichen Niederschlagsmengen und Wasserständen auftritt. [31, 36] Außerdem unterscheiden sich die pH-Werte in Bulten von denen in den Schlenken, welche bei den Bulten niedriger sind. [31] Der Bereich von pH-Werten zwischen 5 und 6 liegt im Übergangsbereich zwischen Nieder- und Hochmooren [37]. In basischen Moorgewässern wird ein hoher pH-Wert durch die Puffereigenschaften von Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) aufrechterhalten [38]. Unter diesen Umständen bewirkt eine erhöhte Calciumkonzentration ( $c > 188 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) eine Zunahme des pH-Wertes des Moorwassers sowie der  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration, [39] was sich zudem auf die Vegetation des Moors auswirkt. [39, 40]

Tabelle 2-1: Ökologische Moortypen in Europa, übernommen von Succow und Joosten [4, 11] veröffentlicht in MOORWISSEN [28]. Die Nährstoffverfügbarkeit ist als Trophie angegeben. Die einzelnen Begriffe werden folgend erklärt: oligotroph=nährstoffarm, mesotroph=mäßig nährstoffreich, eutroph= nährstoffreich.

Moortyp	Trophie	Azidität
(Sauer-)Armmoor	Oligotroph	sauer
Sauer-Zwischenmoor	Mesotroph	Sauer
Basen-Zwischenmoor	Mesotroph	Schwach-sauer
Kalk-Zwischenmoor	Mesotroph	Alkalisch
Reichmoor	Eutroph	Sauer-alkalisch

Da die Nährstoffe in Hochmooren überwiegend aus der Luft stammen, variiert der Nährstoffgehalt im Moorwasser mit den klimatischen Bedingungen. Auch die geographischen Besonderheiten der Umgebung, wie zum Beispiel die Entfernung zum Meer oder die industriebedingten atmosphärischen Verschmutzungen, beeinflussen die vorherrschende Nährstoffzusammensetzung. [1] Zusätzlich unterscheidet sich die Nährstoffkonzentration des Moorwassers auch zwischen den Schlenken und Bulten, wobei in den Schlenken die einzelnen Elemente in höherer Konzentration vorkommen. [32] In Tabelle 2-2 ist ein Überblick der Nährstoffkonzentrationen aus verschiedenen Hochmooren dargestellt.

Tabelle 2-2: Konzentration der Nährstoffe im natürlichen Moorwasser, in Tanner Hochmoor [41], House Hochmoor [42] Schwarzer Hochmoor [43]; Holme Moos Hochmoor [44], sowie Jizerské hory und Jeseníky [45]

Element	Konzentration
$\text{Na}^+$	1,0 - 1,8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [43]; 0,9 - 1,2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [41]; 0,1 - 0,3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]
$\text{Ca}^{2+}$	0,7 - 3,4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [43]; 6,3 - 6,6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [41]; 0,3 - 0,7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]; 0,019 - 0,029 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [44]
$\text{K}^+$	0,03 - 1,6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [43]; 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [41]; 0,2 - 0,6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]; 0,006-0,008 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [44]
$\text{NH}_4^+$	0,1 – 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]; 0,069 - 0,023 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [44]
$\text{NO}_3^-$	0,03 - 1,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]; 0,03-0,074 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [44]
$\text{SO}_4^{2-}$	0,105-0,165 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]; 0,06 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [44]
$\text{PO}_4^{3-}$	0,04 – 0,40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [45]
$\text{Cl}^-$	0,07 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]
Fe	0,025 - 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]; 0,002 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [44]; 5,5 - 4,4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [41]
$\text{Mg}^{2+}$	4,9 - 5,2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [41]; 0,25 - 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]; 0,3 - 0,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [43]; 0,006-0,012 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [44]
$\text{HCO}_3^-$	0,1 - 0,4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [42]
DOC	41 - 63,3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [41]
pH-Wert	5,2 - 6,4 [41]; 4,0 - 4,2 [42]; 3,6 - 5,2 [43]

Als Stickstoff-(N)-Quelle ist sowohl Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) als auch Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) in den Hochmooren vorhanden. Nitrat gelangt in die Moore durch das Auswaschen der in der Luft vorhandenen Stickstoffoxide über den Regen, welche aus der Industrie, dem Verkehr und aus den eingesetzten Brennstoffen für die Energieversorgung stammen. [46, 47] Ammonium als prädominante Stickstoffquelle [48] stammt zum Großteil aus den landwirtschaftlichen Aktivitäten, wie dem Düngen mit ammoniumhaltigen Düngerlösungen. [46]

Neben dem Gehalt an Stickstoff ist das Moorwasser reich an Huminstoffen, welche ungefähr 70 – 90 % des gelösten Kohlenstoffs (DOC, *dissolved organic carbon*) ausmachen. [49] Diese organische Substanzen, welche durch Zersetzung von abgestorbener Pflanzen- und Tierbiomasse entstehen, können eine ionische Bindung mit Metallionen eingehen. [50, 51] Ein Beispiel ist die Bildung eines Eisenkomplexes. Eisen kommt in tieferen Moorschichten aufgrund von anoxischen Bedingungen und mit Hilfe von Eisen-reduzierenden Bakterien in gut wasserlöslicher Form als  $\text{Fe}^{2+}$  vor, [49] während in den oberen Schichten, bei Anwesenheit von Sauerstoff, Eisen unabhängig vom pH-Wert als  $\text{Fe}^{3+}$  vorliegt. [52] Die letzte Form ist nicht bioverfügbar, wird jedoch im Moorwasser durch die Huminstoffe komplexiert [41, 49, 51] und begünstigt somit die Aufnahme des Eisens in die Pflanzen (Siehe Kapitel 2.4.4).

Aus dem Wasser beziehen die Pflanzen auch das Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), welches in den obersten Schichten der Moore der bei etwa  $100 - 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  liegt. Dies entspricht einer, deutlich höheren,  $\text{CO}_2$ -Konzentration verglichen mit jener in der Atmosphäre. [49, 53, 54] Die erhöhte Menge an Kohlendioxid entsteht durch die aeroben Zersetzungsprozesse in der obersten Moorschicht, die Oxidierung von Methan und durch die anaeroben Prozesse in den tieferen Moorschichten. [54, 55]. Außer  $\text{CO}_2$  ist auch Hydrogencarbonat  $\text{HCO}_3^-$  im Torf vertreten, welches aus Kalkablagerungen in tieferen Schichten des Torfs sowie biogeochemischen Reduktionsprozessen entsteht. [54] In saurem Milieu der Wasserschicht wird  $\text{HCO}_3^-$  in  $\text{CO}_2$  umgesetzt, was die  $\text{CO}_2$ -Konzentration deutlich erhöht [49, 54]. Über einem pH-Wert von 5 überwiegt das Hydrogencarbonat und die Moore beinhalten kaum  $\text{CO}_2$ . [1]

Die chemischen Eigenschaften des Wassers in den Mooren bestimmen das Vorkommen und die Vielfalt unterschiedlichster Pflanzenarten. Während in Niedermooren anspruchsvollere Pflanzen vorkommen, wie beispielweise das Schilfrohr, gehören zu den meist vertretenen Pflanzen der Hochmoore die Torfmoose (*Sphagnen*) [1, 56]. Die Besiedelung nährstoffreicherer Substrate mit Torfmoosen wird aufgrund der Verdrängung dieser durch schneller wachsende Moose, Algen oder andere Pflanzenarten verhindert. [57]

## 2.2 Torfmoose

Die *Sphagnen* bedecken etwa 1-2 % der Erdoberfläche und sind somit die am meisten vertretende Pflanzen der Planet. [42, 56] Im botanischen Sinne gehören die Torfmoose zu einer Organisationsstufe Moose, welche sich zwischen den Algen und den Farnpflanzen eingliedert. Zusammen mit den Samenpflanzen gehören die Moose aufgrund des Vorhandenseins von Chlorophyll a und b, sowie Carotinoiden in den Zellen und des Aufbau der Zellwand aus Zellulose zu den grünen Landpflanzen [58]. Durch fehlende lignifizierte Leitbündel, verfügbare Stomata und wirksame Kutikula sind die Moose aber den Gefäßpflanzen untergliedert. Außerdem unterscheiden sie sich von den anderen Pflanzen durch ihren dominanten Gametophyten im Generationswechsel (siehe Kapitel 2.2.1), während bei den Gefäßpflanzen der diploide Sporophyt überwiegt. [59] Die Moose werden aufgrund der vielen morphologisch-anatomischen Unterschiede in zwei Abteilungen aufgeteilt, wobei die Torfmoose zur Abteilung Bryophyta, Unterabteilung Laubmoose gehören. Aufgrund vieler Besonderheiten hat die Gattung *Sphagnum* eine separate Entwicklungslinie bei den Laubmoosen. [58] Ungefähr 40 bis 50 Arten sind in Europa beheimatet, wobei es weltweit etwa 200 – 300 bekannte Arten gibt [1, 37]. Die einzelnen Torfmoosarten werden in 9 bis 10 Sektionen unterteilt, welche sich anhand ihrer Morphologie, wie z.B. die Größe ihres Köpfchens, die Form der Ästchen, sowie durch ihren Pigmentinhalt und der damit verbundenen Färbung (siehe Abbildung 2-2) unterscheiden [1, 37, 58, 60].

### Morphologie

Die eigentliche Moospflanze besteht aus einem beblätterten Stämmchen, aus welchem Ästchen spiralförmig zur Hauptachse der Moospflanze über die gesamte Stammlänge hinweg angeordnet sind. An der Stammspitze befindet sich ein Köpfchen (siehe Abbildung 2-2), das sogenannte Capitulum [61] Die Moospflanze besitzt im Vergleich zu anderen

Moosarten keine spezialisierte Wurzelgewebe, sogenannte Rhizoide [62]. Die Wasserabsorption und die Nährstoffaufnahme erfolgen über die gesamte Pflanzenoberfläche (Kapitel 2.4.4) [58, 63].

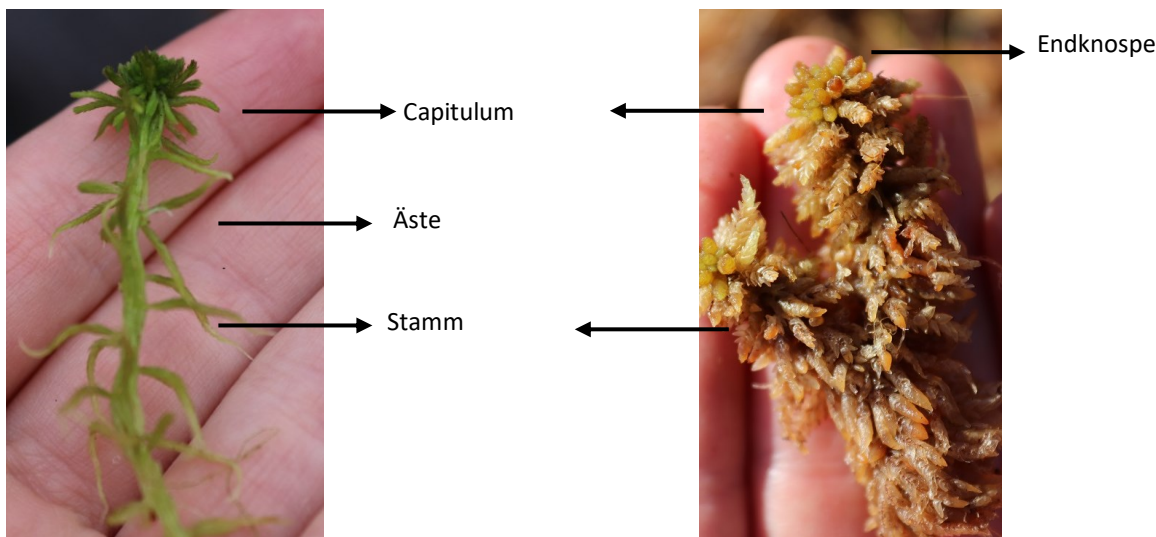


Abbildung 2-2: Zwei verschiedene Torfmoospflanzen. Links: *S. fallax*; rechts: *S. papillosum*. Fotos: Melková

Das Stämmchen (auch Sprossachse, eng. *stem*) trägt die Ästchen und die Stammblätter. Es besteht am Rand aus einer ein- oder mehrzelligen Schicht verdickter Zellen, die sogenannte Rinde oder Hyalodermis [64]. Letztere dient zur Stabilität der Pflanze. Etwa eine Drittel der äußeren Hyalodermiszellen besitzen eine runde oder halbkreisförmige Pore. Diese ermöglicht die Wasseraufnahme in die Zelle. Im Zentrum des Stammes befinden sich längliche Zellen, welche der Wasserleitungsfunktion der Pflanze dienen. Das Stämmchen ist häufig gabelig verzweigt, wodurch eine Torfmoospflanze durchaus zwei bis drei Capitula besitzen kann. [58, 64–66]

Capitulum (auch Krone, bzw. Köpfchen, eng. *capitulum*) ist der obere Teil der Torfmoospflanze und beträgt einen Durchmesser von 0,5 bis 1,5 cm. Es besteht aus äußeren, älteren und inneren, jüngeren, zapfenförmigen Ästchen. In der Mitte des Capitulum befindet sich eine zwiebelartige Spitze des Stämmchens, die sogenannte Endknospe. In diesem Pflanzenteil, welche nur bei manchen Arten deutlich sichtbar ist, sind Scheitelzellen von jungen Blättern und erste Ansätze von Ästchen zu finden. [58, 65, 67] Im Capitulum erfolgt zum Großteil das Pflanzenwachstum. Durch den für das Wachstum erhöhten Energiebedarf ist auch die photosynthetische Aktivität in diesem Bereich am höchsten [68].

Als Ästchen (eng. *branch*) werden unverzweigte mit Ästblättchen beblätterte Seitentriebe des Stämmchens bezeichnet. Es wird zwischen abstehenden und hängenden Ästchen unterschieden. Letztere legen sich dicht um den Stamm. Die abstehenden Ästchen wachsen in unterschiedlichen Richtungen in Bündeln (auch Faszikel oder Astbüschel). [65] Die einzelnen Ästchen wachsen zumeist nur bis zu einer bestimmten Größe an, wobei manche Ästchen aus dem Faszikel ein unbegrenzt Wachstum aufweisen. Die sogenannten Innovationen entspringen der Hauptachse an einem Faszikel und bilden einen Spross, der eine dickere Achse als die der restlichen Ästchen in Bündel besitzt. Die Innovationen tragen selbst Faszikel und enden in einem Capitulum. Die Bildung der Innovationen aus einem Ästchen ist eine vegetative Vermehrungsart der Torfmoospflanze (siehe Kapitel 2.2.1). [61] Die Begründung für das unbegrenzte Wachstum mancher Ästchen ist noch ungeklärt. Baker [61] vermutete, dass es mit der Reife der apikalen Zellen und der Phytohormon-Regulation im Capitulum zusammenhängt.

Die Blätter kommen als Astblätter (eng. *branch leaf*), sowie Stammblätter (eng. *stem leaf*) vor. Sie sind rippenlos und bestehen nur aus einer Zellschicht (Abbildung 2-3 B), um eine maximale Oberfläche für die Aufnahme von CO<sub>2</sub> und Licht zur Verfügung zu stellen [69]. Die beiden Blattarten enthalten zwei Zelltypen (siehe Abbildung 2-3 A). Einerseits sind dies chlorophyllhaltige, grüne, lebendige Zellen, sogenannte Chlorozyten, in welchen die Photosynthese abläuft. Andererseits handelt es sich um tote, chlorophyllfreie, schmale Hyalocyten (auch Hyalinzellen). Sowohl in den oberen als auch in der unteren Zellwand der Hyalocyten befinden sich Poren, welche eine freie Strömung von Wasser wie auch Mikroorganismen in die Zelle erlauben. [58, 65, 70] Dies verleiht der Pflanze eine enorme Wasserspeicherkapazität [71] und erleichtert

eine effiziente Aufnahme des Niederschlagswassers. Eine einzelne Torfmoospflanze kann eine Wassermenge aufnehmen, welche bis zu 16- bzw. 25-Mal ihrer Trockenmasse entspricht [58]. Neben dem Mechanismus der Retention des Wassers, welche die Verdunstung des Wassers aus der Zelle verhindert [72], sind die Hyalocyten für den durch Kapillarkräfte ermöglichten Wassertransport innerhalb der Pflanze, sowie für die Bildung der Stützstruktur des Torfmooses verantwortlich. [71]

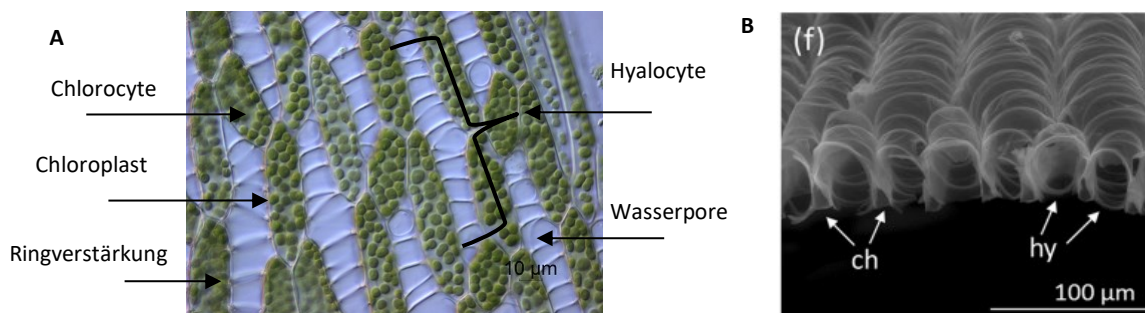


Abbildung 2-3: Mikroskopische Aufnahme des Astblattes des Moooses *S. palustre* A) als Blattaufsicht-Unterseite unter Lichtmikroskop mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) mit einer 40-fachen Vergrößerung (Photo: Melková) und B) als Blattquerschnitt unter Elektromikroskop (Photo von Beike [16]) ch=Chlorocyten, hy=Hyalocyten

Die Form der Hyalocyten, sowie die Anzahl der Poren, deren Größe und Position ist artspezifisch. Eine durchschnittliche Hyalinzelle ist ungefähr 200 µm lang, sowie 30 µm breit und hoch. Der Durchmesser der Poren für die Wasseraufnahme liegt zwischen 4 und 8 µm. [27] Die Blätter des Stämmchens unterscheiden sich von jenen der Ästchen nur aufgrund ihrer geringeren Anordnungsdichte. [71]

Die Knospen (eng. *buds*) sind die einzigen Teile der Pflanze, welche unterhalb des Capitulum als lebendig einzustufen sind. Sie werden unter anderem als axiale Knospen bzw. Wachstumspunkte bezeichnet und sind am Stämmchen der Pflanze lokalisiert. Normalerweise sind die Knospen inaktiv, werden jedoch bei Verlust des Capitulum (z.B. durch einen künstlichen Eingriff, oder durch Trockenheit) aktiv und ermöglichen der Torfmoospflanze bis etwa 10 cm unterhalb des ursprünglichen Capitulum wieder auszuwachsen. [73]

### Wachstum

Am Wachstum der Torfmoose ist, wie bei anderen Pflanzen, das Bildungsgewebe Meristem beteiligt. Es befindet sich an der Spitze des Stammes und besteht aus undifferenzierten Zellen (Scheitelzellen), die durch ihre Teilung zum primären Wachstum der Pflanze beitragen. Bei den Torfmoosen befindet sich das Meristem an der Spitze der Pflanze, daher verfügen sie über ein apikales Meristem, bzw. apikales Wachstum. Aus den geteilten Scheitelzellen entspringen neue Ästchen mit begrenztem Wachstum, welche vorerst auf der gleichen horizontalen Ebene ohne weitere Streckung des Stämmchens verbleiben. Am Randbereich befinden sich die älteren Ästchen, während in der Mitte die jüngeren Ästchen angeordnet sind. Ein halbkugelförmiger Komplex an Ästchen an der Stammspitze stellt das bereits erwähnte Köpfchen bzw. Capitulum dar. Nach dem Erreichen der benötigten Wachstumslänge der Ästchen, findet die Elongation des Stämmchens statt. [67, 73] Während die Torfmoose kontinuierlich an der Spitze wachsen, sterben die basalen Teile der Moospflanze aufgrund des fehlenden Lichts sukzessive ab. Da im Moor in dieser Tiefe ein Sauerstoffmangel herrscht, werden die abgestorbenen Pflanzenteile nur teilweise zersetzt und gehen in Torf über. [37, 58, 66, 73]

Die Stämmchen der Torfmoose wachsen gegen das Gravitationsfeld (negativ geotropisch) und Richtung der Lichtstrahlung (positiv phototropisch). [74] Beim negativen Geotropismus (auch Gravitropismus) richten sich die Pflanzen gegen die Schwerkraft aus. Der Mechanismus des Gravitropismus bei Bryophyten steht in Zusammenhang mit den Amyloplasten, welche als Schwerkraftsensoren (Statoliten) fungieren. Unter Schwerkrafteinfluss verlagern sich die Amyloplasten in der Zelle, was eine Neuordnung des Auxins (ein Phytohormon) in der Zelle bewirkt, worauf die Epidermiszellen mit Wachstumstrecken reagieren. [75] Gleichzeitig wächst die Pflanze lichtorientiert, was als Phototropismus bezeichnet wird. Das im Phototropin (ein lichtsensorisches Pigment) absorbierte Licht induziert über eine Signal-Kette die Produktion des Phytohormons Auxin. Dies bewirkt eine Streckung der Zellen auf beiden Seiten der Zellmembran. Bei einer



einseitigen Beleuchtung verlagert sich das Auxin auf die Licht abgewandete Seite der Zellmembran, wodurch eine Krümmung der Sprossachse bzw. des Stämmchens entsteht. [59, 76, 77]

### 2.2.1 Fortpflanzung

Der Lebenszyklus der Torfmoose zeichnet sich, wie auch bei anderen Moosarten, durch einen Generationswechsel aus. Die erste Generation ist haploid und besteht aus einem Gametophyten, also einer beblätterten Pflanze, die oft als Torfmoos bekannt ist. [62] In der zweiten Generation bildet sich ein diploider, kürzer lebender Sporophyt, welcher an einem Stil des Gametophyten wächst und ebenso Nährstoffe von diesem aufnimmt. Der Sporophyt entsteht aus einer Zygote, dem Ergebnis einer sexuellen Reproduktion und dient der Sporenproduktion. Die Sporen werden in einer Kapsel (Sporogon) produziert und wenn diese reif sind, werden sie mit Überdruck einige Meter weit aus der Kapsel geschleudert. Ausgehend von der haploiden Spore entwickelt sich ein lappiger Vorkeim, das sogenannte Protonema (siehe Abbildung 2-4), aus. Auf dem Protonema bildet sich eine Knospe, aus der im Weiteren der Gametophyt hervorgeht. [58, 67, 78] Die eigentliche Moospflanze ist der Gametophyt selbst. Dieser dominiert beim Generationswechsel der Torfmoose. Im frühen Herbst bilden sich an dem Gametophyten die Gametangien (Geschlechtsorgane), welche sich in die weiblichen Archegonien und die männlichen Antheridien unterteilen lassen und in der Winterzeit reifen. Im Frühling findet die Befruchtung der weiblichen Geschlechtsorgane statt. Aus ihnen bildet sich darauffolgend der Sporophyt mit zugehöriger Sporenkapsel. [62, 78] Mehr als die Hälfte der Torfmoosarten in der nördlichen Hemisphäre sind zweihäusig, also besitzen beide Geschlechtsorgane auf einem Gametophyten [62]. Diese Spezies neigen seltener zur Produktion von Sporenkapseln. Die einhäusigen Torfmoose, welche vermehrt in den Wäldern und an den Rändern der Moore vorkommen, bilden öfter die Sporenkapsel. Ein eindeutiger Zusammenhang des Mechanismus zum Triggern von geschlechtlicher bzw. vegetativer Vermehrung wurde noch nicht abschließend geklärt. [78]

#### Vegetative Vermehrung

Die offensichtlichste Art der vegetativen Vermehrung ist die Verzweigung des Hauptstammes, oft genannt als dichotomische (gegabelte) Teilung (siehe Abbildung 2-5). Dabei verzweigt sich die Pflanze apikal in zwei oder drei annähernd gleiche Teile. Eine dreifache Verzweigung wurde für *S. palustre* in einem Naturexperiment festgestellt. [79] Manche Autoren bevorzugen den Begriff, pseudodichotomisch, da die Verzweigung nicht anhand einer Zellteilung im oberen Pflanzenteil entsteht, sondern ein Seitenästchen beginnt spontan die Merkmale von einem Stamm anzunehmen. [78] Diese Vermehrungsart ist zum Großteil für die räumliche Verbeitung an einem Standort verantwortlich.

Als zweite Vermehrungsstrategie ist die Bildung von Innovationen aus der äußeren Rinde der Stämmchen oder Ästchen zu nennen. Die entstehende neue Knospe ist üblicherweise kleiner als die Mutterpflanze. Der Hauptunterschied zwischen den zwei erwähnten Vermehrungsstrategien ist, dass die Dichotomen eher aus dem oberen vitalen Pflanzenteil entstehen wobei die Knospen eher aus dem älteren Stamm austreiben. Letztgenannte ist eine wichtige Strategie nach schweren Dürreperioden, hier bilden sich aus und auf den scheinbar toten Fragmenten neue Knospen. [79]

Die dritte Art der vegetativen Reproduktion ist das Wachstum aus Pflanzenfragmenten, wie getrennte Ästchen oder zerkleinerte Stämmchen [79]. Diese Vermehrung findet oft bei der *in-vitro* Kultivierung Anwendung. [17] Hierbei wandelt sich beispielweise das separate

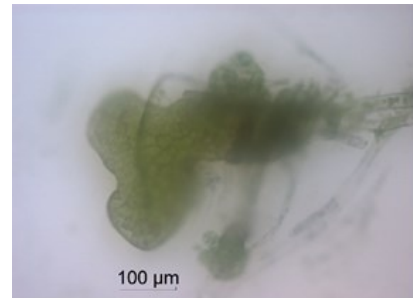


Abbildung 2-4: Mikroskopische Aufnahme des Torfmooses *S. palustre* Klon 12 a unter Lichtmikroskop mit 10-facher Vergrößerung. Kultivierungsbedingungen: Knop-Medium mit 0,3 % Saccharose,  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Foto: Melková



Abbildung 2-5: *S. fallax* aus Kieshofer Moor. Zu sehen ist eine Verzweigung der Torfmoospflanze. Foto: Melková

Ästchen in ein Stämmchen um. Vor allem die jungen Ästchen des Capitulum sind in der Lage schneller zu regenerieren. Auch die Fragmenten aus dem Stämmchen weisen eine Regenerationsfähigkeit auf, wobei die grünen Teile doppelt so schnell wie die braunen Pflanzenteile regenerieren [78, 79]. Aus diesen Pflanzenfragmenten bilden sich Ästchen mit unlimitiertem Wachstum, die sich daraufhin beblätterte und an ihrer Spitze ein Capitulum bilden. Das junge Pflänzchen nimmt nach und nach charakteristische Merkmale einer reifen Moospflanze an, wie die Bildung von Ästchen, sowie die Differenzierung der Blättchen zu Stamm- und Astblätter. [79] Aus einem Fragment können mehreren Pflanzen gleichzeitig entstehen. Dies begünstigt das Wachstum der Moose und führt unter anderem zur Bildung eines kompakten Rasens in den Mooren. Aus den Blattzellen konnte bislang keine erfolgreiche Vermehrung beobachtet werden. [78]

Die vierte Möglichkeit der vegetativen Vermehrung der Torfmoospflanze ist die Bildung eines Protonema. Das Protonema kann außer aus einer Spore auch aus verschiedenen Pflanzenteilen, wie z.B. aus Fragmenten des Stämmchens oder Ästchens entstehen. [73, 78] Die Bildung findet jedoch bei höheren Phosphatkonzentration ( $> 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) statt, welche jedoch ungewöhnlich für Moorgewässer (Tabelle 2-2) sind. [45, 78]

### 2.2.2 Torfmoosarten

Neben ihrer morphologischen Diversität unterscheiden sich die einzelnen Torfmoosarten anhand ihrer bevorzugten Standorte und in ihren Wachstumsrates. [31, 37] Die Verbreitung der Torfmoose an den verschiedenen Standorten steht in Zusammenhang mit den dort vorherrschenden Umweltbedingungen, wie dem Wasserstand und der Nährstoffverfügbarkeit sowie dem pH-Wert des Wassers. [62] Die Torfmoose sind überwiegend in Hochmooren zu finden, allerdings kommen sie auch in anderen feuchten und nährstoffarmen Stellen vor. [40] In Hochmooren sind Torfmoose im Hinblick auf den lokal vorherrschenden Bedingunggenn zwischen Bultarten und Schlenkenarten zu unterteilen. [80] Die Schlenkenarten wachsen in wassergefüllten, seichten Dellen. Oft werden sie auch hydrophile, aquatische oder submersen Torfmoosarten genannt. [66, 81] Zwischen den Schlenken und Bulten wachsen Moosteppiche, die aus mäßig hydrophilen Arten, wie z.B. *S. rubellum*, bestehen. Die Bultarten sind auf einem, über dem Wasserspiegel liegenden, kissenförmigen Buckel zu finden. [1] An diesen mäßig feuchten oder sogar trockenen Standorten wachsen Torfmoose, wie z.B. *S. fimbriatum* oder *S. palustre*. [71]

Die Astblättchen der submers wachsenden Moose sind von ihrer Form her länger, dünner. Die photosynthetisch aktiven Zellen sind näher an der Blattoberfläche platziert und weniger mit Hyalinzellen bedeckt [69, 71, 82]. Zudem kommen an dem Stämmchen hängende Ästchen weniger häufig vor [27, 81]. Es liegt die Vermutung nahe, dass die submersen Torfmoosarten höhere relative Wachstumsraten im Vergleich mit den emersen Torfmoosen erreichen, weil die dünnere Zellwanddicke einen niedrigen Transportwiderstand für die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme bewirkt. [82] Die emersen Torfmoose besitzen dickeres Stämmchen und dickere Hyalocyten mit einer jeweils spezifischen Anzahl an Poren in den Blättern und Stämmchen [81]. Dies ist ausschlaggebend für die Wasserspeicherkapazität [6] und bestimmt somit den möglichen Wassergehalt der Moospflanze [83], welcher sich auf die jeweilige Photosyntheserate auswirkt. [84]

Den pH-Wert betreffend sind die Torfmoose in einem großem pH-Spektrum, von einem schwach sauren bis in den basischen Bereich, anzutreffen. Ihr Auftreten ist jedoch im pH-Wertbereich zwischen 3 und 4 am häufigsten.[37, 62, 85] Außerdem kommen die Torfmoose in unterschiedlichen Bereichen der Nährstoffverfügbarkeit vor. Einige Moose beschränken sich auf oligotrophe Moore, andere wachsen fast ausschließlich in Habitaten mit hohen Nährstoffkonzentrationen im Wasser. [31, 37, 40] Im Folgenden erfolgt die Vorstellung von drei Moosarten, die als potentielle Saatgut-Kandidaten für das *Sphagnum farming* [12, 16] im Rahmen des MOOSzucht-Projekts identifiziert wurden.

***S. palustre*** gehört zur Sektion *Sphagnum*. Das Torfmoos (siehe Abbildung 2-6, links) zeichnet sich durch eine grüne und gelbliche Färbung aus [37, 60]. Durch den ersten Frost werden in der Pflanze Polymere gebildet, die das Capitulum rotbraun verfärben.[37] Die Äste sind meist lang gezogen. Das Moos wächst auf Polstern oder Bulten und wird auch als *lower hummock* Spezies eingestuft [37, 80]. Die bevorzugten Standorte sind mesotrophische bis reichere Moorlebensräume, wobei die Moospflanze kaum in kalkhaltiger, sowie saurer Umgebung zu finden ist [60]. Das Moos toleriert einen pH-Wert des Moorwasser bis zu 7 [80] und kann daher kleinflächig auch in basenreichen Niedermooren, feuchte Waldbrüche, oft entlang von Wasserfällen, Bächen oder auch auf Steinen oder Mineralböden wachsen. [37, 60, 65] Die



Produktivität variiert mit den Umweltbedingungen. Die durchschnittliche jährliche Produktivität von *S. palustre* in warmen Niedermooren in Georgien von liegt bei  $575 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{yr}^{-1}$ . [86]

*S. rubellum*, aus der Sektion Acutifolia, wird als Bultart bezeichnet, da es überwiegend in Rasenform auf einem Bult vorkommt (siehe Abbildung 2-6, Mitte). Seine bevorzugten Standorte sind eher trocken, sauer und nährstoffarm, weswegen sie eher in den oligotrophen Mooren wachsen. Unter anderem ist *S. rubellum* auch auf feuchten Heiden und in sauren Wäldern zu finden. [37, 60] Die durchschnittliche Produktivität des *S. rubellum* beträgt beispielweise in Rhön in Deutschland  $960 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{yr}^{-1}$ . [87]

*S. fimbriatum* ist ein grünes bis blassgelb-grünes Torfmoos aus der Sektion Acutifolia (siehe Abbildung 2-6, rechts). Es ist eine kleine, aber robuste Art mit schmalen Ästchen (1-2 mm) und deutlich emporgehobener Endknospe. *S. fimbriatum* wächst in lockeren Rasen und eher als weiches Bult. Die Standorte sind feuchte, mesotrophe Moorränder, meist mit etwa Abschattung. Das Torfmoos ist auch an Weiden- und Birkenbäumen, an den grasbewachsenen Ufern von Bächen und wie *S. palustre* entlang von Seeufern zu finden. [37, 60, 65] Diese Torfmoosart ist, als eine der wenigen Moospezies, auch in Gebieten mit kalkhaltigem Wasser zu finden. [31, 40, 73]



Abbildung 2-6: Drei verschiedene Torfmoosarten, von links: *S. palustre* abfotografiert in Schwarzwald, Kandel mit einer typischen braun-roter Färbung in der Herbstzeit. Foto: Hölzer [37], *S. rubellum* und *S. fimbriatum* in ihrem natürlichen Habitat, Foto: OESSM [13]

### 2.2.3 Nutzung

Die Torfmoospflanze, sowie der daraus entstehende Torf waren und sind heutzutage immer noch von großer Bedeutung. [85] In der Vergangenheit fanden die getrockneten Torfmoose aufgrund ihrer hohen Wasserspeicherkapazität Verwendung als Isolier- und Verpackungsmaterial und im zweiten Weltkrieg sogar als Wundkompressen. [37, 58] Anhand der durch Untersuchungen an Gletscherleichen aus Nordamerika und Mitteleuropa (Ötzi) gewonnenen Erkenntnisse, besteht die Vermutung, dass die Torfmoose bereits in der Bronzezeit und der Kupferzeit als Wundverband Anwendung fanden. [88] In der heutigen Zeit fungieren die lebenden Torfmoose als Bioindikator für die Schwermetallbelastung in der Atmosphäre. Die dafür entwickelte *Moos-Bag-Technique*-Methode basiert auf der hohen Kationenaustauschkapazität der Moospflanze. [21, 89, 90] Das Torfmoosmaterial wird aus dem Naturraum mit einer naturschutzfachlichen Genehmigung gesammelt oder in einer *in-vitro* Kultivierung (siehe Kapitel 2.3) gezüchtet [21]. Andere Einsatzgebiete der *Sphagnum*-Moose sind der Gartenbau, Moosball-Pflanzen, Samenstarter oder die Nutzung als Pflanzenmedium für Orchideen [91]. Darüber hinaus können die Moose auch herkömmliche Blumenerde ergänzen, um die Feuchtigkeit im Boden zu halten. Dafür benötigtes Material stammt entweder aus natürlichen Mooren, wie z. B. Chile, Neuseeland, Australien und China [91], oder aus einem kontrollierten Anbau in Mitteleuropa [92]. Neben den Gartenbauzwecken finden die Torfmoose ihre Anwendung in der Renaturierung der abgetorften Moore. Sie werden als Aussaat in abgetorften Mooren verwendet, um das Ökosystem wiederherzustellen, Erosion zu vermeiden und das atmosphärische Kohlenstoffdioxid in die Biomasse einzubinden. Die hierfür gepflanzten und angewachsenen Torfmoose verbleiben vor Ort und werden nicht wieder geerntet. [6] Werden die Torfmoose für die Biomasseproduktion angebaut, fällt dies unter den Begriff des *Sphagnum farmings* (siehe Kapitel 2.3.3). [6, 12, 16, 93, 94] Die kultivierten Torfmoose werden als landwirtschaftliche

Nutzpflanze gesehen, welche die Treibhausgasemission von den trockengelegten landwirtschaftlichen Flächen reduzieren [28, 95, 96] und das torfhaltige Kultursubstrat im Erwerbsgartenbau ersetzen kann. [6, 14] Die bekannteste Verwendung als Substrat ist die Kultivierung von Orchideen [97], mehrere *Sphagnum* Spezies wurden auch als Substratrohstoff in einem Gemisch mit anderen Kultursubstraten für Kräuter oder Setzlinge von Gemüsearten positiv erprobt, [6] und können mit ihrer Eigenschaften zum Teil auch Perlit bzw. Vermiculit ersetzen [14].

## 2.3 Sphagnum-Kultivierungsverfahren

Wie im vorherigen Kapitel erläutert, stellt die Torfmoosbiomasse einen wichtigen Rohstoff für verschiedenste Anwendungen dar. Da die Torfmoose in der Natur nur begrenzt verfügbar sind, wird an neuen Methoden zur Vermehrung der Moospflanzen geforscht. Ein schematischer Überblick über die möglichen Vorgehensweisen ist in Abbildung 2-7 ersichtlich. Auf die unterschiedlichen Methoden wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

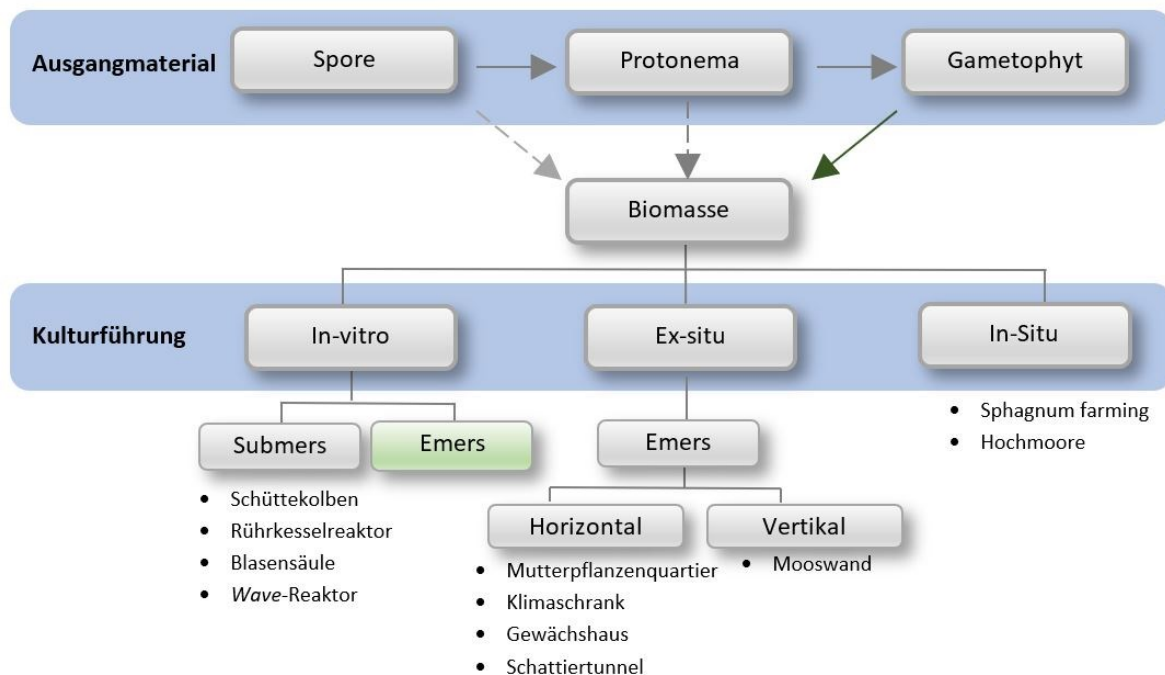


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung der Methoden zur Vermehrung von Torfmoosen. Als Ausgangsmaterial zur Produktion der Anfangsbiomasse können Sporen, aus Spore entwickeltes Protonema sowie Gametophyten verwendet werden. Die Torfmoose können in einer künstlichen Umgebung (*in-vitro*), außerhalb der natürlichen Umgebung (*ex-situ*) oder in der natürlichen Umgebung der Pflanze (*in-situ*) gezüchtet werden. Als Kultivierungsverfahren sind sowohl Oberflächenverfahren (emers) oder Submersverfahren bekannt. Bei der emersen Kultivierungen befinden sich die Torfmoose auf einem festen oder flüssigen Nährboden, während bei der Submerskultivierung die Moospflanzen in einer Nährlösung untertaucht sind [106, 109]. Das grüne Rechteck stellt das fehlende Kultivierungssysteme für die Moosproduktion dar.

### Ausgangsmaterial

Um die Torfmoose in großen Mengen produzieren zu können, muss zunächst genügend Ausgangsmaterial bereitgestellt werden. Für letzteres können Sporen, Protonema, sowie Gametophyten zum Einsatz kommen.

Sporen entstehen bei Torfmoosen in Zusammenhang mit ihrer geschlechtlichen Vermehrung (siehe Kapitel 2.2.1). Für den Prozess der Sporenbildung spielen die Hormone, die Tag/Nacht-Zyklen und sehr wahrscheinlich das Verhältnis von rotem Licht und fernem Infrarotlicht eine übergeordnete Rolle [83]. Dennoch sind die daran beteiligten Mechanismen bis noch heute nicht vollständig geklärt. [6, 62, 98, 99] Die Verwendungen von Sporen als Ausgangsmaterial ist nur eingeschränkt möglich, da die betrachteten Torfmoosarten selten sporulieren, somit ihre Verfügbarkeit zeitlich begrenzt ist und die Sporen nur manuell gesammelt werden können. [100] Die genetische Ausstattung der einzelnen Moospflanzen ist nicht kontrollierbar, was zu einem inhomogenen Material führen kann. Dies bestätigte Heck et al. [23], welche in ihren

Versuchen mit sechs Sporen aus derselben Kapsel Individuen mit vollkommen unterschiedlichen Wachstumsraten beobachtet. Des Weiteren sind Sporen als Anzuchtmaterial für die groß-skalige Biomasseproduktion von Torfmoosen aufgrund der nur langsamen Entwicklung eines vollständigen Gametophyten wenig geeignet. Eine vollständige Auskeimung der Sporen dauert in etwa ein bis zwei Wochen. Die anschließende Entwicklung eines Gametophyten aus dem Protonema-Stadium heraus beträgt auf Knop-Agar etwa 50 bis 55 Tage [79].

Seit einigen Jahren wird zur vegetativen Vermehrung des Laubmooses *Physcomitrella patens* Protonema-Gewebe eingesetzt [90, 101–103]. Dieses Verfahren wird derzeit vor allem für die Produktion von rekombinanten Proteinen in klinischen Studien (eleva GmbH, Deutschland) verwendet. [25] Die Ausdifferenzierung des Protonemas zu einem Gametophyten, sowie die Produktion von neuen Protonemata wird durch das wiederholte Zerkleinern mittels eines Homogenisators, z.B. eines Ultra-Turrax verhindert [101]. Die Hauptvorteile der protonemalen Mooskultur sind höhere Wachstumsraten, homogenes Material und einfachere Analytik sowie Handhabung im Downstream-Prozess [90]. Bei *Sphagnen* wurden Protonemata zum ersten Mal im Jahr 1948 durch Sporenenkeimung *in-vitro* gezüchtet [22, 104], wobei dieses Stadium nur auf einem festen Medium und für kurze Zeit aufrechterhalten werden konnte. Eine Protonema-Induktion von mehreren *Sphagnen*-Arten in einem flüssigen Medium gelang in der Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Reski am Institut für Pflanzenbiotechnologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg [105] durch die Behandlung der Moose mit  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Ammoniumtartrat und konnte für eins bis zwei Wochen aufrechterhalten werden. Eine Protonema-Dauerkultur konnte in Experimenten von Zhao et al. [100] in Knop-Medium bei einem optimalen pH-Wert von 5,8 durch einen wöchentlichen Medienwechsel und Homogenisierungsschritt mit einer Dauer von 35 Sekunden in etwa ein Jahr aufrechterhalten werden. Der Homogenisierungsschritt dauerte um 1/3 bis 1/5 kürzer, als in den Experimenten von Beike et al. [17] mit *S. palustre*. Es zeigte sich, dass die Zerkleinerung nach Protokoll für die Gametophyten von *Physcomitrella patens* [103] letale Auswirkung hatte. Die Verkürzung des Homogenisierungsschrittes begünstigte die Entwicklung der Protonemata aus den zerkleinerten Torfmoosen, allerdings war das Regenerationsverhalten der Moose weniger ausgeprägt verglichen mit *Physcomitrella patens* [100]. Darüber hinaus wirken sich hohe Zelldichten negativ auf die Langzeitstabilität des Protonema-Stadiums aus. Die hohe Zelldichte begünstigt, aufgrund der im Kulturmedium vermehrt ausgeschiedenen Phytohormonen, wie Auxine und Cytokine, die Entwicklung zum Gametophyten. [106] Für die erfolgreiche Umsetzung der groß-skaligen Produktion von Torfmoosen ausgehend von einer Vorkultur im Protonema-Stadium, besteht derzeit noch intensiver Forschungsbedarf.

Eine vielversprechende Möglichkeit der Torfmooskultivierung basiert auf der vegetativen Vermehrung von Gametophyten. Die Torfmoose können sich aus Pflanzenfragmenten des Capitulum, der Ästchen oder Stämmchen regenerieren [79, 107] und unter bestimmter *in-vitro* Bedingungen auch aus Blattmaterial [100], was jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von Cronberg et al. steht. [78] Die benötigten Moospflanzen können einem Naturhabitat stammen und müssen dekontaminiert werden, was in der Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Reski am Institut für Pflanzenbiotechnologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg [108] bereits gelang, oder axenisch (ohne andere Kokulturen) aus einer Spore gezüchtet werden [20]. Die Firma Micropropagation Services (EM) Ltd. entwickelte aus den Gametophyten bereits ein kommerziell erhältliches Ausgangsmaterial, welches zu Renaturierungszwecken in Form von in festem Gel eingekapselten Torfmoosfragmenten (Beadamoos®) oder flüssiges Gel (Beadagel®), bestehend aus 5 bis 25 mm langen intakten Moospflanzen eingesetzt werden kann (Abbildung 2-8). Die Menge an solcher Ansaat ist zum derzeitigen Stand

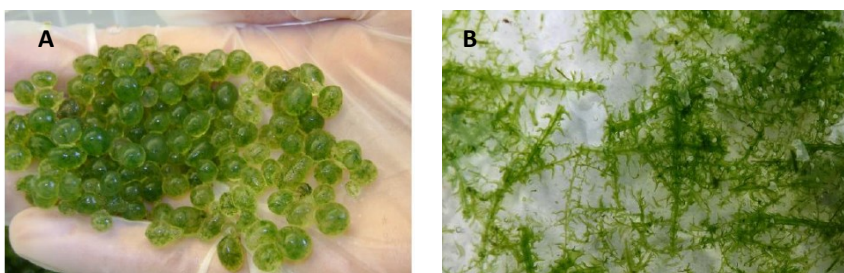


Abbildung 2-8: Micropropagierte Torfmoose als A) BeadaMoos®, B) BeadaGel™ Fotoquelle: [4]. BeadaGel™ besteht aus einer Suspension von 5 -25 mm intakten kleinen Pflanzen in einem hydrokolloiden gelatinartigen Medium, während BeadaMoos beinhaltet ungefähr 10 Torfmoosfragmente mit einer Länge von 5 mm, eingekapselt/eingebettet in einer festen Variante des vorher benutzten Gels.

noch nicht ausreichend [6] und das Anwachsverhalten auf Versuchsflächen des *Sphagnum farming*s nicht zufriedenstellend. (persönliche Mitteilung, Gaudig G.)

Aus diesem Grund liegt der Forschungsfokus darauf, weitere mögliche Verfahren zur Produktion von Torfmoos-Biomasse zu erörtern. Die Verfahren lassen sich grundsätzlich in drei Gruppen zusammenfassen: *in-vitro* (in künstlicher Umgebung), *ex-situ* (außerhalb der natürlichen Umgebung der Pflanze) und *in-situ* (in der natürlichen Umgebung der Pflanze).

### 2.3.1 *In-vitro* Kultivierungsverfahren

Eine schnelle Vermehrung von Moosen ist im Zuge einer *in-vitro* Kultivierung nur möglich durch die Verwendung einer Reinkultur (sog. axenische Kultur). Eine axenische Torfmooskultivierung wurde erstmal 1969 anhand einer sterilen Sporenkeimung ermöglicht. [20, 61, 109] Die in der Natur gesammelten Sporen keimen hierzu unter sterilen und kontrollierten Bedingungen auf einer Agarplatte aus und entwickeln sich im Weiteren zu Gametophyten. [17, 20, 22, 23, 57, 61, 100] In der Moos-Sammlung der Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Reski am Institut für Pflanzenbiotechnologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg befinden sich derzeit 19 *Sphagnum*-Arten, welche aus Sporen angezüchtet wurden. Die Sporen für diese Kultivierung hat die Moos-Arbeitsgruppe der Universität Greifswald zusammengetragen. [23] Die Gametophyten wachsen axenisch auf einer Agarplatte und können zur Forschungszwecken als Inokulum für auf Agarplatten durchgeführte Experimente, zum Beispiel zur Untersuchung des Einflusses von Aminosäuren [24] und Zucker auf das Wachstum der Torfmoose [18], zur Bestimmung des besten Klons aus einer Kapsel [23] oder für OMICS-basierte Assays und die RNA-Sequenzierung [62] verwendet werden. Für die Bereitstellung eines größeren Inokulum-Volumens, erweist sich die Kultivierung auf einer Agarplatte als nicht ausreichend [20]. Für diesen Zweck eignet sich die Kultivierung in Erlenmeyerkolben besser. Hierbei erfolgt eine Durchmischung der Mooskultur durch das Schwenken der Kolben in einem Schüttler, wodurch eine gleichmäßige Nährstoffverteilung bewirkt wird. [110] Aufgrund der Bewegung der Erlenmeyerkolben im Gerät, werden diese auch Schüttelkolben bezeichnet. In den Schüttelkolben wachsen die Moospflanzen vollständig in einer Nährlösung und sind auch mit dieser bedeckt. Daher wird diese Kultivierungsart auch als Submerskultur oder submerse Kultivierung bezeichnet. [110, 111] Als Kulturmedium können verschiedene Lösungen verwendet werden. Beispielsweise sind diese: ein Burkholder Medium [57], ein Basal-Medium [109, 112], eine Knospchen Nährlösung [17, 22] oder eine angepasste Long Asthon Lösung [61]. Heutzutage werden die Torfmoose in einem empirisch ermittelten Sphagnum-Medium [17, 19, 23] kultiviert. Dabei handelt es sich um ein organisches Kulturmedium, welches sich aus einer zur empirisch getesteten Knospchen Pflanzen-Nährlösung [76, 113] leicht abgeänderten Rezeptur zusammensetzt. Dies ist um folgende Komponente erweitert: Eisensulfat, welches die Induktion der Knospung sowie für *in-vitro* Kultivierung in Photobioreaktor von *Physcomitrella patens* [103, 114] begünstigt; Mikroelementlösung nach Murashige [115], welche sich positiv auf die Regenerierung der autotrophen Mutanten von *Physcomitrella patens* auswirkte [116], und aus Ammoniumnitrat ohne weitere Begründung [17]. Als ein wichtiger Bestandteil des Kulturmediums erwies sich Saccharose, welche sich am meisten wachstumsfördernd für *Sphagnum* zeigte. [17, 22, 109] Die Notwendigkeit des organischen Mediums basiert auf der Tatsache, dass die Experimente in einem anorganischen Medium ein nicht zufriedenstellendes Wachstum der Torfmoose zeigten. [17] Da eine Verwendung von organischem Medium für eine großskalige Produktion von Torfmoosen nicht nachhaltig angesehen wird und zudem kostenintensiv ist, steht die Torfmooskultivierung in anorganischen Medien im Hauptfokus der vorliegenden Arbeit.

Eine einfache Maßstabvergrößerung von Schüttelkolben für die großskalige Biomasseproduktion würde nicht zu den gewünschten Ergebnissen führen. Aus diesem Grund werden die Schüttelkolben nur zur Anzucht des Inokulums für die Bioreaktorsystemen [17, 20] eingesetzt. Ein Bioreaktor ist ein Apparat, welcher in einem abgegrenzten Raum die optimalen Wachstumsbedingungen für den zu kultivierenden Organismus aufrecht erhält [110, 117]. Dies wird durch die Regulierung des pH-Werts, der Temperatur, sowie der Zufuhr der reinen Luft oder der mit CO<sub>2</sub>-angereicherten Luft, gewährleistet. Als geschlossene Systeme erlauben Bioreaktoren eine axenische Kultivierung. Die Kultivierungssystemen von Organismen, welche Licht als Energiequelle (phototroph) nutzen, werden als Photobioreaktoren genannt. [118] Der Einsatz eines Photobioreaktors stellt bis zum jetzigen Zeitpunkt das einzige Verfahren für die Kultivierung des Inokulums für eine schnelle künstliche Vermehrung von Torfmoosen dar. [17] Im Wesentlichen sind zwei submerse Photobioreaktoren zur Torfmooskultivierung bekannt. Einerseits sind dies Rührkesselreaktoren [17] und andererseits Blasensäulenreaktoren



[20]. Für die Kultivierung einer anderen Laubmoosart, der *Physcomitrella patens*, finden zudem seit mehreren Jahren sogenannte Wave-Photobioreaktor [25] und einen Rohrreaktoren [119–121] Anwendung.

Der erste Photobioreaktor mit axenischer Torfmooskultur war ein Glasreaktor (2 L) betrieben als eine Blasensäule, in welchem *S. magellanicum* (Tabelle 2-3) submers unter photoautotrophen Bedingungen im Perfusion-Verfahren kultiviert wurde. [20] Dabei blieben die Torfmoose im Reaktor, während das Medium kontinuierlich die Biomasse durchströmte. Die Zuflussrate des Kulturmediums wurde so geregelt, dass der pH-Wert über die gesamte Kultivierungsdauer hinweg konstant blieb.

Tabelle 2-3: Überblick der Prozessparameter für die axenische *in-vitro* Kultivierung von Torfmoosen , in einem 5 L Rührkesselreaktor [17, 19, 23] und einer 2 L Blasensäule [20]. Die jeweilige Medienzusammensetzung ist den angegebenen Quellen zu entnehmen.

Reaktortyp	5 L Rührkesselreaktor	2 L Blasensäule
Trophie	Photoheterotroph	Photoautotroph
Kultivierungsverfahren	Batch	Perfusion
Lichtbedingungen	210 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 16/8 Hell/Dunkel-Zyklus	105 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 14/10 Hell/Dunkel-Zyklus
Begasung	2 % CO <sub>2</sub> 0,3 vvm	0,5 % CO <sub>2</sub> 4,3 vvm
Temperatur	20 °C	20 °C/ 15°C (Hell/Dunkel)
pH	Anfangswert = 4, ohne pH-Regelung	3,85 konstant gehalten
Medium	Sphagnum Medium	Rudolphsche Lösung
Produktivität (g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	<i>S. palustre</i> : 68,6 g in 24 d (0,54 g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	<i>S. fallax</i> : 4 g in 26 d (0,08 g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )

Nach einer Kultivierungsdauer von 26 Tagen in der Blasensäule, bei den in Tabelle 2-3 angegebenen Reaktorbetriebsbedingungen, entstand eine Biomassemenge von etwa 4 g Trockengewicht ( $P_{v,x}=0,08\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ). Im Anschluss an diese Phase wurde alle 4 Tage jeweils ein Moostrockengewicht von 1,3 g geerntet. Dies entspricht einer Biomassezunahme von 0,33 g·d<sup>-1</sup>. Da die Moose teilweise im Reaktor weiterhin verblieben, handelte es sich in zweitem Teil des Kultivierungsprozesses um einen sogenannten *repeated* oder wiederholten Betrieb. Die Wuchsform der Torfmoose änderte sich im Vergleich zu jener in ihrem Naturhabitat. Das übliche Längenwachstum mit einem Capitulum am Ende des Stämmchens ging in ein sphärisches Wachstum über, bei welchem die Torfmoose kleine Agglomerate bzw. Kugel mit mehreren Capitula bildeten. [20]

Diese veränderte Wuchsform wurde auch in dem zweiten Photobioreaktor, dem Rührkesselreaktor (siehe Abbildung 2-9,

links) beobachtet. Dieser stellt das derzeit am häufigsten eingesetzten Verfahren zur künstlichen Vermehrung von Torfmoosen dar. [17, 19, 23] Der 5 L Rührkesselreaktor aus Glas findet Anwendung bei der Kultivierung von Protonema des Laubmooses *Physcomitrella patens* [103, 122] und wurde auch erfolgreich für die Produktion von von *S. palustre* [17], sowie für *S. squarrosum* und *S. fuscum* [19] etabliert. Unter photoheterotrophen Bedingungen mit 20 g·L<sup>-1</sup> Saccharose in einem Batchbetrieb (siehe Tabelle 2-3) erreichte *S. palustre* eine „Multiplikationsrate“ von bis zu 40x (64 g Trockengewicht), *S. fuscum* 50x (68 g Trockengewicht) und *S. squarrosum* 25x (42 g Trockengewicht) innerhalb von 24 Tagen [19]. Daraus ergibt sich eine volumetrische Produktivität von 0,54 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> für *S. palustre*, 0,57 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> für *S. fuscum* und 0,33 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> für *S. squarrosum*. Die hohe Produktivität stellt den größten Vorteil dieser Kultivierungsstrategie dar. Zudem liefert der Rührkesselreaktor eine homogene Torfmoosbiomasse mit vielen Capitula. Einer der größten Nachteile dieses Reaktors im Hinblick auf die groß-skalige Produktion ist, wie auch bei dem Blasensäulenreaktor, die eingeschränkte

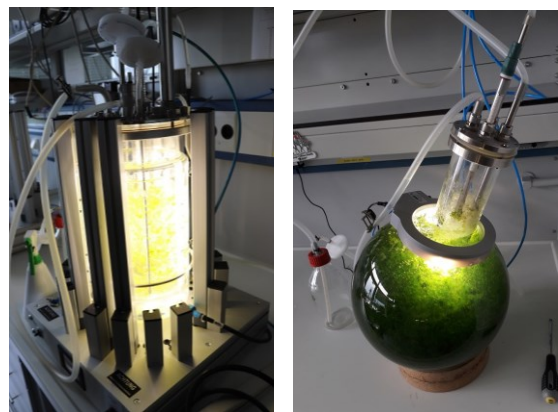


Abbildung 2-9: Axenischen Bioreaktoren für die Produktion von Torfmoos. Links: 5 L Rührkesselreaktor, rechts: 20 L Rundkolbenreaktor. Foto: Melková.

Hochskalierbarkeit. Neben dem kostenintensiven Material steigt mit größerem Reaktorvolumen der Reaktordurchmesser, welcher sich auf den Lichteintrag in der Reaktormitte negativ auswirkt [123]. Ein weiterer Nachteil ist besonders der hohe Energieeintrag aufgrund des Rührens zur Verhinderung der Sedimentation der Moose. Aus diesen Gründen eignet sich der Rührkessel vor allem für die Produktion von Erstmengen, für die Anzucht von Animpfkulturen für die großskaligen Produktionsreaktoren und für Optimierungsläufe der Kultivierungsbedingungen von unterschiedlichen Torfmoos-Stämmen. Dies betrifft auch den zweiten Photobioreaktor, ein 20 L-Rundkolbenreaktor (siehe Abbildung 2-9), welcher in der Reski-Gruppe (Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg) entwickelt wurde. Dieser ähnelt sich anhand seines hydrodynamischen Verhaltens sehr dem Blasensäulenreaktor. [17, 108] Dieser Rundkolben-Bioreaktor kann einfach betrieben werden, liefert ähnlich wie der Rührkesselreaktor, hohe Biomassemengen mit sphärischer Wuchsform. Allerdings ist auch dieser aufgrund seiner Bauform und der verwendeten Materialien schwer zu skalieren. Des Weiteren ist eine Lichtlimitierung bei einer photoautotrophen Kultivierung wegen der geringen Beleuchtungsfläche des oberhalb der Rundung angebrachten LED-Rings nicht auszuschließen.

Ein weiterer Submersreaktor ist der sogenannte *Wave*-Bioreaktor, welcher als Einweg-Bioreaktor (*single use bioreactor*) in den letzten Jahren in der modernen Biotechnologie an Bedeutung gewann [110, 124]. Neben der Anwendung für Zellkulturen und Mikroorganismen finden heutzutage die *Bag*-Systeme auch eine industrielle Anwendung in der Moosbiotechnologie. Derzeit wird *Physcomitrella patens* in ihrem Protonema-Stadium in einem 200 L Einweg-Bioreaktor der Firma Sartorius mit einem Arbeitsvolumen von 100 L zur Produktion von Pharmamedikamenten der Firma eleva GmbH in Deutschland kultiviert. [25, 90, 102] Der Kunststoffbeutel befindet sich hierbei auf einer schwingenden Wanne oder Plattform, welche sich in ein- oder zweidimensionaler Richtung bewegt. Die Bewegung induziert Wellen in dem sich im Beutel befindlichen Medium, was den Mischvorgang des Reaktorinhalts bewirkt und somit die Versorgung der Organismen mit den Substraten erleichtert. [124]. Ähnlich wie die üblicheren Bioreaktoren bieten sie die Möglichkeit der Prozesskontrolle und -steuerung, da sie mit dem pH-Wert- und pO<sub>2</sub>-Sensoren ausgerüstet sind. Aufgrund hoher Sterilitätsansprüche werden sie nach der Herstellung gamma-sterilisiert und als Einweg-Bioreaktoren verkauft. [110] Da dieses System die Möglichkeit zur einfachen Biomasseproduktion bietet, kommt der *Wave*-Photobioreaktor für Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Torfmoosen im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz.

Neben den Submersreaktoren können die Torfmoose auch emers (auf einer Oberfläche, luftexponiert) gezüchtet werden. Bei einem Oberflächenverfahren werden die Organismen, welche auf einer Oberfläche wachsen, mit dem Medium umströmt und das notwendige Gas (CO<sub>2</sub>) für photoautotrophe Kultivierungen beziehen die Organismen aus der reinen oder mit CO<sub>2</sub>-angereicherten Luft [117]. Emers und nicht axenisch werden die Torfmoose am häufigsten in Kulturgefäßen wie Plastikdosen, Plexiglas-Aquarien, Petrischalen oder Glasgefäßen [58] mit verschiedenen Substraten (Torf, Pflanzenmatten) gezüchtet. Ein axenischer emerser Photobioreaktor zur Torfmooskultivierung ist bis zum heutigen Stand noch nicht erfolgreich etabliert worden. In der Photobiotechnologie ist ein emerser Photobioreaktor zur Kultivierung von terrestrischen Cyanobakterien entwickelt worden [125], allerdings ist er wegen seiner Bauform und der vertikal angebrachten Lichtstäbe mit Anheftungsflächen für die Torfmooskultivierung nicht geeignet. In der heterotrophen Biotechnologie sind die emersen Reaktoren verbreiteter. Dreiphasen-Reaktoren, auch bekannt als *Trickle-Ted*-Reaktoren bzw. Rieselbetteaktoren [126], mit horizontal eingebauter Aufwuchsfläche, werden beispielweise in Abwasserreinigung eingesetzt. [127] Eine weitere Anwendung dieses Reaktortyps ist bei der Produktion von bakterieller Zellulose mit Bakterium *A. xylinum* [128] oder bei der Produktion von humanem FAS-Ligand mit Schleimpilze *D. discoideum* auf einer porösen Bimsstein-Keramikmembran [129]. Dabei liegen die Mikroorganismen auf einem porösen Material immobilisiert vor und werden von oben mit Medium berieselt, sowie von unten im Gegenstrom begast. [126, 127] Da dieser Reaktortyp im Vergleich zu den zuvor genannten einen deutlich geringeren Energieeintrag benötigt, wird dieses Prinzip als ein möglicher Ansatz zur Torfmooskultivierung im Rahmen dieser Arbeit erstmal untersucht.

### 2.3.2 *Ex-situ* Kultivierungsmethoden

*Ex-situ* Kultivierungsverfahren werden zur biochemischen und physiologischen Untersuchungen [48, 68, 81, 130–136], sowie zur Produktion von Torfmoosbiomasse [12, 137] angewendet. Für Forschungszwecken werden aus der Natur gesammelte Torfmoose in Phytotronen (Anzuchtkammer) unter definierten Bedingungen akklimatisiert [130, 138], um die Ergebnisse durch den jeweiligen physiologischen Zustand der Freilandmoose nicht zu beeinflussen. Die Torfmoose

werden hydroponisch [139] in Medien wie in der regenwasserähnlichen Rudolpschen Lösung (siehe Tabelle 5-1 im Anhang) [20, 48, 81], in künstlichem Regen [44, 53, 140] kultiviert oder mit der Rudolpschen Lösung besprüht [135]. Die Einflussparameter, wie z.B. Licht-, Wasser-, CO<sub>2</sub>-verfügbarkeit sowie Stickstoffverfügbarkeit [44, 48, 141] können unter kontrollierten Bedingungen in der Anzuchtkammer untersucht werden und für die Abschätzung des Verhaltens der Torfmoose in ihrem natürlichen Habitat unter verschiedenen Klimaszenarien, wie z.B. vermehrter Stickstoffbelastung [6, 93], unterschiedliche Wasserständen [8] genutzt werden. Die Ergebnisse sind dank der kontrollierten Klimabedingungen reproduzierbar und vergleichbar. Darüber hinaus werden Anzuchtkammern auch für Dauerkulturen genutzt. Dank der programmierbaren Parameter, wie Umgebungstemperatur, Lichtintensität der künstlichen Beleuchtung, Luftfeuchtigkeit und Windgeschwindigkeit können Moose über mehrere Monate und Jahre außerhalb ihres natürlichen Habitats gezüchtet werden. [20, 84, 130] Das Gegenteil ist bei einer Dauerkultur im Greifswald Moor Center der Fall, wo die Moospflanzen nach ein paar Monaten aus bis jetzt nicht erklärbaren Gründen ausbleichen und abstarben. [105, 142] Als Alternative zu einer Anzuchtkammer können Torfmoose in ihrem Mutterpflanzenquartier (Greifswald Moor Center) in einer Dauerkultur gehalten werden. [142] Hierfür wachsen die Torfmoose in mit Regenwasser befüllten Pflanzentöpfen im Außenbereich und sind dem natürlichen Sonnenlicht und den Witterungsschwankungen ausgesetzt. Obwohl keine definierten Kulturbedingungen vorherrschen, bleiben so kultivierte Moospflanzen länger vital als jene in der Anzuchtkammer. [105, 142]

Eine weniger kontrollierbare Umgebung als in einer Anzuchtkammer herrscht in Gewächshäusern. In diesen kann eine Biomasseproduktion durch die Regelung der Temperatur und der Lichtintensität, z.B. durch Abdunkeln des Daches oder Einschalten von Beleuchtungsmitteln, das ganze Jahr erfolgen. [8] Die Firma Micropropagation Services (Leicestershire, EM, Großbritannien) benutzt bereits Gewächshäuser (siehe Abbildung 2-10) zur kommerziellen Produktion von Torfmoos-Saatgut für die Renaturierung der Hochmoore in England. [15] Die Produktion von Torfmoos-Stecklinge (Beadahumok™) beträgt ungefähr 4 – 6 Monate [15] und der Preis pro Bündel liegt bei 0,52 €, wodurch sich die Kosten für je einen Hektar zu renaturierenden Moorflächen auf etwa 5300 € belaufen. [137] Der größte Vorteil dieses Verfahren ist die nachhaltige und umweltfreundliche Produktion, da der Energiebedarf zur künstlichen Beleuchtung über Photovoltaikmodule, sowie der Wärmebedarf mit Hilfe von Grundwasserwärmepumpen bereitgestellt werden und die Medienkosten zur Torfmooskultivierung entfallen, da hierfür gesammeltes Regenwasser eingesetzt wird. Gegen die Verwendung von Gewächshäusern spricht jedoch die langsame Wachstumsrate der Torfmoose im Vergleich zu einer Kultivierung im Bioreaktor. Demgegenüber steht der geringere Regelungsaufwand und die authentische Nachahmung der natürlichen Bedingungen, welche für diese Kultivierungsart sprechen.

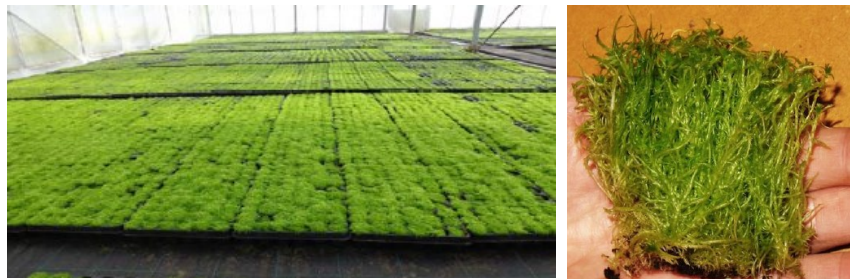


Abbildung 2-10: Produktion von BeadaHumok™ in Micropropagation Service (East Midlands, Großbritannien). Fotoquelle rechts: [4]. links [73]

Die Produktion von Torfmoos-Stecklingen (Beadahumok™) beträgt ungefähr 4 – 6 Monate [15] und der Preis pro Bündel liegt bei 0,52 €, wodurch sich die Kosten für je einen Hektar zu renaturierenden Moorflächen auf etwa 5300 € belaufen. [137] Der größte Vorteil dieses Verfahren ist die nachhaltige und umweltfreundliche Produktion, da der Energiebedarf zur künstlichen Beleuchtung über Photovoltaikmodule, sowie der Wärmebedarf mit Hilfe von Grundwasserwärmepumpen bereitgestellt werden und die Medienkosten zur Torfmooskultivierung entfallen, da hierfür gesammeltes Regenwasser eingesetzt wird. Gegen die Verwendung von Gewächshäusern spricht jedoch die langsame Wachstumsrate der Torfmoose im Vergleich zu einer Kultivierung im Bioreaktor. Demgegenüber steht der geringere Regelungsaufwand und die authentische Nachahmung der natürlichen Bedingungen, welche für diese Kultivierungsart sprechen.

Neben der Torfmoosproduktion kommen Gewächshäuser insbesondere für die Untersuchung des Verhaltens der Moose in einem Modell-Ökosystem [57] zum Einsatz, um beispielweise die Einflüsse von Umweltbedingungen wie der Nährstoffverfügbarkeit [26], Auswirkung von Wasserstressbedingungen [8, 16] oder der Pflanzenkonkurrenz [20] zu erforschen. Das System gewährleistet für die Experimente eine über einen längeren Zeitraum hinweg besser kontrollierbare Umgebung im Vergleich zum natürlichen Habitat.

Seit einigen Jahren wird neben der horizontalen betriebenen Torfmooskultivierung auch eine vertikale Vlieskultur in Gewächshäusern erforscht. Die genaue Kultivierungsstrategie, sowie die Werte für die Produktivität dieser Torfmooswand unterliegen bis heute der Geheimhaltung des Greifswald Moor Centers. Für die Nutzung einer Torfmooswand spricht das große Verhältnis der Lichtfläche zur Grundfläche, welches das der horizontalen Vlieskultur deutlich übertrifft. Die Hochskalierung der Produktion kann über eine parallele Schaltung der Mooswände erfolgen.

Ein weiteres *ex-situ* Kultivierungsverfahren zur Torfmoosproduktion ist die Torfmooskultivierung in einem Schattiertunnel (Nira GmbH, Deutschland). [6] Auf einer Fläche von 450 m<sup>2</sup> wachsen Torfmoose bei teilweise abgeschatteten Lichtverhältnissen und regelmäßiger Nährstoffversorgung durch Bewässerungssysteme der Außentemperatur ausgesetzt. Das verwendete Pflanzenvlies, auf welchem sich Torfmoose befinden, dient zur Wasserspeicherung, wodurch das Austrocknen der Moose vermieden wird. Unter diesen Bedingungen wird, verglichen mit den natürlichen Habitaten, eine zehnfach höhere Produktivität erzielt. Allerdings reagieren die Moose hier sehr sensibel gegenüber Temperaturschwankungen. Zudem kommt eine Anfälligkeit des Verfahrens bezüglich einer Kontamination der Mooskultur durch andere Pflanzen, Pilze und Mikroalgen (C. Schade, persönliche Mitteilung, [6]). Für die Hochskalierung der Produktion benötigt die horizontale Vlieskultur viel Platz und ist nur durch die Vergrößerung der Standfläche möglich.

Zusammenfassend besitzen die *ex-situ* Kultivierungsmethoden ein Potential zur Torfmoosproduktion, allerdings können diese aufgrund der deutlich langsameren Wachstumsraten nicht mit den *in-vitro* Bioreaktoren konkurrieren. Darüber hinaus ist das Risiko eines möglichen Befalls der Torfmooskultur mit Algen, Pilzen oder Bakterien nicht zu vernachlässigen, weshalb sich bei diesen Methoden die Kultur nur zeitlich begrenzt erhalten lässt. [58]

### 2.3.3 *In-situ* Kultivierungsmethoden

Die natürlichen Habitate der Moose sind überwiegend die Hochmoore, auf deren Merkmalen bereits in Kapitel 2.1 eingegangen wurde. In diesem Lebensraum erreichen die Torfmoose eine Flächen-Produktivität von 260 – 1540 g·m<sup>-2</sup>·yr<sup>-1</sup>. [86, 87] Dieser Wert kann von Jahr zu Jahr schwanken, da er von den ökologischen und klimatischen Bedingungen, wie den Lichtverhältnissen, der Temperatur und der Wasserherkunft beeinflusst werden [6].

In Ländern wie Chile, Neuseeland und China können die Torfmoose direkt aus den natürlichen Beständen der Moore entnommen und vermarktet werden. [6] In Deutschland ist die Entnahme untersagt, da *Sphagnum* eine geschützte Gattung ist, welche hauptsächlich in Schutzgebieten vorkommt. Erlaubt sind lediglich Experimente an dem Freilandmaterial zu Forschungszwecken. Darunter zählen beispielweise die Untersuchungen zur Verzweigung der Pflanze [79], der Wasserverfügbarkeit [8, 27], der Verteilung der Bulten- und Schlenken-Arten [143], der Zellzusammensetzung [144–147], des Chlorophyllgehalts [20, 36], der Temperatur im Moost Teppich [83, 148], der Photosyntheserate [149–151] und des CO<sub>2</sub>-Austauschs [152], sowie die vom Tag/Nacht-Zyklen abhängige Wachstumsraten [153, 154].

Seit 2004 ist eine neue *in-situ* Kultivierungsmethode etabliert worden, das sogenannte *Sphagnum farming* (siehe Abbildung 2-11). Hierbei erfolgt die Torfmooskultivierung auf bereits abgetorften und anschließend als Grünland genutzten Hochmoorflächen [16]. Diese Methode wird bereits in Ländern wie Deutschland [12, 16, 93, 155], Kanada [14, 152, 156] und Litauen [6] eingesetzt. Hierbei kann es sich um einen kommerziellen Anbau von Torfmoosen handeln [16] oder, wie in Kanada praktiziert wird, können die Torfmoose auch zu Renaturierung ohne gezielte Ernte der Biomasse (*Sphagnum vegetation restoration*) kultiviert werden. [6, 8]



Abbildung 2-11: Ansicht der Versuchsflächen des *Sphagnum farming*s. Links: Wiedervernässte abgetorfte Moorflächen in Rastede, Niedersachsen, Deutschland und in Shippagan, New Brunswick, Kanada, Foto: Melková.



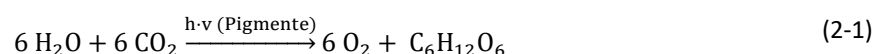
Die Ausbringung der Torfmoose erfolgt entweder direkt auf die Torfschicht (Shippigan, Kanada) oder auf Polypropylen-Matten (Ramsloh, Deutschland) [6]. Um die Torfmoose konstant feucht zu halten, verlaufen entlang der Feldflächenränder Wasserkanäle, da sich ein optimaler Wassergehalt positiv auf das Wachstum der *Sphagnen* auswirkt. [27, 84, 152, 157] Bei einem Abstand von 2 cm [16] bzw. 5 cm [8] zwischen dem Wasserspiegel und den Capitula der Moospflanzen im Moosteppich wurden die besten Wachstumsraten erzielt. Deswegen wird beim *Sphagnum farming* der jeweilige Wasserstand mittels Sensoren gemessen und mittels elektrischen Pumpen aufrechterhalten. [6] Das Wasser stammt hierfür entweder aus Teichen, Flüssen, der Landwirtschaft oder aus einem künstlichen Wasserreservoir. Letzteres erhöht die Nährstoffverfügbarkeit für Moospflanze. Als Saatgut für die Moorflächen können Freilandmoose aus einem Donator-Hochmoor [156] oder aus bereits etablierten *Sphagnum farming* Flächen [6] verwendet werden. Die Länge der Torfmoose sollte dabei maximal 5 – 10 cm betragen, da bei diesen Größen der Moospflanzenteile die Wuchshöhe, sowie die Bedeckung der Fläche am schnellsten erfolgt. [16] Die erreichte Produktivität beträgt 3 – 6 t·ha<sup>-1</sup>·yr<sup>-1</sup> (300 – 600 g·m<sup>-2</sup>·yr<sup>-1</sup>) in Deutschland [12, 16] und 0,3 – 2 t·ha<sup>-1</sup>·yr<sup>-1</sup> (30 – 200 g·m<sup>-2</sup>·yr<sup>-1</sup>) in Kanada [156].

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Torfmoose aus der *in-vitro* Kultivierung direkt als Saatgut eingesetzt werden können. [102, 108] Aufgrund ihrer vielen Innovationen etablieren sich die Torfmoose aus Bioreaktoren auf der Versuchsfäche sehr gut, wobei keine Reifung und Abhärtung (*hardening*) der Moose notwendig ist. Ein solches Saatgutmaterial wäre für eine großflächigen Torfmooskultivierung auf abgetorften und wiedervernässten Flächen anwendbar, sofern das Material aus einer großskaligen Produktion von Torfmoosen in Bioreaktor zur Verfügung stünde. Der Entwurf ein für diese Anwendung möglichen Produktionsverfahrens ist ein Bestandteil dieser Arbeit.

## 2.4 Energie- und Stoffwechsel

Um die Torfmoose unter optimalen Bedingungen kultivieren zu können, ist es wichtig, sich mit den in der Moospflanze ablaufenden Mechanismen der Energieumwandlung in den Zellen, sowie den wichtigsten Nährstoffaufnahme-mechanismen zu befassen. Die in Form von Licht aufgenommene Energie in Kombination mit dem Stoffwechsel in den Zellen resultiert in das Wachstum der Pflanzen und der damit verbundenen Zunahme von Trockenbiomasse. [59]

Die Torfmoose nutzen die Photosynthese zur Umwandlung der Lichtenergie in die chemische Energie zur Erzeugung von energiereichen organischen Verbindungen. Der Mechanismus der Photosynthese basiert auf die Absorption der elektromagnetischen Strahlung und deren Umwandlung in im Zellstoffwechsel verwertbare, chemische Energie. [77] Hierbei handelt sich um einen zweistufigen Prozess, in einer lichtabhängigen Reaktion (Lichtreaktion) werden die Photonen durch Pigmente in den Chloroplasten absorbiert und ihre Energie zur Spaltung von Wasser verwendet. Der aus der Photolyse des Wassers stammende Wasserstoff wird in das Reduktionsäquivalent Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP<sup>+</sup>) überführt. Als Nebenprodukt entsteht Sauerstoff. Außerdem wird Energie in Form von Adenosintriphosphat ATP gespeichert, welches zusammen mit dem entstehenden, reduzierten NADPH in einem zweiten, lichtunabhängigen Schritt (Dunkelreaktion) das energiearme, anorganische Molekül CO<sub>2</sub> in organische Verbindungen in die Matrix der Chloroplasten überführt. Dies umfasst einen Komplex an einzelnen Reaktionen, bekannt unter CO<sub>2</sub>-Assimilation oder Calvin-Zyklus, bei welchem das CO<sub>2</sub> bis zur Hexose (Glukose) reduziert wird. Diese wird zum Aufbau von Makromolekülen, wie Kohlenhydrate, Aminosäuren, Fettsäuren etc. verwendet. [77, 158]



Aus der Gleichung der Photosynthese (2-1) sind die Einflussfaktoren für die Intensität der Photosynthese ersichtlich. Diese sind der Wassergehalt, die eingestrahelte Lichtmenge und die CO<sub>2</sub>-Konzentration. Zusätzlichen Einfluss haben die Ionenversorgung, die Temperatur, der Chlorophyllgehalt, die Blattmorphologie, der Entwicklungszustand, die Luftzirkulation, sowie die Aktivität der photosynthetischen Enzyme. [76] In den nachfolgenden Unterkapiteln wird auf die vier zuerst genannten Einflussfaktoren der *Sphagnum*-Photosynthese eingegangen [159], welche die produktionsrelevanten Parameter darstellen. Die anderen genannten Faktoren sind relevant für ein weitführendes, tieferes Verständnis des Zellwachstums, sowie für die Erforschung hinsichtlich der Erhöhung der Effizienz der Photosynthese.

### 2.4.1 Wassertransport und Wassergehalt der Moose

Die Torfmoose gehören zu den ektohydriischen Pflanzen, welche das Wasser über die gesamte Oberfläche aufnehmen und nur äußerlich leiten. [72, 81] Der innere aktive Wassertransport ist aufgrund der offensichtlich fehlenden anatomischen Spezialisierung im Inneren des Stämmchens nicht möglich. [26] Dies wird durch die Morphologie der Pflanze kompensiert. Die Moose besitzen ein gut entwickeltes System der Wasserleitung in den Kapillarräumen zwischen den hängenden Ästchen um das Stämmchen. Die hängenden Ästchen bilden eine dochtähnliche Struktur um das Stämmchen, was den vertikalen Transportweg zum Capitulum begünstigt. [81, 83] Aufgrund der, im Gegensatz zum gesättigten Flüssigkeitsfilm, geringeren Luftfeuchtigkeit verdunstet das Wasser im Capitulum, was das Wasser in der Moospflanze nach oben treibt. [27] Dank diesem rein physikalischen Transport [26] kann das Wasser bis zu 30 cm in einem Moosteppich aufsteigen. [160] Außerdem überlappen und berühren sich die einzelnen Pflanzen mit den ausgebreiteten Verzweigungen im Moosteppich, was den Wassertransport in der horizontalen Ebene ermöglicht. [83] Durch dichte Rasen sind die Torfmoose in der Lage einen Wasserspeicher aufzubauen, welcher die Moose auch Trockenperioden überstehen lassen kann. [37]

Da der Moospflanze Kutikula und Stomata fehlen, ist es ihr nicht möglich den Wasserverlust aus den Zellen zu kontrollieren. [157] Aus diesem Grund besitzt sie jedoch Hyalocyten, welche das Wasser in den Blättern speichern und somit die Wasserverdunstung teilweise abpuffern können. [72] Wenn die Verdunstungsrate jene Rate übersteigt, mit welcher das Wasser zu den Pflanzenspitzen transportiert wird, trocknen die Capitula aus. [27] Die Aufrechterhaltung eines hydratisierten Zustandes ist wichtig für den Wassergehalt in der Moospflanze, welcher die Photosyntheserate und somit auch das Wachstum der Torfmoose beeinflusst. [27, 84, 157] Der Zusammenhang zwischen der Assimilationsrate ( $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate), welche zur Messung der Photosyntheserate verwendet wird, und dem Wassergehalt ergibt bei den Torfmoosen, wie auch bei anderen Laubmoosen, eine Optimumkurve. [157] Ein Beispiel der Optimumkurve ist in Abbildung 2-12 für *S. fallax*, *S. nemoreum* und *S. magellanicum* dargestellt.

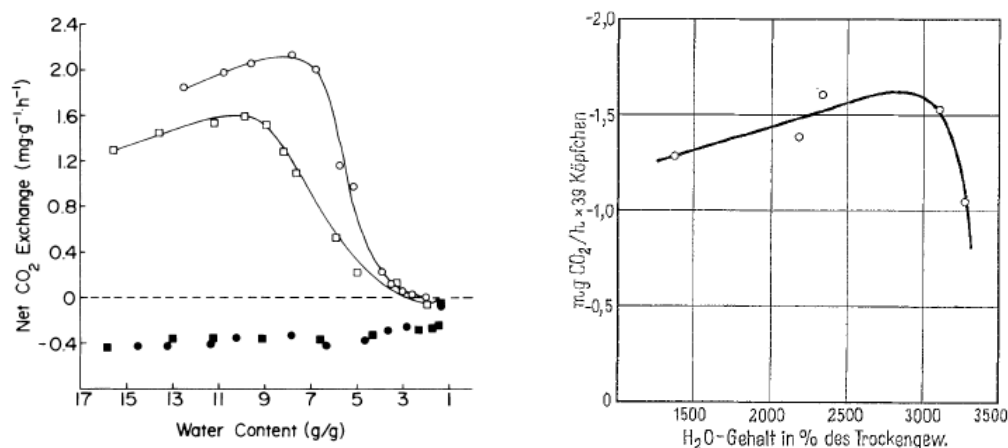


Abbildung 2-12: Optimumkurve für die Abhängigkeit des Wassergehaltes und  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate. Links: Gemessen für *S. fallax* (Kreise) und *S. nemoreum* (Viercken) bei  $15^\circ\text{C}$  und  $\text{PFD} = 500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die schwarzen Vierecken stellen die Respirationsrate dar [25]. Rechts: Gemessen für *S. magellanicum* bei  $T_K = 20^\circ\text{C}$  und Beleuchtungsstärke 6000 Lux. [36]

Die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme verändert sich mit dem jeweiligen Wassergehalt. Bei höheren Wassergehalten bildet sich ein externer Flüssigkeitsfilm auf der Pflanzenoberfläche, was den Zugang zu  $\text{CO}_2$  aufgrund eines erhöhten Diffusionswiderstands reduziert. [130, 157, 161] Bei niedrigeren Wassergehalten kommt es zur biochemischen Veränderung in der Moospflanze, wie der Austrocknung der Gewebe und die Photosyntheserate kann auf die Hälfte oder sogar auf unter ein Drittel absinken, verglichen mit jener bei vollem Wassergehalt. [69] Ein optimaler Wassergehalt ergibt sich, wenn der externe Wassergehalt minimiert, der Turgordruck in der Zelle jedoch aufrechterhalten wird. Der exakte Wert hängt von den vorherrschenden Bedingungen des Experiments, der Photonenflussdichte oder der Luftfeuchtigkeit ab und nimmt für jede

Torfmoospezies andere Werte und Verläufen an. [69, 84, 139] Bei der Untersuchung von zehn unterschiedlichen Torfmoosarten wurden optimale Wassergehalte bestimmt, welche je nach Spezies zwischen 7 und 26 g H<sub>2</sub>O pro g Trockengewicht variierten. [69, 84]

### 2.4.2 Lichteinfluss

Die Torfmoose als phototrophe Organismen benötigen Licht als Energiequelle. Das Licht als eine Form der elektromagnetischen Strahlung kann Energie quantisiert in Form von Photonen abgeben. Die darin jeweils enthaltene Energie hängt von der Wellenlänge ( $\lambda$ ) des Lichts ab. [77, 111] Das Licht wird als Lichtintensität gemessen, welche für die technische Anwendung über die Photonenflussdichte (PFD) in der Einheit  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , also der Anzahl der Photonen pro Flächeneinheit pro Zeiteinheit, angegeben wird. [111] Im diesem Unterkapitel wird auf die spektrale Zusammensetzung des Lichts (sog. Lichtqualität), sowie auf die Menge des Lichts (sog. Lichtquantität) eingegangen, weil sie entscheidend für die Intensität der Photosynthese sind. [76, 77]

#### Lichtqualität

Phototrophe Organismen können nur in so genanntem photosynthetisch aktivem Bereich (PAR) bei Wellenlängen zwischen 350 nm und 720 bzw. 760 nm Photonen absorbieren und dadurch die darin enthaltene Energie nutzen [76, 110]. Hierfür bildet die Pflanze Hauptpigmenten (Massenpigmente oder auch Chromophoren) wie Chlorophyll, welche der Energiegewinnung dienen. [59, 118] Bei den Torfmoosen sind an der Lichtabsorption, wie bei allen photosynthetisch aktiven Organismen, *Chlorophyll a* und ,wie bei höheren Pflanzen, *Chlorophyll b* beteiligt. [36, 162] Beide absorbieren Licht bei Wellenlänge von 400 - 500 nm bzw. 600 -700 nm. [59] Die spezifische Anteile an Chlorophyll in der Torfmoospflanze variieren mit dem physiologischen Zustand des Mooses und seines Standort. [36, 132] Zusätzlich zu den Hauptpigmenten besitzen die Torfmoose genau wie Algen auch *Carotinoide* (Carotine und Xanthophylle), welche ein abweichendes Absorptionsspektrum ( $\beta$ -Carotin  $\lambda=420-480$  nm, Violaxanthin  $\lambda=423$  nm), im Vergleich zu Chlorophyll a und b, aufweisen. [163] Die primären Carotinoide (auch Carotine), wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin, gehören zur Grundausstattung des Photosystems, weil sie als Antennenpigmenten oder akzessorische Pigmente an der Photonenabsorption mitwirken. [77] Neben ihrer lichtleitenden Aufgabe sind die Carotine zusammen mit den Xanthophyllen für den Lichtschutz über eine nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (*non-photochemical quenching*) zuständig. [133] Hierbei wird die überschüssige absorbierte Energie in Form von Wärme dissipiert. [59] Der Pigmentgehalt an Carotinoiden in den Pflanzen korreliert mit den am Standort vorherrschenden Lichtverhältnissen. Beispielweise besitzen Freilandmoose an sonnigen Standorten mehr Carotinoide als jene an schattigen Habitaten.[163]

Darüber hinaus enthalten manche Torfmoosarten auch Wandfarbstoffe, sogenannte Sphagnorubine [132], mit zwei Absorptionsmaxima ( $\lambda=287$  nm und  $\lambda =475- 540$  nm) [164], welche der Pflanze einen rötlichen oder braunen Ton verleihen. [164] Die Ausbildung der Sphagnorubine wird in der Natur durch tiefe Nachttemperaturen ausgelöst, unter Laborbedingungen kann dieser Prozess durch eine Kältebehandlung und Glukose-Fütterung induziert werden [163]. Im gleichen Zug tritt ein deutlich messbarer Abbau des Chlorophylls auf. Nach Beendigung der Kältebehandlung setzt, bei überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes der Beleuchtungsstärke, die Synthese der Chloroplastenpigmente wieder ein. [132, 163]

Neben den Pigmenten für die Energiegewinnung besitzen die Pflanzen auch Pigmente, mit welchen sie Licht wahrnehmen können. Sie helfen der Pflanze die Tageslänge, die Lichtintensität, die spektrale Zusammensetzung des Lichts, sowie die Beschattung durch andere Pflanzen zu erkennen. Zu diesen pflanzlichen Sensorpigmenten gehören vier Typen an Photorezeptoren. Der UV-B-Photorezeptor ( $\lambda = 280 -350$  nm), das Cryptochrom und Phototropin (UV-A und Blaulichtbereich:  $\lambda = 340 - 520$  nm) und das Phytochrom (Hellrotbereich:  $\lambda = 660$  , Dunkelrotbereich:  $\lambda = 730$  nm). [76]

Die Blaulichtrezeptoren sind Cryptochrom und Phototropin. Cryptochrom hemmt bei höheren Pflanzen das Längenwachstum im unteren Teil der Sprossachse. Bei niederen Pflanzen und Pilzen induzieren sie z.B. die Synthese der Schutzpigmenten (Carotinoide). Im der Moosart *Physcomitrella patens* lösen die, sich in der Zellkernregion befindenden, Cryptochrome die Produktion von Seitenzweigen aus. [165] Das Phototropin steuert die Bewegung der Sprossorgane

(Blätter, Blüte) der höheren Pflanzen zur Lichtquelle hin (Phototropismus). Dieses Phänomen wird durch einen Auxin-Transport zwischen der Plasmamembran der Zelle anhand der Cholodny-Went-Theorie erklärt [59, 76, 77]. Neben der Streckung bestimmt das Cryptochrom zusammen mit dem Rotlichtrezeptor Phytochrom im Moos *Physcomitrella patens* die Position der Verzweigungen [165]. In höheren Pflanzen induziert das von Phytochrom absorbierte Rotlicht ein Signal zur Steuerung der Genexpression bei ausgewählten Genen, die Regulation der Enzymproduktion, die Bildung von Chloroplasten-Protein-Komplexen und die Bildung von Enzymen für den Calvin-Zyklus. Der Anteil an dunkelrotem Licht (DH) bewirkt das Streckungswachstum der Pflanze. Ist eine Pflanze von anderen Blättern verschattet, wird das Hellrotlicht durch die Blätter absorbiert und das Dunkelrotlicht durchgelassen. Dadurch enthält das transmittierte Licht einen hohen Anteil an DH-Licht, was die verschattete Pflanze zu einem verstärkten Längenwachstum zwingt, während ihr Verzweigungswachstum gehemmt wird. [76]

### Lichtquantität

Die Photosynthese läuft im obersten Teil der Moospflanze (< 10 mm) überwiegend in Capitulum ab, wobei die unteren Teile weiterhin lebendig bleiben, um im Falle einer Beschädigung des Capitulums neue Seitentriebe zu erzeugen. [166] Zur Messung der Photosyntheseaktivität eines Moores wird oft die Sauerstoffproduktionsrate [167] oder die Kohlenstoffdioxid-Aufnahmerate [56, 68, 138, 148, 149, 152] verwendet. Die Photosyntheserate hängt von der eingestrahlten Lichtintensität ab. Die Korrelation zwischen der Photosyntheserate und der Lichtintensität wird als PI-Kurve (eng. *photosynthetic response curve*) bezeichnet. [69] Ein Beispiel einer Sättigungskurve ist in Abbildung 2-13 dargestellt. [56] Da die Messungen zumeist oft bei Pflanzen an ihrem natürlichen Standort durchgeführt wurden, hängen diese Werte stark von dem physiologischen Zustand der Moospflanze ab und können nur zur qualitativen Beschreibung des Verhaltens verwendet werden.

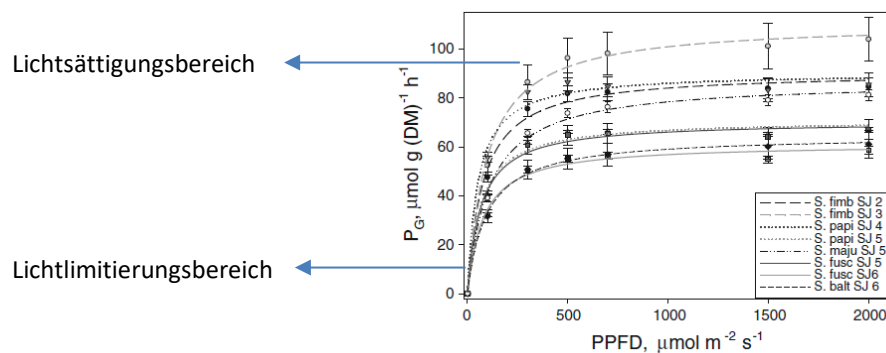


Abbildung 2-13: Abhängigkeit der reellen-Photosyntheserate ( $P_G$ ) von der eingestrahlten Photonendichte (PPFD) für unterschiedliche *Sphagnum*-Arten: *S. fimbriatum*, *S. papillosum*, *S. majus*, *S. fuscum* und *S. balticum* [42]. Abgebildet sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen, sowie die daraus berechnete Lichtreaktionskurve. Aufgrund des geringeren Vorkommens von Bäumen in den Hochmooren, sind die Moorpflanzengesellschaften einer Sonnenstrahlung mit einer Lichtintensität bis zu  $1200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  an einem sonnigen Tag um die Mittagszeit ausgesetzt. [142]

In Abbildung 2-13 sind zwei Lichtbereiche ersichtlich. Diese sind einerseits der Lichtlimitierungsbereich und andererseits Lichtsättigungsbereich, welche durch die Hemmungintensität  $I_c$  Sättigungintensität  $I_k$  voneinander abgegrenzt werden können. [118, 123] Bei sehr niedrigen Lichtintensitäten unter dem Kompensationspunkt  $I_c$  ist die durch Photosynthese gewonnene Energie nicht groß genug, um den Stoffwechsel der Zelle zu erhalten. Hier veratmet die Zelle ihre Speicherstoffe und ist auf Dauer aufgrund der negativen Kohlenstoffbilanz nicht lebensfähig. [76] Am Kompensationspunkt  $I_c$  ist die reelle Photosyntheserate gleich Null, da der durch Photosynthese erzeugte Sauerstoff im Gleichgewicht mit dem respirierten Sauerstoff steht. [168] Beispielweise lag der Kompensationspunkt für die Spezies *S. nemoreum* und *S. fallax*, welche aus ihrem natürlichen Moorhabitat entnommen wurden, zwischen  $10 - 72 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  [83, 138, 139]. Dieser Sachverhalt lässt die beiden Moosarten zu Sonnenpflanzen ( $I_c = 20 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) zählen. [76] Ab dem Kompensationspunkt steigt die reelle Photosyntheserate bei zunehmender Lichtintensität linear bis zum Lichtsättigungsbereich an. Das photosynthetische System ist noch nicht durch Licht gesättigt und hat noch die Kapazität mehr Photonen zu absorbieren. Daher nennt sich dieser Bereich Lichtlimitierungsbereich.

Am **Lichtsättigungspunkt** erreicht die Photosyntheserate ihren maximalen Wert, da jedes absorbierte Photon im Photosystem zur Synthese von ATP und den Reduktionsäquivalenten in der Lichtreaktion genutzt wird. [168] Der Lichtsättigungspunkt liegt entsprechend der Literatur zwischen  $491 - 648 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  [139], kann sich jedoch durch den Wassergehalt [69, 84, 139], die Temperatur [138, 148], den pH-Wert der Umgebung [80] sowie durch ein höheres  $\text{CO}_2$ -Angebot [68] verändern. Ab der Sättigungsintensität erreicht die Photosyntheserate ihr Maximum und bleibt mit steigender Lichtverfügbarkeit bis zum Eintritt der sogenannten Lichthemmung konstant. Der Grund für die konstante Photosyntheserate ist die langsamere Reaktionsgeschwindigkeit der  $\text{CO}_2$ -Fixierung über das Enzym RuBisCO im Vergleich zur Photonenabsorptionsrate (siehe Kapitel 2.4.3). [118] Die absorbierten Photonen können nicht mehr für den Stoffwechsel der Pflanze verwendet werden und die überschüssige absorbierte Energie wird in Form von Wärme dissipiert (*non-photochemical quenching*). Ein weiterer Lichtschutzmechanismus der Moospflanze vor hohen Lichtintensitäten ist die Produktion von Wandpigmenten wie beispielweise Carotinoide [69, 163]. Eine fehlende Photoakklimatisierung, welche zur Photoinhibition führt, wird in Zusammenhang mit dem geringen Stickstoffgehalt der Zelle gebracht. [169] Da die Kapazität der Energiedissipation der Pflanze für die erschöpft ist, resultiert durch den entstandenen reaktiven Sauerstoff eine Schädigung der Pigmente, welche sich durch ein Ausbleichen oder ein Braunfärben der Pflanze zeigt. [118, 148] Neben einem geringen Stickstoffgehalt führen niedrige Temperaturen ( $0 - 15 \text{ }^\circ\text{C}$ ) zu einer Photoinhibition. Bereits ab  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ist eine deutliche Abnahme der Photosyntheserate bei mehreren *Sphagnen*-Arten messbar. [167] Daher lässt sich der Inhibierungspunkt (in der Graphik nicht dargestellt) bei Torfmoosen nicht auf einen bestimmten, konstant bleibenden Wert festlegen und kann deutlich früher auftreten, als die über die Literatur ermittelten Werten von  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  [138] bzw.  $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . [148]

Bei der Betrachtung dieser Daten ist zu beachten, dass die Ermittlung der einzelnen Messpunkte der PI-Kurve schrittweise erfolgte, wobei eine Lichtphase zwischen 5 und 30 Minuten dauerte [56, 68, 167], da abgewartet wurde, bis sich ein konstanter  $\text{CO}_2$ -Wert eingestellt hatte. In dieser kurzen Zeit fand keine Anpassung der Moospflanze an das Lichtangebot statt. Die Auswirkung einer langzeitigen Beleuchtung der Moospflanzen mit einer hohen PFD, wie es in einem Photobioreaktor vorkommt, wurde noch nicht untersucht. Somit könnten Abweichungen zwischen den dargestellten Daten und jener Werte, die in den Kultivierungsversuchen im Bioreaktor auftreten können, als durchaus möglich sein.

### 2.4.3 $\text{CO}_2$ -Assimilation

Die Torfmoose können zum Aufbau der benötigten Makromoleküle als Kohlenstoffquelle sowohl das anorganische Kohlendioxid  $\text{CO}_2$  (Autotrophie) als auch organische Verbindungen wie Glukose, Fruktose oder Saccharose (Heterotrophie) verwenden. [18, 22, 109] Für eine kostengünstige und nachhaltige Strategie der Torfmooskultivierung im industriellen Maßstab, bietet sich die Nutzung von Kohlendioxid als C-Quelle an. Aus diesem Grund wird im folgenden Unterkapitel nur auf die Autotrophie detailliert eingegangen.

In Hochmooren steht für die Torfmoose das atmosphärische  $\text{CO}_2$  [53], Kohlendioxid aus dem Stoffwechsel methanogener Bakterien [170], sowie aus dem gelösten  $\text{CO}_2$  in dem, die Moose umgebenden, Wasser zur Verfügung. Die methanogenen Bakterien kommen in den Hyalocyten der Moospflanze vor und produzieren 5 – 20 % des von den Torfmoosen benötigten  $\text{CO}_2$  durch Oxidation von Methan. Die Rolle dieser methanogenen Bakterien wurde in *in-vitro* Kultivierungen noch nicht untersucht. Dank der Oxidationsreaktion der Bakterien kann sich aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen dem Moorwasser und der Atmosphäre in den Bulten doppelt so viel  $\text{CO}_2$  befinden, im Vergleich zur Atmosphäre. [54] Das gelöste  $\text{CO}_2$  im Moorwasser liegt auch deutlich höher konzentriert vor ( $100 - 5000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) als jenes  $\text{CO}_2$  in der Umgebungsluft [54, 55, 171]. Hydrogencarbonat  $\text{HCO}_3^-$  können die Torfmoose jedoch nicht als C-Quelle für die Photosynthese verwenden [5]. Somit sind sie das gasförmige und gelöste Kohlendioxid die einzigen C-Quellen für die Photosynthese der Torfmoos-Pflanzen.

Die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme der Moospflanze erfolgt über die gesamte Oberfläche ihrer Blättchen und Ästchen. [69] Das  $\text{CO}_2$  diffundiert aus der Umgebungsluft (Gasphase), über einen Flüssigkeitsfilm auf der Moosoberfläche und ihre Zellwand durch eine Membran in die Chlorocyten in Cytoplasma. Der Konzentrationsgradient zwischen der Umgebung und dem Cytoplasma ist die Treibkraft der Diffusion. [59] In der flüssigen Umgebung des Cytoplasmas diffundiert das  $\text{CO}_2$  zu den Chloroplasten, aufgrund eines Konzentrationsgradienten [172]. In den Chloroplasten wird es über das Enzym Ribulose-1,5-

bis-phosphat-Carboxylase/Oxygenase RuBisCO an den Akzeptor Ribulose 1,5-diphosphat ( $C_3$ -Körper) fixiert. [59, 77, 172] Nach der enzymatischen Fixierung wird das Produkt im Calvin-Zyklus über mehrere  $C_3$ -Körper weiter reduziert. Hierbei entstehen Intermediate, welche für die Synthese organischer Verbindungen benötigt oder direkt als Substrat für den Krebszyklus verwendet werden. Die Energie für diese Mechanismen kommt aus dem ATP der Lichtreaktion. [59, 76, 77, 118]

Die enzymatische Fixierung des  $CO_2$  folgt einer Michaelis-Menten Kinetik. Die Umsatzrate des RuBisCO-Enzymes steigt mit dem in den Chloroplasten herrschenden  $CO_2$ -Partialdruck an und erreicht ab einem bestimmten Wert des  $pCO_2$  ihren maximalen Wert. [118] Da *Sphagnen* keine speziellen Organellen zur  $CO_2$ -Aufkonzentrierung (sog. Pyrenoide) besitzen [69], hängt die Photosyntheserate von demjenigen  $pCO_2$ -Wert ab, welcher sich einstellt, wenn die Carboxylierungsrate in den Chloroplasten mit der Rate des diffusiven Zufuhrs des Kohlendioxids in die Zelle im Gleichgewicht steht. Der intrazelluläre, sowie der extrazelluläre Transportwiderstand in der umgebenden Flüssigkeit und der Luft, sowie die vorherrschenden  $CO_2$ -Umgebungskonzentrationen beeinflussen den diffusiven Zufuhr und somit die  $CO_2$ -Zufuhrrate in die Zelle [118, 172]. Der interzelluläre Transportwiderstand ist kaum veränderbar, während der extrazelluläre Transportwiderstand auf der Moosoberfläche durch die Flussrate der Gewässer bestimmbar ist. Da jedoch Moorgewässer eher zu den stehenden Gewässern zählen [69], ist ein intensivierter  $CO_2$ -Transport durch Konvektion im natürlichen Habitat eher selten anzutreffen. Dadurch stellt sich ein höherer Transportwiderstand für den  $CO_2$ -Stofftransport für die aquatischen Spezies ein. [71] Zu dem führt die langsame Diffusionsrate von  $CO_2$  zu einer Kohlenstofflimitierung in den Moospflanzen. [5, 82, 172] Die  $CO_2$ -Umgebungskonzentration beeinflusst die Diffusion in die Zelle aufgrund des sich ausbildenden Konzentrationsgradienten. Eine Steigerung des Konzentrationswertes bewirkt einen höheren  $CO_2$ -Partialdruck in den Chloroplasten. Dies kann im Weiteren die Umsatzgeschwindigkeit des RuBisCO-Enzymes im linearen Bereich der Enzymkinetik erhöhen, was sich demnach positiv auf den Umsatz von  $CO_2$  im Calvin-Zyklus auswirkt und damit eine erhöhte Photosyntheserate erreicht wird. Dieser Effekt kann am Beispiel der  $CO_2$ -Aufnahmekinetik von *S. fuscum* (siehe Abbildung 2-14, rechts) betrachtet werden. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass bei vorliegender Lichtsättigung die enzymatische  $CO_2$ -Fixierung der limitierende Schritt der Photosynthese und somit auch des Wachstums ist. [76, 118] In der Lichtsättigungskurve (siehe Abbildung 2-14, links) führt die erhöhte  $CO_2$ -Verfügbarkeit zu einer Verschiebung des Lichtsättigungspunkts in Richtung höherer Photonenflussdichten [68]. Dies trifft jedoch nur bedingt zu, da sich bei weiterer Erhöhung der  $CO_2$ -Verfügbarkeit ein anderer Faktor auf intrazellulärer Ebene limitierend auswirkt (Blackman-Kinetik). [76, 173] Somit ist die Steigerung der Photosyntheserate und das Wachstum der Torfmoose durch erhöhte  $CO_2$ -Konzentrationen bis zu einem gewissen Grad möglich.

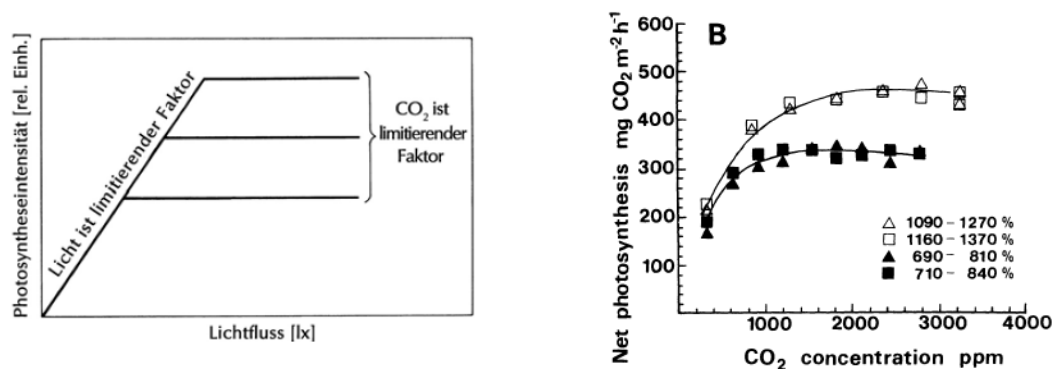


Abbildung 2-14:  $CO_2$ -Aufnahmekinetik. Links: Theoretischer Verlauf der Licht-Sättigungskurve bei Zugrundlegung des Blackman-Kinetik vom limitierenden Faktor  $CO_2$  [63]. Der Sättigungsbereich kann auf eine Begrenzung der Dunkelreaktion zurückgeführt sein. In der Realität ergibt sich einen Übergangsbereich, in welchem Licht und  $CO_2$  gleichzeitig die Photosynthese limitieren, oder eine interne Limitierung bzw. eine andere Nährstoffumsatzrate limitierten wirken kann. [169] Rechts: Experimentell ermittelte  $CO_2$ -Aufnahmekinetik für *S. fuscum* bei vier verschiedenen Wassergehältern bei einer PFD=  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die  $CO_2$  Konzentration ist in 1000 ppm angegeben, was 0,1 % (v/v) entspricht [166]. Im Vergleich zur Blackman-Kinetik verläuft die Kurve ohne scharfen Knick im Übergangsbereich zwischen  $CO_2$ -Limitierungs- und  $CO_2$ -Sättigungsbereich.

### 2.4.4 Nährstoffaufnahme

Die photosynthetisch aktiven Organismen brauchen neben Wasser, Licht und CO<sub>2</sub> auch chemische Elemente, wie Stickstoff (N), Phosphor (P), Kalium (K), Magnesium (Mg), Calcium (Ca) und Eisen (Fe), sowie weitere Spurenelemente, die für den Aufbau und Funktion der Moose essenziell sind. Als Hauptquelle dieser Nährstoffe für die Torfmoose wird der atmosphärische Eintrag über dem Regen angesehen. Die im Regen gelösten Nährstoffe werden in den Hyalocysten der Moospflanze aufgefangen und weiter in die Zelle transportiert. [31, 58] Zusätzlich können die Nährstoffe auch aus dem umgebenden Schlenkenwasser stammen, wobei beide Quellen nur lokal oder zeitweise verfügbar sein können. [58, 69] Dank der Morphologie der Moospflanze, wie z.B. ihrer fehlenden Kutikula, können die Torfmoose die Nährstoffe über die gesamte Pflanzenoberfläche aufnehmen. Ein hoher Wert des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen der Pflanze begünstigt die Wasserabsorption und somit auch die Nährstoffaufnahme. [58, 63]

#### Kationenaustausch

Der Nährstoffmechanismus der ionischen Komponenten, sowie jener der organischen Substanzen der Torfmoose wird selten in der Literatur erwähnt. Im Vordergrund der Untersuchungen stehen zumeist der Kationenaustausch [174–178], welcher das Abfangen der Kationen aus dem Niederschlagwasser begünstigt. Dabei handelt sich um eine physikalische Bindung der Kationen an eine Austausch-Matrix in der zellulosehaltigen Zellwand. Diese besteht aus Polygalacturonsäure mit einer Carboxylgruppe COOH, welche ein H<sup>+</sup>-Ion abgeben kann und dadurch in ein COO<sup>-</sup> Anion dissoziiert. Die Anzahl der negativen Bindungsplätze wird als die Kationenaustauschkapazität bezeichnet. [177] Sie korreliert direkt mit dem Gehalt an Polyuronsäure [73], welche im Bereich von 10 – 30 % des Trockengewichtes der Moose liegt. Submersen Spezies und teppichbildende Arten enthalten weniger Säure als die auf der Erhebung eines Bultes wachsenden Moose. [37, 69, 73] Für den weiteren Transport der Kationen in die Zelle liegen noch keine Untersuchungen vor. Eine Möglichkeit ist, dass sich die adsorbierten Kationen durch einen Konzentrationsgradienten oder eine pH-Wert-Änderung der umgebenden Flüssigkeit freigesetzt werden. [175] Die frei in der Flüssigkeit vorliegenden können dann, wie auch bei anderen Organismen, durch Ionenkanäle in der Zellmembran in das Cytoplasma transportiert werden. [59] Ein Anionenaustausch an der Zellwand der Torfmoose wurde bislang noch nicht nachgewiesen [175]. Aus diesem Grund ist ein Transportmechanismus der Anionen durch Ionenkanälen zu erwarten, wie dieser bei höheren Pflanzen stattfindet. [59]

#### Saccharide

Neben ionischen Komponenten können Torfmoose auch Monosaccharide aufnehmen. Die Monosaccharide, wie Glukose und Fruktose, haben sich als wachstumsfördern erwiesen. [18, 22, 109] Im Genom der Pflanze *Arabidopsis* (Modellorganismus in der Genetik) und auch des Laubmooses *Physcomitrella patens* (Modellorganismus für Pflanzenevolution, -entwicklung und -physiologie) wurden Gene nachgewiesen, welche Membrantransportproteine kodieren, die als Monosaccharidtransporter in der Zellmembran fungieren. [179, 180] Bei der Genomsequenzierung der Torfmoose wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht nach solchen Proteinen gesucht. Neben den einfachen Zuckern wirkt sich auch das Disaccharid Saccharose positiv auf das Wachstum der Moospflanze aus [17]. Allerdings ist der Aufnahmemechanismus bei den Torfmoosen noch nicht vollständig geklärt. [18] Für die direkte Saccharoseaufnahme sind Disaccharid-Transporter (SUC, SUT) in der Zellmembran zuständig, welche zum Beispiel im Genom des Laubmooses *Physcomitrella patens* enthalten sind. [181] Ein zweiter Mechanismus basiert auf der Hydrolyse der Saccharose durch das Enzym Invertase. Das in Glukose und Fruktose gespaltete Disaccharid wird anschließend mit den Monosaccharid-Transportern in die Zelle aufgenommen. Die Anwesenheit der Invertase in der Zellmembran nachgewiesen [133, 182], wie auch die Produkte der Hydrolyse von Saccharose im Kulturmedium konnte während der Kultivierung der Torfmoose *S. palustre*, *S. squarroum* und *S. fuscum* nachgewiesen werden [19]. Dies bestätigt, dass Torfmoose Saccharose als organische C-Quelle für ihren Stoffwechsel nutzen können. [23]

Der Austausch der aufgenommenen Nährstoffe zwischen den einzelnen Zellen erfolgt bei den meisten Moosen über spezielle leitende Zellen in den Stämmchen, den sogenannten Leptoiden für Zucker und den Hydroiden für Wasser und Mineralien. [58] Diese Art von Zellen besitzen Torfmoose nicht. Nichtsdestotrotz können sie wasserlösliche organische Moleküle umlagern bzw. zurückhalten. [26] Dies wird auf das innere parenchymatische Grundwebe im Stämmchen zurückgeführt, wo ein symplastischer Transport von Wasser und Nährstoffen stattfinden kann. [58] Trotz dem fehlenden

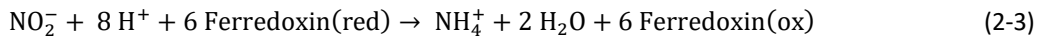
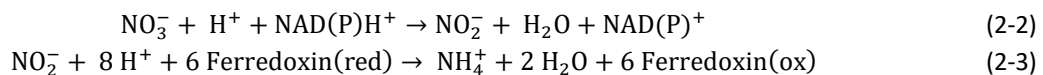
Leitgewebe sind die Torfmoose in der Lage aktiv, unabhängig von den äußeren Wasserbedingungen, lösliche Kohlenstoffverbindungen von den älteren Teilen der Pflanze in das Capitulum zu transportieren. [26]

### Stickstoff

In der Literatur sind häufiger ernährungsphysiologische Untersuchungen anzutreffen verglichen mit Experimenten zur Erforschung der Nährstoffmechanismen in Torfmoosen. Hierbei sind vorrangig Studien über den Einfluss von Stickstoff auf das Wachstum und den Stoffwechsel der *Sphagnen* [24, 44, 47, 48, 141, 183–185] zu finden. Der Stickstoff ist neben dem Kohlenstoff der zweitwichtigste Nährstoff für die Entwicklung und das Wachstum von Pflanzen. Er ist ein essenzieller Baustein für die Aminosäuren- und Proteinsynthese, befindet sich sowohl im Chlorophyll, als auch in den Nukleotiden der DNA, RNA, sowie in den Reduktionsäquivalenten. [77]

Stickstoff kommt in drei Formen ( $N_2$ ,  $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$ ) vor, allerdings kann die pflanzliche Zelle meist nur die reduktive Stickstoff-Form als Ammonium-Ion in die organischen Moleküle einbauen. [76] Als gasförmiges  $N_2$  befindet sich Stickstoff zu etwa 78 % in der Atmosphäre, kann jedoch nicht von den Torfmoosen selbst, sondern nur von den in ihren Hyalocyten vorkommenden, symbiotischen Cyanobakterien in  $NH_4^+$  umgesetzt werden [159, 186, 187]. Ungefähr 35 % des in den *Sphagnen* enthaltenen Zellstickstoffs ist auf diese Symbionten zurückzuführen. [188, 189]

Das Nitrat  $NO_3^-$  ist die maximal oxidierte Form des Stickstoffs, welche in der Zelle bis zum Ammonium  $NH_4^+$  reduziert wird. Zunächst erfolgt der aktive Transport des Nitrats als Anion  $NO_3^-$ , über sogenannte Proteintransporter in der Zellwand, in die Zelle. Anschließend wird das Nitrat in dem Cytoplasma durch das Enzym Nitrat-Reduktase (NR) [184, 190] mit einem Molybden-Enzymkomplex mit dem Co-Faktor NAD(P)H und Flavin (FAD/FADH<sub>2</sub>) als Elektrodonatoren zu Nitrit  $NO_2^-$  reduziert (siehe Gleichung (2-2)(2-3)). Die Synthese der Nitrat-Reduktase wird durch die Anwesenheit des Nitrats ausgelöst und durch das Vorhandensein von Ammonium gehemmt. [76] In einem zweiten Schritt, welcher in den Chloroplasten abläuft, wird das Nitrit durch die Nitrit-Reduktase zu Ammonium reduziert. Die benötigten Elektronen hierfür stammen zum Großteil aus der Photosynthese mit Ferredoxin als Elektronendonatoren (siehe Gleichung(2-3)).



Das Endprodukt Ammonium ist für die Pflanzenzelle giftig und wird daher direkt über mehrere enzymatischen Schritte zu Glutamin umgesetzt, wobei ATP verbraucht wird. Das Glutamin wird anschließend aus den Chloroplasten für weitere Metabolismusschritte als Aminosäurendonor abtransportiert. [76, 184] Nimmt die Torfmooszelle direkt das Ammonium-Ion aus der Umgebung auf, wird ein  $H^+$ -Ion durch den Transport über Ionenkanäle in der Zellwand ausgetauscht und verursacht eine Versäuerung der Zell-Umgebung. [76] Das freiliegende Ammonium im Cytoplasma wird durch das Enzym Glutaminsynthetase zu Glutamin und weiter zu Asparagin umgesetzt, um die Akkumulation der toxischen Ammonium-Ionen zu verhindern. [48, 184, 191, 192] Die entstehenden Aminosäuren können in den Vakuolen gespeichert werden und können bei Bedarf in andere Aminosäure umgebaut werden. Eine direkte Veratmung ist aufgrund einer Vergiftung der Zelle mit Ammoniak nicht möglich. [193] Die Kapazität der  $NH_4^+$ -Entgiftung ist durch die Verfügbarkeit der Kohlenstoffsubstrate aus den Kohlenhydratreserven oder  $CO_2$ -Assimilation und ATP beschränkt. [141, 192] Eine exzessive Stickstoffaufnahme kann zur Sättigung des Stickstoffmetabolismus führen, was wiederum eine Reduktion des Wachstums, sowie der Veränderung der Physiologie bewirken kann. [48, 140, 191, 194] Wächst die Torfmoospflanze unter Bedingung eines Stickstoffmangels, so sinkt der Chlorophyllgehalt und die damit verbundene Photosyntheserate rasch ab. [48, 184] Daher ist es wichtig eine optimale Stickstoffversorgung der Moospflanze während der Kultivierung zu gewährleisten, um die maximale Photosyntheserate und so auch die größtmögliche Wachstumsrate zu erreichen. Zusätzlich könnte die Rolle der symbiotischen Bakterien, sowohl bei der Stickstoff-Umwandlung als auch für die  $CO_2$ -Produktion, in der *in-vitro* Kultivierung untersucht werden.

### Eisen

Aus der Literatur ist wenig über Eisenaufnahme der *Sphagnen* berichtet, obwohl Eisen (Fe) zu den essenziellen Spurenelementen der meisten Lebewesen gehört. Eisen ist ein wichtiger Cofaktor, sowie Bestandteil für Komponenten der



Elektronentransportkette in Mitochondrien und in Chloroplasten, wie beispielweise Ferredoxin und Cytochrom. [195] Zusätzlich ist es weiter an biologischen Aktivitäten wie der DNA-Synthese, in der Synthese von Chlorophyll, bei der Reduktion von Nitrat zu Ammonium oder bei der Fixierung des Ammoniaks beteiligt. [196, 197] Obwohl Eisen in der Natur sehr häufig vorkommt, wird die gut wasserlösliche  $\text{Fe}^{2+}$ -Form bei der Anwesenheit von Sauerstoff pH-Wert-unabhängig direkt in die nicht direkt pflanzenverfügbare Form  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert und fällt in Form von  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  aus. Die Präzipitation erfolgt bereits ab einer  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration von  $10^{-18} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . [52] Auf welche Weise die Torfmoose ihren Bedarf an löslichem Eisen  $\text{Fe}^{2+}$  decken, ist laut Literatur nach heutigem Stand noch nicht erforscht. In der allgemeinen Pflanzenphysiologie sind jedoch zwei Strategien bekannt. [195, 198]

In der auf einer Reduktion basierten Strategie wird die Abhängigkeit der Fe-Löslichkeit vom pH-Wert genutzt. Mit sinkendem pH-Wert ist das ausgefallene Eisenhydroxid besser löslich. Die pH-Wert-Absenkung erfolgt über das Ausschleusen von  $\text{H}^+$ -Ionen aus der Zellmembran durch das Enzym ATPase (AHA1, AHA2 und AHA7). Durch die resultierende saure Umgebung wird das feste Eisenhydroxid teilweise wieder gelöst und das freigesetzte  $\text{Fe}^{3+}$  kann mit Hilfe des Enzymes Eisenreduktase an der Zellmembran zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert. [195, 198] Die Transportproteine IRT1 32-35 aus der Gruppe ZIP-Proteine, sind in der Plasmamembran der Wurzelzellen lokalisiert, besitzen hohe Affinität zu Eisen und sind für die Eisenaufnahme zuständig [195]. Gene für diese Proteine wurden unter anderem bei Reis, bei Hefen aber auch bei Menschen gefunden. [199] Das *Sphagnum* Genom in der JGI-(*Joint Genome Institute*)-Bank wurde noch nicht auf solche Gene der IRT1-Proteine untersucht.

Die zweite Strategie basiert auf der Produktion von Eisen-Chelatoren. Chelatoren sind organische Verbindungen, die dank ihrer freien Elektronenpaare über eine koordinative Bindung mit Metall-Ionen ein Komplex bilden können. Dieselbe komplexbildende Funktion haben beispielweise auch Siderophore bei Bakterien, Cyanobakterien und Pflanzen (Gras), welche direkt einen Komplex mit nicht gelöstem Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) bilden. [200] Der gesamte Komplex bindet an spezifische Proteine in der Zellmembran. Anschließend wird der Komplex durch spezifische Transporter aktiv in die Zelle aufgenommen. [198, 200] Andere Pflanzenarten säuern das Umgebungsmilieu an und binden das freiwerdende  $\text{Fe}^{3+}$  mit Eisen-Chelatoren wie Malat und Citrat. Die beiden Letztgenannten werden hierfür zuvor über Anionenkanäle aus der Zellmembran ausgeschieden. An der Zellwand wird das komplexierte Eisen durch das Enzym Eisen-Reduktase mit dem Cofaktor NAD(P)H reduziert und als  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion in die Zelle über  $\text{Fe}^{2+}$ -Transporter aufgenommen. [198]

Ein besseres Verständnis des Aufnahme-Mechanismus sollte dabei helfen, die *in-vitro* kultivierten Torfmoose direkt von Kultivierungsbeginn an mit Eisen zu versorgen, um eine mögliche kinetische Limitierung der Zelle durch die Eisen-Aufnahme, sowie einer Eisen-Limitierung von vorne auszuschließen. Ein Eisenmangel wirkt sich negativ auf die Größe und auf den Proteingehalt der Chloroplasten aus, da diese in ihrer Thylakoidmembran das Eisen für die strukturelle und funktionale Integrität benötigen. Dieser führt zum Absinken der Chlorophyllkonzentration und macht sich durch die Gelbfärbung der Pflanzen bemerkbar (Chlorose). [196] Im Gegensatz dazu kann Eisen bei einem Überangebot intrazellulär als Speicherprotein Ferritin (FER1, FER3 und FER4) im Stroma unterschiedlicher nicht-photosynthetisch aktiver Plastiden gelagert werden. [52, 195, 201]

### Phosphor

Phosphor ist einer der Bestandteil der DNA, der RNA und der Phospholipide. Außerdem befindet sich dieser in den ATP-Molekülen und ist dadurch am Energiehaushalt der Zelle beteiligt. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt über Ionenkanäle in Form von Phosphat  $\text{HPO}_4^{2-}$  und  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . [59, 202] Eine ausreichende Verfügbarkeit von Phosphat scheint bei den Torfmoosen die Bindung von Innovation, sowie deren Biomasseproduktion am stärksten zu begünstigen. Dies gilt, sofern die vorliegende Phosphorkonzentration im Niederschlagwasser unterhalb des Wertes von  $c_P=124 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  liegt [183] und das Wasser keinen limitierenden Faktor darstellt. [203] Bei einem höheren P-Angebot kann allerdings Stickstoff limitierend werden [183, 204] bzw. bei einem Überangebot an Stickstoff schränkt der fehlende Phosphor das Wachstum ein. [205] Daher wird oft das Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor (N:P) in der Pflanze als Schwellenwert für eine Identifizierung einer Nährstofflimitierung bei Pflanzen verwendet. [204] Niedrige N:P-Verhältnisse im Capitulum ( $<10$ ) weisen auf ein stickstofflimitiertes Wachstum hin [205], während ein hohes N:P-Verhältnis ( $>14$ ) auf ein phosphorlimitiertes Wachstum deutet. [205, 206] Für die Biomasseproduktion von *S. magellanicum* zeigte sich beispielweise ein N:P-Verhältnis im

Capitulum von 10 bis 14 g·g<sup>-1</sup> am geeignetsten. Dies wurde über ein N:P-Verhältnis von 4 in der angesetzten Lösung erzielt. [206]

### Calcium

Calcium dient der Stabilisierung der Zellwand- und der Membran [59], sowie der Osmoregulation als Reaktion auf Umweltfaktoren. [76, 196]. Hierfür ist eine strikte zeitliche und räumliche Kontrolle der Calcium-Konzentration im Zytosol der Zelle entscheidend, weswegen der Calcium-Influx und -Eflux sowie die Calcium-Akkumulation überwacht werden müssen. [207] Calcium wird als Kation Ca<sup>2+</sup> eine Reihe verschiedener Calciumkanäle passiv in die Zelle aufgenommen. [59, 202] Eine hohe externe Calcium-Konzentration c(Ca<sup>2+</sup>) führt zu einer Anhäufung der Calcium-Ionen in den Vakuolen der Pflanzen [207]. Gleichzeitig stimuliert eine hohe Calcium-Konzentration die Expression der ATP-abhängigen Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter, die den Ausfluss der Calcium-Ionen nach außen regulieren. [202, 208] Die Kapazität des Calcium-Transports ist pH abhängig. [209]

Laut Literatur sind meisten *Sphagnum* Arten nicht in der Lage, in kalkhaltigem Wasser zu wachsen [31], da sie zu den kalkfeindlichen Spezies gehören [166]. Die Calcium-Konzentration c(Ca<sup>2+</sup>) in Moorgewässern liegt zwischen 0,7 und 6,6 mg·L<sup>-1</sup> [41, 43], was diese Hypothese stützt. Allerdings konnte festgelegt werden, dass die Torfmoose hohe Calcium-Konzentrationen in Kombination mit hohen pH-Werten nicht vertragen, während bei Vorliegen von nur einem der genannten Bedingungen diese vernachlässigbar zu sein scheinen. [40] Beispielweise reduzierte eine c(Ca<sup>2+</sup>) = 2,5 mmol·L<sup>-1</sup> (100 mg·L<sup>-1</sup>) bei einem pH-Wert von 7,5 das Wachstum um 80 %, verglichen mit dem Wachstum bei einem pH-Wert von 3,5. Ebenso wuchsen die Moose ähnlich gut bei dem geringen pH-Wert und bei c(Ca<sup>2+</sup>) im Bereich von 1 bis 100 mg·L<sup>-1</sup>. In der Natur sind die hohen Ca-Konzentrationen mit einem hohen pH-Wert [40] und mit einem erhöhten Anteil an Bicarbonat verbunden. [39] Das Bicarbonat bzw. deren Pufferkapazität scheint der Grund zu sein, weshalb Torfmoose eher calciumintolerant sind. Beispielweise überlebten auch die calciumtoleranten Torfmoos-Spezies (*S. teres*, *S. squarrosum*) in einer Lösung mit Calciumhydrogencarbonat Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> als Ca-Quelle nicht. Demgegenüber zeigten sie ihr höchstes Wachstum bei Vorhandensein CaCl<sub>2</sub> und einem pH-Wert von 5. [38] Die negative Wirkung des Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> auf die Moospflanzen war geringer, wenn die Moose in einer stehenden Lösung anstatt einem fließenden Medium kultiviert wurden. [38] Die toxische Wirkung könnte mit dem Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-Transporter zusammenhängen, welcher einen Transmembran-Protonengradient für einen Ca-Efflux benötigt [209]. In Anwesenheit von Hydrogencarbonat ist der pH-Wert höher, wodurch die H<sup>+</sup>-Verfügbarkeit sinkt. Dies könnte zu einer geringeren Ca<sup>2+</sup>-Abgabe führen, was sich in einer erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Akkumulation in der Zelle widerspiegelt. Ein ähnlicher Trend konnte für *Sphagnen* in Anwesenheit von 2,4 mmol·L<sup>-1</sup> Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> beobachtet werden. [38] Die Torfmoose, welche bei Anwesenheit von Hydrogencarbonat kultiviert wurden, wiesen das doppelte bzw. neunfache des Calcium-Gehalts auf, im Vergleich zu Moosen, welche in 2,4 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> wuchsen. Die erhöhte Calcium-Akkumulation reduzierte die Photosyntheserate der untersuchten *Sphagnen* deutlich.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das Hydrogencarbonat in Zusammenhang mit einer Kalziumtoxizität steht, da das Gleichgewicht der zytolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration aufgrund der Puffereigenschaften des Hydrogencarbonats gestört wird. [38] Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die hohe c(Ca<sup>2+</sup>) von 169 mg·L<sup>-1</sup> im Knop-Medium das Mooswachstum nicht beeinträchtigt, da im Medium ein pH-Wert von 4,0 vorherrscht und als Ca-Quelle Calciumnitrat verwendet wird. [17]

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Kulturmedium

Als Basismedium für die Batch-Experimente kam das bereits für die Torfmooskultivierung etablierte Sphagnum-Medium [17] ohne Zugabe von Saccharose zum Einsatz. Das Medium wurde als Knop-Medium bezeichnet. Das im Moosbettreaktor (MBR) verwendete Kulturmedium wird im Folgenden als MBR-Medium bezeichnet. Die Auflistung der Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 3-1 ersichtlich. Die verwendeten Chemikalien waren von analysenreiner Qualität (p.a.).

Tabelle 3-1: Medienbestandteile des Knop- und des MBR-Mediums. Die Konzentrationen der Medienbestandteile (c) sind in  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  angegeben.

Summenformel	Name	Knop-Medium		MBR-Medium	
		c ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	c ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	c ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	c ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
<b>Makroelemente</b>					
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumhydrogenphosphat	250	1,83	50	0,366
KCl	Kaliumchlorid	250	3,35	50	0,67
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Magnesiumsulfat Heptahydrat	250	1,01	50	0,202
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Calciumnitrat Tetrahydrat	1000	4,23	200	0,846
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Ammoniumnitrat	100	1,25	20	0,25
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Magnesiumnitrat Hexahydrat	-	-	216	1,45
<b>Mikroelemente (ME)</b>					
$\text{H}_3\text{BO}_3$	Borsäure	3,09	0,05	0,618	0,01
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Mangansulfat Monohydrat	8,45	0,05	1,69	0,01
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Eisensulfat Heptahydrat	12,50	0,045	2,5	0,009
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	Zinksulfat Heptahydrat	4,31	0,015	0,862	0,003
KI	Kaliumiodid	0,415	0,0025	0,083	0,0005
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Natriummolybdat Dihydrat	0,121	0,0005	0,0242	0,0001
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Kupfersulfat Pentahydrat	0,0125	0,00005	0,0025	0,00001
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Cobaltnitrat Hexahydrat	0,0146	0,00005	0,00292	0,00001

Die Medienbestandteile wurden in vollentsalztem Wasser (VE) gelöst. Die Einstellung des pH-Wertes von 4,0 im Kulturmedium erfolgte anhand eines pH-Meters (S20 Seven Easy, Mettler Toledo, USA) mit  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Natronlauge (NaOH, Roth) und  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Salzsäure (HCl, VWR Chemicals). Vor Versuchsbeginn wurde alle Medienbestandteile (inklusive  $\text{FeSO}_4$ ) in einem Autoklav (Laboclav ECO, SHP-Steriltechnik AG, Deutschland) bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  für 20 Minuten dicht verschlossen sterilisiert. Das anstatt dem Autoklavieren übliche Sterilfiltrieren der Eisenlösung war nicht notwendig, da *S. palustre* bei der Kultivierung mit diesen beiden Varianten des Knop-Mediums keinen signifikanten Unterschied in den erzielten Endbiomassekonzentrationen aufwies (siehe Anhang, Abbildung 0-1).

## 3.2 Pflanzenmaterial und Stammhaltung

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kamen drei Stämme der Gattung *Sphagnum* zum Einsatz: *S. palustre* Klon 12a (40068<sup>1</sup>), *S. rubellum* Klon 1.1 (40067) und *S. fimbriatum* Klon 1.1 (40069). Die Kultivare stammten aus der Stammhaltung des Instituts für Pflanzenbiotechnologie der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg und wurden in einem flüssigen Sphagnum-Medium in sterilen Behältern mit einem Volumen von 50 mL an das Institut für Bioverfahrenstechnik (BVT) des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) geliefert. Die *Sphagnum*-Moose wurden im Anschluss daran steril in 500 mL Erlenmeyerkolben überführt und mit 250 mL Knop-Medium befüllt. Die Kultivierung fand bei einer Temperatur ( $T_K$ ) von 20 °C, einer Photonenflussdichte (PFD) von 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , einem  $\text{CO}_2$ /Luft-Gasgemisch von 1 % (v/v), mit einer Begasungsrate ( $V_g$ ) von 0,08 vvm (*volume per volume per minute*) bei einer Schüttelfrequenz von 80 rpm (*rotations per minute*) statt. Diese Versuchsbedingungen wurden für die "Stammhaltung" bzw. für die Vorkulturen eingesetzt. Nach 4 Wochen der Stammhaltung wurde das Medium gewechselt. Falls die Moospflanzen bereits aus dem Medium ragten, wurden die Torfmoose manuell mit Hilfe einer Pinzette zerteilt und in zwei neue Kolben mit frischem Knop-Medium gefüllt.

Für diese Arbeit fiel die Wahl auf das Moos *S. palustre*, da es bereits gelungen war, *S. palustre* Klon 12 a erfolgreich submers in Schüttelkolben [17, 19, 23] und in Blasensäule [17, 19] zu kultivieren. Außerdem konnte sich diese Spezies in mehreren Feldversuchen des *Sphagnum farmings* erfolgreich etablieren. [94] Darüber hinaus wurde die Zellzusammensetzung dieses Moooses bereits untersucht [144], was einen ersten Anhaltspunkt für das Nährmediendesign (siehe Kapitel 5) darstellte. Die weiteren Torfmoospezies *S. rubellum* und *S. fimbriatum* wurden für diese Arbeit ausgewählt, da sie in Vorversuchen mit dem Sphagnum Medium in unbegasteten Schüttelkolben bei PFD= 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  kein deutliches Wachstum zeigten [23].

## 3.3 Kultivierungsverfahren

Die submerse Kultivierung der Torfmoose erfolgte in bewegten Erlenmeyerkolben mit 500 mL Volumen, sogenannten Schüttelkolben (siehe Kapitel 3.3.1), in einem 5 L Flüssigkeitsaufbewahrungsbeutel (Flexboy®, Sartorius, Deutschland), auch *Wave bag*-Bioreaktor genannt (siehe Kapitel 3.3.2) und in 25 L und 60 L fassenden Mikroblasen-Airlift-Systemen (Phytobag®, Phytolution GmbH, Deutschland), welche auch Schlauchreaktoren bezeichnet werden (siehe Kapitel 3.3.3). Das emerse Wachstum von Torfmoosen fand in einem 1,5 L Polycarbonat-Gefäß statt, im Weiteren als Moosbettreaktor bezeichnet (siehe Kapitel 3.3.4). Zudem waren Versuche in einem 125 L Plexiglas-Gewächshaus, sogenanntem *Trickle-Bed*-Reaktor (siehe Anhang) geplant.

### 3.3.1 Schüttelkolben

#### 3.3.1.1 Aufbau

Für die Experimente in den Schüttelkolben wurden begaste 500 mL Erlenmeyerkolben (Abbildung 3-1 A) verwendet. Die Erlenmeyerkolben waren mit einem konischen Gummistopfen (Laborstopfen 50-5727, Chemoline®, Deutschland) aus Naturkautschuk luftdicht verschlossen (Abbildung 3-1 B). Zur kontinuierlichen Begasung wurden zwei Öffnungen ( $\varnothing$  6 mm) für das Zugas sowie Abgas in den Verschlussstopfen gestanzt. Für die Zugasleitung wurde ein 18 cm langes Glasröhrchen ( $\varnothing$  7 mm, Wandung: 1 mm, DURAN®, SCHOTT, Deutschland) eingeschoben, dessen Öffnung 1 cm oberhalb des Kolbenbodens endete. An dessen oberen Ende war im Anschluss an einem 3 cm langen Silikonschlauch ( $\varnothing$  9 mm, Wandung: 2 mm, Masterflex, Deutschland) ein gasdurchlässiger Spritzenvorsatzfilter (Minisart SRP25, Sartorius, Deutschland) mit einer Membran aus Polytetrafluorethylen (PTFE, Porendurchmesser: 0,2  $\mu\text{m}$ ) angebracht, um eine Kontamination der Mooskultur über die Zugasleitung zu verhindern. Die zweite Öffnung des Stopfens diente zur Abführung des Abgases aus dem Kultivierungsraum. Dies erfolgte über ein 5 cm langes Glasröhrchen ( $\varnothing$  7 mm, Wandung: 1 mm, DURAN®, SCHOTT,

<sup>1</sup> Nummer des International Moss Stock Center (IMSC)

### 3 Material und Methoden

Deutschland), welches ebenso mit einem Silikonschlauch ( $\varnothing$  9 mm, Wandung: 2 mm, Masterflex, Deutschland) und einem gasdurchlässigen Spritzenvorsatzfilter (Minisart SRP25, Sartorius, Deutschland) mit einer PTFE-Membran (Porendurchmesser: 0,2  $\mu$ m) ausgestattet war. Für die Probeentnahme wurde der Verschlussstopfen mit einer Kanüle (2,10 x 80 mm; Sterican®, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) durchstochen. Am oberen Ende der Kanüle war ein *Safe-flow*-Membranventil (05143299, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) integriert, um eine sterile Entnahme des Kulturmediums zu gewährleisten (Abbildung 3-1 B). An die untere Öffnung der Kanüle wurde ein 5 cm langer Silikonschlauch ( $\varnothing$  2,5 mm, Wandung: 0,4 mm, Masterflex, Deutschland) angebracht, welcher in das Kulturmedium eintauchte. Die Kolbenöffnung, sowie die einzelnen Durchführungen für den Gasaustausch und die Probeentnahme waren aufgrund der Elastizität des Naturkautschuk-Stopfens elastisch abgedichtet.

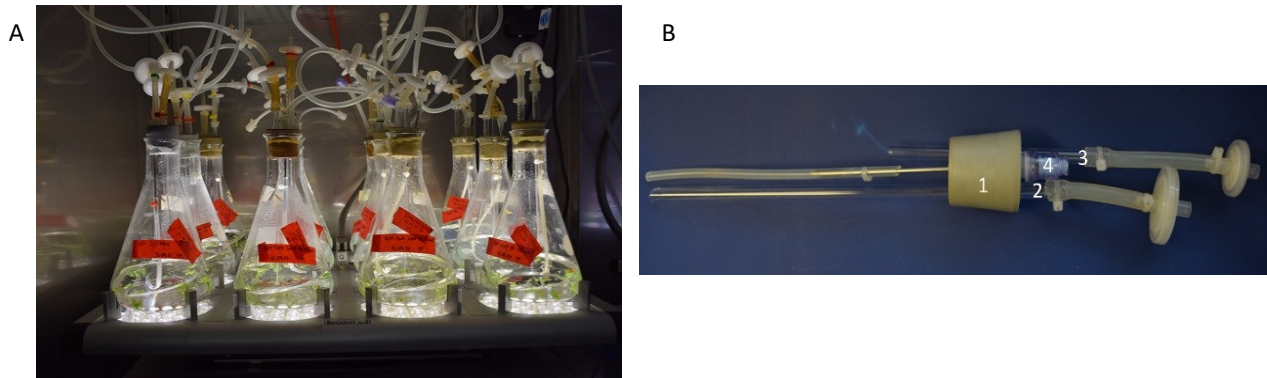


Abbildung 3-1: Kultivierungsaufbau in Schüttelkolben. A) Photographische Darstellung einer Schüttelkolbenkultivierung von *S. palustre* in 500 mL Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler mit einem LEDs-Panel. B) Begasungseinheit zur Torfmooskultivierung in Erlenmeyerkolben mit 1) Verschlussstopfen, 2) Zuluftstrecke und 3) Abluftstrecke mit einem PTFE-Filter, sowie 4) Probenahmeventil.

In Abbildung 3-2 ist schematische der Versuchsaufbau für die Kultivierung in den Schüttelkolben dargestellt.

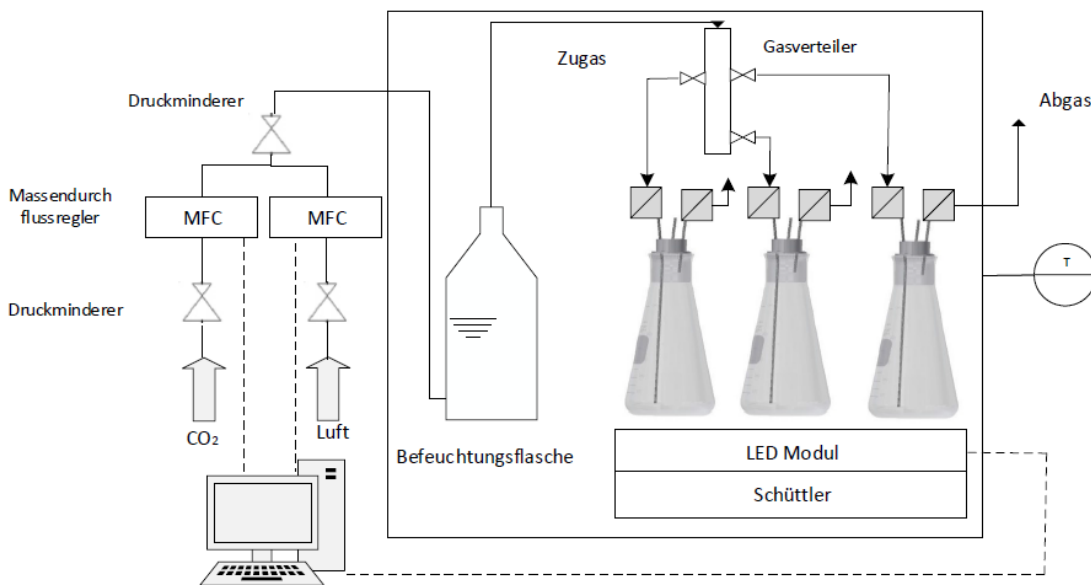


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Kultivierung in Schüttelkolben. Die Abbildung ist exemplarisch für drei Erlenmeyerkolben gezeigt.

Die Kolben wurden mit einem CO<sub>2</sub> angereichertem Gasgemisch begast. Die Einstellung des Gasvolumenstromes erfolgte manuell über einen Massendurchflussregler (MFC; MassFlow 179C, MKS Instruments, USA), und einen *Multi Gas* Regler (647B, MKS, Instruments, USA). Das trockene Gasgemisch strömte ausgehend von der Gasversorgung des Labors zunächst über Druckminderer und Massendurchflussregler, sowie dem Gasmischer mit einem Vordruck von 0,2 bar in eine mit vollentsalztem Wasser befüllte Befeuchtungsflasche. Letztere war nötig, um die Wasserverdunstung aus dem Kulturmedium während der Kultivierung zu minimieren. Anschließend wurde die gesamte Gasmischung durch einen rechteckigen

Edelstahl-Gasverteiler (Eigenentwicklung BVT, KIT) durch 12 Bohrungen mit Schnellschluss-Absperrventilen (Landefeld, Deutschland) über 20 cm lange Silikonschläuche ( $\varnothing$  9 mm, Wandung: 2 mm, Masterflex, Deutschland) und männlichen Luer-Lock-Adapter (Luer-Schlauchverbinder, ROTILABO®, Deutschland) auf die 12 Schüttelkolben verteilt. Das steuerbare LED-Modul (Eigenentwicklung BVT, KIT), bestehend aus jeweils 12 kreisförmig angeordneten kalt-weiße Leuchtdioden (LED; NS6L083BT, Nichia, Japan), beleuchtete die Erlenmeyerkolben von unten. Die Photonenflussdichte wurde über die gemessene Stromstärke für jeden Kolben separat mit der auf Programmiersystem LabView (National Instruments, USA) basierenden Prozessleitsystem BioProCon eingestellt. Die dafür benötigte Kalibrierung der Photonenflussdichte wurde anhand eines planaren Lichtsensors (LI250, LiCor, USA) hinter dem Glasboden eines Erlenmeyerkolbens über eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die kontinuierliche Durchmischung des Kulturmediums erfolgte durch die radiale Bewegung eines Rotationsschüttlers (KS 501 digital, IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland), auf welchem ebenso das Lichtmodul befestigt war. Die Schüttel-Einheit befand sich in einem temperierten Brutschrank (MKKL 120, Flohr Instruments, Niederlande), um eine konstante Kultivierungstemperatur halten zu können. Vor dem Versuchsbeginn wurden die leeren Erlenmeyerkolben ebenso wie das Kulturmedium bei 121 °C, für 20 Minuten autoklaviert.

### 3.3.1.2 Hauptkulturführung

#### Animpfen

Als Inokulum wurde *Sphagnum*-Biomasse aus der Stammhaltung entnommen. Dabei galt es zu beachten, dass die Moose der Vorkultur stets im Medium untergetaucht vorlagen und die Entnahme der Biomasse erst nach frühestens 2 Wochen der Kultivierung erfolgte. Diese Dauer entsprach dem ermittelten Zeitpunkt, bei welchem kein Ammonium mehr im Medium nachgewiesen werden konnte. Zur Überprüfung einer möglichen Ionenlimitierung im Kulturmedium der Stammhaltung wurden jeweils 5 mL Mediumprobe entnommen und mittels Ionenchromatographie (siehe Kapitel 3.4.8) analysiert. Die Überprüfung der Sterilität der Stammhaltung erfolgte mittels Sterilitätstest. Hierfür wurde 1 mL Medium zusammen mit zwei zufällig gewählten Moospflanzen auf Agarplatten (siehe Kapitel 3.4.3) in der Sterilwerkbank (Safe2020, Thermo Scientific, Deutschland) plattiert. Auf die Gewichtsbestimmung der Biomasse des Inokulums wurde aufgrund von wiederholten Kontaminationen der angeimpften Mooskulturen verzichtet. [210] Stattdessen wurden die Torfmoose in der Sterilwerkbank unter Zuhilfenahme einer sterilen Scherre in etwa 2 bis 3 cm lange Moosfragmente zerkleinert. Auf einer zuvor autoklavierten Petrischale (E-2153, neoLAB, Deutschland) mit einem Durchmesser von 15 cm wurde das Inokulum auf 12 etwa gleich große Mengen unterteilt. Der Durchmesser der entstandenen einzelnen Mooshäufchen betrug ungefähr 2 cm. Nach dem Überführen der Torfmoose in mit Medium befüllte Erlenmeyerkolben, wurde der jeweilige Kolbeninhalt von unten durch den Kolbenboden mit einer Kamera (Nikon D5300, Objektiv: Nikon DX AF-S Nikkor 18 - 55 mm, USA) in einem Abstand von 20 cm photographisch erfasst. Die von den Torfmoosen bedeckte Kolbenbodenfläche wurde mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm ImageJ 1.52a (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) nach Möller [211] analysiert und Abweichungen der Start-Torfmoosmenge in jedem Kolben bestimmt. Die Ergebnisse befinden sich im Anhang (siehe Tabelle 0-5).

#### Kultivierung

Ausgangspunkt für jedes Schüttelkolben-Experiment waren die in Tabelle 3-2 zusammengefassten, definierten Standardbedingungen.

Der Wert für die Kultivierungstemperatur von  $T_K=20$  °C stammt aus der Literatur von Beike et al. [17], welche bereits Torfmooskultivierungen in Schüttelkolben durchgeführte. Die Temperierung wurde in einem temperierten Brutschrank aufrechterhalten. Der pH-Wert wurde einmalig vor dem Autoklavieren auf einem Wert von 4,2 eingestellt, um einen Wert von pH=4,0 [17] nach dem Autoklavieren zu erreichen. Während der Kultivierung fand keine pH-Regelung statt. Die Schüttelfrequenz von 80 rpm war an die am BVT-Institut durchgeführten Versuchen zur Kultivierung des Laubmooses *Physcomitrella patens* nach Cerff et al. [101] und die Begasungsrate von  $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $0,08 \text{ vvm}$  ( $\text{L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )) aus der Vorkulturführung von *Chlorella vulgaris* [212] angelehnt. Die eingestrahlte Photonenflussdichte lag bei  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und richtete sich nach dem Wert der Kultivierung von *S. fallax* nach Rudolph [20]. Die Beleuchtung mit kaltweißen LEDs war auf Dauerbetrieb eingestellt. Während der Kultivierung wurden die Schüttelkolben mit einem vorbefeuchten  $\text{CO}_2$ /Luft-

Gemisch mit einem molaren CO<sub>2</sub>-Anteil von 1 % (v/v) begast. Vor jeder Kultivierung wurden die Volumenströme des CO<sub>2</sub> und der Luft nach der Befeuchtungsflasche mit Hilfe eines Durchflussmessers (Gilibrator 250, Sensidyne, USA) überprüft.

Tabelle 3-2: Überblick der Standardbedingungen der Schüttelkolben-Experimente. Links befinden sich die Parameter, die in jedem Experiment gleich gehalten wurden. Rechts sind die Kultivierungsbedingungen aufgelistet, deren Einfluss auf das Wachstum von Torfmoosen untersucht wurde. Abweichungen zu den hier angegebenen Werten der Photonenflussdichte, des molaren CO<sub>2</sub>-Anteils, des Hell/Dunkel-Zyklus und des Mediums werden vor den jeweiligen Schüttelkolbenexperimenten angeführt.

Prozessparameter	Wert	Prozessparameter	Wert
Temperatur	20	CO <sub>2</sub> -Anteil	1 %
Schüttelfrequenz	80 rpm	Medium	Knop
Begasungsrate	20 mL·min <sup>-1</sup> (0,08 vvm)	PFD	100 μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> (Dauerbeleuchtung)
Medienvolumen	250 mL	LED-Beleuchtung	Kaltweiße LEDs
pH-Anfangswert	4,00	Kultivierungsverfahren	Batchprozess

Zur Untersuchung des Wachstum der Torfmoose wurde alle 7 Tage (sofern nicht anders angegeben) mit einer sterilen Einweg-Spritze (Omnifix Luer Lock Solo, B Braun, Deutschland) 5 mL Kulturmedium für eine anschließende Kationen- und Anionenbestimmung mittels Ionenchromatographie (siehe Kapitel 3.4.8) entnommen und der pH-Wert anhand eines pH-Meters bestimmt. Für die Dokumentation des Wachstums der Torfmoose wurden Bilder von der Mooskultur mit einer Kamera von unten in einem Abstand von 20 cm aufgenommen. Nach einer Kultivierungsdauer  $t_p=35$  d (sofern nicht anders angegeben) wurden die Experimente beendet. Die Dauer von 5 Wochen wurden aufgrund von Vorexperimenten gewählt, da hier die Torfmoose optisch noch nicht das kompletten Medienvolumen einnahmen. Zur Überprüfung axenischer Wachstumsbedingungen wurde am Ende der Kultivierung nochmals einen Sterilitätstest durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.3). Zur Bestimmung der Biomassekonzentration am Ende des Versuches ( $c(BTM)$ ), wurde die Trockenmasse der Mooskultur bestimmt (siehe Kapitel 3.4.1).

Als eine repräsentative Torfmoospezies wurde *S. palustre* für die Untersuchung des Moosverhaltens auf die Änderung unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen in den Schüttelkolben gewählt. Die Abweichungen der einzelnen Kultivierungsbedingungen zu der Standardkultivierung (siehe Tabelle 3-2) werden vor jedem Experiment im Ergebnisteil erläutert. Die Ergebnisse der Experimente, in welchen der jeweils veränderte Parameter keinen Einfluss auf das Wachstum der Torfmoose zeigte, befinden sich im Anhang.

### 3.3.2 Wave-Photobioreaktor

#### 3.3.2.1 Aufbau

Ein Scale-up in der Prozessführung der Submerskultur erfolgte in einem am Institut entwickelten *Wave*-Photobioreaktor. Dafür wurde ein 5 L Flüssigkeitsaufbewahrungsbeutel (STD Flexboy® 5L, Sartorius, Deutschland) aus Ethylen-Vinyl-Alkohol (Gasbarriereschicht) und Ethylen-Vinylacetat (mediumberührende Schicht) mit einer Abmessung von 30 x 33 cm verwendet. Um den Reaktor begasen zu können, wurden folgende Veränderungen vorgenommen. Für die Zuluftstrecke (siehe Abbildung 3-3 B-12) wurde anstatt des originalen Eingangsanschlusses ein gasdichter Schlauch (Flexilon®P, Angst+Pfister, Deutschland) in den vorhandenen Schlauch eingeführt und mit Heißkleber (Hotmelt, Pattex, Deutschland) an dem Anschluss dicht verklebt. Am Gasschlauchende, außerhalb des Reaktors, befand sich ein Luer-Lock-Adapter (Luer-Schlauchverbinder, ROTILABO®, Deutschland), welche die Verbindung zwischen dem Reaktor und der Befeuchtungsfläche für die Gaszufuhr ermöglichte (siehe Abbildung 3-3 A-2). Am zweiten Schlauchende wurde ein 15 cm langer poröser Begasungsschlauch (Phytobag, Phytolution GmbH, Deutschland) zur Begasung des Kulturmediums (siehe Abbildung 3-3 B-10) angebracht. Der zweite vorhandene Anschluss (Ausgang) (siehe Abbildung 3-3 B-13) wurde durch eine Schnellverschlusskupplung (PP, NW 6,4 mm, Bürkle, Deutschland) ersetzt, um den Reaktor an die Gasanalytik (Abbildung 3-3 A-4)

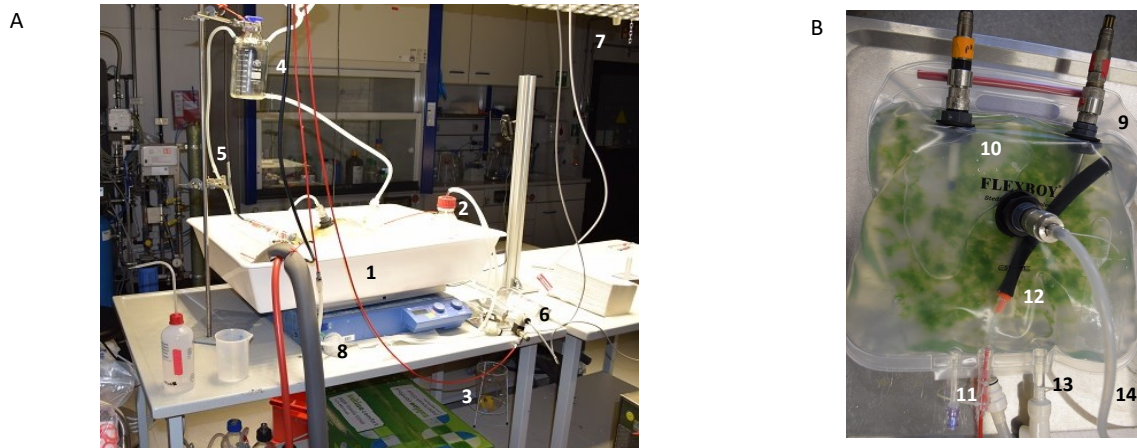


Abbildung 3-3: Wave-Photobioreaktor A) im Betrieb mit Darstellung der zusätzlich benötigten Peripherie: Wave-Photobioreaktor in einer Laborschale mit Kühlplatte auf einem Schüttler [1], Befeuchtungsflasche [2], Abgasschlauch [3], Abgaskondensator [4] mit Kondensatrückführung [5], Sammeltüte für die Abgasanalytik [6], Lichtmodul [7] und Kühlmittelführung [8]. B: Aufbau des Bioreaktors mit Darstellung der Anschlüsse für die  $pO_2$ -Sonde [9], die pH-Sonde [10], das Probenahmeventil [11], den Begasungsanschluss mit porösem Schlauch [12], die Kondensatrückführung [13] und den Anschluss für Abgas [14].

steril anschließen zu können. Der Probenahme-Anschluss (siehe Abbildung 3-3 B-11) verblieb im originalen Zustand. An dessen äußerem Ende wurde ein *Safe-flow*-Membranventil (05143299, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) angebracht. Die Anschlüsse für die pH-Sonde, die  $pO_2$ -Sonde, sowie eine Öffnung zum Animpfen des Reaktors wurden in der Sterilwerkbank am oberen Bereich der Reaktorfolie angebracht (siehe Abbildung 3-3 B), um eine Kontamination des Reaktorinneren zu vermeiden. Die genaue Vorgehensweise zur Integration der Anschlüsse in die Reaktorfolie ist im Anhang näher erläutert.

Der zusammengesetzte Reaktor wurde horizontal in eine 10 L Laborschale (Denios, Deutschland) mit den Abmessungen 52 x 42 x 12 cm (L x B x H) positioniert. Zwischen Laborschale und Reaktor befand sich für die Temperierung ein wassergekühlter Kühlkörper aus Aluminium (FLKU 140, Fischer Elektronik, Deutschland) (siehe Abbildung 3-4). Der Anschluss für die Belüftung des Reaktors wurde über den Luer-Lock-Adapter mit der zuvor autoklavierten und mit 800 mL VE-Wasser

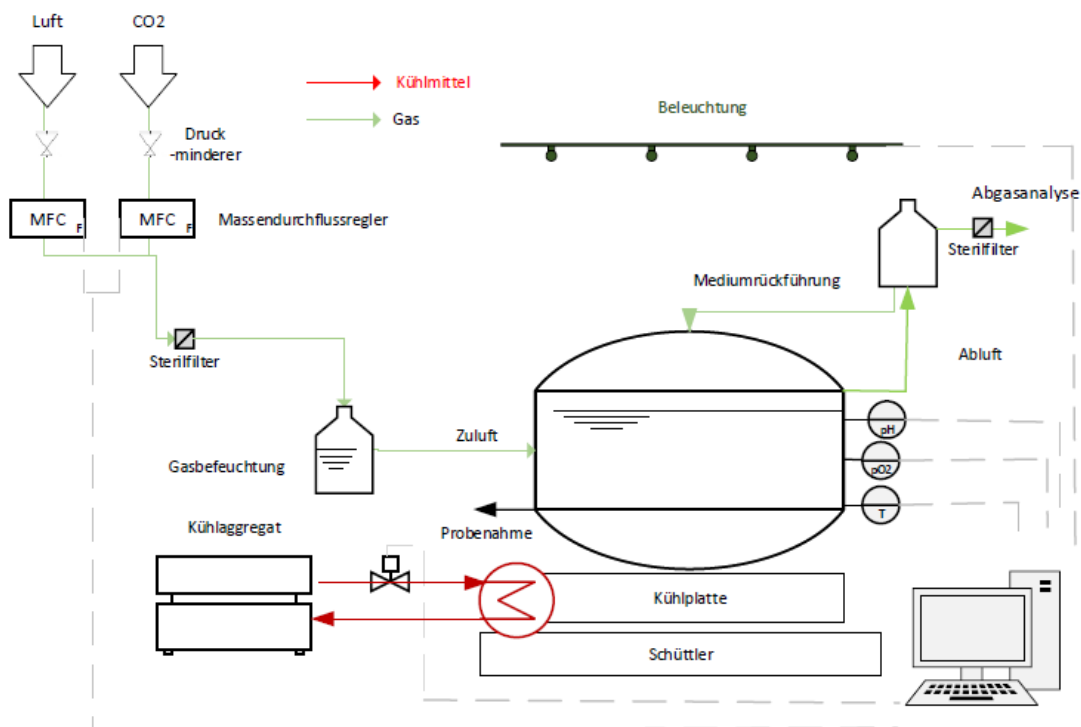


Abbildung 3-4: R&I-Fließschema des Wave-Photobioreaktors. In Grün sind die Gasströme, und in rot der Kühlwasserkreislauf dargestellt.



befüllten Befeuchtungsflasche verbunden. Dies diente dazu, die Medienverluste während der Kultivierung zu minimieren. Vor der Gasbefeuchtung befanden sich zur Volumenstromereinstellung die Massendurchflussregler (MassFlow 179C, MKS Instruments, USA), welche über Druckminderer an der Gasversorgung des Labors angeschlossen waren. Der Vordruck des Gaszustromes wurde anhand der Druckminderer auf 0,2 bar eingestellt, um unzulässigen Überdruck im System zu vermeiden. Um keine Kontamination über die Begasung einzubringen, wurde das zuströmende Gas nach den MFCs und vor der Gasbefeuchtung durch einen Spritzenvorsatzfilter ( $\varnothing$  5 cm; Porengröße:  $d = 0,22 \mu\text{m}$ , Whatman, Vereinigtes Königreich) geleitet. Die Begasung im Reaktor erfolgte mit einem porösen Begasungsschlauch, welcher komplett mit Kulturmedium umgeben war und somit den Gaseintrag in die Flüssigphase erlaubte.

Der Reaktor wurde über eine Schnellverschlusskupplung in der Abgasstrecke an eine zuvor autoklavierte 1 L Sammelflasche angeschlossen, um die mit dem Gas ausgetragene Flüssigkeit über eine Medienrückführung wieder in den Reaktor zu leiten (Abbildung 3-4). Dieses Medium konnte aus der Sammelflasche aufgrund einer Höhendifferenz zum Reaktor über eine Öffnung in der Mitte des Reaktors wieder dorthin (Abbildung 3-3 B-10) zurückfließen. Aus einer dritten Öffnung der Sammelflasche wurde das Abgas über einen Spritzenvorsatzfilter ( $\varnothing$  5 cm; Porengröße:  $d = 0,22 \mu\text{m}$ , Whatman, Vereinigtes Königreich) in den Abgasanalysator (MULTOR 310, Maihak AG, Deutschland) zur Bestimmung der Gaszusammensetzung geleitet. Aufgrund einer geringen Abgasrate von  $V_G < 500 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  wurde das Abgas zuerst in einem gasdichten Beutel (Supel™, Supelco, Pennsylvania, USA) zwischengespeichert. Mit Hilfe der Software BioProCon wurde der Abgasvolumenstrom überwacht und das Füllvolumen des Beutels anhand eines Magnetventils gesteuert. Bei Erreichen eines Volumens von 1000 mL wurde schlussendlich das Abgas an den Gasanalysator zur Messung weitergeleitet.

Die Laborschale, in welcher der Reaktor lag, wurde auf dem Schüttler (KS 501 digital, IKA Werke GmbH, Deutschland) mit zwei 25 cm langen Klettbandstreifen (Dual Lock SJ 3550, 3M, USA) befestigt. Damit erfolgte die Durchmischung des Reaktorinhaltes über eine radiale Bewegung des Schüttlers, welche das Medium in eine wellenförmige Bewegung versetzte. In einem Abstand von 75 cm oberhalb des Reaktors befand sich das zur Beleuchtung eingesetzte Lichtmodul (Eigenentwicklung, BVT, KIT), welches mit 347 kaltweißen LED-Lampen (MASTER LEDspot PAR20, Philips, Niederlande) bestückt war und eine Fläche von  $1,2 \text{ m}^2$  aufwies. Das Emissionsspektrum der LED-Lampen (Abbildung 0-35) war nahezu identisch zu jenem, welches bei den in den Schüttelkolbenversuchen verwendeten LEDs gemessen wurde. Die Reaktorkühlung erfolgte durch den Wärmeaustausch zwischen dem Kulturmedium und dem durch den Aluminium-Kühlkörper fließenden Kühlmittel (Glyantin, BASF, Deutschland). Das hierbei erwärmte Kühlmittel wurde mittels eines Kühlaggregates (Unichiller 015-MPC, huber, Deutschland) wieder auf die Eintrittstemperatur von  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  abgekühlt. Die Temperatur des Kulturmediums wurde anhand eines PI-Reglers PI-Reglers (Deadzone; P-Anteil: 3 %, I-Anteil: 10 min, Wartezeit: 60 s) und der Software BioProCon auf  $T_{\text{soll}} = 20 \text{ }^\circ\text{C}$  geregelt.

#### 3.3.2.2 Prozessführung

Um eine mögliche Einbringung von Kontaminationen während des Reaktorzusammenbaus zu vermeiden, wurde der Kunststoffbeutel vor Kultivierungsbeginn für 2 h mit Hilfe von UV-Strahlern in den Seitenwänden der Sterilwerkbank bestrahlt. Nach der UV-Desinfektion wurden die zuvor autoklavierte pH-Sonde (Polilyte Plus H Arc 120, Hamilton, USA) und  $\text{pO}_2$ -Sonde (Visiform DO120, Hamilton, USA) steril angeschlossen. Anschließend wurde dem Reaktor 3 L des zuvor autoklavierten ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 min) und 1fach konzentrierten Knop-Mediums mit einem pH-Wert von 4,0 über einer Peristaltikpumpe (Ecoline VC-360, Ismatec, Deutschland) steril zugeführt. Das Inokulum wurde mittels einer sterilen Schere in ungefähr 2 - 3 cm lange Moosfragmente zerkleinert, das Gewicht gravimetrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.4.2) und die gewogenen Moose mittels einer zuvor autoklavierten Pinzette durch eines der Gewindeteile in den Reaktor überführt. Anschließend wurde die restliche Peripherie, wie die Befeuchtungsflasche und die Flasche für die Medienrückführung aus dem Abgas steril angeschlossen. Der Reaktor wurde in der Laborschale positioniert und eine Schüttelfrequenz von 40 rpm eingestellt. Dieser Wert wurde so gewählt, damit es zu keiner Überlastung des Schüttlers und einem damit verbundenen Ausfall dessen aufgrund des Reaktorgewichts kommt. Der Reaktor wurde kontinuierlich mit  $\text{CO}_2$  angereicherter Luft (2 %, 0,02 vvm) begast. Die vergleichsweise niedrige Begasungsrate war so gewählt, um eine Abreicherung an  $\text{CO}_2$  mit der eingesetzten Abgasanalytik erfassen zu können. Die Volumenströme der Gaszufuhr wurden mit der Software BioProCon über zuvor kalibrierte Massendurchflussregler eingestellt und geregelt. Außerdem wurde anhand der in BioProCon hinterlegten Kalibriergeraden die Lichtintensität auf  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  eingestellt. Während der Kultivierung

wurde die Kultivierungstemperatur ( $T_K$ ), der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), der Sauerstoffanteil  $x_{O_2}$ , sowie der Kohlenstoffdioxidanteil  $x_{CO_2}$  im Abgas gemessen und über BioProCon erfasst.

Die Kultivierung von *S. palustre* erfolgte im Batch-Verfahren. Das Wachstum der Torfmoose wurde photographisch dreimal wöchentlich dokumentiert. Über das Safe-Flow-Probenahmeventil wurde dreimal wöchentlich eine Medienprobe von 14 mL entnommen und für die Ionenbestimmung (siehe Kapitel 3.4.8) bei  $-18\text{ °C}$  gelagert. Bei der Ernte des Reaktorinhaltes wurde zuerst ein Sterilitätstest (siehe Kapitel 3.4.3) des Kulturmediums durchgeführt. Anschließend fand die Bestimmung der Feuchtmasse der geernteten Torfmoosbiomasse (siehe Kapitel 3.4.2) statt. Die produzierten Torfmoospflanzen wurden anschließend an die Partner des Mooszucht-Projekts versendet und auf deren Versuchsfläche angebaut.

### 3.3.3 Schlauchreaktor

#### 3.3.3.1 Aufbau

Für die submerse Kultivierung wurde ein vertikal ausgerichteter Mikroblasen-Airlift-Reaktor (Phytobag®, Phytolution, Deutschland) verwendet. Die Reaktorgesamtlänge betrug 1,6 m und das Arbeitsvolumen 60 L. Der Reaktor bestand aus 16 doppelagigen, vertikal aufgehängten, gleichgroßen Schläuchen mit einem Durchmesser von 6 cm und einer Höhe von 1,3 m und wurde auf einer Edelstahlkonstruktion befestigt (siehe Abbildung 3-5 A). Die im unteren Bereich horizontal verbundenen Schläuche (siehe Abbildung 3-5 B) wurden von dort über ein 160 cm langes, poröses Begasungsrohr (Phytolution, Deutschland) begast. Hierdurch wurden Turbulenzen in dem Reaktor erzeugt, welche zu einer Durchmischung des Mediums in den Säulen führten. Um Wasserverluste im Reaktorraum zu minimieren, wurde das für die Begasung vorgesehene Gasgemisch, vor dem Reaktoreintritt durch eine mit vollentsalztem Wasser befüllte Befeuchtungseinheit geführt. Vor der Gasbefeuchtung waren die Massendurchflussregler für  $CO_2$  und Luft angebracht, welche die über die Software BioProCon voreingestellten Volumenströme regelten. Genauso wie bei dem Wave-Photobioreaktor waren die MFC an der Gasversorgung des Labors über Druckminderer ( $p=0,2\text{ bar}$ ) angeschlossen. Das Abgas trat aus dem oberen Bereich des Reaktors in die Umgebungsluft aus. In dem vom Begasungsschlauchanschluss gesehenen zweiten Segment wurde auf einer Höhe von 120 cm mittig eine Öffnung mit einer Länge von 3 cm in die Folie geschnitten, um die pH-Sonde in den Reaktor einzuführen. In dem dritten und dem vorletzten Segment des Reaktors wurden zwei Schnitte mit einer Länge von 0,5 cm positioniert, um die Möglichkeit zur Probenahme zu integrieren. Hierfür wurde ein 60 cm langes Kunststoffrohr ( $\varnothing 5\text{ mm}$ , Hobby, Deutschland) durch den Schnitt durchgeführt. Am äußeren Ende des Schlauches befand sich ein Safe-flow-Membranventil (05143299, B. Braun Melsungen AG, Deutschland). Für das Inokulieren des Reaktors wurde zudem in jedes, das Erste ausgenommen, auf einer Höhe von 120 cm mittig eine 3 cm lange Öffnung in die Reaktorfolie geschnitten.

Der Schlauchreaktor wurde einseitig orthogonal mit einem Abstand von 40 cm mit einem Lichtmodul (Eigenentwicklung, BVT, KIT) mit einer Fläche von  $1,8\text{ m}^2$  beleuchtet (siehe Abbildung 3-5). Das Lichtmodul bestand aus 384 kaltweißen LED-Lampen (MASTER LEDspot PAR, Philips, Niederlande), deren Helligkeit manuell über einen PMV-Dimmer (AD8, 16 A INVOLIGHT, Deutschland) eingestellt wurde. Um die Kultivierungstemperatur konstant zu halten, wurde eine Verdunstungskühlung an der Reaktorwand mit Kühlwasserrealisiert. Als Kühlwasser wurde VE-Wasser verwendet, welches sich in einem 10 L Wasserbehälter befand. Daraus wurde es mit einer Zentrifugalpumpe (Model 50, Royal Exclusive®, Deutschland) über einen Plattenwärmeaustauscher, im Gegenstrombetrieb mit Kühlwasser aus dem Kühlkreislauf des Gebäudes ( $T=15\text{ °C}$ ) gekühlt (siehe Abbildung 3-5 C). Das abgekühlte Wasser wurde weiter in ein oberhalb vom Schlauchreaktor positioniertes, 1,4 m langes Kunststoffrohr (Abwasserrohr DIN 4102-B1, Marley, Deutschland) geleitet. Daraus floss das für die Kühlung eingesetzte Wasser aus 14 Löchern mit einem Abstand von 5 cm entlang der Reaktoraußenwand zum unteren Ende des Reaktors (siehe Abbildung 3-5 D). Die Abfuhr der Wärme aus dem Kultivierungsraum erfolgte über die Reaktorwand in das entlangfließende Kühlwasser. Unterhalb des Reaktorbodens war eine leicht geneigte 1,4 m lange Kunststoffrinne (RG 75, Marley, Deutschland) positioniert, in welcher sich das erwärmte Kühlwasser sammelte und wieder in den Kühlwasserbehälter zurückfloss. Bei Kühlbedarf wurde das Kühlwasser automatisiert aus dem Wasserbehälter in den Kühlkreislauf gefördert. Die Fördermenge wurde anhand der von der pH-Sonde (Polilyte Plus H Arc 120, Hamilton, USA) erfassten Temperatur über einen P-Regler mit der Software BioProCon geregelt. Bei Überschreiten des Sollwerts

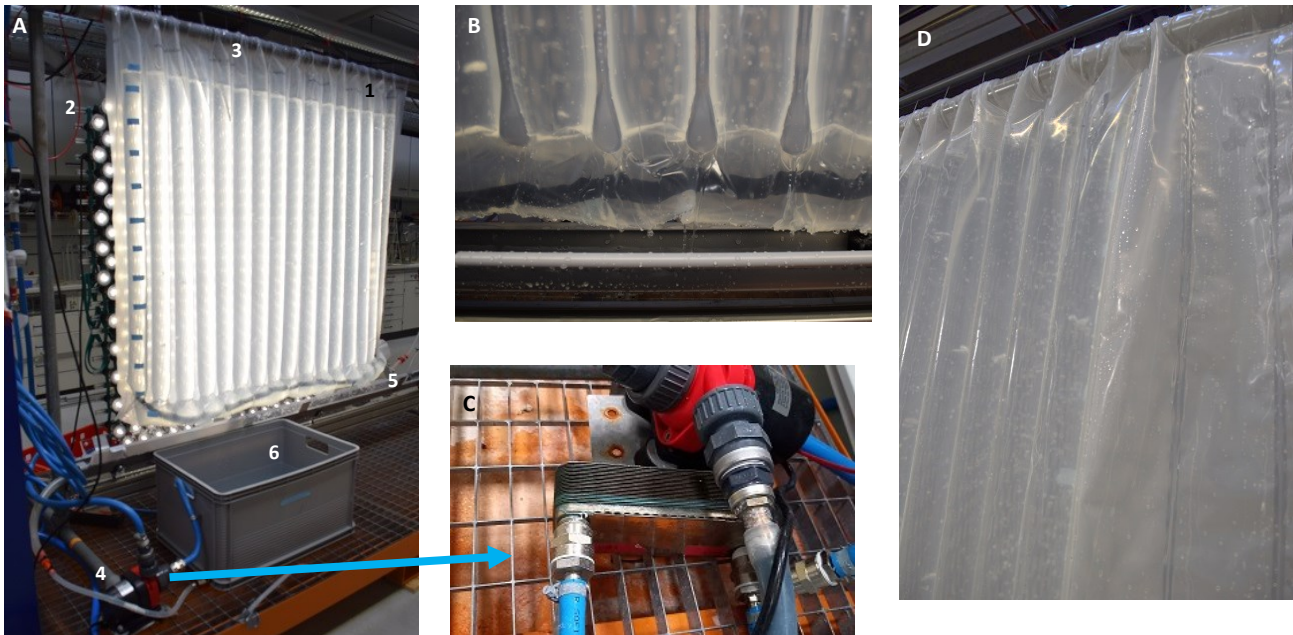


Abbildung 3-5: Schlauchreaktor A) Aufbau des Schlauchreaktors [1] mit Darstellung des Lichtmoduls [2], Kühlwasserverteiler [3], Wärmetauscher mit angeschlossener Zentrifugalpumpe [4, C], Kühlwassersammler [5], Wasserbehälter [6]. B) Detaillierte Ansicht des Reaktorbodens mit verknüpften einzelnen Reaktorsegmenten. C) Ansicht des Wärmetauschers. D) Ansicht des Verdunstungskühlers mit an der Reaktorwand laufendem Wasser.

wurde die Zentrifugalpumpe mit einer Leistung von 14 W jeweils so lange betrieben, bis die Temperatur im Reaktor wieder auf den Sollwert gesunken war. Die schematische Darstellung des Versuchsaufbaus im Schlauchreaktor befindet sich in Anhang.

#### 3.3.3.2 Prozessführung

Nach dem Aufbau des gesamten Kultivierungssystems wurde der Schlauchreaktor mittels einer Peristaltikpumpe (Ecoline Peristaltikpumpe, Ismatec, Deutschland) mit einem 1fach konzentriertem Knop-Medium befüllt. Das Medium wurde zuvor nicht autoklaviert, um die Machbarkeit einer nicht-axenischen Kultivierung zu überprüfen. Der pH-Wert von 4,0 wurde manuell mit 2 M HCl eingestellt und über die gesamte Versuchsdauer mit Hilfe der Software BioProCon aufgezeichnet, aber nicht geregelt. Die Begasung erfolgte mit einer mit CO<sub>2</sub> angereicherten Luft (0,03 vvm mit molarem CO<sub>2</sub>-Anteil  $x_{CO_2}=2\%$ ). Die Einstellung der PFD von 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erfolgte durch einen Dimmer. Dafür wurde an der beleuchteten Reaktorseite mit einem planaren Lichtsensor an 5 Stellen die Photonenflussdichte gemessen und die erforderliche Einstellung am Dimmer ermittelt. Die Temperatur des Kulturmediums wurde auf 20 °C geregelt. Der über die Zeit auftretende Kühlwasserverlust im Wasserbehälter wurde regelmäßig manuell ausgeglichen.

In dem ersten Experiment wurde *S. palustre* in 60 L des Knop-Mediums für 35 Tage kultiviert. Die Vorkultur stammte aus der Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Reski am Institut für Pflanzenbiotechnologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg. Dort wurde auch das Gewicht der feuchten Torfmoosbiomasse ermittelt. Die Moospflanzen wurden in einer Sterilwerkbank in 2 – 3 cm lange Fragmente zerkleinert, gleichmäßig auf 15 sterile Inokulumsbehälter (50 mL, Falcon™, Corning, USA) verteilt und die einzelnen Reaktorsegmente durch Einbringen der Torfmoosfragmente in die Öffnung der Reaktorfolie mit einer Pinzette angeimpft. Der Verlauf des Wachstums der Torfmoose über die Prozesszeit wurde zweimal pro Woche photographisch erfasst. Dafür wurde der gesamte Reaktor mit einer Kamera in einem Abstand von 1,5 fotografiert. Die Probenahme des Kulturmediums für die weitere Ionenanalyse (siehe Kapitel 3.4.7) erfolgte mit Hilfe einer sterilen Einweg-Spritze (10 mL, B Braun, Deutschland) über das *Safe-Flow* Ventil. Hierzu wurden 14 mL des Kulturmediums entnommen und bis zur Durchführung der Analyse bei -18 °C gelagert. Am Ende des Kultivierungsexperiments wurde das Medium über eine vom Hersteller des Reaktors angebrachte Öffnung oberhalb eines Siebes abgelassen, um die kultivierten Torfmoospflanzen aufzufangen. Der morphologische Zustand der geernteten Biomasse wurde

photographisch erfasst. Für die Ausbeutebestimmung wurde die Feuchtmasse (siehe Kapitel 3.4.2) und die Biotrockenmasse (siehe Kapitel 3.4.1) bestimmt.

Das zweite Experiment, welches im 25 L Maßstab durchgeführt wurde, erfolgte das Animpfen und die Prozessführung identisch zu dem Experiment im 60 L Maßstab. Das Kultivierungsende wurde auf 28 Tagen verkürzt, damit die produzierten Torfmoose noch im November auf die Versuchsflächen in Hankhauser Moor<sup>2</sup> ausgebracht werden konnten.

### 3.3.4 Moosbettreaktor

#### 3.3.4.1 Aufbau

Das Gehäuse für den Moosbettreaktor wurde extern von der Glas Schmidt GmbH Diepholz, Deutschland mit einem Volumen von 1,5 L und den Innenmaßen von 10 x 10 x 15 cm (H x B x T) aus hitzebeständigem Polycarbonat (Makrolon® GP clear 099, Bayer AG, Deutschland) angefertigt. Die technische Skizze dazu befindet sich im Anhang (siehe Abbildung 0-20). Die einzelnen Reaktorwände wurden auf Gehrung geschnitten und mit einem firmeneigenen Lösungsmittelkleber verklebt. Die Reaktorwandstärke betrug 1 cm. Um den Reaktordeckel befestigen zu können, wurde eine rechteckige Umrandung mit einer Stärke von 10 mm und einer Breite von 2 cm am oberen Rand der Reaktorwände festgeklebt. In der Deckelhalterung befand sich eine 2 mm breite Nut für einen O-Ring (FKM 80A, Landefeld, Deutschland) zum Abdichten des Deckels. Der Deckel (10 x 120 x 120 mm; H x B x T) war mit Zylinderschrauben (M6, 30 mm, Landefeld, Deutschland), Unterlegscheiben (A2 433-6 ES, Landefeld, Deutschland), sowie Federringen (M6, Landefeld, Deutschland) aus Edelstahl verschraubt. In zwei sich gegenüberliegenden Reaktorwänden befanden sich sechs Öffnungen ( $\varnothing 15$  mm) für Gewindetüllen mit zylindrischem Polypropylen-Gewinde (PP G  $\frac{1}{4}$ "', ESSKA, Deutschland) und Schlauchverschraubung (PP G  $\frac{1}{4}$ "', ESSKA, Deutschland). Diese Gewindetüllen dienten als Anschluss für die Medienzu- bzw. abfuhr. Die Schlauchverschraubungen dienten als Anschlüsse für die Reaktorbegasung (siehe Abbildung 3-6). Die genaue Position der Bohrungen ist im Anhang der Abbildung 0-20 zu entnehmen. Die Deckplatte wurde in zwei Ausführungen angefertigt, einerseits mit einer mittig positionierten Bohrung ( $\varnothing 10$  mm) zum Anschluss von einer Düse und andererseits ohne Bohrung.

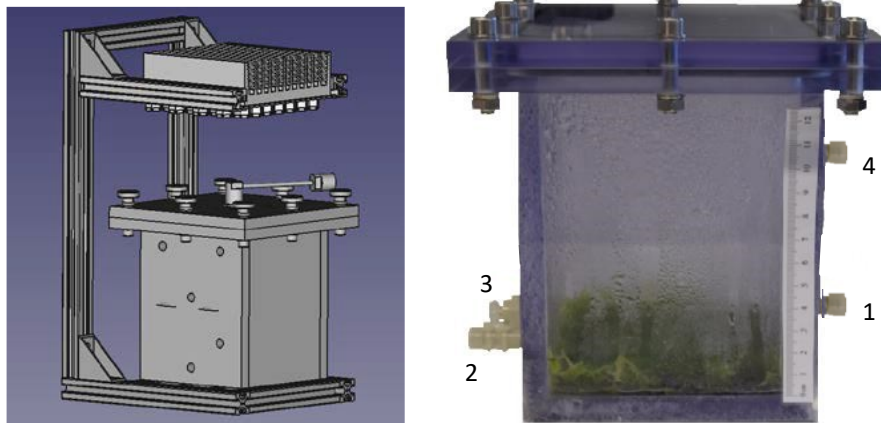


Abbildung 3-6: Moosbettreaktor. Links: Technische Skizze des Moosbettreaktors zusammen mit dem Lichtmodul und der Halterung des Lichtmoduls. Rechts: Zusammengebauter Moosbettreaktor mit Anschlüssen für 1) die Medienzufuhr auf der Höhe von 45 mm, 2) die Medienabfuhr auf der Höhe von 5 mm, 3) die Gaszuführung auf der Höhe von 45 mm und 4) das Abgas auf der Höhe von 115 mm.

Jeder Moosbettreaktor war an einem aus Aluminiumprofilen gefertigten Gestell befestigt, an welchem 10 cm oberhalb des Reaktordeckels ein Lichtmodul (Eigenentwicklung, BVT, KIT) mit einer Abmessung von 10 x 10 cm (siehe Abbildung 0-19) angebracht war. Das Lichtmodul war mit 60 kaltweißen LEDs (NS6L083BT, Nichia, Japan) bestückt und wurde anhand eines regelbaren Netzteils (Eigenentwicklung, 12x24V/1A, BVT, KIT) mit Spannung versorgt. Das Emissionsspektrum war ähnlich dem der Schüttelkolben-Lichtmodule. Der Moosbettreaktor wurde mit Hilfe einer 1 L Laborglasflasche mit Medium befüllt. Über die Oliven-Anschlüsse der Laborflasche wurde ein Pumpenschlauch ( $\varnothing 4,8$  mm, Wandung: 1,6 mm,

<sup>2</sup> Versuchsfläche des Verbundprojekts MOOSzucht und OptiMOOS

### 3 Material und Methoden

Bürkle, Deutschland) am unteren Anschluss der Flasche und ein Silikonschlauch ( $\varnothing$  12 mm, Wandung: 2 mm, Masterflex, Deutschland) am oberen Anschluss befestigt (siehe Abbildung 3-7).

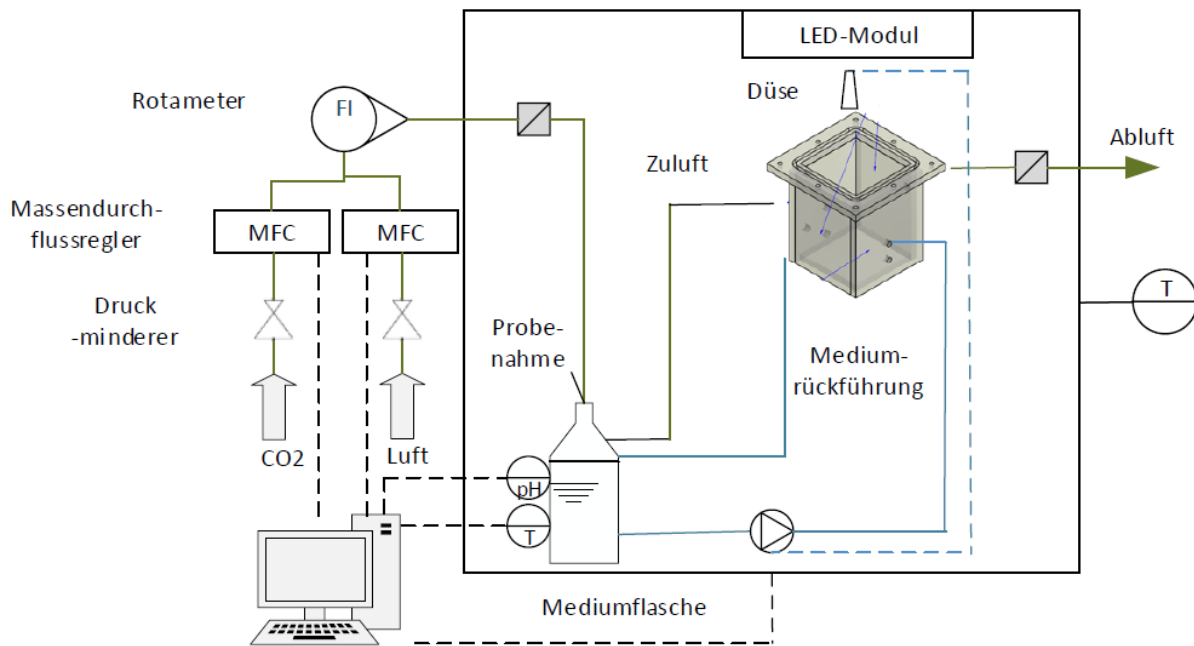


Abbildung 3-7: R&I-Fließschema des Moosbettreaktors. Blau markiert ist die Mediumstrecke, grün der Gasstrom.

Die Medienflasche befand sich während der Kultivierung 45 cm unterhalb des Reaktors, um ein freies Abfließen des Kulturmediums aus dem Reaktor in die Medienflasche zu bewirken. Im Deckel der Medienflasche war eine Öffnung zum Anschluss der pH-Sonde und weitere Anschlüsse für die Gaszufuhr und die Probenahme vorhanden. Der Moosbettreaktor wurde mit einem über Massendurchflussregler (MassFlow 179C, MKS Instruments, USA) eingestelltem Gasgemisch begast. Für die sterile Begasung passierte das Gas vor dem Eintritt in die Medienflasche einen PTFE-Sterilfilter (Minisart SRP-25, Porendurchmesser: 0,2  $\mu$ m, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland) und gelang über einen 15 cm langen Silikonschlauch ( $\varnothing$  9 mm, Wandung: 2 mm, Masterflex, Deutschland) in das Kulturmedium. Daraus strömte das befeuchtete mit CO<sub>2</sub> angereicherte Gasgemisch durch den Flaschendeckel über einen Silikonschlauch ( $\varnothing$  9 mm, Wandung: 2 mm, Masterflex, Deutschland) 45 mm über den Reaktorboden in den Reaktor. Aus letzterem trat das Abgas über eine Schlauchleitung ( $\varnothing$  9 mm, Wandung: 2 mm, Masterflex, Deutschland) mit einem endständigen Sterilfilter (Minisart SRP-25, Porendurchmesser: 0,2  $\mu$ m, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland) aus. Aufgrund der eingeschränkten Anzahl an Steuerungseingänge (Simatic S7, Siemens, Deutschland) konnten nur vier MFCs (jeweils zwei für CO<sub>2</sub> und Luft) über die Software BioProCon geregelt werden. Um sechs Moosbettreaktoren parallel betreiben zu können, wurden jeweils ein Luft-CO<sub>2</sub>-Gasstrom auf drei Schwebekörper-Durchflussmesser (DS10, PKP Prozessmesstechnik, Deutschland) zur manuellen Einstellung des Volumenstroms aufgeteilt. Das austretende Gasgemisch wurde danach für jeden einzelnen Moosbettreaktor durch einen Sterilfilter in dessen Medienflasche geleitet. Um die Glasflaschen vor einer Beschädigung zu schützen, wurde der Vordruck der beiden Gase aus der Gasversorgung des Labors mit Hilfe von Druckminderern auf einem Wert von 0,2 bar begrenzt (siehe Abbildung 3-7).

Während der Kultivierung wurden Daten wie der pH-Wert, die Temperatur im Medium ( $T_m$ ), sowie der CO<sub>2</sub>- und Luft-Volumenstrom mit Hilfe der Prozesssoftware BioProCon aufgezeichnet. Die pH-Wert-Messung erfolgte über eine pH-Sonde (EasyFerm Plus Arc 120 mm, HAMILTON, USA), welche im Verschluss der Medienflasche mit einem Edelstahl-Sondenadapter ( $\varnothing$  20 mm, BioEngineering AG, Deutschland) dicht verschraubt wurde. Die MBR befanden sich in einem Kühlbrutschrank (Rumed 3203, Rubarth Apparate GmbH, Deutschland), um durch die gekühlte Umgebungsluft von außen



temperiert zu werden. Bis zu sechs Reaktoren konnten gleichzeitig zusammen mit ihrer ganzen Peripherie (Pumpen und LED-Einheiten) im Kühlbrutschrank betrieben werden (Abbildung 3-8). Hierbei bediente jeweils eine Peristaltikpumpe, welche um zwei Pumpenköpfe (314D Pumpehead, Watson Marlow, Vereinigtes Königreich) erweitert war, gleichzeitig zwei auf derselben Etage positionierte Moosbettreaktoren.

### 3.3.4.2 Prozessführung

Die Kultivierung der Torfmoose im MBR sollte unter sterilen Bedingungen erfolgen. Dazu wurde der Moosbettreaktor zusammen mit dem angefeuchteten Bewässerungsvlies aus Polypropylen (PP-500, Nira GmbH & Co.KG, Deutschland), der angeschlossenen Medienflasche und der pH-Sonde, für 20 min bei 121 °C mit Stützdruck autoklaviert. Für die Animpfung wurde der Moosbettreaktor in die Sterilwerkbank übertragen, mit ungefähr 6 g an Torfmoosbiomasse (siehe Kapitel 3.4.2) inokuliert und über die Medienflasche mit 800 mL MBR-Medium (Tabelle 3-1) befüllt. Zur Kultivierung wurde der Moosbettreaktor in den temperierten Brutschrank positioniert, wo die Temperatur des Innenraums auf 20 °C geregelt wurde. Die Photonenflussdichte von 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (siehe Tabelle 3-3) wurde über die anliegende Stromstärke in der Beleuchtungseinheit über die BioProCon-Software eingestellt. Die Stromstärke wurde aus der PFD-Kalibriergerade ermittelt. Die hierfür benötigte Photonenflussdichte wurde anhand von dreifach durchgeführten Messungen über den Reaktordeckel auf dem Reaktorboden bestimmt. Der Moosbettreaktor wurde mit einem vorbefeuchteten  $\text{CO}_2$ /Luft-Gemisch mit einem molaren  $\text{CO}_2$ -Anteil von 3 % (v/v) mit einer Begasungsrate von 1,5  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  begast. Somit wurde das Gas im Reaktorraum einmal pro Stunde ausgetauscht. Der pH-Wert des Kulturmediums wurde vor dem Autoklavieren auf pH =4 eingestellt und weiter während der Kultivierung nicht geregelt. Die Zufuhr des Kulturmediums in den Reaktor erfolgte stündlich mithilfe einer Peristaltikpumpe (Peripex W1 Peristaltic Watson Marlow, Bioengineering, Schweiz). Die Frequenz der Medienzufuhr wurde mittels eines PI-Reglers gesteuert. Hierbei wurde der Regler so eingestellt, dass das Medium jede Stunde bei einer Drehzahl von 30 rpm ( $87\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) für 8,75 Minuten durch den Reaktor gepumpt wurde, was einer vollständigen Medienumwälzung entspricht. Die Probenahme des Kulturmediums erfolgte dreimal pro Woche. Durch das Safe-Flow-Probenahmeventil wurde jeweils 14 mL des Mediums entnommen und für die spätere Ionanalytik (siehe Kapitel 3.4.8) bei -18 °C gelagert. Das Kulturmedium wurde wöchentlich in einer Sterilwerkbank gewechselt. Vor dem Medienwechsel (MW) wurde die gebildete Wuchshöhe des Moosteppichs anhand des am rechten Rand des Moosbettreaktors positionierten Maßstabs an fünf verschiedenen Stellen mit einem Abstand von 2 cm abgelesen. Der aus diesen Daten berechnete Mittelwert ( $n=5$ ) stellte die mittlere Wuchshöhe des Moosteppichs ( $h_x$ ) dar. Zusätzlich dazu wurde die Mooskultur durch den Reaktordeckel photographisch erfasst. Die Kultivierungsdauer war identisch mit jender bei den Schüttelkolbenexperimenten und betrug  $t_p=35$  d. Am Ende der Kultivierung wurde die Feuchtmasse der Torfmoose (siehe Kapitel 3.4.2) bestimmt.



Abbildung 3-8: Kultivierung von *S. palustre* in sechs parallel betriebenen Moosbettreaktoren im temperierten Brutschrank.

Tabelle 3-3: Überblick der Prozessparameter der Kultivierung von *S. palustre* im Moosbettreaktor

Prozessparameter	Wert	Prozessparameter	Wert
Temperatur	20 °C	$\text{CO}_2$ -Anteil	1 %
Medium	MBR-Medium: 0,2 Knop + $0,216\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Mg}(\text{NO}_3)_2\text{ H}_2\text{O}$	Begasungsrate	25 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Medienvolumen	800 mL	PFD	200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
Medienwechsel	Alle 7 Tage	Tag/Nacht-Zyklen	Dauerbeleuchtung
pH-Wert	4		

## 3.4 Analytische Methoden

Für die Analytik wurden analysenreine Chemikalien (p.a.) und Reinstwasser (Widerstand 16 M $\Omega$ ; Maxima, ELGA LabWater, Deutschland) verwendet. Das entnommene Medium, sowie die Torfmoosbiomasse wurde bis zur Durchführung der entsprechenden Analysen bei -20 °C gelagert.

### 3.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die in den Schüttelkolben und dem Schlauchreaktor produzierten Torfmoose wurden in Aluminiumschälchen in einem Trockenschrank (UL 80, Memmert, Deutschland) bei 80 °C für 24 Stunden getrocknet. Nach einer 30-minütiger Abkühlphase der Biomasse im Exsikkator erfolgte die Bestimmung des Trockengewichts der Biomasse auf einer Analysenwaage (ABJ 320-4, Kern & Sohn GmbH, Deutschland).

### 3.4.2 Bestimmung der Feuchtmasse

Die Feuchtmasse des Inokulums für die Experimente im Moosbettreaktor, im *wave*-Photobioreaktor und im Schlauchreaktor wurde gravimetrisch bestimmt. Hierfür wurde die Vorkultur manuell mit einer Schere in ungefähr 2 - 3 cm große Moosfragmente in einer Sterilwerkbank zerteilt und in einen Absaugfiltereinsatz (Steritop™ Filter Unit, Merck Milipore, USA) ausgestattet mit einer 0,22  $\mu$ m Millipore Express Plus (PES)-Membran, überführt. Der Deckel wurde zusätzlich mit Parafilm (Parafilm M, Bemis, USA) abgedichtet. Anschließend wurde der Absaugfiltereinsatz an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und 1 Minute bei einem Unterdruck von 0,1 bar das Medium den Torfmoospflanzen entzogen. Der Unterdruck wurde mittels einem an der Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Manometer (MS-11 5100, Wika, Deutschland) überprüft. Nach der Filtration wurde das Gewicht der Feuchtmasse einer Analysenwaage bestimmt und die Biomasse steril in die Reaktorsysteme überführt.

Das Gewicht der im Moosbettreaktor produzierten Torfmoose wurde gravimetrisch bestimmt. Dazu wurden die Torfmoose, ohne diese zu zerdrücken aus dem Moosbettreaktor entnommen. Dabei tropfte das Medium (sog. Tropfwasser) von den Pflanzen ab. Dieses Gewicht ist als Abtropfgewicht bekannt, wurde jedoch wegen des zu hohen Wassergehaltes und der damit verbundenen hohen Gewichtsschwankungen nicht gravimetrisch ermittelt. Als wichtigere Messgröße erwies sich das Pressgewicht [43, 175], welches nach dem Abpressen des zwischen den Pflanzenteilen eingeschlossenen Kulturmediums der nicht mehr tropfenden Torfmoospflanzen gravimetrisch bestimmt wurde. Dafür wurden die feuchten *Sphagnum*-Pflanzen auf einem Rundfilter (Porendurchmesser 1,6  $\mu$ m; Typ 14a, Carl Roth®, Deutschland) aus Cellulose in einem Büchnertrichter (127C-4, Haldenwanger™, Deutschland) bei einem durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugten Unterdruck für 20 Minuten filtriert. Die benötigte Filtrationszeit, bis keine Flüssigkeit mehr aus der Torfmoosbiomasse abtropfte, wurde empirisch (siehe Abbildung 0-18) ermittelt. Zwischen den Pflanzenteilen war immer noch Haftwasser vorhanden und konnte unter den gegebenen Bedingungen nicht mehr abfiltriert werden. In den feuchten Zustand wurden die Moose auf einer Analysenwaage gewogen. Das gemessene Gewicht stellte die sogenannte Feuchtmasse der Torfmoose am Kultivierungsende (FM) dar.

### 3.4.3 Sterilitätstest

Das Medium der Vorkultur, das Kulturmedium, sowie eine Stichprobe der produzierten Torfmoose wurde auf Kontamination (Pilze und Bakterien) untersucht. Hierzu wurden spezielle Medien für den Sterilitätstest verwendet. Diesen Medien waren das Lysogeny Broth Medium (LB-Medium), das Tryptic Soy Agar Medium (TSA-Medium) und das BD Sabourad Glucose Agar Medium (BD-Medium). Die genauen Zusammensetzungen der Medien und die dazugehörigen Konzentrationen sind in Tabelle 0-2 beschrieben. Auf die Agarplatten wurde jeweils 0,5 mL Medium und ein bis zwei Torfmoospflanzen aufgebracht und zwei Wochen lang in einem Trockenschrank bei 37 °C inkubiert.

### 3.4.4 Zellaufschluss

Vor dem Zellaufschluss der Torfmoose trockneten die Proben für 72 Stunden in einem Gefriertrockner (Alpha 1-2 LS plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Deutschland). Anschließend wurde die gefriergetrocknete Biomasse mit einer Kugelmühle (MM40, Retsch, Deutschland) am Institut für Hochleistungsimpuls- und Mikrowellentechnik (KIT, Deutschland) aufgeschlossen. Der Mahlvorgang erfolgte in zwei Mahlbechern ( $V = 50 \text{ mL}$ ) mit jeweils 9 Edelstahlkugeln ( $\varnothing 1,2 \text{ cm}$ ) bei einer Schüttelfrequenz von 3500 rpm, einer Dauer von 15 s und wurde fünfmal wiederholt. Zwischen jedem Mahlvorgang folgte zur Abkühlung der Probe eine Pause von einer Minute.

### 3.4.5 Lichtmikroskopie und Binokular

Zur mikroskopischen Untersuchung der Morphologie der Torfmoose wurde manuell ein Blatt der Seitenästchen und des Capitulum der Torfmoospflanze entnommen, auf einen Glasträger überführt und mit einem Lichtmikroskop (Axio Scope.A1, Zeiss, Deutschland) bei 40-facher Vergrößerung mit einem Differentialinterferenzkontrast (DIC) mikroskopiert. Der verwendete Differentialinterferenzkontrast (DIC) verbesserte die Strukturauflösung in den einzelnen Zellen. Die makroskopische Untersuchung der intakten Pflanzenteile erfolgte mittels eines Binokulars (Leica M420, Leica, Deutschland) am Institut für Molekulare Zellbiologie der Pflanzen (KIT, Deutschland).

### 3.4.6 Bestimmung des Kohlenstoff-, Stickstoff- und Magnesiumgehalts der Torfmoospflanzen

Die Analyse des Kohlenstoff- und Stickstoffgehalts in den aufgeschlossenen Torfmoosproben (siehe Kapitel 3.4.4) erfolgte in einer Dreifachbestimmung mit einem N/C-Analyzer (NA 1500, Carlo Erba, Italien) in Geomar Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung (Kiel, Deutschland). Der Magnesiumgehalt wurde ebenso dreifach mit Hilfe der optischen Emissionsspektroskopie (ICP-OES; iCAP 7600 DUO, Thermo-Fisher-Scientific, USA) am Institut für Angewandte Materialien (KIT, Deutschland) bestimmt.

### 3.4.7 Bestimmung des spezifischen Pigmentgehalts der Biomasse

Der Gehalt an Chlorophyll *a* (Chl *a*), Chlorophyll *b* (Chl *b*) und der Carotinoide (Car) wurde photometrisch nach der Methode von Zhu [149] in Triplikaten bestimmt. Hierfür wurden 5 mg an aufgeschlossener Biomasse und 1,5 mL einer Lösung von Aceton und Reinstwasser (80:20 v/v, VWR Chemicals) in ein 2 mL *SafeLock*-Eppendorf-Gefäß eingebracht. Zur Resuspendierung der Biomasse wurde das Eppendorf-Gefäß kurz gevortext und im Anschluss daran 20 °C und einer Drehzahl von 5500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Rotina 420R, Hettich, Deutschland). Der Überstand wurde im Verhältnis von 1:2 mit Reinstwasser verdünnt, in eine 1,5 mL acetonbeständige Küvette überführt und die Absorption (*A*) der Lösung bei 470, 647, 663 und 750 nm mit Hilfe eines UV-VIS-Spektrometers (Lambda 35, PerkinElmer Instruments, USA) gemessen. Als Blindprobe wurde die Aceton-Reinstwasser-Lösung (80:20 v/v) verwendet.

Die Masse *m* (mg) von Chl *a*, Chl *b* und Car wurde auf Basis der empirischen Gleichungen (3-1- (3-3) berechnet. Der resultierende Pigmentgehalt ( $q_{\text{pig},x}$ ) ergab sich aus der ermittelten Chlorophyllmasse bezogen auf die eingewogene Probe.

$$m_{\text{Chl } a} = 12,25 \cdot A_{663} - 2,79 \cdot A_{647} \quad (3-1)$$

$$m_{\text{Chl } b} = 21,50 \cdot A_{647} - 2,79 \cdot A_{663} \quad (3-2)$$

$$m_{\text{Car}} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot m_{\text{Chl } a} - 85,02 \cdot m_{\text{Chl } b}}{198} \quad (3-3)$$



#### 3.4.8 Bestimmung der ionischen Komponenten im Medium mittels Ionenchromatographie

Vor der Nährstoffmessung wurden alle Proben mit einem Spritzenfilter aus Cellulose (0,45 µm, Rotalibo, Carl Roth®, Deutschland) filtriert. Die Konzentration an Kationen und Anionen im Medium wurde mit einem Ionenchromatographen (822 Compact IC plus, Metrohm, Schweiz) bestimmt. Aufgrund des geringeren Medienvolumens bei den Schüttelkolbenversuchen wurden die Medienproben nur einfach analysiert, die Moosbettektorproben über eine Dreifachbestimmung. Für die Anionenmessung ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) wurde eine Anionensäule (Metrosep A Supp 5 150/4, Metrohm, Schweiz) und einer Schutzsäule (A Supp 4/5 Guard 4.0, Metrohm, Schweiz) eingesetzt. Der Anioneneluent war in wassergelöstes  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $3,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NaHCO}_3$  ( $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und 12,5 % (v/v) Acetonitril. Zur Bestimmung der Kationenkonzentration ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) kam eine Kationensäule (Metrosep C4 150 / 4.0, Metrohm, Schweiz) und eine Schutzsäule (Metrosep C4 S-Guard-Säule, Metrohm, Schweiz) zum Einsatz. Der Kationeneluent setzte sich aus  $1,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ HNO}_3$  und  $0,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} 2,6\text{-Pyridindicarbonsäure}$  zusammen. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt.

Die filtrierten Medienproben wurden im Verhältnis 1:10 (Knop-Medium) oder 1:3 (MBR-Medium) maschinell mit Hilfe einer Autosample-Einheit (885 Professional Sample Processor, Metrohm, Schweiz) verdünnt, über eine *Stopped-Flow*-Dialyseeinheit (Metrohm, Schweiz) automatisch weitergeleitet und in die Säule injiziert. Der Eluentenfluss entsprach  $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Zur Erfassung der ionischen Komponenten in den Medienproben diente ein Leitfähigkeitsdetektor (896 Professional Detector, Metrohm, Schweiz). Der Ionenchromatograph, sowie die Probenvorbereitung und Automation wurde mit Hilfe der MagIC Net Software (Version 2.3, Metrohm, Schweiz) gesteuert und die Daten weiter verarbeitet. Die Zusammensetzung der für die Kalibrierung verwendeten Standards sind im Anhang der Tabelle 0-3 und Tabelle 0-4 zu entnehmen.

#### 3.4.9 Bestimmung der Eisenkonzentration

Die Bestimmung der Eisenkonzentration in den wässrigen Kulturmedienproben erfolgte anhand der optischen Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES ; Vista-PRO CCD Simultaneous ICP-OES, Varian, Niederlande) am Institut für Wasserchemie (KIT, Deutschland). Hierfür wurden wöchentlich 10 mL Flüssigprobe aus den Schüttelkolben entnommen und durch einen Cellulose-Spritzenvorsatzfilter filtriert. Die Analyse erfolgte über eine Dreifachbestimmung.

#### 3.4.10 Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffes (DOC)

Die Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffes im Moorwasser des Hankhauser Moors<sup>3</sup>, sowie dem Nährmedium während der Kultivierung in Schüttelkolben erfolgte nach der Verbrennungsmethode mit Hilfe eines TOC-Geräts (Total Organic Carbon; Shimadzu TOC-L, Japan) am Engler-Bunte-Institut|Wasserchemie und Wassertechnologie (KIT, Deutschland). Das untersuchte Probenvolumen betrug jeweils 12 mL. Die Proben wurden vor der Analyse mit einem Cellulose-Filter filtriert. Durch die Kopplung einer Größenausschluss-Chromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) mit der DOC-Bestimmung nach Hubber et al. [213] wurde zudem die Zusammensetzung der organischen Materie im Moorwasser und den analysierten Medium bestimmt.

#### 3.4.11 Ermittlung des Emissionsspektrums

Das Emissionsspektrum der Lichtmodule wurde für alle Kultivierungssysteme mit einem Spektrometer (Avaspec ULS2048x64-EVO, Avantes, Niederlande) in dreifacher Bestimmung in einem Abstand von 10 cm aufgenommen. Als Ergebnis wurde der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung dokumentiert.

---

<sup>3</sup> Versuchsfläche des Verbundprojekts MOOSzucht und OptiMOOS

## 3.5 Berechnungen

### 3.5.1 Signifikanzberechnung

Die Biomasseerträge aus den Schüttelkolbenexperimenten, sowie der Moosbettreaktorkultivierung wurden über eine one-way Anova und einen Tukey B-Test in OriginPro® (Version 2019, OriginLab Corporation, USA) auf die Signifikanz geprüft. Mit einem Signifikanzniveau von 5 % ( $p < 0,05$ ) galt der Unterschied zwischen ermitteltem Biomasseertrag und Kontrolle als signifikant.

### 3.5.2 Produktivität

Für die Beurteilung des Wachstums der Torfmoose in der Natur werden Kerngrößen, wie die flächenbezogene jährliche Biomasseproduktivität oder Biomasseausbeute in  $t \text{ BTM} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{yr}^{-1}$  oder in  $\text{g BTM} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{yr}^{-1}$  [12, 87, 93, 145], in der Biologie auch biologischer Ertrag genannt [76], und im Weiteren der Längenzuwachs in  $\text{cm} \cdot \text{yr}^{-1}$  [93], die Kompaktheit (Biotrockenmasse pro Mooslänge) in  $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-1}$  [93], sowie die durchschnittliche *Sphagnum* Biotrockenmasse in  $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$  [6] verwendet. Im Rahmen der Kultivierung im Moosbettreaktor wurde als Messgröße die flächenbezogene herangezogen und diese als Flächenproduktivität  $P_{A,x}$  in  $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$  bezeichnet, wie in der Verfahrenstechnik üblich. Die Feuchtmasse (FM) der produzierten Torfmoosbiomasse wurde hierbei durch die Reaktorgrundfläche ( $A_R$ ) und die Kultivierungsdauer  $t_p$  geteilt. [123] Der Längenzuwachs wurde in  $\text{cm} \cdot \text{wk}^{-1}$  aus der Wuchshöhe  $h_x$  und Kultivierungsdauer  $t_p$  berechnet.

Die Ausmaße des Wachstums in den submersen Bioreaktorkulturen wird als Multiplikationsfaktor (Biomasse am Ende bezogen auf Anfangsbiomasse) bzw. relativer Zuwachs [17] angegeben, welcher in der Biotechnologie für die Beschreibung eines exponentiellen Wachstums ohne Limitierung verwendet wird. [118] Dabei bleibt das Verhältnis von End- und Anfangsbiomasse über die Kultivierungsdauer konstant. Das ist aber oft nicht der Fall, da sich beispielsweise die lag-Phase als Adaptierungsphase negativ auf die gesamte Wachstumsbilanz auswirkt. Da bei der Torfmooskultivierung, so wie bei anderen photoautotrophen Kultivierungen, ab einem bestimmten Zeitpunkt aufgrund einer Lichtlimitierung das exponentielle Wachstum in ein lineares Wachstum [118, 212] übergeht, stellt der Multiplikationsfaktor keinen guten Indikator für die Produktivität dar. Dies ist vor allem der Fall, da keine Messmethode zur Biomassebestimmung existiert und somit keine Erkennung der einzelnen Wachstumsphasen möglich ist. Deswegen wurde der Parameter Raum-Zeit-Ausbeute (hergestellte Produktmenge pro Zeiteinheit in dem verfügbaren Produktionsvolumen) [110], auch volumetrische Produktivität genannt  $P_{v,x}$  in  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  [111] verwendet. Dabei wurde die End-Biotrockenmasse (BTM) auf das Medienvolumen ( $V_M$ ) und die Kultivierungsdauer ( $t_p$ ) bezogen. Aufgrund großer Abweichungen in der Inokulum-Start-Menge wurde auf die Bestimmung der Biomasseausbeute (Biomasse am Ende subtrahiert mit der Anfangsbiomasse) in  $\text{g}$  [19] verzichtet und die Ergebnisse der Submerskultivierung in Form einer Endbiomassekonzentration in  $c(\text{BTM})$  in  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  angegeben.

### 3.5.3 Medien-Design

Für das Medium-Design wurden von den Bestandteilen des Knop-Mediums (siehe Tabelle 3-1) ausgegangen. Ziel hierbei war es, den Bedarf an den einzelnen Elementen in der Biomasse  $c_e$  (3-4) optimal über das Medium bereitzustellen. Der für die Berechnung benötigte spezifische Gehalt der Elemente in der Biomasse  $e_{e,x}$  ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) wurde über die Elementaranalyse des Torfmooses *S. palustre* Klon 12a (Probe: EDTA-100) [144] ermittelt. Der in dieser Aufstellung fehlende Stickstoffgehalt wurde aus der Veröffentlichung von Temmnik et al. [145] übernommen. Die zu erreichende End-Biomassekonzentration sollte  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  betragen, was einem durchschnittlichen Wert einer Standardkultivierung zum jetzigen Zeitpunkt widerspiegelt. Aus der Formel (3-4) ergab sich der theoretische Bedarf der einzelnen Elemente  $c_e$  ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) für die erwartete Biomassekonzentration von  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Aus dem Verhältnis der molekularen Gewichte des Elementes und des dazugehörigen Salzes  $e_{e,\text{salz}}$  ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) (3-5) konnte die benötigte Salzkonzentration (3-6) in dem neuen Medium ermittelt werden. Die Salzart entsprach jener im Knop-Medium. Die einzige Ausnahme stellte das Element Calcium dar, bei welchem anstatt mit  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$  die Salzlösung mit  $\text{CaCl}_2$  angesetzt wurde.

$$c_e = c_X \cdot e_{e,X} \quad (3-4)$$

$$e_{e,Salz} = \frac{M_e}{M_{Salz}} \quad (3-5)$$

$$c_{Salz} = c_e \cdot e_{e,Salz} \quad (3-6)$$

### 3.5.4 Volumetrische Kohlenstoffdioxidaufnahmerate (CUR) und Sauerstoffproduktionsrate (OPR)

Die volumetrische Kohlenstoffdioxidaufnahmerate, sowie die Sauerstoffproduktionsrate im *Wave*-Photobioreaktor wurde über die Bilanzierung der eingehenden ( $\dot{f}_{Zugas}$ ) und ausgehenden Stoffmengenströme um den Reaktorraum anhand der Gleichung (3-7) und (3-8) nach Posten et al. [111] für jeden Messzeitpunkt ermittelt. Die Berechnung des Stoffmengenstromes aus dem Volumenstrom erfolgte unter der Annahme, dass sich die Zuluft als ideales Gas verhält, deshalb konnten die aus den von BioProCon ermittelten eingehenden Volumenströme für CO<sub>2</sub>,  $\dot{V}_{CO_2,in}$  und Zuluft  $\dot{V}_{Zuluft}$  mit dem molaren Volumen  $V_m = 22,4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  umgerechnet werden. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Zugas  $y_{CO_2,in}$  wurde vor der Kultivierung mit dem Maihak-Gasanalysator gemessen. Die Zusammensetzung des Abgases ( $y_{CO_2,out}$ ,  $y_{O_2,out}$ ) wurde aus den in BioProCon ermittelten Daten, gemessen mit dem Maihak-Gasanalysator, entnommen. Das Mediovolumen  $V_{Med}$  entsprach 3 L.

$$CUR = \frac{\dot{f}_{Zugas}}{V_M \cdot V_{Med}} \cdot \left( y_{CO_2,in} - \frac{y_{CO_2,out} \cdot (1 - y_{CO_2,in} - y_{O_2,in})}{(1 - y_{CO_2,out} - y_{O_2,out})} \right) \quad \text{in mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad (3-7)$$

$$OPR = \frac{\dot{f}_{Zugas}}{V_M \cdot V_{Med}} \cdot \left( \frac{y_{O_2,out} \cdot (1 - y_{CO_2,in} - y_{O_2,in})}{(1 - y_{CO_2,out} - y_{O_2,out})} - y_{O_2,in} \right) \quad \text{in mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \quad (3-8)$$

### 3.5.5 Nährstoffaufnahme

Zur quantitativen Beschreibung der absoluten Ionenaufnahme der im Moosbettreaktor gewachsenen Torfmoose wurden zunächst die aktuell im Medium vorliegende Menge der einzelnen Ionen ( $m_i$  in mg) aus den mittels Ionenchromatographie (siehe Kapitel 3.4.8) gemessenen Massenkonzentrationen ( $c_i$ ) zu jedem Probenahmezeitpunkt ( $i$ ) ermittelt. Das für die Berechnung benötigte Mediovolumen ( $V_{M,i}$ ) wurde über die an der Medienflasche angebrachten Skala mit einer Abweichung von  $\pm 2,5 \text{ mL}$  abgelesen. Das Start-Mediovolumen der Moosbettreaktorexperimente betrug 800 mL. Aus der Differenz der Anfangsmenge ( $V_{M,0} \cdot c_{I,0}$ ) und der im Medium verbleibenden Ionenmenge ( $V_{M,i} \cdot c_{I,i}$ ) ergab sich die theoretische Menge an aufgenommenen Ionen ( $m_{i,auf}$ ). In dieser Berechnung wurde die Bindung der Kationen an die Zellwand nicht berücksichtigt. Zusätzlich wurde angenommen, dass die Konzentrationsänderung im Medium rein durch die Kationenaufnahme in die Zelle bewirkt wird. Die Daten  $m_{i,i}$  wurden mit Hilfe einer linearen Regression in der Auswertsoftware OriginPro untersucht. Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden wurde die Aufnahmerate der einzelnen Ionen in  $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$  ermittelt. Die Aufnahmerate des Ammoniums und Nitrats wurde zusammengefasst und als Stickstoffaufnahme angegeben.

$$m_{I,i} = V_{M,0} \cdot c_{I,0} - V_{M,i} \cdot c_{I,i} \quad (3-9)$$

# 4 Untersuchung der physiologischen Randbedingungen des Wachstums von Torfmoosen in Submerskultur zur Realisierung eines Photobioreaktors

Diese Arbeit widmet sich der Prozessentwicklung eines Kultivierungssystem für die Produktion von Torfmoosbiomasse als Ansaat für das *Sphagnum farming* [6, 12, 16, 86, 91, 93, 94, 155] im Rahmen eines MOOSzucht-Projekts. Als Produktionskandidaten wurden die am schnellsten gewachsenen Klone der axenisch *in-vitro* gezüchteten Torfmoose rausgeseucht [23] und die erste Untersuchung des Produktionsstammes in Hinsicht auf pH-Wert, Nitrat- und Saccharosekonzentration [17] sowie Medienzusammensetzung [19] untersucht. Eine weitere Selektion und Optimierung der Produktionsfaktoren benötigt eine große Anzahl an Parallelversuchen und eine Messmethode zur Wachstumsbestimmung, um die Wachstumskinetiken aufzunehmen. Die Parallelversuche wurden mit begasten und von unten beleuchteten 500 mL Schüttelkolben als Kultivierungssystem durchgeführt, welche sich zuvor für eine submerse Kultivierung der Moose als geeignet zeigten [17]. Die Aufnahme der Wachstumskinetik stellt aufgrund der Morphologie der Torfmoospflanzen eine Herausforderung dar. Die Torfmoose sind mehrzellige Organismen mit inhomogenem Wachstum in Submerskultur, welches eine repräsentative Probenahme zur Biomassebestimmung erschwert. Der Fokus der Arbeit lag auf der produzierten Torfmoos-Gesamtmenge, bei den gewählten Kultivierungsparametern, wie z.B. die eingestrahlte Photonenflussdichte, der CO<sub>2</sub>-Gehalt im Zugas und die Stickstoffquelle im Kulturmedium. Somit wurde das Fundament für weitere mögliche Untersuchungen hinsichtlich der Produktivität gelegt, sowie wichtige biologischen Aspekte für ein zu entwickelndes Kultivierungssystem bestimmt (siehe Kapitel 4, 5). Nachdem manche Produktionsbedingungen bekannt waren, wurde ein erster Prototyp eines emersen Kultivierungsystems (Moosbettreaktor) entworfen und die ersten Basisdaten des Wachstums von Torfmoosen in diesem Bioreaktor ermittelt (siehe Kapitel 6). Eine ausgewählte produzierte Biomasse wurde auf die Versuchsfläche des MOOSzucht-Projekts ausgebracht, um das Etablieren der *in-vitro* produzierten Torfmoose zu überprüfen. Es stand der Entwurf eines skalierbaren Moosbettreaktorprototyps für die massenhafte Torfmoosproduktion im Fokus. Parallel dazu wurden zwei Alternativen eines submersen Kultivierungssystems zur Maßstabvergrößerungen (*Wave bag*-Photobioreaktor und Schlauchreaktor) überprüft (siehe Kapitel 7). Zum Schluss wurden die einzelnen Reaktortypen bezüglich der Saatgutqualität und Energieeintrag verglichen (siehe Kapitel 7.3).

## 4.1 Photoautotrophe Kultivierung im Batchprozess

In Schüttelkolbenversuchen wurden bereits mehrere Torfmoos-Spezies wie *S. nemoreum* [109], *S. imbricatum* [22] *S. palustre* [17, 23] und 18 andere Torfmoosarten [23] kultiviert. In allen Experimenten beinhaltete das Medium eine organische Kohlenstoffquelle, wobei die Torfmoose den höchsten Zuwachs in Anwesenheit von Saccharose [17, 109] erreicht haben. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein anorganisches Medium für das Wachstum von *Sphagnen* in axenischer Submerskultur als unzureichend. [17, 22, 109] Ein exogener Zucker als C-Quelle könnte die Zellulose-Biosynthese für die Zellwand der Hyalozyten begünstigen [22, 39], jedoch ist ein reines photoheterotrophes Wachstum von *Sphagnen* eher unwahrscheinlich. Da die spätere groß-skalige Torfmoosproduktion mit einem organischen Medium den Preis der produzierten Torfmoosbiomasse sowie das Kontaminationsrisiko der Moossuspension im Freiland deutlich erhöhen würde, wurde in einem ersten Experiment die Machbarkeit einer photoautotrophen Kultivierung mit einer kontinuierlichen Begasung mit Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>)-angereicherter Luft überprüft. Dafür wurde das Torfmoos *S. palustre* in begasten Schüttelkolben mit kontinuierlicher CO<sub>2</sub>- Zufuhr (0,08 vvm mit molarem CO<sub>2</sub>-Anteil  $x_{CO_2}=1\%$ ) und in unbegasten mit einer Silikon-Verschlußkappe (Silicosen®, Hirschmann, Deutschland) kultiviert. Der Versuch wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt.

#### 4 Untersuchung der physiologischen Randbedingungen des Wachstums von Torfmoosen in Submerskultur zur Realisierung eines Photobioreaktors

In Abbildung 4-1 ist das Ergebnis eines photoautotrophen Wachstums mit und ohne Begasung dargestellt. Mit einer durchschnittlichen Biotrockenmassekonzentration von  $c(\text{BTM}) = 6,85 \pm 0,62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  war das Wachstum mit kontinuierlicher Begasung signifikant um einen Faktor 5,98 im Vergleich zur Mooskultur ohne Zugas ( $c(\text{BTM}) = 0,27 \pm 0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) verbessert.

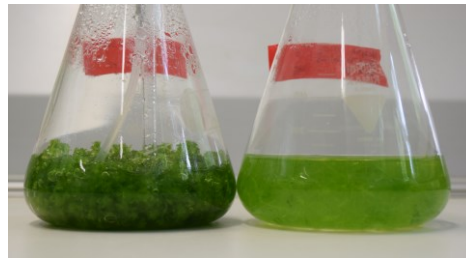


Abbildung 4-1: Vergleich des Biomasseertrages in begasten und nicht begasten Kolben. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 mL 1,0-faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ ,  $V_G = 20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v), Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $t_p = 35 \text{ d}$ . Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=2$ .

Dieser Versuch bestätigte, dass *S. palustre* in der Lage ist, in einem anorganischen Kulturmedium zu wachsen, wenn die Mooskultur kontinuierlich mit  $\text{CO}_2$  versorgt wird. Das Wachstum ohne aktive  $\text{CO}_2$ -Zufuhr ist sehr wahrscheinlich C-limitiert, was eine geringe Biomassezunahme zur Folge hat. Die fehlende  $\text{CO}_2$ -Versorgung in den zuvor erwähnten Experimenten könnte auch die Ursache für die Schlussfolgerung sein, dass *in-vitro* Torfmoose Zucker essentiell zum Wachstum benötigten [17, 22, 109]. Eine ausschließliche heterotrophe Ernährung der Moospflanze ist unwahrscheinlich, da die Torfmoose überwiegend aus chlorophyll-haltigen Zellen bestehen [58] und das Rubisco-Enzym zur  $\text{CO}_2$ -Fixierung exprimieren [214], um Photosynthese zu betreiben. Die Machbarkeit eines photoautotrophen Wachstums von *Sphagnum* bestätigte auch Rudolph et al. [20] für *S. magellanicum* in 2 L Blasensäule mit einem molaren 2 %  $\text{CO}_2$ -Anteil im Zugas. Beim Vergleich der Biomassekonzentration von *S. palustre* mit 2 % (m/v) Saccharose [17] lag die ermittelte End-Biomassekonzentration ( $8 \text{ gBTM} \cdot \text{L}^{-1}$ ) nah an der aus diesem Experiment. Ein Vergleich der Produktivität konnte nicht durchgeführt werden, da keine Information über die Start-Inokulum-Menge vorliegt.

Außer der Endbiomassekonzentration wurde der Wachstumsverlauf der Mooskultur in begasten Schüttelkolben anhand des wöchentlichen Erscheinungsbildes des Schüttelkolbens (siehe Abbildung 4-2) dokumentiert. Die inokulierten Torfmoospflanzen bildeten innerhalb der ersten 14 Tage kleine Blättchen an allen Pflanzenteilen (Stämmchen, Äste und Capitula), neue Innovationen und Köpfchen, wobei keine Verzweigung oder Streckung der Hauptsache, basierend auf den photographischen Aufnahmen der Mooskultur (siehe Anhang, Abbildung 0-3), festgestellt wurde.

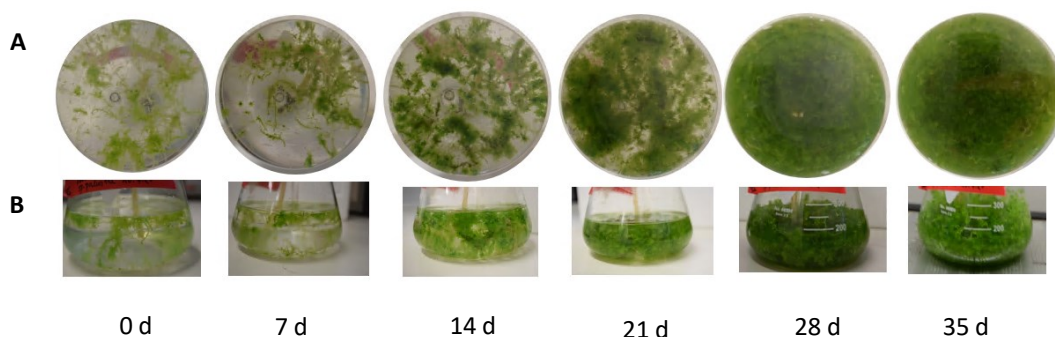


Abbildung 4-2: Entwicklung der Mooskultur von *S. palustre* kultiviert submers in 500 mL Erlenmeyerkolben photographisch aufgenommen durch den Kolbenboden (A) und frontal (B). Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 mL Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ ,  $V_G = 20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v), Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $t_p = 35 \text{ d}$ . Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=2$ .

Des Weiteren sank in der Zeit der pH-Wert (siehe Abbildung 4-3 A) vom ursprünglichen Wert 4,0 auf durchschnittlich  $3,3 \pm 0,2$  und gleichzeitig wurde eine Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ )-Abnahme anhand der Ionenanalytik (siehe Abbildung 4-3 D) detektiert. Nach kompletter Ammoniumaufnahme wurde ein Nitratverbrauch beobachtet (siehe Abbildung 4-3 G) einhergehend mit vermehrter Verzweigung der bereits vorhandenen beblätterten Torfmoose und Bildung neuer Capitula. Gleichzeitig nahm die Konzentration der restlichen gemessenen Ionen ab. Am Ende der Kultivierung füllten die Torfmoose die Flüssigphase komplett aus und an manchen Stellen sind vereinzelt Torfmoospflanzen mit einem schwach entwickelten Capitulum aus dem Medium herausgewachsen (siehe Abbildung 4-2 B). Zu diesem Zeitpunkt waren alle gemessenen Kationen- und Anionenkonzentrationen im Medium größer als  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

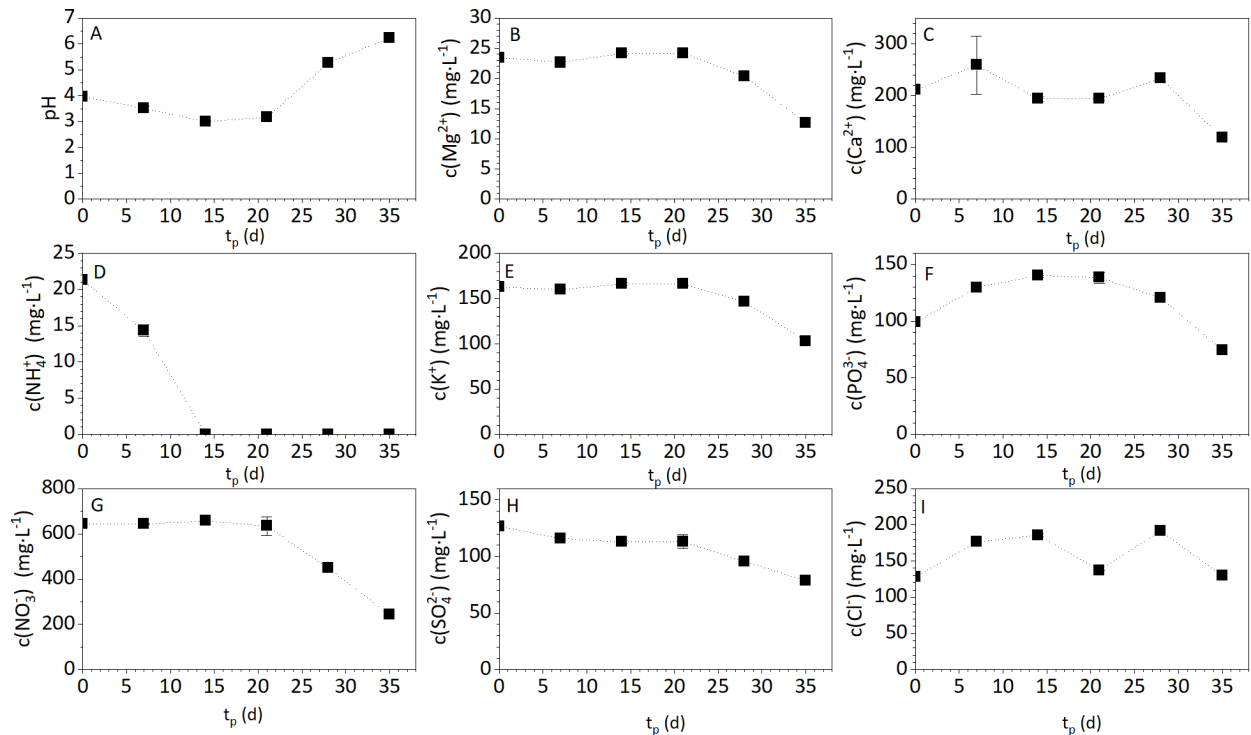


Abbildung 4-3: Verlauf des pH-Wertes und der Nährstoffkonzentration während einer Kultivierung von *S. palustre* in Schüttelkolben zur Untersuchung der Machbarkeit eines photoautotrophen Wachstums. Abgebildet ist A) der pH-Verlauf, der Kationenkonzentrationsverlauf B) des Magnesiums  $c(\text{Mg}^{2+})$ , C) des Calciums  $c(\text{Ca}^{2+})$ , D) des Ammoniums  $c(\text{NH}_4^+)$ , und E) des Kaliums  $c(\text{K}^+)$ , sowie der Anionenkonzentrationsverlauf F) des Phosphats  $c(\text{PO}_4^{3-})$ , G) des Nitrats  $c(\text{NO}_3^-)$ , H) des Sulfats  $c(\text{SO}_4^{2-})$ , und I) des Chlors  $c(\text{Cl}^-)$ . Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 mL Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v), Dauerlicht,  $\text{PFD} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $t_p = 35 \text{ d}$ . Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=1$ . Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte der Duplikate, die vertikalen Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar.

Aus diesem Experiment sind folgende Fragestellung zu einer definierten *in-vitro* Torfmoos-Kultivierung entstanden, auf welche in den nächsten Kapiteln eingegangen wird:

1. Ist das Torfmoos in der Lage, den pH-Wert der Flüssigphase aufgrund von Kationenaustausch an der Zellwand zu senken oder ist die beobachtete pH-Abnahme auf eine Ammoniumaufnahme zurückzuführen? (Kapitel 4.2)
2. Kann der pH-Wert des Mediums während der Kultivierung ohne Nebenwirkungen auf das Wachstum von Torfmoosen konstant gehalten werden? (Kapitel 4.3)
3. Kann die lag-Phase des Wachstums von Torfmoosen, begleitet von einer schwach ausgeprägten Biomassezunahme, beschleunigt werden? (Kapitel 4.3)
4. Inwiefern wird das Wachstum von Torfmoosen durch die Veränderung der Licht- sowie Kohlenstoffverfügbarkeit und durch die Hell/Dunkel-Zyklen beeinflusst? (Kapitel 4.5)
5. Braucht das Torfmoos zum Wachstum sowohl Nitrat als auch Ammonium als Stickstoffquelle im Medium? (Kapitel 5.1)
6. Können die Biomasseerträge durch die Verwendung anderer anorganischen Medien aus der Photobiotechnologie gesteigert werden? (Kapitel 5 und 5.2)

## 4.2 Ansäuerung des Kulturmediums

Die Ansäuerung des Umgebungsmediums ist bei Torfmoosen ein bekanntes Phänomen [35, 42, 73, 174–178] und wird oft mit einem Kationenaustausch an der Torfmooszellwand (Kapitel 2.4.4) in Zusammenhang gebracht. Die dafür zuständige Polygalacturonsäure bindet Kationen aus der umgebenden Flüssigkeit, wobei eine äquivalente Proton ( $H^+$ )-Menge an die Umgebung abgegeben wird, was zu einer pH-Senkung führt [178]-ähnlich beschrieben von Beike et al. [17] im Falle von Torfmoospezies *S. palustre* im Sphagnum Medium. Der pH-Effekt der Ammonium-Aufnahme (siehe Kapitel 2.4.4) wurde bisher als Begründung der pH-Abnahme des Mediums nicht in Betracht gezogen. Daher wurde in einem nächsten Versuch die Hypothese überprüft, ob der Kationenaustausch eines im Knop-Medium vorhandenen Kations oder die Ammonium-Aufnahme zur pH-Senkung führt. Zunächst wurde rechnerisch ermittelt, welches Kation aus dem Knop-Medium zur beobachteten pH-Senkung ( $pH(t_p=14\text{ d})=3,05 \pm 0,02$ ) aus der Abbildung 4-3 führen könnte. Anschließend wurde *S. palustre* in einzelnen Kationenlösungen kultiviert und die pH-Änderung ermittelt.

Für die Berechnung der maximalen pH-Senkung, welche bei Fixierung jeweils eines Kationen zustande kommt, wurden folgende Annahme getroffen: 1) das Moos wächst in den ersten Kultivierungstagen nicht und die Anzahl an freien Plätzen der Polygalacturonsäure ist konstant; 2) der Kationenaustausch jeder Carboxylierungsgruppe  $COOH$  ist unabhängig vom pH, 3) jedes Kation aus dem Knop-Medium liegt in freier Form vor und die gesamte Menge jedes Kations (siehe Tabelle 3-1) kann an der Polygalacturonsäure fixiert werden; 4) für ein gebundenes Kation (hier auch zweiwertige Ionen) wird ein  $H^+$  freigesetzt, was in eine pH-Senkung resultiert. Die berechnete pH-Senkungen in je einer Kationenlösung ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Fe^{2+}$ ) bei analoger Konzentration zu Knop-Medium befinden sich in Tabelle 4-1.

Tabelle 4-1: Berechnete pH Senkung in je einer Kationenlösung bei analoger Konzentration zum Knop-Medium.  $\Delta pH$  entspricht der pH-Änderung nach Abgabe von  $H^+$ -Ionen bei gleichzeitiger Aufnahme von  $1,014\text{ mmol}\cdot L^{-1}\text{ Mg}^{2+}$ ;  $4,325\text{ mmol}\cdot L^{-1}\text{ Ca}^{2+}$ ;  $5,193\text{ mmol}\cdot L^{-1}\text{ K}^+$ ;  $1,25\text{ mmol}\cdot L^{-1}\text{ NH}_4^+$  und  $0,045\text{ mmol}\cdot L^{-1}\text{ Fe}^{2+}$ .  $pH_{\text{Ende}}$  ist der pH-Wert, welcher sich aus der Differenz des Start pH-Werts von 4,0 und die pH-Änderung ergibt.

Kation	$Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$	$K^+$	$NH_4^+$	$Fe^{2+}$
$c(\text{mmol}\cdot L^{-1})$	1,014	4,235	5,193	1,250	0,045
$\Delta pH$	1,33	1,93	1,72	1,13	0,28
$pH_{\text{Ende}}$	2,69	2,07	2,28	2,87	3,72

Jedes Kation bis auf Eisen könnte die pH-Absenkung bewirken, wenn die gesamte im Knop-Medium vorhandene Menge an Kation an der Zellwand fixiert wäre. Dies ist allerdings nicht der Fall, da anhand der Abbildung 4-3 keine deutliche Abnahme der einzelnen Kationenkonzentration ersichtlich ist und somit ist es unwahrscheinlich, dass Calcium, Magnesium und Kalium zu der Ansäuerung des Kulturmediums beitragen, sondern dass die Ammoniumaufnahme oder -fixierung die pH-Senkung bewirkt. Diese Hypothese wurde anschließend experimentell überprüft. Dafür wurde der passive Adsorptionseffekt an *S. palustre* in 250 mL Lösung, bestehend aus Reinstwasser und jeweils einer Kationenlösung ( $KH_2PO_4$  und  $KCl$ ,  $MgSO_4$ ,  $Ca(NO_3)_2$  oder  $NH_4NO_3$ ) mit der im Knop-Medium vorgegebenen Konzentrationen beobachtet. Die gewählte Prozesszeit von  $t_p=17\text{ d}$  sollte zur Erfassung der aufgetretenen pH-Senkung ausreichen.

Die Ergebnisse des pH-Verlaufs während der Torfmooskultivierung in den einzelnen Kationenlösungen sind zusammen mit den Nährstoffkonzentrationen in Abbildung 4-4 dargestellt. Als positive Kontrolle war das Knop-Medium mit allen vier Kationenquellen verwendet, als negative Kontrolle Knop-Medium ohne Torfmoose. Die pH-Verläufe der  $NH_4^+$ -Lösung und der Kontrolle verzeichneten nahezu identische pH-Abnahme. In den anderen Kationenlösungen, sowie im Knop-Medium ohne Inokulum, sank der pH-Wert mit voranschreitender Prozesszeit nicht. Aus der Ionenanalytik ist nur die Verringerung der  $NH_4^+$ -Ionen ersichtlich. Die Konzentration der restlichen Kationen änderte sich geringfügig. In den nicht-angepflanzten Kolben blieb die Ammoniumkonzentration  $c(NH_4^+)$  über die Prozesszeit überwiegend konstant bei einem Wert  $15,1 \pm 0,6\text{ mg}\cdot L^{-1}$ . Es kann also auch Evaporation ausgeschlossen werden.

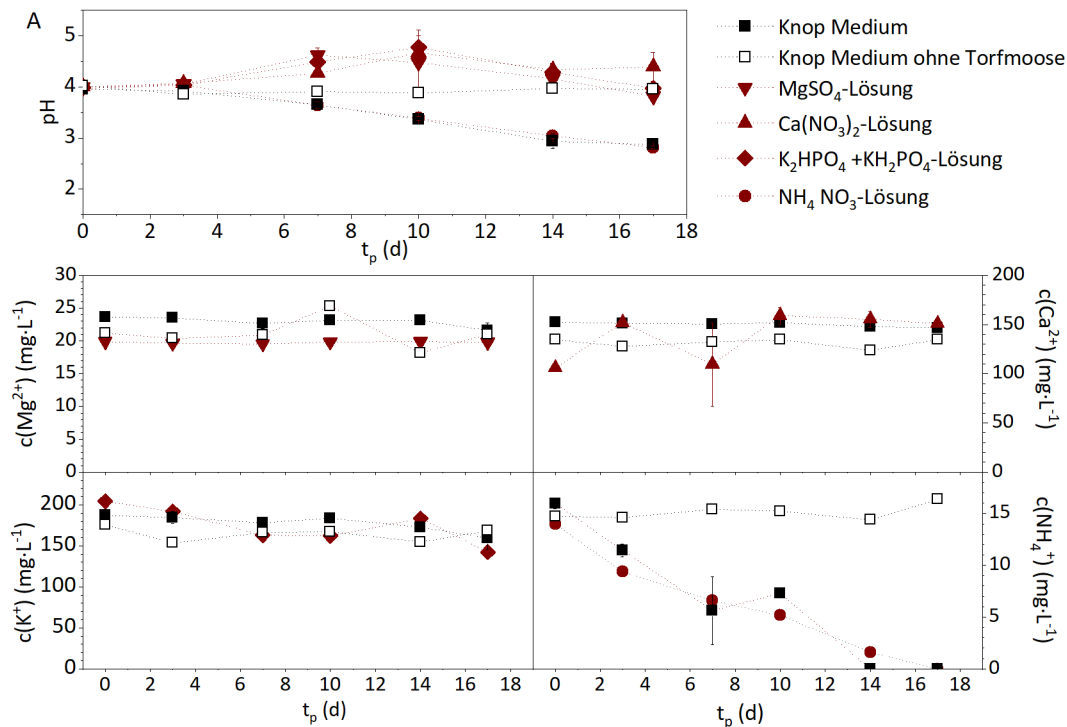


Abbildung 4-4: Prozessverlauf der Kultivierung von *S. palustre* zur Untersuchung der Ansäuerung des Umgebungsmilieus mit A) dem pH Verlauf und B) dem Konzentrationsverlauf im Knop-Medium mit und ohne Torfmoose, der Lösung mit je einer Kationenquelle bei analoger Konzentration zum Knop-Medium:  $Mg^{2+}$ -Lösung mit  $1,014 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $MgSO_4$ ,  $Ca^{2+}$ -Lösung mit  $4,325 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $Ca(NO_3)_2$ ,  $K^+$ -Lösung mit  $1,837 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $KH_2PO_4$  und  $1,014 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $KCl$ ,  $NH_4^+$ -Lösung  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $NH_4NO_3$ . Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $250 \text{ mL}$  Medium,  $pH_{Anfang} = 4,0$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit  $1 \%$   $CO_2$  (v/v), Dauerlicht,  $PFD = 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $t_p = 17 \text{ d}$ . Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n = 1$ . Die abgebildeten Werten sind Mittelwerte der Duplikate, die vertikalen Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar.

Anhand der Konzentrationsverläufe ist ersichtlich, dass keine passive Fixierung des Calciums, Kaliums und Magnesium innerhalb von 17 Tagen erfolgt und somit auch keine pH-Abnahme im Medium auftritt. Damit stehen unsere Ergebnisse im Widerspruch zu der Aussage, dass die beobachtete pH-Senkung im Medium auf den Kationenaustausch zurückzuführen ist [17]. Der Ammonium-Verbrauch scheint die Ursache der pH-Abnahme zu sein, wobei es offen ist, ob das Ammonium an der Oberfläche der Zelle fixiert oder von der Zelle aufgenommen wurde. Die erste Hypothese kann rechnerisch widerlegt werden. Bei einer durchschnittlichen Start-Inokulummenge von  $100 \text{ mg}$  (BTM) und einer experimentell ermittelten Gesamtbindungsstelle von  $1,56 \text{ mmol}\cdot\text{gBTM}^{-1}$  [21] verfügt das Moos *S. palustre* Klon 12a über  $0,156 \text{ mmol}$  verfügbarer  $H^+$ -Ionen zum Kationenaustausch. Im Knop-Medium befinden sich  $0,313 \text{ mmol}$   $NH_4^+$ -Kationen ( $c(NH_4^+) = 1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $V_M = 250 \text{ mL}$ ), 2,5mal mehr als die verfügbaren Stellen an der Moosoberfläche. Darüber hinaus spricht gegen den pH-Effekt der passiven Adsorption auch die Kinetik des Austauschmechanismus. Innerhalb von ein paar Minuten [35, 177], bzw. Stunden [175], abhängig von der vorliegenden Kationenkonzentration, sank der pH-Wert, aber in keinem der Experimente dauerte es mehrere Tage, wie es die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen. Aus diesen Gründen kann die beobachtete pH-Abnahme im Knop-Medium auf die Ammoniumassimilation zurückgeführt werden. Dieser Mechanismus ist für Mikroalgen [215–219], für heterotrophe Mikroorganismen wie z.B. *Escherichia coli* [216, 220] oder höhere Pflanzen [221] bekannt und beschrieben. Nach der  $NH_4^+$ -Aufnahme in das Cytoplasma wird das Kation in die Aminosäure Glutamat [216] unter Beteiligung des Glutaminsynthetase-Enzymes (GS) bei gleichzeitiger Freisetzung eines  $H^+$ -Ions [76, 192, 221], eingebaut. Um die Elektroneutralität des Cytoplasmas beizubehalten, wird das  $H^+$  Ion aus der Zelle in wässrige Lösung, oft mittels  $H^+$ -Pumpen, ausgeschieden [216, 222], was zur pH-Senkung des Milieus führt. Die pH-Senkung durch die Ammoniumassimilation in der Zelle stellte auch Chiwa et al. [223] an Freilandproben von verschiedenen *Sphagnum* sowie Rudolph an *S. fallax* [20] und Heck et al. [19] an *S. palustre*, *S. fimbriatum* und *S. squarrosum* fest.

Als letzte mögliche Ursache der beobachteten Ansäuerung des Mediums wurde das Ausgasen des Ammoniaks ( $NH_3$ ) wegen der kontinuierlichen Begasung vermutet, was in einen Überschuss  $H^+$ -Ionen in der Lösung nach dem Dissoziationsgleichgewicht zwischen  $NH_3$  und  $NH_4^+$  resultieren kann. Da sich  $c(NH_4^+)$  über die Prozesszeit kaum verändert hat, ist



solcher Prozess eher unwahrscheinlich. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass bei einem pH-Wert von 4 das Ammoniak in der wässrigen Lösung aufgrund der pH-abhängigen  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Verteilung kaum vorhanden ist [224] und daher auch nicht ausgasen kann.

Somit lässt sich sagen, dass der niedrige pH-Wert im Wesentlichen durch die Ammoniumkonzentrationsveränderung im Knop-Medium bedingt wird. Diese Erkenntnis rückt die Frage, ob die aufgetretene pH-Senkung einen physiologischen Effekt auf die Torfmoose hat, oder einfach einen Nebeneffekt der Ammoniumaufnahme darstellt, in den Vordergrund. Darauf wird im Kapitel 4.3 und 5 näher eingegangen. Außerdem ist noch offen, ob der aufgenommene Stickstoff auch ohne sichtbares Wachstum in der Biomasse nachweisbar ist und in welcher Form dieser vorliegt. Dieser Problematik widmet sich Kapitel 5.1.

### 4.3 Kultivierung bei einem konstanten pH-Wert

Als nächstes wurde überprüft, ob durch die Ammoniumassimilation aufgetretene pH-Abnahme einen physiologischen Effekt auf die Torfmoose hat. Dazu sollte das Torfmoos *S. palustre* bei einem konstantem pH-Wert kultiviert werden. Die Kultivierung bei einem konstanten pH-Wert ist eine gängige Strategie in den biologischen Kultivierungsprozessen, da die Mikroorganismen auch in der Natur einen optimalen pH-Bereich haben, bei welchem die intrazelluläre pH-Homöostase nicht beeinflusst wird. [225] Die Kultivierungen von *Sphagnum* im Bioreaktor verlaufen ohne pH-Regelung mit einem pH-Anfangswert von 4 [17, 19, 23]. Ein pH-Aufrechterhalten im Rührkessel-Bioreaktor während der Kultivierung von *S. palustre* zeigte sich ohne Erfolg, da die Torfmoose ausbleichen und anschließend abstarben. [17] Im Gegensatz dazu kultivierte Rudolph et al. [20] *S. fallax* in einem kontinuierlichen Perfusion-System unter einem konstanten pH-Wert von 3,85, welcher mit der Zugabe von aufkonzentrierter Rudolfscher Lösung (pH=5,8) aufrechterhalten wurde. Daher wurde eine Hypothese aufgestellt, dass eine Kultivierung von *S. palustre* unter konstantem pH-Wert möglich sein kann. Um den auftretenden pH-Veränderungen entgegenzuwirken, wurde dem Medium ein biologisch nicht abbaubarer Puffer Piperazin-1,4-bis-(propansulfonsäure), im Folgenden mit PIPPS abgekürzt, zugesetzt, dessen pK bei 3,77 liegt. [226, 227] Die PIPPS-Konzentration von  $5,659 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  war in Vorversuchen ausreichend, um die pH-Senkung hervorgerufen durch die Ammoniumaufnahme ( $\Delta\text{pH}=1,2$ ) zu puffern. Die Kultivierung wurde mit dem gepufferten Knop-Medium unter Standardbedingungen und bei einem pH-Wert von 4,0 und 5,0 in zweifacher Bestimmung durchgeführt und der Versuch mit pH=4,0 wiederholt.

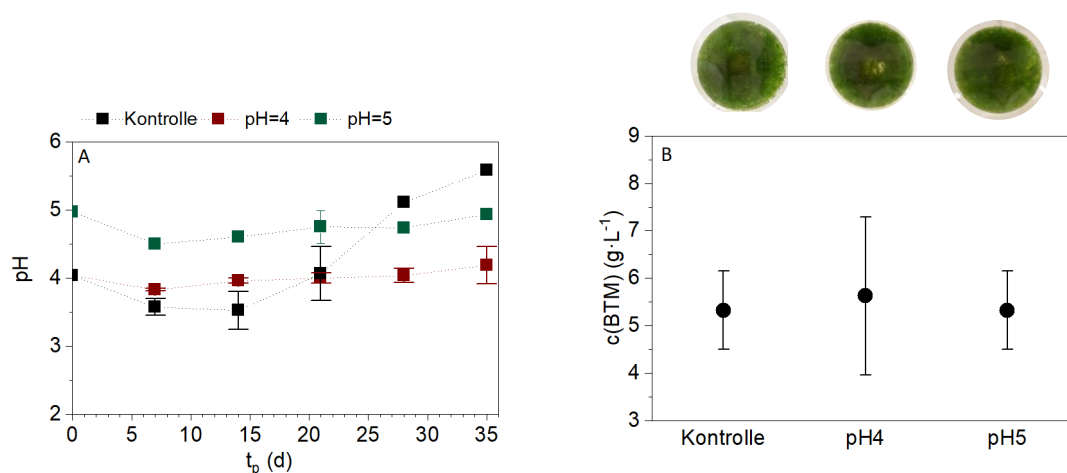


Abbildung 4-5: Prozessverlauf des Experiments zur Untersuchung des Einflusses von konstantem pH-Wert auf das Wachstum von Torfmoosen von *S. palustre* mit A) dem pH-Verlauf, gemessen online mit einer pH-Sonde und offline manuell und B) der Endbiomassekonzentration ( $c_{\text{BTM}}$ ) in einem gepufferten System mit  $5,659 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  PIPPS mit Anfang-pH-Wert =4 und 5 und in einem nicht gepufferten System (Kontrolle). Abgebildet sind Mittelwerte der Duplikate mit ihren Standardabweichungen. Kultivierungsbedingungen:  $T_K=20\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 mL 1,0faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD}=100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G=20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p=35 \text{ d}$ . Anzahl an Kolben pro Parameter: 2, n=2.

In der Abbildung 4-5 A ist der pH Verlauf der Kontrolle und des gepufferten Systems (pH=4,0 und 5,0) dargestellt. Durch die Zugabe von  $5,659 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PIPPS konnte ein durchschnittlicher Wert von  $4,07 \pm 0,04$  während der gesamten Kultivierungsdauer annähernd konstant gehalten werden. Der pH-Wert von 5,0 lag bei  $4,71 \pm 0,17$  und somit auch annähernd konstant. C(BTM) -Werte der axenischen Kolben unterschieden sich nicht statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Mooskultur wies eine ähnliche Grünfärbung wie die ohne Puffer im Medium, was im Widerspruch zur Beobachtung von Beike et al. [17] ist, wo ein konstanter pH-Wert von 5 zum Ausbleichen der Torfmoospflanze führte. Vermutlich sind die unterschiedlichen Beobachtungen auf verwendetes pH-Stellmittel (NaOH bzw. KOH) zurückzuführen. Durch das Gegentitrieren steigt die Konzentration an Kationen ( $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$ ) im Medium, worauf die *Sphagnen* mit einem Wachstumstillstand reagieren können. [178]

Das hier beschriebene Ergebnis zeigt, dass Aufrechterhalten des konstanten pH-Werts (pH=4,07 und pH= 4,7) der Umgebung die Moospflanze nicht stört und die pH-Veränderung im Batch-Prozess nicht für das Wachstum von Torfmoos erforderlich sind. Für die Umsetzung für die Kultivierung in einem Photobioreaktor sollte der pH-Wert durch die Base oder Säure konstant gehalten werden, da die Verwendung eines Puffers mit hohen Kosten verbunden wäre. [118, 212] Ein potientielles Stellmittel könnte das Ammoniumhydroxid sein, welches zusätzlich noch den Stickstoffbedarf der Pflanze decken könnte.

Der nächste notwendige Schritt für die Torfmooskultivierung ist die Ermittlung des exakten optimalen pH-Wertes. Die *Sphagnen* wachsen in der Natur bei einem pH-Wert von 3,6- 6,4 [41–43]. Clymo [40] untersuchte die pH-Abhängigkeit des Längenzuwachses im pH-Bereich von 3,5 bis 7,5 an Freilandmaterial, und zeigte, dass der größte Zuwachs bei einem pH-Wert von 5,5 erreicht wird. Beike et al. [17] untersuchte die Variation des Anfang-pH-Werts von Knop-Medium für *S. palustre*, wobei der pH-Wert nicht geregelt wurde. Dies zeigt, dass die Frage des optimalen pH-Werts für *in-vitro* Torfmoose kaum experimentell nachgegangen wurde. Bei der Ermittlung des optimalen pH-Wertes sollten drei Aspekte mitberücksichtigt werden: 1) Die pH-Abhängigkeit der Nitrat-Assimilation, welche bei niedrigen pH-Werten  $< 3$  reduziert wird [185, 191]. 2) Das pH-abhängige Kohlensäure-Bikarbonat-System. Das Hydrogencarbonat  $\text{HCO}_3^-$ , welche ab einem pH-Wert von 5 überwiegt, können laut Literatur [5] die Torfmoose als C-Quelle für die Photosynthese nicht verwenden und sind somit auf das gasförmige und gelöste Kohlendioxid angewiesen. 3) Die pH-Abhängigkeit der Photosyntheserate, welche tendenziell mit steigendem pH-Wert (von 5 -9) abnimmt [80], wobei es Unterschiede zwischen einzelnen Arten innerhalb der *Sphagnen* gibt. Beispielweise berichtete Haraguchi et al. [80], dass *S. fallax* eine höhere Photosyntheserate bei pH=6, als bei 5 aufweist und daher auch die basische Umgebung tolerieren kann. Aus diesen Erkenntnissen geht hervor, dass der optimale pH-Wert in einer Submerskultur für jede Moos-Spezies einzeln ermittelt werden sollte und der Orientierungsbereich zwischen pH 3 – 6 liegt.

## 4.4 Lag-Phase

In einem nächsten Versuch stand die lag-Phase im Fokus. Neu inokulierte Organismen müssen zunächst an die neuen Umgebungsbedingungen adaptieren und daher zeigen sie Wachstumsraten, welche zum Beginn der Kultivierung deutlich unter der maximalen Wachstumsrate liegen. [110, 225, 228] Diese geringeren Raten haben einen bedeutenden Einfluss auf die Produktivität des Prozesses [110], da eine kürzere lag-Phase zur einer früheren Erreichen der vollen Produktivität führt. Die Dauer der lag-Phase hängt neben dem Alter und der Anzahl der Zellen auch mit dem Unterschied zwischen dem neuen und alten Kulturmedium zusammen, da die Zellen die für den Stoffwechsel benötigten Moleküle wieder synthetisieren müssen. Somit ist die Dauer der lag-Phase auch durch die Synthese solcher Moleküle bedingt. [110] In der Praxis wird der Reaktor daher nicht nach jedem Batch neu angeimpft, sondern in halb-kontinuierlicher Kultur gefahren.

Die Kultivierung von *S. palustre* erfolgte bisher in einem Batchprozess und hat die lag-Phase bis zu 14 Tagen, ermittelt anhand der BTM-Wachstumskurve in Knop-Medium im Batchverfahren [17]. Im Vergleich hierzu beträgt die lag-Phase von Laubmoos *Physcomitrella patens* 5-6 Tagen im Schüttelkolben im Gametophyt-Stadium [121] oder bis zu 3 Tage im Protonema-Stadium [229]. Somit gibt es möglicherweise ein Potential für die Verkürzung der lag-Phase im Batchprozess, wenn die relevanten Einflussfaktoren bekannt wären. Die fehlende Methode zur Biomassequantifizierung schränkt die

#### 4 Untersuchung der physiologischen Randbedingungen des Wachstums von Torfmoosen in Submerskultur zur Realisierung eines Photobioreaktors

Ermittlung solcher Faktoren ein. Weiterhin würde das den Einsatz von -omics-Technologien erfordern. Aus diesen Gründen wurde in folgenden Experimenten nicht nach der Ergründung der Ursachen der Verzögerungsphase gesucht, sondern lediglich experimentell getestet, ob sich zwei potentielle Einflussfaktoren: natürliches Moorwasser oder Eisen-Chelate wie EDTA und Zitronensäure auf das Wachstum von Torfmoosen auswirken. Keiner von diesen zwei Faktoren hatten einen markanten Einfluss auf optische Biomassezunahme (siehe Abbildung 0-10, Abbildung 0-12)- daher wurde auf die Darstellung dieser Versuche an dieser Stelle verzichtet.

Darüber hinaus wurde zur lag-Phase noch eine Hypothese aufgestellt, welche auf die Beobachtungen von Heck M. (Daten nicht publiziert) basierte. Wenn der Bioreaktor mit Vorkulturmedium angeimpft wurde, wuchs *S. palustre* im Bioreaktor schneller als im Kontrollmedium. Daher war das Ziel des nächsten Experiments, die Substanzen im Kulturmedium zu bestimmen. Dafür wurde während einer Standardkultivierung mit *S. palustre* in 1 L Schüttelkolben die gelösten organischen Substanzen (DOC) näher untersucht. Das Volumen des Knop-Mediums wurde auf 400 mL erhöht, um die benötigte Probenmenge zur Analyse des gelösten organischen Kohlenstoffs mittels Dünnschnittchromatographie (Kapitel 3.4.10) sowie derer Zusammensetzung mittels Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.4.10) zu bestimmen. Die Analyse erfolgte in einfacher Bestimmung.

Die Ergebnisse der organischen Materie während der Torfmooskultivierung sind in Abbildung 4-6 dargestellt. Die Graphik des DOC-Verlaufs (Abbildung 4-6 A) ist in zwei Zeiträume unterteilt. Im ersten Abschnitt ( $t_p < 9$  d) erfolgte die Probenahme des Kulturmediums durch Safe-Flow-Ventil, dessen Oberfläche mit Ethanol desinfiziert wurde. Im zweiten Abschnitt wurde das Medium direkt aus dem Kolben in der Sterilwerkbank entnommen. Der Grund dafür war das Ergebnis aus der Zusammensetzung des DOCs im Kulturmedium (Abbildung 4-6 B). Das verwendete Ethanol veraussachte die Messung und überdeckte den im Medium gemessenen DOC. Dies ist an der grünen (mit Ethanol) und blauen Linie (ohne Ethanol) zu erkennen. Somit wurde bis zum Versuchstag  $t_p = 9$  d anstatt im Medium vorhandenem DOC lediglich die Ethanol-Menge ermittelt. Ab  $t_p = 9$  d sollten die Werte dem tatsächlichen DOC im Kulturmedium entsprechen. Der im Kulturmedium detektierte Kohlenstoff setzte sich aus verschiedenen Substanzen zusammen, welche von 30 bis 80 min retentierten und keine Fluoreszenz-Aktivität bei einer Anregungswellenlänge von 276 nm und Emissionswellenlänge von 340 nm (siehe Abbildung 4-6 C) aufwiesen. Die UV-Aktivität zeigten die Substanzen um die Retentionszeit von 58 min. Die Gesamtmenge des DOCs lag zwischen  $40 - 140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  und kein Trend in der Produktion war mit der voranschreitenden Zeit zu sehen.

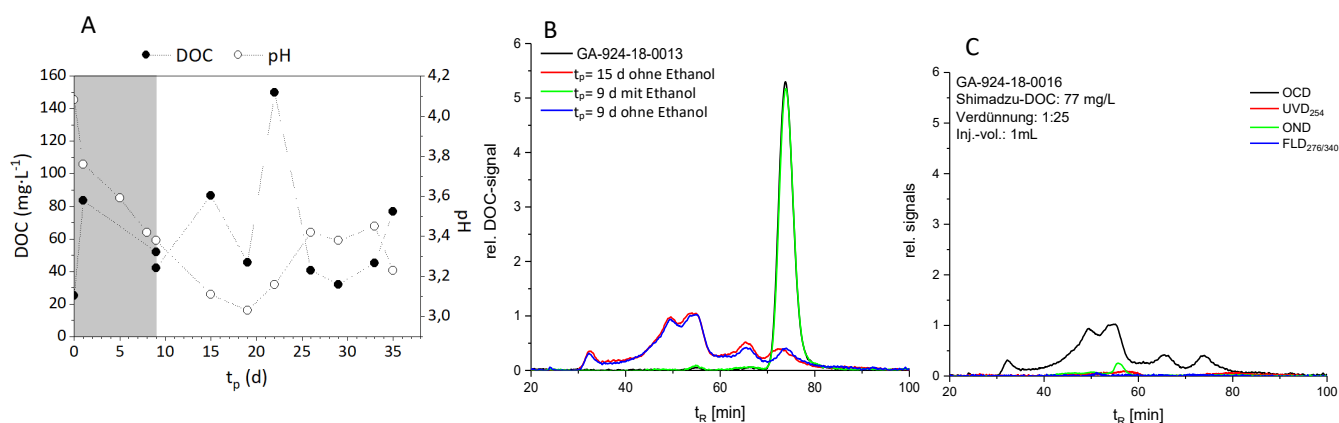


Abbildung 4-6: Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) während der Kultivierung von *S. palustre* mittels Dünnschnittchromatographie in einfacher Bestimmung (A), Zusammensetzung des DOCs mittels Größenausschlusschromatographie zur Prozesszeit  $t_p = 9$  und 15 d (B) und die Zusammensetzung der organischen Materie (DOC) zur Prozesszeit  $t_p = 15$  d (C). Aufgetragen ist der gelöste organische Kohlenstoff (DOC), welcher sich aus hochmolekularen Stoffen ( $t_r=30$  min), wie z.B Zucker sowie niedermolekulare Stoffe ( $t_r=60$  min), wie organische Säure zusammensetzt. Der genaue Typ der Substanz ist nicht klar, allerdings ist es aus dem Verlauf der UV-Aktivität ( $UVD_{254}$ ) ersichtlich, dass sich um UV-Aktive Substanzen handeln, die ungesättigte bzw. aromatische Verbindungen aufweisen. Zusätzlich ist der organische Stickstoff ( $OND$ ) aufgetragen, welche die organischen Peptide darstellt, die durch Hydrolyse der Blätter entstehen. Das letzte gemessene Parameter war die Fluoreszenz ( $FLD_{276/340}$ ) bei einer Anregungswellenlänge von 276 nm und Emissionswellenlänge von 340 nm. (Persönliche Mitteilung, G. Abbt-Braun; Engler-Bunte-Institut | Wasserchemie und Wassertechnologie, KIT, Deutschland). In Abbildung A ist grau der Zeitraum markiert, in welchem die Probenahme mit Verwendung von Ethanol erfolgte. Kultivierungsbedingungen:  $T_k = 20 \pm 1$  °C, 400 mL 1,0-faches Knop-Medium,  $pH_{Anfang} = 4,0$ , Dauerlicht,  $PFD = 100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p = 35$  d. Anzahl an Kolben pro Parameter=1, n=1.

Die Ergebnisse zeigen, dass während der Kultivierung von *S. palustre* im Kulturmedium organische Kohlenstoffverbindungen vorhanden sind, deren Spektrum breit ist. Anhand der Retentionszeit könnte es sich um folgende Fraktionen handeln: Biopolymere ( $t_R=30$  min), Huminstoff-Grundeinheiten ( $t_R=50$  min), niedermolekulare Säure und amphiphile Substanzen ( $t_R=55$  min) handeln. [230] Die Anwesenheit von Huminstoffen ist eher unwahrscheinlich, da keine UV-Aktivität nachgewiesen wurde, wie es bei der Analyse des Moorwassers (siehe Abbildung 0-9) war. Bei den Biopolymeren könnte die dominierte Fraktion Polysaccharide und keine Proteine sein, da diese Fraktion aufgrund von fehlender OND-Information oft normalerweise als Polysaccharide angesehen wird. [230] Am meisten sind die niedermolekularen Säuren vorhanden und bei einem Teil könnte es sich um N-haltige Verbindungen, wie z.B. Aminosäure, Aminzucker handeln, weil ein OND-Signal im Retentionsbereich detektiert wurde. Über eine Sekretion der Aminosäure in das Kulturmedium berichtete Gabriel et al. [184] in einem Experiment mit *in-vitro* kultiviertem Moos *S. magellanicum*, wo die Aminosäure Serin und Glycin mit einer Konzentration  $< 2,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  nachgewiesen wurde. Ob es sich um Aminosäure im Kulturmedium von *S. palustre* handelt, muss weiter untersucht werden. Darüber hinaus können auch weitere Untersuchungen des Einflusses von einer gezielten Zugabe der Aminosäuren auf die lag-Phase durchgeführt werden.

Außer den n-haltigen Substanzen werden auch organischen Säuren in das Kulturmedium sekretiert. Diese Beobachtung wird durch die Befunde von Rasmussen et al. [231, 232] unterstützt, dass in einem Photobioreaktor kultiviertes *S. fallax* und *S. cuspidatum* in das Kulturmedium mehrere Phenolsubstanzen ausscheidet, wobei es sich quantitativ um die sogenannte *Sphagnum*-Säure und deren Ethylester handelt. Die Konzentration im Medium war moospezifisch und beispielweise sekretierte *S. cuspidatum* das 14-fache der *trans-Sphagnum*-Säure ( $290 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1} \sim 0,064 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) im Vergleich zu *S. fallax*. Dass es sich dabei nicht nur um diese Säure handelt, sprechen zwei Argumente: 1) Die produzierte Menge ( $0,063 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ist deutlich geringer die als hier ermittelten Daten zeigen, 2) die *trans-Sphagnum*-Säure ist ein aromatische Verbindung und sollte UV-aktiv sein. Die UV-Aktivität der im Kulturmedium vorhandenen organischen Substanzen wurde nachgewiesen, aber nicht in dem gesamten Retentionszeitsbereich der organischen Säuren. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass auch andere organische Säuren produziert werden. Dies ist mittels HPLC nachzuweisen.

Über die Funktion der detektierten Substanzen ist wenig bekannt. Beispielweise soll die *Sphagnum*-Säure das Gefäßpflanzenwachstum unterdrücken. [233] Da aber die kultivierten *Sphagnen* höhere Anteile an sekretierten Phenolen als die in der Natur ausscheiden, sollte die Säure auch eine andere Bedeutung für die Pflanzen haben. [232, 234] Die Sekretion von DOC beobachtete auch Gonzales et al. [21] für dieselbe Torfmoosart *S. palustre* Klon 12a und postulierte, dass es sich um Substanzen handelt, welche mit der Metalladsorptionskapazität (Zink, Kupfer) im Zusammenhang stehen. Die Natur dieses DOCs konnte in der Studie nicht eindeutig charakterisiert werden. Nicht auszuschließen ist, dass die produzierten Substanzen organische Säure sind, die an der Eisenreduktion beteiligt sind (siehe Kapitel 2.4.4). Viele Pflanzen und Mikroorganismen scheiden organische Säure oder Phenolen aus, welche das Eisen komplexieren [235, 236] und zur Zellwand zur Reduktion transportieren. [236, 237] Dabei verbleiben die Komplexbildner in der Umgebung. [235] Die erste Fe-Analytik (siehe Abbildung 0-11) des Kulturmediums während der Kultivierung zeigte, dass Eisen aus dem Medium aufgenommen wird. Der genaue Mechanismus der Eisenaufnahme ist jedoch nicht bekannt. [238]

Es lässt sich zusammenfassen, dass *S. palustre* organische Substanzen während der Kultivierung im Knop-Medium produziert, welche im Medium verbleiben und nach dem Animpfen des Reaktors mit Vorkulturmedium in den Bioreaktor übertragen werden. Um welche Substanzen es sich genau handelt, sollte mittels HPLC nachgewiesen und Experimente zur exogenen Zugabe dieser Substanzen durchgeführt werden, um deren positive Auswirkung auf die lag-Phase zu bestätigen. Dies ist nur bedingt nötig, weil in einem technischen Prozess die Adaptation eher vermieden wird, in dem die Zellen ein konstantes Medium in einem Perfusionssystem oder kontinuierlichen System erhalten.

## 4.5 Einfluss der Licht- und Kohlenstoffverfügbarkeit

Das Torfmoos sollte in dem großskaligen Reaktor lediglich unter photoautotrophen Bedingungen wachsen. Unter solchen Bedingungen ist die Biomassebildungsrate überwiegend von Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle und dem Licht als Energiequelle abhängig. Aus diesem Grund war das Ziel der nächsten Versuchsreihe den Einfluss der Lichtqualität und -menge,

#### 4 Untersuchung der physiologischen Randbedingungen des Wachstums von Torfmoosen in Submerskultur zur Realisierung eines Photobioreaktors

sowie der Kohlenstoffdioxidverfügbarkeit auf den physiologischen Zustand der Moospflanze sowie auf die Endbiotrockenmassekonzentration in Submerskultur zu bestimmen. In Licht-Experimenten wurde die Lichtzusammensetzung anhand von zwei verschiedenen Beleuchtungsmodulen (siehe Kapitel 4.5.1), die eingestrahlte Photonenflussdichte (siehe Kapitel 4.5.3) und die Dauer der Lichtphase (siehe Kapitel 4.5.4) variiert. In CO<sub>2</sub>-Versuche wurden vier verschiedene CO<sub>2</sub>-Konzentrationen im Zugas (siehe Kapitel 4.5.2) getestet. Die restlichen Kultivierungsbedingungen entsprachen der Standardkultivierung.

##### 4.5.1 Einfluss der Lichtqualität

Zwei LED-Beleuchtungsmodulen, bereits verwendet in der Mikroalgenkultivierung [212], wurden für die Kultivierung von *S. palustre* getestet. Die Kultivierung wurde in dreifacher Bestimmung in zwei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Das erste Lichtmodul war mit warm-weißen Leuchtdioden Nichia NS6L083BT (Anan, Japan) das zweite mit Nichia NS6L083AT (Anan, Japan), sog. kalt-weißen LED bestückt. Die beiden LED-Module beleuchteten die Schüttelkolben mit einer Photonenflussdichte von 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Das aufgenommene Emissionsspektrum der beiden Lichtmodule (siehe Abbildung 4-7, A) unterschied sich in ausgestrahlter Photonenflussdichte überwiegend Blaulichtbereich (430 und 490 nm). Im Fall des kalt-weißen LED-Moduls lag die gesamte ausgestrahlte Lichtintensität um 44 % höher als die vom warm-weißen LED-Modul. Die Gesamt-Photonenflussdichte in diesem Bereich betrug 10,5  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (AT-LEDs) und 18,9  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (BT-LEDs). Der Unterschied von 8,4  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  resultierte in eine Erhöhung der Endbiomassekonzentration um den Faktor 7,4 ( $c(\text{BTM}) = 7,34 \pm 0,91 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), trotz derselben Gesamtintensität. Der Unterschied war signifikant. Bei der Verwendung von AT-LEDs wurde kaum Wachstum ( $c(\text{BTM}) = 1,10 \pm 0,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) beobachtet und eine signifikante Senkung des spezifischen Anteils an Chlorophyll *a* und Carotinoide (siehe Abbildung 4-7 C) festgelegt.

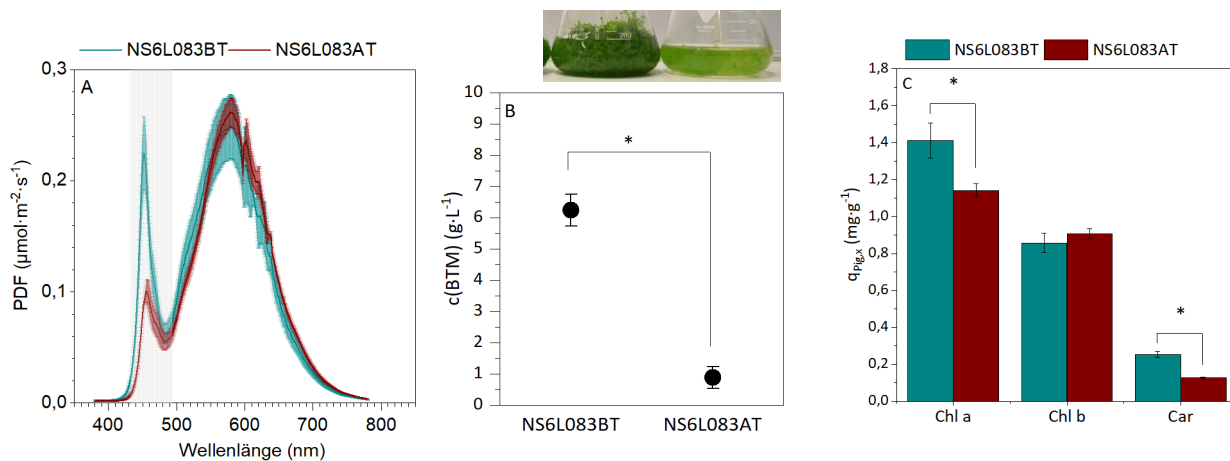


Abbildung 4-7: Vergleich des Einflusses der kalt- und warm-weißen LED-Module auf das Wachstum von *S. palustre*. A) Emissionsspektrum der beiden Lichtmodulen bei einer Gesamt-Photonenflussdichte von 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Grau hinterlegt ist die Fläche des Blaulichtbereichs mit einer Wellenlänge zwischen 430 und 490 nm. B) Gebildete Torfmoosbiomasse angegeben als Biotrockenmassekonzentrationen. Abgebildet sind Mittelwerte der Duplikate mit ihren Standardabweichungen. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz ( $p < 0,05$ ). C) Spezifische Pigmentanteile  $q_{\text{Pig},x}$  für Chlorophyll *a*  $q_{\text{Chl a}}$ , Chlorophyll *b*  $q_{\text{Chl b}}$  und Carotinoide  $q_{\text{Car}}$ , dreifach bestimmt für jeweils 1 Probe aus dem ersten Versuchsexperiment. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V_M = 250 \text{ mL}$  1,0-faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ mL min}^{-1}$  mit 1 % CO<sub>2</sub> (v/v),  $t_p = 35 \text{ d}$ . Anzahl an Kolben pro Parameter: 3,  $n = 2$ .

Das Experiment zeigt eindeutig einen Zusammenhang zwischen der Photonenflussdichte (PFD) im Blaulichtbereich und der Endbiomassekonzentration. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich das Blaulicht auf verschiedene Weisen auf die Pflanzen auswirkt, wie z.B. in der Induktion der Produktion der Seitenzweige im Moos *Physcomitrella patens*, [101, 165], BTM-Zuwachs bei *Sphagnum* [108] oder das Auslösen der Signaltransduktionsketten der Expression verschiedener Gene [239]. Um solche Effekte überhaupt auszulösen und eine bestimmte Intensität des biologischen Prozesses zu erreichen, müssen Blaulichtrezeptoren (Cryptochrom und Phototropin) einen Photonenfluss mit bestimmter Wellenlänge mit einer bestimmten Bestrahlungszeit, auch Fluenz genannt, bestrahlt werden. [76] Beispielweise zeigte sich beim Laubmoos

*Physcomitrella patens*, dass das Licht mit einer Fluenzrate (entspricht der PFD) über  $6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ein Zeitraum von mehr als 3 h erforderlich war, um die Verzweigung des Moooses zu induzieren. [165] Dadurch könnte das geringere Wachstum mit NS66083AT-Beleuchtungsmodul erklärt werden. Die photochemische Wirksamkeit der absorbierten Blauphotonen [76] von  $10,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  war nicht ausreichend, um eine bestimmte Intensität des zum Wachstum von *S. palustre* benötigten Prozesses zu erreichen. Um dies zu bestätigen, ist zunächst notwendig, die biologische Wirkung des Blaulichtrezeptoren im Gametophyt-Stadium der Torfmoose zu identifizieren und anschließend die Fluenz der einzelnen Lichtrezeptoren zu ermitteln.

Der festgestellte Unterschied in der Chlorophyllkonzentration lässt sich durch die Morphologie der Mooskultur erklären. Da in Schüttelkolben, beleuchtet von warm-weißen LED-Modulen, wenig Biomasse angewachsen ist, entwickelten sich auch wenig Capitula (siehe Abbildung 4-8) in der Mooskultur. Das Capitulum enthält mehr Pigmente als das Stämmchen [162, 163] und wenn die gut gewachsene Mooskultur mehr Capitula pro Stämmchen besaß, war dadurch automatisch auch mehr Chlorophyll in der Gesamtprobe vorhanden.

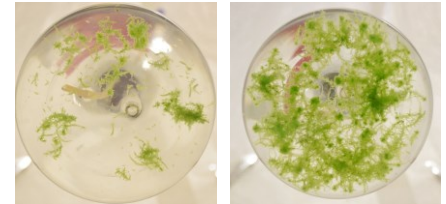


Abbildung 4-8: Ansicht der Mooskultur beleuchtet von warm-weißen LED-Modul (NS6L083AT) zur Prozesszeit  $t_p = 0$  d (links) und 35 d (rechts).

Aus diesem Experiment lässt sich sagen, dass eine minimale Photonenflussdichte im Blaubereich ( $\lambda=430$  und  $490$  nm) für das photoautotrophe Wachstum von *S. palustre* in Submerskultur notwendig ist.

#### 4.5.2 Variation der $\text{CO}_2$ -Konzentration im Zugas

Die Torfmoose sind auf gelöstes  $\text{CO}_2$  im Medium angewiesen. Das  $\text{CO}_2$  aus dem Zugas muss zunächst aus den Gasblasen durch die Grenzfläche Blase-Wasser in das Medium diffundieren. Anschließend wird es mit einer Geschwindigkeit abhängig von der Strömung weiter zu der Zelle transportiert. In der Zelle diffundiert das  $\text{CO}_2$  passiv zum RuBisCO-Enzym, über welches es fixiert wird und in dem Calvin-Zyklus zu organischen Molekülen umgewandelt wird. Die Geschwindigkeit der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme, sogenannte CUR, steht in direktem Zusammenhang mit der  $\text{CO}_2$ -Fixierungsrate des RuBisCO-Enzymes (siehe Kapitel 2.4.3) und mit der Menge des Enzymes in Chloroplasten-Stromata. Um die  $\text{CO}_2$ -Fixierungsrate durch eine geringere  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit im Cytoplasma nicht zu limitieren, sollte die zugeführte  $\text{CO}_2$ -Menge in das Kulturmedium immer höher als die von den Zellen aufgenommene Menge sein bzw. sollte die Kohlendioxidtransportrate (CTR) größer als die Kohlenstoffaufnahme (CUR) sein. Dabei stellt sich eine Gleichgewichtskonzentration von  $\text{CO}_2$  im Cytoplasma ein. Diese Konzentration sollte möglichst hoch sein, damit die maximale  $\text{CO}_2$ -Fixierungsrate des RuBisCO-Enzyms laut der Enzymkinetik erreicht werden kann.

Die CTR wird mit dem Stoffübergangskoeffizient ( $k_{ia}$ ) abgeschätzt und während der Kultivierung bei Bedarf erhöht, um die Mikroorganismen immer mit ausreichendem Substrat zu versorgen. Der Gaseintrag kann durch die Erhöhung der Begasungsrate, Strömung in der Flüssigphase oder durch den  $\text{CO}_2$ -Partialdruck erhöht werden. [110, 117, 118] Durch die Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Partialdruckes in der Gasphase löst sich mehr  $\text{CO}_2$  im Kulturmedium. Dies bewirkt eine höhere Konzentrationsdifferenz zwischen der Flüssigphase und der Zelle und lässt den Partialdruck  $p\text{CO}_2$  im Cytoplasma steigen. In der Regel wird angenommen, dass die  $\text{CO}_2$ -Konzentration der Interzellularen wenig von der Umgebungskonzentration abweicht [76] und daher steht die  $\text{CO}_2$ -Fixierungsrate des RuBisCO-Enzymes in direktem Verhältnis zur  $\text{CO}_2$ -Konzentration der Umgebung ( $p\text{CO}_2$ ). Das Enzym erreicht im luftgesättigten Wasser ( $c(\text{CO}_2,l) = 13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $T=25^\circ\text{C}$ ) keine Sättigung und somit die Zelle auch nicht die maximale Photosyntheserate. [76] Das ist für die meisten anderen photosynthetischen Mikroorganismen typisch. Oftmals wird RuBisCO stark überexprimiert, um bei natürlichen Bedingungen ( $p\text{CO}_2=0,04\%$ ) trotzdem genug  $\text{CO}_2$  fixieren zu können. Eine Erhöhung des  $p\text{CO}_2$  in der Umgebung und somit auch im Cytoplasma bietet das Potenzial für eine schnellere Photosynthese pro Photosynthese-Einheit [69], was eine höhere Biomassebildungsrate bewirken kann [240]. Jedoch ist die RuBisCO-Kinetik für *Sphagnum* nicht bekannt [185] und aus diesem Grund ist offen, welche  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Medium vorherrschen muss, um die maximalen  $\text{CO}_2$ -Fixierungsrate von Torfmoosen bei gegebenen Wachstumsbedingungen zu erreichen.

#### 4 Untersuchung der physiologischen Randbedingungen des Wachstums von Torfmoosen in Submerskultur zur Realisierung eines Photobioreaktors

Zur CO<sub>2</sub>-Aufnahme sind mehrere Studien vorhanden, die beispielweise PI-Kinetik bei mehreren CO<sub>2</sub>-Konzentration [68], den CO<sub>2</sub>-Einfluss auf die Längenzuwachs [53, 61, 183, 241] oder auf die CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate [171, 214] zeigen. Da die Messungen direkt im Freiland oder an Feldmaterial im Labor erfolgten, sind die Ergebnisse aufgrund anderer äußerer Faktoren wie z.B. Nährstoffbeschränkung [76] schwer zu interpretieren. Eine Untersuchung zur CO<sub>2</sub>-Aufnahmekinetik der *in-vitro* Torfmoose in Submerskultur in Abhängigkeit von der CO<sub>2</sub>-Konzentration in Flüssigphase liegt nicht vor. Der molare CO<sub>2</sub>-Anteil des Zugases in *in-vitro* Kultivierungen liegt bei einem Wert von 1 % (*S. fallax*, anorganisches Medium) [20], 2 % (*S. palustre*, *S. squarrosus* und *S. fallax*, organisches Medium) [19] oder 0,04 % als reine Luftbegasung (*S. palustre*, organisches Medium) [17]. Der gewählte CO<sub>2</sub>-Partialdruck ist in den Publikationen nicht begründet, was weiter bestätigt, dass kein optimaler pCO<sub>2</sub> für *Sphagnen* in Submerskultur bekannt ist.

Das folgende Experiment untersucht einen möglichen Zusammenhang zwischen dem CO<sub>2</sub>-Partialdruck im Zugas und der produzierte Torfmoosmenge in Schüttelkolben. Es wurde vermutet, dass ein erhöhter pCO<sub>2</sub> zu einem schnelleren Wachstum aufgrund der höheren Menge an gelöstem CO<sub>2</sub> in der Flüssigphase führt. Um die Hypothese zu testen, wuchs *S. palustre* unter Standardbedingungen bei zwei eingestrahelten Photonendichten (100 und 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) mit vier verschiedenen molaren CO<sub>2</sub>-Anteilen im Zugas (siehe Tabelle 4-2). Die maximale gelöste CO<sub>2</sub>-Konzentration im Kulturmedium (c(CO<sub>2</sub>,l)) wurde anhand Henry-Gesetz für eine Temperatur von 20 °C und Flüssigphase Wasser berechnet. [118] Der Versuch wurde in zweifacher Bestimmung durchgeführt und für PFD = 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> und für x<sub>CO2</sub>=0,04 % und 1 % wiederholt .

Tabelle 4-2: CO<sub>2</sub>-Versuchsreihe zur Untersuchung des Einflusses von CO<sub>2</sub>-Konzentration im Zugas auf das Wachstum von *S. palustre*. x<sub>CO2</sub> ist der volumetrische Anteil des C<sub>02</sub> im Zugas in % und ppm, c(CO<sub>2</sub>,g) ist die molare von CO<sub>2</sub>-Konzentration im Zugas und c(CO<sub>2</sub>,l) ist die molare von CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Flüssigphase berechnet anhand Henry-Gesetz mit Henry-Konstante (H<sub>CO2,H2O,25 °C</sub>)=1,70 g·L<sup>-1</sup>·bar<sup>-1</sup> und pCO<sub>2</sub>= c(CO<sub>2</sub>,g)·0,01.

x <sub>CO2</sub> (%)   (ppm)	0,04   400	1   10 000	2   20 000	3   30 000
c(CO <sub>2</sub> ,g) (μmol·L <sup>-1</sup> )	17,9	446,4	892,9	1339,3
c(CO <sub>2</sub> ,l) (μmol·L <sup>-1</sup> )	15,5	386,4	772,7	1159,1

Die Ergebnisse der Endbiomassekonzentration sind in Abbildung 4-9 dargestellt. Die Kultivierung bei einer PFD= 100 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> lieferte keine signifikant unterschiedliche Endbiomassekonzentration zwischen den variierten molaren CO<sub>2</sub>-Anteilen im Zugas. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei PFD = 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> sowohl die reine Luftbegasung als Begasung mit CO<sub>2</sub>-angereicherter Luft (x<sub>CO2</sub>=1 %) nicht ausreichend für das Wachstum. Die Erhöhung des x<sub>CO2</sub> im Zugas auf 2 % resultierte in c(BTM) von 7,06 ± 0,81 g·L<sup>-1</sup>. Dies unterschied sich signifikant von den c(BTM) bei x<sub>CO2</sub>=0,04 und 1 %. Ein Vergleich zu x<sub>CO2</sub>=3 % war statistisch nicht möglich, da der zweite Kolben während der Kultivierung kontaminiert wurde.

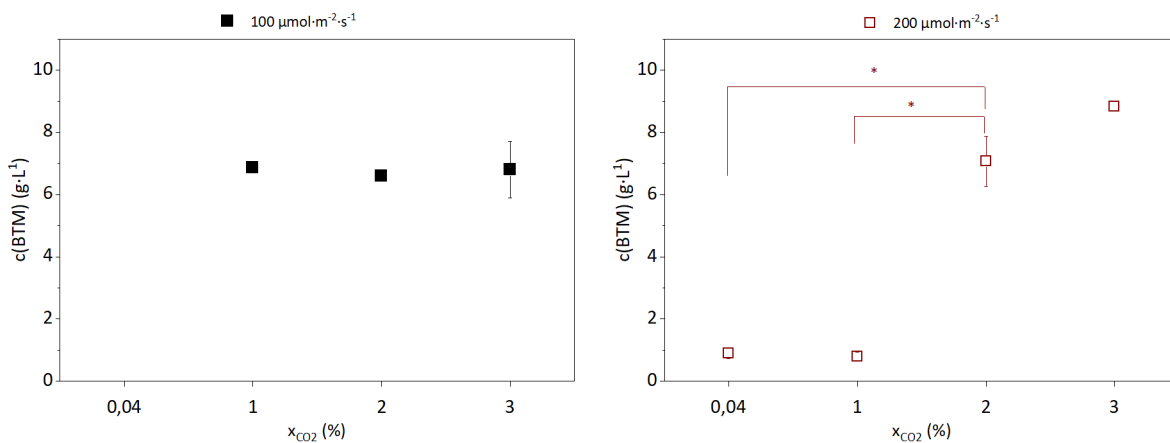


Abbildung 4-9: Überblick der Endbiomassekonzentrationen aus dem Experiment zur Untersuchung des Wachstum von Torfmoosens von *S. palustre* bei variiertem CO<sub>2</sub>-Anteil bei PFD= 100 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (A) und 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (B). Abgebildet sind Mittelwerte der Duplikate mit ihren Standardabweichungen. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (p<0,05). Kultivierungsbedingungen: T<sub>K</sub>= 20±1 °C, 250 mL 1,0-faches Knop-Medium, pH<sub>Anfang</sub>=4,0, Dauerlicht, V<sub>G</sub>= 20 mL·min<sup>-1</sup>, t<sub>p</sub>= 35 d. Anzahl an Kolben pro Parameter: 2, n=1.



Aus den Ergebnissen geht hervor, dass bei  $PFD=100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  das Licht das Wachstum limitiert. Anhand von PI-Kurven für *S. palustre* [167] und andere Moosspesies [56, 138, 148, 214] liegen die  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  im Lichtlimitierungsbereich. Da das photosynthetische System noch nicht durch Licht gesättigt ist, ist die maximale Kapazität der Photonenabsorption sowie die Energiegewinnung nicht erreicht. Somit steht nicht ausreichend Energie zur Verfügung für Calvin-Zyklus, in welchem die fixierten  $\text{CO}_2$  in für Wachstum benötigten Kohlenstoffverbindungen umgewandelt wird. Daher ist es denkbar, dass die erhöhte  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit keine Wachstumsverbesserung bewirken konnte, weil die Lichtverfügbarkeit, die spezifische Wachstumsrate und die  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate in direktem stöchiometrischem Zusammenhang stehen. Die hier beschriebenen Rückschlüsse dürfen nicht mit den Ergebnissen von Jauhiainen et al. [68] gleichgesetzt werden, wo die Photosyntheserate von *S. fuscum* bei  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mit steigendem  $p\text{CO}_2$  zunahm. Die untersuchten  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken waren im Bereich von 350 bis 2000 ppm ( $x_{\text{CO}_2}=0,035\% - 0,2\%$ ), was deutlich unter den hier gezeigten Werten ist. Aus diesem Grund ist es möglich, dass bei den Messungen die Photosynthese sowohl Licht als auch  $\text{CO}_2$ -limitiert war und daher ein  $\text{CO}_2$ -Effekt auf die Photosyntheserate messbar war.

Bei einer PFD von  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  wechselt die Limitierung von Licht zu  $\text{CO}_2$ . Die reine Luftbegasung ( $c(\text{CO}_2)=16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) sowie 1 % an  $\text{CO}_2$  war nicht ausreichend, um die Photosynthese zu sättigen. Dies ist im Einklang von der Aussage von Schöpfer [76], dass den meisten Pflanzen die normale  $\text{CO}_2$ -Konzentration eine begrenzende Wirkung auf das Wachstum hat. Für aquatische *Sphagnen* postulierte Roelofs et al. [242], dass eine zu niedrige  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Schlenkenwasser teilweise für das fehlende Wachstum verantwortlich sein könnte. [112] Für Bultenarten findet das Wachstum ab einer  $c(\text{CO}_2)=200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [53] oder  $560 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [241] statt. Es scheint, dass die *Sphagnen* eine minimale  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Wasser benötigen, um wachsen zu können. Dies geht auch aus den Ergebnissen von Paffen et al. [112] hervor. Eine gelöste  $\text{CO}_2$ -Mindestkonzentration von  $750 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ist notwendig für *S. cuspidatum* und erst bei  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  konnte einen signifikant höheren Längenzuwachs beobachtet werden.  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  entspricht ungefähr einem Partialdruck von 2,6 kPa ( $x_{\text{CO}_2}=2,6\%$ ) in der Luft. Dieses Phänomen könnte mit einem hohen  $K_m$  des RuBisCO-Enzymes der Torfmoospflanze zusammenhängen. Da aber die RuBisCO-Kinetik bei Moosen sehr wenig untersucht wurde [69] bzw. nur eine Feldmessung bezüglich der maximalen Fixierungsrate von RuBisCO in  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  vorliegt [214], kann keine vollständige Erklärung der hier beschriebenen Befunde gegeben werden. Nichtsdestotrotz ist es aus hier gezeigten Ergebnissen ersichtlich, dass der molare  $\text{CO}_2$ -Anteil im Zugas bei einer PFD=  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und Begasungsrate von  $20 \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mindestens bei 2 % liegen sollte. Ohne weitere Bestimmung des  $p\text{CO}_2$  im Medium während der Gesamtkultivierung ist auch nicht sicher, ob  $x_{\text{CO}_2}$  von 2 % mit voranschreitender Kultivierungsdauer reicht, die  $\text{CO}_2$ -Transportrate über der  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate zu halten, damit die Moose mit ihrer maximalen Photosyntheserate wachsen können.

Des Weiteren ist ein Trend der Steigerung der Biomassekonzentration durch zunehmenden molaren  $\text{CO}_2$ -Anteil (von 2 bis 3 %) zu erahnen, allerdings sollte der Versuch wiederholt werden, um diese Beobachtung bestätigen zu können. Die Literaturdaten deuten darauf hin, dass eine Steigerung der  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit die Netto-Photosyntheserate [68] sowie die Innovationsanzahl [183] bewirkt. Smolders et al. [53] fand auch diesen Zusammenhang zwischen der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Wasser und der Bildung neuer Innovationen in *S. cuspidatum*. Im Gegensatz dazu hatten höhere Konzentration an  $\text{CO}_2$  in der Flüssigphase ( $750 - 5000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \sim x_{\text{CO}_2} = 2 - 12,9\%$ ) keinen signifikanten Einfluss auf die Wachstumshöhe von *S. magellanicum* bei einer PFD= $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $17^\circ\text{C}$ . [53] Der N-Gehalt im Capitulum lag unabhängig von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration ungefähr bei  $8,8 \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , was im Vergleich zu anderen Daten [93, 241, 243, 244] auf eine Stickstoff-Limitierung (siehe Abbildung 6-12) hindeutet. Vermutlich war wegen des N-Mangels die vermehrte RuBisCO-Synthese bei höheren Partialdrücken nicht möglich und die Carboxylierungsrate konstant, was ähnliche Wachstumsraten bzw. Längenzuwachs zur Folge hatte. Eine Untersuchung zur  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate abhängig vom  $p\text{CO}_2$  bei gleichzeitiger Ermittlung des RuBisCO-Gehaltes könnte diese Hypothese bestätigen. Ein Widerspruch zu diesen Beobachtungen liefert Jauhiainen und Silvola [68], in deren Experimente eine höhere C-Verfügbarkeit von 350 auf 2000 ppm ( $x_{\text{CO}_2}=0,04 - 0,2\%$ ) eine höhere  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate für *S. fuscum* bedeutete. Silvola [171] erweiterte den untersuchten Bereich bis zu 10 000 ppm (1 %) und stellte eine weitere Steigerung der Photosyntheserate fest. Eine weitere Erhöhung des molaren  $\text{CO}_2$ -Anteil im Zugas von 0,5 % auf 5 % und 10 % resultierte in Steigerung des Trockengewicht von submers kultiviertem *S. cuspidatum* [61].

Diese Daten zeigen, dass ein erhöhtes  $p\text{CO}_2$  (3- 10 %) eine weitere Steigerung der Biomassekonzentration bewirken könnte. Dies sollte in weiteren Experimenten näher untersucht werden und dabei auf das Nährstoffangebot geachtet



#### 4 Untersuchung der physiologischen Randbedingungen des Wachstums von Torfmoosen in Submerskultur zur Realisierung eines Photobioreaktors

werden. Außer den Indizien aus der Literatur spricht dafür auch die Tatsache, dass die oberste Torfschicht oft höhere  $\text{CO}_2$ -Konzentration als die atmosphärische wegen der aeroben und anaeroben Zersetzung aufzeigt. [54, 171] Die Werte liegen zwischen  $100\text{-}5000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , was in einem Reaktor mit einem molaren  $\text{CO}_2$ -Anteil im Zugas von  $0,26 - 13 \%$  zu vergleichen ist.

### 4.5.3 Variation der eingestrahle Photonenflussdichte

Das Ziel von diesem Experiment, war den Einfluss der eingestrahnten Photonenflussdichte auf die produzierten Torfmoosmengen in Submerskultur zu untersuchen. In den Arbeiten, wo die Torfmoose in Bioreaktoren gezüchtet wurden, liegen die eingestrahnten Photonenflussdichten bei  $105$  [20],  $120$  [17] oder gestuft von  $150$  bis  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , [19] und in Schüttelkolben bei  $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  [19]. Da die Begründung der gewählten PFD nicht vorliegt und außerdem bis jetzt keine Experimente bezüglich der Lichtmenge mit *in-vitro* kultivierten Torfmoosen durchgeführt wurden, lag es nahe, Experimente zur Untersuchung der eingestrahnten Photonenflussdichten auf die submers kultivierte Mooskultur von *S. palustre* durchzuführen. Der Untersuchungsbereich lag zwischen  $100 - 500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Anhand an Freilandmaterial ermittelten PI-Kurven handelte sich um PFD in Lichtlimitierungs- und Lichtsättigungsbereich [68, 139, 245].

Die Ergebnisse der End-Biotrockenmasse, abhängig von der eingestrahnten Photonenflussdichte, zusammen mit den photographischen Aufnahmen der Mooskultur sind in Abbildung 4-10 gezeigt. Mit steigender Photonenflussdichte erreichten die Torfmoose höhere Biomassekonzentrationen  $c(\text{BTM})$  aber aufgrund von fehlender zweifacher Bestimmung, bedingt durch aufgetretene Kontamination, kann keine Aussage über Signifikanz der Ergebnisse getroffen werden. Aus dem Grund können auch keine Rückschlüsse über den Einfluss der eingestrahnten Photonenflussdichte auf die Torfmoosproduktivität gezogen werden.

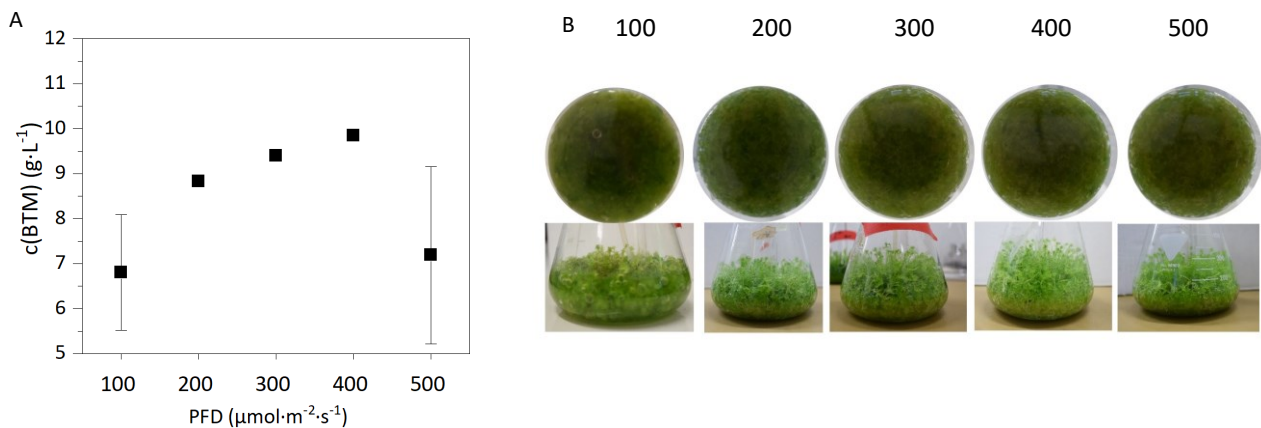


Abbildung 4-10: Vergleich des Einflusses der eingestrahnten Photonenflussdichte auf das Wachstum von *S. palustre*. A) Überblick der Endbiomassekonzentrationen aus dem Experiment zur Untersuchung des Wachstum von Torfmoosen von *S. palustre* bei variiert Photonenflussdichte und einem  $\text{CO}_2$ -Anteil von  $3,3 \%$ . Abgebildet sind die Mittelwerte der Duplikate mit Standardabweichung. B) Vergleich der Mooskultur. Abgebildet ist die photographische Aufnahme der Mooskultur durch den Schüttelkolbenboden und frontal. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $250 \text{ mL}$  1,0faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerlicht,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $t_p = 35 \text{ d}$ . Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n = 1$ .

Unter Berücksichtigung der photographischen Aufnahmen der Mooskultur (Abbildung 4-10 B) ist eine Tendenz zu erkennen. Die Torfmoose wuchsen bei höheren Lichtmengen sichtbar aus dem Medium heraus und nahmen mehr Kolbenvolumen ein. Ab einer PFD  $> 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  wies die unterste Torfmooschicht eine Gelbfärbung auf, während die obersten Schichten grün geblieben sind. Eine Gelbfärbung ist wahrscheinlich auf den Chlorophyllabbau zurückzuführen, was die Ergebnisse der Chlorophyllbestimmung in einem parallellaufenden Experiment im Moosbettreaktor (Abbildung 6-19) bestätigten. Die Ursache des Chlorophyllabbaus könnte entweder auf ein hohes Lichtangebot oder auf eine Nährstofflimitierung hindeuten.

Bei einem höheren Lichtangebot kann die gesamte absorbierte Energie von Chloroplasten nicht abfließen, weil bereits die maximale Umsatzrate des  $\text{CO}_2$  erreicht wird. [118] Entweder dissipiert die Zelle die Energie per *non-photochemical*

*quenching* (NPQ) in Form von Wärme [59, 133, 169] oder spart die Chlorophyllen ein, in dem die Chlorophyllmoleküle abgebaut werden und somit auch wenig Lichtenergie absorbiert wird. Die Lichtwirkung auf den Chlorophyllgehalt beobachtete Rudolph [132] und postulierte, dass eine erhöhte Lichtstärke (von 5000 auf 10000 Lux), also ungefähr von 50 auf 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  einen Chlorophyllabbau zur Folge hat, was zum Vergilben führt. Dieser Effekt tritt im Vergleich zu Freilandmoosen [68, 139, 167] deutlich früher auf, weil in der Natur die *Sphagnen* bei deutlich höheren Lichtintensitäten (über 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) wachsen müssen, um den Pigmentabbauerscheinungen zu bewirken [132, 164]. Eine Begründung für die unterschiedliche Empfindlichkeit der *in-vitro* und Freilandmoosen gibt es in der Literatur nicht. Ein einziger Hinweis liegt in der Studie von Rudolph [132], wo durch einen Austausch der Lichtquelle (Osram HQI TS power Starlampen anstatt Osram Leuchtstoffröhren) unter höheren Lichtintensitäten bessere Resultate des physiologischen Zustand erzielt wurden. Daher scheint die spektrale Energieverteilung der künstlichen Beleuchtung einen Einfluss auf den Chlorophyllgehalt der Dauerkultur zu haben.

Als zweite Ursache könnte der Chlorophyllabbau auch auf eine Nährstofflimitierung zurückgeführt werden, da in den Medien von 200 - 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  Mooskultur nach Tag 28 der Kultivierung kein Stickstoff mehr vorhanden war (siehe Abbildung 0-2). Trotz dem nicht signifikanten Unterschied der produzierten Torfmoosbiomasse bei verschiedenen Photonenflussdichten scheint es, dass mehr Biomasse produziert wurde, da das ganze Nitrat im Medium zum ersten Mal verbraucht wurde. Dass ein Stickstoffmangel zum Chlorophyllabbau führt, wurde für Mikroalgen [212] und Pflanzen [246] bereits bewiesen, für die Torfmoose wird drauf hingedeutet. [169] In der Studie von Petersen [138] wurde erwähnt, dass der Chlorophyllabbau in der Langzeitkultur durch Verbesserung des Nährstoffangebotes minimiert werden kann, jedoch wurde nicht erläutert, um welche Nährstoffe sich handelt. Ob die Torfmoose tatsächlich eine N-Limitierung erfahren, ist trotz dem kompletten N-Verbrauch nicht eindeutig. Der theoretische N-Gehalt der Mooszelle in diesem Experiment liegt rechnerisch bei  $14\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  und dieser Wert liegt im Bereich des Wachstums von Torfmoosen ohne N-Limitierung. [93, 241, 243, 244] Nach den vorliegenden Ergebnissen gibt es einen Hinweis darauf, dass eine Photonenflussdichte über 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  im Vergleich zu 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  das Wachstum von *S. palustre* steigern könnte, allerdings treten Chlorophyllabbauerscheinungen auf.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist es wichtig zu erwähnen, dass die ermittelte Endbiomassekonzentration kein Resultat von einer konstanten Wachstumsrate in der Kultivierungsdauer ist. Deshalb ist es unmöglich, eine PFD-Kinetik im Kolben zu ermitteln, wie es z.B. für die einzellige Mikroalge *Chlorella vulgaris* [212] oder für *Physcomitrella patens* im Protonema-Stadium [101, 121, 229] der Fall war. Moose als mehrzellige Organismen erfahren keine homogene und dreidimensionale Durchmischung im Schüttelkolben. Im Vergleich zu einer Mooskultur in Blasensäule sind die Moospflanzen, abhängig von deren Ort im Reaktor, einer bestimmte Lichtintensität ausgesetzt. Ein Lichtgradient entlang des Kolbens ergibt sich aus der Tatsache, dass das Licht nicht mischbar ist und von den aufeinanderliegenden Schichten innerhalb der Mooskultur unterschiedlich absorbiert wird. [118, 173] Somit herrschen keine homogenen Lichtverhältnisse innerhalb der Mooskultur, was sich in unterschiedliche Photosyntheserate bzw. Biomassebildungsraten der einzelnen Moospflanzen auswirkt.

Ein Lichtgradient in der Mooskultur ist in Abbildung 4-11 dargestellt. In einer 6 cm Mooschicht wurde auf verschiedenen Höhen das transmittierte Licht und dessen Emissionsspektrum gemessen. Bereits nach 1 cm Mooschicht drang lediglich 5 % des eingestrahnten Lichts durch den Moosteppich durch. Mit steigender Mooschichttiefe sank das transmittierte Licht einhergehend mit Senkung des Blauanteils im Wellenlängenbereich von 430 bis zu 490 nm und Zunahme der Grünanteil im Wellenbereich von 490 bis zu 575 nm (Tabelle 0-6). Dies beobachtete auch Proctor [72, 73], wo unter der Naturbedingungen 1 % des eingestrahnten Lichts zwischen 1-2 cm in dichten Rasen und ca. 4-5 cm bei einem lockerem Moosteppich transmittierte. Werden diese Informationen mit der PI-Kurven [68, 139, 245] verknüpft, kann das Mooswachstum im Kolben folgend erklärt werden:

#### 4 Untersuchung der physiologischen Randbedingungen des Wachstums von Torfmoosen in Submerskultur zur Realisierung eines Photobioreaktors

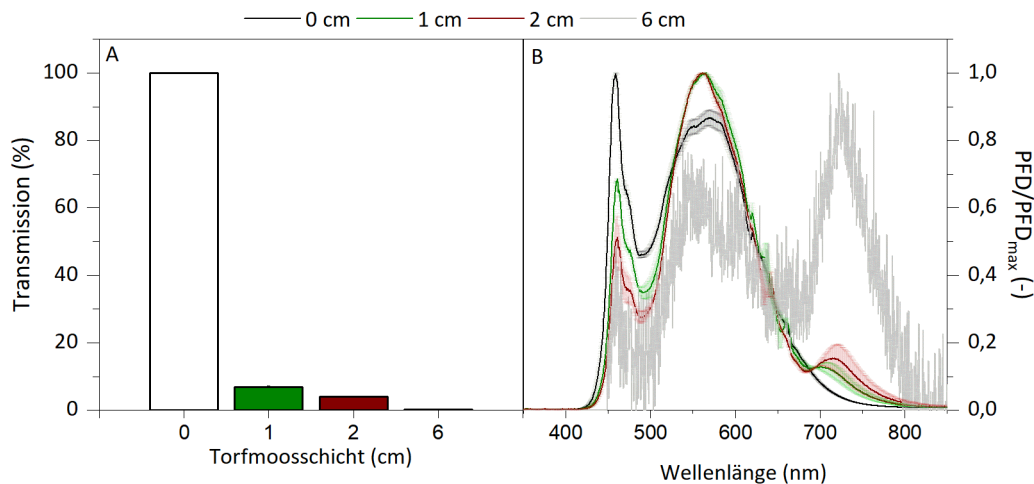


Abbildung 4-11: Lichtgradienten mit deren Spektrum entlang des im Moosbettreaktor gewachsenen Torfmooses *S. palustre*. A) Transmittiertes Licht durch die Torfmoossschicht. Abgebildet sind Mittelwerte der Duplikate mit ihren Standardabweichungen. B) Emissionsspektrum des transmittierten Lichts. Die y-Achse ist die maximale Photonenflussdichte. Die Torfmooses stammten aus einer Moosbettkultivierung mit folgenden Kultivierungsparameter:  $T_R = 20\text{ }^\circ\text{C}$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_g = 25\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 1\%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800\text{ mL}$  und wöchentlichem Medienwechsel.

Zum Beginn der Kultivierung schatteten sich die inokulierten Torfmoose nicht ab und erfahren daher eine ähnliche Lichtintensität im Kolben. Ob es sich um Intensität aus dem Lichtlimitierungs- oder Lichtsättigungsbereich handelt, kann ohne weitere PI-Kurve für *in-vitro* kultivierte *Sphagnen* nicht erläutert werden. Das gesamte Licht wird von der am nächsten zur Lichtquelle Schicht absorbiert. Die inokulierten Moospflanzen wachsen mit ihrer PFD-abhängige Wachstumsrate. Mit voranschreitender Vermehrung des Inokulums füllen die Moose den Kolbeninhalt auf. Die Wachstumsrate bleibt auf dem Kolbenboden gleich, unter der Annahme, dass alle andere Faktoren nicht limitierend wirken. Die darüberliegende Moossschicht wächst mit einer geringeren Wachstumsrate, welche abhängig von der geringeren Lichtverfügbarkeit, [56, 68, 138, 148, 149, 152] bedingt durch die Absorption der vorherigen Schicht, ist. Dadurch unterscheiden sich die Wachstumsrate der einzelnen Moossschichten voneinander abhängig von deren Position auf dem Lichtweg. Eine mi-Integration über den Gesamtkolben konnte eine Auskunft über die Wachstumsrate in jedem untersuchten Kolben geben.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Eindringtiefe des Lichts in Mooskultur sehr niedrig (unter 1 cm) ist. Da in den Schüttelkolben keine nennenswerte Durchmischung der Moose erfolgt, werden die einzelnen Mooszellen mit unterschiedlichen Lichtintensitäten beleuchtet, welche verschiedene Wachstumsrate bewirken. Insgesamt sollte sich bei komplett absorbiertem Licht ein linearer Wachstumsverlauf ergeben.

#### 4.5.4 Einfluss von Hell/Dunkel-Zyklen

Ziel des nächsten Experiments war es, den Einfluss der Hell/Dunkel-Zyklen auf die Biomasseproduktion von *S. palustre* zu untersuchen. Da das Bereitstellen des Inokulums für die groß-skalige Produktion zuerst im Labor erfolgen sollte, könnte die kürzere Beleuchtungszeit des Photobioreaktors die verbrauchte Energie in den künstlichen Lichtmodulen sparen. Aus der Literatur ist sehr wenig zum Einfluss der Tag/Nacht-Zyklen (circadian Rhythmik), bzw. Hell/Dunkel-Zyklen (konstante PFD in der Hellphase) bei Torfmoosen bekannt. Frahm [58] kultivierte die Moose mit einem 12/12 stündigen Hell/Dunkel-Zyklus, Heck et al. [19] die Torfmoose *S. palustre*, *fussum* und *scurrosum* mit 20/4-Zyklus ( $\text{PFD} = 150\text{-}500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), Rudolph [20] *S. fallax* bei 14 h Hell ( $\text{PFD} = 105\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;  $T = 20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) und 10 h Dunkel ( $15 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ), oder Beike et al. [17] *S. palustre* unter Dauerlicht ( $\text{PFD} = 120\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Die Wahl der einzelnen Zyklusdauer wurde nicht begründet. Andere Studien über das Wachstum von *in-vitro* Torfmoosen abhängig von der Hell/Dunkel-Zyklen sind aktuell nicht vorhanden. Die einzigen bekannten Experimente, durchgeführt an Freilandmaterial, beschäftigen sich lediglich mit infraradianer [154], saisonaler Rhythmik und mit Jahresrhythmus [153]. Daher bleibt es offen, wie das Torfmoos auf die Hell/Dunkel-Zyklen unter photoautotrophen Kultivierungsbedingungen reagiert und ob ein Einfluss auf die Biomassebildungsrate besteht. Es wurde in einem Experiment *S. palustre* in den Schüttelkolben bei zwei Hell/Dunkel-Zyklen (20/4

und 16/8) mit einer konstanten Lichtintensität in der Hellphase von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  unter Standardbedingungen in zweifacher Bestimmung kultiviert. Als Vergleichsmaßstab war die Kultur unter Dauerlicht (24/0).

Die Ergebnisse der End-Biomassekonzentration (Abbildung 4-12 A) zeigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Hell/Dunkel-Zyklen vorliegt. Dies bedeutet, dass die Torfmoose trotz der geringeren Lichtverfügbarkeit keinen Wachstumsnachteil im Vergleich zu den Moosen (24/0) in der Hell-Phase erfahren. Dies ist in der Abbildung 4-12 B zu sehen, wenn die produzierte Biomasse ( $c(\text{BTM})$ ) auf die Länge der Hellphase und Kultivierungsdauer bezogen wird. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen produzierten Biomassekonzentration in einer Hellphase im Vergleich zur Kontrolle (24/0). Dies deutet darauf hin, dass die durchschnittliche Wachstumsrate in allen drei Tag/Nacht-Zyklen gleich war, aber pro Lichtzeit sich verändert hat. Dies ist im Einklang mit der Beobachtung von Hillman [247] bei Tomatenpflanzen, in der die Pflanzen mit einem 12/12-Zyklus schneller als im Dauerlicht wuchsen, obwohl sie im Dauerlicht doppelt so viel photonische Energie erhielten.

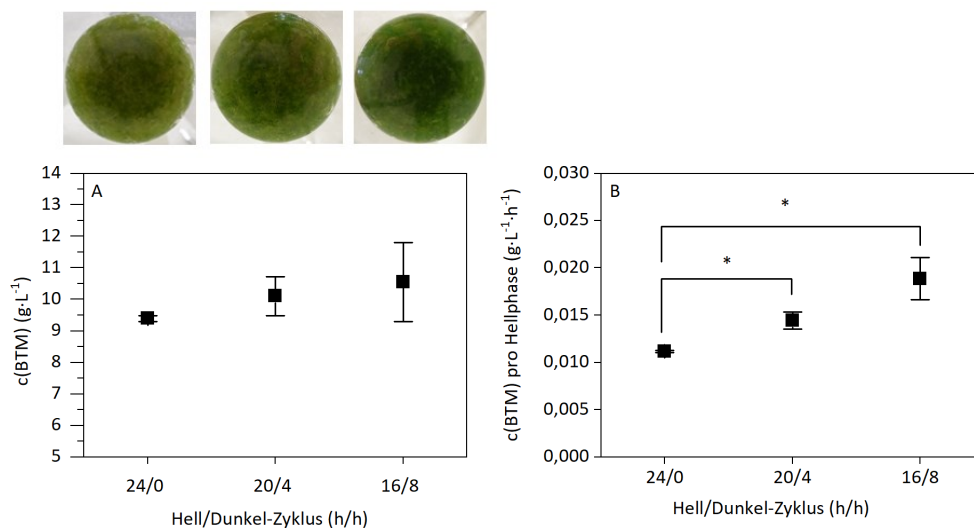


Abbildung 4-12: Vergleich des Einflusses der Hell/Dunkel-Zyklen auf das Wachstum von *S. palustre*. A) Endbiomassekonzentration bei Dauerbeleuchtung (24/0), 20 h hell und 4 h dunkel (20/4) und 16 h hell und 8 h dunkel (16/8); B) Die durchschnittliche tägliche produzierte Biomasse bezogen auf die Dauer der Hellphase. Abgebildet sind Mittelwerte der Duplikate mit ihren Standardabweichungen. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Kultivierungsbedingungen:  $T_K=20$  °C, 250 mL 1,0faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$ ,  $V_G=20$  mLmin $^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2}= 3$  %,  $\text{PFD}= 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $t_p= 35$  d. Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=1$ .

Diese Befunde lassen sich auf drei Arten interpretieren:

1) Die Torfmoose legen in der Hellphase Speicherstoffe [245, 248] an, die während der Nachtphase veratmet werden, um die Energie zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels zu decken. Ob das Veratmen der Speicherstoffe die Energie für die Biomasseproduktion in der Dunkelphase bereitstellt, ist jedoch unwahrscheinlich. Ohne weitere Methode zur Biomassebestimmung und Analyse der Zellzusammensetzung vor und nach der Dunkelphase kann diese Hypothese nicht belegt werden.

2) Eine zweite mögliche Erklärung für diesen Befund könnte mit der Wachstumsrate in der Hellphase zusammenhängen, welche aufgrund der vorhandenen Nachtphase höher war. In der Nachtphase fließt die Energie in die Reparatur von Proteinen. Da die Nitrat-Assimilation aufgrund von Bispezifität der Nitratreduktase bei Torfmoosen auch in der Nacht möglich ist [190], ist es wahrscheinlich, dass genügend Stickstoff in der Zelle für die Protein-Reparatur in der Dunkelphase zur Verfügung steht. Eine höhere Menge an funktionellen Proteinen bzw. Enzymen könnte die Lichtnutzung in der Hellphase während der Biomassebildung positiv beeinflussen. Um dies zu belegen, ist eine Messung der Photosyntheserate der Moospflanze, komplette Analyse der Proteinausstattung der Torfmoospflanze, sowie der Zellzusammensetzung vor und nach der Dunkelphase bzw. während der Kultivierungsdauer notwendig.

Darüber hinaus ist es bekannt, dass die circadianen Rhythmen verschiedene biologische Vorgänge in den höheren Pflanzen, wie z.B. Enzymaktivität oder Transkription von Genen des Photosyntheseapparates steuern. [76] Unter anderem

#### 4 Untersuchung der physiologischen Randbedingungen des Wachstums von Torfmoosen in Submerskultur zur Realisierung eines Photobioreaktors

---

werden bei Moosen (*Physcomitrella patens*) die Gene für die Chlorophyll-a/b-bindenden Proteine (*Lhcb*) über den Circadianrythmus gesteuert. [76, 249, 250] Dies könnte bedeuten, dass sich eine längere Hellphase negativ auf die Chlorophyll-Bildung auswirkt, was in einem geringeren Chlorophyll-Gehalt einhergehend mit der geringeren absorbierten Lichtenergie resultiert. Dies kann sich am Ende in eine Verringerung der Photosyntheseleistung und die Abnahme der Biomassebildungsrate widerspiegeln. Aus diesem Grund und auch weil, der Grünton der Mooskultur (Abbildung 4-12 A) bei 24/0 deutlich gelber als bei 20/4 war, liegt die Vermutung nahe, dass die Dunkel-Phase einen Einfluss auf das Chlorophyll hat. Eine Bestätigung dieser Hypothese könnte die Chlorophyllanalyse gegeben werden.

Durch diese Befunde lässt sich schlussfolgern, dass eine Energieeinsparung durch kürzere Hell-Phasen (16/8) in der Anzuchtproduktion denkbar ist.

## 5 Anpassung des Kulturmediums hinsichtlich der großtechnischen Umsetzung

Ausgehend von dem für *S. palustre* entwickelten Kulturmedium [17] wurde eine Anpassung der Medienrezeptur für die großskalige Produktion durchgeführt. Zielvorgabe war eine rein autotrophe Kultivierung, um das Kontaminationsrisiko durch eine organische C-Quelle zu vermeiden, da die Torfmoosproduktion unter unsterilen Kultivierungsbedingungen im Freiland in offenen Reaktoren ablaufen sollte. Die Machbarkeit solcher Bedingungen wurde bereits im Kapitel 4.1 nachgewiesen.

Zweitens waren die allgemein hohen Nährstoffkonzentration im Knop-Medium nicht notwendig, die im Batchprozess essentiell sind [17, 19], um eine mögliche Nährstofflimitierung während des Prozesses zu vermeiden [117]. Für die großskalige Produktion sollte ein kontinuierlicher Prozess realisiert werden, um konstante Wachstumsbedingungen der Torfmoose zu gewährleisten. Dafür wird ein weniger konzentriertes Medium, im Vergleich zum Batchprozess, benötigt. Außerdem ist das verdünnte Medium vorteilhaft, weil die Nährstoffzufuhr in künstlichen Medien deutlich höher ist, als die im Regenwasser [48], jenes eine mögliche Inhibierung des Stoffwechsels von Torfmoosen zur Folge haben könnte. [178] Wiederum bedeutet das aber nicht, dass die Nährstoffkonzentration im Medium so gering wie im natürlichen Habitat sein müssen, weil die ökologische Nische nicht dem Optimum der Wachstumsgeschwindigkeit entsprechen muss. In der großskaligen Produktion sollte die naturnahen aber optimierten Bedingungen in Bezug auf das Wachstum herrschen. Aus diesen Gründen wurde ein Experiment zur quasi-kontinuierlichen Kultivierungsstrategie (siehe Kapitel 5.2) erprobt.

Drittens war besonders die hohe Calciumkonzentration von  $169 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  im Originalmedium im Vergleich zu den Werten in der Natur (siehe Tabelle 2-2) auffällig. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass das Calcium als Gegenion im Calciumnitrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) notwendig ist. Die Vorexperimente von Heck M. (Daten nicht publiziert) beschäftigten sich bereits mit dieser Problematik und zeigten, dass die Senkung der ursprünglichen Konzentration von  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  auf 10 % bei gleichzeitiger Zugabe von  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$  sich nicht negativ auf das Wachstum von Torfmoosen auswirkte. Aus diesem Grund wurde der Calcium-Einfluss im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

Viertens sollte die Notwendigkeit beider Stickstoffquellen und ihre Eignung für den kontinuierlichen Betrieb unter Berücksichtigung der selektiven Aufnahme von Ammonium und Nitrat und den damit verbundenen pH-Effekten in Batch-Betrieb (siehe Kapitel 5.1) überprüft werden.

Als letztes wurden bekannte Kulturmedien aus dem Bereich der Photobiotechnologie [212] getestet. In solchen Medien war das Wachstum von *S. palustre* nicht zufriedenstellend (siehe Abbildung 0-13), wodurch auf die Diskussion der Ergebnisse hier verzichtet wird.

### 5.1 Einfluss der Stickstoffquelle und -konzentration auf das Wachstum von Torfmoosen

#### 5.1.1 Variation der Stickstoffquelle

Die Notwendigkeit beider Stickstoffquellen für die *Sphagnen* in Submerskultur wurde in fünf Medien mit verschiedener N-Quelle (siehe Tabelle 5-1) untersucht. Alle Medien enthielten dieselbe Menge an Stickstoff ( $10,94 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Die Ausnahme war das Nitrat-Medium, wo die gesamte Stickstoffkonzentration um 22 % geringer war, da eine Erhöhung des Nitrats gleichzeitig die Konzentration des Gegenions Calcium unerwünscht steigern würde. Die Kultivierung von Torfmoos *S. palustre* erfolgte unter Standardbedingungen in zweifacher Ausführung.

## 5 Anpassung des Kulturmediums hinsichtlich der großtechnischen Umsetzung

Tabelle 5-1: Zusammensetzung der Kulturmedien zur Untersuchung des Einflusses der Stickstoffquelle auf das Wachstum von *S. palustre*.

Medium N-Quelle	Kontrolle	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Medium	Ammonium-Medium	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -Medium	NaNO <sub>3</sub> -Medium
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,25 mmol·L <sup>-1</sup>	-	-	5,47 mmol·L <sup>-1</sup>	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	-	10,94 mmol·L <sup>-1</sup>	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	-	-	-	10,94 mmol·L <sup>-1</sup>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4,23 mmol·L <sup>-1</sup>	4,23 mmol·L <sup>-1</sup>	-	-	-
CaCl <sub>2</sub>	-	-	4,23 mmol·L <sup>-1</sup>	4,23 mmol·L <sup>-1</sup>	4,23 mmol·L <sup>-1</sup>

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-1 dargestellt. Die *Sphagnen*, gewachsen im Kontrollmedium (siehe Abbildung 5-1 A) wiesen eine gesunde grüne Farbe auf, die Größe des Capitulum betrug ungefähr 1 mm und die Moospflanzen verzweigten sich (siehe Abbildung 5-1 B). In den restlichen Medien war eine abweichende Morphologie der Torfmoose in Zusammenhang mit der angesetzten Stickstoffquelle auffällig. Im NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Medium wuchsen die Torfmoose in einer Kugelstruktur, wobei der Unterschied im NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Medium zur Kontrolle noch nicht so deutlich wie im Ammonium-Medium war. Ohne weitere Verzweigungen und die Stammstreckung der inokulierten Torfmoospflanzen bildeten sich dunkelgrüne Kugeln, deren Größe mit der angeimpften Pflanze zusammenhing. Die Innovationen waren nicht deutlich von den ursprünglichen Blättchen zu erkennen (siehe Abbildung 5-1 B). Die Wuchsform der *S. palustre* gewachsen in den Nitrat-Medien, war ähnlich zur Kontrolle, jedoch verfärbten sich die Medien nach 28 Tagen bräunlich.

Bei der Anwesenheit von beiden Stickstoffquellen wuchsen die Torfmoose am besten. Die Endbiotrockenmasse (Abbildung 5-2 A) lag am höchsten im Kontrollmedium ( $c(\text{BTM}) = 4,90 \pm 0,29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und war nicht signifikant größer als die BTM im NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Medium ( $c(\text{BTM}) = 4,90 \pm 0,81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Die geringste Biomassekonzentration erzielte das Ammonium-Medium, begleitet mit beiden nitratenthaltenden Medien. Der Unterschied war signifikant zum Kontrollmedium.

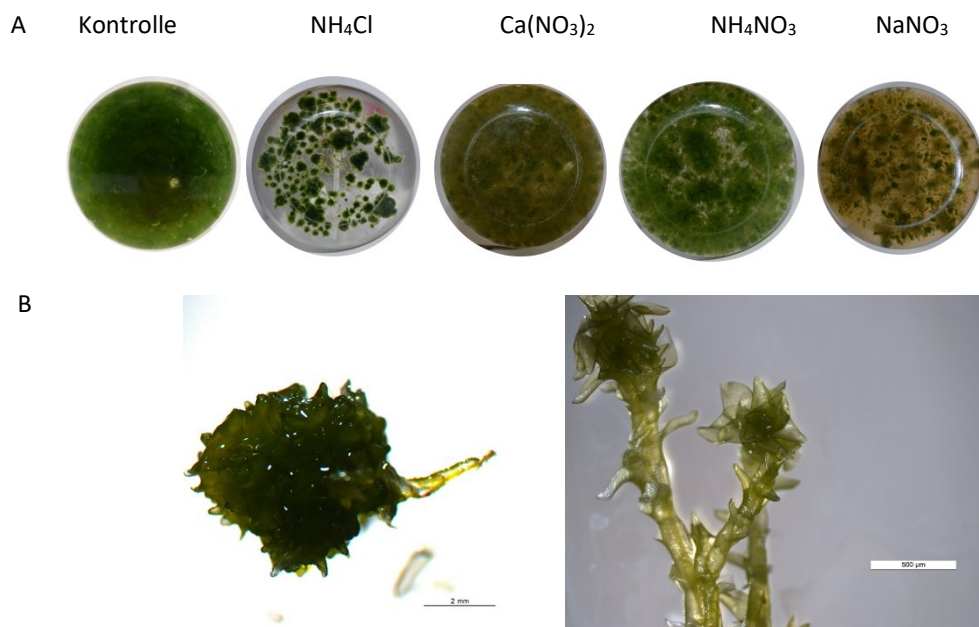


Abbildung 5-1: *S. palustre* kultiviert in fünf verschiedene N-Medien. A) Ansicht der Mooskultur am Ende der Kultivierung, photographisch aufgenommen durch den Kolbenboden. Von links: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-Medium mit 1,25 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, Ammonium-Medium mit NH<sub>4</sub>Cl mit 10,94 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, Kontrolle mit 1,25 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> und 4,23 mmol·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub>-Medium mit 10,94 mmol·L<sup>-1</sup> NaNO<sub>3</sub> und Nitrat-Medium mit 4,23 mmol·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. B) Ansicht des Torfmooses *S. palustre* unter Stereomikroskop, kultiviert in NH<sub>4</sub>Cl-Medium, der Maßstab entspricht 2 mm; und in Knop-Medium (Kontrolle), der Maßstab entspricht 500 µm. Kultivierungsbedingungen: T<sub>K</sub>= 20±1 °C, V<sub>M</sub>=250 mL Medium, pH<sub>Anfang</sub>=4,0, Dauerbeleuchtung, PFD= 100 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, V<sub>G</sub>= 20 mL·min<sup>-1</sup> mit 1 % CO<sub>2</sub> (v/v), t<sub>p</sub>= 35 d, Anzahl an Kolben pro Parameter: 2, n=1.

Ein Unterschied im pH-Verlauf, abhängig von der verwendeten Stickstoffquelle, ist aus Abbildung 5-2 B ersichtlich. In den Medien, die ausschließlich Nitrat enthielten, wurde eine stetige Zunahme des pH-Werts festgestellt, wobei im Medium mit NaNO<sub>3</sub> ab der vierten Woche der Kultivierung der pH-Wert ungefähr bei 6,8 stagnierte. Dies könnte durch die



Pufferwirkung des vorhandenen Kaliumhydrogenphosphats und Kaliumdihydrogenphosphats zustande gekommen sein. Der Verlauf des pH-Werts in den Medien mit Ammonium war gegenläufig zu den Nitratmedien. Bei einer höheren Ammoniumkonzentration ( $c(\text{NH}_4^+) = 4,23 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) sank der pH-Wert 7 Tage später auf null, als der im Kontrollmedium. Im Medium mit  $10,94 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$  wurde keine pH-Zunahme über die gesamte Prozesszeit festgestellt.

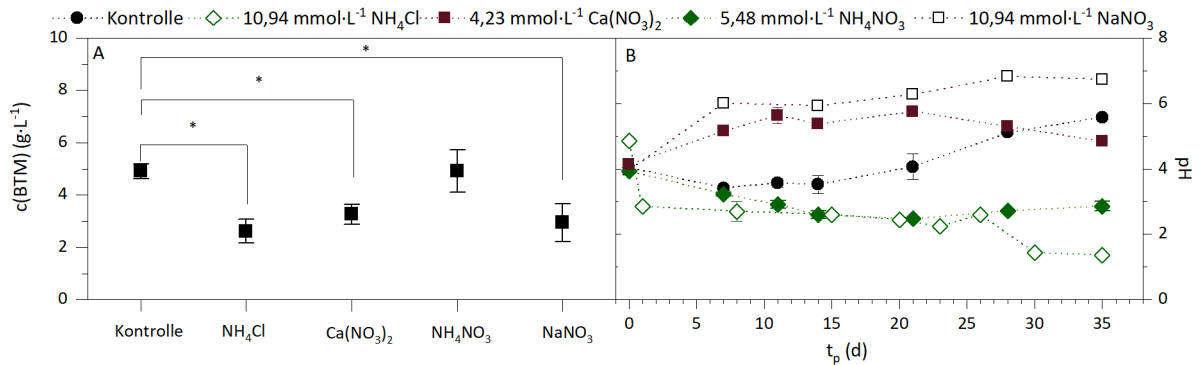


Abbildung 5-2: Prozessverlauf der Kultivierung von *S. palustre* zur Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Stickstoffquelle auf das Wachstum von Torfmoosen mit A) der Endbiotrockenmasse. Abgebildet sind die Mittelwerte der Duplikate mit ihren Standardabweichungen. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz ( $p < 0,05$ ); und mit B) dem pH Verlauf. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 mL Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 100 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p = 35 \text{ d}$ , Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n = 2$ .

In einem wiederholten Versuch mit  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ - und  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Medium wurden zusätzlich die Ionenkonzentrationen (siehe Abbildung 5-3) während der Kultivierung und die Zellzusammensetzung (siehe Abbildung 5-4) nach 14 Tagen der Kultivierung bestimmt. Die Probe zur Prozesszeit von  $t_p = 35 \text{ d}$  konnte aus technischen Gründen nicht ausgewertet werden. Durch die Aufnahme von Nitrat wurde das Medium mit voranschreitender Kultivierungszeit basischer, dagegen mit Ammonium saurer. Bei einer höheren  $c(\text{NH}_4^+)$  wurde das Ammonium um 11 Tage später als im Knop aufgenommen. Außerdem wurde in der Anwesenheit von Ammonium sowohl im Kontrollmedium als auch im  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Medium kaum Nitrat aufgenommen, während im Nitrat-Medium direkt eine leichte Abnahme der Nitratkonzentration  $c(\text{NO}_3^-)$  zu beobachten war.

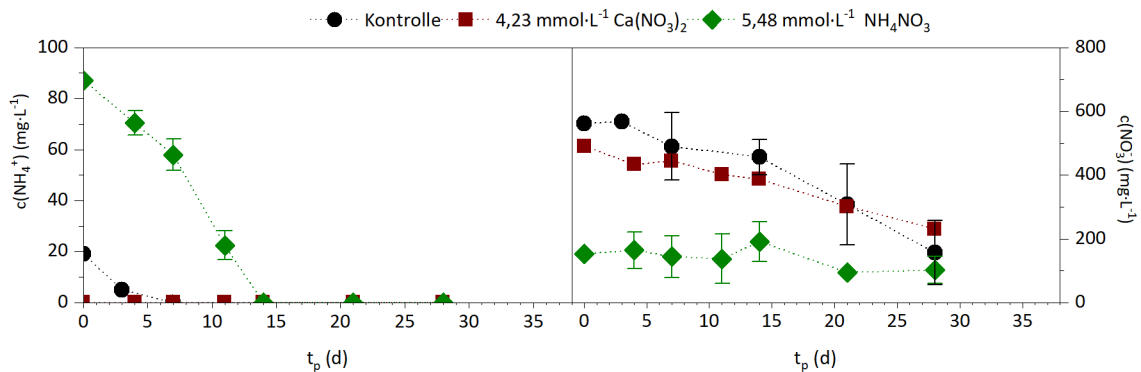


Abbildung 5-3: Prozessverlauf der Kultivierung von *S. palustre* zur Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Stickstoffquelle auf das Wachstum von Torfmoosen mit dem Verlauf der Anionenkonzentration des Nitrats  $c(\text{NO}_3^-)$ , des Phosphats  $c(\text{PO}_4^{3-})$ , und des Sulfats  $c(\text{SO}_4^{2-})$ , sowie der Kationenkonzentrationsverlauf des Ammoniums ( $c(\text{NH}_4^+)$ ), des Magnesiums ( $c(\text{Mg}^{2+})$ ), und des Calciums ( $c(\text{Ca}^{2+})$ ). Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 mL Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 100 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p = 35 \text{ d}$ , Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n = 1$ . Die abgebildeten Werten sind Mittelwerte der Duplikate, die vertikalen Balken stellen ihre Standardabweichungen dar.

Zur Prozesszeit von  $t_p = 14 \text{ d}$ , als kein Ammonium in beiden Medien mehr vorhanden war, wurde der Stickstoffgehalt und der spezifische Pigmentanteil der gesamten Mooskultur ermittelt (siehe Abbildung 5-4). Die Torfmoose, gewachsen im Ammoniumnitrat-Medium, setzten sich aus Stickstoff zu  $37,6 \pm 4,6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  zusammen, was um 33 % signifikant höher war, als der Stickstoffgehalt der Torfmoose im Kontrollmedium. Der Stickstoffgehalt der Torfmooszelle aus dem Nitrat-Medium lag bei  $15,8 \pm 0,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , war um 44 % signifikant geringer als in der Kontrolle und um 57 % signifikant weniger als im Medium mit  $5,48 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ . Ein signifikanter Unterschied der Mooszelle in ihrem Kohlenstoffgehalt  $q_{C,X}$



kultiviert in Kontrolle im Vergleich zu anderen Medien wurde festgestellt. Die spezifischen Anteile an Chlorophyll a ( $q_{chl a}$ ), b ( $q_{chl b}$ ) und Carotinoide ( $q_{car}$ ) verzeichneten teilweise einen ähnlichen Trend wie der N-Gehalt, da der spezifischen Chlorophyllanteil der Kontrolle und des Nitrat-Mediums signifikant unterschiedlich war. Beispielsweise bildeten die im Nitrat-Medium gewachsenen Torfmoose um etwa 66 % weniger Chlorophyll a, während die im  $NH_4NO_3$ -Medium ähnlich viel Pigmentmaterial wie die Torfmoose im Kontrollmedium ( $q_{chl a}=4,0 \pm 0,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $q_{chl b} = 1,7 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $q_{car}= 1,0 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) besaßen.

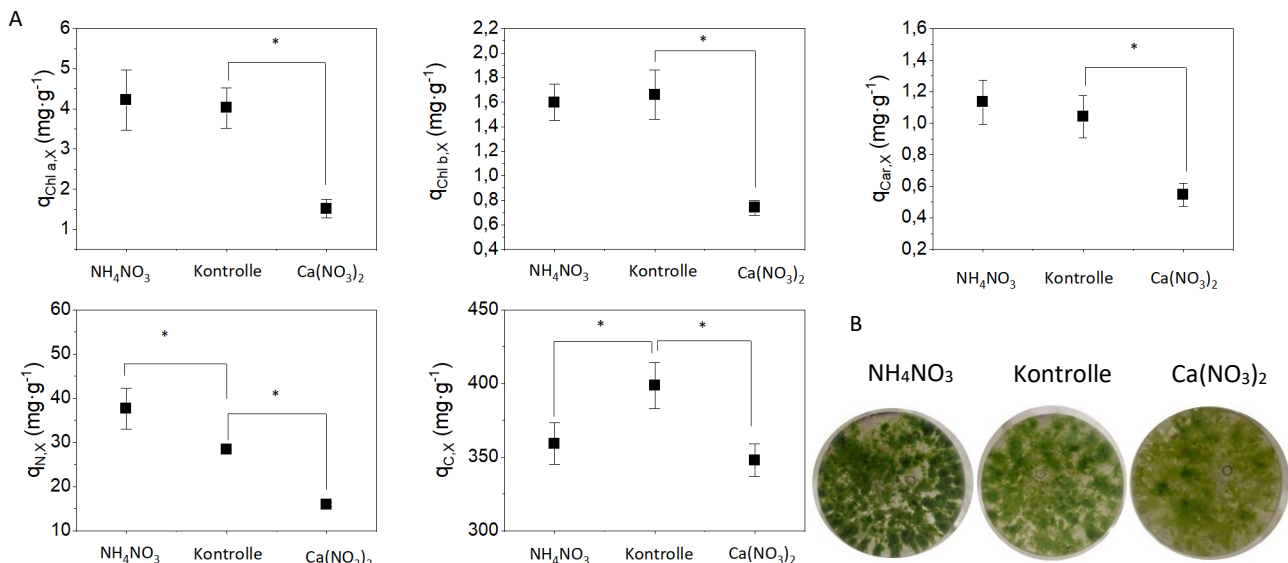


Abbildung 5-4: Zellzusammensetzung von *S. palustre* aus dem Experiment zur Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Stickstoffquelle auf das Wachstum von Torfmoosen mit A) dem spezifischen Anteil von Chlorophyll a  $q_{chl a}$ , Chlorophyll b  $q_{chl b}$  und Carotinoide  $q_{car}$  und dem spezifischen Stickstoff ( $q_{N,X}$ ), Kohlenstoffgehalt ( $q_{C,X}$ ) sowie B) Mooskultur photographisch aufgenommen zur Prozesszeit  $t_p=14$  d. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte von dreifacher Bestimmung eines Kolbens, die vertikalen Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz ( $p<0,05$ ). Kultivierungsbedingungen:  $T_K= 20\pm 1$  °C, 250 mL 1,0faches Knop-Medium,  $pH_{Anfang}=4,0$ , Dauerbeleuchtung, PFD= 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G= 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $CO_2$  (v/v),  $t_r= 14$  d. Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=1$ .

Ziel dieses Experiment war es herauszufinden, ob ein Unterschied im Wachstum von *S. palustre* bei verschiedenen N-Quellen beobachtbar ist. Durch die dargestellte Kultivierung konnte gezeigt werden, dass das Torfmoos *S. palustre* beide N-Quellen aufnehmen kann, wobei die Biomassezunahme sowie der physiologische Zustand der Mooskultur und der pH-Wert abhängig von der Qualität und Quantität der verfügbaren Stickstoffquelle ist.

### pH

Die pH-Verläufe zusammen mit der Ionen-Analytik bestätigen die Vermutung, dass die pH-Zunahme in der Standardkultivierung auf die Nitrataufnahme zurückzuführen ist. Dieses Phänomen ist genau wie bei Ammonium bekannt [221] und lässt sich durch die Ladungsbilanz erklären. Bei der Nitrat-Assimilation und das anschließende Verstoffwechselln kommt es zur Bildung  $OH^-$ -Ionen, welche entweder intern durch die Aufnahme eines extrazellulären  $H^+$ -Iones neutralisiert werden oder direkt aus der Zelle in das Kulturmedium exportiert werden, um den pH-Wert innerhalb der Zelle aufrechtzuerhalten. [221, 251] Dies resultiert in einen Anstieg des pH-Wertes im Kulturmediums [216], was detailliert in einer Studie mit *Chlorella vulgaris* [219] dargestellt wird, und mit hier beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt.

### Morphologie

Auf die Wuchsform von *S. palustre* hatte das Ammonium den größten Einfluss. Die photographische Aufnahme der Mooskultur zeigte, dass die Ammonium-Anwesenheit eine sphärische Wuchsform von *S. palustre* bewirkt. Bei einer  $c(NH_4^+) = 4,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  waren mehrere Kugelstrukturen der Torfmoose als bei  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  vorhanden. Eine höhere  $NH_4^+$ -Konzentration von  $10,94 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  bewirkte ein komplettes Ausbleiben der Stammstreckung und Verzweigung der Moospflanze. Vergleichbare Befunde liegen auch für *S. magellanicum* [206] vor, in denen eine erhöhte N-Verfügbarkeit die Astbildung der Moospflanzen in der Natur verringerte. Die N-Behandlung erfolgte mit  $NH_4NO_3$  mit einer Konzentration

von  $4 \text{ gN}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{year}^{-1}$ . Die Anwesenheit von beiden Ionen erschwert die Interpretation der Ergebnisse, da es nicht klar ist, ob sich generell das N-Überangebot oder lediglich nur das Ammonium-Überangebot negativ auf die Streckung der Stämmchen auswirkte. In einer Studie von Paffen et al. [112] wurde ein  $c(\text{NH}_4^+)$ -Gradient von 50 bis  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  untersucht, aber kein Einfluss auf die Morphologie von *S. cuspidatum* erwähnt. Wahrscheinlich sind die  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration zu gering um einen Effekt hervorzurufen, weil sie unter der  $c(\text{NH}_4^+)$  des Kontrollmediums liegen. Unter anderem beobachtete Baker et al [183], dass die Produktion der Hyalocyten ausfällt, wenn die Torfmoose (*S. fallax*) im Medium mit  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $c(\text{NH}_4^+)=18 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) kultiviert wurden. Ob sich die fehlende Hyalocyten-Produktion auf die äußeren Merkmale der Moospflanze auswirkt, ist in der Studie nicht angegeben.

Wegen der fehlenden Daten in der Literatur wird folgende Hypothese zum beobachteten Ammonium-Effekt auf die Morphologie der Pflanze aufgestellt. Die Zelle kann die Ammoniumaufnahme nicht regulieren und deswegen wird das gesamte Ammonium in die Zelle importiert. Die im Zytoplasma aufgenommenen  $\text{NH}_4^+$ -Ionen werden direkt in Glutamin umgesetzt [184, 191], da das frei gelöste Ammoniumion für die Zelle toxisch ist. [252] Bei einer erhöhten N-Aufnahme, wenn das Wachstum nicht durch Stickstoff limitiert ist, weist die Moospflanze einen *luxury uptake* [252] auf, wodurch das aufgenommene Ammonium in Form von freien Aminosäure wie Asparagin, Glutamine und Arginin in Vakuolen gespeichert wird, [147, 184, 191, 252], was als  $\text{NH}_4^+$ -Entgiftungs-Mechanismus bezeichnet wird. [48, 184, 192]. Da die Produktion der Aminosäuren Energie und Kohlenstoff benötigt [192], welche dann für die Biomassebildung fehlen, kommt es zur Wachstumsreduzierung. [140, 252]. Abhängig vom aufgenommenen Ammonium kann es hypothetisch zum totalen Zurückstellen der Stämmchenproduktion kommen. Die hier aufgestellte Hypothese sollte zukünftig untersucht werden, um ein Gleichgewicht zwischen der Ammonium-Verfügbarkeit und der Biomassebildungsrate der Mooskultur zu finden.

### Stickstoffaufnahme

Die hier beschriebene Beobachtung über die Aufnahme beider N-Quellen bestätigt die Angaben von Simola [24] und Rudolph et al. [48, 253], dass beide Stickstoffquellen für das Wachstum von Torfmoosen angesetzt werden können, wobei das Ammonium bevorzugt wird, wie bei vielen anderen Organismen. Außerdem scheint es, dass das Torfmoos den Import von Ammonium gegenüber den des Nitrats bevorzugt.

Der erste Fakt lässt sich über den Energieverbrauch der Stickstoffassimilation erklären. Bei der Ammonium-Assimilation wird keine Energie verbraucht und aus dem Grund erfolgt sie schneller. [221] Das Nitrat muss zunächst zum Ammonium unter Verbrauch von 8 Elektronen aus der Photosynthese [76] umgewandelt werden, bevor es im Anabolismus eingesetzt wird. [185] Darüber hinaus zeigten auch die ersten Ergebnisse der N-Kinetik, dass die Ammonium-Aufnahme in die Moospflanze schneller als die Nitrat-Aufnahme erfolgt [141], jenes auch ein Grund sein kann, weshalb das Ammonium bevorzugt wird.

Die zweite Erklärung der bevorzugten Ammonium-Aufnahme bietet die Enzym-Kinetik an. Die Nitrataufnahme wird in der Anwesenheit von Ammonium-Ionen gehemmt, wie es die hier gezeigten Ergebnisse andeuten – in Übereinstimmung mit den Daten von Heck et al. [19]. Die bevorzugte Ammoniumaufnahme wird oft bei höheren Pflanzen, Pilzen und Algen [253] in Zusammenhang mit einer Inhibierung der Nitratreduktase in Anwesenheit von Ammonium gebracht. Ähnlich wie die genannten Organismen besitzen auch die *Sphagnen*-Arten die Nitrat-Reduktase [47, 190, 253, 254], deren Aktivität von der Ammoniumkonzentration abhängt. Eine  $c(\text{NH}_4^+) = 1,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  im Medium führte bei *S. cuspidatum* zur Senkung der Nitratreduktase-Aktivität um den Faktor 2,7 zum Vergleich zur Kontrollversuch mit  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$  in der Nährlösung, gewechselt alle zwei Tage [253]. Im Gegensatz dazu gab es keinen signifikant negativen Effekt auf die Nitratreduktase bei einer  $c(\text{NH}_4^+) < 0,11 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  für *S. fuscum* [255]. Entweder liegt die verwendete Konzentration unter dem Schwellenwert der Hemmung der Nitrataufnahme oder die Ammoniumionen wurden dank des Kationenaustauschs an der Zellwand zurückgehalten, was jedoch nur maximal 5 % der gesamten Assimilation [141] betragen kann. Ab welcher  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration die Nitratassimilation stimuliert wird, ist aus den vorliegenden Daten sowie Literatur nicht abschätzbar.

### N-Quellen

Das beste Wachstum von *S. palustre* wurde erreicht, wenn Ammonium zusammen mit Nitrat im Medium vorhanden war. Dies ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten. Beispielweise ergab  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  *S. nemoerum* ein

besseres Wachstum im Vergleich zu Agar-Medien nur mit einer N-Quelle ( $2,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$  oder  $2,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ ) [48]. Auch Rudolph et al. [48] zeigte die Notwendigkeit beider Stickstoff-Ionen im Medium, wobei die beiden N-Quellen separat als  $\text{HNO}_3$  und  $\text{NH}_3$  der Nährlösung zugegeben wurden. Das Wachstum war am besten in einer Nährlösung mit  $c(\text{NO}_3^-) = 322 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  und  $c(\text{NH}_4^+) = 153 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Diese Ergebnisse sind jedoch schwierig zu deuten, da keine systematische Konzentrationsreihe beider N-Quellen untersucht wurde. Außerdem wuchsen die Torfmoose im Phytotron unter nicht axenischen Bedingungen. Deshalb könnten sich auf der Moosoberfläche in den Hyalocyten Mikroorganismen wie Cyanobakterien befinden, welche den N-Stoffwechsel der Pflanze beeinflussen [159, 186, 187].

Ohne weitere Kenntnisse der exakten Aufnahmekinetik des Nitrats und Ammoniums, ist es auch schwierig zu erklären, wieso beide N-Quelle für das Torfmooswachstum benötigt werden. Auf mechanistischer Art lässt sich das Phänomen folgend zu interpretieren: Unter der Annahme, dass die Zelle einen konstanten N-Fluss für die Biomassebildung benötigt, kann grundsätzlich Nitrat und Ammonium von der Zelle aufgenommen werden. Da aber die Ammonium-Assimilation bevorzugt erfolgt [141, 185], ist der N-Bedarf zunächst mit Ammonium gedeckt. Das Nitrat wird auch in die Zelle parallel transportiert, jedoch zehnfach langsamer [141] und daher trägt es zum N-Fluss geringfügig bei. Bei einer niedrigeren  $c(\text{NH}_4^+)$  im Medium reicht das vorhandene Ammonium nicht mehr, um den N-Bedarf der Zelle zu decken und daher gleicht das Nitrat den N-Fluss größtenteils aus.

### Nitrat als N-Quelle

Die Verwendung des Nitrats ( $\text{NaNO}_3$ - oder  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) als einzige N-Quelle im Kulturmedium verlangsamte das Wachstum. Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass im Nitrat-Medium der pH-Wert unmittelbar zum Beginn der Kultivierung anstieg (siehe Diskussion), was sich auf das Wachstum von Torfmoosen negativ auswirken könnte. Wie bereits im Kapitel 4.3 diskutiert wurde, kann ein hoher pH-Wert die Photosynthese der *Sphagnen* senken [80] oder die Konzentration von Hydrogencarbonat  $\text{HCO}_3^-$  erhöhen [5]. Das Hydrogencarbonat kann das Torfmoos in der Dunkelreaktion der Photosynthese nicht verstoffwechseln, was ein geringeres Wachstum aufgrund der C-Limitierung zur Folge haben könnte. Im Medium mit  $\text{NaNO}_3$  kann noch die Ursache des schlechteren Wachstums die hohe Konzentration von Natriumionen sein, da im Kontrollmedium das Natrium nur als Spurenelement mit einer  $c(\text{Na}^+) = 0,02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  vorliegt. Dass die Moose auf Natrium sehr empfindlich reagieren, wurde in einer Studie von Rudolph [178] nachgewiesen, in der ein Wachstumsstillstand von *S. magellanicum* nach Eintausch mit  $\text{Na}^+(6,5 \text{ } \gamma \cdot \text{mL}^{-1})$  beobachtet wurde. Eine optimale Kultivierung inkludiert einen konstanten pH-Wert, der den Nitrat-pH-Effekt eliminiert und gleichzeitig  $\text{CO}_2$  in gelöster und verfügbarer Form bereitstellt.

Gegen die Verwendung des Nitrats als N-Quelle sprechen die Ergebnisse von Simola [24] mit *S. nemoerum* auf Agarplatten, in welchem  $\text{KNO}_3$  ein deutlich schlechteres Wachstum als  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ergab. Als mögliche Ursache wurde eine nicht sehr wirksame Reduktion von Nitrat in *Sphagnen* vermutet. Die Nitratassimilation erfolgt in der Torfmooszelle wie bei anderen Pflanzen über die Nitrat-Reduktase [47, 190, 253, 254]. Ihre Aktivität hängt mit der Nitratkonzentration [47], mit dem Alter der Moospflanze [47], mit dem Ammonium als Endprodukt der Nitratassimilation [47, 48] sowie mit dem pH-Wert zusammen, wobei ab einem pH-Wert von 3 die Nitrat-Assimilation schwächer ausgeprägt ist [185, 191]. Welcher von diesen Einflussparameter sich negativ auf die Nitrat-Assimilation auswirkte und ein verschlechtertes Wachstum von *S. palustre* zur Folge hatte, kann im Moment nicht erklärt werden.

### Ammonium als N-Quelle

Darüber hinaus geht es aus den abgebildeten Ergebnissen hervor, dass sich auch das Ammonium als die einzige Stickstoffquelle nicht für das Wachstum von *S. palustre* eignet. Dies kann jedoch an der  $c(\text{NH}_4^+)$  von  $10,94 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  liegen, oder dem daraus folgenden pH-Shift. Die hohen Ammoniumkonzentration können für die Torfmooszelle toxisch sein, wie es bereits oben erwähnt wurde. Wenn viel Ammonium im Kulturmedium vorhanden ist, kann es sein, dass die Zelle das gesamte ATP und den gesamten Kohlenstoff zum Entgiftungs-Mechanismus verbraucht [192] und nichts mehr für die Biomassebildung übrig bleibt.

### N-Gehalt

Die Ergebnisse der Bestimmung des N-Gehaltes deuten darauf hin, dass die Zellzusammensetzung von der Stickstoffquelle abhängt. Bei einem erhöhten Ammoniumangebot steigt der Stickstoffgehalt in der Zelle an. Dies ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten, in denen das Medium mit Ammonium zur Erhöhung der freien Aminosäuren in den Blättchen führte - ein ähnlicher Effekt wurde bei Pflanzen mit Nitrat beobachtet [221]. Ein ähnliches Phänomen ist in den Experimenten mit *Sphagnen* zu sehen, in denen eine Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [140] und  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  [206, 252, 256] eine erhöhte Konzentration an freien Aminosäuren im Capitulum von *Sphagnen* verursachte, wobei die Speicheramino­säuren Asparagin, Arginin und Glutamine [184] am meisten vertreten waren. Somit ist es wahrscheinlich, dass der hier ermittelte N-Gehalt die erhöhte Produktion von Speicheramino­säuren in der Zelle widerspiegelt.

Ob der aufgenommene Stickstoff in der Zelle wiedergefunden wird, wurde rechnerisch überprüft. Unter der Annahme, dass das gesamte Ammonium aus  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $c(\text{NH}_4^+) = 4,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $V_m = 250 \text{ mL}$ ) in die Zelle kovalent gebunden wird, sollte sich die Zelle theoretisch aus  $35,6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  Stickstoff zusammensetzen. Dieses Ergebnis entspricht etwa der gemessenen Gesamtmenge an Stickstoff, welcher in Abbildung 5-4 abgebildet ist, und deutet darauf hin, dass es bei einer  $c(\text{NH}_4^+) = 4,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  zur Akkumulation von Stickstoff kommen könnte. Ob die Zelle diesen Stickstoffgehalt in Form von Aminosäuren [184, 252] in den Vakuolen anlagern kann, zeigt folgende Berechnung: Unter der Annahme, dass der gesamte Stickstoff als meist vertretende Speicheramino­säure Asparagin akkumuliert, sollte sich die hier produzierte Biomasse zum  $261 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  ( $q_{\text{Asparagin}} = 26 \%$ ) aus Asparagin zusammensetzen, was ca. um den Faktor von 100 höher als die experimentell ermittelten Daten von Fritz [206] oder Limpens et al. [252] ist. Da das Stickstoffangebot als  $\text{gN}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{year}^{-1}$  angegeben wird, ist ein direkter Vergleich der N-Verfügbarkeit erschwert. Wird das gespeicherte Volumen bei einer Dichte der Asparagin-Aminosäure von  $1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  berechnet, ergibt sich ein absolutes Volumen von 0,11 mL. Unter Berücksichtigung der Zellvolumen ( $\sim 100 \times 200 \times 5 \mu\text{m}$ ) [81] und Anzahl der Chlorocyten ist das Aminosäurevolumen bezogen auf das Gesamtvolumen wahrscheinlich. Es ist nicht auszuschließen, dass die tatsächliche kovalent gebundene Stickstoffmenge in der Zelle deutlich geringer als hier ermittelt liegt, weil die Torfmoose die Aminosäure außer der Anlagerung in Vakuolen [147, 184, 191, 252] in die Umgebung ausscheiden können. [184] Die Aminosäuren verbleiben möglicherweise dann in den Hyalocyten und werden bei der Probenpräparation nicht aus den Zellen rausgewaschen. Dies erhöht den tatsächlichen N-Gehalt in der Zelle.

Abgesehen davon liegt der hier ermittelte N-Gehalt deutlich über den in den Literaturdaten [93, 145, 256], welcher als ‚optimal‘ bezeichnet wird. Beispielsweise zeigte sich, dass bei einem spezifischen N-Gehalt von  $13 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  die Photosyntheserate ihr Maximum erreicht und anschließend sinkt [244]. Bei  $16 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  war wiederum die Biomasseproduktion in Feldversuchen am stärksten ausgeprägt. [145] Dies würde bedeuten, dass die *in-vitro Sphagnen* im Knop-Medium nach zwei Wochen Kultivierung stickstoff-gesättigt und dadurch in ihrem Wachstum inhibiert sind. Dies war aber nicht der Fall. Eine genaue Erklärung für diese Befunde könnte die Kinetik des Stickstoff-Stoffwechsels anbieten, welche die Ammoniumaufnahme­rate, die Ammoniumassimilationsrate [141, 185], die Rate der Proteinbiosynthese und des Chlorophylls, die Photosyntheserate und die Biomasseproduktionsrate beinhaltet. Der Stickstoffgehalt, welcher sich in der Zelle unter bestimmten Bedingungen einstellt, ist ein Resultat von all diesen Raten. Aus diesem Grund ist die Bestimmung des Einflusses der  $\text{NH}_4$ -Konzentration im Medium auf den N-Gehalt und somit auf die Biomassebildung nicht so einfach.

Im Nitratmedium war der spezifische N-Gehalt deutlich geringer. Da die Nitrat-Assimilation langsamer als die Ammonium ist [141] und zur geringeren überflüssigen N-Anlagerung kommt, sodass der vorhandene Stickstoff ausschließlich für die Biosynthese der Proteinen und nicht der Speicheramino­säuren benötigt wird.

### Pigmentgehalt

Auffallend an den Ergebnissen ist, dass außer dem N-Gehalt auch der spezifische Pigmentgehalt im Nitrat-Medium deutlich geringer liegt. Da alle andere Versuchsparameter konstant geblieben sind und keine anderen Elemente limitierend wirkten, scheint die Chlorophyllproduktion mit der N-Quelle im Zusammenhang zu stehen. Vergleichbare Befunde liegen jedoch nicht vor, da sich die Studien an Freilandmaterial eher dem Einfluss eines Stickstoff-Überangebot in Form von  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  auf den Chlorophyllgehalt widmen, und nicht in Form von Nitrat. [93, 203, 206] Unter Laborbedingungen liegt eine Studie [48] vor, in der eine fehlende Produktion von Chlorophyll bei verschiedenen  $\text{N-NO}_3^-$  und  $\text{N-NH}_4^+$  Kombinationen festgestellt wurde. Eine Kombination von  $c(\text{NO}_3^-) = 322 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $c(\text{NH}_4^+) = 153 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  resultierte in eine Chlorophyllzunahme von  $60 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  innerhalb von 5 Monaten. Die restlichen Medien mit  $c(\text{NO}_3^-) = 322 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + c(\text{NH}_4^+) = 153$

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $c(\text{NO}_3^-) = 82 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + c(\text{NH}_4^+) = 600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  verzeichneten im untersuchten Bereich eine stetige Abnahme des Chlorophyllgehaltes. Außer der Tatsache, dass beide N-Quellen eingesetzt wurden, wurde in den Experimenten nicht die gleiche N-Menge im Medium angesetzt und daher ist es an dieser Stelle auch nicht möglich eine Erklärung für den Einfluss des Nitrats auf Chlorophyllbildung zu geben.

Zusammengefasst ergibt sich für das Wachstum von Torfmoosen in fünf verschiedenen Stickstoffmedien folgendes: Der pH-Wert im Knop-Medium sinkt aufgrund der Ammoniumaufnahme und steigt aufgrund der Nitratassimilation. *S. palustre* besitzt in Anwesenheit von Ammonium einen höheren Stickstoff- und Chlorophyllgehalt im Vergleich zu den Kulturen mit Nitrat als einzige Stickstoffquelle vorhanden ist. Ob es sich um einen zellulären oder intrazellulären Stickstoffgehalt handelt, ist nicht klar. Es ist auch unklar, weshalb das Moos zwingend zwei Stickstoffquellen benötigt und in welchem Verhältnis die Stickstoffquellen zur Verfügung stehen sollen. Die Information über die genaue N-Aufnahme ist wichtig für den kontinuierlichen Betrieb, damit ein Gleichgewicht zwischen der N-Zufuhr, der N-Aufnahmerate und der Biomassebildungsrate bestimmt wird. Zu hohe Ammoniumkonzentrationen im Medium könnten in der großskaligen Produktion wachstumshemmend wirken bzw. die Biomassebildungsrate senken. Darüber hinaus könnte jedoch die N-Anlagerung bei der Akklimatisation der Mooskultur aus dem Bioreaktor auf die Naturbedingungen helfen, da die Hochmoore oft ombotroph sind.

### 5.1.2 Variation der Ammoniumkonzentration

Aus dem ermittelten Stickstoffgehalt (siehe Abbildung 5-4) ging hervor, dass die Torfmooszelle aus mehr Stickstoff besteht, wenn Ammonium im Medium vorhanden war. Es ist unklar, ob die Zelle den Stickstoff für das Wachstums benötigt, oder akkumuliert. Um mögliche Stickstoffakkumulation zu vermeiden, wurde die Anfangskonzentration von Ammoniumnitrat auf die Hälfte ( $0,625 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) und  $\frac{3}{4}$  ( $0,935 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) gesenkt und in einem weiteren Testversuch um die Hälfte ( $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) erhöht. Das Torfmoos *S. palustre* wurde unter Standardbedingungen in zweifacher Bestimmung kultiviert. Die Ergebnisse der Endbiomassekonzentration sind in Abbildung 5-5 dargestellt.

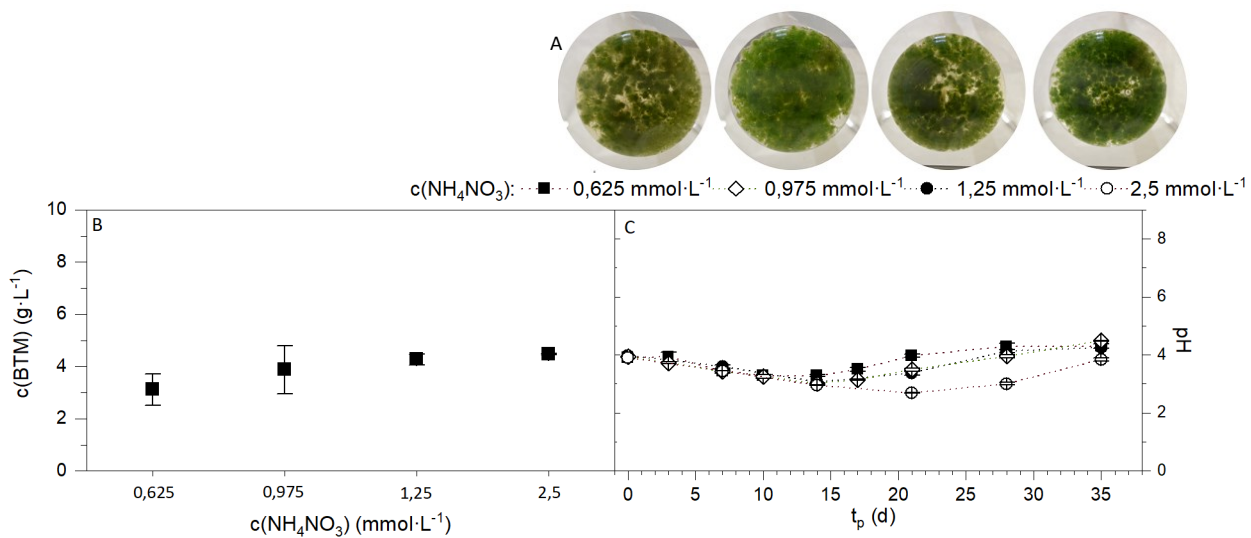


Abbildung 5-5: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von  $c(\text{NH}_4\text{NO}_3)$  auf das Wachstum von Torfmoosen von *S. palustre* in folgenden Medien: Knop +  $0,625 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ , Knop +  $0,935 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ , Knop +  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ , und  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ . A) Ansicht der Mooskultur durch den Schüttelkolbenboden zur Prozesszeit  $t_p = 35 \text{ d}$ . B) Biotrockenmassekonzentrationen. C) pH-Verläufe. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $200 \text{ mL}$  1,0faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit  $1 \text{ \% CO}_2$  (v/v),  $t_p = 35 \text{ d}$ , Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=1$ . Die abgebildeten Werten sind Mittelwerte von Duplikaten, die vertikalen Balken stellen die Standardabweichungen dar.

Bei der Betrachtung der Endbiomassekonzentration ist zu erkennen, dass die steigender  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Anfangskonzentration zur Erhöhung der Biomasseerträge führt. Allerdings ist der Unterschied der Kontrolle zu den restlichen Biomassekonzentration nicht signifikant. Einen ähnlich Trend zeigte sich bei *in-vitro* Kultivierung von *S. palustre 12a*, in der eine Erhöhung des Ammoniumnitrat von  $0,5$  bis zum  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  im Knop-Medium keine Auswirkung auf das Wachstum unter photoheterotrophen Bedingungen hatte [17]. Im Gegensatz dazu zeigt eine Untersuchung mit *S. nemoreum* auf

Agarplatten, dass die Erhöhung der  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Konzentration von  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  auf  $2,5$  und  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  das Wachstum signifikant verschlechtert. [24] Die Ursache könnte das verwendete Medium (ohne weitere Angaben) sein. Ein möglicher Mangel an anderen Nährstoffen, wie z.B. Phosphor [205, 206], könnte das Wachstum bei der erhöhten Stickstoffverfügbarkeit limitieren. Dies wird durch die berichtete Gelbfärbung der Torfmoospflanzen unterstützt. In unserem Fall war die Grünfärbung der Mooskultur nahezu identisch. Allerdings war eine Veränderung der Wuchsform bei der Mooskultur kultiviert in  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  zu sehen. Die inokulierten Torfmoospflanzen wuschen in einer sphärischen Form, welche in vorherigem Experiment bei der  $c(\text{NH}_4^+) = 5,48 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  beobachtet und bereits beschrieben wurde. Da die kugelförmigen Torfmoose mit vielen Innovationen sich auf dem Feld als meist geeignetste Saatgutqualität für das *Sphagnum farming* zeigten [108], könnten Freilandexperimente vom beobachtbaren Morphologieeffekt der Ammoniumkonzentration profitieren.

## 5.2 Einfluss des wöchentlichen Medienwechsels auf das Wachstum von Torfmoosen

Im Naturhabitat wachsen die *Sphagnen* an nährstoffarmen Standorten [1], weswegen die Startkonzentrationen der Nährsalze im Knop-Medium als überschätzt gelten könnten. Aus diesem Grund wurde in einem Experiment das Knop-Medium auf 20 % der ursprünglichen Konzentration (0,2fach) verdünnt und wöchentlich gewechselt. Der Medienwechsel (MW) fand wöchentlich in der Sterilwerkbank statt. Dies war der erste Ansatz eines quasi-kontinuierlichen Betriebs für die zukünftige kontinuierliche Prozessführungsstrategie zur groß-skaligen Torfmoosproduktion. Die Machbarkeit solcher Kultivierung wurde für *S. palustre* (SP) und *S. rubellum* (SR) getestet. Der Vergleichsmaßstab war eine Kultivierung von *S. palustre* im unverdünnten Knop-Medium. Der Kontrollansatz für *S. rubellum* war nicht vorgesehen, da es vermutet wurde, dass die hohen Nährstoffkonzentration den Wachstumsstillstand [23] zur Folge hatten.

In Abbildung 5-6 ist der Wachstumsverlauf anhand des wöchentlichen Erscheinungsbildes des Schüttelkolbens sowie der erreichten Biomassekonzentration dargestellt. Alle Mooskulturen verzeichneten über die Dauer der Kultivierung hinweg einen Zuwachs an Biomasse. Das Wachstum von *S. palustre* im 1,0fachen Knop-Medium fiel im Vergleich zu der Kultivierung von *S. palustre* im 0,2fachen Knop-Medium vergleichbar aus. Die Endbiomassekonzentration von *S. rubellum* war sehr ähnlich zu der von *S. palustre* und der Unterschied nicht signifikant. In allen Medien wuchsen beide Torfmoospezies bereits nach 28-tägiger Kultivierung über den Wasserspiegel hinaus, wodurch identische Wachstumsbedingungen nicht mehr garantiert werden konnten, weshalb die Kultivierung frühzeitig beendet wurde.

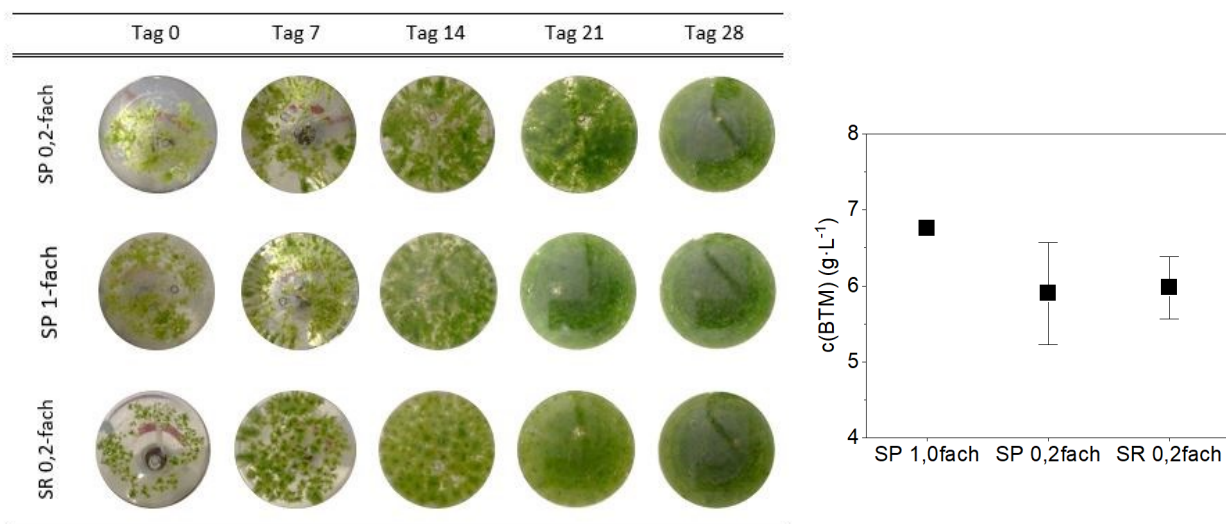


Abbildung 5-6: Fotografische Darstellung der Biomassezunahme aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums von *S. palustre* (SP) und *S. rubellum* (SR) mit wöchentlichem Medienwechsel des 0,2fachen Knop-Mediums. Kultivierungsbedingungen:  $T_K=20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $250 \text{ mL}$  1,0faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$ , Dauerlicht,  $\text{PFD}=100 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G=20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit  $1 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p=28 \text{ d}$ , Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=1$ .

Außer der Produktivität stellte die Morphologie einen Unterschied zwischen den beiden Torfmoos-Arten dar. Während *S. rubellum* in einer sphärischen Form wuchs, und die Größe der Mooskugeln im Laufe der Kultivierung zunahm, wuchs *S. palustre* in die Länge unter vorwiegender Ausbildung von Stämmchen (siehe Abbildung 5-6 A). Für *S. rubellum* bildeten sich vorwiegend auf der Außenseite der inokulierten Moospflanzen Capitula aus (siehe Anhang Abbildung 0-7).

Eine quantitative Ionanalytik im 0,2fachen Medium vor und nach dem Medienwechsel ist in Abbildung 5-7 gezeigt. Für den Versuchsansatz mit *S. palustre* im 0,2fach konzentrierten Knop-Medium, sowie für den Kultivierungsansatz von *S. rubellum* unter identischen Kultivierungsbedingungen ist eine Senkung der Anionen- und Kationen-Konzentrationen im Verlauf der Kultivierung nach jedem Medienwechsel ersichtlich, wobei die Anionen-Konzentration im Medium von *S. rubellum* vor dem Medienwechsel niedriger lagen. Der größte Unterschied in der Konzentrationsveränderung ist im Falle des Nitrats zu beobachten. Während für *S. palustre* spätestens nach 21 Tagen das Nitrat aufgebraucht wurde, kann dies für *S. rubellum* schon zur Prozesszeit von  $t_p = 7$  d beobachtet werden. Am Ende der Kultivierung konnte auch kein Phosphat und Magnesium im Kulturmedium von *S. rubellum* nachgewiesen werden.

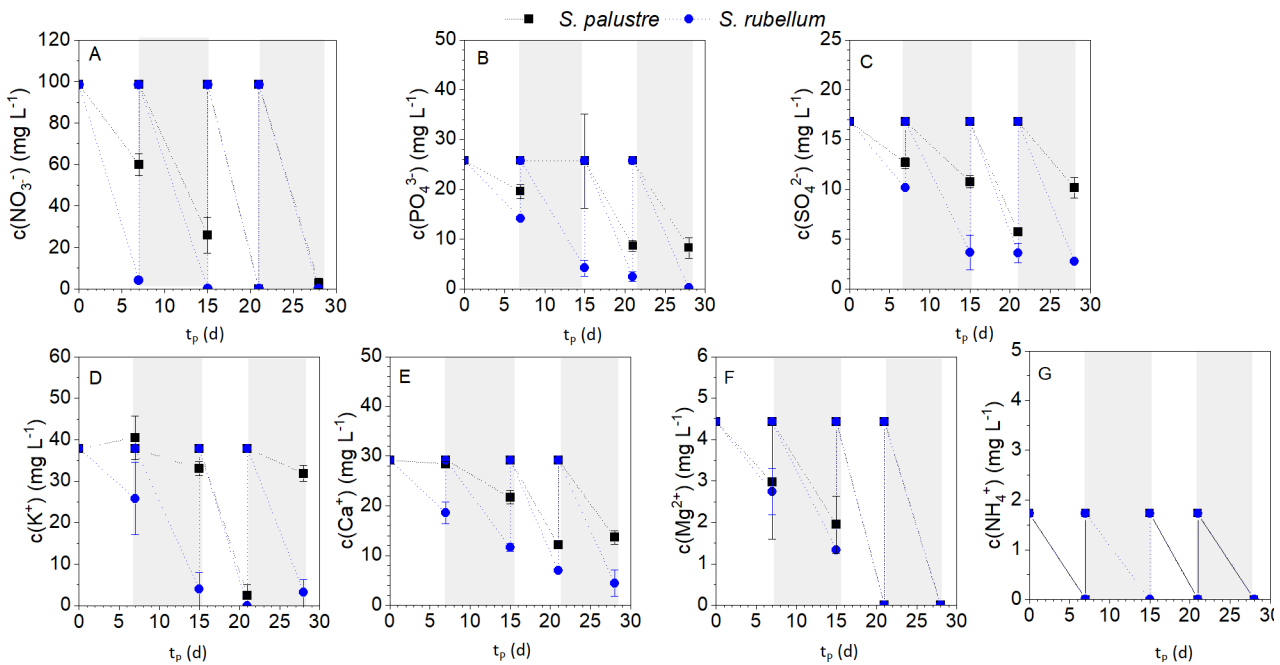


Abbildung 5-7: Ionanalytik aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums von *S. palustre* (SP) und *S. rubellum* (SR) mit wöchentlichem Medienwechsel des 0,2fachen Knop-Mediums. Abgebildet sind die Kationenkonzentrationen D) des Kaliums  $c(K^+)$ , E) des Calciums  $c(Ca^{2+})$ , F) des Magnesiums  $c(Mg^{2+})$ , G) des Ammoniums  $c(NH_4^+)$ , und H) sowie die Anionenkonzentrationen A) des Nitrats  $c(NO_3^-)$ , B) des Phosphats  $c(PO_4^{3-})$  und C) des Sulfats  $c(SO_4^{2-})$ . Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1$  °C, 250 mL Medium,  $pH_{Anfang} = 4,0$ ,  $V_G = 20$  mL  $\cdot$  min $^{-1}$  mit 1 % CO $_2$  (v/v), Dauerlicht, PFD= 100  $\mu$ mol  $\cdot$  m $^{-2}$   $\cdot$  s $^{-1}$ ,  $t_p = 28$  d. Anzahl an Kolben pro Parameter: 2, n=1. Die abgebildeten Werten sind Mittelwerte der Duplikate, die vertikalen Fehlerbalken stellen ihre Standardabweichungen dar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass *S. palustre* sowohl in einem Batch-Versuch mit 1-fachem Knop-Medium als auch in einem quasi-kontinuierlichem Ansatz mit 0,2fachem Knop-Medium mit dem wöchentlichen Medienwechsel vergleichbar wachsen kann. Dies Ergebnis war zu erwarten, da sich die Nährstoffverhältnisse des Kulturmediums nicht verändert haben. Ein potientielles Problem dieser Prozessführungsstrategie hätte der Medienwechsel darstellen können. Bei dem Medienwechsel können die von Torfmoos produzierten Substanzen bzw. Signalmolekülen, welche für das Wachstum erforderlich sein könnten, aus dem System ausgetragen werden. Dieser Effekt scheint eher vernachlässigbar zu sein, da das Wachstum im Kontrollmaßstab ähnlich war. Außerdem zeigte auch Rudolph et al. [20] für *S. fuscum*, dass eine kontinuierliche Prozessführungsstrategie in einem Bioreaktor unter photoautotrophen Bedingungen praktisch umsetzbar ist.

Für die Anwendung dieser Kultivierungsstrategie gegenüber dem Batchprozess sprechen folgende Tatsachen: Erstens können die inhibierenden Nebenprodukte aus dem System rausgetragen werden und zweitens können geringere Menge an Nährstoffen für die Biomasseproduktion angewendet werden [110, 117, 124]. Das Kulturmedium für den kontinuierlichen Betrieb ist so zu wählen, dass keine Limitierung der wichtigsten Nährstoffe bei Reaktorausstritt vorliegt und kein überflüssiges Nährstoffüberangebot auftritt. Diese beide Anforderung erfüllt das 0,2fache Knop-Medium in diesem



Experiment jedoch noch nicht. Nach der dritten Kultivierungswoche wurde aus dem Medium von *S. palustre* komplett das gesamte Nitrat und Magnesium aufgenommen, während Kalium, Calcium, Phosphat und Sulfat vor dem Medienwechsel vorhanden waren. Die Tatsache, dass *S. palustre* mehr Nitrat aufnimmt, wenn das Medium verdünnt wird (siehe Abbildung 0-8), konnte mit der bevorzugten Aufnahme des Ammoniums und Hemmung der Nitratreduktase-Aktivität zusammenhängen, was bereits im Kapitel 5.1.1 näher beschrieben wurde. Da weniger Ammonium im 0,2fachen Medium vorlag, wurde es auch schneller aus dem Medium aufgenommen, und somit setzte die Nitrataufnahme früher auf, was ein N-Mangel im Medium zur Folge haben könnte. Die erreichte Biotrockenmassekonzentration unterschied sich nicht vor der Kontrolle, was darauf hindeutet, dass das Wachstum von Torfmoosen vermutlich nicht N-limitiert war. Zur Bestätigung dieser Hypothese ist eine zeitaufgelöste Bestimmung des Stickstoffgehalts in der Moospflanze sowie der Trockenmasse.

Des Weiteren erwies sich, dass *S. rubellum* submers wachsen kann und ähnliche Biomassemenge zu *S. palustre* erzeugt werden können, was in Widerspruch mit den Beobachtungen von Heck et al. steht. [23] In einfach konzentriertem Knop-Medium, unter der Zugabe von 2 % Saccharose und ohne Begasung des Mediums war das Wachstum von *S. rubellum* sehr schwach ausgeprägt und war ca. zehnfach geringer als das von *S. palustre*. Der erste Grund dieser unterschiedlichen Beobachtungen könnte der positive Einfluss der niedrigeren Nährstoffkonzentration sein. *S. rubellum* wächst an oligotrophen, also nährstoffarmen Standorten [37, 60], oberhalb von Wasserstand als Bulten-Spezies [257] und ist somit an geringen Nährstoffkonzentrationen gewöhnt. Durch eine geringere Ionenverfügbarkeit des 0,2fachen Mediums im Vergleich zu dem 1fachen Knop-Medium könnte die Wachstumsleistung positiv beeinflusst werden. Ein weiterer Versuch mit *S. rubellum* im 1,0fachen unter den gleichen Versuchsbedingungen könnte diese Hypothese bestätigen. Eine niedrigere Ammoniumkonzentration konnte eine Ursache dafür sein, da das Wachstum von *S. rubellum* bereits für eine Reduktion der  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ -Konzentration im 1,0fachen Medium (Abbildung 0-7) beobachtet wurde, jedoch nicht so stark ausgeprägt wie im 0,2fachen Medium war. Somit scheint es, dass diese Bulten-Spezies [257] empfindlich gegen das Ammonium in Submerskultur sind.

Weiterhin könnte auch die Anwesenheit von Saccharose im Medium einen Grund für die festgestellten Beobachtungen darstellen. Die Kultivierung ohne Zugabe von Saccharose erwies sich für die Kultivierung von *S. palustre* als positiv im Vergleich zu der Kultivierung ohne Zusatz von Saccharose [17], wenn die Zuckerkonzentration unter von  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  lagen [58]. Ein negativer Einfluss der zu hohen Saccharosekonzentration auf *S. rubellum* ist somit nicht auszuschließen.



# 6 Wachstum von Torfmoosen unter definierten Prozessbedingungen im Moosbettreaktor

Der erste im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Photobioreaktor für die Torfmooskultivierung sollte den Bedingungen im kontrollierten Gewächshaus entsprechen, in welchem die Torfmoose nicht im Medium untergetaucht sind, sondern emers (auf einer Oberfläche) wachsen. Es war das Ziel mit diesem Reaktortyp natürliche Bedingungen zu erzeugen, das Wachstum unter definierten Bedingungen zu ermöglichen und eine Hochskalierung für die massenhafte Torfmoosproduktion zu erlauben. Ausgegangen wurde von einem *Trickle-Bed*-Reaktor (TBR), welcher im Rahmen von MOOSzucht-Projekt zur großskaligen Vermehrung von Torfmoosen gewählt wurde. Dieser Dreiphasen-Reaktor besteht aus einem porösen Bett, auf welchem die Torfmoose aufgetragen sind (Festphase). Die Biomasse wird von oben mit Medium (Flüssigphase) berieselt und von unten im Gegenstrom mit einem Luft-CO<sub>2</sub>-Gasgemisch (Gasphase) versorgt. [126, 127] Die Vorteile dieses Reaktorsystems sind: das Torfmoos wächst emers und somit sollte die Aufnahme von CO<sub>2</sub> effizienter sein; ein geringerer Energieeintrag durch nicht vorhandenen Rührer; eine einfachere Skalierbarkeit des TBRs als bei einem Blasensäulenreaktor, da in diesem Reaktortyp die photoaktive Schichtdicke mit steigendem Volumen sinkt [118, 123]; eine Annäherung an realen Bedingungen, welches eine schnelle Anzucht der Mooskultur begünstigen könnte.

## 6.1 Reaktorkonzeption

Folgende Zielstellungen wurden im Reaktordesign berücksichtigt und anschließend experimentell getestet.

**Bauform:** Die Bauform des Reaktors sollte technisch einfach realisierbar sein, kostengünstig produziert werden und in der späteren Produktion eine einfache Handhabbarkeit ermöglichen. Das Behältnis sollte dicht verschlossen werden können, um Kontaminationen während der Kultivierung zu minimieren und eine Abgasanalytik zu ermöglichen. Die Reaktorhöhe sollte so gewählt werden, dass die gesamte Mooschicht mit Medium gleichmäßig von oben versorgt wird und die Moose im Längenwachstum räumlich nicht eingeschränkt werden.

**Material:** Das Kulturgefäß sollte aus einem Material hergestellt werden, welches keine negative Auswirkung auf das Torfmoos hat. Da das Licht für die Kultivierung erforderlich ist, sollten die Reaktorwände aus einem transparenten Material bestehen, welches das Licht im gesamten PAR-Bereich passieren lässt. Das Material sollte hitzebeständig (bis 120 °C) sein, um das Kulturgefäß sterilisieren zu können, damit axenische Bedingungen der Torfmooskultivierung gewährleistet werden können. In der ersten Entwicklungsstufe ist es nicht zwangsläufig notwendig, ein kostengünstiges Material zu wählen. Beim Hochskalieren des Reaktors sollte das Gehäuse aus Plastikmaterial hergestellt werden, um den Materialaufwand gegenüber Glasreaktoren zu minimieren.

**Temperierung:** Um eine konstante optimale Kultivierungstemperatur aufrechtzuerhalten, die für die Photosyntheserate und das Wachstum von Torfmoosen erforderlich ist, sollte das System über Kühlsystem verfügen.

**Lichteintrag:** Die Beleuchtung sollte künstlich mittels LEDs erfolgen. Die gesamte Grundfläche des Reaktors sollte mit dem Licht beleuchtet werden, um alle Moospflanze mit Licht zu versorgen. Die vorhergehenden Experimente haben gezeigt, dass ein minimaler Anteil an Blaulicht für ein optimales Wachstum notwendig ist (siehe Abbildung 4-7). Zusätzlich sollte das LED-Modul eine Lichtintensität zwischen 100 – 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erzeugen können, um ausreichende Photonen für die Photosynthese (siehe Abbildung 4-9) bereitzustellen. Außerdem sollte sich die Länge der Hell-Phase steuern lassen, da zuvor gezeigt wurde, dass ein Hell-Dunkel-Zyklus von 16/8 (Abbildung 4-12) in vergleichbare Produktivitäten wie die Dauerbeleuchtung resultiert.

**CO<sub>2</sub>-Eintrag:** Um die Torfmoose mit CO<sub>2</sub> zu versorgen, sollte ein kontinuierlicher Austausch zwischen der Gasphase und dem Moos gewährleistet werden. Außerdem sollte die Gaszusammensetzung im Bereich von 1 bis 10 % einstellbar sein, um eine weitere Steigerung der Biomassekonzentration durch ein erhöhtes pCO<sub>2</sub> (3- 10 %) des Zugases [54, 171] bewirken zu können.

**Moosträger:** Die Anforderungen an den Moosträger, auf welchem das Torfmoos im Moosbettreaktor wächst, sind: 1) die Hitzebeständigkeit zur Dampfsterilisation, um eine axenische Kultivierung im Labormaßstab gewährleisten zu können, 2) die Bioverträglichkeit, um die Beeinträchtigung des Wachstum von Torfmoosens durch den Moosträger zu vermeiden, 3) die Speicherkapazität, damit die Moospflanzen in bewässerter Umgebung stehen und wie in Hochmooren die Nährstoffe von unten beziehen können, und 4) das Material sollte porös sein, um das Abfließen des Mediums zu erlauben aber gleichzeitig die Biomasse zurückzuhalten.

**Nährstoffzufuhr:** Zwei Arten der Medienzufuhr sollten etabliert werden. Zunächst sollten die Torfmoose mit den Nährstoffen durch Versprühen des Kulturmediums von oben versorgt werden, da das Capitulum photosynthetisch am aktivsten ist [26, 73]. Die zweite Möglichkeit der Medienzufuhr ist das semi-kontinuierliche Durchströmen der Moose mit dem Medium von unten- ähnlich wie in einem Perfusionssystem [123], in welchem die Zellen zurückgehalten werden. Die kontinuierliche Zugabe von Nährstoffen in geringer Konzentration sollte dem Wachstum von Torfmoosen unter Naturbedingungen ähneln, doch sollten die Moospflanzen mit einer ausreichenden Substratmenge versorgt werden.

**Bestimmung des Wachstums:** Da die gängigen Methoden zur Bestimmung des Wachstums nicht für die Mooskultur anwendbar sind, sollte eine indirekte Methode zur Abschätzung der Biomasse während der Kultivierung etabliert werden. Als Indikator auf eine zunehmende Biomassemenge im Reaktor könnte die Bestimmung der Abgaszusammensetzung oder die der Nährstoffaufnahme in die Moospflanze genutzt werden.

## 6.2 Entwicklung des Moosbettreaktors

Zur Entwicklung des Reaktors wurde ein *Scale-Down*-Ansatz verwendet: Dabei wurde ein kleines Reaktorelement untersucht, wobei die Schnittstelle zum Gesamtreaktor im Experiment später nachgestellt wird.

### Bauform

Im ersten Abschnitt der Entwicklung wurde ein *Scale-Down*-Prototyp mit einem Volumen von 1,5 L (siehe Abbildung 6-1) entworfen. Die Größe des Reaktors war so gewählt, um die experimentelle Handhabung zu erleichtern und die Versuchszahl pro Zeit zu erhöhen. Es wurde die rechteckige Form von bereits verwendeten Kulturgefäßen [20] beibehalten, da die Anfertigung einfach ist. Die Reaktorhöhe von 15 cm bot ausreichend Platz für das Längenwachstum, da der durchschnittliche Zuwachs in der Natur zwischen 0,06 bis 0,14 cm·d<sup>-1</sup> [56, 112, 148] liegt und im Kultivierungszeitraum von

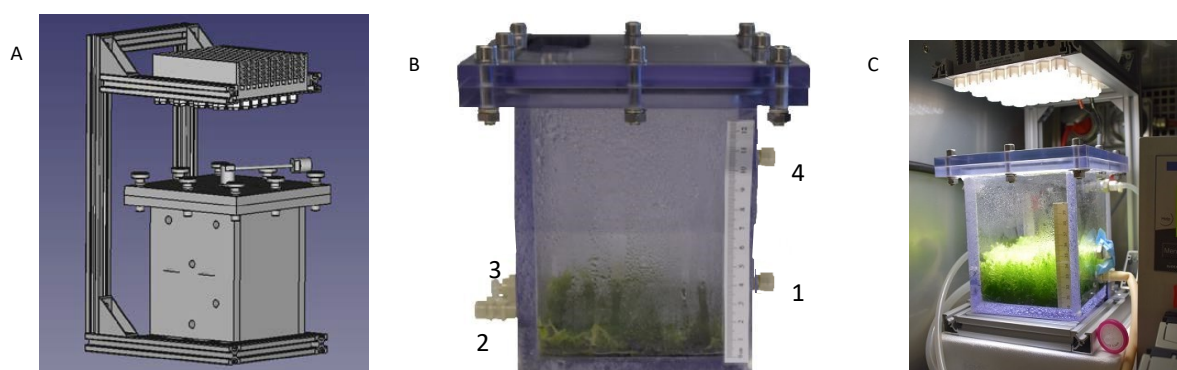


Abbildung 6-1: Moosbettreaktor. A) 3D-Skizze des Moosbettreaktors zusammen mit dem Lichtmodul und Halterung des Lichtmodules. B) Zusammengebauter Moosbettreaktor mit Anschlüssen für 1) die Medienzufuhr auf der Höhe von 45 mm, 2) die Medienabfuhr auf der Höhe von 5 mm, 3) das Zugas auf der Höhe von 45 mm, 4) das Abgas auf der Höhe von 115 mm; C) Moosbettreaktor im Betrieb.

fünf Wochen die Höhe von 15 cm nicht überschreiten kann. Außerdem war ein ausreichender Abstand der Mooschicht zur Düse gewährleistet.

Das Behältnis bestand aus auf Gehrung zugeschnittenen Platten. Diese wurden mit einem Lösungsmittelkleber (Dichlormethan) verklebt, welcher nach dem Verkleben verdampfte. Es wurde jedoch beobachtet, dass nach der Herstellung des Gefäßes Lösungsmittelblasen in den Gehrungen (siehe Abbildung 6-2 A) geblieben sind. Diese haben sich nach dem ersten Autoklavivorgang (120 °C, 20 min, mit oder ohne Stützdruck) ausgedehnt (siehe Abbildung 6-2 B). Dies beeinträchtigte die Dichtigkeit des Gefäßes direkt nach dem Autoklavivorgang nicht. Wenn Undichtigkeiten im Betrieb auftraten, wurden diese mit Silikonkleber von außen verschlossen.

Für eine Abdichtung des Deckels wurde in der Deckelhalterung einen O-Ring in eine Nut angesetzt, welche durch die Verformung des Materials durch den Druck des darauf liegenden Deckels abdichtete. Im Wasserbad wurde die Dichtigkeit des Reaktordeckels nach jedem Autoklavivorgang überprüft.

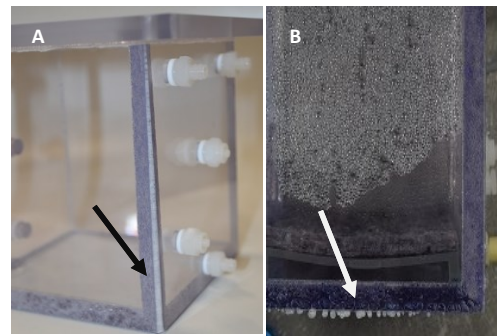


Abbildung 6-2: Ansicht des angefertigten Behältnisses. A) vor dem Autoklavieren, B) nach dem Autoklavieren. Der rauslaufende Klebstoff ist aus den nebeneinander liegenden Wänden und Reaktorboden nach dem Autoklavivorgang zu sehen.

### Reaktormaterial

Das Material der Kultivierungsgefäß besteht aus Glas oder Plastik wie Plexiglas. [20, 58] Das Glas ist im Vergleich zu Kunststoffmaterialien hitzestabil, aber teurer und schwieriger zu bearbeiten. Die Auswahl für das Reaktormaterial fiel auf das Polycarbonat (Makrolon® GP clear 099), da es die Zielvorgaben am Reaktormaterial erfüllte: die Formbeständigkeitstemperatur liegt für Polycarbonat bei 140 °C [258] und ist somit bei 120 °C autoklavierbar. Außerdem erlaubt das Material die Transmission von Licht im PAR-Bereich, die für die Photosynthese notwendig ist. [258] Das Material war für die Moospflanzen bioverträglich, da kein negativer Einfluss während der Kultivierung im Schüttelkolben innerhalb von 35 Tagen festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt). Dies war zu erwarten, da die Organismen sehr selten Kunststoff als Substrat verwerten können. [117] Saure Bedingungen während der Kultivierung sollte auch kein Problem für dieses Material darstellen, da das Polycarbonat gegen verdünnte Säuren beständig ist. [258]

### Temperierung

Die Moospflanzen zusammen mit dem LED-Modul produzieren während der Kultivierung Wärme. Dadurch wird die Temperatur des Reaktorinneren beeinflusst und deshalb ist es notwendig die Wärme aus dem Reaktorsystem abzuführen, um eine konstante Temperatur während der Kultivierung aufrechtzuerhalten. In der ersten Entwicklungsstufe erfolgte die Kühlung mithilfe eines Kühlsystems des Brutschrankes. Der Wärmeaustausch vom Reaktorinneren mit der gekühlten Umgebungsluft fand durch die Reaktorwand über die Konvektion der abgekühlten Luft im Luftraum statt. Ein Beispiel des Temperaturverlaufs im Kulturmedium des Moosbettreaktor ist in Abbildung 6-3 dargestellt.

Der Sollwert der Temperatur im Innenraum des Brutschrankes wurde auf 20 °C eingestellt, da bei dieser Temperatur *S. palustre* im Bioreaktor [17, 19] standardmäßig kultiviert wird. Die durchschnittliche Temperatur im Kulturmedium lag zwischen 22,7 bis 24,2 °C und somit wurde sie nicht beim eingestellten Wert von 20 °C gehalten. Dies kann daran liegen, dass die Temperatur in der Flüssigphase und nicht im Reaktorinnere gemessen wurde. Da der Reaktor kontinuierlich mit Gasgemisch begast wurde, was den Wärmeübergang im Vergleich zum statischen Medium in der Medienflasche erhöhen könnte, ist es nicht auszuschließen, dass die Temperatur im Reaktorinneren unter der gemessenen Temperatur im Medium lag. Der schnellere Wärmeübergang im Reaktorkopfraum wurde in anderem Versuch (siehe Anhang, Abbildung 0-46) bewiesen. Unter anderem sollte die leicht erhöhte Kultivierungstemperatur kein Problem für das Mooswachstum darstellen, da die Photosyntheserate von *S. palustre* bei 25 °C höher als bei 20 °C liegt [167]. Somit ist davon auszugehen, dass das Wachstum eher intensiviert wird als verlangsamt. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse auch, dass die Temperatur im Kulturmedium durch die externe Kühlung des Brutschrankes eine Abweichung zwischen 0,5 bis 0,8 °C aufweist. Eine effektivere Kühlung wurde im Scale-up dieses Reaktortyps etabliert (siehe Kapitel Anhang).

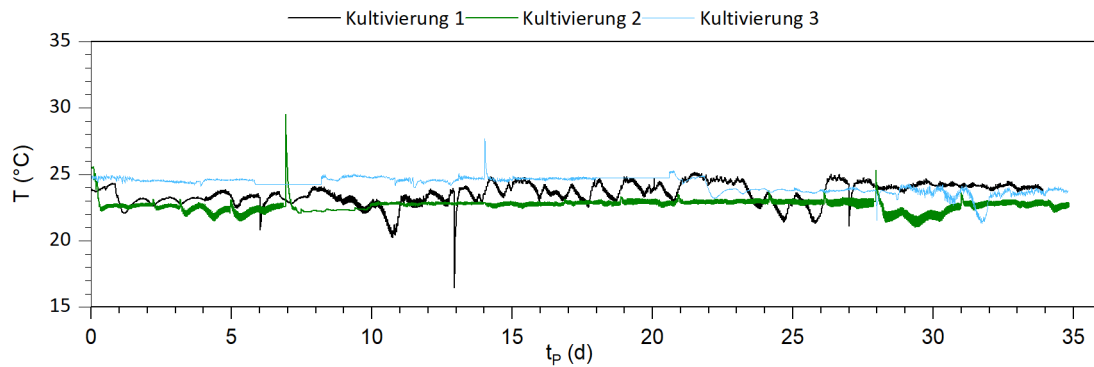


Abbildung 6-3: Temperaturverlauf von drei Kultivierungen im Moosbettreaktor. A) Die Temperatur wurde mittels pH-Sonde im Kulturmedium in der Medienflasche gemessen. Die durchschnittliche Temperatur der Kultivierung 1 lag bei  $23,5 \pm 0,8$  °C, Kultivierung 2 bei  $22,7 \pm 0,5$  °C, Kultivierung 3 bei  $24,2 \pm 0,6$  °C.

### Lichteintrag

Das Lichtmodul wurde so konstruiert, dass die Lichtfläche der Bodenfläche des Moosbettreaktors entspricht, um jeden Ort der Reaktorfläche zu beleuchten (siehe Abbildung 0-19). Die Lichtverteilung im Moosbettreaktor ist in Abbildung 6-4 (A) dargestellt. Die Varianz der ermittelten Photonenflussdichte beträgt 6,6 % und somit kann die Lichtverteilung als homogen betrachtet werden. Die spektrale Zusammensetzung des MBR-LED-Moduls stimmt mit der des Schüttelkolben-Moduls (siehe Abbildung 6-4 B) überein, und somit ist die minimale Photonenflussdichte im Blaubereich ( $\lambda=430$  und  $490$  nm) für das photoautotrophe Wachstum von *S. palustre* erreicht, welche sich im Vorexperiment (siehe Abbildung 4-8) als notwendig für das Wachstum zeigte.

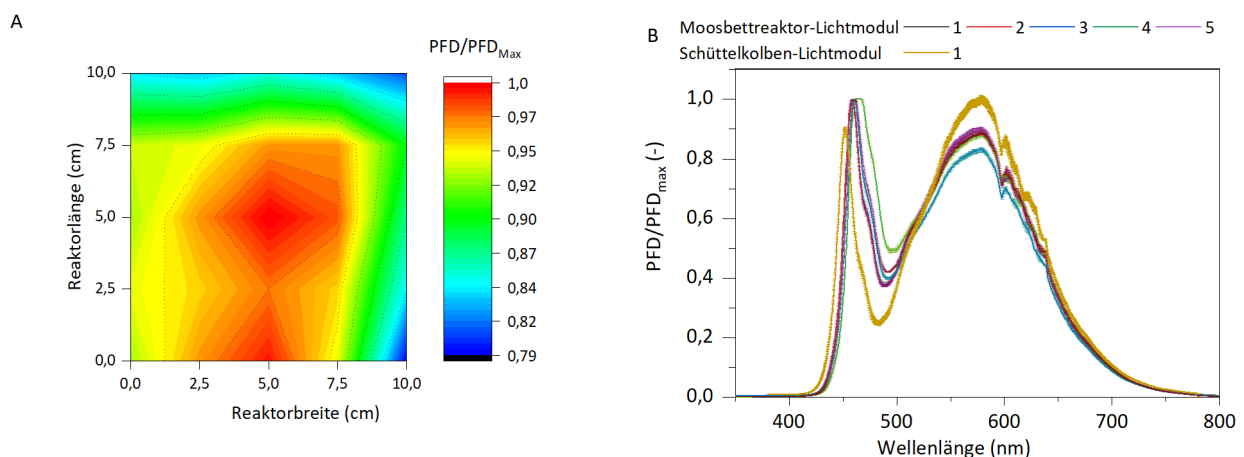


Abbildung 6-4: Charakterisierung des Lichteintrags im Moosbettreaktor. A) Lichtverteilung auf der Reaktorhöhe von 3 cm im Moosbettreaktor bei einer  $PFD_0 = 150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die aufgetragenen Werte sind der gemittelte Wert über 10 s bezogen auf die maximale gemessene PFD im Reaktor. Messung der PFD erfolgte mittels eines planaren Lichtsensors. B) Emissionsspektrum von verwendeten Lichtmodulen (LM) für Moosbettreaktor- und Schüttelkolbenexperimente. Abgebildet sind Mittelwerte der dreifachen Bestimmung mit ihren Standardabweichungen.

### CO<sub>2</sub>-Eintrag

Der Moosbettreaktor verfügte über zwei Arten des Gaseintrags. Angelehnt an das *Trickle-Bed*-Konzept wurde die Gas Mischung unter dem Mosträger zugeführt und weiter durch die Mooschicht durchströmt. Dafür wurden mehrere Bohrungen auf verschiedenen Reaktorhöhen in zwei Reaktorwänden vorgesehen (siehe Abbildung 0-20). Zusätzlich wurde auch in Betracht gezogen, dass die Torfmoose das Medium bzw. Wasser in den Hyalocyten speichern [71] und von einem Flüssigkeitsfilm auf ihrer Oberfläche umgeben sind, was den CO<sub>2</sub>-Eintrag in die Torfmooszelle verlangsamt. Um diesen Einfluss zu verringern, wurde die CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit im Flüssigkeitsfilm erhöht, in dem das zugeführte Kulturmedium

kontinuierlich mit CO<sub>2</sub> vorbegeast wurde. Somit sollte die CO<sub>2</sub>-Transportlimitierung teilweise vermieden werden. Dies wird detailliert in Kapitel 6.5.2 erläutert.

Die Bestimmung der Begasungsrate, mit welcher die Torfmoose kontinuierlich mit CO<sub>2</sub> ohne C-Limitierung versorgt werden sollten, benötigt eine genaue Aufnahmekinetik der Mooskultur im Moosbettreaktor. Da sie nicht bekannt ist, wurde eine Begasungsrate von 25 ml·min<sup>-1</sup> mit einem molaren CO<sub>2</sub>-Anteil im Gas ( $x_{\text{CO}_2}$ ) von 3 % gewählt. Diese entsprach dem Volumenstrom, bei welchem die Gasphase im Reaktorkopfraum stündlich ausgetauscht wird. Gleichzeitig sollte die Begasungsrate zu keiner CO<sub>2</sub>-Limitierung führen. Dies wurde rechnerisch überprüft: Der theoretische CO<sub>2</sub>-Bedarf liegt bei 2 ml·h<sup>-1</sup>, wenn im Moosbettreaktor 5 g Biotrockenmasse mit einem spezifischen C-Gehalt von 0,47 g·g<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 5-4) innerhalb von 35 Tagen produziert wird und die experimentell übermittelte CO<sub>2</sub>-Aufnahmerate maximal 10 mg·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> [31, 69, 83, 164] beträgt. Bei einem gewählten  $x_{\text{CO}_2} = 3\%$  beträgt der zugeführten CO<sub>2</sub>-Volumenstrom 0,03 ml·min<sup>-1</sup> und der Volumenstrom vom Zugas 1,15 ml·min<sup>-1</sup>, was deutlich unter der gewählten Begasungsrate ist.

### Moosträger

Zunächst wurde die Bioverträglichkeit verschiedener Materialien (verzinkter Stahl 8.8, Edelstahl 1.4301, Edelstahl 1.4571) auf das Torfmoos in Schüttelkolbenexperimenten untersucht. Objekte dieser jeweiligen Materialien wurden zum Kultivierungsbeginn der Mooskultur hinzugegeben und anschließend wurde *S. palustre* unter Standardbedingungen kultiviert. In Abbildung 6-5 sind die Mooskulturen nach 35 Tagen Kultivierung abgebildet.

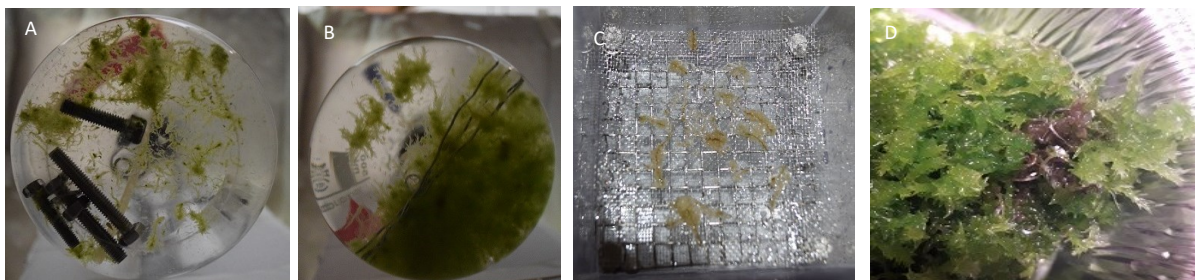


Abbildung 6-5: Schüttelkolbenexperiment zur Bioverträglichkeit der verschiedenen Materialien mit der Mooskultur *S. palustre*. A) Ansicht der Mooskultur mit verzinkten Zylinderschrauben ( $t_p=35$  d), B) mit vier Stangen des Drahtgewebes aus rostfreiem Edelstahl ( $t_p=35$  d), C) im Moosbettreaktor auf einem Moosträger bestehend aus Drahtgewebe und Zylinderschrauben ( $t_p=35$  d) und D) mit 1 g rostfreiem austenitischem Edelstahl ( $t_p=35$  d). Kultivierungsbedingungen der Schüttelkolbenexperimentes:  $T_k=20\pm 1$  °C,  $V_M=250$  mL Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD}=100$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G=20$  mL·min<sup>-1</sup> mit 1 % CO<sub>2</sub> (v/v),  $t_p=35$  d, Anzahl an Kolben pro Parameter: 1,  $n=1$ .

Im Fall der Zugabe von verzinkten Zylinderschrauben (Stahl 8.8) wuchsen die inokulierten Torfmoose gar nicht (siehe Abbildung 6-5 A). Das Drahtgewebe (Harver & Boecker, Deutschland) bestehend aus nicht-rostendem Edelstahl (1.4301) beeinflusste die Färbung der Moospflanzen, die sich hellgrün bis teilweise gelblich verfärbten (siehe Abbildung 6-5 B). Die Verwendung eines Moosträgers aus dem Drahtgewebe gestützt mit Zylinderschrauben war für die Moose im Moosbettreaktor letal (siehe Abbildung 6-5 D). Nach bereits  $t_p=2$  d verfärbte sich die gesamte Biomasse gelblich mit einhergehendem Ausbleichen der Chloroplasten (siehe Anhang, Abbildung 0-21). Beim Einsetzen der Splitter aus austenitischem rostfreiem Edelstahl (1.4571) wuchs das Torfmoos wie der Vergleichsmaßstab, jedoch traten bräunlich verfärbte Stellen am Torfmoos (siehe Abbildung 6-5 D) im direkten Kontakt zum Metallstück auf.

Das Vorexperiment zeigte, dass verzinkter Edelstahl das Wachstum hemmen kann und die Verfärbung der Moospflanze und Chlorophyllabbau in Kontakt mit dem Metall nicht vernachlässigbar ist. Die mögliche Ursache der Beobachtungen kann die Interaktion der Moospflanze mit einem oder mehreren Elementen des verwendeten Stahls sein. Im Falle des verzinkten Edelstahls liegt die Vermutung nahe, dass Zink die Ursache dieser Verfärbung ist, da in Versuchen in Schattiertunnel [142] die Torfmoose unter noch frei liegenden Querrohren des Schattiertunnel-Gestänges abstarben. Es scheint, dass sich Zink aus den Zinkverstreibungen des Gestänges durch die Bewässerung der Mooskultur gelöst hat und das Wachstum von Torfmoosen inhibierte. [196] Zink spielt als Spurenelement eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Zellvermehrung, der Photosynthese, des Stickstoffstoffwechsels und der Produktion von Nukleinsäuren sowie Proteinen [196, 259]. Bei einer erhöhten Konzentration kann es zur Zink-Toxizität kommen, die sich durch

Wachstumshemmung oder Chlorose auszeichnet [259]. Dies hängt jedoch von der angewendeten Zink-Konzentration, der Zeit des Kontakts mit Pflanze sowie der Kontaktfläche des Materials mit Pflanze ab. Da in dem hier beschriebenen Experiment weder die Zinkkonzentration noch die Größe der metallischen Fläche ermittelt wurde, bleibt der negative Zink-Einfluss lediglich eine Hypothese. Nichtsdestotrotz sollte für die weitere Reaktorentwicklung der Zinkeinsatz vermieden werden.

Der negative Effekt des austenitischen rostfreien Edelstahls bei direktem Kontakt des Materials mit der Moospflanze über längere Zeit war nicht zu erwarten. Dieses Material wird in Biotechnologie als Standardwerkstoff für Bioreaktorbau eingesetzt, da es physiologisch unbedenklich ist und keine Migration unzulässiger Bestandteile der medienberührenden Anlagenteile erlaubt. [110, 117] Es könnte die Oberfläche während des Kolbenexperiments die Moose verletzt haben oder eventuell gab es elektrochemische Reaktion zwischen dem Moos an sich mit dem Metall.

### Bestimmung des Wachstums

Zur Wachstumsüberwachung der kultivierten Torfmoose im Moosbettreaktor wurden drei Methoden getestet. Die erste Methode war die Aufzeichnung des Verlaufs des Längenzuwachses im Moosbettreaktor (siehe Kapitel 6.6.1). Die zweite Methode der Wachstumsbestimmung war die Messung der Abgaszusammensetzung, da durch die Photosynthese das konstant zuströmende Zugas von CO<sub>2</sub> abgereichert wird. Diese Veränderung im Abgas kann mit Hilfe einer Gasanalytik und Massenbilanz (siehe Kapitel 3.5.4) quantifiziert werden, was einen guten Indikator auf zunehmende Biomassemenge im Reaktor darstellt. Die Etablierung dieser Methode war nicht erfolgreich, da durch den Abgasfilter des Reaktors bei einer Begasungsrate von 1,5 L·h<sup>-1</sup> kaum Abgas ausgetreten ist und somit keine Messung der Gaszusammensetzung möglich war. Die letzte Methode zur Wachstumsquantifizierung basierte auf der Bilanz der aufgenommenen Elemente aus dem Kulturmedium. Die Durchführung sowie die Ergebnisse werden in Kapitel 6.6.3 behandelt.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass der Bioreaktor für die Dauer der Kultivierung konstante Lichtbedingungen und überwiegend stabile Temperaturbedingungen aufrechterhalten kann. Außerdem zeigte sich, dass keine verzinkten Bauteile, welche mit Medium in Kontakt stehen, verwendet werden dürfen. Beim Einsatz des austenitischen rostfreien Edelstahls sollte ein längerer Kontakt mit den Pflanzen vermieden werden, wobei der Effekt mit dem Medium vernachlässigbar zu sein scheint. Ob die Torfmooskultivierung in diesem Reaktortyp etabliert werden kann, wird in weiteren Kapiteln detailliert untersucht.

## 6.3 Etablierung der Prozessführungsstrategie im Moosbettreaktor

Angelehnt an das Konzept des *Trickle-Bed*-Reaktors sollte die Versorgung der Moospflanzen durch Versprühen des Mediums von oben erfolgen. Dies benötigte erstens die Etablierung eines Medium-Kreislaufs mit integrierter Düse und zweitens einen geeigneten Moosträger, welche die Anforderungen aufgelistet im Kapitel 6.1 erfüllt.

### Experiment I

In einem ersten Experiment wurde die Machbarkeit einer Kultivierung mit Berieselung erprobt. Das entworfene Schema des Medienkreislaufs wurde bereits in Kapitel 3.3.4.1 in Abbildung 3-7 präsentiert und wird an dieser Stelle nicht mehr erläutert. Zur Bewässerung kam eine Edelstahl-Zerstäubungsdüse (0,4 mm, Adhere To Fly, Vietnam) am Reaktordeckel zum Einsatz, welche das Medium auf die gesamten Reaktorfläche abgegeben hat. Basierend auf den Ergebnissen zur Untersuchung des Medienwechsels in Schüttelkolben (siehe Kapitel 5.2) wurde zur Torfmooskultivierung im Moosbettreaktor das 0,2fache Knop-Medium angesetzt und wöchentlich gewechselt. Außerdem wurde stündlich das gesamte Medienvolumen von 400 mL mit einem Volumenstrom von 24,5 ml·min<sup>-1</sup> 17 min lang versprüht. Die Zeit war so gewählt, damit das ganze Medium einmal durch den Reaktor durchfloss. In diesem Experiment war der Einsatz eines Moosträgers wie im *trickle-bed* Reaktor noch nicht geplant, um zunächst den Einfluss der Düse auf das Wachstum von Torfmoosen zu testen. Als Moosunterlage wurde ein Speichervlies (Polypropylen-500, Nira GmbH & Co.KG, Deutschland) verwendet, welches bereits als Unterlage im *Sphagnum farming* zum Einsatz kommt [12, 16]. Außerdem erwies sich dieses Material als wachstum-unbedenklich, wie es ein Vorexperiment in Schüttelkolben (siehe Abbildung 0-22) zeigte. Wichtig zu



erwähnen ist, dass das neue Vlies vor dem Einsatz im Wasser (100 °C, 2 h) eingelegt und anschließend unter fließendem Wasser gewaschen wurde. Dies war erforderlich, weil ohne den Waschschrift die inokulierten Torfmoose direkt nach einem Tag im Reaktor sich gelblich verfärbten (siehe Abbildung 0-23).

Die restlichen Kultivierungsbedingungen entsprachen der Standardbedingungen, welche in Tabelle 3-3 aufgelistet sind. Die Ergebnisse der Kultivierung von *S. palustre* sind in Abbildung 6-6 dargestellt. Die Kultivierung sollte ursprünglich fünf Wochen lang erfolgen, wurde jedoch aufgrund des mangelhaften Wachstums abgebrochen. Außerdem haben sich die Torfmoose braun verfärbt. Eine mögliche Begründung für diese Beobachtung könnte die Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber mechanischem Stress sein. Da die *in-vitro Sphagnen* im Vergleich zu denen in der Natur dünner sind [17, 21], sind sie wahrscheinlich nicht so robust gegenüber dem mechanischen Stress des Wasserstrahls der Zerstäubungsdüse. Eine Vernebelungsdüse könnte dieses Problem eventuell beheben. Um jedoch die Flüssigkeit vernebeln zu können, sind hohe Drücke und Durchsätze der zu vernebelten Flüssigkeit erforderlich. Dies wäre im Moosbettreaktor mit einem hohen apparativen Aufwand verbunden. Deswegen wurde die Etablierung einer Vernebelungsdüse im *trickle-bed*-Reaktor auf die zweite Entwicklungsstufe verschoben, in welcher eine Maßstabvergrößerung um den Faktor 80 mit einem Reaktorvolumen 125 L erfolgte (siehe Anhang).

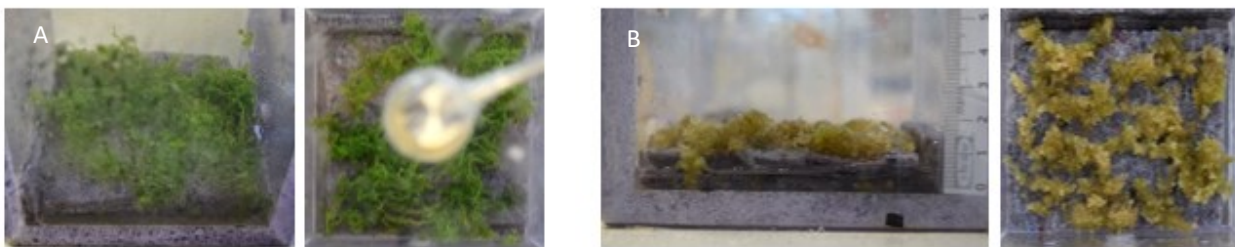


Abbildung 6-6: Experiment zur Untersuchung des Medienversprühen auf das Wachstum von Torfmoosen mittels einer Zerstäubungsdüse. A) Ansicht der Mooskultur im Moosbettreaktor zur Prozesszeit  $t_p = 0$  d und B)  $t_p = 21$  d.

### Experiment II

Da sich das Besprenkeln der Biomasse als nicht erfolgreich zeigte, wurde im nächsten Schritt ein quasi-kontinuierlicher Perfusionsprozess im Moosbettreaktor vorbereitet. Diese Prozessführung kombinierte eine Rückhaltung der Torfmoose im Reaktorraum (Perfusion) und zeitlich regelbare Zuführung des Kulturmediums im Kreislauf. Dazu wurde die Torfmooschicht von einem geringen Medienfluss durchströmt, um die Scherkräfte des zugeführten gegen das zerstäubte Medium zu reduzieren. Bei einem Medienfluss von  $0,01 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  tropfte das Medium aus der Medienzuführöffnung an einer Reaktorseite (siehe Abbildung 3-7) auf die Torfmooschicht und floss an der Reaktorwand herab. Anschließend verließ das Medium den Reaktor durch einen Bodenablauf in der gegenüberliegenden Wand. Das Medium sammelte sich in der Sammelflasche und wurde jede Stunde dem Reaktor eine Woche lang wiederzugeführt. Das stündliche Intervall war an Versuchen aus der Torfmooskultivierung im Gewächshaus [94] angelehnt, in welchem die Torfmoose jede Stunde 10 Minuten lang mit Medium berieselt wurden. In hier beschriebenen Experiment förderten die Pumpen das Medium 8,75 min, in denen das komplette Medievolumen einmal durch den Reaktor am Anfang jeder Stunde gepumpt wurde. Zusätzlich wurde somit hohe Nährstoffkonzentration vermieden, die im einem Batchprozess zum Kultivierungsanfang vorliege. Da die Medienzufuhr phasenweise erfolgte, wurde diese Prozessführungsstrategie als quasi-kontinuierlich bezeichnet. Das Medium wurde wöchentlich gewechselt, was sich in den vorhergehenden Schüttelkolbenexperimenten (siehe Kapitel 5.2) als wachstumsfördern erwiesen hat. Als Moosträger wurde das bereits erwähnte Polypropylen-Vlies gewählt. Dieses Material war bioverträglich, hitzebeständig, speicherte das Wasser und erfüllte alle Anforderungen an den Moosträger, auf welchem die Moospflanzen im Moosbettreaktor wachsen sollten. Eine hohe Porosität des Materials war nicht mehr erforderlich, da das Medium durch das Material nicht passieren musste. Die restlichen Materialien, welche als Moosträger getestet aber nicht weiter zur Kultivierung verwendet wurden, sind im Anhang beschrieben (siehe Abbildung 0-23).

Mit dieser Prozessführungsstrategie wurde *S. palustre* unter Standardbedingungen (siehe Tabelle 3-3) in zweifacher Ausführung kultiviert. Unter den verwendeten Prozessparametern wurde eine Bildung der kompakten Mooschicht (siehe

Abbildung 6-8) beobachtet. Die Grundfläche des Reaktors wurde vollständig bewachsen und die Moose wuchsen bis zu einer Höhe von  $2,6 \pm 0,7$  cm ( $n=2$ ). Die produzierte Menge an Feuchtmasse betrug  $44,9 \pm 5,3$  g ( $n=2$ ).

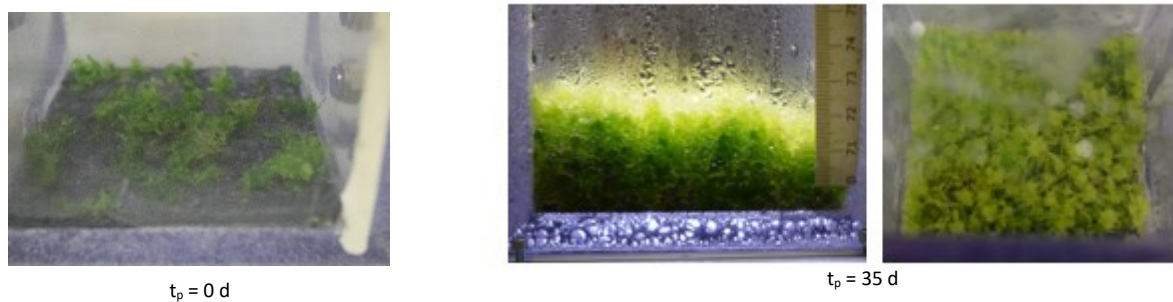


Abbildung 6-8: Produzierte Torfmoosbiomasse von *S. palustre* im Moosbettreaktor kultiviert im 0,2fachen Knop-Medium mit 400 mL Volumen. Ansicht der Mooskultur in einem von zwei Reaktoren, von vorne (links) und von oben (rechts) zum Kultivierungsanfang  $t_p = 0$  d und zum Kultivierungsende  $t_p = 35$  d.  $m_{FM,0} = 2,97 \pm 0,01$  g,  $m_{FM,Ende} = 44,9 \pm 5,3$  g. Kultivierungsparameter:  $T_K = 22 \pm 0,6$  °C, PFD =  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 1,5$  L  $\cdot$  L $^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 35$  d,  $n=1$ .

Zusätzlich zu der Bestimmung der Moosmenge wurde die Ionenkonzentration der Medienproben gemessen. Die Konzentrationsverläufe der Ionen, die nicht aus dem Medium vollständig aufgenommen wurden, befinden sich im Anhang (siehe Abbildung 0-24). Ammonium und Nitrat waren die einzigen Ionen, deren Konzentrationen im Laufe der Kultivierung auf null sanken. In Abbildung 6-7 sind die Konzentrationsverläufe separat für jede Kultivierung (MBR 1, MBR 2) abgebildet. Die grauen und weißen Flächen der Abbildungen stellen die Verläufe der Kationen- und Anionenkonzentration zwischen vier Medienwechseln dar. In der ersten Kultivierungswoche wurde im Medium des Reaktors 2 Ammonium noch nachgewiesen, während für Reaktor 1 das komplette Ammonium bereits nach dem dritten Tag aufgenommen wurde. Ab der zweiten Kultivierungswoche mit neuem Medium beinhaltet das Kulturmedium an Tag 3 ( $t_p = 10$  d) kein Ammonium mehr. Die Nitratkonzentrationen sinken über den Verlauf der Kultivierung auf immer kleiner werdende Niveaus ab, wobei das Nitrat in der fünften Kultivierungswoche im Reaktor 2 (MBR 2) vollständig aufgebraucht wurde. Im Reaktor 1 (MBR 1) wurde ähnliches vier Tage später beobachtet.

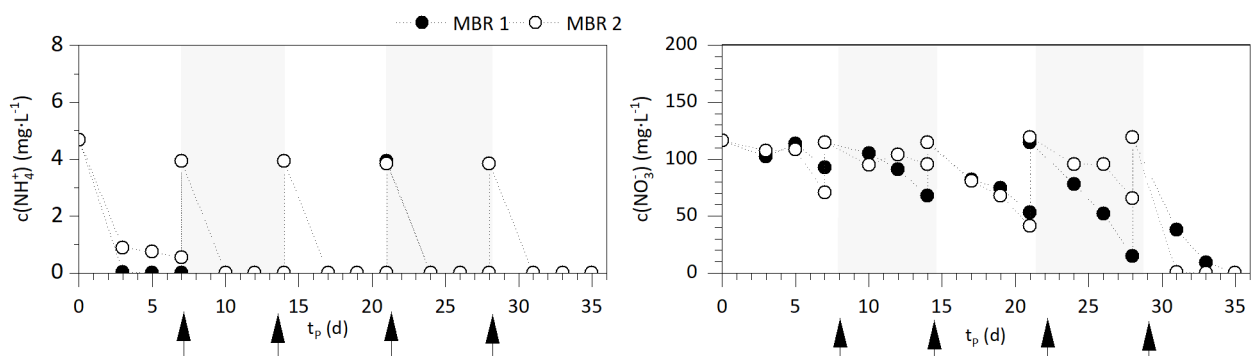


Abbildung 6-7: Nährstoffkonzentrationsverlauf des Experiments zur Etablierung der Prozessführungsstrategie für *S. palustre* kultiviert in Moosbettreaktor in 400 mL Medium (0,2 x) mit dem Konzentrationsverlauf des Ammoniums  $c(\text{NH}_4^+)$  und des Nitrats  $c(\text{NO}_3^-)$ . Der wöchentliche Medienwechsel ist mit den Pfeilen gekennzeichnet. Kultivierungsparameter:  $T_R = 22 \pm 0,6$  °C, PFD =  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 1,5$  L  $\cdot$  L $^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 35$  d,  $n=1$ .

Die Konzentrationsverläufe der Nitrat- und Ammoniumionen bestätigen die vorhergehenden Beobachtungen, dass Ammonium bevorzugt aufgenommen wird. Da die Analyseproben an Tag 3 nach dem Medienwechsel genommen wurden, ist es nicht eindeutig, ob die beiden N-Quellen in einem zeitlichen Raum gleichzeitig verwertet werden können.

Die Verwendung des Speichervlies und die Medienführung im Kreislauf mit wöchentlichem Medienwechsel zeigte sich als eine geeignete Prozessführungsstrategie in diesem Reaktortyp. Die Torfmoose wuchsen kompakt und bildeten eine dichte Moossschicht. Die detaillierte Beschreibung des Wachstums befindet sich im Kapitel 6.6.1. Da nicht mehr der Träger, sondern die Moose selbst mit ihrer Wuchsform das *Trickle-Bed* darstellten, wurde anstatt des *Trickle-Bed*-Reaktor Begriffs die Bezeichnung Moosbettreaktor für diesen Reaktortyp eingeführt. Die erreichte Produktivität im Moosbettreaktor von  $118 \pm 39$  g FM  $\cdot$  m $^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  überschreiten die natürlichen Produktivitäten ungefähr um den Faktor 20 [87]. Dies war



auch zu erwarten, weil in einem Bioreaktor die Torfmoose nicht den wechselhaften Wetterbedingungen sowie mangelnder Nährstoffverfügbarkeit ausgesetzt sind. Da am Ende der Kultivierung kein Nitrat im Medium vorhanden war, ist es zu erwarten, dass die Produktivitäten noch höher liegen können. Diese Hypothese wird im kommenden Kapitel experimentell überprüft.

## 6.4 Etablierung des Kulturmediums

### 6.4.1 Experiment I

Aufgrund der festgestellten N-Limitierung im 0,2fachen Knop-Medium mit 400 mL wurde in einem nächsten Versuch eine erhöhte Nährstoffverfügbarkeit im Kulturmedium untersucht. Das Torfmoos *S. palustre* wurde in zwei unterschiedlichen Medien kultiviert. Im ersten Medium wurde das Medienvolumen verdoppelt ( $V_M=800$  mL) und die Konzentration einzelner Medienbestandteile beibehalten (0,2fach), während im zweiten Medium ist das Medienvolumen gleichgeblieben ( $V_M=400$  mL), aber die Konzentration der Nährstoffe verdoppelt (0,4fach). Somit war die absolute Menge an allen Nährstoffen in beiden Medien und auch die Verhältnisse zwischen einzelnen Elementen gleich. Das Experiment erfolgte in zweifacher Bestimmung unter Standardbedingungen (siehe Tabelle 3-3).

In beiden Medienvariationen wurde das Wachstum beobachtet (siehe Abbildung 6-9), wobei weder die Erhöhung des Medienvolumens noch die Steigerung der Nährstoffkonzentration eine signifikante Steigerung des Biomasseertrags (Feuchtmasse) im Moosbettreaktor im Vergleich zum vorherigen Experiment (400 mL 0,2fach) bewirkte. Dies galt auch für die durchschnittliche Wuchshöhe.

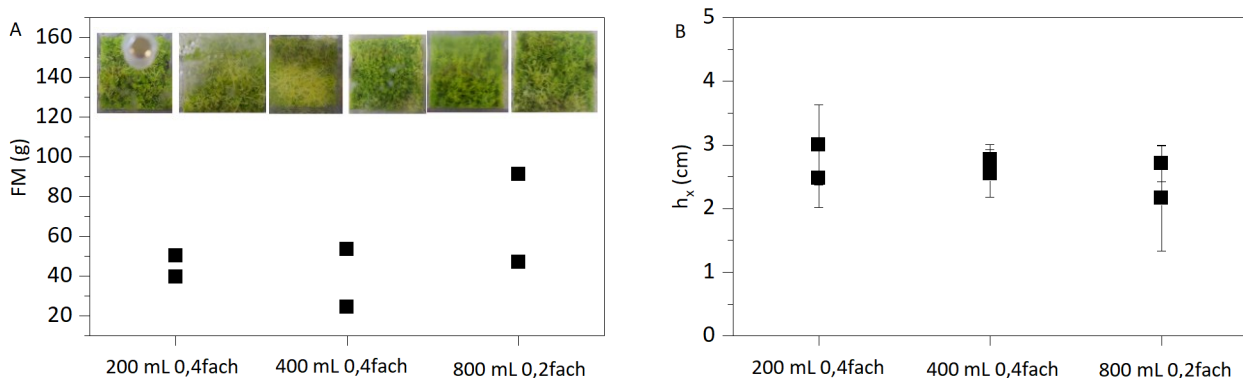


Abbildung 6-9: Vergleich der produzierten Torfmoosbiomasse von *S. palustre* im Moosbettreaktor kultiviert im 0,4fachen 400 mL und im 0,2fachen 800 mL Knop-Medium. Der Versuchsmaßstab waren die Ergebnisse aus der Kultivierung im 400 mL 0,2fachen Medium. Aufgetragen ist A) die Endfeuchtmasse (FM) in einfacher Bestimmung zusammen mit den photographischen Aufnahmen der Mooskultur im Moosbettreaktor zur  $t_p=35$  d.; und B) die mittlere Wuchshöhe zur  $t_p=35$  d. Der dargestellte Wert sind Mittelwerte der Wuchshöhe mit ihren Standardabweichungen in jeweils einem Moosbettreaktor. Die Animpfmengen  $m_{FM,0}$  betrug  $2,9 \pm 0,38$  g für 0,2faches 400 mL,  $2,97 \pm 0,01$  g für 0,4faches 400 mL und  $2,97 \pm 0,09$  g für 0,2faches 800 mL Medium. Kultivierungsparameter:  $T_K=23,5 \pm 0,8$  °C, PFD =  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g=1,5 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2}=3$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p=35$  d,  $n=1$ .

Um die mögliche Limitierung der Nährstoffe zu identifizieren, wurden die Kationen und Anionen im Medium regelmäßig in einfacher Bestimmung gemessen und beide Duplikate aufgetragen. Die Ionen, die am Ende der Kultivierung immer noch im Medium vorhanden waren, befinden sich im Anhang (siehe Abbildung 0-25). In Abbildung 6-10 sind die Verläufe für Nitrat und Magnesium dargestellt. Ähnlich wie im Experiment mit dem 400 mL 0,2fachen Medium wurde bei beiden getesteten Medien ein ähnlicher Trend über den gesamten Kultivierungszeitraum hinweg zu sehen. In der ersten Kultivierungswoche blieben die Ionenkonzentrationen überwiegend konstant. Nach dem ersten Medienwechsel ( $t_p=7$  d) sank die Nitrat- und auch Magnesiumkonzentration von den ursprünglichen Werten des frischen Mediums bis zu den nächsten Medienwechseln ab. Die Senkung der Konzentration war nahezu linear. Zusätzlich wurden die Ionenkonzentrationen wöchentlich geringer und die Senkung steiler. Dies ist wahrscheinlich auf die Zunahme der Torfmoosbiomasse im

Reaktor und somit verbundenem erhöhtem Nährstoffbedarf zurückzuführen. Eine komplette Aufnahme von Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) trat in 400 mL Medium (0,2fach) nicht auf, während im 800 mL Medium (0,2fach) ab einer Prozesszeit von  $t_p=33$  d. Die Konzentration des Magnesiums  $c(\text{Mg}^{2+})$  als einziges Kation lag in beiden getesteten Medien gegen dem Kultivierungsende unter  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , allerdings erreichte nicht den Nullwert.

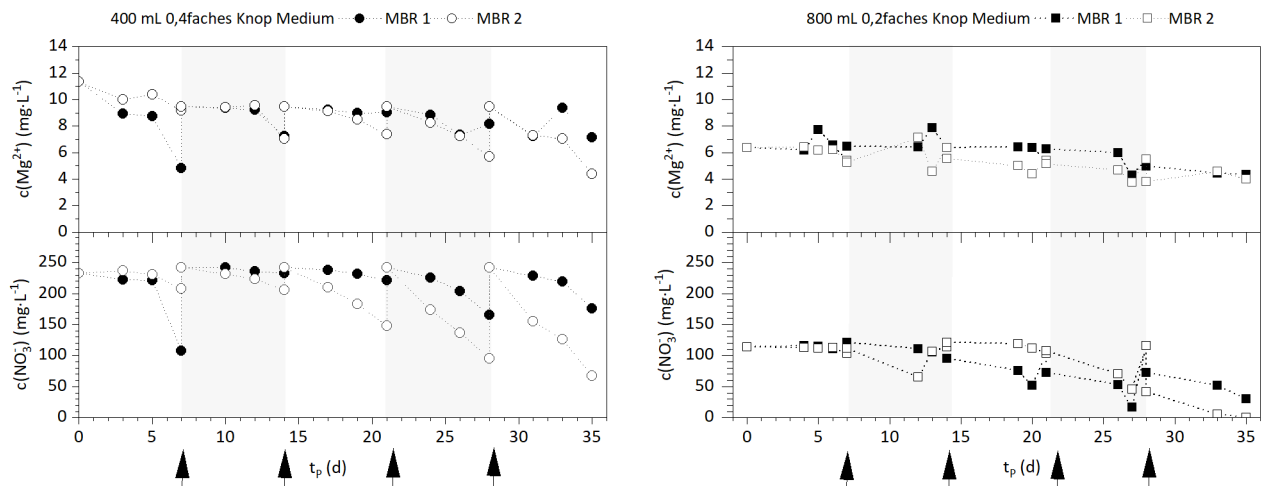


Abbildung 6-10: Nährstoffkonzentrationsverlauf des Experiments zur Medienetablierung für *S. palustre* kultiviert in Moosbettreaktor im 400 mL 0,4 fachen Knop-Medium und im 800 mL 0,2fachen Knop-Medium mit Konzentrationsverlauf des Magnesiums  $c(\text{Mg}^{2+})$  und des Nitrats  $c(\text{NO}_3^-)$ . Aufgetragen sind die Konzentration gemessen in einfacher Bestimmung für jede MBR-Kultivierung (MBR) Abgebildet sind beide Duplikate mit ihren Standardabweichungen. Der wöchentliche Medienwechsel ist mit den Pfeilen gekennzeichnet. Kultivierungsparameter:  $T_K = 23,5 \pm 0,8$  °C, PFD =  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_B = 1,5 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3\%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p=35$  d,  $n=1$ .

Beim Vergleich der Konzentrationsverläufe zwischen beiden Medien ist es auffällig, dass die Ionen im 0,4fachen Medium schneller als die im 0,2fachen sinken. Dies könnte drei Ursache haben. Erstens könnte zum Kultivierungsanfang mehr Inokulum im Reaktor mit dem 0,4fachen Medium vorhanden sein, welches einen höheren Nährstoffbedarf benötigt, was eine schnellere Abnahme der Ionenkonzentration zur Folge hat. Dagegen spricht die Tatsache, dass die Varianz der angeimpfte Inokulummenge bei 1,6 % liegt. Außerdem wuchsen die Moose im 0,4fachen Medium langsamer wie im 0,2fachen Medium (siehe Abbildung 6-9) und daher ist es eher unwahrscheinlich, dass der Unterschied der Ionenverläufe an vorhandener Biomasse liegt. Eine weitere Erklärung für diese Beobachtungen könnte eine fehlerhafte Messung der Medienproben aus dem Experiment mit dem 0,2fachen Medium darstellen. Es könnte sich um einen systematischen Fehler der Verdünnung der Medienproben handeln, welcher in diesem Stand nicht mehr nachgewiesen werden kann und somit nur als eine Spekulation bleibt. Als letzte Ursache, die am meisten plausible scheint, ist die fehlerhafte Einstellung der Frequenz der Medienzufuhr. Die Zeit, in welcher die Pumpen für die Medienzufuhr angeschaltet waren, war in allen vier Reaktoren gleich, berechnet für das Medienvolumen von 800 mL, eingestellt. Daher wurde das 400 mL Medium in der vorgegebenen Zeit zweimal statt einmal durch den Reaktor gepumpt. Somit kamen die Torfmoose häufiger im Kontakt mit Nährstoffen, nahmen mehr Nährstoffe auf, was in eine deutlich größere Differenz der Konzentration in der Zeit resultieren könnte. Die gezeigte lineare Abnahme des Nitrats und auch Magnesium könnte mit dem linearen Wachstum von Torfmoosen unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen zusammenhängen. Auf diese Hypothese wird weiter in Kapitel 6.6.3 eingegangen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die festgestellten N-Limitierung im 0,2fachen Knop-Medium mit 400 mL durch die Erhöhung des Medienvolumens nicht vermieden werden kann, obwohl doppelt so viel Stickstoff im Medium vorhanden ist. Im Gegensatz dazu bleibt bei der Verdopplung der Mediumkonzentration (0,4fach, 400 mL) das Nitrat im Medium am Ende der Kultivierung immer noch vorhanden, jedoch wächst das Torfmoos *S. palustre* signifikant nicht besser als in den restlichen Medien. Der Grund dafür kann ohne weitere Biomassebestimmung während der Kultivierung sowie die Aufnahmekinetik im Moment nicht gegeben werden. Nichtsdestotrotz ist die Verwendung dieses Mediums von Vorteil, da keine Limitierung

von den wichtigsten Nährstoffen vorliegt. Gegen dieses Medium (0,4x, 400mL) spricht das überflüssige Nährstoffüberangebot an allen restlichen Ionen, da am Kultivierungsende alle gemessenen Ionen im 0,4fachen Medium deutlich über die aus dem 0,2fachen Medium lagen.

## 6.4.2 Experiment II

Basierend auf vorheriger Erkenntnis wurde eine weitere Variante des Knop-Mediums zur Torfmooskultivierung im Moosbettreaktor vorgeschlagen. Das Volumen betrug weiterhin 800 mL, die Verdünnung blieb bei den 20 % (v/v). Um die aufgetretenem Stickstoffmangel zu kompensieren, wurde das Magnesiumnitrat ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) mit einer Konzentration von  $0,216 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  dem Medium zugegeben. Die Konzentration des Nitratsalzes war so gewählt, damit im neuen Medium dieselbe N-Menge wie im 0,4fachen Medium mit 400 mL Medienvolumen vorhanden ist, weil bei dieser Menge keine N-Limitierung auftrat. Das Magnesium als Gegenion im Nitratsalz wurde aus dem Grund ausgewählt, da Magnesium eine wichtige Rolle in der Photosynthese der Pflanze, wie z.B. Komponente von Chlorophyll, Regulierung und Aktivierung des Enzyms Rubisco, Proteinsynthese spielt. [196] Außerdem liegt eine Studie vor, in welcher auf die Durchströmung mit Natrium-, Calcium- und Kaliumlösung *S. magellanicum* empfindlicher als auf Magnesium reagierte. [178]

Im zweiten Experiment zur Etablierung des Kulturmediums wurde *S. palustre* in zweifacher Bestimmung unter Standardbedingungen (siehe Tabelle 3-3) in einem 0,2fachen Knop-Medium mit  $0,216 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  und einem Volumen von 800 mL kultiviert. Die produzierte Torfmoosbiomasse erreichte eine durchschnittliche Endfeuchtmasse von  $119,3 \pm 1,4 \text{ g}$  und war nicht signifikanter höher als die ohne Magnesiumnitrat (800 mL, 0,2fach, siehe Kapitel 6.4.1). Die mittlere Wuchshöhe betrug  $5,39 \pm 0,89 \text{ cm}$  und war signifikant unterschiedlich zu der im Medium ohne zusätzliche Nitratquelle ( $h_x = 2,43 \pm 0,38 \text{ cm}$ ). Die oberste Capitula-Schicht war deutlich grüner (siehe Abbildung 6-11) im Vergleich zu allen anderen Mooskulturen im Moosbettreaktor.

Um dies mit der Veränderung der Zellzusammensetzung in Zusammenhang zu bringen, wurde der Stickstoffgehalt gravimetrisch mittels C-N Analysator (Kapitel 3.4.6), sowie die spezifischen Anteile für Chlorophyll a ( $q_{\text{Chl a,x}}$ ), b ( $q_{\text{Chl b,x}}$ ) und Carotinoide ( $q_{\text{car,x}}$ ) im Capitulum photometrisch nach Zhu (siehe Kapitel 3.4.9) bestimmt. Dazu wurde 1 cm von der obersten Schicht der Torfmoose, gewachsen in 0,2-fachem Medium mit einem Volumen von  $V_M = 800 \text{ mL}$  mit und ohne Magnesiumnitrat, am Kultivierungsende abgeschnitten, anschließend gefriergetrocknet und aufgeschlossen (siehe Kapitel 3.4.4).

In Abbildung 6-12 sind die Ergebnisse der einzelnen Moosbettreaktorproben als Mittelwert der dreifachen Bestimmung einer Reaktorprobe dargestellt. Torfmoose, gewachsen in Medium mit Nitratzugabe, besaßen dunkel gefärbte Capitula, in welchen der Stickstoffgehalt  $31,5 \pm 0,2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  betrug. Dies war signifikant höher als die hellgrüne Capitula aus dem Moosbettreaktor mit 800 mL 0,2x Medium ( $q_{\text{N,x}} = 28,9 \pm 0,2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Die Differenz betrug 8 %. Der spezifische Pigmentanteil an Chlorophyll a verzeichnete denselben Trend: je dunkler die Verfärbung der Capitula, desto mehr Pigmente waren in der Zelle vorhanden. Torfmoose aus dem Medium mit Magnesiumnitrat setzten sich aus einem Chlorophyllgehalt von  $q_{\text{Chl a,x}} = 1,71 \pm 0,07 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  zusammen. Dies war um 33 % mehr als bei den Torfmoosen, die im 0,2fachen 800 mL Knop-Medium ohne  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  gewachsen sind. Der Chlorophyll b-Gehalt  $q_{\text{Chl b,x}}$  der beiden Proben unterschieden sich nicht signifikant. Dies galt auch für Carotinoide.

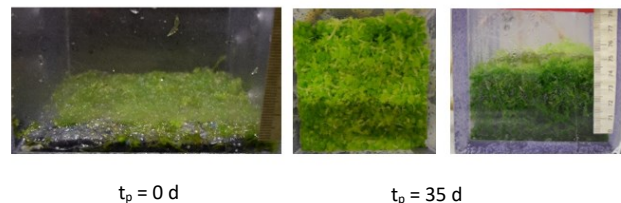


Abbildung 6-11: Produzierte Torfmoosbiomasse von *S. palustre* im Moosbettreaktor kultiviert im 0,2fachen Knop-Medium mit 800 mL Volumen und mit  $0,216 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Ansicht der Mooskultur in einem von zwei Reaktoren, von vorne (links) und von oben (rechts) zum Kultivierungsanfang  $t_p = 0 \text{ d}$  und zum Kultivierungsende  $t_p = 35 \text{ d}$ .  $m_{\text{FM},0} = 3,78 \pm 0,05 \text{ g}$ ,  $m_{\text{FM},\text{Ende}} = 119 \pm 1,4 \text{ g}$  ( $n=2$ ). Kultivierungsparameter:  $T_K = 22,7 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 1,5 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3 \text{ } \%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 35 \text{ d}$ ,  $n=1$ .

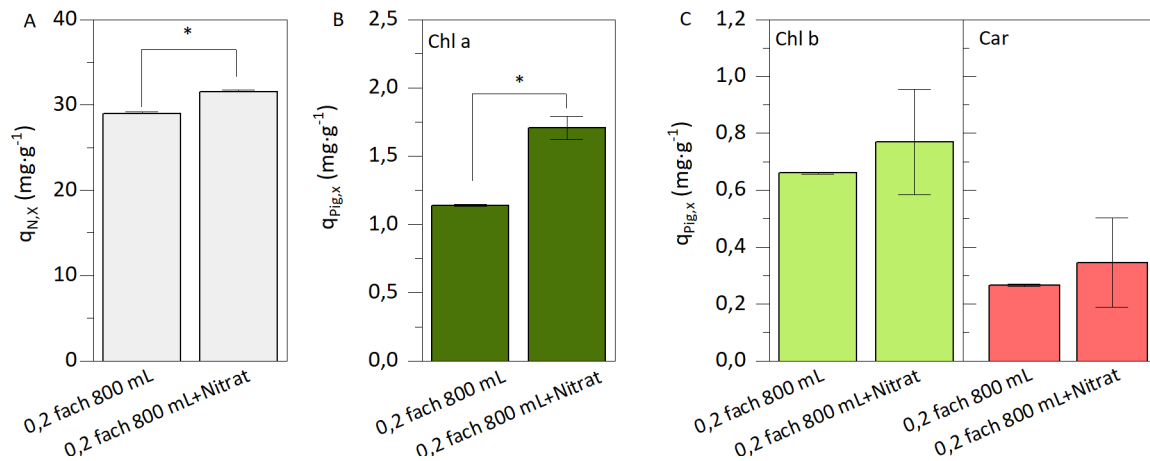


Abbildung 6-12: Einfluss des Kulturmediums auf den Stickstoffgehalt  $q_{N,x}$  (A) sowie die spezifische Anteile für Chlorophyll a  $q_{\text{Chl a},x}$  (B), Chlorophyll b  $q_{\text{Chl b},x}$  und Carotinoide  $q_{\text{Car},x}$  (C) in Capitulas von *S. palustre* kultiviert im Moosbettreaktor mit 800 mL Medium (0,2 x) und 800 mL Medium (0,2x + 0,216  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ). Abgebildet ist der Mittelwert der dreifachen Bestimmung einer Mooskulturprobe mit ihren Standardabweichungen. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Kultivierungsparameter:  $T_K = 22,7 \pm 0,5$  °C, PFD = 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 1,5 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 35$  d,  $n = 1$ .

Außer der Produktivität und Zellzusammensetzung wurden die Ionenkonzentrationen für beide Moosbettreaktoren in einfacher Bestimmung ermittelt. Am Ende der Kultivierung war das Nitrat im Medium mit einer Konzentration von  $c(\text{NO}_3^-) \sim 40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nachzuweisen (siehe Abbildung 6-13). Jenes galt auch für die Magnesiumionen. Zur Prozesszeit  $t_p = 35$  d erreichte die Magnesiumkonzentration im Moosbettreaktor 2 (MBR 2) einen Wert von  $13,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Aus den technischen Gründen konnte die Medienprobe aus MBR1 nicht bestimmt werden. Während der gesamten Kultivierungsdauer wirkte kein anderes Ion limitierend (siehe Abbildung 0-26).

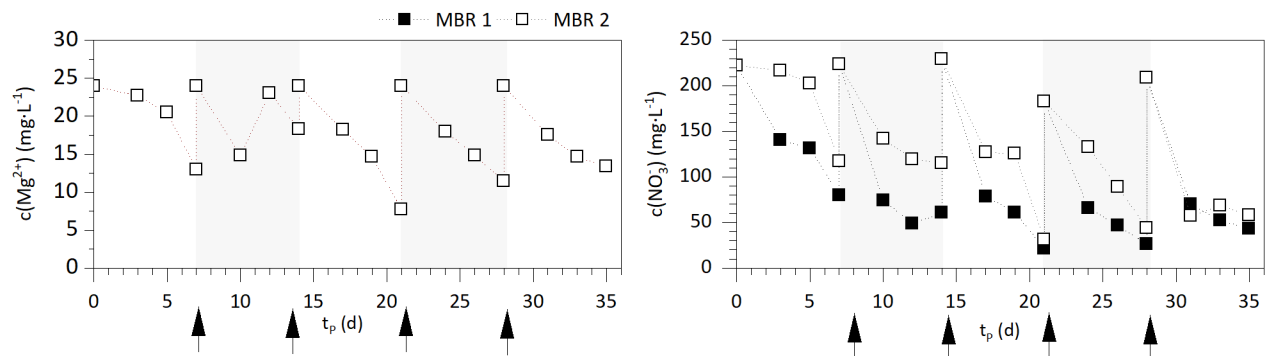


Abbildung 6-13: Nährstoffkonzentrationsverlauf des Experiments zur Medienoptimierung für *S. palustre* kultiviert in Moosbettreaktor im 800 mL 0,2fachen Knop-Medium mit Konzentrationsverlauf des Magnesiums  $c(\text{Mg}^{2+})$  und des Nitrats  $c(\text{NO}_3^-)$ . Abgebildet sind Nährstoffkonzentrationen bei der Duplikate in einfacher Bestimmung. Der wöchentliche Medienwechsel ist mit den Pfeilen gekennzeichnet. Kultivierungsparameter:  $T_K = 22,7 \pm 0,5$  °C, PFD = 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 1,5 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 35$  d,  $n = 1$ .

Anhand der hier beschriebenen Ergebnisse ist es ersichtlich, dass sich die Zugabe von  $0,216 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  positiv auf das Wachstum der Torfmoospflanze *S. palustre* auswirkt. Der positive Effekt ist an der zusätzlichen mittleren Wuchshöhe zu erkennen, jenes sich allerdings nicht auf das Gewicht der feuchten Moose (FM) ausgewirkt hat. Diese Diskrepanz könnte auf die unterschiedliche Morphologie der Pflanzen oder auf unterschiedlichen Wassergehalt der geernteten Torfmoosbiomassen zurückzuführen sein, wobei letzteres maßgeblich für das Gewicht der Torfmoosbiomasse verantwortlich ist (siehe Kapitel 3.4.2). Die erste Hypothese basiert auf der Tatsache, dass die einzelnen Moose möglicherweise eine unterschiedliche Anzahl an Blättchen, ein dickeres Stämmchen und wenig Längenwachstum besaßen, was das Verhältnis des Feuchtmassegewichts und Wuchshöhe variiert. Bei dem verwendeten konstanten Unterdruck könnte das Wasser aus den Zwischenräumen der mit Medium angesaugten Torfmoosen nicht gleichmäßig abfiltriert werden. Dies resultierte in einem Wassergehalt, der nicht bei jeder Probe gleich war und somit entsprach das tatsächliche Feuchtgewicht der im

Moosbettreaktor produzierten Torfmoosen nicht dem ermittelten. Dies ist auch aus der linearen Korrelation zwischen der produzierten Wuchshöhe und der ermittelten Feuchtmasse im Moosbettreaktor (siehe Abbildung 0-27) ersichtlich. Mit steigender Länge der Moospflanzen befindet sich mehr Biomasse im Reaktor, was sich in eine Steigerung der Feuchtmasse widerspiegelt. Allerdings variierte der Wassergehalt während der Bestimmung der Feuchtmasse und steht im Widerspruch mit den Daten von Heck et al. [19] Die Feuchtmassebestimmung von *S. palustre* erzielte Wassergehalt von 88 % mit einer Varianz von 0,1 %. Die in diesen Experimenten ermittelten Wassergehalte liegen im Bereich von 94 bis 97 % und. Der markante Unterschied könnte auf die Nutzung des Cellulose-Filters zurückgehen, welcher hier im Gegensatz zu der Publikation verwendet wurde. Die Filter könnten während des Filtrationsschritts durch im Medium vorhandene Partikel verstopft werden und Wasser zurückhalten. In folgenden Experimenten werden die Feuchtmassegewichte nicht mehr berücksichtigt, da sie untereinander nur bedingt vergleichbar sind. Um dennoch die verschiedenen Experimente miteinander vergleichen zu können, wird die Wuchshöhe als Maß für das Wachstum verwendet.

Aus den Ergebnissen der Wuchshöhe geht es hervor, dass das Wachstum von *S. palustre* positiv beeinflusst wurde, wenn die Stickstoff-Limitierung behoben wurde. Der positive Einfluss des Magnesiums ist auch nicht auszuschließen, da es jedoch in beiden Medien am Ende der Kultivierung nachzuweisen war, ist eher vom erstgenannten Stickstoff-Effekt auszugehen. Wenn die Zelle stickstofflimitiert ist, kann die Synthese der Aminosäuren und somit der Proteine verlangsamt werden [77, 118, 196], welches sich negativ auf die Wachstumsrate der Zelle auswirkt. In Experimenten mit *S. cuspidatum* verursachte die N-Limitierung eine mangelhafte Produktion der Moospflanzeninnovationen. [183] Im Gegensatz dazu reduzierte bereits eine geringe Erhöhung der Stickstoffkonzentration von 0 mmol·L<sup>-1</sup> auf 0,01 mmol·L<sup>-1</sup> das Wachstum von *S. cuspidatum*. [44] Ein ähnlichen Effekt der Reduzierung des Längenwachstum bei einer Konzentrationserhöhung von 0 auf 10 gN·m<sup>-2</sup>·year<sup>-1</sup> wurde an Freilandkulturen [194] nachgewiesen. Da im ersten Experiment die CO<sub>2</sub>-Zufuhr in das Medium lediglich passiv aus der Umgebungsluft erfolgte, kann die CO<sub>2</sub>-Limitierung der Moose und somit verbundener N-Sättigung von *Sphagnum* [206, 243] für die beobachtete negative Auswirkung verantwortlich sein. Der zweite Versuch erfolgte im natürlichen Habitat, in welchem andere Elemente, wie zum Beispiel Phosphor, bei einem erhöhten N-Angebot wachstumslimitierend wirken können. [206] Gegen die Hypothese der N-bedingten Verbesserung des Wachstum von Torfmoosens spricht die Tatsache, dass die beiden ermittelten N-Gehalte deutlich über den N-Gehalt-Werten in den meisten der bisher vorliegenden Untersuchungen [93, 135, 145, 206, 243] liegen. Laut den Daten sinkt die Photosyntheserate ab einem spezifischen N-Gehalt von 13 mg·g<sup>-1</sup> [244] bzw. die Biomasseproduktion in Feldversuchen ab 16 mg·g<sup>-1</sup>. [145] Diese Problematik wurde bereits im Kapitel 5.1.1 vorgestellt und es ließ sich schlussfolgern, dass sich der höhere Stickstoffgehalt der *in-vitro* Mooskultur im Vergleich zu den Freilandmoosen nicht negativ auf die Photosyntheserate auswirken muss, weil möglicherweise andere Elemente reichlich vorhanden sind und dadurch für die Photosynthese oder Biomassebildungsrate nicht limitierend wirken.

Unter der Annahme, dass nicht der N-Gehalt in diesem Experiment die entscheidende Rolle bei der Wachstumssteigerung spielte, scheint die Chlorophyllsteigerung das Wachstum von Torfmoosen positiv beeinflusst zu haben. Mit der erhöhten N-Verfügbarkeit stieg der spezifische Anteil an Chlorophyll a. Mit mehr Chlorophyll-Einheiten kann die Zelle mehr Lichtenergie in chemische Energie umwandeln, was hohe Wachstumsrate zur Folge haben kann- unter der Bedingungen, dass die Pflanze weder Licht noch CO<sub>2</sub> limitiert war. Die Stimulation der Bildung des Chlorophylls in *Shpagnen* durch ein erhöhtes N-Angebot wies Granath et al. [244] in seinen Experimenten mit *S. balticum* nach. In Versuchen mit *S. magellanicum* [184] führte eine Stickstoffmangel zur Verringerung der Chlorophyllgehalte und der damit verbundene Photosyntheserate. Fritz et al. [206] berichtete, dass eine erhöhte N-Zufuhr die Chlorophyllkonzentration im Gewebe von *S. magellanicum* erhöhte [206]. Dennoch wurde in der gleichen Studie festgestellt, dass die Photosyntheserate pro Capitulumgewicht trotz eines höheren Chlorophyllgehaltes nicht zunahm. Dies ist wahrscheinlich auf eine niedrige CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit im Experiment zurückzuführen.

Da in dem hier beschriebenen Experiment keine Photosyntheserate ermittelt wurde, bleibt es unklar ob eine erhöhte Chlorophyllkonzentration eine höhere Photosyntheserate veranlasst, dass in ein schnelleres Wachstum resultiert. Eine zusätzliche Messung des RuBisCO-Gehalts könnte die Basis für eine exakte Korrelation zwischen Wachstum und Photosyntheserate bilden.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass von allen getesteten Kulturmedien die Wuchshöhe der Torfmoose im 0,2fachen Knop-Medium mit einem Volumen von 800 mL und einer Magnesiumnitrat-Konzentration von 0,216 g·L<sup>-1</sup> am höchsten war. Dieses Medium wird im Folgenden als MBR-Medium bezeichnet und galt als das Standardmedium für alle andere Versuche im Moosbettreaktor. Eine weitere Optimierung wurde nicht verfolgt, bei der exakte Aufnahmekinetiken und stöchiometrische Verhältnisse der Elemente benötigt werden. Zusätzlich ist es notwendig, die Verteilung der Nährstoffe im Kulturmedium und des Wassers innerhalb der Pflanze zu verstehen: Im natürlichen Habitat wird das Wasser im Capitulum der Moospflanze aufgrund eines Verdunstungseffektes nach oben transportiert. [27] Da im Moosbettreaktor aufgrund des Kulturmediums eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit herrscht, ist die Triebkraft des kapillaren Transports gering. Dadurch ist es möglich, dass das Medium nach oben nicht gefördert wird und die oberen Pflanzenteile nicht ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden können. Außerdem sollte auch der Abstand zwischen dem Wasserspiegel und dem Capitulum mitberücksichtigt werden, da er sich auf die Wachstumsrate positiv auswirken kann. [260] Die Nachführung des Füllstandes im Bioreaktor war für die zweite Stufe der Reaktorentwicklung vorgesehen (siehe Anhang).

## 6.5 Einfluss von der Licht-, CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit und Tag/Nacht-Zyklen

### 6.5.1 Variation der Photonenflussdichte

In den Vorexperimenten im Schüttelkolben zur Untersuchung der Lichtverfügbarkeit (siehe Abbildung 4-10) war ein Trend der steigenden Biomassekonzentration mit einer erhöhten eingestrahelten Photonenflussdichte zu sehen. Dieser Effekt wurde auch im Moosbettreaktor untersucht. Die Kultivierung von *S. palustre* erfolgte bei drei verschiedenen Photonenflussdichten von 100 – 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  unter Standardbedingungen (siehe Tabelle 3-3) in zweifacher Bestimmung. Die angegebenen Photonenflussdichte wurden auf dem Vlies durch den Reaktordeckel gemessen.

Die photographischen Aufnahmen der Mooskulturen, sowie deren erreichte mittlere Wuchshöhe ist in Abbildung 6-14 dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den gebildeten Wuchshöhen wurde nicht nachgewiesen. Die Torfmoose erreichten eine ähnliche Wuchshöhe, welche  $5,1 \pm 0,5$  cm ( $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $5,4 \pm 0,7$  cm ( $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und  $5,2 \pm 0,6$  cm ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) betragen. Allerdings wurde beobachtet, dass sich mit steigender Photonenflussdichte die Capitula gelblich verfärbten. Dies tritt nicht sofort auf. Beim Vergleich der photographischen Aufnahme der Mooskultur bei verschiedenen PFD (siehe Abbildung 0-30) fällt auf, dass sich die oberste Schicht erst ab einer Prozesszeit von  $t_p=21$  d bei  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  gelblich verfärbt.

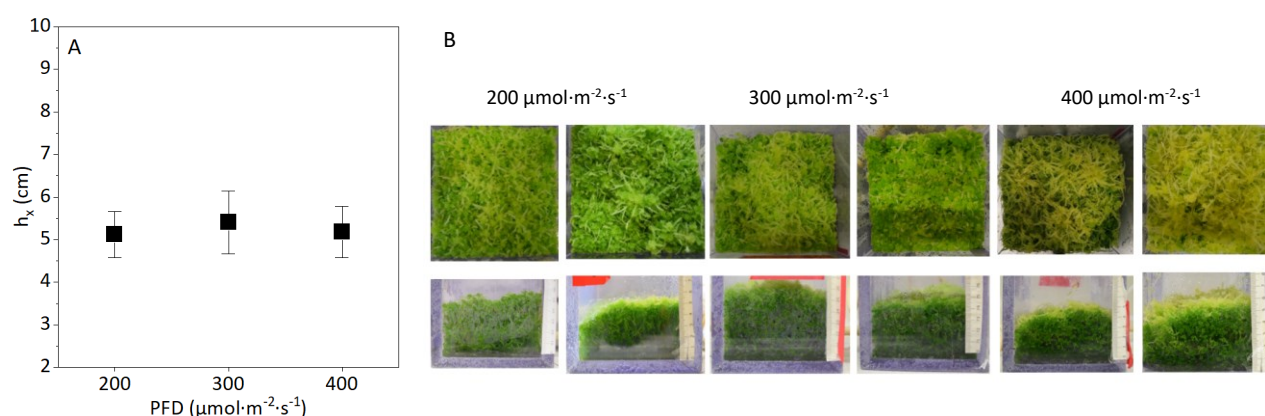


Abbildung 6-14: Experiment im Moosbettreaktor zur Untersuchung des Einflusses von der eingestrahelten Photonenflussdichte auf das Wachstum von *S. palustre*. A) Abhängigkeit der mittleren Wuchshöhe  $h_x$  von der eingestrahelten Photonenflussdichte PFD. Abgebildet sind Mittelwerte der beiden Reaktorduplikate bei jeweils einer Photonenflussdichte mit ihren Standardabweichungen. B) Ansicht der Mooskultur im Moosbettreaktor am Kultivierungsende ( $t_p=35$  d). Die Animpfmengen  $m_{FM,0}$  betrug  $7,82 \pm 3,41$  g ( $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $4,26 \pm 0,52$  g ( $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und  $3,51 \pm 0,28$  g ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), Kultivierungsparameter:  $T_K=21 \pm 2$  °C, Dauerbeleuchtung,  $V_g=1,5$  L·h<sup>-1</sup>,  $x_{CO_2}=3$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m=800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p=35$  d,  $n=1$ .



Dieses Experiment zeigte, dass eine Photonenflussdichte von 200 bis 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  keine Steigerung der Wuchshöhe bewirkt. Dies deckt sich mit den Untersuchungen aus dem Experiment in den Schüttelkolben (siehe Abbildung 4-10) und widerspricht teilweise den Daten von Jauhiainen et al. [136]. Die Daten zeigen den Beginn der Lichtsättigung der Freilandmoosen erst bei 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , ab welcher sich die Photosyntheserate nicht mehr ändert. Unter der Annahme, dass die Photosyntheserate direkt mit der Biomassebildungsrate im Zusammenhang steht, sollten die Moose im Moosbettreaktor geringere Wuchshöhe bei 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erreichen. Dies war nicht der Fall, weil eine Erhöhung der Lichtintensität zu keiner Steigerung der Wuchshöhe, welche im Endeffekt das Resultat von der Wachstumsrate ist, führte. Dies deutet darauf hin, dass die *in-vitro* kultivierten Torfmoose einen niedriger liegenden Lichtsättigungspunkt besitzen, als die aus der Natur.

Außerdem ruft die PFD über 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  die Gelbfärbung der Moose hervor, welches auch im Vorexperiment (siehe Kapitel 4.5.1) festgestellt wurde. Als Ursache der Gelbfärbung wird ein lichtreduzierter Chlorophyllabbau vermutet. Dieser Zusammenhang wurde bereits in einem anderen Experiment (siehe Abbildung 6-12, Abbildung 6-9) nachgewiesen. Der Grund des Chlorophyllabbaus kann eine Lichtakklimatisation oder eine N-Limitierung sein. Wenn die Zelle starkem Licht ausgesetzt wird, schützt sie sich vor den schädlichen Reaktionen angeregter Photosysteme [76], in dem Chlorophyll-Moleküle abgebaut bzw. in andere Schutzpigmente umgewandelt werden [132]. Somit wird weniger Lichtenergie absorbiert, welche bei einem Überschuss anschließend *per non-photochemical quenching* (NPQ) in Form von Wärme dissipiert wird. [59, 133] Die PI-Kurven von Freiland-*Sphagnen* [68, 139, 245] weisen einen breiten Bereich des Lichtsättigungsbereichs auf. Dies wird dadurch erklärt, dass der Elektronenfluss im Moosgewebe nicht gesättigt wird und die *Sphagnen* hohe Werte an NPQ zeigen. [245] Eine Erklärung weshalb *in-vitro* Torfmoose bei deutlich geringeren Photonenflussdichten als in der Natur mit einem Chlorophyllabbau reagieren bzw. die Energie durch NPQ-Mechanismen nicht abführen können, kann im Moment nicht gegeben werden. In der Studie von Murray et.al [169] wurde der geringere Stickstoffgehalt im Gewebe mit der fehlenden Lichtakklimatisation im Zusammenhang gebracht. Der genaue Wert wurde nicht angegeben. Gegen die N-Limitierung der Mooskultur im Moosbettreaktor sprechen die Ergebnisse aus der Ionenanalytik (siehe Abbildung 0-28) sowie die bereits diskutierten N-Gehalte (siehe Abbildung 6-12).

### 6.5.2 Variation der CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit im Kulturmedium

In diesem Experiment wurde der Einfluss der Begasung des Kulturmediums auf das Wachstum der Torfmooskulturen untersucht. Wenn das Medium durch den Moosteppich im Reaktor strömt, wird es von den Torfmoosen in den Hyalocysten gespeichert [71]. Ein Flüssigkeitsfilm auf der Moosoberfläche verhindert den direkten Import des CO<sub>2</sub> aus der Gasphase, sodass es zur Aufnahme die Phasengrenzfläche passieren muss. [110] Dabei kann eine Transportlimitierung in der Flüssigphase aber auch zwischen der Gas- und Flüssigphase auftreten, was dazu führt, dass die Moose ihren Bedarf an CO<sub>2</sub> nicht decken können. Um diese Transportlimitierungen vorzubeugen, wurde die CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit im Flüssigkeitsfilm der Torfmoose erhöht, in dem das zugeführte Kulturmedium kontinuierlich mit CO<sub>2</sub> begast wurde. Somit sollte die Torfmoospflanze nicht nur auf den CO<sub>2</sub>-Transport aus der Gasphase angewiesen sein, sondern kann schon das im Medium gelöste CO<sub>2</sub> zur Assimilation verwenden. Diese Hypothese wurde im folgenden Experiment überprüft.

Im ersten Versuchsansatz wurde das Zugas (siehe Abbildung 3-7) zuerst in die Medienflasche in das Medium geleitet und danach strömt es in den Reaktorraum hinein. Diese Art der Begasung wurde als Kultivierung mit Begasung des Mediums bezeichnet und sollte die CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit in der Flüssigkeit erhöhen. Die negative Kontrolle des Experiments war eine Kultivierung mit direkter Kopfbegasung. Dabei gelangte das Zugas über ein Sterilfilter direkt in den Reaktorkopfraum, ohne das Medium zu durchströmen. Dieser Ansatz wurde als Kultivierung ohne Vorbegasung des Kulturmediums genannt. Die restlichen Kultivierungsbedingungen waren identisch und sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst. Der Versuch wurde in zweifacher Bestimmung durchgeführt, doch wurde eine Kontamination im Kulturmedium eines Moosbettreaktors ohne Begasung in der ersten Kultivierungswoche festgestellt. In Abbildung 6-15 sind die Ergebnisse dargestellt. Der Moosbettreaktor mit Begasung des Kulturmediums produzierte Moose mit einer Wuchshöhe von  $5,4 \pm 0,7$  cm ( $n=2$ ), während die direkte Kopfbegasung in einer Wuchshöhe von  $3,8 \pm 0,2$  cm ( $n=1$ ) resultierte. Außerdem wies die Biomasse des Moosbettreaktors ohne Begasung eine gelbliche Verfärbung der obersten Mooschicht auf. Dieses Experiment

unterstützt die oben gestellte Hypothese, dass der CO<sub>2</sub>-Eintrag aus der Gasphase in den Flüssigkeitsfilm bei der gegebenen Begasungsrate und CO<sub>2</sub>-Anteil im Zugas nicht den CO<sub>2</sub>-Bedarf der Moose deckt.

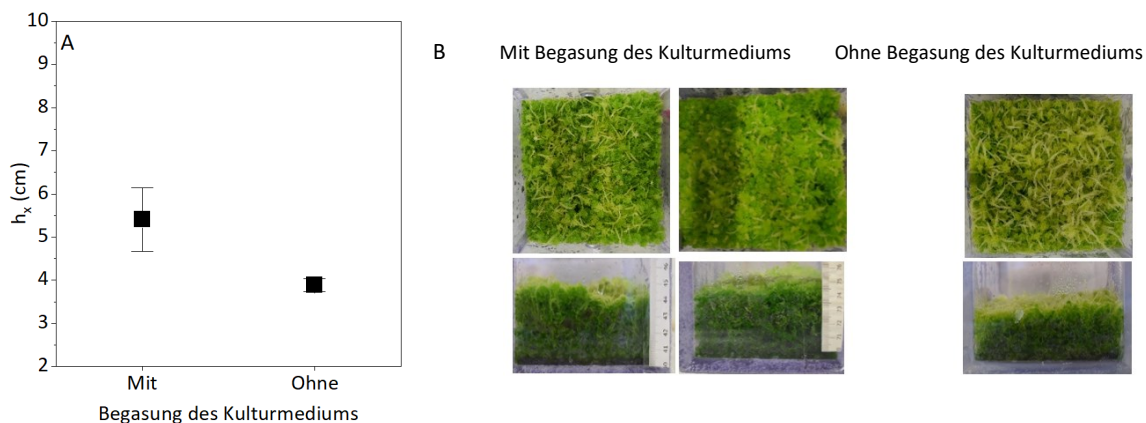


Abbildung 6-15: Experiment im Moosbettreaktor zur Untersuchung des Einflusses der Begasung des Kulturmediums auf das Wachstum von *S. palustre*. A) Abhängigkeit der mittleren Wuchshöhe  $h_x$  von der Begasung des Mediums. Bei dem Experiment ohne die Begasung gelang das Zugas direkt in den Kopfraum des Reaktors. Abgebildet sind die Mittelwerte der Wuchshöhe beider Reaktorduplikate nur für den Versuchansatz mit der Vorbegasung des Kulturmediums mit ihren Standardabweichungen. Die Animpfmenge  $m_{FM,0}$  betrug  $4,87 \pm 1,26$  g (mit Vorbegasung), und  $5,75$  g (ohne Vorbegasung). B) Seitliche Ansicht der Mooskultur und die Ansicht durch den Reaktordeckel auf die Torfmoossschicht am Kultivierungsende ( $t_p=35$  d). Kultivierungsparameter:  $PFD = 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $T_k = 21 \pm 0,4$  °C,  $V_g = 1,5$  L $\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3\%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35$  d,  $n=1$ .

Die Oberflächenreaktoren, wie der Moosbettreaktor verfügen über keine Mechanik zur Durchmischung der Flüssigphase im Reaktor. So kann der CO<sub>2</sub>-Übergang aus der Gasphase in das Kulturmedium das Wachstum limitieren. Um dies zu bestätigen, wurde die CO<sub>2</sub>-Transperrate aus der Gasphase über den Flüssigkeitsfilm aus dem zweiten Fickschen Gesetz (siehe Tabelle 0-7) berechnet. Angenommen wurde eine Dicke des Flüssigkeitsfilms auf der Moosoberfläche von 1 mm, ein Diffusionskoeffizient  $D(\text{CO}_2, \text{g})$  von  $2,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [118] und eine Sättigungskonzentration  $c_{\text{CO}_2}^*$  von  $0,051 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $x_{\text{CO}_2}=3\%$ ,  $T=20$  °C,  $V_n=22,4\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $H_{\text{CO}_2, \text{H}_2\text{O}}=1,48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{bar}^{-1}$ ) [118]. Aus der Gleichung ergab sich ein CO<sub>2</sub>-Fluss von  $539 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ , wenn im Reaktor  $0,5 \text{ gBTM}$  der Torfmoosbiomasse mit einer spezifischen Fläche von  $28 \text{ m}^2\cdot\text{gBTM}^{-1}$  [21] vorhanden war. Dieser Wert ist ähnlich zu der gemessenen CO<sub>2</sub>-Aufnahmeraten von *Sphagnen* in der Natur, wie zum Beispiel  $600 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . [68] Im Moosbettreaktor herrschen definierte Bedingungen und Nährstoffe liegen im Überschuss vor, sodass die CO<sub>2</sub>-Aunahmerate im Moosbettreaktor höhere Werte erreichen könnte. Die abgeschätzten Werte liegen durchschnittlich bei  $827 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ , wenn der Kohlenstoffgehalt der Zelle  $q_{c,x}=0,47 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  (siehe Abbildung 6-12) beträgt und insgesamt  $4 \text{ g BTM}$  (siehe Abbildung 6-20) im Moosbettreaktor in 5 Wochen auf  $0,01 \text{ m}^2$  produziert wird. Diese Berechnungen deuten darauf hin, dass im Moosbettreaktor die CO<sub>2</sub>-Transperrate das Wachstum limitieren könnte. Es ist es an dieser Stelle zu erwähnen, dass es nicht eindeutig ist, wie effektiv die Begasung des Kulturmediums ( $V_g=1,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $d_{\text{Schlauch}} = 5 \text{ mm}$ ) war, und welche CO<sub>2</sub>-Konzentration sich im Flüssigkeitsfilm eingestellt hat. Die  $k_{ia}$ -Bestimmung bei einer Schlauchbegasung kann diesen Wert ermitteln, wurde jedoch in diesem Experiment nicht bestimmt.

Aus den dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass der Gaseintrag im Moosbettreaktor eine wichtige Rolle für das Wachstum spielt. Auffällig an den produzierten Torfmoosen ist, dass sich ihre Capitula gelblich verfärbt haben. Eine gelbe Färbung wurde bereits mit der Reduzierung des Chlorophyllgehalts in der Mooszelle (siehe Abbildung 6-12) in Zusammenhang gebracht. Über die Auswirkung der limitierenden CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit auf den Chlorophyllgehalt von Torfmoosen wurde in der Literatur kaum berichtet. Baker et al. [61] zeigte eine Mooskultur von *S. cuspidatum* nach vier Wochen Kultivierung auf der Agarplatte und beobachtete, dass die Chlorocyten nur teilweise mit Chloroplasten gefüllt waren. Dies ist in der Übereinstimmung mit der mikroskopischen Aufnahme der Mooskultur kultiviert ohne Begasung des Mediums (siehe Abbildung 0-29). Paffen et al. [112] fand ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer Gelb-Färbung der



Mooskultur und der CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit. Eine Erklärung für diese Befunde ist nicht gegeben, es wird jedoch vermutet, dass die Photo-Akklimatisierung der Moospflanze diesen Effekt verursacht, welcher bereits im Kapitel 6.5.1 erläutert wurde.

Um die Transportlimitierung aus der Gasphase in die Flüssigphase zu erhöhen und somit die oben beschriebenen Effekte zu vermeiden, kann der CO<sub>2</sub>-Eintrag entweder durch die Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Zugas oder durch die Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Volumenstrom erhöht werden.

### 6.5.3 Variation der Hell-Dunkel-Zyklen

Der Einfluss der Hell-Dunkel/Zyklen auf das Wachstum von *S. palustre* wurde im Moosbettreaktor untersucht, um die vorher beobachtete Ergebnisse (siehe Abbildung 4-12) zu bestätigen. Die Länge der Hellphase betrug 24, 20 und 16 Stunden. Über die Dauer der Versuche wurde der Moosbettreaktor mit einer konstanten PFD von 300 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> beleuchtet. Die Lichtzeitschaltung wurde mittels BioProCon geregelt. Um eine ungewollte Belichtung der weiter untenstehenden Moosbettreaktoren einzugrenzen, wurde zwischen jeder Etage eine lichtundurchlässige Kunststoff-Unterlage gelegt. Die Kultivierung von *S. palustre* erfolgte unter Standardbedingungen (siehe Tabelle 3-3) in zweifacher Bestimmung.

In Abbildung 6-16 sind die erreichten Wuchshöhe  $h_x$ , sowie die Mooskultur am Ende der Kultivierung ( $t_p=35$  d) dargestellt. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Wuchshöhe. Dieses Ergebnis bestätigt, dass eine Hell-Phase von 16 Stunden ausreicht, um ähnliche Produktivität im Vergleich zu längeren Belichtungszeiten im Moosbettreaktor zu erreichen. Die oberste Schicht der Mooskultur wies eine ähnliche hell-grüne Färbung auf und die gelblichen Verfärbungen sind in allen Experimenten unabhängig der Belichtungszeit beobachtet worden.

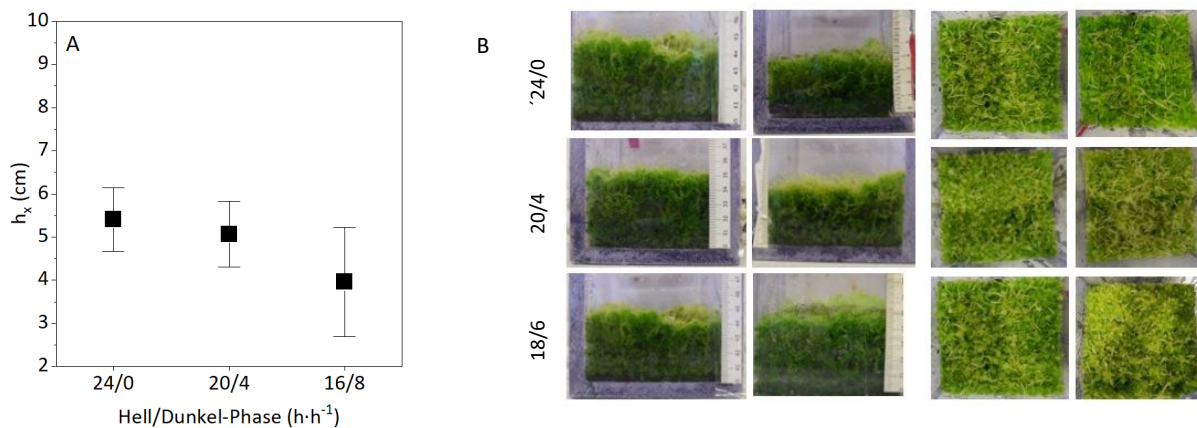


Abbildung 6-16: Experiment im Moosbettreaktor zur Untersuchung des Einflusses der Dunkel- und Hellphase auf das Wachstum von *S. palustre*. A) Abhängigkeit der mittleren Wuchshöhe  $h_x$  von dem Hell-Dunkel-Zyklus. Abgebildet sind Mittelwerte der beiden Reaktorduplikate bei jeweils einem Hell-Dunkel-Zyklus mit ihren Standardabweichungen. B) Seitliche Ansicht der Mooskultur und die Ansicht durch den Reaktordeckel auf die Torfmooschicht am Kultivierungsende ( $t_p=35$  d). Die Animpfmenge  $m_{FM,0}$  betrug 6,31±0,16 g (18/6), 7,48 ±0,69 g (20/4) und 9,07±2,99 g (24/0). Kultivierungsparameter: PFD = 300 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>  $T_K=21 \pm 0,4$  °C,  $V_g=1,5$  L·h<sup>-1</sup>,  $X_{CO_2}=3$  %,  $pH_{Anfang}=4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m=800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p=35$  d,  $n=1$ .

## 6.6 Charakterisierung des Wachstums von Torfmoosen im Moosbettreaktor

Wenn sich die Morphologie der *Sphagnen* mit fortschreitendem Wachstum ändert, ist eine detaillierte Beschreibung der Wachstumskinetik sehr komplex. Um diese dennoch abzuschätzen, wurden drei Ansätze der Charakterisierung des Wachstums während der Prozesslaufzeit vorgeschlagen und getestet: Als erstes wurde das Wachstum der Mooskultur im Moosbettreaktor photographisch erfasst und die Wuchshöhe des Moospolsters ermittelt (siehe Kapitel 6.6.1). Im zweiten Ansatz wurde mehrere Moosbettreaktoren parallel betrieben und geerntet, um die tatsächlich produzierte Torfmoosbiomasse während der Kultivierung zu bestimmen (siehe Kapitel 6.6.2). Im letzten Ansatz wurde die im Lauf der Kultivierung produzierte Biomasse mit der quantitativen Ionenaufnahme verglichen und gegebenenfalls korreliert (siehe Kapitel 6.6.3).

### 6.6.1 Wachstumsverlauf, Morphologie und Zellzusammensetzung der Torfmoospflanze

Im Fokus dieses Kapitels stand neben der Beschreibung der Wachstumskinetik auch die Beschreibung der morphologischen Änderung von *S. palustre* im Moosbettreaktor und die Charakterisierung der Moospflanze anhand ihrer Zellzusammensetzung.

#### Wachstumsverlauf

In der Abbildung 6-17 A ist ein bildlicher Wachstumsverlauf des Torfmooses *S. palustre* unter Standardbedingungen dargestellt. In den ersten sieben Tagen der Kultivierung wurde ein Wachstum in die Reaktorfläche beobachtet. Zur Prozesszeit  $t_p = 14$  d bewuchs das Inokulum gleichmäßig den gesamten Querschnitt des Reaktors, wobei sich hauptsächlich kleine Capitula auf den Torfmoosen bildeten. Nach zwei Wochen Kultivierung setzte das vertikale Wachstum nach oben ein. Die Streckung des Stämmchens ( $t_p = 14$  d) ist in Abbildung 6-18 (A1) zu sehen. Die jungen Gametophyten bestanden aus einem dünnen Stämmchen (siehe Abbildung 6-18 D, F) an deren Spitze jeweils ein kleines Capitulum gebildet war. Aus dem Stämmchen wuchsen neben den Seitenästchen zusätzliche kleine Innovationen mit einem Durchmesser von ca.

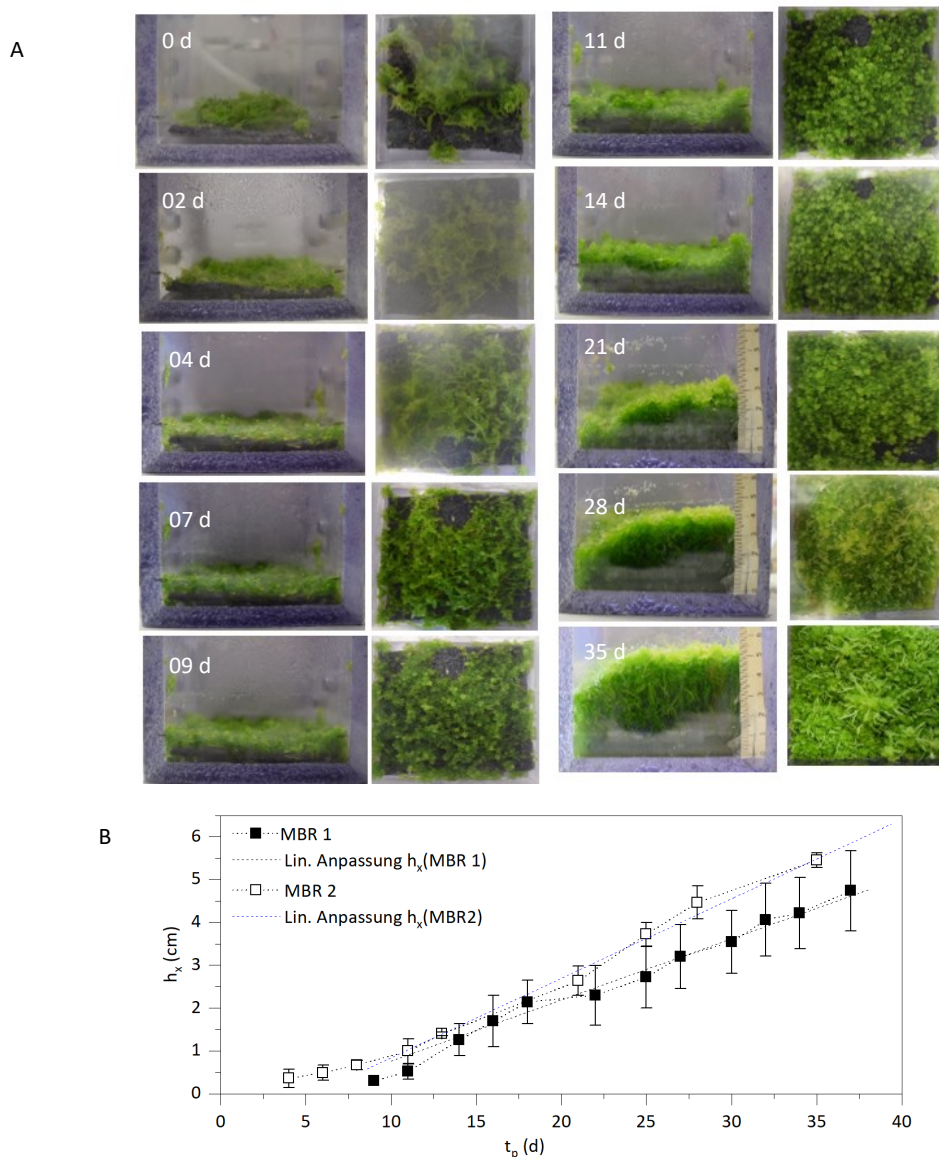


Abbildung 6-17: Wachstumsverlauf der Torfmoosart *S. palustre* im Moosbettreaktor. A) Bildlicher Wachstumsverlauf im Moosbettreaktor anhand der seitlichen Ansicht und der Ansicht durch Reaktordeckel. B) Die durchschnittliche Wuchshöhe von *S. palustre* im Moosbettreaktor (MBR). Die gestrichelten Linien stellen die Ausgleichsgeraden dar, welche über eine lineare Regression mit der Software OriginPro® bestimmt worden. Die Animpfmengemenge  $m_{FM,0}$  betrug  $9,03 \pm 3,27$  g (*S. palustre*). Kultivierungsparameter: PFD =  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   $T_K = 23,5 \pm 0,1$  °C,  $V_g = 1,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3 \%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35$  d,  $n=1$ .

2 mm (siehe Abbildung 6-18 F). Eine mehrfach wiederholte Verzweigung des Gametophoren wurde festgestellt (siehe Abbildung 6-18 C1, B2).

Außer dem bildlichen Verlauf wurde die Wuchshöhe des Moost Teppichs anhand eines am rechten Rand des Moosbettreaktors positionierten Maßstabs ermittelt. Ein Verlauf der mittleren Wuchshöhe ist in Abbildung 6-17 B dargestellt. Das Torfmoos *S. palustre* zeigte eine stetige Höhenzunahme mit einem nahezu linearen Verlauf. Mittels einer linearen Regression in OriginPro® wurde die Steigung ab einer Prozesszeit von  $t_p = 14$  d ermittelt. Die durchschnittliche Längenzuwachsrates betrug  $0,14 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$  im ersten Moosbettreaktor und  $0,19 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$  im zweiten. Die Wachstumsverläufe bestätigen die Vermutung, dass es sich um ein lineares Wachstum der Torfmoose im Moosbettreaktor handelt. Das lineare Wachstum gilt in der photoautotrophen Bioverfahrenstechnik als Indiz eines lichtlimitierten Stoffwechsels. [118] Bei konstanter Belichtung ist die Energiezufuhr in das System ebenfalls konstant und so ergibt sich ein konstanter Zuwachs an der Biomasse, welcher unter der maximal möglichen Zuwachsrates liegt. [118] Ein weiterer Indikator für eine vorliegende Lichtlimitierung ist die hohe Lichtabsorptionsrate im Reaktor, sodass nach Passieren der Kultur keine oder nur eine geringe Menge an Photonen nachzuweisen ist. [118] In diesen Versuchen war dies bereits nach etwa 1 cm Moossschicht der Fall (siehe Abbildung 4-11) und daher war auch zu erwarten, dass die Moose im Moosbettreaktor als Resultat einer Lichtlimitierung linear wachsen. Eine Bestätigung dieser Hypothese wird weiter im Kapitel 6.6.2 mittels einer gravimetrischen Bestimmung der Biomasse im Moosbettreaktor im Laufe der Kultivierung überprüft.

Die Flächen-Produktivität des Moosbettreaktors für *S. palustre* betrug  $12,6 \text{ gBTM}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , das etwa  $4,6 \text{ kgBTM}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{year}^{-1}$  entspricht. Dies ist um den Faktor von 3 bis 17fach höher als die Produktivität im natürlichen Habitat [6, 87] und um den Faktor von 7 bis 13 als auf den Testflächen vom *Sphagnum farming*. [12, 93, 145] Die Kultivierung im natürlichen Habitat unter nicht optimalen und ganzjährigen Bedingungen, wobei im Winter kein Wachstum stattfindet, können die Diskrepanz in der Produktivität erklären. [56] Beim Vergleich der durchschnittlichen Längenzuwachsrates mit den Literaturdaten ist eine deutliche Wachstumsverbesserung von *S. palustre* durch die Moosbettreaktorkultivierung zu bemerken: *S. palustre* wuchs z.B. auf den Flächen vom *Sphagnum farming* mit einer über mehrere Jahre gemittelten Längenzuwachsrates von  $25 \text{ cm}\cdot\text{year}^{-1}$  ( $0,07 \text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ ) um den Faktor 2,4 langsamer als die Mooskultur im Moosbettreaktor.

### Morphologie der Mooskultur

Die typische Morphologie des Torfmoos *S. palustre* aus dem Moosbettreaktor ist in Abbildung 6-18 dargestellt. Das Moospolster (siehe Abbildung 6-18 B1) bestand aus dicht stehenden, verzweigten, voll ausdifferenzierten Einzelpflanzen (siehe Abbildung 6-18 B2), die mit ihren seitlichen Ästchen ineinander verankert waren. Die Oberfläche des Moost Teppichs war

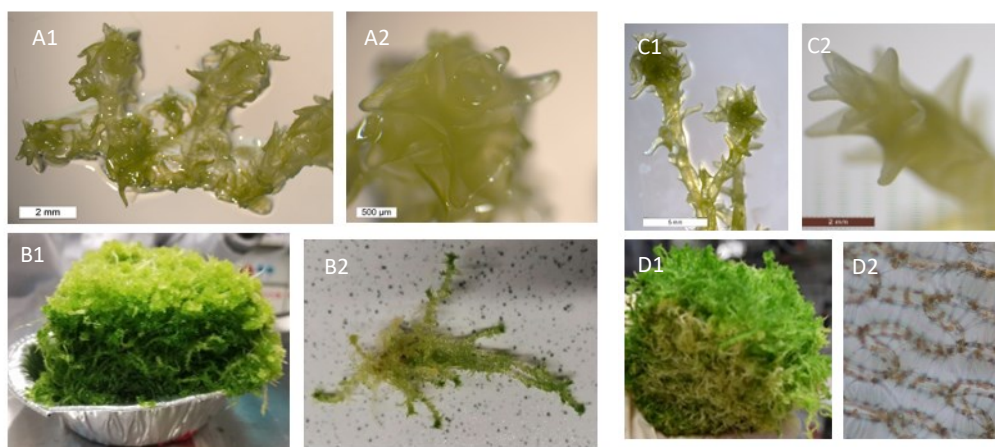


Abbildung 6-18: Saatgut produziert im Moosbettreaktor A1-2) Mikroskopische Aufnahme der Torfmoose zur Prozesszeit  $t_p = 14$  d mittels eines Binokulars. A1: kleine Gametophore, A2: Capitulum; B1-2) geerntete Biomasse aus dem Moosbettreaktor, B1: Moospolster, B2: einzelne Moospflanzen; C1-2) Mikroskopische Aufnahme der Torfmoose zur Prozesszeit  $t_p = 35$  d mittels eines Binokulars. C1: kleine Gametophore, C2: Wachstumspunkt; D1-2) Moospolster mit angefangener Zersetzung der untersten Pflanzenteile der Pflanze, D2: Mikroskopische Aufnahme des untersten Pflanzenteils. Die abgebildete Skala entspricht 2 mm (A1), 500  $\mu\text{m}$  (A2), 5 mm (C1) und 2 mm (C2). Kultivierungsparameter:  $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   $T_k = 23,5 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V_g = 1,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3 \%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800 \text{ mL}$  und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35 \text{ d}$ ,  $n=1$ .

überwiegend mit Capitula mit mehreren dünnen aufsteigenden Ästchen bedeckt (siehe Abbildung 6-18). Manche der verzweigten Stämmchen endeten mit Innovationspunkten statt kleiner Capitula (siehe Abbildung 6-18 C1, C2).

Die im 1,5 L Moosbettreaktor produzierte Biomasse ähnelte morphologisch den natürlichen Torfmoospflanzen. Im natürlichen Habitat ist die Moospflanze komplett ausdifferenziert, besteht aus einem deutlich entwickelten Stämmchen, an dessen Spitze ein Capitulum wächst. Außerdem kann sie zwei bis dreimal verzweigt sein (siehe Kapitel 2.2). Im Moosbettreaktor wuchsen die Moospflanzen sehr ähnlich. Sie bestanden aus einem Stämmchen, welche Capitula, Innovationen und dünne Ästchen trugen. Die dünnen hängenden Ästchen mit einem allgemein geringeren Chlorophyllgehalt sind bei manchen Torfmoosarten bekannt und dienen zum kapillaren Wassertransport [71]. Die sind mit den Innovationen nicht zu verwechseln: Die Innovationen besitzen kein spitzes Ende, sondern enden mit mehreren dicht aneinander geordneten Blättern, welche einem Capitulum ähneln. Allerdings ist das tatsächliche Capitulum größer als das Ende der Innovation (siehe Abbildung 6-18 A2, C2). Im Vergleich zur natürlichen Wuchsform besaßen die *in-vitro Sphagnen* kleinere Capitula als die Freilandmoose, welche nicht in einem Bündel von Faszikeln, sondern von Blättern (siehe Abbildung 2-2) enden. Somit scheint sich das *in-vitro* Capitulum nicht einem großen Köpfchen zu entwickeln, wie es im natürlichen Habitat zu beobachten ist.

Ein weiterer hier festgestellter Unterschied ist, dass die *in-vitro* Moose deutlich dünner als die aus dem Freiland sind. Denselben morphologischen Unterschied stelle auch Gonzalez et al. [9] für das *in-vitro* kultivierte *S. palustre* fest. Wenn die *in-vitro* Moose auf das Feld ausgebracht wurden, besaßen sie nach gewisser Zeit ihre übliche Morphologie. [142] Dies deutete darauf hin, dass in der *in-vitro* Kultur ein Umweltfaktor nicht vorhanden ist, welcher die natürliche Morphologie des Moosstämmchens und die des Capitulums beeinflusst. Als weitere mögliche Ursache könnte die größere *in-vitro* Wachstumsrate sein, sodass die maximale Stämmchendicke nur bei langsamem Wachstum erreicht wird.

Darüber hinaus unterschied sich das Wachstum der Moospflanze im Moosbettreaktor zu dem in den Schüttelkolben. Im Moosbettreaktor wuchsen die Torfmoose nach der lag-Phase in die Länge und besaßen Capitula nur an der Spitze der Pflanze. Das Längenwachstum ist typisch für die Pflanzen und vollzieht sich durch die Elongation des Stämmchens an der Spitze. [67, 73] Der Grund dafür ist ein Zusammenspiel von Licht und Gravitationskraft. Die Stämmchen der Torfmoose wachsen gegen das Gravitationsfeld (negativ geotropisch) und senkrecht zur Lichtstrahlung (positiv phototropisch). [74] In Schüttelkolben bildet die Moospflanze vermehrt Innovation und daraus anschließend Capitula.

Als Ursache für die Innovationsbildung sind zwei Faktoren bekannt: Erstens treibt die Moospflanze die Innovationen aus den Knospen nur bei Verlust eines Capitulums, sonst bleiben die Knospen inaktiv. [73] Woran die Pflanze den Verlust eines Capitulums erkennt, ist nicht klar. In den hier gezeigten Daten wurde diese Beobachtung allerdings mit einer mechanisch zerkleinerten Moospflanze als Inokulum gemacht, weshalb es möglich ist, dass die Pflanze Signale in alle vorhandenen Knospen schickt, um auszutreiben. Zweitens scheint die Innovationsbildung mit dem Nährstoffangebot zusammenzuhängen. In Experiment von Baker et al. [183] zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl der Innovationen und dem Logarithmus der Konzentration des angesetzten Mediums. Dabei begünstigte vor allem die Phosphorkonzentration die Innovationsbildung, wenn sie über dem Wert im Regen ( $c_P=124 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) lag [183] und das Wasser keinen limitierenden Faktor darstellte [203]. Da das Phosphor im Knop-Medium deutlich höher liegt ( $c_P=55 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ist es wahrscheinlich, dass auch die Phosphor-Verfügbarkeit die Innovationsbildung unterstützt hat. Die beiden genannten Faktoren können jedoch nicht alleine die Bildung der Innovationen verursachen, weil sie in beiden Kultivierungsstrategien (MBR vs. SK) nahezu identisch sind und trotzdem besitzen die Mooskulturen aus den Schüttelkolben mehr Innovationen. Dies deutet darauf hin, dass es auch andere Faktoren gibt, welche die Morphologie der Moose beeinflussen.

Es wurde beobachtet, dass allein die Kultivierungsart eine Veränderung der Morphologie der *Sphagnen* bewirken kann. [100] Beispielweise wachsen die Torfmoose anders, wenn sie in wässrigen Kulturmedien gezüchtet werden. [58] *S. palustre* aus dem Rührkesselreaktor besaß viele Innovationen und Capitula (bis zu 30) [19, 108], die in alle Richtungen orientiert waren. [142] Eine ähnliche sphärische Wuchsform, eine sogenannte Ballstruktur, wurde bereits auch für *S. cuspidatum* [61] in Submerskultur und für *S. fallax* in einer Blasensäule [20] beobachtet. Die Ballstruktur wird vermutlich durch ein räumlich ungestörtes Wachstum hervorgerufen [20]. Dies kann jedoch nicht der einzige Einflussfaktor sein, weil die Moose innerhalb der Bioreaktorkultur [19, 108] ineinander verankert sind und trotzdem sphärisch wuchsen. Daher können außer der räumlichen Freiheit auch die hydrodynamischen Bedingungen in der Submerskultur eine Rolle bei der

vermehrten Bildung der Capitula spielen. Durch die Hydrodynamik kommt es zu Scherkräften, die vermutlich nicht weiter schädlich sind, jedoch zur Bildung von Ballstrukturen führen. Das Längenwachstum ist inhibiert, eventuell durch die hydrodynamische Deformation des Stämmchens. Weil die Pflanze ihre Hauptachse nicht strecken kann, investiert sie wahrscheinlich die Energie und den Kohlenstoff in die Capitula-Bildung. Ein Beispiel einer ungeschüttelten Mooskultur im Schüttelkolben ist in Abbildung 0-17 B2 (Anhang) abgebildet. Es wurden mehrere Ästchen und weniger Capitula festgestellt. Dabei muss aber in Betracht gezogen werden, dass unter solchen Bedingungen der Nährstoff- und CO<sub>2</sub>-Transport nur über die Diffusion erfolgte. Deshalb wurde eine ausreichende CO<sub>2</sub>-Versorgung und Nährstoffversorgung nicht gewährleistet. Ein CO<sub>2</sub>-Mangel beeinflusst die Pflanzenmorphologie, indem die Mooskulturen eher eine stärkere Stämmchenstreckung und Produktion von seitlichen Ästchen aufwiesen. [61] Im Gegensatz dazu besitzen Torfmoose bei einer Begasung mit CO<sub>2</sub>-angereicherter Luft (5 %) eine deutlich höhere Anzahl an großen Capitula [61] und an Innovationen [183]. Eine statische Kultivierung mit ausreichender Nährstoffzufuhr ist schwierig zu realisieren. Daher bleibt die Vermutung der Hydrodynamik in Submerskultur als mögliche Ursache der Ballstruktur der Torfmoose unbestätigt.

Die nächste Begründung der vermehrten Capitulum-Bildung kann der Verlust der Orientierung zur Gravitationskraft unter bestimmten hydrodynamischen Bedingungen sein- unter der Annahme, dass die Gravitationskraft die Innovation-Entwicklung aus der Hauptachse stimuliert. Für die Gametophyten der Spezies *Physcomitrella patens* wurde eine fehlende gravitrope Reaktion beobachtet, wenn das Moos langsam (4 rpm) vertikal unter Lichtausschluss gedreht wurde. Die Caulonema-Filamente (Protonema-Stadium) wuchsen unter solchen Bedingungen in allen Richtungen. [261] Nach dem Aussetzen des Laubmooses einer Zentrifugalkraft, wurde bereits das Wachstum der Filamente in eine Richtung ab einer Kraft von 0,1-g beobachtet. [261] Dies gilt als Indiz, dass die Moose unter einem bestimmten Wert die Gravitationskraft nicht wahrnehmen können. Ob die fehlende Schwerkraft die Bildung der Innovationen aus allen Knospen hervorruft, benötigt weitere Untersuchungen.

Zuletzt könnte auch das Licht zu der beobachteten Morphologie der Moospflanze beitragen. Wenn Torfmoose heterotroph (ohne Licht bei gleichzeitiger Zugabe von 20 g·L<sup>-1</sup> Saccharose) bei einer Schüttelfrequenz von 80 rpm in Schüttelkolben kultiviert werden, resultierte das fehlende Licht in ein Ausbleiben der Bildung neuer Capitula (siehe Abbildung 0-17 C2), während eine deutliche Verzweigung der Pflanze festgestellt wurde. Daher ist es denkbar, dass die vermehrte Capitulum-Bildung durch verschiedene Lichtrichtung ausgelöst wird. Wenn die Moose geschüttelt werden, wechseln sie ihre Position ständig. Somit erfahren sie das Licht aus verschiedenen Richtungen und bilden daher in die alle Richtung Innovationen.

Eine klare Trennung zwischen dem Licht- und Schwerkrafteinfluss ist schwierig. Aus der Literatur ist es bekannt, dass die phototropen Reaktionen die gravitropen Reaktion überlagern. [76] Beispielweise zeigte sich für *Physcomitrella patens* in einem Agarplatten-Experiment, dass die Richtung des Gametophytenwachstums ab einer PFD von  $\geq 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  vom Licht abhängt und nicht von der Schwerkraft. [261] Ein anderes Laubmoos *Ceratodon purpureus* im Protonema-Stadium reagierte ab einer PFD<sub>650-750 nm</sub>  $\geq 0,14 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  nicht mehr auf das Gravitationsfeld. [75] Solche Licht-Schwerkraft-Interaktion könnten die morphologischen Effekte auf *Sphagnen* erklären, um die Innovationsbildung, die Anzahl der Capitula pro Stämmchen zu fördern und den Vorgang der Ausdifferenzierung zu stoppen. Außerdem könnte ein größeres Verständnis der Morphologiebedingungen ein schnelleres Wachstum in Bioreaktoren sowie eine schnellere Zunahme der Wuchshöhe im Freiland ermöglichen, weil das Capitulum photosynthetisch am aktivsten ist [68].

### Zellzusammensetzung der Moospflanze

Die im Moosbettreaktor produzierten Torfmoose wiesen einen Farbgradienten entlang der Torfmooslänge auf: angefangen mit hellgrünen Capitula (siehe Abbildung 6-18 B1) über dunkel gefärbte Stämmchen bis teilweise braunen Pflanzenteilen am Reaktorboden (siehe Abbildung 6-18 D1). Die Braunfärbung wies einen niedrigeren Chlorophyllgehalt im Vergleich zu den grünen Pflanzenteilen (siehe Abbildung 6-18 D2) auf, jenes ein bekanntes Phänomen bei Torfmoosen ist. [58, 153] Der Grund der Braunfärbung der Biomasse im Moosbettreaktor kann die Lichtlimitierung sein. Die Torfmoose empfangen nach etwa 1 cm Moossschicht ungefähr 5 % der ursprünglich eingestrahlt Lichtstrahlung (siehe Abbildung 4-11) und nach 6 cm kommt kein Licht durch. Wenn die Moose kein Licht absorbieren können, verfügen sie auch über keine Energie, die den Stoffwechsel aufrechterhalten kann und die Zellen sterben langsam ab. Es ist bereits bewiesen,



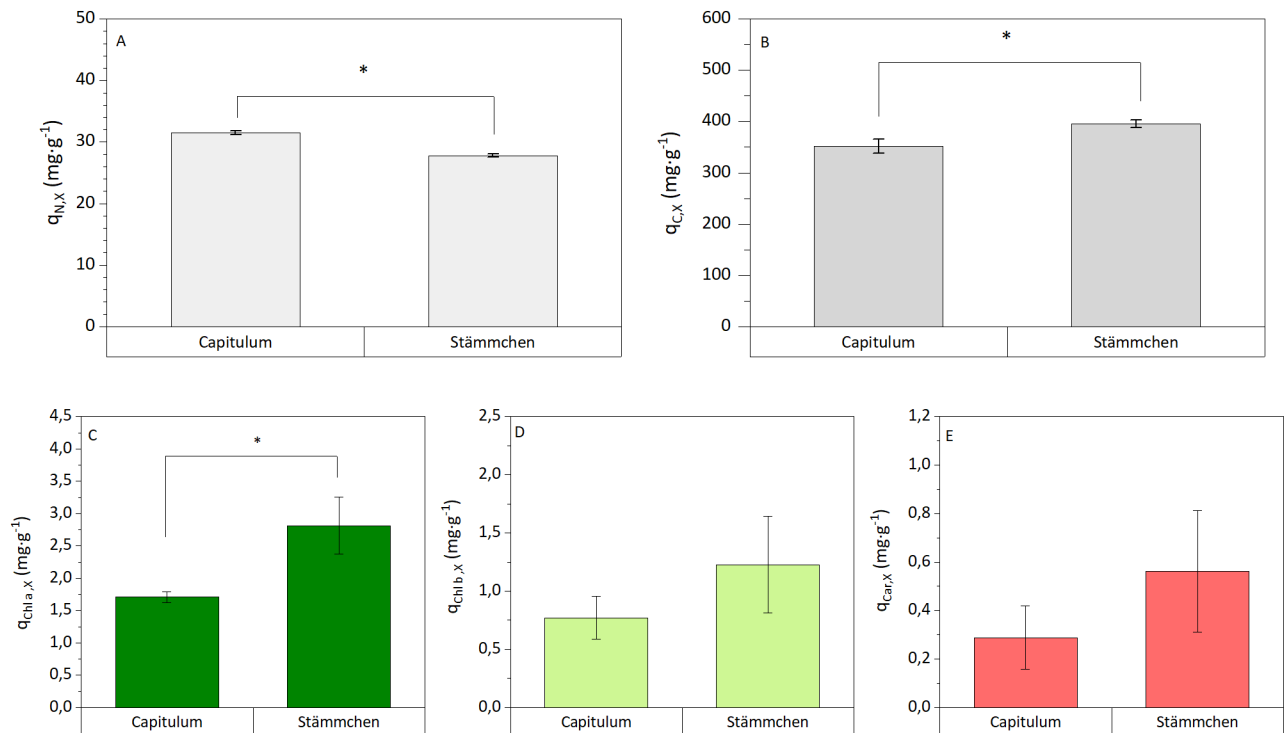


Abbildung 6-19: Charakterisierung der Torfmoospflanze gewachsen in Moosbettektor anhand der Bestimmung des spezifischen Stickstoffgehalts ( $q_{N,x}$ ) sowie des Kohlenstoffgehalts ( $q_{C,x}$ ) und der spezifischen Anteile für Chlorophyll a ( $q_{chl,a}$ ), Chlorophyll b ( $q_{chl,b}$ ) und Carotinoide ( $q_{car}$ ) in Capitula sowie in Stämmchen. Abgebildet sind Mittelwerte der dreifachen Bestimmung der Mooskultur aus einem Moosbettektor mit ihren Standardabweichungen. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

dass das Capitulum photosynthetisch am aktivsten ist [68], und in den tiefer gelegenen Stämmchen die Photosyntheserate niedrig ist [184] und Pigmentabbauvorgänge dominieren [163].

Um die Korrelation zwischen der Grünfärbung der einzelnen Pflanzenteile und der Zellzusammensetzung zu erfassen, wurde der Stickstoff- ( $q_{N,x}$ ), sowie der Kohlenstoffgehalt ( $q_{C,x}$ ) und die spezifischen Pigmentanteile ( $q_{pig,x}$ ) in der obersten Mooschicht (1 cm) bestehend aus dem Capitulum und in der darunter liegenden Mooschicht bestehend aus Stämmchen (> 1 cm), bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-19 dargestellt. Der Stickstoffgehalt in der Capitulum-Schicht war mit einem Wert von  $31,49 \pm 0,29 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  signifikant höher als der in der Stämmchen-Schicht ( $27,77 \pm 0,25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Der Unterschied des Kohlenstoffgehalts zwischen den beiden Proben war auch signifikant, wobei der  $q_{C,x}$  der Stämmchenprobe höher war. Dies galt auch für den spezifischen Anteil an Chlorophyll a. Die Stämmchen besaßen mehr Chlorophyll a ( $q_{chl,a} = 1,78 \pm 0,08 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) als die Capitula ( $q_{chl,a} = 2,81 \pm 0,44 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Für den Chlorophyll b-Gehalt und die Carotinoide bestand kein Unterschied in den ermittelten Werten und die Werte waren in Übereinstimmung mit den publizierten Daten. [262]

Der hier ermittelte N-Gehalt im Capitulum von  $30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  liegt deutlich über dem N-Gehalt der Moospflanzen verschiedener *Sphagnum*-Arten aus dem Freiland, sowie aus den Laborexperimenten. Der N-Gehalt im Capitulum von *S. palustre* liegt zwischen  $13,2 - 17 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  [93, 145] und von  $12,6 - 20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  [44, 93, 223, 243, 244] bei anderen Moos-Spezies. Die Abweichung der Daten wurde bereits im Kapitel 5.1.1 und 6.4 diskutiert. Zusammenfassend kann der hohe N-Gehalt mit einer höheren C-Verfügbarkeit durch die kontinuierliche Begasung der Mooskultur zusammenhängen, da die Moospflanze mehr Tricarboxylsäuren [192] bilden kann, um mehr Stickstoff in Form von Aminosäuren zu speichern. [48, 184, 191, 192]

Mehrere Publikation, darunter die von Smolders [53] Gunnarson [194] Chiwa [223] Rice [139], Gabriel [184] et al. haben an Moospflanzen verschiedener *Sphagnum*-Arten aus dem Freiland nachgewiesen, dass die Konzentrationen von N im Capitulum höher als in Stämmchen weiter unten war. Dies wurde in unseren Ergebnissen bestätigt. Die Chlorophyll-Gehalten in Freilandmoosen stimmen mit den ermittelten Daten überein, wenn die Moose einem erhöhten N-Angebot ausgesetzt wurden [141, 206, 244], sonst weisen die Capitula der Freilandproben geringeren Chlorophyllanteil auf. [132,

184, 263] Die N-Stimulation der Produktion von photoaktiven Pigmenten kann dadurch erklärt werden, dass die Pigmente Komponenten der Lichtsammelkomplexe sind, welche sich aus Proteinen zusammensetzen. [118]. Wird der spezifische Anteil an Chlorophyll a der Mooskultur aus dem Moosbettreaktor und aus den Schüttelkolben (siehe Abbildung 5-4) verglichen, fällt auf, dass die Chlorophyllgehalte um das Dreifache kleiner sind, als die von submersen Torfmoosen. Dies ist in Einklang mit den Befunden von Rice et al. [71], dass die Torfmoospezies eine Zunahme an Chlorophyllgehalt aufwies, wenn sie submers kultiviert wurden. Diese Beobachtung könnte mit dem Verhältnis zwischen Hyalocyten und Chlorozyten zusammenhängen. Anscheinend besitzen die submers kultivierten Torfmoose weniger Hyalocyten aber dafür mehr photosynthetisch aktiven Chlorozyten. Da die Hyalocyten keine Chloroplasten besitzen, ist der Pigmentanteil bezogen auf die Chlorozyten-Menge gleich aber bezogen auf das Gesamtgewicht der Pflanze höher. Eine zweite Erklärung kann die Eigenbeschattung der Pflanzen sein. So erhalten sie weniger Licht, was die Chlorophyll-Bildung stimuliert.

Unter anderem zeigten sich charakteristische Unterschiede der quantitativen Pigmentzusammensetzung zwischen dem Capitulum und des weniger lichtexponierten Stämmchens. Den höchsten Chlorophyllgehalt zeigten die Capitula. Dies bestätigt die Angabe von Smolders [53] und Gerdol [162], welche einen höheren Anteil an Chlorophyll a im Capitulum im Vergleich zum Stämmchen nachwies. Dies kann auf zwei Arten interpretiert werden: Die erste Erklärung ergibt sich aus dem apikalen Wachstum von Torfmoosen. Wenn die Pflanze wächst, verlängert sich das Stämmchen an der Spitze des Capitulum und neue Ästchen entstehen in der Mitte der Knospe. Die älteren Ästchen des Capitulum werden nach außen gedrängt. Nach gewisser Zeit sind sie nicht mehr Teil des Köpfchens, sondern hängen unter dem Capitulum wie andere Seitenästchen. [153, 264] Somit bleiben die im Capitulum bereits gebildeten Pigmente in den Ästchen. [162] Da weiterhin kein Stickstoffmangel in der Zelle vorherrscht, muss die Zelle die Pigmente nicht abbauen, um es zum Wachstum zu verwenden. Die zweite Erklärung beruht auf einer Adaptation an die neuen Lichtverhältnisse, da die Schicht der Stämmchen deutlich weniger Licht als die obersten Schichten (siehe Abbildung 4-11) erhalten. Bei geringen Lichtintensitäten könnte die Moospflanze die Menge an Pigmenten erhöhen, was sich in einem erhöhten Chlorophyllgehalt pro Zelle widerspiegelt, wodurch sie mehr Photonen absorbieren können und mehr Energie zum Wachstum transformiert wird. Diese Chlorophyll-reichen Pflanzenteile könnten theoretisch zum Wachstum beitragen, wenn sie mit genug Licht versorgt wären. Eine Anbringung von der Lichtstäbe innerhalb des Moospolsters könnte die Produktivität des Moosbettreaktors steigern.

### 6.6.2 Wachstumskurve von *S. palustre*

Die über die Kultivierungszeit von 5 Wochen ermittelte Wuchshöhe von *S. palustre* im Moosbettreaktor zeigte einen linearen Verlauf (siehe Abbildung 6-17). Die Zunahme der Biomasse wurde im nächsten Experiment überprüft. In drei parallel betriebenen Reaktoren wurde wöchentlich vor dem Medienwechsel  $\frac{1}{4}$  der Reaktorgrundfläche geerntet. Vom jeweils geernteten Biomassesegment in Abbildung 6-20 wurde die Feuchtmasse (siehe Kapitel 3.4.1), die Biotrockenmasse (siehe Kapitel 3.4.1) und anschließend der Magnesium- und Stickstoffgehalt (siehe Kapitel 3.4.6) bestimmt. Die verbleibende Mooskultur wuchs weiter im Reaktor bis zum nächsten Medienwechsel. Eine schematische Darstellung des Experiments befindet sich im Anhang in Abbildung 0-33.

Die Biotrockenmassenzunahme der einzelnen Segmente verzeichnet einen linearen Wachstumsverlauf mit einer Steigung von  $0,045 \text{ gBTM} \cdot \text{d}^{-1}$  und  $1,712 \text{ gFM} \cdot \text{d}^{-1}$  im Feuchtmasserverlauf. Dieses Ergebnis bestätigt einen linearen Wachstumsverlauf der Torfmoose im Moosbettreaktor, welcher bereits im Einklang mit dem linearen Längenwuchs steht. Die Wachstumskurven aus den Literaturquellen suggerieren andersartige Verläufe für Kulturen von *S. palustre* [17] in Schüttelkolben und *S. fallax* [20] in der Blasensäule. Im ersten Fall besteht der Verlauf der Biotrockenmasse lediglich aus 4 Punkten, wobei zwei davon eine lag-Phase vermuten lassen. Die restlichen Punkte reichen nicht aus, um eine exponentielle Biomassezunahme nachzuweisen. In der zweiten Wachstumskurve ist zwar deutlich eine exponentielle Phase zu erkennen, da aber keine Methode zur gravimetrischen Bestimmung der Biomasse im Reaktor vorgestellt wurde, ist es unklar, ob die Punkte dem tatsächlichen Wachstum entsprechen. Auf einen quantitativen Vergleich der Biomassebildungsraten aus den

Wachstumskurven wurde verzichtet, da die Experimente unter unterschiedlichen Prozessbedingungen (Medienvolumen, C-Quelle, Lichtverfügbarkeit) durchgeführt wurden.

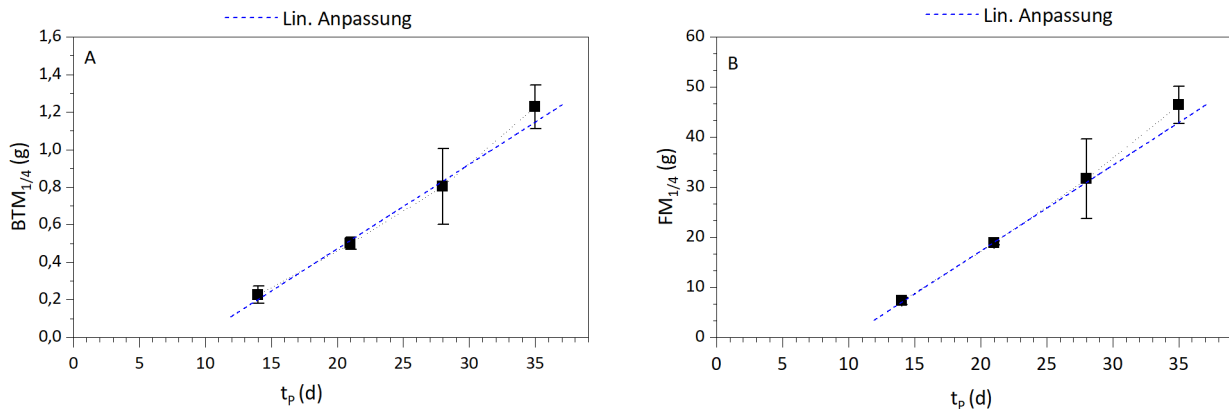


Abbildung 6-20: Prozessverlauf der Torfmooskultivierung mit wöchentlicher Ernte des ¼ Reaktorinhalts zur Ermittlung der Wachstumskurve von *S. palustre* anhand der Biotrockenmasse (A) und der Feuchtmasse (B) in dem ¼ geernteten Biomassesegment. Die gestrichelten Linien stellen die Ausgleichsgeraden dar, welche über eine lineare Regression mit der Software OriginPro® ab dem Versuchstag t<sub>p</sub> = 14 d bis 35 d bestimmt worden. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen (n=3). Kultivierungsparameter: PFD = 300 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> T<sub>K</sub> = 23,5 ± 0,1 °C, V<sub>g</sub> = 1,5 L·h<sup>-1</sup>, x<sub>CO2</sub> = 3 %, pH<sub>Anfang</sub> = 4 (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit V<sub>m</sub> = 800 mL und wöchentlichem Medienwechsel, t<sub>p</sub> = 35 d, n=1.

Aus den hier gezeigten Wachstumskurven (BTM, h<sub>x</sub>) kann die Schüttdichte (g·L<sup>-1</sup>) der Mooskultur im Moosbettreaktor berechnet werden. Dieser Parameter ist wichtig für die Transportkosten der produzierten Torfmoosbiomasse, sowie bei der Herstellung der Kultursubstrate aus der Torfmoosbiomasse. [6] Wenn die Biomassebildungsrate 0,045 gBTM·d<sup>-1</sup> beträgt und die durchschnittliche Längenzuwachsrates bei 0,18 cm·d<sup>-1</sup> (siehe Abbildung 0-32) liegt, beträgt die Schüttdichte der im Moosbettreaktor produzierten Torfmoose 10 gBTM·L<sup>-1</sup>. Dieser Wert liegt nah an der Schüttdichte von *S. palustre* (8,5 gBTM·L<sup>-1</sup>) aus dem *Sphagnum farming* [6].

### 6.6.3 Korrelation des Wachstums von Torfmoosens mit der Nährstoffaufnahme

Die Torfmoose wachsen im Moosbettreaktor linear, wenn die Wachstumsbedingungen, wie z.B. die Belichtung konstant ist. Dadurch wird auch eine lineare Aufnahme der einzelnen Ionen aus dem Medium vermutet. Eine Ausnahme stellt dabei das Ammonium dar (siehe Kapitel 5.1.1). Eine Auftragung der Aufnahme der restlichen Ionen könnte zeigen, ob die Wachstumsbedingungen konstant sind, die ein lineares Wachstum erlauben. Die Ionenaufnahme wurde mittels Gleichungen aus dem Kapitel 3.5.5 berechnet. Die Ergebnisse aus fünf zeitlich unabhängigen Kultivierungen sind in Abbildung 6-21 abgebildet.

Anhand der Messdaten ist ein linearer Trend in der Aufnahme aller dargestellten Ionen (Phosphat, Sulfat, Nitrat und Magnesium) zu erkennen, welches die Basis für ein lineares Wachstum ist. Bei der Betrachtung der Werte müssen aber folgende Aspekte beachtet werden. Die berechneten, akkumulierten Mengen werden mit dem Medienvolumen in der Medienflasche berechnet. Ein unbestimmter Teil des Kulturmediums wird durch die Biomasse im Reaktor zurückgehalten [175], welches die Ionenaufnahme der Moose rechnerisch überschätzt. Da die Nährstoffverfügbarkeit im Reaktor ortsabhängig und die genaue Verteilung der Nährstoffe entlang des Moospolsters nicht bekannt ist, bleibt es ungewiss, ob jede Moospflanze mit der in diesem System möglichen maximalen derselben Biomassebildungsrate wächst. Zuletzt können die hier gezeigten Ergebnisse auch durch die Akkumulation der einzelnen Ionen beeinflusst worden sein. Es wurde davon ausgegangen, dass die Aufnahmen direkt mit der vorhandenen Biomasse korreliert, wenn die Moospflanzen einen konstanten Gehalt an Phosphor, Schwefel oder Stickstoff aufweisen und keines dieser Substrate akkumulieren können. Wie bereits vorherigen Experimenten zeigten, variiert der N-Gehalt mit der Stickstoffverfügbarkeit und unterscheidet sich entlang der Pflanze [162]. Außerdem kann sich der N-Gehalt mit der Zeit des Wachstums von Torfmoosen ändern. [44] Darüber hinaus ist es auch bekannt, dass die Nährstoffaufnahme der *Sphagnen* von den anfänglichen Konzentration



## 6 Wachstum von Torfmoosen unter definierten Prozessbedingungen im Moosbettreaktor

abhängt [141, 205]. Da sich die Nährstoffkonzentration im Laufe der quasi-stationären Prozessführung ändern, ist es nicht auszuschließen, dass die Aufnahmeraten der Ionen variieren.

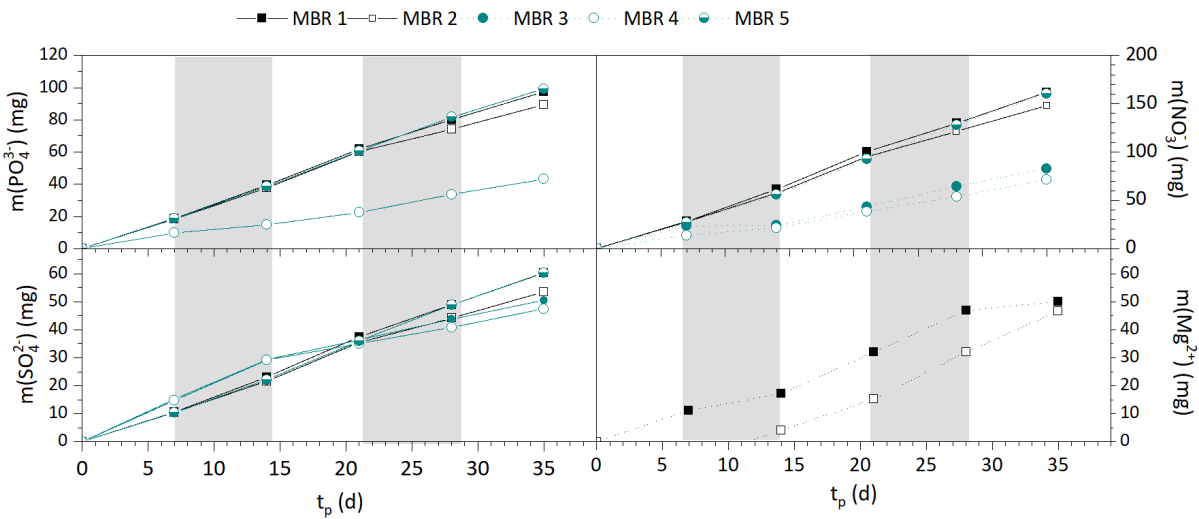


Abbildung 6-21: Ionenaufnahme von Nitrat  $m(\text{NO}_3^-)$ , Phosphat  $m(\text{PO}_4^{3-})$ , Sulfat  $m(\text{SO}_4^{2-})$  und Magnesium  $m(\text{Mg}^{2+})$  aus der Kultivierung im Moosbettreaktor von *S. palustre* berechnet für alle zwei Tage (A) und wöchentlich (B). Die Anpflanzmenge  $m_{\text{FM},0}$  betrug 4,2 g (MBR1), 3,7 g (MBR 2), 6,3 g (MBR 3), 6,5 g (MBR 4), 8,2 g (MBR 5),  $h_x = 6,35 \pm 0,35$  cm (MBR 1),  $5,59 \pm 0,40$  cm (MBR 2),  $3,06 \pm 0,87$  cm (MBR 3),  $4,85 \pm 0,17$  cm (MBR 4),  $5,6 \pm 0,21$  cm (MBR 5). Der wöchentliche Medienwechsel ist anhand des farblichen Übergang zwischen grau und weiß ersichtlich. Kultivierungsparameter:  $T_R = 21-24$  °C,  $\text{PFD} = 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_g = 25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $X_{\text{CO}_2} = 3\%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel.

Um die Ionenaufnahme mit der Biomasse zu korrelieren, wurde eine durchschnittliche Ionenaufnahmerate  $r_i$  ( $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ ) definiert und berechnet. Der Wert dieser Rate für das jeweilige Ion wurde anschließend gegen die Längenwachstumsrate der jeweiligen Kultivierungen aufgetragen. In Abbildung 6-22 ist keine Korrelation zwischen den beiden Parameter zu erkennen. Die Aufnahme des Sulfats ist kein Indikator für eine zunehmende Biomasse im Reaktor, da es für jeden Moosbettreaktor sehr ähnlich ausfällt, obwohl die Reaktoren unterschiedliche Wuchshöhe produzierten. Nitrat und Phosphat korrelieren nur schwach mit dem Wachstum der Torfmoose ( $R^2 = 0,52 - 0,59$ ).

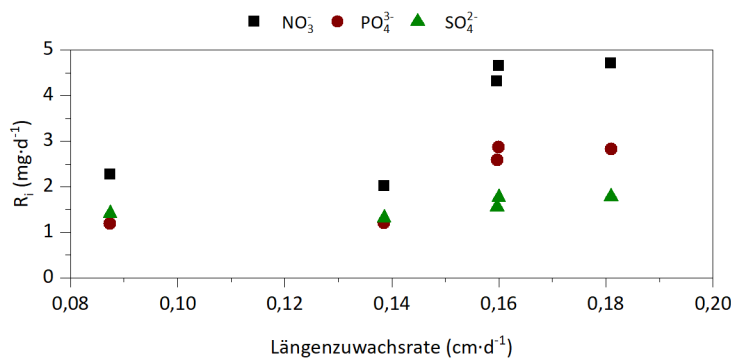


Abbildung 6-22: Korrelation zwischen der Längenwachstumsrate und der Aufnahmerate für Nitrat, Phosphat und Sulfat im Moosbettreaktor. Die Aufnahmerate entsprechen der Steigung der wöchentlichen Aufnahmeraten und wurden mittels linearer Regression in OriginPro® berechnet. Die Längenwachstumsrate wurden bereits in anderen Experimenten vorgestellt.

### 6.7 Wachstum von drei Torfmoos-Spezies im MBR-Medium

Die Eignung des Kultivierungsprozesses im Moosbettreaktor wurde für zwei weitere Torfmoospezies (*S. rubellum* und *S. fimbriatum*) überprüft. Kultivierung von *S. fimbriatum* im organischen Medium wiesen, genau wie *S. rubellum*, geringere

Wachstumsraten in Schüttelkolbenversuchen auf. [23] Da das Design des Moosbettreaktors dem natürlichen Habitat entspricht, sollte das Wachstum von der schwierig kultivierbaren Moospezies *S. fimbriatum* und *S. rubellum* im Moosbettreaktor realisierbar sein. Alle drei Moospezies wurden unter Standardbedingungen (siehe Tabelle 3-3) in zweifacher Ausführung kultiviert. Die eingestrahlte Photonenflussdichte wurde von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  reduziert, weil sich eine PFD von  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  für das Wachstum von Torfmoosen von *S. palustre* besser erwies (siehe Kapitel 6.5.1). Als Inokulum wurden die Mooskulturen aus den Schüttelkolben genommen, welche anstatt einer Batch-Vorkulturführung, im 250 mL 0,2fachen Knop-Medium mit wöchentlichem Medienwechsel kultiviert wurden. Diese Kulturführung stellte vergleichbare Mengen an Moosmaterial wie der Batchprozess (siehe Kapitel 5.2) zur Verfügung. Es war zugleich die einzig bekannte Strategie zur *in-vitro* Vermehrung von *S. rubellum* in Submerskultur. Nach vier Wochen Kultivierung und vor anstehendem Medienwechsel wurden die Pflanzen als Inokulum für den Moosbettreaktor verwendet.

Der photographisch festgehaltene Wachstumsverlauf der Torfmoose *S. palustre*, *S. rubellum* und *S. fimbriatum* im Moosbettreaktor ist in Abbildung 6-23 dargestellt. Über eine Kultivierungszeit von fünf Wochen ist eine deutliche Zunahme der Biomasse aller Torfmoosarten zu beobachtet gewesen. Nach drei Kultivierungswochen schloss sich die Bewuchsdecke in jedem Moosbettreaktor, wobei sich die einzelnen Torfmoosarten voneinander durch ihre Wuchsform, Wuchshöhe und ihre somit verbundene Produktivität unterschieden. Die Moospezies *S. fimbriatum* wies im Vergleich zu *S. palustre* ein höheres Längenwachstum mit dünneren Stämmchen auf. Die Moospflanzen der Spezies *S. rubellum* wuchsen dagegen langsamer, viel kompakter und bildete kleine Capitula, welche unter dem Binokular einen Durchmesser

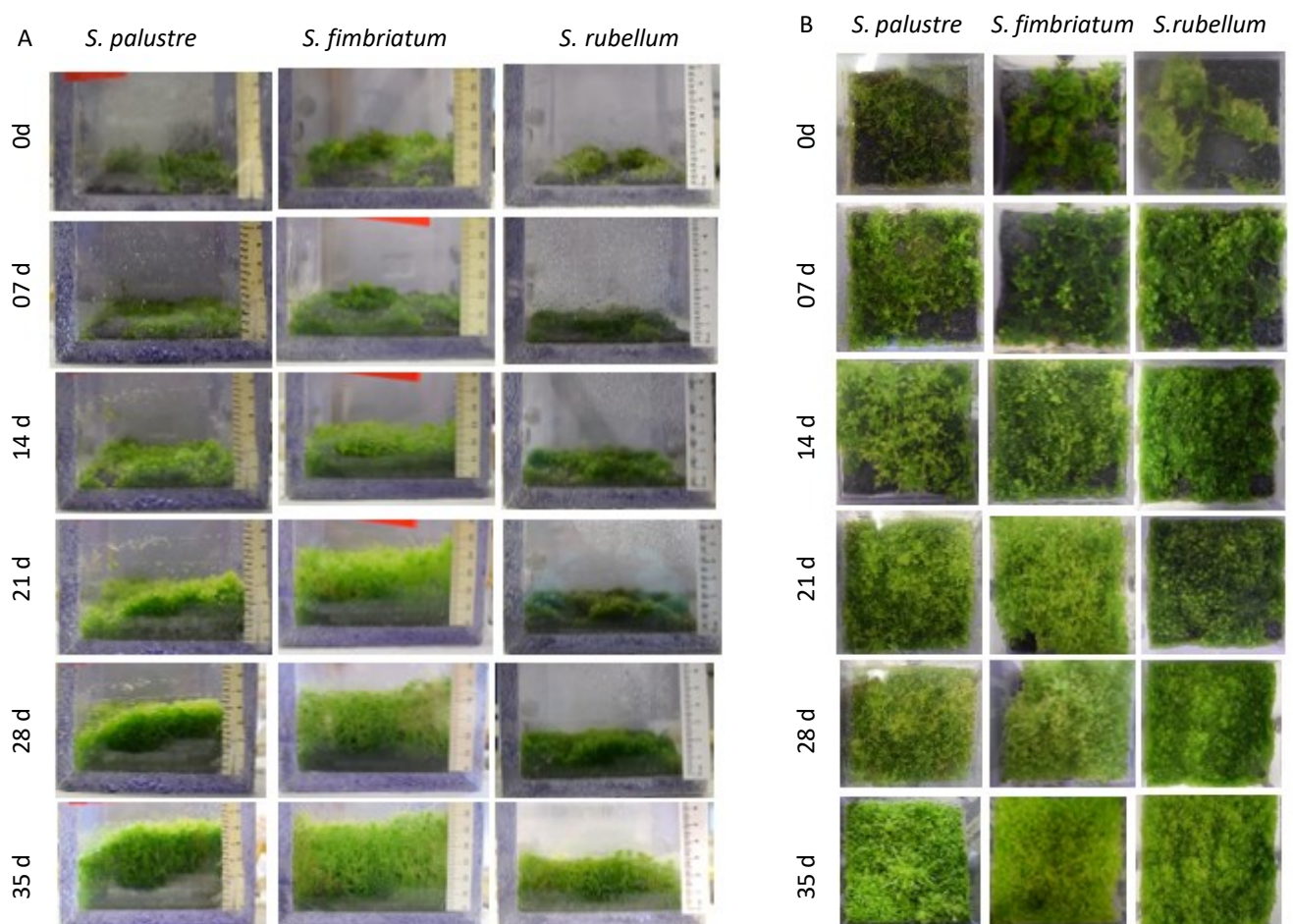


Abbildung 6-23: Bildlicher Wachstumsverlauf der Torfmoosart *S. palustre*, *S. fimbriatum* und *S. rubellum* im Moosbettreaktor zur Etablierung des Wachstums in Emerskultur. A) Seitliche Ansicht und B) Ansicht durch Reaktordeckel in den Moosbettreaktor während des Wachstums von Torfmoosen in Prozesszeitraum von  $t_p = 35$  d. Die Anpflanzmenge  $m_{FM,0}$  betrug  $9,03 \pm 3,27$  g (*S. palustre*), 15, 9 g (*S. fimbriatum*) und  $9,79 \pm 0,81$  g (*S. rubellum*). Kultivierungsparameter: PFD =  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   $T_K = 23,5 \pm 0,1$  °C,  $V_g = 1,5$  L·h<sup>-1</sup>,  $x_{CO_2} = 3$  %, pH<sub>Anfang</sub> = 4,0 (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35$  d, n = 1.

von etwa 0,2 mm maßen (siehe Abbildung 0-31). Damit waren sie um das Zweifache kleiner als die Capitula der Spezies *S. palustre*. Die erreichte mittlere Wuchshöhe von *S. palustre* betrug  $5,09 \pm 0,49$  cm (n=2), *S. fimbriatum*  $6,08 \pm 0,27$  cm (n=1) und *S. rubellum*  $2,67 \pm 0,19$  cm (n=2). Der Unterschied in der Wuchshöhe zwischen *S. palustre* und *S. rubellum* war signifikant.

Zusätzlich wurde das Wachstum der Torfmoose anhand ihres Längenzuwachses aufgezeichnet. Der Verlauf der mittleren Wuchshöhe ist in Abbildung 6-24 dargestellt. Alle drei Moosarten zeigten eine nahezu lineare Längenzunahme. Mittels einer linearen Regression in OriginPro® wurde die Steigung der mittleren Wuchshöhe ab der Prozesszeit von  $t_p = 14$  d ermittelt. *S. palustre* wuchs mit einer Längenzuwachsrate von  $0,14$  cm·d<sup>-1</sup> im ersten Moosbettreaktor und  $0,19$  cm·d<sup>-1</sup> im Zweiten. Die Längenzuwachsrate von *S. rubellum* lag bei  $0,09$  cm·d<sup>-1</sup> in beiden Moosbettreaktoren und von *S. fimbriatum* bei  $0,20$  cm·d<sup>-1</sup>. Der zweite Moosbettreaktor mit *S. fimbriatum* konnte aufgrund einer Kontamination im Medium nicht ausgewertet werden.

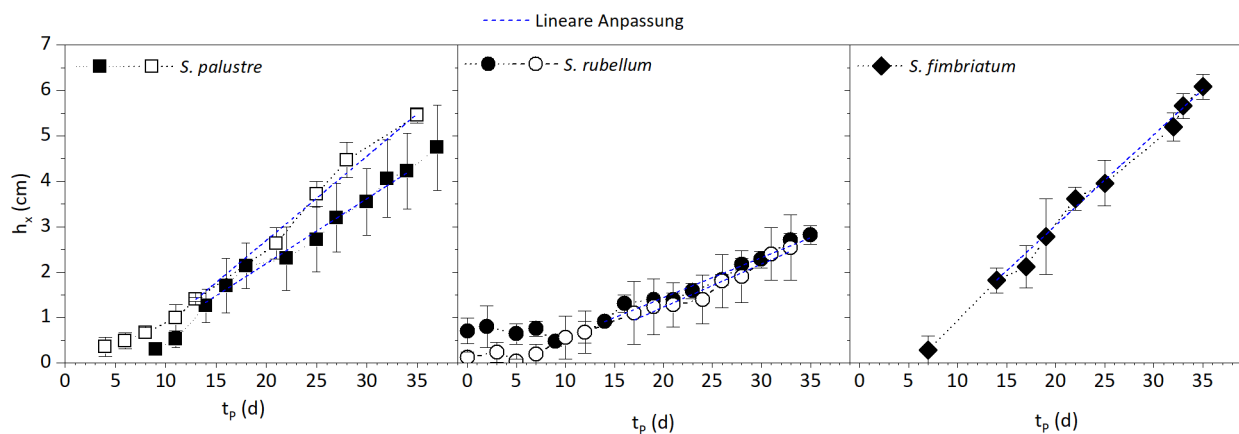


Abbildung 6-24: Die durchschnittliche Wuchshöhe von *S. palustre*, *S. rubellum* und *S. fimbriatum* im Moosbettreaktor. Die gestrichelten Linien stellen die Ausgleichsgeraden dar, welche über eine lineare Regression mit der Software OriginPro® bestimmt worden. Die Animpfmenge  $m_{FM,0}$  betrug  $9,03 \pm 3,27$  g (*S. palustre*),  $15,9$  g (*S. fimbriatum*) und  $9,79 \pm 0,81$  g (*S. rubellum*). Kultivierungsparameter: PFD =  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   $T_K = 23,5 \pm 0,1$  °C,  $V_g = 1,5$  L·h<sup>-1</sup>,  $X_{CO_2} = 3\%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35$  d, n=1.

Der Verlauf der Temperatur, des pH-Wertes, sowie der Ammonium- und der Nitratkonzentration während der Kultivierung ist in Abbildung 6-25 dargestellt. Die Verläufe der zusätzlich quantifizierten Ionen sind im Anhang (siehe Abbildung 0-34). Die gemittelte Kultivierungstemperatur aller drei Moosbettreaktoren lag bei  $23,5 \pm 0,1$  °C. Die inline-pH-Messung zeigte ein wiederkehrendes Profil im Verlauf der Kultivierung. Nach jedem Medienwechsel sank der pH-Wert parallel zur Verringerung der Ammoniumkonzentration. Anschließend nahm der pH-Wert zu, während die Nitratkonzentration sank. Dies wurde im Kulturmedium aller Moosbettreaktoren festgestellt. Darüber hinaus wurde über die Gesamtdauer der Kultivierungen ein weiterer überlagernder Trend im pH-Verlauf festgestellt: Mit jedem Medienwechsel fiel der pH-Wert auf ein immer niedrigeres Niveau ab. Der darauffolgende pH-Anstieg war deutlich steiler und verzeichnete einen sigmoidalen Verlauf mit einem Hochwert von 5,6 für *S. palustre*, 6,5 für *S. fimbriatum* und 6,7 für *S. rubellum*.

Mit dieser Versuchsreihe wurde zum ersten Mal unter Laborbedingungen ein Wachstum von *S. rubellum* und *S. fimbriatum* durch emerse Kultivierung erzielt. Das Torfmoos *S. rubellum* erwies sich als die am langsamsten wachsende Moospezies, während *S. fimbriatum* am schnellsten wuchs. Im natürlichen Habitat wurden jedoch folgende entgegen sprechende Beobachtungen angestellt: Die durchschnittliche Produktivität von *S. rubellum* beträgt ungefähr  $250 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{yr}^{-1}$  und unterscheidet sich kaum von der von *S. palustre*, während *S. fimbriatum* mit einer geringsten Produktivität von  $180 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{yr}^{-1}$  wächst. [87] Diese Werten sind aber nur bedingt vergleichbar, weil sich viele Umweltfaktoren auf die jährliche Produktivität auswirken können. Die Produktivität hängt beispielweise mit dem Standort, dem Nährstoffangebot, der Häufigkeit der Niederschläge, der Länge der Sommer und der Temperatur zusammen. Gunnarston et al. [87] beobachtete eine Abhängigkeit der Produktivität von der Entfernung vom Äquator, welche die zuvor genannten klimatischen Einflussfaktoren teilweise integrieren. Da die Torfmoose in ihrem natürlichen Habitat nicht unter gleichen bzw. ihren optimalen Bedingungen wachsen, ist es an dieser Stelle nicht möglich, die Arten miteinander anhand der publizierten Daten zu vergleichen.

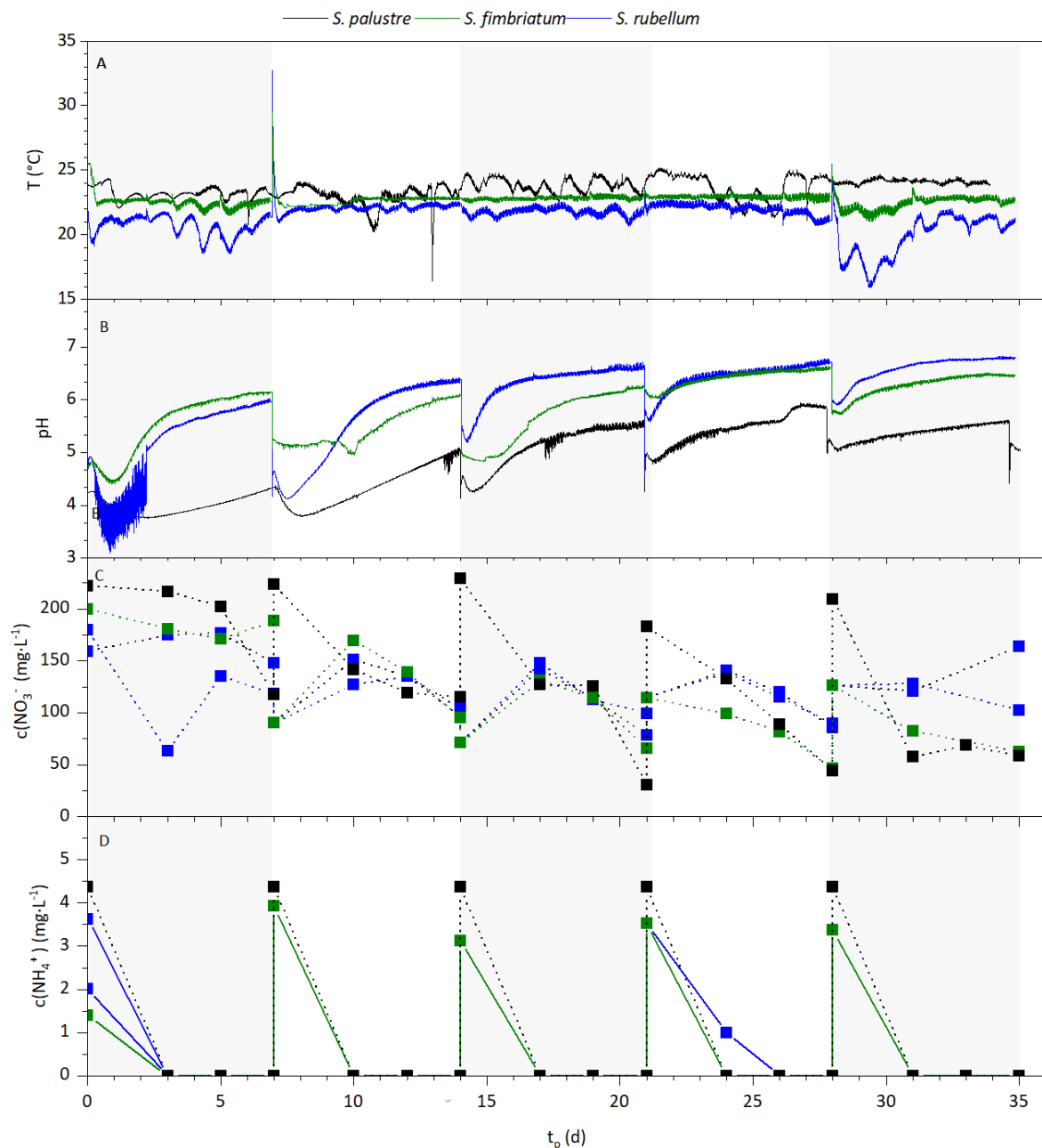


Abbildung 6-25: Prozessverlauf der Kultivierung von *S. palustre*, *S. fimbriatum* und *S. rubellum* im Moosbettreaktor zur Etablierung des Wachstums in Emerskultur mit Temperaturverlauf (A) und pH-Verlauf (B). Der wöchentliche Medienwechsel ist anhand des farblichen Übergangs zwischen grau und weiß ersichtlich. Kultivierungsparameter: PFD =  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $T_K = 23,5 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V_g = 1,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $X_{\text{CO}_2} = 3 \%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800 \text{ mL}$  und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35 \text{ d}$ ,  $n=1$ .

Die unterschiedlichen Wachstumsraten im Moosbettreaktor können durch unterschiedliche Optima in der Licht- und Nährstoffverfügbarkeit, sowie dem Wassergehalt hervorgerufen worden sein. Die natürlichen Habitaten von *S. rubellum* zeichnen sich durch ihre Trockenheit und ihren Nährstoffmangel (oligotrophen Mooren) aus [37, 60], während *S. fimbriatum* mesotrophe Moorränder *S. fimbriatum* bevorzugt [37, 60, 65] und *S. palustre* mesotrophische bis nährstoffreiche Moorlebensräume [60] zu finden ist. Das hohe Nährstoffangebot im Moosbettreaktor könnte der Grund der geringeren Wachstumsrate von *S. rubellum* sein. Dagegen spricht das Ergebnis aus dem Schüttelkolbenexperiment (siehe Abbildung 5-6), in welchem sich die Wachstumsrate bzw. die Endbiomassekonzentration zwischen *S. rubellum* und *S. palustre* nicht unterschied. Entweder beeinträchtigte das Wachstum von *S. rubellum* das erhöhte Nährstoffangebot bedingt durch die Zugabe von Magnesiumnitrat oder der zu hohe pH-Wert ( $<7$ ), weil *S. rubellum* saure Umgebung bevorzugt [37, 60]. Außerdem könnte sich der pH-Wert auf die  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit und somit auf die Produktivität ausgewirkt haben. Wie bereits im Kapitel 4.3 erwähnt wurde, liegt  $\text{CO}_2$  bei einem pH-Wert über 5 nur in Form von  $\text{HCO}_3^-$  vor [39], welches die Torfmoose als C-Quelle für die Photosynthese nicht verwenden können. [5] Da das Moospolster von *S. rubellum* im Moosbettreaktor

deutlich dichter und feuchter als das der restlichen Moose war, ist es möglich, dass die Pflanzen C-limitiert waren. Zuletzt kann die Phylogenie eine Auswirkung auf die Wachstumsrate haben [6]. *S. palustre* gehört zur Sektion der *Sphagnen*, während *S. rubellum* und *S. fimbriatum* zur Sektion der *Acutifolia*. Die Sektionen sind durch niedrigere Wachstumsrate bekannt [6]. Ein sektionsbedingter Wachstumsunterschied kann auf Grundlage dieser Experimente jedoch nicht bestätigt werden, da *S. fimbriatum* eine deutlich höhere Wachstumsrate als *S. rubellum* aufwies- trotz der Tatsache, dass sie in derselben taxonomischen Untergattung zugeordnet sind.

Der dynamische pH-Verlauf während der Torfmooskultivierungen könnte einen weiteren Grund für die unterschiedlichen Wachstumsraten der jeweiligen Torfmoospezies liefern. Wie oben beschrieben, war das pH-Wert Profil über die Kultivierungsdauer ähnlich in allen Reaktoren, doch wurde eine direkte Korrelation der pH Steigung mit der aufgenommenen Nitratmenge (siehe Abbildung 6-25), sowie anderen Ionen (Abbildung 0-34) nicht beobachtet. Der pH-Wert des Mediums von *S. rubellum* wurde annähernd neutral, während *S. palustre* im sauren Milieu wuchs. Der Unterschied des pH-Wertes könnte durch die Produktion von organischen Säuren verursacht sein, welche in einer Bioreaktorkultur bereits nachgewiesen wurden. [231, 232] und die pH-Senkung bewirkt haben könnten. Eine pH-Zunahme könnte auf aufgenommene Anionen zurückgeführt werden und der pH-Verringerung entgegengewirkt haben. Unter dieser Annahme könnte die Produktion von organischen Substanzen am stärksten für *S. palustre* und am schwächsten für *S. rubellum* ausgeprägt sein. Dies ist zu diesem Zeitpunkt eine Hypothese, die es in Zukunft zu untersuchen gilt.

Werden die vorgelegten Befunde zur Kultivierung von Torfmoosen im Moosbettreaktor zusammengefasst, lässt sich sagen, dass sich der Moosbettreaktor für Kultivierung von unterschiedlichen Spezies eignet. Unter gewählten Bedingungen werden Produktivität erreicht, die um den Faktor 20 höher als in der Natur liegen. Außerdem erfüllt dieser Reaktortyp die Zielvorgabe, dass die Torfmoosmorphologie in der *in-vitro* Kultur ähnliche der Freilandmoose ist. Darüber hinaus sind die ersten Parameter (Hell/Dunkel-Zyklus, PFD, Kulturmedium) bestimmt worden, welche eine weitere Entwicklung des Bioreaktors sowie eine optimale Versorgung der Torfmoose ermöglichen. Für einen weiteren Ansatz des Moosbettreaktors zu Forschungszwecken sind weitere Entwicklungsschritte am Reaktor zu unternehmen, um konstante Wachstumsbedingungen für die Dauer der Kultivierung aufrechtzuerhalten. Hierzu sollte eine Kühlung im Reaktorinneren integriert werden. Weiterhin ist ein tieferes Verständnis des CO<sub>2</sub>-Eintrags anzustreben. Eine CO<sub>2</sub>-Versorgung im Moospolster an mehreren Stellen, sowie eine Anreicherung des Zugases und des Kulturmediums mit CO<sub>2</sub> könnte den Gaseintrag in die jeweiligen Pflanzenteile verbessern. Das Medium sollte die Biomasse durchströmen und anschließend nicht mehr im Kreislauf geführt werden- wie in einem kontinuierlichen Prozess. Dies benötigt eine weitere Optimierung des Kulturmediums, wobei davor die genauen Aufnahme rate der Ionen bestimmt werden sollen, um ihre Zufuhr an das Mooswachstum anzupassen. Eine homogene Verteilung des Kulturmediums sowie die Vermeidung von schlecht durchgemischten Zonen sollte in der weiteren Entwicklung mitberücksichtigt werden. Außerdem war die Anzahl der freien Parameter zu groß, um jeweils Wachstumsexperimente in diesem Maßstab durchzuführen. Daher sollten weitere Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen den Reaktorbedingungen und den Mooszellen in einem anderen Reaktor durchgeführt werden. Die modernen Ansätze bei einzelligen Mikroorganismen gehen bei *Scale-Down*-Reaktoren bis in den µL-Maßstab. [265] In solchen Systemen könnten die intrazellulären Reaktionen, wie zum Beispiel die Akklimatisierung der Moospflanze an Lichtverhältnisse oder der Stickstoffmetabolismus bei einem erhöhten N-Angebot untersucht werden. Dabei könnten Transkriptom- und Proteomstudien für die induzierte Synthese von gewünschten Proteinen bei Stresssignalen hilfreich sein.

# 7 Photobioreaktoren zur Torfmoosproduktion im Pilotmaßstab

In diesem Kapitel werden drei Bioreaktortypen vorgestellt, welche im Rahmen dieser Arbeit entwickelt bzw. aus den anderen Bereichen der Photobiotechnologie zum Wachstum von Torfmoosen angesetzt wurden. In allen drei Systemen war das primäre Ziel die Bildung von Torfmoosbiomasse und die online-Überwachung des Kultivierungsprozesses anhand des pH-, des pO<sub>2</sub>-Verlaufes, sowie semi-kontinuierlicher Abgasanalytik. Der entwickelte *Trickle-Bed*-Photobioreaktor erlitt aus unbekanntem Gründen eine mechanische Beschädigung (siehe Abbildung 0-50) nach der finalen Desinfektion des Reaktors mittels UV-C-Licht und konnte für die Produktion von Torfmoosen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr eingesetzt werden. Der Bau eines neuen Photobioreaktors war aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

## 7.1 Wave-Photobioreaktor

Der zweite Ansatz einer Maßstabsvergrößerung war ein horizontal aufgebauter *Wave*-Photobioreaktor (siehe Abbildung 3-3). Die Wahl dieses Reaktortyps fußte auf folgende Argumente: 1) dieser Reaktortyp wird in der Mooskultivierung von *Physcomitrella patens* für Biopharmazeutika seit mehreren Jahren verwendet [25]; 2) eine sterile Prozessführung ist über mehrere Tage möglich [25]; 3) der Photobioreaktor wird horizontal auf einem Schüttler betrieben, sodass die radiale Wellenbewegung des Reaktorinhalts das Wachstum von Torfmoosen in alle Richtungen fördern und die erwünschte kugelförmige Saatgutqualität begünstigen könnte; 4) das Reaktormaterial ist ein Kunststoff, welches das Licht für die Photosynthese passieren lässt und ist im Vergleich zu Glas günstiger.

Zur Überwachung des Wachstums von Torfmoosen wurde der 5 L Flüssigkeitsaufbewahrungsbeutel um verschiedene Messtechniken (pH-Sonde, pO<sub>2</sub>-Sonde, Abgasanalytik) erweitert. Die detailliert beschriebene Integration der benötigten Anschlüsse am Reaktor befindet sich im Anhang. Hierbei galt es zu beachten, dass die Dichtigkeit des Reaktors an diesen Verbindungsstellen gewährleistet bleibt, um mögliche Kontamination von außen zu verhindern. Das Aufrechterhalten einer konstanten Temperatur von 20,0 °C wurde durch eine integrierte Kühlung an der unteren Außenseite des Reaktors sichergestellt, an welcher mittels eines Kühlkörpers die Wärme aus dem Reaktorinneren abgeführt wurde. Die Menge an Kühlwasser wurde über ein geregeltes Magnetventil gesteuert. Um die CO<sub>2</sub>-Abreicherung im Abgas während der Kultivierung erfassen und somit auf das Wachstum der Torfmoose Rückschlüsse ziehen zu können, wurde die Begasungsrate auf 0,02 vvm (50 mL · min<sup>-1</sup>) reduziert.

Im *Wave*-Photobioreaktor wurden mehrere Experimente durchgeführt, doch aufgrund auftretender Algen-Kontamination werden an dieser Stelle die Dateien einer Sterilkultivierung von etwa vier Wochen gezeigt. Das Torfmoos *S. palustre* wurde unter folgenden Prozessbedingungen kultiviert: PFD= 300 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>, x<sub>CO<sub>2</sub></sub>= 2 %, 1fach konzentriertes zuvor autoklaviertes Knop-Medium mit einem Volumen von 3 L mit einem zu Beginn der Kultivierung eingestellten pH-Wert von 4,0. Die Temperaturregelung wurde bei diesem Versuch aus technischen Gründen nicht durchgeführt. Die Vorkultur entstammt aus der Forschungsgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. Reski am Institut für Pflanzenbiotechnologie an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg.

### Wachstumsverlauf

Im 5 L *Wave*-Photobioreaktor wurde das Wachstum von Torfmoosen photographisch (siehe Abbildung 7-1 A) erfasst. Innerhalb der ersten 14 Tagen bildeten sich kleine Blättchen an den inokulierten Pflanzen und eine vermehrte Innovationsbildung ohne weitere Verzweigung war zu beobachten. Ab ca. Tag 14 füllten die Torfmoose den Reaktorinhalt mit einer kugelförmigen Morphologie mit mehreren Innovationen und kleinen Capitula. Der durchschnittliche Durchmesser der Moosbällchen betrug 1,4 ± 0,7 cm. Das Längenwachstum unterblieb und es fand keine Ausdifferenzierung der Pflanze statt. Ab Versuchstag 28 verfärbte sich das Medium braun und eine vermehrte Schaumbildung wurde auf der



Wasseroberfläche festgestellt. Aus diesem Grund wurde die Kultivierung zur Prozesszeit  $t_p = 30$  d abgebrochen. Die mikroskopische Aufnahme des Mediums deutete auf eine Mikroalgen-Kontamination hin (Daten nicht gezeigt). Die Endfeuchtmasse lag im 5 L Wave-Photobioreaktor bei 255 g. Dies entsprach einer volumetrischen Produktivität von  $2,83 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Das Torfmoosvolumen am Ende der Kultivierung ergab eine Volumenzunahme auf etwa das Neunfache (von ca. 100 mL auf ca. 900 mL).

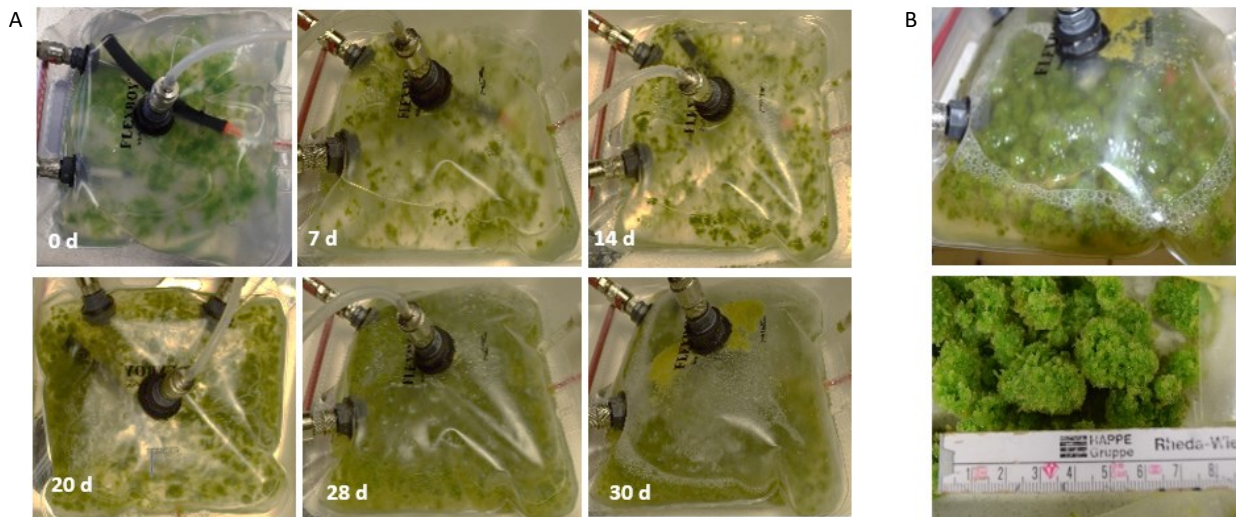


Abbildung 7-1: Kultivierung von *S. palustre* im 5 L Wave-Bioreaktor. A: Optisch erfasste Biomassezunahme von Kultivierungstag 0 bis Tag 30. B-Oben: Verfärbtes Kulturmedium am Ende der Kultivierung. B-unten: Sphärische Morphologie der Torfmoose mit einem durchschnittlichen Durchmesser von  $1,4 \pm 0,7$  cm. Das Anfang-Moosvolumen betrug 120 mL. Kultivierungsparameter: 3 L Knop-Medium mit  $1,25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 300 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $V_g = 50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 2 \%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 30$  d.

### Prozessverlauf

Das Wachstum der Torfmoose wurde mittels einer quantitativen Ionen-, einer pH- und einer Abgasanalytik (siehe Abbildung 7-2) begleitet. Sinkende Konzentration des Ammoniums ( $\text{c}(\text{NH}_4^+)$ ) bewirkte einen stetigen pH-Abfall bis auf den minimalen Wert von 2,99 zur Prozesszeit  $t_p = 10,5$  d. Ab diesem Zeitpunkt konnte kein Ammonium im Medium mehr nachgewiesen werden. Nach drei Tagen der gesamten Ammonium-Aufnahme stieg der pH-Wert kontinuierlich auf das Maximum von 4,39 an. Keine deutliche Veränderung der restlichen Ionen konnte festgestellt werden.

Während der gesamten Kultivierungszeit ist ein Trend für die Anteile von  $\text{O}_2$  ( $x_{\text{O}_2}$ ) und  $\text{CO}_2$  ( $x_{\text{CO}_2}$ ) im Abgasstrom zu erkennen. Ab der Prozesszeit  $t_p = 1$  d reicherte sich das Kulturmedium und das Abgas linear mit Sauerstoff an, während die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme des Torfmooses das Abgas von  $\text{CO}_2$  abreicherte. Ab  $t_p = 25,5$  d kehrte sich der Trend beider Gasanteile um. Der  $\text{O}_2$ -Anteil im Abgas sank während eine  $\text{CO}_2$ -Verringerung im Abgasstrom zu verzeichnen war. Ein Leerlaufen der  $\text{CO}_2$ -Gasflasche konnte ausgeschlossen werden und es wird vermutet, dass zu diesem Zeitpunkt ein heterotropher Mikroorganismus eingedrungen ist. Der  $\text{CO}_2$ -Peak am Versuchstag  $t_p = 27$  d stellt der manuelle Eingriff in die Kultivierung ein, in welchem der  $\text{CO}_2$ -Volumenstrom erhöht wurde, um das gelöste  $\text{CO}_2$  im Medium zu steigern. Zu diesem Zeitpunkt schäumte das Medium und wurde gelb-braun (siehe Abbildung 7-1 B), weshalb wurde das Experiment abgebrochen. Zur Prozesszeit  $t_p = 16,7$  d ist zwischen zwei Messungen eine abrupte Reduzierung des  $\text{O}_2$ -Anteils im Abgas von  $x_{\text{O}_2} = 20,99 \%$  zu  $x_{\text{O}_2} = 20,80 \%$  zu erkennen. Da in den fünf Minuten  $\text{pO}_2$ -Signal weiterhin bei 21,3 % blieb, könnte dies an die Veränderung der Gaszusammensetzung im Zugas liegen. Allerdings wiesen die in BioProCon erfassten Volumenströmen keine Abweichung von den eingestellten Werten auf. Zusätzlich dazu änderte sich der  $\text{CO}_2$ -Anteil im Abgas nicht. Daher kann in diesem Moment keine genaue Erklärung für diesen Befund gegeben werden.

Aus dem ermittelten Sauerstoffkonzentrationsverlauf wurde die Sauerstoffproduktionsrate (OPR) sowie  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate (CUR) (siehe Abbildung 7-3) ermittelt. Ab  $t_p = 1$  d ist eine lineare Zunahme der OPR als auch der CUR ersichtlich. Beide Parameter lagen in den ersten Tagen im negativen Bereich, jenes auf die Atmung der Mooskultur hinweist, da die im

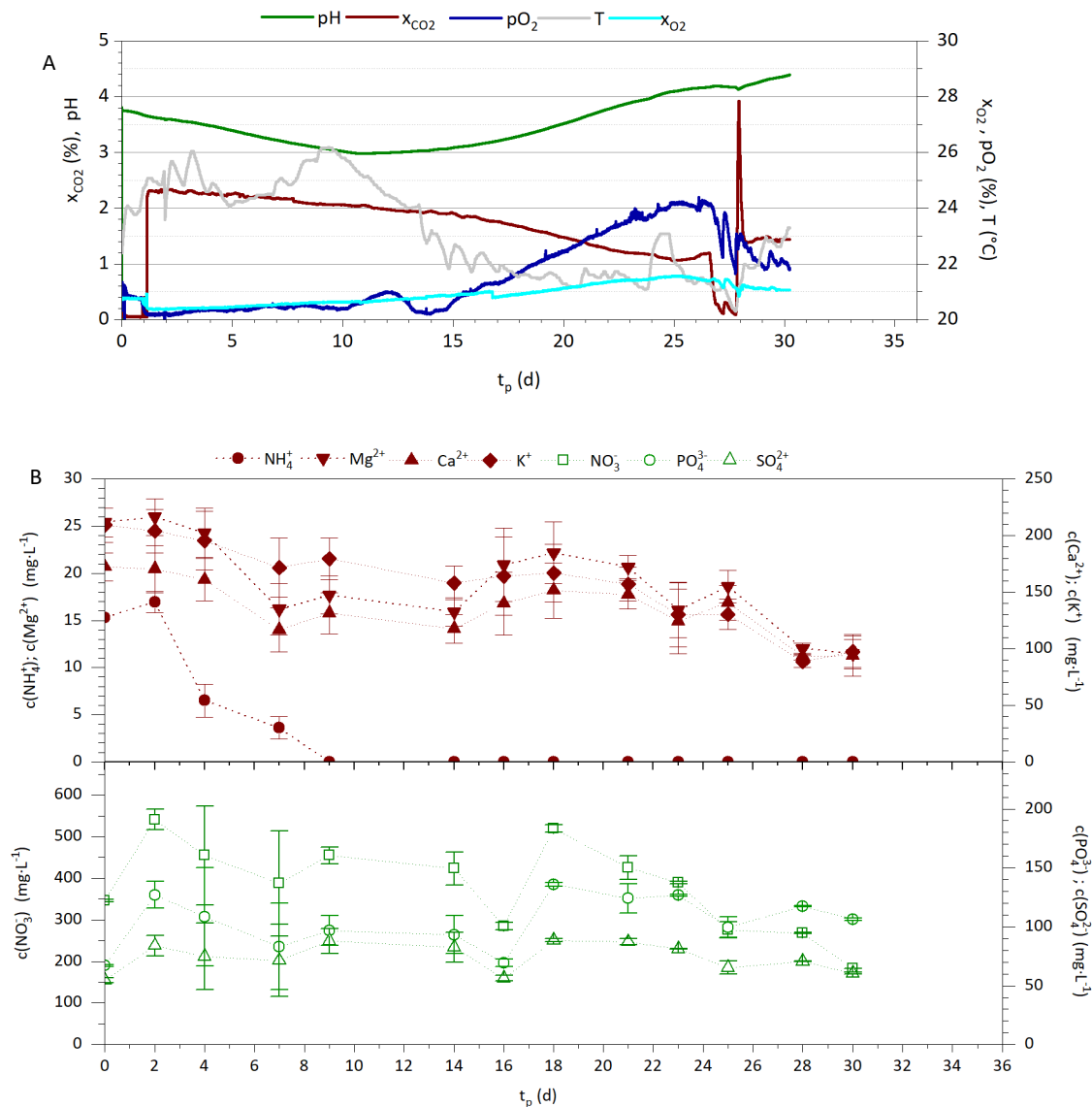


Abbildung 7-2: Prozessverlauf eines Batchprozesses im 5 L Wave-Bag-Reaktor mit *S. palustre*. A) der pH-Wert, der Kohlenstoffdioxid-Volumenanteil im Abgas  $x_{CO_2}$ , der Sauerstoffpartialdruck  $pO_2$ , die Temperatur im Kulturmedium T, der Sauerstoff-Volumenanteil im Abgas  $x_{O_2}$ ; B) Ammonium-  $c(NH_4^+)$ , Magnesium-  $c(Mg^{2+})$ , Calcium-  $c(Ca^{2+})$ , Kaliumkonzentration  $c(K^+)$ ; Nitrat-  $c(NO_3^-)$ , Phosphat-  $c(PO_4^{3-})$  und Sulfatkonzentration  $c(SO_4^{2-})$ . Kultivierungsparameter: 3 L Knop-Medium mit  $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 300 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_g = 50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{CO_2} = 2 \%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 30 \text{ d}$ .

Abgas gemessene Sauerstoffmenge geringer als die eingetragene  $O_2$ -Menge ist. Dies bestätigt auch die CUP. Die Torfmoose atmen und produzieren  $CO_2$ . Dies hat zur Folge, dass die ausgetragene Kohlenstoffmenge größer als die eingetragene ist und die CUR liegt somit im negativen Bereich. Da es nicht technisch möglich war, das System mit der Gasmischung vor dem Kultivierungsbeginn zu equilibrieren, könnte auch die Sättigung des Kulturmediums mit  $CO_2$  und  $O_2$  die Ursache der negativen Werte für CUR und OPR sein. Ab  $t_p = 6,9 \text{ d}$  erreichte die OPR null und steigt kontinuierlich linear mit einer Steigung von  $0,025 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  pro Tag. Die  $CO_2$ -Aufnahmerate (CUR) überschritt den Nullwert zur Prozesszeit  $t_p = 11 \text{ d}$  und ab dem Zeitpunkt ergab sich eine volumetrische  $CO_2$ -Aufnahmerate (CUR) von  $0,029 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  pro Tag.

Die Durchführbarkeit der Kultivierung von *S. palustre* in einem Wave-Photobioreaktor wurde in diesem Versuch positiv erwiesen. Das Moos wuchs im Reaktor mit der erwünschten Saatgutqualität mit vielen Innovationen. Die Kugelmorphologie mit schwach ausgeprägtem Längenwachstum wies darauf hin, dass mechanische Kräfte die Morphologie des Torfmooses beeinflussen. Durch die submersive Kultivierungsmethode ergibt sich keine bevorzugte Wuchsrichtung durch die sich ständig verändernden Lichtverhältnisse. Zusätzlich werden die Moospflanzen durch die Scherkräfte umgebogen, bzw. in ihrem Längenwachstum gehemmt. Die erreichte Produktivität von  $2,83 \text{ gFM}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  übertrifft in diesem Moment



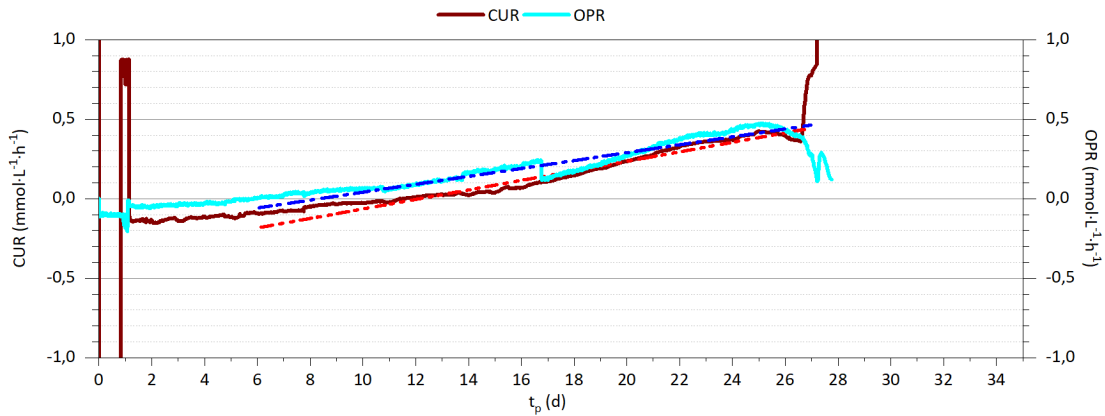


Abbildung 7-3: Prozessverlauf eines Batchprozesses im 5 L Wave-Bag-Reaktor mit *S. palustre* mit volumetrischer  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate CUR und  $\text{O}_2$ -Produktionsrate OPR. Die gestrichelte Linie entspricht der Ausgleichsgerade bestimmt mittels linearer Regression in Software OriginPro® ab dem Versuchstag  $t_p = 9$  d bis zum 25 d (OPR) und ab  $t_p = 11$  d bis zum 25 d (CUR). Kultivierungsparameter: 3 L Knop-Medium mit  $1,25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $V_g = 50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 2 \%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 30 \text{ d}$ .

nicht den Ausbeuten im 5 L Blasensäulenreaktor ( $\sim 4,8 \text{ gFM} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) [19] könnte aber gesteigert werden, wenn die axenische Prozessführungsstrategie gewährleistet wird. Ein kontaminierter Reaktorinhalt ist auf den Zusammenbau des Reaktors zurückzuführen, weil der Reaktor in der Sterilwerkbank selbstgebaut wurde. Eine Anfertigung des Kunststoffbeutels mit den erwünschten Anschlüssen, wie es bereits für *Physcomitrella patens* der Fall ist [25, 102], könnte das Kontaminationsrisiko minimieren und die Ausbeute noch erhöhen.

Die hier angewandte Prozessanalytik zum Messen des Torfmooswachstum im Bioreaktor kann genutzt werden, um Aussage über die Umwandlung des konstant zuströmenden Kohlenstoffdioxids in Sauerstoff zu treffen. Die Mooskultur sollte unten den hier getesteten Bedingungen mindestens mit einer  $\text{CO}_2$ -Menge von  $0,029 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  versorgt werden. Aus dem Wert kann die theoretische Biomassebildungsrate berechnet werden, die bei  $17 \text{ mgBTM} \cdot \text{d}^{-1}$  liegt, unter der Annahme, dass die Moose aus 49 % Kohlenstoff (siehe Abbildung 6-12) bestehen. Aufgrund der Tatsache, dass keine Bestimmung des Trockengewichts im Reaktor erfolgte, kann dieser Wert nicht bestätigt werden. Verglichen mit der Biomassezunahme aus dem Moosbettreaktor ( $126 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ) fällt sie deutlich geringer aus. Dies ist ein Indiz für ein nicht optimales Wachstum von *S. palustre* im Wave-Photobioreaktor. Aus den Ergebnissen geht auch hervor, dass die Sauerstoffproduktionsrate linear ist, welches das allgemein angenommene lineare Wachstum der Torfmoospflanze bestätigt. Darüber hinaus beträgt der durchschnittliche Photosynthesekoeffizient PQ, welcher sich aus dem Verhältnis OPR/CUR ergibt [118], einen Wert von 0,86. Dies deuteten auf Produktion von reduzierten Stoffwechselprodukte, wie z.B. Lipide, Aminosäure hin, bei welcher  $\text{CO}_2$ -Molekülen abgespalten werden [118].

## 7.2 Schlauchreaktor

Der dritte Reaktor war ein vertikal aufgebauter Schlauchreaktor aus der Mikroalgenkultivierung. Dieser Reaktortyp wurde für die Torfmooskultivierung aus mehreren Gründen gewählt: 1) der Reaktor ist einfach zu fertigen, da die Länge der Reaktorfolie im Meterwarenbereich hergestellt werden kann, 2) der Aufbau besteht aus einem transparenten, bioverträglichen Material, welches sich im Feld der Photobiotechnologie beweisen hat, 3) es besteht eine Möglichkeit zur Hochskalierung, da mehrere Reaktoren parallel betrieben werden können.

Um im Reaktor eine konstante Temperatur zum Wachstum der Torfmoose zu gewährleisten, wurde eine Verdunstungskühlung in den Reaktor integriert. Eine detaillierte Beschreibung dieses Systems befindet sich im Kapitel 3.3.3. Die Wärmeabfuhr war ausreichend, um den Reaktor auch über heiße Sommertage ( $T=32 \text{ }^\circ\text{C}$ ) auf  $20,0 \text{ }^\circ\text{C}$  abzukühlen (Daten nicht gezeigt). Die Durchmischung des Reaktors erfolgte pneumatisch durch komprimiertes Gas, welches die Turbulenz mittels Gasblasen erzeugte. Die Einstellung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Abgas sowie des benötigten Volumenstromes war dank zwei durch die Software BioProCon geregelte Massendurchflussregler möglich. Um die Medienverluste aus dem Reaktor bedingt durch die Begasung zu minimieren, war eine Gasbefeuchtungsflasche vor dem Gaseingang des Reaktors

angeschlossen. Der Vordruck des Gases wurde anschließend auf 1,5 bar eingestellt, um das Zerbrechen der Befeuchtungsflasche zu vermeiden. Zur Beleuchtung der Mooskultur wurde ein LED-Modul, bestehend aus den gleichen LED-Lampen des *Wave*-Photobioreaktors, konstruiert. Die Messanalytik beinhaltete die pH-Erfassung mittels pH-Sonde. Eine CO<sub>2</sub>-Analytik und somit verbundener Überwachung des Wachstums war nicht angestrebt, da es sich um eine Testkultivierung zur Produktion größerer Menge an Torfmoosbiomasse handelte. Zudem wurde der Schlauchreaktor als ein ‚offenes‘ System betrieben und das Gas konnte im oberen Teil der Seitenwände rausströmen.

Die Durchführbarkeit der Kultivierungen von *S. palustre* wurde in einem 60 L Schlauchreaktor und in einem 25 L Maßstab (Anhang, Abbildung 0-42) gezeigt. Die Prozessbedingungen waren: PFD = 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $2\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  (0,03 vvm),  $x_{\text{CO}_2}=2\%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4$  ohne pH-Regelung. Die Kultivierungstemperatur  $T_K$  wurde auf 20,0 °C geregelt. Als Medium kam 1,0fach konzentriertes, nicht zuvor autoklaviertes Knop-Medium mit  $1,25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NH}_4\text{NO}_3$  zum Einsatz.

### Wachstumsverlauf

In der Abbildung 7-4 ist die Torfmooskultivierung im Schlauchreaktor anhand photographischer Aufnahmen dargestellt. Nach dem Animpfen verteilten sich die Torfmoose im ganzen Volumen einzelner Segmente und diffundierten in alle Richtungen. Vereinzelt Moospflanzen wurden vom Gasstrom nicht erfasst und gelangten unter den Begasungsschlauch, wo sie bis zum Ende der Kultivierung verblieben (siehe Abbildung 0-39). Nach etwa einer Stunde befanden sich der Großteil der Moospflanzen an der Phasengrenze, an der sie dicht ineinander wuchsen. Das Biomassevolumen nahm mit der fortschreitenden Zeit zu, wie in den photographischen Aufnahmen den Kultivierungszeitraum von 35 Tagen zu erkennen ist. In der Abbildung fällt die heterogene Verteilung der Biomasse in den einzelnen Segmenten des Schlauchreaktors auf. Die verschiedenen Biomassevolumina sind teilweise auf ein unterschiedliches Animpfvolumen pro Segment zurückzuführen (siehe Abbildung 0-39:  $t_p=0$ ). Die zweite Begründung zur heterogenen Verteilung der Moospflanze ergab sich aus der Tatsache, dass die einzelnen Reaktorsegmente am unteren Bereich miteinander verbunden waren und die Biomasse über Strömungseffekte in die Nachbarsäulen gelangten.

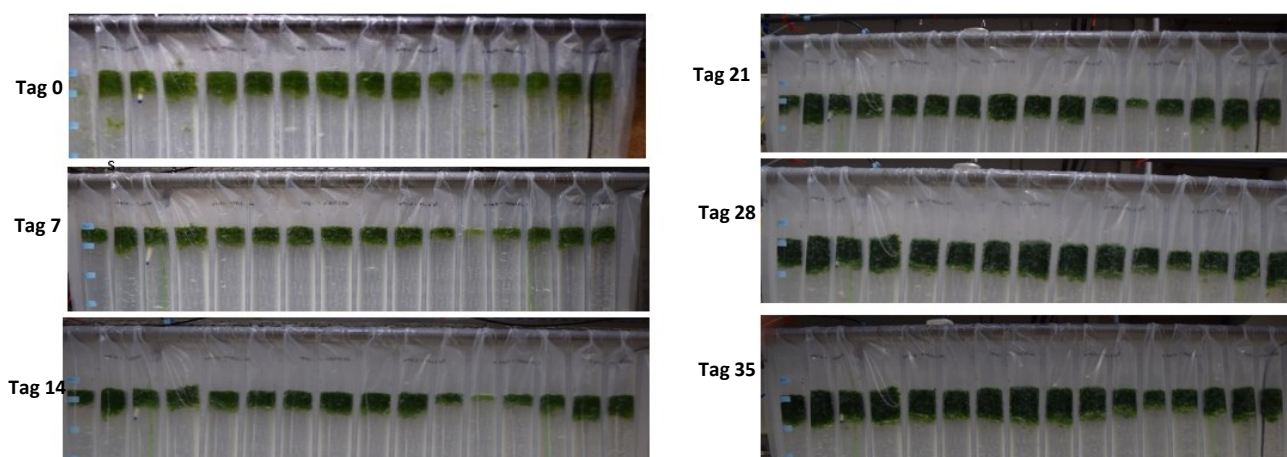


Abbildung 7-4: Ansicht der optischen Biomassezunahme von *S. palustre* kultiviert im 60 L Schlauchreaktor innerhalb von 35 Tagen. Animpfmenge  $m_{\text{FM},0}=250\text{ g}$ . Kultivierungsparameter:  $T_K=21\pm 1,8\text{ }^\circ\text{C}$ , PFD = 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g=2\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2}=2\%$ , Knop-Medium mit  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$  (ohne pH-Regelung) und  $V_m=60\text{ L}$ .

Die Torfmoosbiomasse entsprach am Kultivierungsende ungefähr 10 % des Medienvolumens. Die produzierte Biomasse lag bei 42,4 gBTM (904,6 gFM) mit einem Volumen von 1,3 L. Die volumetrische Produktivität des Prozesses  $P_{V,X}$  lag bei 0,02 gBTM $\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (0,43 gFM $\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ). Bezogen auf der Reaktorfläche entsprach die Flächenproduktivität  $P_{A,X}$  einem Wert von 6,06 gBTM $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ . (129 gFM $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ). Die geringere volumetrische Produktivität ist auch auf die Hydrodynamik des Reaktors zurückzuführen. Die Begasung im Reaktor erzeugte Gasblasen, welche sich zwischen den einzelnen Torfmoospflanzen anlagerten, wobei der Auftrieb die Torfmoose in das obere Reaktorvolumen komprimierte und die effektiv genutzte Belichtungsfläche zur Photosynthese und Biomassenproduktion auf etwa 10 % verringert war. Außerdem war das Volumen der angeimpften Moose zu gering im Vergleich zum Reaktorvolumen (0,4 % v/v), jenes sich auch auf die Produktivität ausgewirkt haben könnte.

### Morphologie

Die Morphologie der produzierten Torfmoosbiomasse ist in Abbildung 7-5 anhand von photographischen Aufnahmen gezeigt. Die Moose wuchsen im dichten Moospolster und an der Lichtseite bildeten sich deutlich mehr Capitula als innerhalb des Moospolsterzentrums und an der lichtabgewandten Reaktorseite. Die Moospflanzen auf der lichtzugewandten Seite wiesen einen helleren Grünton auf, wobei im Polsterzentrum eine braune Stelle detektiert wurde (siehe Abbildung 7-5 D, E). Ein Längenwachstum war im Gegensatz zum *Wave*-Photobioreaktor beobachtet, jedoch war es nicht ausgeprägt (siehe Abbildung 7-5 G). Dies könnte mit der Hydrodynamik des Schlauchreaktors zusammenhängen und ist in Blasensäulen bzw. Air-Liftreaktoren von der Begasungsintensität abhängig. Die hier verwendete Begasungsrate von 0,03 vvm ist im Vergleich zu den typisch verwendeten Begasungsrate gering, sodass die hydrodynamische Scherung der Gasblasen ebenfalls gering ausfiel. [110] Die viel geringere Scherkräfte als im Vergleich zum *Wave*-Photobioreaktor ermöglichten vermutlich das Längenwachstum der Torfmoose im Schlauchreaktor. Die Tatsache, dass die Moose sowohl an der Phasengrenze als auch am Reaktorboden keine Rotation im Medium erfuhren und trotzdem viele Capitula besaßen, deutet darauf hin, dass neben den bereits genannten Scherkräften und den hydrodynamischen Bedingungen andere Parameter die vermehrte Bildung von Capitula begünstigen.



Abbildung 7-5: Ansicht der geernteten Torfmoosen *S. palustre* aus dem 60 L Schlauchreaktor A) Biomasseernte aus einem Reaktorsegment von der Lichtseite und B) von der abgeschatteten Reaktorseite; C) Ansicht an der Biomasse aus einem Reaktorsegment von oben und D) in der Mitte des Moospolsters; E) Moospolster aus einem Reaktorsegment von der Lichtseite; F) Ansicht einer Torfmoospflanze mit mehreren Innovationen an der Lichtseite und mit Innovationen in der Mitte des Moospolsters. Kultivierungsparameter:  $m_{FM,0} = 250 \text{ g}$ ,  $T_K = 21 \pm 1,8 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 2 \%$ , Knop-Medium mit  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung) und  $V_m = 60 \text{ L}$ .

### Prozessverlauf

Während der gesamten Kultivierung wurde eine durchschnittliche Temperatur von  $21 \pm 1,8 \text{ }^\circ\text{C}$  gehalten (siehe Abbildung 7-6). Zur Prozesszeit  $t_p = 21, 27$  und  $30 \text{ d}$  versagte die Temperaturregelung aufgrund des Ausfalls der Kühlmittelpumpe. Durch fehlende Wärmeabfuhr an der Reaktorwand stieg die Temperatur im erwähnten Zeitraum an. Die zeitliche Veränderung des pH-Wertes im Kultivierungsmedium verzeichnete einen aus dem Kolbenmaßstab bekannten Verlauf. Zu Beginn der Kultivierung sank der pH-Wert vom eingestellten Wert von 4,0 auf etwa 3,5 innerhalb von 3 Tagen. Nach Tag 3

setzte sich eine geringere Abnahme des pH-Wertes bis zum Versuchstag von 29 d fort. Während dieser Abnahme des pH-Wertes sank die Ammoniumkonzentration  $c(\text{NH}_4^+)$  bis auf null. Abgesehen von Ammonium war keine ausgeprägte Nährstoffveränderung im Medium zu beobachten und somit standen die restlichen Nährstoffe bis zum Ende der Kultivierung ausreichend zur Verfügung (Anhang Abbildung O-42). Die langsame Ammonium-Abnahme, im Vergleich zu den anderen Kultivierungen innerhalb der anderen Photobioreaktorsystemen, deutet auf eine schwache Nährstoffversorgung der einzelnen Reaktorsäulen hin.

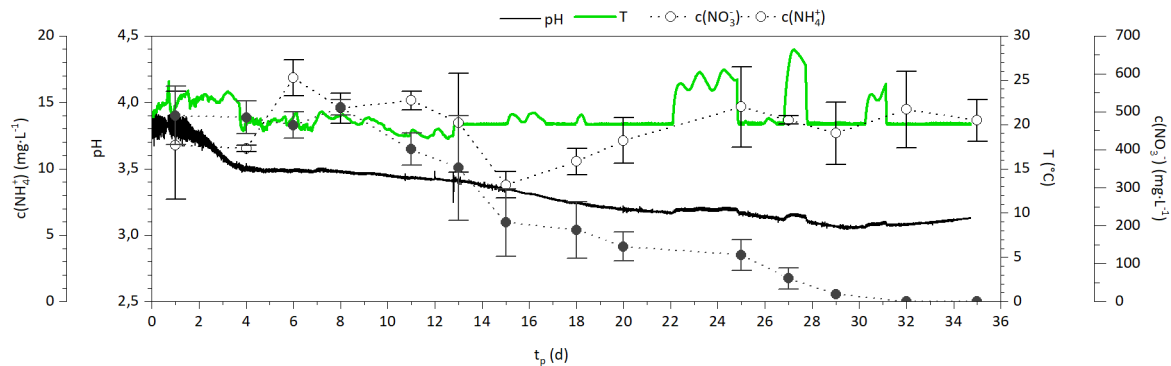


Abbildung 7-6: Prozessverlauf eines Batchprozesses im 60 L Schlauchreaktor mit *S. palustre* mit dem pH-Wert, der Mediumtemperatur, der Ammoniumkonzentration  $c(\text{NH}_4^+)$  und Nitratkonzentration  $c(\text{NO}_3^-)$ . Kultivierungsparameter:  $m_{\text{FM},0} = 250$  g,  $T_K = 21 \pm 1,8$  °C, PFD =  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 2$  %, Knop Medium mit  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4$  (ohne pH-Regelung) und  $V_m = 60$  L.

## 7.3 Vergleich der Reaktorsysteme

In diesem Kapitel werden die entwickelten Photobioreaktoren im Hinblick auf die wichtigsten Produktionsparameter zur Produktion von Torfmoosen diskutiert. Entgegen der ursprünglichen Vermutung ist keine Phase der Reifung ‚Hardening‘ der Bioreaktorkultur vor dem Aussäen erforderlich. Es wurde gezeigt, dass die Mooskulturen aus dem Bioreaktor sich an die Feldbedingungen adaptieren und gedeihen können [108], sodass die Produktion allen Saatguts direkt in Photobioreaktoren erfolgen kann. Aus diesem Grund ist die Hauptanforderung an Photobioreaktoren ihre Hochskalierbarkeit, um genügend Biomasse zur Verfügung zu stellen. Ein weiterer Aspekt in der Saatgutproduktion ist die Morphologie der Moospflanze. Es wurde zuvor gezeigt, dass sich für die Anzucht auf dem Feld Torfmoose mit einer hohen Anzahl an Capitula am besten eignen. [108] Um mit Torfpreisen konkurrieren zu können [13], sollte die Saatgutproduktion möglichst geringere Kosten verursachen. Dazu gehören beispielweise die Investitionskosten des Reaktorbaues, der Peripherie und die Betriebskosten, wie zum Beispiel der Energieeintrag zur Begasung und Durchmischung des Reaktors [266]. Im Vergleich zu heterotrophen Kultivierungen ist eine effektive Lichtverteilung und Umwandlung der Lichtenergie zur Biomasseproduktion durch Photosynthese ein weiterer zu berücksichtigender Faktor, welcher anhand der Eindringtiefe beurteilt wird. [123] Der Vergleich aller drei entwickelten Photobioreaktoren hinsichtlich der erwähnten Anforderungen befindet sich in Tabelle 7-1.

### Reaktorkosten, Betriebskosten und Peripherie

Die hier vorgeschlagenen Reaktoren sind in ihren Materialkosten miteinander vergleichbar. Die Peripherie um die Reaktoren ist jedoch nach Reaktortyp ökonomisch unterschiedlich zu bewerten. Zur Durchmischung und Gaseintrag dient im Schlauchreaktor die Begasung und so ist der Energieeintrag hier deutlich höher als im Moosbettreaktor, in welchem die Begasung lediglich zum Gaseintrag in das Moospolster dient. Zugleich stellt die fehlende Durchmischung des Moosbettreaktors in diesem Entwicklungsstand einen großen Nachteil für die homogene Nährstoffversorgung der Moose dar, weil sich örtliche Über- oder Unterversorgung im Moospolster ergeben können. Der Nährstofftransport kann in zukünftigen Reaktoren zusätzlich durch die Vernebelung des Kulturmediums realisiert werden, jenes aber die Investitions- sowie die Betriebskosten steigert. Der Schlauchreaktor, im Gegensatz zum *Wave*-Photobioreaktor, benötigt zur Durchmischung

keinen Schüttler bzw. keinen Rührer inklusive deren Wartungskosten. Die dadurch verursachten Investition- sowie Betriebskosten sind deutlich geringer. Der Schlauchreaktor ist aufgrund seines offenen Betriebs nicht dicht verschlossen, wodurch der Aufwand und die Kosten der Gewährleistung der Sterilität entfallen. Bei der hier verwendeten Begasungsrate von 0,03 vvm werden die Torfmoospflanzen nur teilweise im Medium zirkuliert und neigen zur Flotation, sodass nur ein kleiner Teil der belichteten Fläche zur Photosynthese und Biomasseproduktion genutzt wird. In der klassischen Blasensäule wird hingegen eine homogene Verteilung der Kulturen bei einer Begasungsrate von 0,3 vvm [17, 19] erzielt. Um die Durchmischung zu optimieren, könnte eine höhere Begasungsrate genutzt werden, welche jedoch mit einem erhöhten Leistungseintrag und damit höheren Energieverbrauch verbunden ist. Eine zweite Möglichkeit zur homogenen Verteilung der Moospflanzen stellt die Vergrößerung des Reaktordurchmessers der einzelnen Reaktorsegmente dar, wobei dies aus zwei Gründen nur bedingt realisierbar ist: Erstens muss bei einem höheren Durchmesser die Reaktorwand dicker sein, um die Stabilität bei nun höherem Volumen und Kulturgewicht zu garantieren. Durch die Verbreiterung des Reaktordurchmessers wird jedoch die Lichteindringtiefe größer [123], sodass es zur vermehrten Lichtlimitierung der Torfmoospflanzen auf der lichtabgewandten Seite des Reaktors kommen kann.

Ein weiterer Kostenparameter betrifft die Beleuchtung, der durch den Betrieb der Reaktoren im Freiland minimiert werden kann.

### Hochskalierung

Im Moosbettreaktor bietet das Stapeln einzelner Moosbettreaktoren eine Möglichkeit, die Skalierbarkeit zu gewährleisten. Das *Numbering up* wirkt sich positiv auf die Flächenproduktivität aus, während der Lichteintrag beeinträchtigt wird, da sich die Moosetagen gegenseitig abschatten. Um das Licht auf jeder Etage für das Wachstum bereitzustellen, könnten reflektierten Platten seitlich an den Reaktoren positioniert werden. Dies benötigt eine genaue Modellierung der Lichtverteilung in den einzelnen Schichten in Abhängigkeit des sich stets verändernden Sonnenstands. Der größte Vorteil des Schlauchreaktors ist seine Hochskalierbarkeit. Die Reaktoren bestehen aus einzelnen Segmenten und können nebeneinander in Reihe positioniert werden. Somit steigt das Produktionsvolumen, wobei die Flächenproduktivität konstant bleibt. Der *Wave*-Photobioreaktor hat einen großen Nachteil in Hinsicht auf die Hochskalierung, welche durch den Energieeintrag des Schüttlers und die effiziente Durchmischung des Reaktors bis zu 100 L skalierbar eingeschränkt ist. [266]

### Pflanzenmorphologie und Saatgutqualität

Die Wuchsform der produzierten Torfmoose im Moosbettreaktor ähnelte der aus der Natur, weil die Moose stark ausdifferenziert waren und das Längenwachstum deutlich ausgeprägt war. Da sie eine geringere Anzahl an Capitula im Vergleich zu den Moospflanzen aus den anderen Submersreaktoren aufweisen, erfüllt der Reaktor nicht die erwünschte Anforderung an das Saatgut. Dennoch könnte die im Moosbettreaktor produzierte Biomasse an anderen Stellen verwendet werden (siehe Kapitel 2.2.3). Zum Beispiel könnte die Kultivierungsstrategie im Moosbettreaktor mit dem kommerziell angebotenen Produkt *Beda Humock* [137], welches bereits vermarktet ist, konkurrieren, da die Wachstumsraten im Gewächshaus deutlich geringer als die im Moosbettreaktor ausfallen. Die Moosproduktion in der kontrollierten Umgebung des MBRs könnte beliebige Torfmoose in kürzerer Zeit mit derselben Qualität wie in der Anzucht im Gewächshaus zur Verfügung stellen.

Im Gegensatz dazu produziert der *Wave*-Photobioreaktor die Torfmoospflanzen mit der höchsten Anzahl an Capitula pro Stämmchen. Trotz der erwünschten Saatgutqualität eignet sich solcher Reaktortyp für die massenhafte Produktion der Torfmoose aus den bereits erwähnten Gründen nicht. Die Morphologie der Mooskultur aus dem Schlauchreaktor war vergleichbar mit dem Moospolster aus dem Moosbettreaktor, jedoch wiesen die Moospflanzen mehr Capitula als im auf. Durch die Flotation im Schlauchreaktor herrschte nur eine geringe Turbulenz, welches das Längenwachstum fördert und die gewünschte Saatgutqualität mindert. Eine verbesserte axiale Durchmischung könnte eine sphärische Wachstumsweise im Schlauchreaktor unterstützen, und so die Saatgutqualität steigern.

### Produktivität

Für den Einsatz des Moosbettreaktors zur Produktion von Torfmoosbiomasse spricht seine Flächenproduktivität, die am höchsten im Vergleich zu den anderen getesteten Reaktorsystemen ist. Da die Optimierung des Torfmooswachstums im

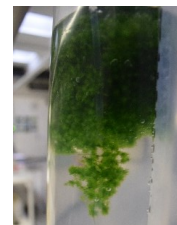
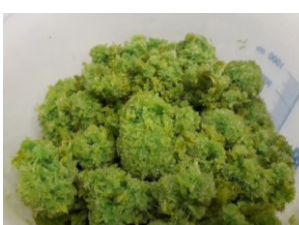


Bereich der Nährstoffaufnahme und des CO<sub>2</sub>-Übergangs in diesem Reaktortyp noch nicht abgeschlossen ist, sind auch höhere Produktivität zu erwarten. Die Beurteilung des Prozesses anhand der volumetrischen Produktivität eignet sich für den Moosbettreaktor nicht, da die Moose nicht im ganzen Reaktorvolumen wachsen. Dadurch fällt die volumetrische Produktivität deutlich kleiner aus. Im *Wave*-Photobioreaktor war die volumetrische Produktivität unter den drei getesteten Reaktor am höchsten. Verglichen mit dem Moosbettreaktor kann die hohe Produktivität mit der Tatsache zusammenhängen, dass die Moose im *Wave*-Photobioreaktor ständig vom Substrat umströmt waren [117]. Außerdem begünstigt die wellenartige Bewegung des Kulturmediums den Gaseintrag in die Flüssigphase, jenes eine Limitierung Stoffübergang ist. [110] Um die Produktivitäten des *Wave*-Photobioreaktors mit dem Schlauchreaktor vergleichen zu können, ist dieselbe Animpfkonzentration (Verhältnis der Torfmoosmenge zum Reaktorvolumen) erforderlich. Aufgrund von deutlich unterschiedlicher Reaktorvolumen (3 L und 60 L) war es nicht möglich dieselbe Startdichte der Mooskultur zu erreichen. Das geringere Verhältnis des Inokulums zum Medienvolumen könnte beim Schlauchreaktor der Grund sein, weshalb die volumetrische Produktivität um das zehnfache geringer als im *Wave*-Photobioreaktor liegt. Darüber hinaus könnte die größere volumetrische Produktivität des *Wave*-Photobioreaktors als im Schlauchreaktor auf den Lichteintrag zurückzuführen sein. Die Moose im *Wave*-Photobioreaktor könnten aufgrund der Hydrodynamik die gesamte belichtete Fläche zum Wachstum nutzen. Während die horizontal Betriebsweise des *Wave*-Photobioreaktors eine große Lichtfläche mit einer geringen Lichteindringtiefe zur Verfügung stellt, wirkt sie sich zugleich negativ auf die Flächenproduktivität aus. Die ist deutlich geringer als die der vertikalen betriebenen Photobioreaktoren.

Tabelle 7-1: Überblick der entwickelten Photobioreaktoren zur Torfmooskultivierung, sowie der wichtigsten Produktionsparameter.

Reaktortyp	Moosbettreaktor	<i>Wave</i> -Photobioreaktor	Schlauchreaktor
Reaktorfläche $A_R$	0,01 m <sup>2</sup>	0,09 m <sup>2</sup>	0,08 m <sup>2</sup>
Reaktorvolumen $V_R$	1,5 L	5 L	60 L
Energieeintrage	Begasung (Gaseintrag)	Schüttler (Durchmischung) Begasung (Gaseintrag)	Begasung (Durchmischung und Gaseintrag)
Entscheidende Betriebskosten	Beleuchtung	Mechanische Energie zur Durchmischung	Pneumatische Energie zur Begasung und Durchmischung
Maßstabvergrößerung	Unbegrenzt durch <i>Numbering-up</i>	Bis 100 L	Unbegrenzt durch Parallelisierung
Prozessregelung	Temperatur: noch nicht etabliert aber möglich pH: möglich	Temperatur: etabliert pH: möglich	Temperatur: etabliert pH: möglich
Volumetrische Produktivität $P_{X,V}$	~ 0,08 gBTM·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ~ 2,08 gFM·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	- ~ 2,8 gFM·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	~ 0,02 gBTM·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ~ 0,43 gFM·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>
Flächenproduktivität $P_{X,A}$	~ 12,6 gBTM·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup> ~ 312 gFM·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	- ~ 34 gFM·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>	~ 6,06 gBTM·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup> ~ 129 gFM·m <sup>-2</sup> ·d <sup>-1</sup>

Morphologie des Saatguts



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Schlauchreaktor sich wegen der geringen Investitionskosten, mäßigen Betriebskosten und des *Scale-Up*-Potenzials am besten als *Low-cost*-Bioreaktor zur Produktion der Torfmoosbiomasse eignet. Die Hydrodynamik erschwert deren Einsatz, die jedoch in den zukünftigen Entwicklungsschritten durch die Reaktorbauweise verbessert werden kann. Mit der Annahme, dass die geringere Produktivität des Schlauchreaktors auch auf die geringe Start-Zelldichte zurückzuführen ist, könnte die Prozessführung wie z.B. ein modifizierter *Fed-Batch*-Prozess (*repeated-Fedbatch*) [267] höhere Torfmoosbiomassmengen in kurzer Zeit liefern. Hierbei wird ein Teil des Reaktorinhalts zu einem bestimmten Zeitpunkt geerntet. Die im Reaktor verbleibende Biomasse dient als Inokulum für die nachfolgende Kultivierung. Anschließend wird der Reaktor mit frischem Medium befüllt, sodass keine Lag-Phasen entstehen. Zur Realisierung eines solchen Mediendurchlaufs könnte der Reaktor mit einer Biomasse-Rückhalte mechanik modifiziert

werden, wie z.B. einem Membranfilter. Nachteile dieser Prozessführungsstrategie sind jedoch die hohen Investitionskosten- und Betriebskosten aufgrund der Regelung, der Automatisierung sowie der größeren Kontaminationsgefahr durch die sequenzierte Kultivierungsdauer. Im Gegensatz zum Batch-Verfahren mit seinen für gewöhnlich höhere Biomassekonzentrationen und der damit verbundener geringerer Lichtverfügbarkeit, könnte die beschriebene Fed-Batch-Strategie eine groß-skalige Produktion von Saatgut ermöglichen.



## 8 Ausblick

Die hier vorgestellten Ergebnisse ergaben konkrete Ziele für die Weiterentwicklung und Optimierung der Produktion von Torfmoospflanzen. Essentielle Wachstumsfaktoren waren die CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit, die Stickstoffkonzentration und die Dauer der Hell-Dunkel-Zyklen.

Für das photoautotrophe Wachstum könnte ein erhöhtes pCO<sub>2</sub> des Zugases eine weitere Steigerung der produzierten Torfmoosmenge bewirken. Hierbei sollte der optimale pCO<sub>2</sub> im Kulturmedium ermittelt werden, bei welchem die maximale Biomassebildungsrate erreicht wird. Um diesen Wert während der Kultivierung nicht zu unterschreiten, sollte der pCO<sub>2</sub>-Verlauf überwacht und durch die Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Volumenstromes, Begasungsrate etc. reguliert werden. Zusätzlich könnte eine quantitative Messung des RuBisCO-Enzyms in der Pflanze Aufschluss über die maximale CO<sub>2</sub>-Fixierungsrate geben, um die CO<sub>2</sub>-Versorgung weiter zu optimieren. Um weitere schwierig kultivierbare Moos-Spezies wie *S. rubellum* und *S. fimbriatum* [23] zu kultivieren, sollte eine kontinuierliche Prozessführungsstrategie statt eines Batchbetriebs realisiert werden. Hierbei sollten überschüssige Nährstoffe aus dem Medium entfernt werden, um den Prozess zu ökonomisieren. Außerdem sollte sich die Aufnahme von Ammonium und Nitrat auf Mengen beschränken, die wachstumsfördernd sind, um eine Anlagerung von Stickstoff in Form von Speicheramino Säuren zu vermeiden. Die Ermittlung dieser Mengen sollte durch die Bestimmung des Stickstoff- und Aminosäuregehalts der Pflanze unterstützt werden. Darüber hinaus könnte im kontinuierlichen Betrieb die pH-Regelung des Mediums über Ammonium erfolgen, jenes gleichzeitig zur Stickstoff-Versorgung dient. Zukünftig sollten die Faktoren, die die Wuchsform der Pflanze, ihren Verzweigungsgrad und die Anzahl der Innovationen untersucht werden, um die Pflanzen im Photobioreaktor auf ihre Aussaat im Moor vorzubereiten. Zuletzt könnten symbiotische Bakterien eingegangen, die im natürlichen Habitat der Moospflanzen vorkommen, untersucht werden, um ihren Einfluss auf das Torfmooswachstum zu bestimmen und eventuell in der Torfmoosproduktion einzusetzen.

Um eine ausreichende Menge an Saatgut für das *Sphagnum farming* in Deutschland bereitzustellen (400 m<sup>3</sup>·ha<sup>-1</sup>·year<sup>-1</sup>, H. Joosten, Universität Greifswald, persönliche Mitteilung), könnten mehrere Bioreaktoren unter minimalen Betriebskosten gleichzeitig betrieben werden. Als Produktionsreaktor könnte der hier vorgestellte Schlauchreaktor zum Einsatz kommen, welcher bis zu einem 100 L Volumen pro Reaktoreinheit betrieben werden und durch *Numbering-Up* in Reihen hochskaliert werden kann. Der Energieeintrag beschränkt sich auf die Begasung, die jedoch durch die Säulenform wesentlich geringer ist als im Rührkesselreaktor. Zur Beleuchtung ist aus Kostengründen das Sonnenlicht zu ziehen. Dafür sollte zunächst ein Testlauf im Freiland im kleineren Maßstab erprobt und dabei das im Zusammenhang mit dieser Arbeit entwickelte Kühlsystem getestet werden. Darüber hinaus sollte eine Regelungstechnik zum kontinuierlichen Betrieb etabliert werden, welches bereits für die Kultivierung von *S. fallax* erfolgreich eingesetzt wurde [20]. Zur Realisierung eines solchen Mediendurchlaufs ist im Reaktor eine Rückhaltung der Moose, z.B. mittels Membranfilter zu integrieren. Um diesen Reaktor zu nutzen, ist eine weitere Optimierung der hydrodynamischen Bedingungen erforderlich, um die Flotation der Biomasse zu vermeiden und somit die gesamte Belichtungsfläche zum Wachstum zu nutzen. Dies könnte durch höhere Begasungsraten erfolgen, in dem die Moose in Bewegung bleiben. Zusätzlich könnte eine Vergrößerung der Gasblasen vermeiden, dass sich die Gasblasen zwischen den einzelnen Torfmoospflanzen anlagern und dadurch die Torfmoose einen Auftrieb bekommen. Die Steigerung der volumetrischen Produktivität könnte durch einen modifizierten Fed-Batch-Prozess (*repeated-Fedbatch*) [267] realisiert werden. Ein Teil der produzierten Torfmoosbiomasse wird zu einem bestimmten Zeitpunkt geerntet und die im Reaktor verbleibende Biomasse dient als Inokulum für die nachfolgende Kultivierung. Die deutlich höheren Start-Inokulum-Mengen im Vergleich zum Batch-Verfahren minimiert die lag-Phase, jenes die Produktivität erhöht. Dieses Vorgehen verringert die Abhängigkeit von großen Mengen an Saatgut für die großskalige Produktion.

Die Anzahl der Innovationen pro Biomasse ist ein wichtiger Parameter für die Saatgutqualität. Die unterschiedlichen Wuchsformen in Moosbettreaktor und in Suspensionskultur sind vermutlich durch die einheitlichen Licht- und Kräftebedingungen zu erklären. Zuletzt könnten weitere Einflussfaktoren auf das Längenwachstum und Verzweigungsverhalten der Pflanze wie z.B. die Lichtqualität (Farbe, Hell-/Dunkel-Zyklen), die Lichtrichtung, die Kräfteverteilung im Reaktor, die Medienbestandteile bis hin zu Pflanzenhormonen untersucht werden, um optimales Saatgut zu produzieren.

---

## 9 Literaturverzeichnis

1. Ellenberg H, Dierschke H (2010) Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen: In ökologischer, dynamischer und historischer Sicht ; 203 Tabellen, 6., vollständig neu bearbeitete und stark erweiterte Auflage. UTB Botanik, Ökologie, Agrar- und Forstwissenschaften, Geographie, vol 8104. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
2. Huth V, Günther A, Bartel A et al. (2021) The climate benefits of topsoil removal and Sphagnum introduction in raised bog restoration. *Restor Ecol*. <https://doi.org/10.1111/rec.13490>
3. Höper H (2007) Freisetzung von Treibhausgasen aus deutschen Mooren. <https://doi.org/10.23689/fidgeo-3035>
4. Succow M (1988) Landschaftsökologische Moorkunde: Mit 64 Tabellen, 1. Aufl. Reihe Ökologie. Fischer, Jena
5. BAIN JT, PROCTOR MCF (1980) THE REQUIREMENT OF AQUATIC BRYOPHYTES FOR FREE CO<sub>2</sub> AS AN INORGANIC CARBON SOURCE: SOME EXPERIMENTAL EVIDENCE. *New Phytol* 86:393–400. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb01680.x>
6. Gaudig G (2017/2018) Shagnum farming from species selection to the production of growing media: a review. *Mires and Peat*:1–30
7. (2021) Herzlich Willkommen auf [www.WARUM-TORF.info](http://www.WARUM-TORF.info). <https://www.warum-torf.info/>. Accessed 07 Aug 2021
8. Campaue S, Rochefort L (1996) Sphagnum Regeneration on Bare Peat Surfaces: Field and Greenhouse Experiments. *Journal of Applied Ecology*:599–608
9. Rochefort L (2003) North American approach to the restoration of Sphagnum dominated peatlands. *Wetlands Ecology and Management*:3–20
10. Schmatzler E (2012) Die Torfindustrie in Niedersachsen – Ergebnisse einer Umfrage zur Zukunft der Torfgewinnung in Niedersachsen. <https://doi.org/10.23689/fidgeo-2959>
11. Joosten H (1993) Denken wie ein Hochmoor: hydrologische Selbstregulation von Hochmooren und deren Bedeutung für Wiedervernässung und Restauration. *Telma* : Band 23 : S. 95 - 115 23 (1993):95–115
12. Gaudig G (2017/2018) Sphagnum farming on cut-over bog in NW Germany. *Mires and Peat*
13. Wichmann S (2020) Paludiculture on former bog grassland: Profitability of Sphagnum farming in North West Germany. *Mires and Peat*
14. Aubé M (2015) Characteristics of Eastern Canadian cultivated Sphagnum and potential use as a substitute for perlite and vermiculite in peat-bases horticultural substrates. *Mires and Peat*:1–18
15. Caporn SJM (2017/2018) Sphagnum restoration on degraded blanket and raised bogs in the UK using micropropagated source material: a review of progress. *Mires and Peat*:1–17
16. Gaudig G (2013/2014) Sphagnum farming in Germany - a review of progress. *Mires and Peat*:1–11
17. Beike AK, Spagnuolo V, Lüth V et al. (2015) Clonal in vitro propagation of peat mosses (*Sphagnum* L.) as novel green resources for basic and applied research. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 120:1037–1049. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0658-2>
18. Graham LE (2010) Evolutionary and ecophysiological significance of sugar utilization by the peat moss *Sphagnum compactum* (Sphagnaceae) and the common charophycean associates *Cylindrocystis brebissonii* and *Mougeotia* sp. (Zygnemataceae). *American Journal of Botany*:1485–1491
19. Heck MA, Melková I, Posten C et al. (2021) Medium optimization for biomass production of three peat moss (*Sphagnum* L.) species using fractional factorial design and response surface methodology, vol 381
20. Rudolph H (1988) Sphagnum culture techniques. *Methods in bryology*:25–34
21. Gonzalez AG, Pokrovsky OS, Beike AK et al. (2016) Metal and proton adsorption capacities of natural and cloned *Sphagnum* mosses. *J Colloid Interface Sci* 461:326–334. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.09.012>
22. Kajita Miyuki (1986) Establishment and growth characterization of suspension culture of cells from the moss, *Sphagnum imbrication*. *Physiol. Plantarum*:21–26
23. Heck MA, Lüth VM, van Gessel N et al. (2021) Axenic in vitro cultivation of 19 peat moss (*Sphagnum* L.) species as a resource for basic biology, biotechnology, and paludiculture. *New Phytol* 229:861–876. <https://doi.org/10.1111/nph.16922>

- 
24. SIMOLA LK (1975) The Effect of Several Protein Amino Acids and Some Inorganic Nitrogen Sources on the Growth of *Sphagnum nemoreum*. *Physiol Plant* 35:194–199. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1975.tb03892.x>
  25. greenovation Biotech GmbH (2009) Abschlussbericht des Verbundpartnes greenovation Biotech GmbH: BioChancePlus-3. Entwicklung und Produktion neuartiger Biopharmazeutika im Moos
  26. Rydin H, Clymo RS (1989) Transport of Carbon and Phosphorus Compounds about *Sphagnum*. *Proc R Soc Lond B*:63–84
  27. Hayward PM, Clymo RS (1982) Profiles of water content and pore size in *Sphagnum* and peat, and their relation to peat bog ecology. *Proc R Soc Lond B* 215:299–325. <https://doi.org/10.1098/rspb.1982.0044>
  28. (2021) MoorWissen | Startseite. <https://www.moorwissen.de/de/index.php>. Accessed 07 Aug 2021
  29. (2018) ALW - Moore: Moortypen, Topographischer Moortyp Hangmoore, Kesselmoore. <http://www.wagner-ugau.de/data/moore/grundlagen/moortypen/gliederungssysteme.html>. Accessed 07 Aug 2021
  30. van Bremen N (1995) How *Sphagnum* bogs down other plants. *TREE*
  31. Smith AJE (ed) (1982) *Bryophyte Ecology*. Springer Netherlands, Dordrecht
  32. Damman AWH (1978) Distribution and Movement of Elements in Ombrotrophic Peat Bogs. *OIKOS*:480–495
  33. Succow M, Joosten H (eds) (2001) *Landschaftsökologische Moorkunde: Mit 10 Farbbildern, 223 Abbildungen, 136 Tabellen im Text sowie auf 2 Beilagen, 2., völlig neu bearbeitete Auflage*. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart
  34. Leuschner C, Ellenberg H (2017) *Ecology of Central European Non-Forest Vegetation: Coastal to Alpine, Natural to Man-Made Habitats*. Springer International Publishing, Cham
  35. Clymo R.S. (1964) The Origin of Acidity in *Sphagnum* Bogs. *The Bryologist*:427–431
  36. Hyryläinen A, Rautio P, Turunen M et al. (2015) Seasonal and inter-annual variation in the chlorophyll content of three co-existing *Sphagnum* species exceeds the effect of solar UV reduction in a subarctic peatland. *Springerplus* 4:478. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1253-7>
  37. Hölzer A (2010) *Die Torfmoose Südwestdeutschlands und der Nachbargebiete*. Weissdorn-Verl., Jena
  38. Vicherová E, Hájek M, Hájek T (2015) Calcium intolerance of fen mosses: Physiological evidence, effects of nutrient availability and successional drivers. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 17:347–359. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2015.06.005>
  39. Smolders AJP, Tomassen HBM, van Mullekom M et al. (2003) Mechanisms involved in the re-establishment of *Sphagnum*-dominated vegetation in rewetted bog remnants. *Wetlands Ecology and Management* 11:403–418. <https://doi.org/10.1023/B:WETL.0000007195.25180.94>
  40. Clymo RS (1973) The Growth of *Sphagnum*: Some Effects of Environment. *Journal of Ecology* 61:849–869
  41. Jirsa F, Neubauer E, Kittinger R et al. (2013) Natural organic matter and iron export from the Tanner Moor, Austria. *Limnologia* 43:239–244. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2012.09.006>
  42. Clymo R.S. (1984) *Sphagnum-Dominated Peat Bog: A Naturally Acid Ecosystem [and Discussion]*. *Biological Science*:497–499
  43. Gies T, Lötschert W (1973) Untersuchungen über den Kationengehalt im Hochmoor. *Flora* 162:244–268. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)31706-1](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)31706-1)
  44. PRESS MC (1986) THE POTENTIAL IMPORTANCE OF AN INCREASED ATMOSPHERIC NITROGEN SUPPLY TO THE GROWTH OF OMBROTROPHIC SPHAGNUM SPECIES. *New Phytol*:45–55
  45. Jiroušek M, Hájek M, Bragazza L (2011) Nutrient stoichiometry in *Sphagnum* along a nitrogen deposition gradient in highly polluted region of Central-East Europe. *Environ Pollut* 159:585–590. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.10.004>
  46. Bragazza L, Limpens J, Gerdol R et al. (2005) Nitrogen concentration and delta15N signature of ombrotrophic *Sphagnum* mosses at different N deposition levels in Europe. *Global Change Biol* 11:106–114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2004.00886.x>
  47. WOODIN SJ, LEE JA (1987) The Effect of Nitrate, Ammonium and Temperature on Nitrate Reductase activity in *Sphagnum* species. *New Phytol*:103–115
  48. Rudolph H, Voigt JU (1986) Effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N on growth and metabolism of *Sphagnum magellanicum*. *Physiol Plant*:339–343

49. Steinmann P, Shotyk W (1997) Chemical composition, pH, and redox state of sulfur and iron in complete vertical porewater profiles from two Sphagnum peat bogs, Jura Mountains, Switzerland. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61:1143–1163. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(96\)00401-2](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(96)00401-2)
50. Hayes MHB, Mylotte R, Swift RS (2017) Humin: Its Composition and Importance in Soil Organic Matter. In: vol 143. Elsevier, pp 47–138
51. Melo BAG de, Motta FL, Santana MHA (2016) Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 62:967–974. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.001>
52. Thiel EC (1987) Ferritin: Structure, Gene Regulation, and Cellular Function in Animals, Plants, and Microorganisms. *Ann. Rev. Biochem.*:289–315
53. Smolders AJP (2001) Substrate-Derived CO<sub>2</sub> Is Important in the Development of *Sphagnum* Spp. *New Phytol*:325–332
54. Lamers LPM, Farhoush C, van Groenendael JM et al. (1999) Calcareous groundwater raises bogs; the concept of ombrotrophy revisited. *Journal of Ecology* 87:639–648. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.1999.00380.x>
55. Yavitt JB, Williams CJ, Wieder RK (1997) Production of methane and carbon dioxide in peatland ecosystems across North America: Effects of temperature, aeration, and organic chemistry of peat. *Geomicrobiology Journal* 14:299–316. <https://doi.org/10.1080/01490459709378054>
56. Laine AM, Juurola E, Hájek T et al. (2011) Sphagnum growth and ecophysiology during mire succession. *Oecologia* 167:1115–1125. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2039-4>
57. Hintikka V (1972) Variation in gametophyte morphology of *Sphagnum fallax* in aseptic culture. *Annales Botanici Fennici*:91–96
58. Frahm J-P (2018) *Biologie der Moose*. Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin
59. Boenigk J (2021) *Boenigk, Biologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
60. Daniels RE, Eddy A (1985) *Handbook of European Sphagna*. Institute of Terrestrial Ecology, Abbots Ripton, Huntingdon
61. BAKER RGE (1985) The effect of carbon dioxide on the growth and vegetative reproduction of *Sphagnum cuspidatum*. *Journal of bryology*:399–406
62. Shaw AJ, Schmutz J, Devos N et al. (2016) The Sphagnum Genome Project. In: A.J. Shaw (ed) *Genomes and Evolution of Charophytes, Bryophytes, Lycophytes and Ferns*, vol 78. Elsevier, pp 167–187
63. Püstjervi (1958) ON THE CATION UPTAKE MECHANISM OF SPHAGNUM MOSSES. *Mautaloust Aikakausk*
64. Frahm J-P (2012) Zum Bau und histologischen Terminologie von Laubmoosstämmchen. *Archive for Bryology*
65. Berg C (1995) *Moose Mecklenburg-Vorpommerns VII: Bestimmungshilfe zum Einarbeiten in die Gattung Sphagnum (Torfmoose)*. *Natur und Naturschutz in Mecklenburg-Vorpommern*
66. Bruno Ortner (2018) *Das Torfmoos (Sphagnum)-Ein Baumeister ganzer Landschaft*. [https://www.mgw.or.at/private/arbeitsgebiete/botanik/torfmoos\\_ortner.htm](https://www.mgw.or.at/private/arbeitsgebiete/botanik/torfmoos_ortner.htm). Accessed 01 Sep 2021
67. Temsch E (2021) *Sphagnum*. <https://homepage.univie.ac.at/eva.temsch/>
68. Jauhiainen J (1999) Photosynthesis of *Sphagnum fuscum* at long-term raised CO<sub>2</sub> concentrations. *Annales Botanici Fennici*:11–19
69. Hanson DT, Rice SK (2014) *Photosynthesis in Bryophytes and Early Land Plants*, vol 37. Springer Netherlands, Dordrecht
70. Clymo RS (1970) The Growth of Sphagnum: Methods of Measurement. *Journal of Ecology*:13–49
71. Rice SK (1995) Patterns of allocation and growth in aquatic Sphagnum species. *Canadian Journal of Botany*:349–359
72. PROCTOR MCF (1982) *Physiological Ecology: Water Relations, Light and Temperature Responses, Carbon Balance*. In: Smith AJE (ed) *Bryophyte Ecology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 333–381
73. Clymo RS, Hayward PM (1982) *The Ecology of Sphagnum*. In: Smith AJE (ed) *Bryophyte Ecology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 229–289
74. Aletsee L, Anker L, Baillaud L et al. (1962) *Physiology of Movements / Physiologie der Bewegungen: Part 2: Movements due to the Effects of Temperature, Gravity, Chemical Factors and Internal Factors / Teil2: Bewegungen durch Einflüsse der Temperatur, Schwerkraft, Chemischer Faktoren und aus Inneren Ursachen*. *Encyclopedia of Plant Physiology / Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 17/2. Springer, Berlin, Heidelberg

75. Braun M, Böhmer M, Häder DP et al. (2018) *Gravitational Biology I: Gravity Sensing and Graviorientation in Microorganisms and Plants*. SpringerLink Bücher. Springer International Publishing, Cham
76. Schopfer P, Brennicke A (2010) *Pflanzenphysiologie*, 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
77. Czihak G, Langer H, Ziegler H (1996) *Biologie: Ein Lehrbuch*, Sechste unveränderte Auflage. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg
78. Cronberg N (1991) Reproductive biology of Sphagnum. *LINDBERGIA*:69–82
79. Sobotka D (1976) Regeneration and vegetative propagation of Sphagnum palustre as factor of population stability. *Acta Soc Bot Pol*
80. Haraguchi A (1996) Effect of pH on photosynthesis of five Sphagnum species in mires in Ochiishi, northern Japan. *Wetlands* 16:10–14. <https://doi.org/10.1007/BF03160641>
81. Y. Li, J. M. Glime, C. Liao (1992) Responses of two interacting Sphagnum species to water level. *Journal of Bryology*:59–70
82. Rice SK (1995) On the Ecological and Evolutionary Significance of Branch and Leaf Morphology in Aquatic Sphagnum (Sphagnaceae). *American Journal of Botany* 82
83. Titus JE, Wagner DJ (1984) Carbon Balance for Two Sphagnum Mosses: Water Balance Resolves a Physiological Paradox. *Ecology* 65:1765–1774
84. van Gaalen KE, Flanagan LB, Peddle DR (2007) Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and spectral reflectance in Sphagnum moss at varying water contents. *Oecologia* 153:19–28. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0718-y>
85. Taskila S, Särkelä R, Tanskanen J (2016) Valuable applications for peat moss. *Biomass Conv Bioref* 6:115–126. <https://doi.org/10.1007/s13399-015-0169-3>
86. Krebs M (2016) Record growth of Sphagnum papillosum in Georgia (Transcaucasus): rain frequency, temperature and microhabitat as key drivers in natural bogs. *Mires and Peat*:1–16
87. Gunnarsson U (2005) Global patterns of Sphagnum productivity. *Journal of Bryology* 27:269–279. <https://doi.org/10.1179/174328205X70029>
88. Dickson JH, Hofbauer W, Porley R et al. (2009) Six mosses from the Tyrolean Iceman's alimentary tract and their significance for his ethnobotany and the events of his last days. *Veget Hist Archaeobot* 18:13–22. <https://doi.org/10.1007/s00334-007-0141-7>
89. Ares A, Aboal JR, Carballeira A et al. (2012) Moss bag biomonitoring: a methodological review. *Sci Total Environ* 432:143–158. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.087>
90. Decker EL, Reski R (2008) Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess Biosyst Eng* 31:3–9. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0151-y>
91. Wichmann S (2020) Establishing Sphagnum cultures on bog grassland, cut-over bogs and floating mats procedures, costs. *Mires and Peat*
92. Sphagnum Shop (2021) *Lebendes Sphagnum Moos*. <https://www.sphagnum-shop.com/de/Lebendes-Sphagnum-Moos/>. Accessed 11 Aug 2021
93. Gaudig G, Krebs M, Joosten H (2020) Sphagnum growth under N saturation: interactive effects of water level and P or K fertilization. *Plant Biol (Stuttg)* 22:394–403. <https://doi.org/10.1111/plb.13092>
94. Joosten H (2010) *Torfmooskultivierung auf schwimmfähigen Vegetationsträgern für ein nachhaltiges und umweltfreundliches Torfsubstitut im Erwerbegartenbau-MOOSFRARM: Schlussbericht*
95. Günther A (2017) Greenhouse gas balance of an establishing Sphagnum culture on a former bog grassland in Germany. *Mires and Peat*:1–16
96. Bonn A (2014) *KLIMASCHUTZ DURCH WIEDERVERNÄSSUNG VON KOHLENSTOFFREICHEN BÖDEN: Moore und kohlenstoffreiche Böden: Wiedervernässung als Klimaschutzinvestition*.
97. Emmel M (2008) GROWING ORNAMENTAL PLANTS IN SPHAGNUM BIOMASS. *Acta Horti*:173–178. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.779.20>
98. Sundberg S (2000) The ecological significance of sexual reproduction in peat mosses (Sphagnum). 2000, vol 2000
99. Sundberg S, RYDIN H (2000) Experimental evidence for a persistent spore bank in Sphagnum. *New Phytol* 148:105–116. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00746.x>
100. Zhao W, Li Z, Hu Y et al. (2019) Development of a method for protonema proliferation of peat moss (Sphagnum squarrosum) through regeneration analysis. *New Phytol* 221:1160–1171. <https://doi.org/10.1111/nph.15394>

- 
101. Cerff M, Posten C (2012) Enhancing the growth of *Physcomitrella patens* by combination of monochromatic red and blue light - a kinetic study. *Biotechnol J* 7:527–536. <https://doi.org/10.1002/biot.201100044>
  102. Decker EL, Reski R (2020) Mosses in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 61:21–27. <https://doi.org/10.1016/j.cop-bio.2019.09.021>
  103. Hohe A, Decker E, Gorr G et al. (2002) Tight control of growth and cell differentiation in photoautotrophically growing moss (*Physcomitrella patens*) bioreactor cultures. *Plant Cell Rep* 20:1135–1140. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0463-y>
  104. Bold HC (1948) The Prothallium of *Sphagnum palustre* L. *Thy Bryologist* 51:55–63
  105. Gaudig G (2018) Zwischenbericht - MOOSzucht: Ergebnisse und Stand des Vorhabens. 15.05.2017-30.04.2018
  106. Reutter K (1998) Expression of the bacterial *ipt* gene in *Physcomitrella* rescues mutations in budding and in plastid division. *Planta* 206:196–203
  107. Poschlod, P. & Pfadenhauer, J. Regeneration of vegetative parts of peat mosses—a comparative study of nine *Sphagnum* species. In: *Telma*, vol 19, pp 77–88
  108. Gaudig G (2020) Zwischenbericht - MOOSzucht: Ergebnisse und Stand des Vorhabens. 01.05.2019-30.04.2020
  109. SIMOLA LK (1969) The Effect of Various Mono—and Disaccharides on the Growth of *Sphagnum nemoreum* Thalli in Sterile Cultures. *Physiol Plant*:1079–1084
  110. Chmiel H, Takors R, Weuster-Botz D (eds) (2018) *Bioprozesstechnik*, 4. Auflage. Springer Spektrum, Berlin
  111. Posten C *Integrated Bioprocess Engineering*. In: *EBOOK PACKAGE Physics, Chemistry, Materials Sc, Geosc 2018 : EBOOK PACKAGE COMPLETE 2018 English : EBOOK PACKAGE Physics, Chem., Mat.Sc, Geosc 2018 English : EBOOK PACKAGE COMPLETE 2018*. De Gruyter, Berlin, Boston
  112. Paffen BGP, Roelofs JGM (1991) Impact of carbon dioxide and ammonium on the growth of submerged *Sphagnum cuspidatum*. *Aquatic Botany* 40:61–71. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(91\)90074-F](https://doi.org/10.1016/0304-3770(91)90074-F)
  113. Bopp M, Brandes H (1964) Versuche zur Analyse der Protonemaentwicklung der Laubmoose. *Planta*:116–136
  114. Reski R, Abel WO (1985) Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopenentenyladenine. *Planta* 165:354–358. <https://doi.org/10.1007/BF00392232>
  115. Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*:473–497
  116. Schween G, Hohe A, Koprivova A et al. (2003) Effects of nutrients, cell density and culture techniques on protoplast regeneration and early protonema development in a moss, *Physcomitrella patens*. *J Plant Physiol* 160:209–212. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00855>
  117. Menkel F (1992) *Einführung in die Technik von Bioreaktoren*. Oldenbourg, München
  118. Posten C (2018) *Integrated bioprocess engineering*. De Gruyter Textbook. De Gruyter, Berlin, Boston
  119. Perner-Nochta I, Lucumi A, Posten C (2007) Photoautotrophic Cell and Tissue Culture in a Tubular Photobioreactor. *Eng Life Sci* 7:127–135. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620178>
  120. Lucumi A, Posten C (2006) Establishment of long-term perfusion cultures of recombinant moss in a pilot tubular photobioreactor. *Process Biochemistry* 41:2180–2187. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.017>
  121. Lucumi Hernandez SA (2008) *Prozesstechnische Optimierung des Molecular Farming glykosylierter Proteine in Photo-Bioreaktoren mit dem Moos Physcomitrella patens*. Dissertation, Universität Karlsruhe
  122. Hohe A, Reski R (2005) Control of growth and differentiation of bioreactor cultures of *Physcomitrella* by environmental parameters. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81:307–311. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6656-z>
  123. Asenjo JA (ed) (1995) *Bioreactor system design*. *Bioprocess technology*, vol 21. Dekker, New York
  124. Eibl R, Werner S, Eibl D (2009) Bag bioreactor based on wave-induced motion: characteristics and applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 115:55–87. [https://doi.org/10.1007/10\\_2008\\_15](https://doi.org/10.1007/10_2008_15)
  125. Wright BeadaMoos ppx
  126. Bauer T, Haase S, Lange R (2009) Konzeptstudie: Strukturierter Rieselbettreaktor. *Chemie Ingenieur Technik* 81:989–994. <https://doi.org/10.1002/cite.200900038>
  127. Reineke W, Schlömann M (2020) *Umweltmikrobiologie*, 3. Aufl. 2020. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
  128. Lu H, Jiang X (2014) Structure and properties of bacterial cellulose produced using a trickling bed reactor. *Appl Biochem Biotechnol* 172:3844–3861. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0795-4>

- 
129. Lu Y, Knol JC, Linskens MHK et al. (2004) Cultivation of immobilized *Dictyostelium discoideum* for the production of soluble human Fas ligand. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:547–552. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1620-8>
  130. Rudolph H (1968) Gaswechselfmessungen an *Sphagnum magellanicum*. *Plant anal.*:35–43
  131. HARRIS A, BRYANT R, BAIRD A (2005) Detecting near-surface moisture stress in spp. *Remote Sensing of Environment* 97:371–381. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2005.05.001>
  132. Rudolph H (1977) Veränderung des Chloroplastenpigment-Spiegels bei *Sphagnum magellanicum* im Verlauf der Synthese von Sphagnorubin und anderer membranochromer Pigmente. *Pflanzenphysiologie*:107–116
  133. Marschall M (2002) Metabolic activity of *Sphagnum recurvum* under different environmental conditions. *Acta Biol Hung*:247–248
  134. Lembrechts JFM, O. L. J. Vanderborcht (1985) (1985) Mineral Content of *Sphagnum* Mosses in Belgian Bog Ecosystems. *J. Environ. Qual.* 14:217–224
  135. van der Heijden E, Jauhiainen J, Silvola J et al. (2000) Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration and increased nitrogen deposition on growth and chemical composition of ombrotrophic *Sphagnum balticum* and oligomesotrophic *Sphagnum papillosum*. *Journal of Bryology* 22:175–182. <https://doi.org/10.1179/jbr.2000.22.3.175>
  136. Jauhiainen J (1998) The effects of increased nitrogen deposition and CO<sub>2</sub> on *Sphagnum angustifolium* and *S. warnstorffii*. *Annales Botanici Fennici*:247–256
  137. Wright N Rapid&Reliable Restoration of *Sphagnum* using Micropropagated *Sphagnum* as BeadaHummo<sup>ZM</sup>, Rotterdam
  138. Petersen K (1984) Untersuchung zru Photosynthese und Photorespiration bei *Sphagnum magellanicum* BRID, Kiel
  139. Rice SK, Aclander L, Hanson DT (2008) Do bryophyte shoot systems function like vascular plant leaves or canopies? Functional trait relationships in *Sphagnum* mosses (Sphagnaceae). *American Journal of Botany* 95:1366–1374. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800019>
  140. BAXTER R (1992) Effects of an experimentally applied increase in ammonium on growth and amino-acid metabolism of *Sphagnum cuspidatum* Ehrh. ex. Hoffm. from differently polluted areas. *New Phytol*:265–274
  141. Fritz C, Lamers LPM, Riaz M et al. (2014) *Sphagnum* mosses--masters of efficient N-uptake while avoiding intoxication. *PLoS ONE* 9:e79991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079991>
  142. Gaudig G (2019) Zwischenbericht - MOOSzucht: Ergebnisse und Stand des Vorhabens. 01.05.2018-30.04.2019
  143. Håkan Rydin (1993) Interspecific Competition between *Sphagnum* Mosses on a Raised Bog. *OIKOS* 66:412–423
  144. Di Palma A, Crespo Pardo D, Spagnuolo V et al. (2016) Molecular and chemical characterization of a *Sphagnum palustre* clone: Key steps towards a standardized and sustainable moss bag technique. *Ecological Indicators* 71:388–397. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.06.044>
  145. Temmink RJM, Fritz C, van Dijk G et al. (2017) *Sphagnum* farming in a eutrophic world: The importance of optimal nutrient stoichiometry. *Ecological Engineering* 98:196–205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.10.069>
  146. Vingiani S, Adamo P, Giordano S (2004) Sulphur, nitrogen and carbon content of *Sphagnum capillifolium* and *Pseudevernia furfuracea* exposed in bags in the Naples urban area. *Environ Pollut* 129:145–158. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.016>
  147. W. S. G. Maass, J. S. Craigie (1964) EXAMINATION OF SOME SOLUBLE CONSTITUENTS OF SPHAGNUM GAMETOPHYTES. *Canadian Journal of Botany*:805–814
  148. Harley PC, Tenhunen JD, Murray KJ et al. (1989) Irradiance and temperature effects on photosynthesis of tussock tundra *Sphagnum* mosses from the foothills of the Philip Smith Mountains, Alaska. *Oecologia* 79:251–259. <https://doi.org/10.1007/BF00388485>
  149. Zhu X, Nimmo V, Wu J et al. (2019) *Sphagnum* outcompetes feathermosses in their photosynthetic adaptation to postharvest black spruce forests. *Botany* 97:585–597. <https://doi.org/10.1139/cjb-2019-0076>
  150. O. Skre and W.C. Oechel (1981) Moss functioning in different taiga ecosystems in interior Alaska: Seasonal, Phenotypic, and Drought Effects on Photosynthesis and Response Patterns. *Oecologia*:50–59
  151. Titus JE (1986) Water Relations of Photosynthesis for Two *Sphagnum* Mosses. *Ecology* 5:1109–1115
  152. McNeil P. and Waddington J.M. (2003) Moisture controls on *Sphagnum* growth and CO<sub>2</sub> exchange on a cutover bog. *Journal of Applied Ecology*:354–367
  153. Mironov VL, Kondratev AY, Shkurko AV (2018) Growth of *Sphagnum riparium* is strongly rhythmic: Contribution of the seasonal, circalunar and third rhythmic components



- 
154. Mironov VL, Kondratev AY (2017) Peat moss *Sphagnum riparium* follows a circatrigintan growth rhythm in situ: A case report. *Chronobiol Int* 34:981–984. <https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1329208>
  155. Wichmann S (2017/2018) Westablishing *Sphagnum* cultures on bog grassland, cut-over bogs, and floating mats: procedures, costs and area potential in Germany. *Mires and Peat*:1–19
  156. Pouliot R, Hugron S, Rochefort L (2015) *Sphagnum* farming: A long-term study on producing peat moss biomass sustainably. *Ecological Engineering* 74:135–147. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.10.007>
  157. Stafelt MG (1973) DER GASAUSTAUSCH DER MOOSE. *Plant anal.*:30–60
  158. Häder D-P, Betz M (eds) (1999) *Photosynthese: 17 Tabellen*. Thieme, Stuttgart
  159. Weston DJ, Timm CM, Walker AP et al. (2015) *Sphagnum* physiology in the context of changing climate: emergent influences of genomics, modelling and host-microbiome interactions on understanding ecosystem function. *Plant Cell Environ* 38:1737–1751. <https://doi.org/10.1111/pce.12458>
  160. Buck WR, McQueen CB (1990) Field Guide to the Peat Mosses of Boreal North America. *Brittonia* 42:291. <https://doi.org/10.2307/2806820>
  161. Williams TG (1996) Effect of changes in water content on photosynthesis, transpiration and discrimination against  $^{13}\text{C}$  and  $\text{C}_{18}\text{O}_{16}\text{OH}$  in *Pleurozium* and *Sphagnum*. *Oecologia*:38–46
  162. Renato Gerdol (1994) The Vertical Pattern of Pigment Concentrations in Chloroplasts of *Sphagnum capillifolium*. *The Bryologist* 97
  163. Schmidt-Stohn G (1977) Änderungen der plastidenpigmente bei *Sphagnum magellanicum* Brid. in abhängigkeit von standort, verfärbungsgrad und alter. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 81:289–303. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(77\)80095-0](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(77)80095-0)
  164. Rudolph H (1965) Zur Frage der Membranochromie bei Sphagnen: Der Versuch einer Charakterisierung chromatographisch rein dargestellter Kardinalpigmenten. *Plant anal.*:178–185
  165. Uenaka H, Wada M, Kadota A (2005) Four distinct photoreceptors contribute to light-induced side branch formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 222:623–631. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0009-y>
  166. Rydin H, Jeglum JK (2013) *The biology of peatlands*, Second edition. *Biology of habitats*. Oxford University Press Oxford, Oxford, UK
  167. Haraguchi A, Yamada N (2011) Temperature Dependency of Photosynthesis of *Sphagnum* spp. Distributed in the Warm-Temperate and the Cool-Temperate Mires of Japan. *AJPS* 02:716–725. <https://doi.org/10.4236/ajps.2011.25086>
  168. Lüttge U, Kluge M, Bauer G (2005) *Botanik*, 5., vollst. überarb. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim
  169. Murray KJ (1993) Photoinhibition as a control on photosynthesis and production of *Sphagnum* mosses. *Oecologia*:200–207
  170. Raghoebarsing AA, Smolders AJP, Schmid MC et al. (2005) Methanotrophic symbionts provide carbon for photosynthesis in peat bogs. *Nature* 436:1153–1156. <https://doi.org/10.1038/nature03802>
  171. Silvola J (1990) Combined Effects of Varying Water Content and  $\text{CO}_2$  Concentration on Photosynthesis in *Sphagnum fuscum*. *Holarctic ecology*:224–228
  172. Raven JA (1970) EXOGENOUS INORGANIC CARBON SOURCES IN PLANT PHOTOSYNTHESIS. *Bio. Rev.*:167–221
  173. Schediwy K, Trautmann A, Steinweg C et al. (2019) Microalgal kinetics - a guideline for photobioreactor design and process development. *Eng Life Sci* 19:830–843. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900107>
  174. Brehm K (1971) Ein *Sphagnum*-Bult als Beispiel einer natürlichen Ionenaustauschersäule. *Biol. Pflanz.*:287–312
  175. Brehm K. (1968) Die Bedeutung des Kationenaustausches für den Kationengehalt lebender Sphagnen. *Planta*:324–345
  176. Breuer K, Melzer A (1990) Heavy metal accumulation (lead and cadmium) and ion exchange in three species of *Sphagnaceae*. *Oecologia*:461–467
  177. Clymo R.S. (1963) Ion Exchange in *Sphagnum* and its Reation to Bog Ecology. *Annals of Botany*:309–324
  178. Rudolph H (1965) Kationenaufnahme durch Ionenaustausch? Neue Gesichtspunkte zur Frage der Ernährungsphysiologie der Sphagnen, Bonn
  179. Sherson SM, Alford HL, Forbes SM et al. (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 54:525–531. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg055>

- 
180. Johnson DA, Hill JP, Thomas MA (2006) The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. *BMC Evol Biol* 6:64. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-64>
181. Reinders A, Sivitz AB, Ward JM (2012) Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Front Plant Sci* 3:22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00022>
182. Marschall M (1998) Carbohydrate Composition and Invertase Activity of the Leafy Liverwort *Porella platyphylla*. *New Phytol*
183. BAKER RGE, BOATMAN DJ (1990) Some effects of nitrogen, phosphorus, potassium and carbon dioxide concentration on the morphology and vegetative reproduction of *Sphagnum cuspidatum*. *New Phytol* 116:605–611. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00545.x>
184. Gabriel A (1983) Ammonium-Assimilation und Metabolismus der freien Aminosäuren bei *Sphagnum magellanicum* brid, Christian-Albert-Universität
185. J. JAUHAINEN BW&E, N NM (1998) Potential  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  uptake in seven *Sphagnum* species. *New Phytol*:287–293
186. Basilier K (1979) Moss-Associated Nitrogen Fixation in Some Mire and Coniferous Forest Environments around Uppsala, Sweden. *OIKOS*:84–88
187. Kostka JE, Weston DJ, Glass JB et al. (2016) The *Sphagnum* microbiome: new insights from an ancient plant lineage. *New Phytol* 211:57–64. <https://doi.org/10.1111/nph.13993>
188. Weston DJ (2018) The Sphagnum Project: enabling ecological and evolutionary insights through a genus-level sequencing project: Forum. *New Phytol*:16–25
189. Berg A (2013) Transfer of fixed-N from  $\text{N}_2$ -fixing cyanobacteria associated with the moss *Sphagnum riparium* results in enhanced growth of the moss. *Plant and Soil*. 362:271–278
190. Deising H (1988) NAD(P)H-nitrate Reductase from *Sphagnum* Species- A Comparative Characterization. *Annals of Botany*:659–667
191. Rudolph H (1993) Nitrogen metabolism of *Sphagnum*. *Advances in Bryology*:79–105
192. Givan CV (1979) Metabolic Detoxification of Ammonia in Tissues of Higher Plants: Review. *Phytochemistry*:375–382
193. Lea PJ, Fowden L (1975) Asparagine Metabolism in Higher Plants. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 168:3–14. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30097-5](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30097-5)
194. Gunnarsson U, Rydin H (2000) Nitrogen fertilization reduces *Sphagnum* production in bog communities. *New Phytologist* 147:527–537. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00717.x>
195. Palmer CM, Gueriot ML (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol* 5:333–340. <https://doi.org/10.1038/nchembio.166>
196. Marschner H, Marschner P (eds) (2012) Marschner's Mineral nutrition of higher plants, 3. ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam
197. Raven JA (1988) The iron and molybdenum use efficiencies of plant growth with different energy, carbon and nitrogen sources. *New Phytol*:279–287
198. Smith AM (2010) *Plant biology*. Garland Science, New York, NY
199. Eide D (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeas. *Biochemistry*:5624–5628
200. Khan A, Singh P, Srivastava A (2018) Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. *Microbiol Res* 212-213:103–111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
201. Briat J-F, Duc C, Ravet K et al. (2010) Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta* 1800:806–814. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.12.003>
202. Kadereit JW, Körner C, Nick P et al. (2021) *Strasburger – Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
203. Limpens J, Berendse F, Klees H (2004) How Phosphorus Availability Affects the Impact of Nitrogen Deposition on *Sphagnum* and Vascular Plants in Bogs. *Ecosystems* 7:793–804. <https://doi.org/10.1007/s10021-004-0274-9>

- 
204. Bragazza L, Tahvanainen T, Kutnar L et al. (2004) Nutritional constraints in ombrotrophic Sphagnum plants under increasing atmospheric nitrogen deposition in Europe. *New Phytol* 163:609–616. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01154.x>
  205. Aerts R (1992) Growth-Limiting Nutrients in Sphagnum-Dominated Bogs Subject to Low and High Atmospheric Nitrogen Supply. *Journal of Ecology* 80:131–140
  206. Fritz C, van Dijk G, Smolders AJP et al. (2012) Nutrient additions in pristine Patagonian Sphagnum bog vegetation: can phosphorus addition alleviate (the effects of) increased nitrogen loads. *Plant Biol (Stuttg)* 14:491–499. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00527.x>
  207. Conn SJ, Gilliham M, Athman A et al. (2011) Cell-specific vacuolar calcium storage mediated by CAX1 regulates apoplastic calcium concentration, gas exchange, and plant productivity in Arabidopsis. *Plant Cell* 23:240–257. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072769>
  208. Garcíadeblas B, Benito B, Rodríguez-Navarro A (2001) Plant cells express several stress calcium ATPases but apparently no sodium ATPase. *Plant Soil* 235:181–192. <https://doi.org/10.1023/A:1011949626191>
  209. Pittman JK, Shigaki T, Hirschi KD (2005) Evidence of differential pH regulation of the Arabidopsis vacuolar Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters CAX1 and CAX2. *FEBS Lett* 579:2648–2656. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.085>
  210. Dolgy D (2019) Untersuchung des Einflusses verschiedener Stickstoffquellen auf das Wachstum von Sphagnum palustre. Bachelorarbeit, Karlsruher Institut für Technologie
  211. Möller C (2018) Development of new methods for the estimation of peat moss biomass during laboratory. Bachelor Thesis, Karlsruher Institut für Technologie
  212. Trautmann A (2018) Prozessstrategien zur Beeinflussung der makromolekularen Zellzusammensetzung photoautotropher Mikroorganismen bei Kultivierungen im Labor- und Pilotmaßstab. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie
  213. Hubber S Size-exclusion chromatography with organic carbon detection (LC-OCD): a fast and reliable method for the characterization of hydrophilic organic matter in natural waters. *Vom Wasser* 86:277–290
  214. Williams TG (1998) Measuring and modelling environmental influences on photosynthetic gas exchange in Sphagnum and Pleurozium. *Plant Cell Physiol*:555–564
  215. Barber J (1967) Measurement of the Membrane Potential and Evidence for Active Transport of Ions in Chlorella pyrenoidosa. *Biochemica et Biophysica Acta*:618–625
  216. J. A. Raven, F. A. Smith (1974) Significance of hydrogen ion transport in plant cells. *Canadian Journal of Botany*:1035–1974
  217. Scherholz ML, Curtis WR (2013) Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. *BMC Biotechnology*:1–15
  218. Tam NFY, Wong YS (1996) Effect of Ammonia Concentration on Growth of Chlorella vulgaris and Nitrogen Removal from Media. *Bioresource Technology*:45–50
  219. Przytocka-Jusiak M, Mlynarczyk A, Kulesza M et al. (1977) Properties of Chlorella vulgaris strain adapted to high concentration of ammonium nitrogen. *Acta Microbiol Pol* 26:185–197
  220. Christensen ML (2002) Growth and proton exchange in recombinant Escherichia coli BL21. *Enzyme and Microbial Technology*:566–574
  221. Kirkby EA (1968) Influence of Ammonium and Nitrate Nutrition on the Cation-Anion Balance and Nitrogen and Carbohydrate Metabolism of White Mustard Plants Grown in Dilute Nutrient Solution. *Soil science*:133–141
  222. Raven JA (1976) Nitrogen Assimilation and Transport in Vascular Land Plants in Relation to Intracellular pH Regulation. *New Phytol*:415-131
  223. Chiwa M, Sheppard LJ, Leith ID et al. (2016) Sphagnum can 'filter' N deposition, but effects on the plant and pore water depend on the N form. *Sci Total Environ* 559:113–120. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.130>
  224. Jacobi, Anna (2012) Optimierung der Lichtverteilung in Photobioreaktoren – Potentiale „Antennen-reduzierter“ Mikroalgen-Mutanten als biologischer Ansatz und transparenter Schwammstrukturen als technisches Konzept, Karlsruher Institut für Technologie
  225. Fuchs G (ed) (2017) Allgemeine Mikrobiologie, 10., unveränderte Auflage. Thieme eRef. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

- 
226. Yu Q, Kandegedara A, Xu Y et al. (1997) Avoiding interferences from Good's buffers: A contiguous series of non-complexing tertiary amine buffers covering the entire range of pH 3–11. *Anal Biochem* 253:50–56. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2349>
227. Khalili F, Henni A, East ALL (2009) pKa Values of Some Piperazines at (298, 303, 313, and 323) K. *J Chem Eng Data* 54:2914–2917. <https://doi.org/10.1021/je900005c>
228. Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000) *Brock biology of microorganisms*, 9. ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ
229. Cerff M (2012) In situ product recovery of extracellular proteins: An integrated approach between cell physiology, bioreaction and magnetic separation. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie
230. Wei (2012) Membrane Fouling Potential of Secondary Effluent Organic Matter (EfOM) from Conventional Activated Sludge Process. *J Memb Separ Tech*. <https://doi.org/10.6000/1929-6037.2012.01.02.7>
231. Rasmussen S (1995) Compartmentalization of Phenolic Constituents in Sphagnum. *Phytochemistry*:35–39
232. Rasmussen S (1995) Regulation of phenylpropanoid metabolism by exogenous precursors in axenic cultures of *Sphagnum fallax*. *Physiol Plant*:83–90
233. Verhoeven JTA, Liefveld WM (1997) The ecological significance of organochemical compounds in Sphagnum. *Acta Botanica Neerlandica*:117–130
234. Wilschke J (1989) A Hydroxybutenolide from Sphagnum species. *Phytochemistry*:1725–1727
235. Marschner H, Römheld V (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil*:261–274
236. Victoria FdC, Bervald CMP, da Maia LC et al. (2012) Phylogenetic relationships and selective pressure on gene families related to iron homeostasis in land plants. *Genome* 55:883–900. <https://doi.org/10.1139/gen-2012-0064>
237. Zanin L, Tomasi N, Cesco S et al. (2019) Humic Substances Contribute to Plant Iron Nutrition Acting as Chelators and Biostimulants. *Front Plant Sci* 10:675. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00675>
238. Spratt AK, Wieder RK (eds) (1988) *Growth Responses and Iron Uptake in Sphagnum Plants and Their Relation to Acid Mine Drainage Treatment*
239. Terfa MT, Solhaug KA, Gislerød HR et al. (2013) A high proportion of blue light increases the photosynthesis capacity and leaf formation rate of *Rosa × hybrida* but does not affect time to flower opening. *Physiol Plant* 148:146–159. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01698.x>
240. Mark Fresewinkel Effizienzsteigerung mikroalgenbasierter Energiegewinnung durch Prozessintegration – Prozessauslegung und Modellierung der Glycolatproduktion und Konstruktion eines Biofilmreaktors. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie
241. Heijmans MMPD (2001) Effects of elevated carbon dioxide and increased nitrogen deposition on bog vegetation in the Netherlands. *Journal of Ecology*:268–279
242. Roelofs JGM (1983) Impact of acidification and eutrophication on macrophyte communities in soft waters in the Netherlands. *Aquatic Botany*:139–155
243. Lamers LPM, Bobbink R, Roelofs JGM (2000) Natural nitrogen filter fails in polluted raised bogs. *Global Change Biol* 6:583–586. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2000.00342.x>
244. Granath G, Wiedermann MM, Strengbom J (2009) Physiological responses to nitrogen and sulphur addition and raised temperature in *Sphagnum balticum*. *Oecologia* 161:481–490. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1406-x>
245. Marschall M (2010) Photosynthetic responses, carbohydrate composition and invertase activity in fructan accumulating bryophytes (*Porella platyphylla* and *Sphagnum flexuosum*) under different environmental conditions (carbohydrate treatments, dark starvation, low temperature, desiccation). *Acta Biol Hung* 61 Suppl:120–129. <https://doi.org/10.1556/ABiol.61.2010.Suppl.12>
246. Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H (1999) Chlorophyll degradation. *Annu. Rev. Plant Physiolg. Plant Mol. Biolg*:67–95
247. Hillman WS (1956) Injury of Tomato Plants by Continuous Light and Unfavorable Photoperiodic Cycles. *American Journal of Botany* 43:89. <https://doi.org/10.2307/2438816>
248. Hegnauer R (1986) *Chemotaxonomie der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe*. Chemische Reihe, vol 22. Birkhäuser Basel, Basel, s.l.

- 
249. Aoki S, Kato S, Ichikawa K et al. (2004) Circadian expression of the PpLhcb2 gene encoding a major light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol* 45:68–76. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch006>
250. Ichikawa K, Sugita M, Imaizumi T et al. (2004) Differential expression on a daily basis of plastid sigma factor genes from the moss *Physcomitrella patens*. Regulatory interactions among PpSig5, the circadian clock, and blue light signaling mediated by cryptochromes. *Plant Physiol* 136:4285–4298. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053033>
251. Dijkshoorn (1962) Metabolic regulation of the alkaline effect of nitrat utilization in plants:165–166
252. Limpens J, Berendse F (2003) Growth reduction of *Sphagnum magellanicum* subjected to high nitrogen deposition: the role of amino acid nitrogen concentration. *Oecologia* 135:339–345. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1224-5>
253. PRESS MC (1982) Nitrate Reductase Activity of *Sphagnum* Species in the South Pennines. *New Phytol*:487–494
254. Saxena A (2006) Seasonal pattern of metal bioaccumulation and their toxicity on *Sphagnum squarrosum*. *Journal of Environmental Biology*:71–75
255. Woodin SJ (1985) NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN *SPHAGNUM FUSCUM* IN RELATION TO WET DEPOSITION OF NITRATE FROM THE ATMOSPHERE. *New Phytol*:381–388
256. Nordin A (2000) Amino acid accumulation and growth of *Sphagnum* under different levels of N deposition. *Ecoscience*:474–480
257. Spearing AM (1972) Cation-Exchange Capacity and Galacturonic Acid Content of Several Species of *Sphagnum* in Sandy Ridge Bog, Central New York State. *The Bryologist*:154–158
258. Allgemeine Info MakroloDatenblatt
259. Rout GR, Das P (2009) Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc. In: Lichtfouse E, Navarrete M, Debaeke P et al. (eds) *Sustainable Agriculture*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 873–884
260. Hayward PM, Clymo RS (1971) The Growth of *Sphagnum*: Experiments on, and Simulation of, Some Effects of Light Flux and Water-Table Depth. *Journal of Ecology* 1983:845–863
261. Jenkins GI, Courtice GR, Cove DJ (1986) Gravitropic responses of wild-type and mutant strains of the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Environ* 9:637–644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1986.tb01621.x>
262. Rastogi A, Antala M, Gąbka M et al. (2020) Impact of warming and reduced precipitation on morphology and chlorophyll concentration in peat mosses (*Sphagnum angustifolium* and *S. fallax*). *Sci Rep* 10:8592. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65032-x>
263. Marschall M, Proctor MCF (2004) Are bryophytes shade plants? Photosynthetic light responses and proportions of chlorophyll a, chlorophyll b and total carotenoids. *Annals of Botany* 94:593–603. <https://doi.org/10.1093/aob/mch178>
264. Aldous AR (2002) Nitrogen translocation in *Sphagnum* mosses: effects of atmospheric nitrogen deposition. *New Phytol*:241–253
265. Puskeiler R, Kaufmann K, Weuster-Botz D (2005) Development, parallelization, and automation of a gas-inducing milliliter-scale bioreactor for high-throughput bioprocess design (HTBD). *Biotechnol Bioeng* 89:512–523. <https://doi.org/10.1002/bit.20352>
266. Pavlov A, Bley T (eds) (2018) *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*. Reference Series in Phytochemistry. Springer International Publishing, Cham
267. Bergmann P, Trösch W (2016) Repeated fed-batch cultivation of *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 in flat-panel airlift photobioreactors with static mixers for improved light utilization: Influence of nitrate, carbon supply and photobioreactor design. *Algal Research* 17:79–86. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.040>
268. Krachler R, Krachler RF, Wallner G et al. (2016) *Sphagnum*-dominated bog systems are highly effective yet variable sources of bio-available iron to marine waters. *Sci Total Environ* 556:53–62. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.012>
269. Glatzel S, Kalbitz K, Dalva M et al. (2003) Dissolved organic matter properties and their relationship to carbon dioxide efflux from restored peat bogs. *Geoderma* 113:397–411. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(02\)00372-5](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00372-5)
270. Pinton R, Cesco S, Varanini Z (2009) Role of Humic Substances in the Rhizosphere. In: Senesi N, Xing B, Huang PM (eds) *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp 341–366

- 
271. Calvo P, Nelson L, Kloepper JW (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383:3–41.  
<https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
  272. Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO et al. (2015) Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196:15–27. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.013>
  273. Steve C. F. Au-Yeung, Donald R. Eaton, Thomas Birchall et al. The preparation and characterization of iron trihydroxide, Fe(OH)<sub>3</sub>
  274. D. B. Jaynes, A. S. Rogowski, H. B. Pionke Acid Mine Drainage From Reclaimed Coal Strip Mines 1. Model Description
  275. Timberlake CF (1964) Iron-malate and iron-citrate complexes. *Journal of the Chemical Society*:5078–5085
  276. Bocanegra MP, Lobartini JC, Orioli GA (2006) Plant Uptake of Iron Chelated by Humic Acids of Different Molecular Weights. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 37:239–248.  
<https://doi.org/10.1080/00103620500408779>
  277. J.L. Pierre & I. Gautier-Luneau (2000) Iron and citric acid: A fuzzy chemistry of ubiquitous biological relevance. *Bio-Metals*:91–96
  278. Tiffin LO (1966) Iron Translocation II. Citrate/Iron Ratios in Plant Stem Exudates. *Plant Physiol* 41:515–518.  
<https://doi.org/10.1104/pp.41.3.515>

---

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Intaktes Hochmoor in Shippagan, New Brunswick.....	3
Abbildung 2-2: Zwei verschiedene Torfmoospflanzen. ....	6
Abbildung 2-3: Mikroskopische Aufnahme des Astblattes des Moooses <i>S. palustre</i> .....	7
Abbildung 2-4: Mikroskopische Aufnahme des Torfmooses <i>S. palustre</i> Klon 12 a.....	8
Abbildung 2-5: <i>S. fallax</i> aus Kieshofer Moor.....	8
Abbildung 2-6: Drei verschiedene Torfmoosarten.....	10
Abbildung 2-7: Schematische Darstellung der Methoden zur Vermehrung von Torfmoosen. ....	11
Abbildung 2-8: Micorpropagierte Torfmoose als A) BeadaMoos®, B) BeadaGel™ .....	12
Abbildung 2-9: Axenischen Bioreaktoren für die Produktion von Torfmoos. ....	14
Abbildung 2-10: Produktion von BeadaHumok™ in Micropropagation Service .....	16
Abbildung 2-11: Ansicht der Versuchsflächen des <i>Sphagnum farmings</i> .....	17
Abbildung 2-12: Optimumkurve für die Abhängigkeit des Wassergehaltes und CO <sub>2</sub> -Aufnahmerate. ....	19
Abbildung 2-13: Abhängigkeit der reellen-Photosyntheserate (P <sub>G</sub> ) von der eingestrahlten Photonenflussdichte (PPFD) .....	21
Abbildung 2-14: CO <sub>2</sub> -Aufnahmekinetik.....	23
Abbildung 3-1: Kultivierungsaufbau in Schüttelkolben. ....	30
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Kultivierung in Schüttelkolben. ....	30
Abbildung 3-3: <i>Wave</i> -Photobioreaktor.....	33
Abbildung 3-4: R&I- Fließschema des <i>Wave</i> -Photobioreaktors. In.....	33
Abbildung 3-5: Schlauchreaktor .....	36
Abbildung 3-6: Moosbettreaktor.....	37
Abbildung 3-7: R&I-Fließschema des Moosbettreaktors.....	38
Abbildung 3-8: Kultivierung von <i>S. palustre</i> in sechs parallel betriebenen Moosbettreaktoren im temperierten Brutschrank. ....	39
Abbildung 4-1: Vergleich des Biomasseertrages in begasten und nicht begasten Kolben. ....	46
Abbildung 4-2: Entwicklung der Mooskultur von <i>S. palustre</i> kultiviert submers in 500 mL Erlenmeyerkolben .....	46
Abbildung 4-3: Verlauf des pH-Wertes und der Nährstoffkonzentration während einer Kultivierung von <i>S. palustre</i> in Schüttelkolben zur Untersuchung der Machbarkeit eines photoautotrophen Wachstums.....	47
Abbildung 4-4: Prozessverlauf der Kultivierung von <i>S. palustre</i> zur Untersuchung der Ansäuerung des Umgebungsmilieus .....	49
Abbildung 4-5: Prozessverlauf des Experiments zur Untersuchung des Einflusses von konstantem pH-Wert auf das Wachstum von Torfmoosen von <i>S. palustre</i> .....	50
Abbildung 4-6: Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) während der Kultivierung von <i>S. palustre</i> .....	52
Abbildung 4-7: Vergleich des Einflusses der kalt- und warm-weißen LED-Module auf das Wachstum von <i>S. palustre</i> . ....	54
Abbildung 4-8: Ansicht der Mooskultur beleuchtet von warm-weißen LED-Modul (NS6L083AT).....	55



Abbildung 4-9: Überblick der Endbiomassekonzentrationen aus dem Experiment zur Untersuchung des Wachstum von Torfmoosens von <i>S. palustre</i> bei variiertem CO <sub>2</sub> -Anteil bei PFD= 100 μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> (A) und 200 μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> (B). .....	56
Abbildung 4-10: Vergleich des Einflusses der eingestrahnten Photonenflussdichte auf das Wachstum von <i>S. palustre</i> .....	58
Abbildung 4-11: Lichtgradienten mit deren Spektrum entlang des im Moosbettreaktor gewachsenen Torfmooses <i>S. palustre</i> .....	60
Abbildung 4-12: Vergleich des Einflusses der Hell/Dunkel-Zyklen auf das Wachstum von <i>S. palustre</i> . . .	61
Abbildung 5-1: <i>S. palustre</i> kultiviert in fünf verschiedene N-Medien .....	64
Abbildung 5-2: Prozessverlauf der Kultivierung von <i>S. palustre</i> zur Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Stickstoffquelle auf das Wachstum von Torfmoosen .....	65
Abbildung 5-3: Prozessverlauf der Kultivierung von <i>S. palustre</i> zur Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Stickstoffquelle auf das Wachstum von Torfmoosen .....	65
Abbildung 5-4: Zellzusammensetzung von <i>S. palustre</i> aus dem Experiment zur Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Stickstoffquelle auf das Wachstum von Torfmoosen .....	66
Abbildung 5-5: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von c(NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) auf das Wachstum von Torfmoosen von <i>S. palustre</i> in folgenden Medien:.....	70
Abbildung 5-6: Fotografische Darstellung der Biomassezunahme aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums von <i>S. palustre</i> (SP) und <i>S. rubellum</i> (SR) mit wöchentlichem Medienwechsel des 0,2fachen Knop-Mediums. ....	71
Abbildung 6-1: Moosbettreaktor. ....	75
Abbildung 6-2: Ansicht des angefertigten Behältnisses .....	76
Abbildung 6-3: Temperaturverlauf von drei Kultivierungen im Moosbettreaktor .....	77
Abbildung 6-4: Charakterisierung des Lichteintrags im Moosbettreaktor. ....	77
Abbildung 6-5: Schüttelkolbenexperiment zur Bioverträglichkeit der verschiedenen Materialien mit der Mooskultur <i>S. palustre</i> .....	78
Abbildung 6-6: Experiment zur Untersuchung des Medienversprühen auf das Wachstum von Torfmoosen mittels einer Zerstäubungsdüse .....	80
Abbildung 6-7: Nährstoffkonzentrationsverlauf des Experiments zur Etablierung der Prozessführungsstrategie für <i>S. palustre</i> kultiviert in Moosbettreaktor in 400 mL Medium (0,2 x) .....	81
Abbildung 6-8: Produzierte Torfmoosbiomasse von <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor kultiviert im 0,2fachen Knop-Medium mit 400 mL Volumen .....	81
Abbildung 6-9: Vergleich der produzierten Torfmoosbiomasse von <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor kultiviert im 0,4fachen 400 mL und im 0,2fachen 800 mL Knop-Medium. Der Versuchsmaßstab waren die Ergebnisse aus der Kultivierung im 400 mL 0,2fachen Medium. ....	82
Abbildung 6-10: Nährstoffkonzentrationsverlauf des Experiments zur Medienetablierung für <i>S. palustre</i> kultiviert in Moosbettreaktor im 400 mL 0,4 fachen Knop-Medium und im 800 mL 0,2fachen Knop-Medium.....	83
Abbildung 6-11: Produzierte Torfmoosbiomasse von <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor kultiviert im 0,2fachen Knop-Medium mit 800 mL Volumen und mit 0,216 g·L <sup>-1</sup> Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·7 H <sub>2</sub> O. ....	84
Abbildung 6-12: Einfluss des Kulturmediums auf den Stickstoffgehalt q <sub>N,x</sub> (A) sowie die spezifische Anteile für Chlorophyll a q <sub>chl a,x</sub> (B), Chlorophyll b q <sub>chl b,x</sub> und Carotinoide q <sub>Car,x</sub> (C) in Capitulas von <i>S. palustre</i> .....	85
Abbildung 6-13: Nährstoffkonzentrationsverlauf des Experiments zur Medienoptimierung für <i>S. palustre</i> kultiviert in Moosbettreaktor im 800 mL 0,2fachen Knop-Medium .....	85

Abbildung 6-14: Experiment im Moosbettreaktor zur Untersuchung des Einflusses von der eingestrahnten Photonenflussdichte auf das Wachstum von <i>S. palustre</i> . A) Abhängigkeit der .....	87
Abbildung 6-15: Experiment im Moosbettreaktor zur Untersuchung des Einflusses der Begasung des Kulturmediums auf das Wachstum von <i>S. palustre</i> . .....	89
Abbildung 6-16: Experiment im Moosbettreaktor zur Untersuchung des Einflusses der Dunkel- und Hellphase auf das Wachstum von <i>S. palustre</i> . .....	90
Abbildung 6-17: Wachstumsverlauf der Torfmoosart <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor. ....	91
Abbildung 6-18: Saatgut produziert im Moosbettreaktor .....	92
Abbildung 6-19: Charakterisierung der Torfmoospflanze gewachsen in Moosbettreaktor anhand der Bestimmung des spezifischen Stickstoffgehalts ( $q_{N,x}$ ) sowie des Kohlenstoffgehalts ( $q_{C,x}$ ) und der spezifischen Anteile für Chlorophyll a ( $q_{Chl a}$ ) Chlorophyll b ( $q_{Chl b}$ ) und Carotinoide ( $q_{Car}$ ) in Capitulas sowie in Stämmchen. ....	95
Abbildung 6-20: Prozessverlauf der Torfmooskultivierung mit wöchentlicher Ernte des $\frac{1}{4}$ Reaktorinhalts zur Ermittlung des Wachstumskurve von <i>S. palustre</i> anhand der Biotrockenmasse .....	97
Abbildung 6-21: Ionenaufnahme von Nitrat $m(NO_3^-)$ , Phosphat $m(PO_4^{3-})$ , Sulfat $m(SO_4^{2-})$ und Magnesium $m(Mg^{2+})$ aus der Kultivierungen im Moosbettreaktor von <i>S. palustre</i> .....	98
Abbildung 6-22: Korrelation zwischen der Längenzuwachsrate und der Aufnahme rate für Nitrat, Phosphat und Sulfat im Moosbettreaktor. ....	98
Abbildung 6-23: Bildlicher Wachstumsverlauf der Torfmoosart <i>S. palustre</i> , <i>S. fimbriatum</i> und <i>S. rubellum</i> im Moosbettreaktor zur Etablierung des Wachstums in Emerskultur. ....	99
Abbildung 6-24: Die durchschnittliche Wuchshöhe von <i>S. palustre</i> , <i>S. rubellum</i> und <i>S. fimbriatum</i> im Moosbettreaktor. ....	100
Abbildung 6-25: Prozessverlauf der Kultivierung von <i>S. palustre</i> , <i>S. fimbriatum</i> und <i>S. rubellum</i> im Moosbettreaktor zur Etablierung des Wachstums in Emerskultur mit Temperaturverlauf .....	101
Abbildung 7-1: Kultivierung von <i>S. palustre</i> im 5 L Wave-Bioreaktor. ....	104
Abbildung 7-2: Prozessverlauf eines Batchprozesses im 5 L Wave-Bag-Reaktor mit <i>S. palustre</i> . ....	105
Prozessverlauf eines Batchprozesses im 3 L Wave-Bag-Reaktor mit <i>S. palustre</i> mit Verlauf der Ionenkonzentration .....	105
Abbildung 7-3: Prozessverlauf eines Batchprozesses im 5 L Wave-Bag-Reaktor mit <i>S. palustre</i> mit volumetrischer $CO_2$ -Aufnahmerate CUR und $O_2$ -Produktionsrate OPR. ....	106
Abbildung 7-4: Ansicht der optischen Biomassezunahme von <i>S. palustre</i> kultiviert im 60 L Schlauchreaktor .....	107
Abbildung 7-5: Ansicht der geernteten Torfmoosen <i>S. palustre</i> aus dem 60 L Schlauchreaktor .....	108
Abbildung 7-6: Prozessverlauf eines Batchprozesses im 60 L Schlauchreaktor mit <i>S. palustre</i> .....	109
Abbildung 0-1: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von sterilfiltriertem Eisen auf das Wachstum von Torfmoosen. ....	139
Abbildung 0-2: Verlauf der Nitratkonzentration $c(NO_3^-)$ aus dem Versuch zur Untersuchung des Einflusses der PFD auf das Wachstum von Torfmoosen .....	140
Abbildung 0-3: Entwicklung der inokulierten Moospflanze <i>S. palustre</i> in einem Schüttelkolben innerhalb von 17 Tagen .....	140
Abbildung 0-4: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von $c(NH_4NO_3)$ auf das Wachstum des Torfmooses <i>S. palustre</i> in folgenden Medien: .....	141
Abbildung 0-5: Prozessverlauf des Experiments zur Untersuchung des Einflusses eines konstantem pH-Werts auf das Wachstum von Torfmoosen von <i>S. palustre</i> , .....	141

Abbildung 0-6: pH-Verlauf aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums von <i>S. palustre</i> (SP) und <i>S. rubellum</i> (SR) mit wöchentlichem Medienwechsel des 0,2fachen Knop-Mediums. ...	142
Abbildung 0-7: Fotografische Darstellung der Morphologie des Torfmooses .....	142
Abbildung 0-8: Prozessverlauf des Experiments zur Untersuchung der Auswirkung von Medienwechsel auf das Wachstum von Torfmoosen von <i>S. palustre</i> .....	142
Abbildung 0-9: Zusammensetzung der organischen Materie im Moorwasser .....	143
Abbildung 0-10: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von autoklaviertem und sterilfiltriertem Moorwasser auf <i>S. palustre</i> mit einer Moorwasser-Konzentration von 0 %, 5 %, 10 %, 20 %, 50 % (v/v).....	144
Abbildung 0-11: Prozessverlauf der Untersuchung des Eisenverhaltens bei der Kultivierung von <i>S. palustre</i> mit aufgetragenem pH-Wert und der Eisenkonzentration c(Fe). .....	145
Abbildung 0-12: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von Zitronensäure (ZS) und EDTA mit einer Konzentration von 1,37 mmol·L <sup>-1</sup> (1x), 2,74 mmol·L <sup>-1</sup> (2x), 5,48 mmol·L <sup>-1</sup> (4x) auf das Wachstum der Torfmoose <i>S. palustre</i> . .....	146
Abbildung 0-13: Biomassekonzentration des Torfmooses <i>S. palustre</i> kultiviert in verschiedenen Medien:147	
Abbildung 0-14: Prozessverlauf des Experiments zur Untersuchung der Rudolphschen Lösung auf das Wachstum der Torfmoose mit wöchentlichem Medienwechsel, .....	148
Abbildung 0-15: Fotografische Darstellung der Biomassezunahme aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums von <i>S. rubellum</i> (SR) in 1-fachem Knop-Medium mit 0,625 mmol·L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> und wöchentlicher Zugabe von 2 ml 125 mmol·L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> . .....	149
Abbildung 0-16: Aufnahmemenge der Ionen: Nitrat m(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), Phosphat m(PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ), Sulfat m(SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ), Calcium m(Ca <sup>2+</sup> ), Magnesium m(Mg <sup>2+</sup> ), und Stickstoff m(N) des Kontrollansatzes von <i>S. palustre</i> . .....	149
Abbildung 0-17: Vergleich der Morphologie von <i>S. palustre</i> kultiviert in Schüttelkolben. ....	150
Abbildung 0-18: Abtropfgewicht abhängig von der Filtrationszeit .....	150
Abbildung 0-19: LED-Modul des Moosbettreaktors. ....	151
Abbildung 0-20: Technische Zeichnung des Moosbettreaktors .....	151
Abbildung 0-21: Vergleich der Mooskultur <i>S. palustre</i> nach dem Kontakt mit Materialien aus Edelstahl151	
Abbildung 0-22: Experiment zur Bioverträglichkeit von verschiedenen Materialien mit <i>S. palustre</i> .....	152
Abbildung 0-23: Etablierung des Wachstum von Torfmoosen im Moosbettreaktor mit verschiedenen Moosträgern.....	152
Abbildung 0-24: Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums von Torfmoosens .....	152
Abbildung 0-25: Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor aus dem Experiment zur Etablierung des Kulturmediums .....	153
Abbildung 0-26: Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor aus dem Experiment zur Etablierung des Kulturmediums in 800 mL des 0,2fachen Knop-Mediums mit 0,216 g·L <sup>-1</sup> Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	153
Abbildung 0-27: Korrelation zwischen der Wuchshöhe und der Feuchtmasse des Torfmooses <i>S. palustre</i> produziert im MBR.....	154
Abbildung 0-28: Verlauf der Nitratkonzentration c(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) aus dem Experiment zur Untersuchung des Einflusses von der eingestrahlten Photonenflussdichte auf das Wachstum des Torfmooses <i>S. palustre</i> . .....	154
Abbildung 0-29: Mikroskopische Aufnahme eines Astblattes des Mooses <i>S. palustre</i> .....	154

Abbildung 0-30: Bildlicher Wachstumsverlauf der Torfmoosart <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor aus dem Experiment zur Untersuchung des Einflusses von drei unterschiedlichen Photonenflussdichten. ....	155
Abbildung 0-31: Aufnahme von <i>S. palustre</i> (rechts) und <i>S. rubellum</i> (links) mittels eines Binokulars. ....	155
Abbildung 0-32: Verlauf des spezifischen Pigmentanteiles (A), der durchschnittlichen Wuchshöhe (B), des Stickstoff- ( $q_{N,x}$ ) und des Magnesiumgehalts ( $q_{Mg,x}$ ) .....	156
Abbildung 0-33: Schematische Darstellung des Experiments zur Ermittlung der Wachstumskurve von <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor. ....	156
Abbildung 0-34 Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von <i>S. palustre</i> (SP), <i>S. fimbriatum</i> (SF) und <i>S. rubellum</i> (SR) im Moosbettreaktor .....	157
Abbildung 0-35: Emissionsspektrum der LED- Leuchtmittel. ....	158
Abbildung 0-36: Sondenanschlüsse des WavePhotobioreaktors. ....	158
Abbildung 0-37: Prozessverlauf eines Batchprozesses im 3 L Wave-Bag-Reaktor mit <i>S. palustre</i> mit volumetrischer CO <sub>2</sub> -Aufnahmerate CUR, O <sub>2</sub> -Produktionsrate OPR und Photosynthesekoeffizienten PQ. ....	159
Abbildung 0-38: Inbetriebnahme des Wave-Photobioreaktors. ....	159
Abbildung 0-39: Bodensatz der im Batch-Verfahren betriebenen Schlauchreaktoren aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums. ....	160
Abbildung 0-41: Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von <i>S. palustre</i> im 60 L Schlauchreaktor .....	161
Abbildung 0-42 :Wachstumsverlauf von <i>S. palustre</i> in dem im Batch-Verfahren betriebenen 25 L Schlauchreaktor mit Temperaturregelung. ....	161
Abbildung 0-43: Technische Zeichnung des von 125 L <i>Trickle-Bed</i> -Reaktor. ....	162
Abbildung 0-44: Acrylglasplatte mit Bohrungen .....	163
Abbildung 0-45: Ansicht des Kühlsystems im TBR mit einem Glaskondensator .....	163
Abbildung 0-46: Temperaturverlauf im <i>Brickle-Bed</i> -Reaktor gefüllt mit 25 L Wasser. Links: ohne Kühlungssystem. ....	164
Abbildung 0-47: Lichtprofil im <i>Trickle-Bed</i> -Photobioreaktor bei einer PFD = 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .....	165
Abbildung 0-48: R&I- Fließschema des <i>Trickle-Bed</i> -Photobioreaktors der Variante I. ....	166
Abbildung 0-49: R&I- Fließschema des <i>Trickle-Bed</i> -Photobioreaktors der Variante II. ....	167
Abbildung 0-50: Photographische Aufnahme der Reaktorschäden .....	168
Abbildung 0-51: Set-up der Messmethode zur Messung der integralen optischen Transmission .....	169
Abbildung 0-52: Korrelation der integralen optischen Transmission mit der Biotrockenmassekonzentration von <i>Chlorella vulgaris</i> (A) und mit der Biotrockenmassekonzentration von <i>S. palustre</i> (B) in 150 mL bzw. 200 mL VE-Wasser .....	170
Abbildung 0-53: Korrelation der integralen Transmission mit verschiedenen Medievolumen mit und ohne Schüttler .....	170
Abbildung 0-54: Korrelation der integralen Transmission mit verschiedenen leeren Kolben in unveränderter Ausrichtung (A) und mit verschiedenen Positionen in der Messeinheit (B) .....	171
Abbildung 0-55: Korrelation aller gemessenen Werte der integralen optischen Dichte mit der Biotrockenmasse von <i>S. palustre</i> in 150 mL und 200 mL VE-Wasser. ....	172

---

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Ökologische Moortypen in Europa .....	4
Tabelle 2-2: Konzentration der Nährstoffe im natürlichen Moorwasser .....	4
Tabelle 2-3: Überblick der Prozessparameter für die axenische <i>in-vitro</i> Kultivierung von Torfmoosen ....	14
Tabelle 3-1: Medienbestandteile des Knop- und des MBR-Mediums.....	28
Tabelle 3-2: Überblick der Standardbedingungen der Schüttelkolben-Experimente.....	32
Tabelle 3-3: Überblick der Prozessparamter der Kultivierung von <i>S. palustre</i> im Moosbettreaktor .....	39
Tabelle 4-1: Berechnete pH Senkung in je einer Kationenlösung bei analoger Konzentration zum Knop-Medium.....	48
Tabelle 4-2: CO <sub>2</sub> -Versuchsreihe zur Untersuchung des Einflusses von CO <sub>2</sub> -Konzentration im Zugas auf das Wachstum von <i>S. palustre</i> . x.....	56
Tabelle 5-1: Zusammensetzung der Kulturmedien zur Untersuchung des Einflusses der Stickstoffquelle auf das Wachstum von <i>S. palustre</i> . .....	64
Tabelle 7-1: Überblick der entwickelten Photobioreaktoren zur Torfmooskultivierung, sowie der wichtigsten Produktionsparameter.....	111
Tabelle 0-1: Ionenkonzentration des Knop-Mediums und der Rudolpschen Lösung in mg·L <sup>-1</sup> .....	136
Tabelle 0-2: Zusammensetzung der Medien für Sterilitätstest .....	137
Tabelle 0-3: Zusammensetzung der IC-Standards für die Kationen- und Anionenmessung .....	137
Tabelle 0-4: Zusammensetzung der Standards für die Kationen- und Anionenmessung für Proben aus den Schüttelkolbenversuchen. Analyse: MBR-Medium, Probenvolumen: 2 mL, Verdünnung: 1:10. ....	137
Tabelle 0-5: Überblick über die Start-Inokulummengen in den Schüttelkolbenexperimenten. Die .....	138
Tabelle 0-6: Veränderung des Blau-, Grün- und Rotanteils des durch die Torfmoossschicht durchdringenden Lichts. Die Wellenlängenbereich .....	139
Tabelle 0-7: 2.Ficksches Gesetz zur Berechnung der Diffusion von CO <sub>2</sub> in der Flüssigkeit .....	139
Tabelle 0-8: Aufgenommene Menge an Ammonium, Nitrat, Phosphat und Sulfat aus dem Experiment zur Etablierung von Wachstum von drei <i>Sphagnum</i> -Arten.....	139

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. xylinum</i>	<i>Acetobacter xylinum</i>
A <sub>ph</sub>	Fläche der Phasengrenze
BTM	Biotrockenmasse
BVT	Institut für Bioverfahrenstechnik
c	Salzbestandteil
C	Kohlenstoff
CA	Cellulose Acetat
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Kation
Car	Carotinoide
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Anion
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COO <sup>-</sup>	Carboxylatgruppe
C/N-Verhältnis	Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glukose
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostellum discoideum</i>
DH	<i>Dunkelrot</i>
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
DOC	Eng. <i>dissolved organic carbon</i> : der gelöste organische Kohlenstoff
e	Element
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fe	Eisen
FLD	Fluoreszenz-Detektor
H <sup>+</sup>	Proton/Wasserstoff-Kation
HCl	Salpetersäure
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
H <sub>2</sub> O	Wasser
i	Zeitpunkt
I	Ion
I <sub>c</sub>	Kompensationspunkt
I <sub>s</sub>	Sättigungspunkt
IC	Ionenchromatographie
ICP-OES	optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IMR	Institut für Mess- und Regelungstechnik
IP	<i>Internet Protocol</i>
IT	Integrale Transmission
K <sup>+</sup>	Kalium-Kation
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
KM	Kühlmittel
L <sub>A</sub>	Außenlänge
MBR	Moosbettreaktor
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Kation
MSC	Massendurchflussregler
MW	Medienwechsel

---

M.W.	Mittelwert
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
N	Elementarer Stickstoff
N <sub>2</sub>	Molekularer Stickstoff
Na <sup>+</sup>	Natrium-Kation
NaOH	Natronlauge
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium-Kation
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit-Anion
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat-Anion
ns	Nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Molekularer Sauerstoff
OND	Organischer Stickstoff
OESSM	Ökologische Schutzstation Steinhuder Meer
ox	oxidiert
p.a.	Analysenrein
PI-Kurve	Eng. <i>photosynthetic response curve</i>
PIPPS	Piperazin-1,4-bis(propansulfonsäure)
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Phosphat-Anion
PP	Polypropylen
ppm	<i>Parts per million</i> (Millionstel)
PTFE	Polytetrafluorethylen
red	reduziert
rpm	Rounds per minute
Rubisco/ RuBisCO	Ribulose-1,5-bis-phosphat-Carboxylase/Oxygenase
<i>S. fallax</i>	<i>Sphagnum fallax</i>
<i>S. fimbriatum</i>	<i>Sphagnum fimbriatum</i>
<i>S. magellanicum</i>	<i>Sphagnum magellanicum</i>
<i>S. nemoreum</i>	<i>Sphagnum nemoreum</i>
<i>S. palustre</i>	<i>Sphagnum palustre</i>
<i>S. rubellum</i>	<i>Sphagnum rubellum</i>
SEC	Eng. <i>Size-exclusion chromatography</i> , Größenausschluss-Chromatographie
SK	Schüttelkolben
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfat-Anion
SP	<i>Sphagnum palustre</i>
SR	<i>Sphagnum rubellum</i>
TCP	Transmission Control Protocol
T/N-	Tag/Nacht-
TOC	<i>Total organic carbon</i>
TSA	Tryptic Soy Agar
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolettstrahlung
VE	Vollentsalztes Wasser
WBR	<i>Wave Bag</i> -Reaktor
wl.	wöchentlich
ZS	Zitronensäure

---



# Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
$c$	Konzentration	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
$c(l)$	Ionenkonzentration	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
$c(\text{CO}_2,l)$	$\text{CO}_2$ -Konzentration in der Flüssigphase	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
$c(\text{CO}_2,g)$	$\text{CO}_2$ -Konzentration in der Gasphase	$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
$c_c$	Konzentration der benötigten Salzbestandteile im optimierten Knop-Medium	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
$C(\text{BTM})$	Biomassekonzentration	$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
$d_{\text{Membrane}}$	Dicke der Membrane	mm
$e_{e,x}$	Massenanteil des Elements an der Biomasse	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$e_{e,\text{Salz}}$	Massenanteil des Elements an dem Salz	$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
$F_{\text{Diff,Gas}}$	Fluss	$\text{G}\cdot\text{s}^{-1}$
$\dot{J}_{\text{Zugas}}$	Einhegende Stoffmengenstrom des Zugases	$\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$
$FLD_{276/340}$	Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 340 nm nach Anregung von 276 nm	-
FM	Feuchtmasse	g
$h$	Plancksches Wirkungsquantum	J·s
$h$	Höhe	cm
$h_x$	Mittlere Wuchshöhe	cm
$k_{\text{Diff,Gas}}$	Diffusionskoeffizient eines Gases	$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$
$L_i$	Innenlänge	cm
$M$	Molekulargewicht	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
$m_{\text{Chl } a}$	Menge an Chlorophyll <i>a</i>	mg
$m_{\text{Chl } b}$	Menge an Chlorophyll <i>b</i>	mg
$m_{\text{Car}}$	Menge an Carotinoide	mg
$m_i$	Aktuelle vorliegende Ionenmenge im Medium	mg
$m_{l,i}$	Theoretische aufgenommene Menge an Ion <i>l</i> zu dem Zeitpunkt <i>i</i>	mg
OPR	Sauerstoffproduktionsrate	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
$P_G$	Brutto-Photosyntheserate	$\mu\text{mol}\cdot\text{g}(\text{BTM})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
$P_{A,x}$	Jährliche Flächenproduktivität	$\text{g}(\text{BTM})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{yr}^{-1}$
$P_{V,x}$	Volumetrische Produktivität	$\text{g}(\text{BTM})\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
PFD	Photonenflussdichte	$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
$p\text{CO}_2$	Kohlendioxidpartialdruck	%
$p\text{O}_2$	Sauerstoffpartialdruck	%
$q_{\text{Car}}$	Spezifischer Pigmentgehalt an Carotinoide	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
$q_{\text{Chl } a}$	Spezifischer Pigmentgehalt an Chlorophyll <i>a</i>	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
$q_{\text{Chl } b,x}$	Spezifischer Pigmentgehalt an Chlorophyll <i>b</i>	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
$q_{\text{Mg},x}$	Spezifischer Magnesiumgehalt	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
$q_{\text{N},x}$	Spezifischer Stickstoffgehalt	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
$q_{\text{Pig},x}$	Spezifischer Pigmentgehalt	$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
$r_i$	Aufnahmerate von Ion <i>i</i>	$\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$
$T_K$	Kultivierungstemperatur	°C
$T_M$	Mediumtemperatur	°C
$t_p$	Prozesszeit	d
$t_R$	Retentionszeit	min
$\nu$	Frequenz eines Photones	Hz
$\dot{V}$	Volumenstrom	$\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
$\dot{V}_{\text{CO}_2,\text{ein}}$	$\text{CO}_2$ -Volumenstrom	$\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
$V_M$	Molares Volumen	$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$
$V_M; V_{\text{med}}$	Medienvolumen	L
$V_{M,i}$	Medienvolumen zum Zeitpunkt <i>i</i>	mL

---

$\dot{V}_{Zuluft}$	Zuluft	$L \cdot \text{min}^{-1}$
vvm	Belüftungsrate (volume gas per volume reactor and minute)	$L \cdot L^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
$y_{\text{CO}_2, \text{in}}$	Massenanteil von $\text{CO}_2$ im Zugas	$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$
$y_{\text{CO}_2, \text{out}}$	Massenanteil von $\text{CO}_2$ im Abgas	$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$
$y_{\text{O}_2, \text{in}}$	Massenanteil von $\text{O}_2$ im Zugas	$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$
$y_{\text{O}_2, \text{out}}$	Massenanteil von $\text{O}_2$ im Abgas	$\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$
$\lambda$	Wellenlänge	nm

---

---

# Anhang

## A1 Studentische Arbeiten

Carolin Möller: Development of new methods for the estimation of peat moss biomass during laboratory cultivation, Karlsruhe Institute of Technology, Bachelorthesis, 2018

Julian Borho: Untersuchung des Einflusses von natürlichem Moorwasser auf das Wachstum von Torfmoos, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis, 2019

Denys Dolgyy: Untersuchung des Einflusses verschiedener Stickstoffquellen auf das Wachstum von *Sphagnum palustre*, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis, 2019

Dominik Nitz: Etablierung des Wachstums von Torfmoosen in *Trickle-Bed*-Reaktoren, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis, 2019

Clarissa Müller: Einfluss des Mediums auf das Wachstum von *Sphagnum palustre*, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis, 2020

Jonas Braunmiller: Einfluss von Licht und CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit auf das Wachstum von *Sphagnum palustre*, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis, 2020

Holger Dittmann: Entwicklung und Etablierung eines Kultivierungsprozesses für die Vermehrung von Torfmoosen im Pilotmaßstab, Karlsruher Institut für Technologie, Masterthesis, 2020

Sandra Hahn: Etablierung des Wachstums von *S. rubellum*, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorthesis, 2021

## A2 Schüttelkolben-Experimente

### Material und Methoden

Tabelle 0-1: Ionenkonzentration des Knop-Mediums und der Rudolfschen Lösung in mg·L<sup>-1</sup>

Sphagnum-Medium						Rudolfsche Lösung					
Kation	c [mg·L <sup>-1</sup> ]	Kation	c [mg·L <sup>-1</sup> ]	Anion	c [mg·L <sup>-1</sup> ]	Kation	c [mg·L <sup>-1</sup> ]	Kation	c [mg·L <sup>-1</sup> ]	Anion	c [mg·L <sup>-1</sup> ]
K <sup>+</sup>	203,045	Na <sup>+</sup>	0,023	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	602,557	K <sup>+</sup>	1242,958	Na <sup>+</sup>	1210,000	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	460,483
Ca <sup>2+</sup>	169,723	Cu <sup>2+</sup>	0,00318	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	174,462	Ca <sup>2+</sup>	854,886	Cu <sup>2+</sup>	0,700	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	613,349
Mg <sup>2+</sup>	24,658	Co <sup>2+</sup>	0,00296	Cl <sup>-</sup>	118,880	Mg <sup>2+</sup>	486,875	Co <sup>2+</sup>	0,880	Cl <sup>-</sup>	85,854
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	22,539	Al <sup>3+</sup>	-	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	107,542	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1378,535	Al <sup>3+</sup>	0,433675	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1109,570
Mn <sup>2+</sup>	2,747	Ti <sup>4+</sup>	-	BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	2,939	Mn <sup>2+</sup>	5,424	Ti <sup>4+</sup>	2,061	BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	29,267
Fe <sup>2+</sup>	2,511	Li <sup>2+</sup>	-	I <sup>-</sup>	0,317	Fe <sup>2+</sup>	127,3559	Li <sup>2+</sup>	0,228	I <sup>-</sup>	0,252
Zn <sup>2+</sup>	0,980	Ni <sup>2+</sup>	-	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,080	Zn <sup>2+</sup>	1,114	Ni <sup>2+</sup>	0,617	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	-
		Sn <sup>2+</sup>	-	Br <sup>-</sup>	-			Sn <sup>2+</sup>	0,739	Br <sup>-</sup>	0,276

Tabelle 0-2: Zusammensetzung der Medien für Sterilitätstest. Die Konzentrationen einzelner Bestandteile sind in g·L<sup>-1</sup> angegeben. Der pH-Wert vom LB Medium für Bakterien entsprach 7, Tryptic soy agar (TSA) + 1% Glucose für Bakterien: 7,5 und BD Sabouraud Glucose Agar für Pilze zwischen 4,5 und 4,8.

LB Medium für Bakterien	c g·L <sup>-1</sup>	BD Sabouraud Glucose Agar für Pilze	c g·L <sup>-1</sup>	Tryptic Soy Agar (TSA) + 1% Glucose für Bakterien	c g·L <sup>-1</sup>
Bacto-Trypton	10	Pepton aus Casein	5	Pepton aus Casein	15
Hefe Extrakt	5	Pepton aus Soja	5	Pepton aus Soja	5
NaCl	10	Glukose	40	NaCl	5
Agar	15			Glukose	10
				Agar	15

Tabelle 0-3: Zusammensetzung der IC-Standards für die Kationen- und Anionenmessung für Proben aus den Schüttelkolbenexperimenten. Medium: Knop, Probenvolumen: 4 mL, Verdünnung: 1:3.

Anionenstandards							
	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6	Standard 7
c(Cl <sup>-</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	2,00	7,50	15,00	30,00	40,00	60,00	-
c(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	3,20	16,00	80,00	160,00	213,00	320,00	-
c(PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	3,33	12,50	25,00	50,00	66,60	100,00	-
c(SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,83	6,88	13,75	27,5	36,60	55,00	-
Kationenstandards							
	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5		
c(Na <sup>+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0		
c(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	5,00	10,00	15,00	20,00		
c(K <sup>+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	10,00	20,00	60,00	80,00	100,00		
c(Ca <sup>2+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	5,00	10,00	15,00	20,00		
c(Mg <sup>2+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	2,50	10,00	20,00	30,00		

Tabelle 0-4: Zusammensetzung der Standards für die Kationen- und Anionenmessung für Proben aus den Schüttelkolbenversuchen. Analyse: MBR-Medium, Probenvolumen: 2 mL, Verdünnung: 1:10.

Anionenstandards							
	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6	Standard 7
c(Cl <sup>-</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	10,01	25,03	50,05	75,08	100,10	150,15
c(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	9,95	24,88	49,75	74,63	99,50	149,25
c(PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	10,01	25,03	50,05	75,08	100,10	150,15
c(SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	0,10	0,50	5,01	20,04	40,08	60,12	80,16
Kationenstandards							
	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5		
c(Na <sup>+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	2,50	5,00	7,50	10,0		
c(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	5,00	10,00	15,00	20,00		
c(K <sup>+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	10,00	20,00	60,00	80,00	100,00		
c(Ca <sup>2+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	5,00	10,00	15,00	20,00		
c(Mg <sup>2+</sup> ) in mg·L <sup>-1</sup>	1,00	2,50	10,00	20,00	30,00		

Tabelle 0-5: Überblick über die Start-Inokulumengen in den Schüttelkolbenexperimenten. Die Parameterspalte stellt die Bezeichnung der einzelnen untersuchten Kultivierungsparameter dar.  $q_{A-X, Kolben}$  ist der prozentuale Anteil der Moosfläche an der gesamten Kolbenbodenfläche in %. C(BTM) ist die Endbiotrockenmassekonzentration in  $g \cdot L^{-1}$ . Die Abweichung der Moosfläche zur Moosfläche der Kontrolle ist als Abw  $q_{A-X, Kolben}$  bezeichnet. Die Angaben stellen Mittelwerte und deren Standardabweichungen dar, welche mit dem statistischen Analyse Tool ANOVA Software in OriginPro® 2019 berechnet wurden.

Abbildung	Parameter	$q_{A-X, Kolben}$ (%)	Abw $q_{A-X, Kolben}$ (%)	C(BTM) ( $g \cdot L^{-1}$ )
Abbildung 0-1	FeSO <sub>4</sub> aut.	11,18 ± 1,29		6,31 ± 0,01
	FeSO <sub>4</sub> sterilf.	12,11 ± 1,81	8,3	5,94 ± 0,39
Abbildung 4-1	Kontrolle	11,18 ± 1,29		5,94 ± 0,39
	0 % CO <sub>2</sub>	10,09 ± 0,33	9,7	1,06 ± 0,11
Abbildung 4-4	Knop	12,67 ± 0,48		0,92±0,29
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	13,07 ± 0,05	3,1	0,47±0,08
	Ca <sup>2+</sup>	13,56 ± 0,33	7,0	0,38±0,01
	K <sup>+</sup>	13,30 ± 0,69	5,0	0,34±0,04
	Mg <sup>2+</sup>	17,09 ± 0,82	34,9	0,38±0,03
Abbildung 0-10	0 %	13,01 ± 0,01		7,70 ±
	5 %	10,11 ± 0,58	22,3	6,91 ± 0,14
	10 %	9,67	25,7	6,62
	20 %	9,10	30,0	7,36
	50 %	8,64 ± 0,17	33,6	6,7 ± 0,55
Abbildung 0-12	Kontrolle	13,16		5,73
	EDTA 1x	11,20	14,9	6,62
	EDTA 2x	25,27	92	6,84
	EDTA 4x	18,46	40,2	6,04
	ZS 1x	21,39	62,5	3,84
	ZS 2x	25,08	90,6	5,64
	ZS 4x	30,22	129,6	7,14
Abbildung 4-7	NS6L083BT	31,42 ± 19,78	60,5	6,25± 0,51
	NS6L083AT	12,41 ± 1,99		0,88 ± 0,30
Abbildung 4-10	100 µmol	80,80 ± 6,18		6,81 ± 0,91
	200 µmol	32,08 ± 2,54	60,4	8,82
	300 µmol	36,66 ± 0,78	54,6	9,28± 0,06
	400 µmol	30,05 ± 0,18	62,8	9,84
	500 µmol	28,09 ± 4,48	65,2	7,18± 1,39
Abbildung 4-9	1 %, 100 µmol	58,3 ± 4,36		7,024 ± 1,31
	2 %, 100 µmol	81,1 ± 3,67	38,9	6,61 ± 0,12
	3 %, 100 µmol	80,80 ± 6,18	59,0	6,81 ± 0,91
	0,04 %, 200 µmol	32,75 ± 1,91	58,1	0,89 ± 0,17
Abbildung 4-12	24/0	36,66 ± 0,78		9,28± 0,06
	18/6	80,0 ± 0,78	117,1	10,10 ± 0,44
	20/4	79,58 ± 3,65	118,2	10,55 ± 0,88
Abbildung 4-5	Kontrolle	31,42 ± 19,78		6,25± 0,51
	pH=4,0	46,51 ± 9,85	48,2	5,56 ± 1,17
	pH=5,0	39,79 ± 7,95	26,6	5,32 ± 0,52
Abbildung 5-3	Kontrolle	28,98 ± 6,92		4,90 ± 0,24
	NaNO <sub>3</sub>	15,31 ± 19,9	19	2,94 ± 0,62
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	42,54 ± 17,8	47	3,26 ± 0,34
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	46,12 ± 26,1	60	4,90 ± 0,74
	NH <sub>4</sub> Cl	15,85 ± 4,91	45	2,61 ± 0,37
Abbildung 5-5	0,625	9,37 ± 0,01	6	3,13 ± 0,43
	0,975	9,27 ± 0,47	7	3,87 ± 0,65
	1,25	10,00 ± 0,46		4,26 ± 0,14
	2,5	9,36 ± 0,14	6	4,48 ± 0,02
Abbildung 5-6	SP 1,0	64,74 ± 4,46		6,77
	SP 0,2	61,36 ± 5,38	5	5,59 ± 0,68
	SR 0,2	41,89 ± 9,81	35	5,56 ± 0,41
Abbildung 0-13	Rudolph	7,79 ± 0,18	3	3,71 ± 0,13

Tabelle 0-6: Veränderung des Blau-, Grün- und Rotanteils des durch die Torfmooschicht durchdringenden Lichts. Die Wellenlängenbereiche gliedern sich in den Blaulichtbereich: 430 – 490 nm, den Grünlichtbereich: 490 – 575 nm und den Rotlichtbereich: 640 – 780 nm.

Mooschicht	0 cm	1 cm	2 cm	6 cm
Blauanteil	20,8%	14,3%	11,3%	5,4%
Grünanteil	41,0%	42,6%	43,5%	24,8%
Rotanteil	10,0%	12,3%	14,3%	47,5%

Tabelle 0-7: 2.Ficksches Gesetz zur Berechnung der Diffusion von CO<sub>2</sub> in der Flüssigkeit. Diffusionskoeffizient von CO<sub>2</sub> = 2,1 · 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>, Henry-Koeffizient von CO<sub>2</sub> = 1,48 g·L<sup>-1</sup>·bar<sup>-1</sup> [118]

$$F_{DIFF,CO_2} = \frac{k_{Diff,CO_2,H_2O} \cdot (c_{CO_2}^* - c_{CO_2,H_2O}) \cdot A_{Phasengrenze}}{d_{Film}}$$

$F_{DIFF,CO_2}$	CO <sub>2</sub> -Fluss in g·s <sup>-1</sup>	$c_{CO_2,H}$	CO <sub>2</sub> -Konzentration in der Lösung in mg·L <sup>-1</sup>
$k_{Diff,CO_2,H_2O}$	Diffusionskoeffizient von CO <sub>2</sub> im Wasser in m <sup>2</sup> ·s <sup>-1</sup>	$d_{Film}$	Membrandicke (Flüssigkeitsfilm) in m
$c_{CO_2}^*$	CO <sub>2</sub> -Gleichgewichtskonzentration an der Phasengrenze in mg·L <sup>-1</sup>	$A_{Ph}$	Fläche der Phasen grenze in m <sup>2</sup>
$c_{CO_2}^* = H_{CO_2,H_2O} \cdot p_{CO_2,Zugaz}$			
$H_{CO_2,H_2O}$	Henry-Koeffizient in g·L <sup>-1</sup> ·bar <sup>-1</sup>	$p_{CO_2,Z}$	CO <sub>2</sub> -Partialdruck in Pa

Tabelle 0-8: Aufgenommene Menge an Ammonium, Nitrat, Phosphat und Sulfat aus dem Experiment zur Etablierung von Wachstum von drei *Sphagnum*-Arten. Die aufgenommenen Mengen wurden anhand der Gleichung (3-9) berechnet.

	Ammonium (mg)	Nitrat (mg)	Phosphat (mg)	Sulfat (mg)
<i>S. palustre</i>	14,9	27,8	5,07	3,86
<i>S. fimbriatum</i>	10,1 ± 0,64	32,2 ± 0,92	5,07 ± 0,2	7,20 ± 0,2
<i>S. rubellum</i>	10,4 ± 0,5	23,2 ± 6,2	1,95 ± 1,29	1,92

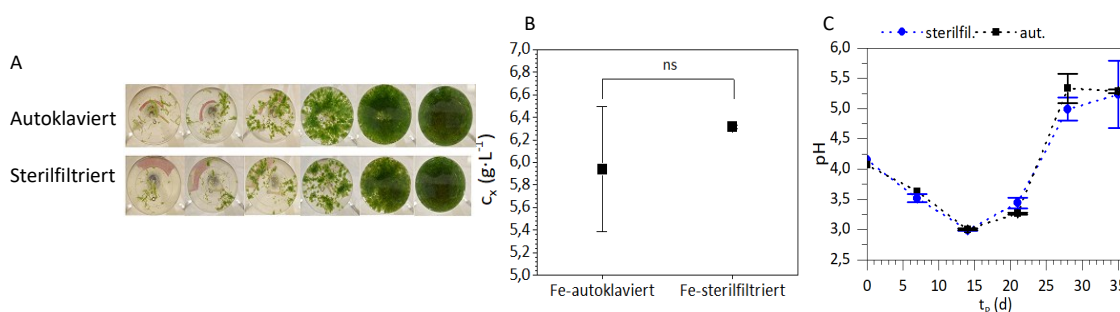


Abbildung 0-1: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von sterilfiltriertem Eisen auf das Wachstum von Torfmoosen. A) Wöchentliche Ansicht des Schüttelkolbens mit autoklaviertem (oben) und sterilfiltriertem Eisensulfat (unten); B) Endbiomassekonzentration dargestellt als Mittelwert von Duplikaten mit der Standardabweichung und berechneter Signifikanz ( $p < 0,05$ ) mittels der Software ANOVA in OriginPro® 2019. C) pH-Wert-Verlauf dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung. Kultivierungsbedingungen:  $T_{\kappa} = 20 \pm 1$  °C, 200 mL 1,0faches Knop-Medium,  $pH_{Anfang} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $PFD = 100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $V_g = 20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  mit 1 % CO<sub>2</sub> (v/v),  $t_p = 35$  d, Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n = 1$ .

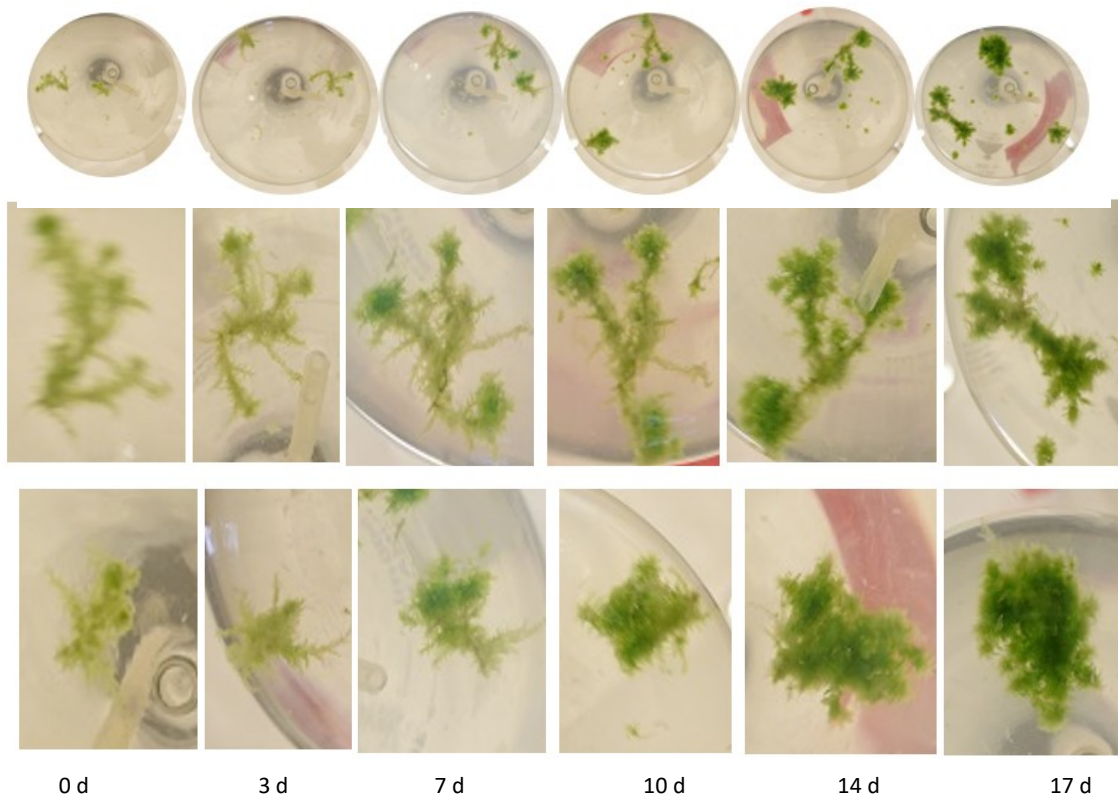


Abbildung 0-3: Entwicklung der inokulierten Moospflanze *S. palustre* in einem Schüttelkolben innerhalb von 17 Tagen. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1$  °C, 200 mL 1,0faches Knop-Medium,  $pH_{Anfang} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $PFD = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p = 17$  d, Anzahl an Kolben pro Parameter: 1,  $n = 1$ .

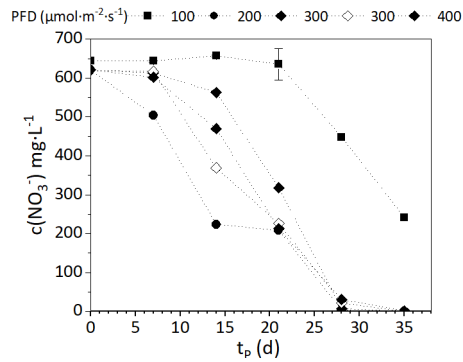


Abbildung 0-2: Verlauf der Nitratkonzentration  $c(\text{NO}_3^-)$  aus dem Versuch zur Untersuchung des Einflusses der PFD auf das Wachstum von Torfmoosen. Abgebildet sind die einzeln bestimmte Ionenkonzentrationen für vier verschiedenen Photonendichten (PFD).



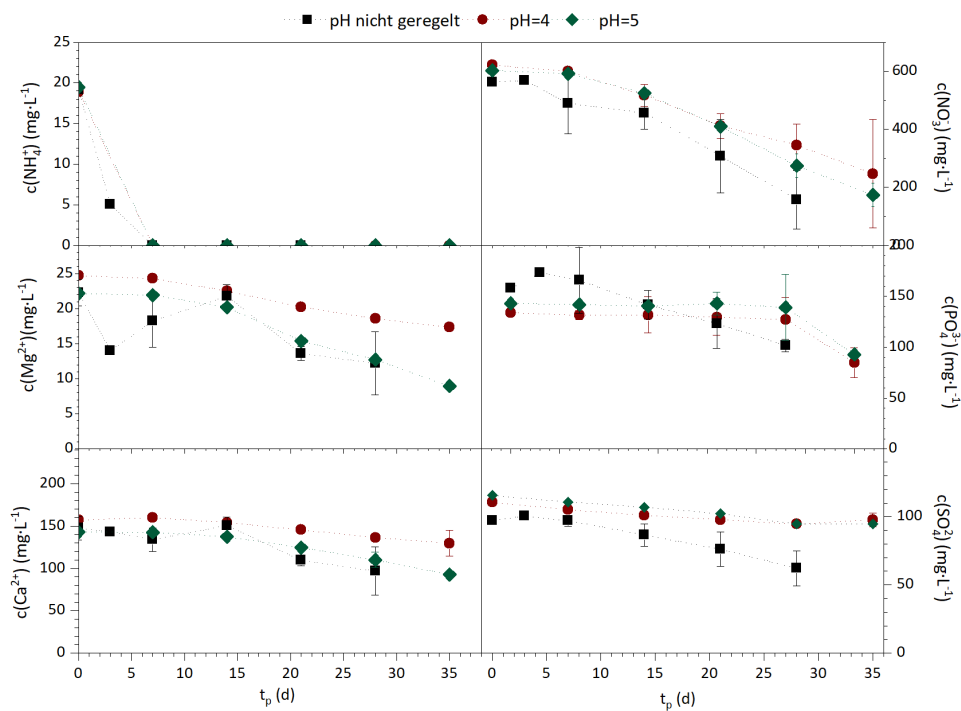


Abbildung 0-5: Prozessverlauf des Experiments zur Untersuchung des Einflusses eines konstantem pH-Werts auf das Wachstum von Torfmoosen von *S. palustre*, in einem gepufferten System mit 5,659 g·L<sup>-1</sup> PIPPS und Anfangs-pH-Werten von 4 und 5, sowie in einem nicht gepufferten System (Kontrolle) mit den Anionenkonzentrationenverläufen für Nitrat c(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), Phosphate c(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), und Sulfat c(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), sowie Kationenkonzentrationen des Ammoniums c(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), Calciums c(Ca<sup>2+</sup>) und Magnesiums c(Mg<sup>2+</sup>). Kultivierungsbedingungen: T<sub>K</sub>= 20±1 °C, 250 mL 1,0faches Knop-Medium (Kontrolle), pH<sub>Anfang</sub>=4,0 und 5,0, Dauerbeleuchtung, PFD= 100 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, V<sub>G</sub>= 20 mL·min<sup>-1</sup> mit 1 % CO<sub>2</sub> (v/v), t<sub>p</sub>= 35 d (pH=4,0; 5,0), 28 d (Kontrolle). Anzahl an Kolben pro Parameter: 1, n=1. Die abgebildeten Werten sind Mittelwerte von Duplikaten, die vertikalen Balken stellen deren Standardabweichung dar.

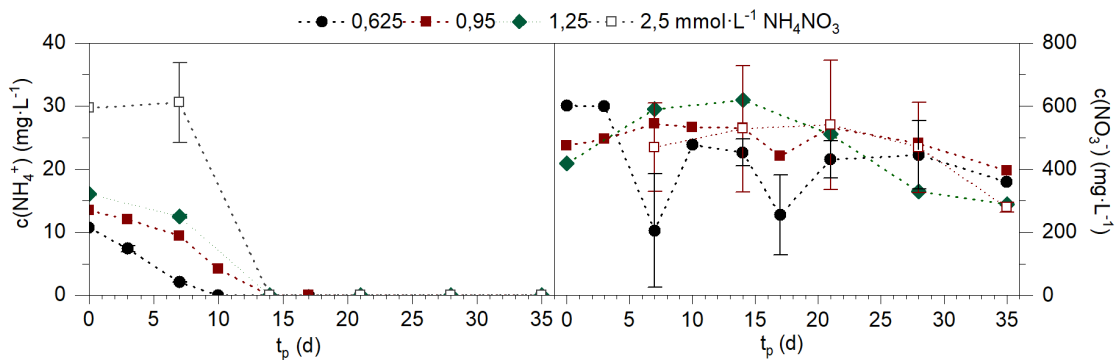


Abbildung 0-4: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von c(NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) auf das Wachstum des Torfmooses *S. palustre* in folgenden Medien: Knop + 0,625 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, Knop + 0,935 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, Knop + 1,25 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, und 2,5 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Dargestellt ist Verlauf der Ammoniumkonzentration c(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) und der Nitratkonzentration c(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Die einzelnen Messpunkte stellen die Mittelwerte der Duplikate mit ihren Standardabweichungen dar. Kultivierungsbedingungen: T<sub>K</sub>= 20±1 °C, 200 mL 1,0faches Knop-Medium, pH<sub>Anfang</sub>=4,0, Dauerbeleuchtung, PFD= 100 µmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, V<sub>G</sub>= 20 mL·min<sup>-1</sup> mit 1 % CO<sub>2</sub> (v/v), t<sub>p</sub>= 35 d, Anzahl an Kolben pro Parameter: 2, n=1.

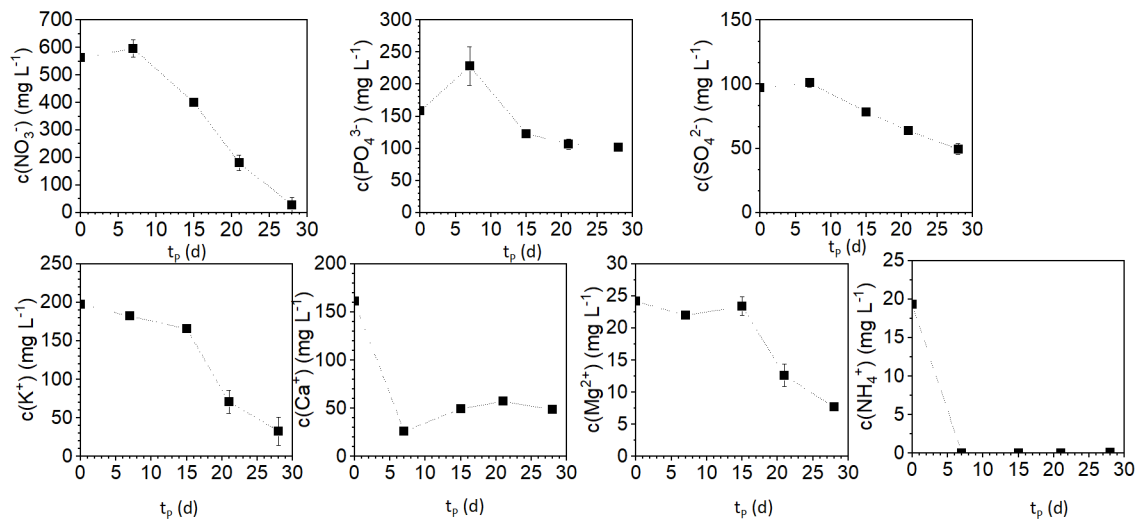


Abbildung 0-8: Prozessverlauf des Experiments zur Untersuchung der Auswirkung von Medienwechsel auf das Wachstum von Torfmoosen von *S. palustre* mit den Anionenkonzentrationsverläufen für Nitrat  $c(\text{NO}_3^-)$ , Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) und Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) sowie Kationenkonzentrations des Ammoniums  $c(\text{NH}_4^+)$ , Calciums  $c(\text{Ca}^{2+})$  und Magnesiums  $c(\text{Mg}^{2+})$ . Kultivierungsbedingungen:  $T_K=20\pm 1^\circ\text{C}$ , 250 mL 1,0faches Knop-Medium (Kontrolle),  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD}=100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G=20\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p=28$  d. Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=1$ . Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte von Duplikaten, die vertikalen Balken stellen die Standardabweichungen dar.

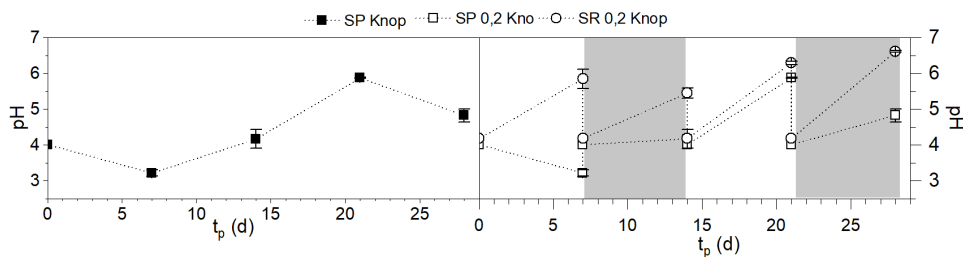


Abbildung 0-6: pH-Verlauf aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums von *S. palustre* (SP) und *S. rubellum* (SR) mit wöchentlichem Medienwechsel des 0,2fachen Knop-Mediums. Der wöchentliche Medienwechsel ist anhand des farblichen Übergangs zwischen grau und weiß ersichtlich. Kultivierungsbedingungen:  $T_K=20\pm 1^\circ\text{C}$ , 250 mL 1,0faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$ , Dauerlicht,  $\text{PFD}=100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G=20\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p=28$  d, Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=1$ . Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte von Duplikaten, die vertikalen Balken stellen die Standardabweichung dar.



Abbildung 0-7: Fotografische Darstellung der Morphologie des Torfmooses *S. rubellum* (0,2faches Knop-Medium) in einem Schüttelkolben (A) einer sphärischen Form von *S. rubellum* (B) und eines Torfmoospflanze von *S. palustre* (C).

## Weiterführende Ergebnisse

### Experiment zum Kapitel lag-pHase: Zugabe von Huminstoffen

Das Moorwasser enthält Huminstoffe [41, 268, 269], welche eine biostimulative Wirkung in der Rhizosphäre der Pflanzen besitzen, wie z.B. der Erhöhung der Zellmembranaktivität, was zu einer erhöhten Nährstoffaufnahme führt [51, 237, 270–272]. Außerdem können die Huminstoffe auch Eisen komplexieren [41, 51, 268], was die Fe-Aufnahme des Organismus wie z.B. bei Mikroalgen begünstigt. [237, 268, 271] Huminstoffe sind reichlich im Wasser der Hochmoore vorhanden [50, 51, 272]. Aus diesem Grund wurde folgende Hypothese aufgestellt: in einem anorganischen Medium fehlt die stimulative Wirkung auf den Stoffwechsel der *in-vitro Sphagnen*. Somit müssen die *Sphagnen* selbst die benötigten Substanzen, die sich in ihrer Wirkung jener der Huminstoffe ähneln, synthetisieren. Eine künstliche Zugabe der Huminstoffe im Medium sollte sich positiv auf das Wachstum der Torfmoose auswirken, falls die Huminstoffe für die Torfmoose von Bedeutung sind.

Da es schwierig ist die Huminstoffe synthetisch bereitzustellen, wurden zunächst keine definierten isolierten Huminstoffe verwendet, sondern natürliches Moorwasser aus einem Hochmoor (Hankhauser Moor, Feldversuch des Mooszuchtprojektes, Niedersachsen, am 11/2017 entnommen), in welchem bereits das Torfmoos *S. palustre* aus einer Bioreaktoranzucht ausgebracht wurde. [23] Das Moorwasser wurde durch einen Cellulose-Filter (Typ 14a, Carl Roth®, Deutschland) mit einem Porendurchmesser der Membran von 1,6 µm filtriert, um Pflanzenreste und Verunreinigungen zu entfernen. Der sich im Moorwasser befindende gelöste organische Kohlenstoff (DOC) mit einem Durchmesser < 0,45 µm [41] konnte die Membran passieren. Anschließend wurde das Moorwasser autoklaviert, um die Sterilität der Kultivierung zu gewährleisten. Für den Fall, dass die relevanten Komponenten temperaturempfindlich sein sollten, wurde das Moorwasser in einem parallellaufenden Versuch sterilfiltriert und dem Medium zugegeben. Der DOC-Gehalt sowie dessen Zusammensetzung im Moorwasser (siehe Abbildung 0-9) wurde mit Hilfe des TOC-Gerätes und einer Größenausschlusschromatographie (siehe Kapitel 3.4.10) bestimmt. Untersucht wurden fünf verschiedene Konzentration an Moorwasser (0 %, 5 %, 10 %, 20 % und 50 % (v/v)) in einem Knop-Medium

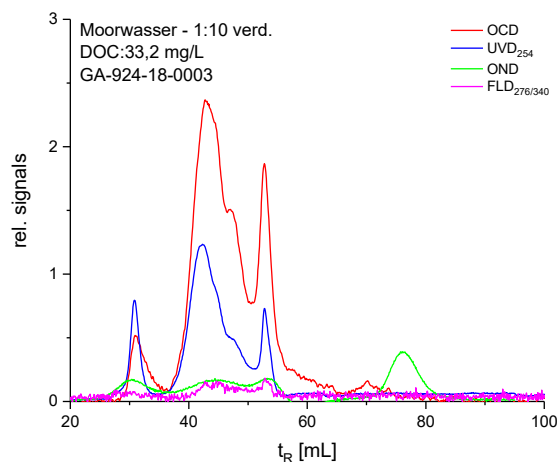


Abbildung 0-9: Zusammensetzung der organischen Materie im Moorwasser entnommen im November 2017 aus dem Hankhauser Hochmoor (Niedersachsen). Die Ergebnisse wurden mittels Größenausschlusschromatographie (siehe Kapitel 3.4.10) ermittelt. Aufgetragen ist der gelöste organische Kohlenstoff (DOC), welcher bei 33,2 mg·L<sup>-1</sup> lag und sich aus hochmolekularen Stoffen (t<sub>r</sub><30 min), niedermolekularen Stoffen (t<sub>r</sub>=60 min), wie organische Säure, zusammensetzte. Der genauen Substanzen konnten nicht ermittelt werden, allerdings ist aus dem Verlauf der UV-Aktivität (UVD<sub>254</sub>) ersichtlich, dass es sich um UV-aktive Substanzen handelt, die ungesättigte bzw. aromatische Verbindungen aufweisen. Diese Substanzen könnten Huminstoffe sein. Zusätzlich ist der organische Stickstoff (OND) aufgetragen, welcher organische Peptide kennzeichnet, die durch Hydrolyse der Blätter entstehen. Ein weiterer gemessener Parameter war die Fluoreszenz (FLD<sub>276/340</sub>) bei einer Anregungswellenlänge von 276 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm. (Persönliche Mitteilung, G. Abbt-Braun, Engler-Bunte-Institut | Wasserchemie und Wassertechnologie, KIT, Deutschland).

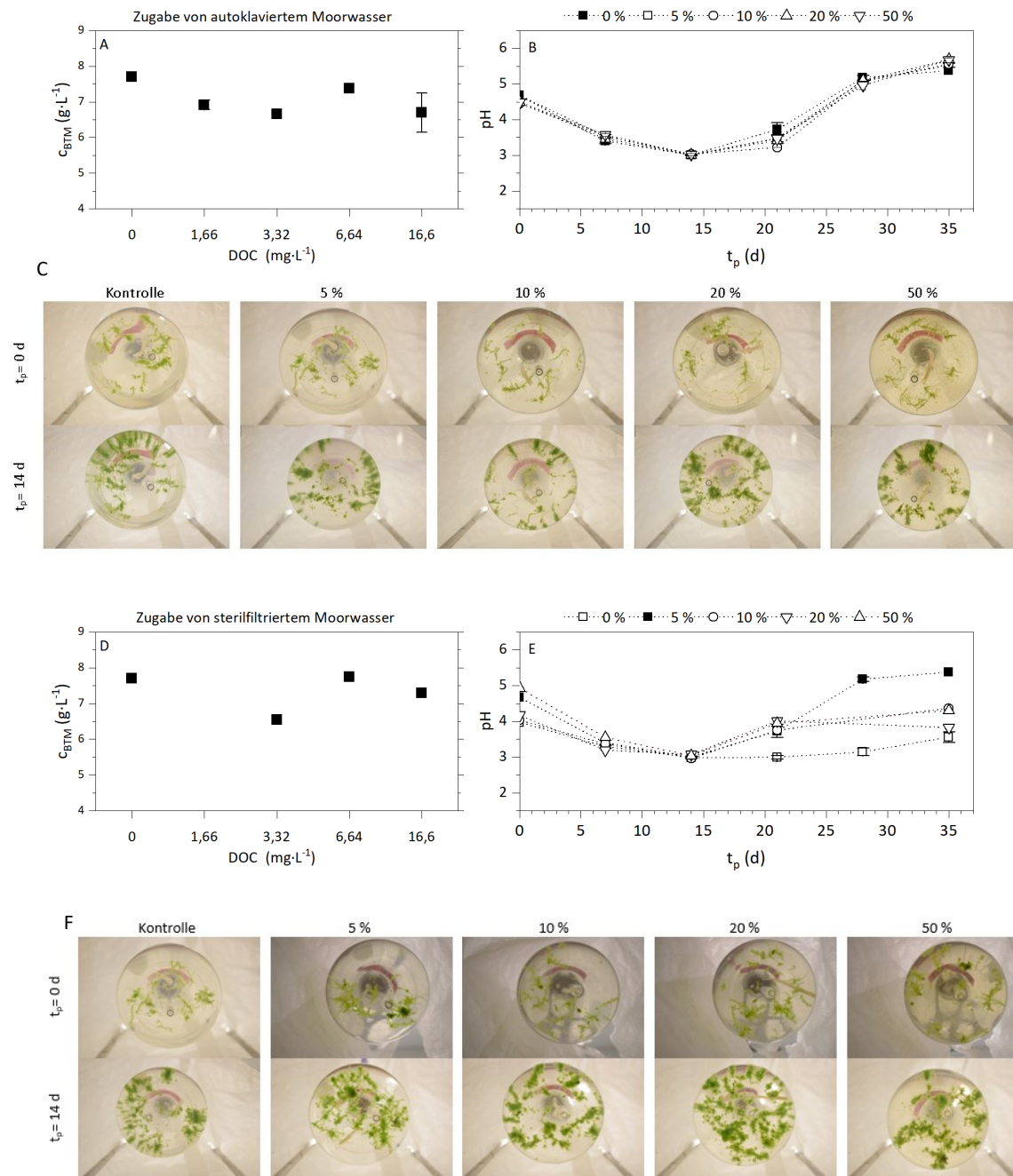


Abbildung 0-10: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von autoklaviertem und sterilfiltriertem Moorwasser auf *S. palustre* mit einer Moorwasser-Konzentration von 0 %, 5 %, 10 %, 20 %, 50 % (v/v) umgerechnet in DOC-Konzentrationen anhand des DOC-Gehalts des Moorwassers von 33,2  $mg \cdot L^{-1}$ . A, D) Endbiotrockenmassekonzentration abhängig von der Moorwasserkonzentration, angegeben als der berechnete gelöste organische Kohlenstoff (DOC). B, E) pH-Wert-Verläufe und C, F) Entwicklung von *S. palustre* zu Beginn der Kultivierung und am Versuchstag  $t_p = 14$  d anhand von durch den Kolbenboden aufgenommenen Fotos. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1$  °C, 250 mL 1,0-fach Knop-Medium,  $pH_{Anfang} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $PFD = 100 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ,  $V_G = 20 mL \cdot min^{-1}$  mit 1 %  $CO_2$  (v/v),  $t_p = 35$  d, Anzahl an Kolben pro Parameter: 1, n=1.

Die beiden Experimente (siehe Abbildung 0-10) zeigen, dass die exogene Anwendung des Moorwassers bei der gewählten DOC-Konzentration optisch abgeschätzt keine deutliche Biomassezunahme und auch kein signifikanter Unterschied der erreichten Biotrockenmasse bewirkte. Somit erscheint das Wachstumsverhalten von Torfmoosen durch die Zugabe

von Moorwasser in das Knop-Medium bei den vorliegenden DOC-Gehalten und der ermittelten Zusammensetzung als nicht begünstigend.

#### Experiment zum Kapitel lag-Phase: Verlauf der Eisenkonzentration

Als ein weiterer Aspekt der lag-Phase wurde Eisen und dessen Verfügbarkeit untersucht. Das im Medium vorhandene Eisensulfat reagiert bei Anwesenheit von Sauerstoff zu Eisenhydroxid  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  [273], womit es nicht länger für den Stoffwechsel der Organismen zugänglich ist. Um das Eisen wieder zu lösen, sind niedrige pH-Werte notwendig. [274] Hierfür verfügen die Pflanzen über verschiedene Mechanismen (siehe Kapitel 2.4.4), welche beispielweise auf einer Ausscheidung von Reduktionsmitteln basieren, wie z.B. Protonen [195] oder auf die Freisetzung von Chelatoren, wie organische Säuren und Phenole, die das Eisen komplexieren [235, 236]. Das komplexierte  $\text{Fe}^{3+}$  wird anschließend in das für Pflanzen verfügbare Eisen  $\text{Fe}^{2+}$  an der Zellwand mittels dem Enzym Eisenreduktase reduziert und aufgenommen. [235] Im Zuge eines Experiments mit *S. magellanicum* [238] wurde festgestellt, dass Eisen über eine spezifische Bindung in das organische Material aufgenommen wird. Hierbei wurde jedoch nicht geklärt, ob es sich um Siderophore wie bei Bakterien, Cyanobakterien und Pflanzen (Gras) [271] handelt, welche direkt einen Komplex mit Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) bilden und anschließend über die Zellmembran in der Zelle gelangen [200] oder die Liganden (organische Säuren, Phenole), das Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) abfangen und dann zur Zellwand zur Reduktion transportieren. [236, 237] Beim letzteren verbleiben die Komplexbildner in der Umgebung in der Zelle. [235] Die Bestimmung der Eisenaufnahmestrategie benötigt eine Sequenzierung des *Sphagnum* Genoms, in welchem die Gene für die Eisenaufnahme wie z.B. IRT (*iron-regulated transporter*) nachgewiesen werden. Dies wurde bereits für *Physcomitrella patens* erfolgreich durchgeführt [236]. Für die Bestätigung dieses Mechanismus müssten diese Gene exprimiert werden. Da dies eine aufwendige Analytik benötigt, welche den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, wurde zunächst in einer Standardkultivierung von *S. palustre* der Verlauf der Gesamtkonzentration des Eisens ermittelt, da bis zum jetzigen Zeitpunkt diese Daten nicht vorliegen. [19] Dies sollte zeigen, ob die Torfmoose in der Lage sind, das Eisen aufzunehmen. Die Eisenkonzentration  $c(\text{Fe})$  in wässrigen Kulturmedienproben wurde anhand der optischen Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES; Kapitel 3.4.9) in dreifacher Bestimmung ermittelt.

Der Verlauf der Eisenkonzentration  $c(\text{Fe})$  ist in Abbildung 0-11 dargestellt. In den ersten 14 Tagen verzeichnete  $c(\text{Fe})$  eine starke Abnahme und sank auf 10 % des ursprünglichen Wertes. Nach  $t_p = 14$  d stagnierte die Eisenkonzentration bei einem Wert um  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Die genaue Eintrittszeitpunkt dieser Stagnation könnte allerdings auch schon vor dem Tag 14 aufgetreten sein.

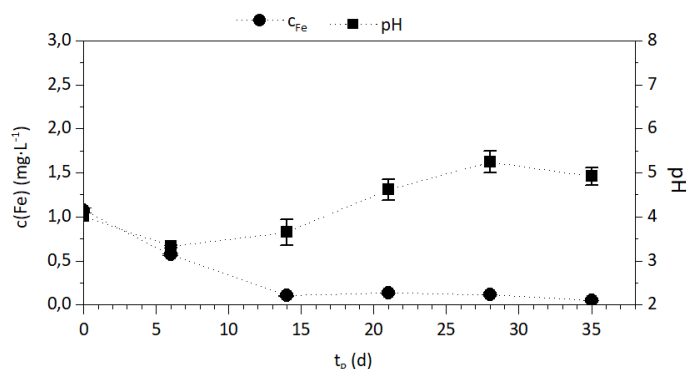


Abbildung 0-11: Prozessverlauf der Untersuchung des Eisenverhaltens bei der Kultivierung von *S. palustre* mit aufgetragenem pH-Wert und der Eisenkonzentration  $c(\text{Fe})$ . Kultivierungsbedingungen:  $T_k = 20 \pm 1$  °C, 250 mL 1,0faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerlicht,  $\text{PFD} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p = 35$  d. Anzahl an Kolben pro Parameter=1, n=1. Die abgebildeten pH-Werte und  $c(\text{Fe})$  sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung, die vertikalen Balken stellen die Standardabweichungen dar.

Der gemessene Anfangswert von  $c(\text{Fe})$  liegt um etwa 50 % unterhalb dem theoretisch vorliegenden Sollwert der Eisenkonzentration von  $2,51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Eine Erklärung hierfür könnte ein Ausfallen von Eisen mit Phosphat in dem Medium

während des Autoklavierens mit gleichzeitiger Oxidation bei Sauerstoffanwesenheit zu  $\text{Fe}^{3+}$  in unlösliches  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  [273] oxidiert. Andererseits könnten Medienbestandteile durch die vor der Analyse notwendige Filtration zur Entfernung von Pflanzenresten entfernt werden, was eine geringere  $c(\text{Fe})$  zur Folge haben könnte. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass der dargestellte Verlauf nicht der tatsächlichen Eisenkonzentration entspricht. Daher sollte für die korrekte Ermittlung der Eisenkonzentration im Knop-Medium eine analytische Methode eingesetzt werden, welche das Eisenpräzipitat und die gelöste  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ -Form quantifizieren kann.

### Experiment zum Kapitel lag-Phase: Zitronensäure und EDTA

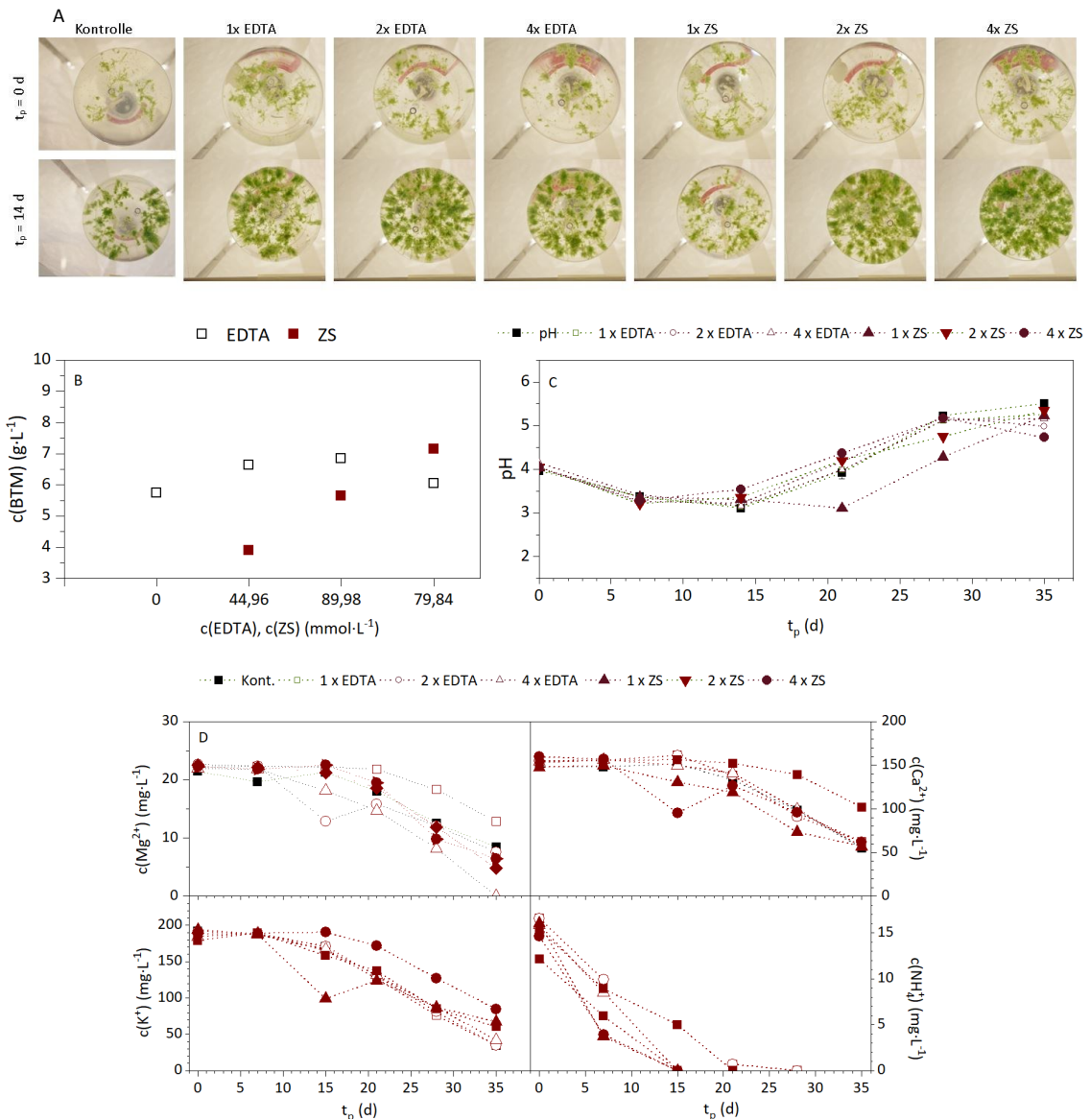


Abbildung 0-12: Experiment zur Untersuchung des Einflusses von Zitronensäure (ZS) und EDTA mit einer Konzentration von  $1,37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (1x),  $2,74 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (2x),  $5,48 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (4x) auf das Wachstum der Torfmoose *S. palustre*. A) Entwicklung der Mooskultur zum Anfang der Kultivierung und am Versuchstag  $t_p = 14 \text{ d}$ , photographisch aufgenommen durch den Kolbenboden. B) Endbiotrockenmassekonzentration, C) pH-Verläufe und D) Kationenkonzentrationen des Ammoniums  $c(\text{NH}_4^+)$ , Calciums  $c(\text{Ca}^{2+})$ , Magnesiums  $c(\text{Mg}^{2+})$  und Kaliums  $c(\text{K}^+)$ . Kultivierungsbedingungen:  $T_k = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $200 \text{ mL}$  1,0faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit  $1 \text{ \% CO}_2 (\text{v/v})$ ,  $t_p = 35 \text{ d}$ ,  $n=1$ , Anzahl an Kolben pro Parameter: 1,  $n=1$ .



EDTA und Zitronensäure weisen komplexierende Eigenschaften mit Eisen auf [275], wodurch das Eisen  $\text{Fe}^{3+}$  wasserlöslich bleibt. Eine positive Auswirkung der EDTA-Zugabe auf die Biomasseproduktion beobachtete beispielweise Krachler et al. [268] für *Chlorella vulgaris* oder Bocanegra et al. [276] für Setzlinge der Sonnenblume. Da im Knop-Medium kein Eisen-Chelat enthalten ist, wurde im nächsten Experiment die Zugabe von EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) mit einer Konzentration von  $1,37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  untersucht, welche äquimolar zur Eisenkonzentration war. Zur Erhöhung der Bindungsplätze wurde die EDTA-Konzentration in weiteren Versuchen verdoppelt und vervierfacht. Das Torfmoos *S. palustre* wurde unter Standardbedingungen kultiviert. Das Experiment wurde in einfacher Bestimmung durchgeführt und nicht wiederholt. Derselbe Experimentansatz wurde auch mit einem weiteren Fe-Chelato, der Zitronensäure [275] angewendet. Zitronensäure ist eine organische Säure des Ziträt-Zyklus [59], welche aus der Zelle ausgeschieden wird, um Eisenhydroxid aus den Böden zu lösen [277] und es an die Membran der Wurzelzellen zu transportieren. [278]

Unter Einbeziehung der Start-Inokulummenge mit einer Varianz von 30 % (siehe Tabelle 0-5) kann nicht eindeutig behauptet werden, dass die Zugabe der beiden Eisenchelatoren das Wachstum positiv beeinflusst, es ist jedoch zu erkennen, dass sich die Zugabe dieser nicht negativ auf die Torfmoose auswirkte (siehe Abbildung 0-12). Aufgrund der Tatsache, dass das Knop-Medium kein Fe-Chelat enthält, sollte dieser Versuch unter Verwendung einer zusätzlichen Fe-Analyse des Mediums, sowie des Eisengehalts in den Zellen wiederholt werden.

#### Experiment zum Kapitel Medium: Variation des Kulturmediums und der Medienbestandteile

Durch die Untersuchung der Biomassezusammensetzung wurde ein optimiertes Knop-Medium formuliert, in welchem die Menge der einzelnen Elemente des Knop-Mediums auf die elementare Zusammensetzung der Torfmooszelle (siehe Kapitel 3.5.2) abgestimmt waren. [5] Außerdem wurden folgende Medien getestet: 1) Knop-Medium mit Zugabe des Mikroelements Nickel in Form von  $15,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (Knop+Ni), da das Nickel als einziges Element im Vergleich zum Medium für Blattmoos *Physcomitrella patens* [101, 229] nicht vorhanden war, 2) P Medium verwendet bereits in photoautotrophen Kultivierung von Mikroalge *Chlorella vulgaris* [212], 3) P Medium mit den Stickstoff enthaltenden Bestandteile des Knop-Mediums ( $1,25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$  und  $4,23 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) statt  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $14,02 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),

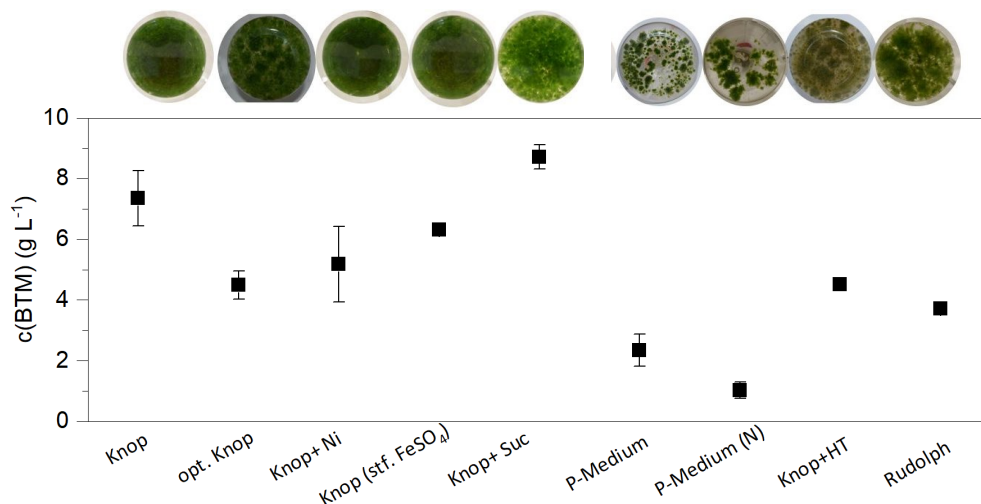


Abbildung 0-13: Biomassekonzentration des Torfmooses *S. palustre* kultiviert in verschiedenen Medien: Knop (Knop), optimiertes Knop (opt. Knop), Knop mit Zugabe von  $15,6 \text{ mg L NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (Knop +Ni), sowie mit sterilfiltriertem  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (st.  $\text{FeSO}_4$ ), mit Zugabe von  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Saccharose (Knop+Suc) in nicht begasten Schüttelkolben, sowie in P-Medium (P-Medium) mit Ammonium als Stickstoffquelle und mit Nitrat- und Ammoniumkonzentration dem Knop-Medium entnommen (P-Medium (N)), Knop-Medium erweitert um Hutner's Trace -Mikroelementelösung (Knop+HT) und in Rudolfscher Lösung mit wöchentlichem Medienwechsel (Rudolph). Angegeben ist die End-Biotrockenmasse bezogen auf das Medienvolumen. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 mL Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung mit  $\text{PPFD} = 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p = 35 \text{ d}$ . Anzahl an Kolben pro Parameter: 1, n=1. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte der Duplikate, die vertikalen Balken stellen die Standardabweichungen dar.

welches sich als einzige Stickstoffquelle negativ auf das Wachstum von Torfmoosen auswirken kann (siehe Kapitel 5.1), 4) Knop-Medium mit Hutner's Trace-Mikroelementenlösung aus der Mikroalgenkultivierung, mit der Annahme, dass die Torfmoose bei einem phototrophen Wachstum die gleichen Spurenelemente wie die Mikroalgen benötigen, 5) Rudolphsche Lösung [20] mit einem wöchentlichen Medienwechsel. Es wurde keine signifikante Steigerung der Produktivität von *S. palustre* (Abbildung 0-13) in all diesen Medien festgestellt.

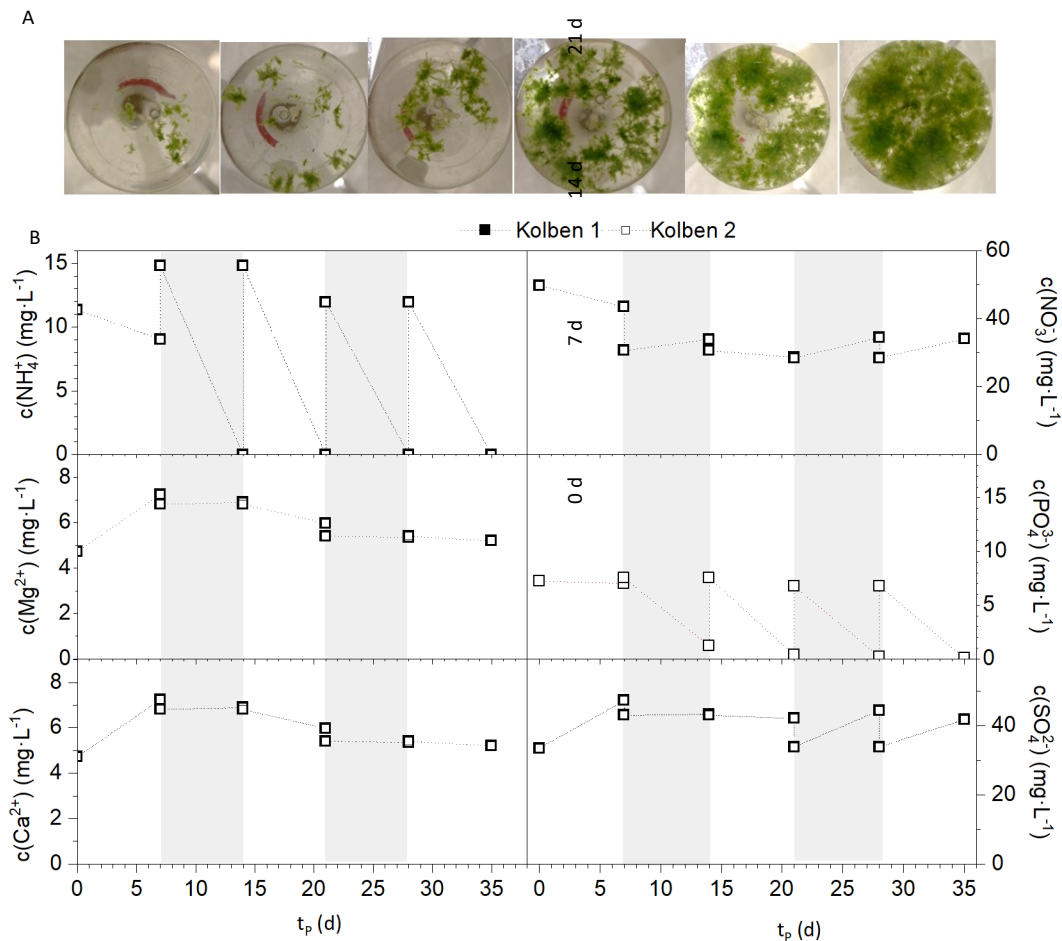


Abbildung 0-14: Prozessverlauf des Experiments zur Untersuchung der Rudolphschen Lösung auf das Wachstum der Torfmoose mit wöchentlichem Medienwechsel, A) durch den Kolbenboden photographisch aufgenommene Entwicklung der Mooskultur photographisch aufgenommen; B) Verläufe der Kationenkonzentrationen des Ammoniums  $c(\text{NH}_4^+)$ , Calciums  $c(\text{Ca}^{2+})$  und Magnesiums  $c(\text{Mg}^{2+})$ , sowie der Anionenkonzentration für Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), Phosphat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), und Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Der wöchentliche Medienwechsel ist anhand des farblichen Übergangs zwischen grau und weiß ersichtlich. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1$  °C, 250 mL Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v),  $t_p = 35$  d, Anzahl an Kolben pro Parameter: 2,  $n=1$ .

#### Experiment zum Kapitel: Einfluss der Stickstoffquelle und -konzentration auf das Wachstum der Torfmoose

*S. rubellum* wurde unter Standardbedingungen in zwei verschiedenen Medienvariationen kultiviert. Im ersten Ansatz wurde einfach konzentriertes Knop-Medium verwendet, bei welchem die Konzentration an Ammoniumnitrat auf 50 % ( $c = 0,625 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) reduziert wurde. Im zweiten Ansatz wurde  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  nicht zu Beginn der Kultivierung vorgelegt, sondern wöchentlich 2 mL an Ammoniumnitrat mit einer Konzentration von  $125 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  der Mooskultur zugegeben. Am Ende der Kultivierung, bzw. nach der vierten Zugabe wurde insgesamt die gleiche Menge an Ammonium dem



Medium zugegeben. Die Kultivierung wurde in zweifacher Bestimmung durchgeführt und nicht wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 0-15 zu entnehmen.

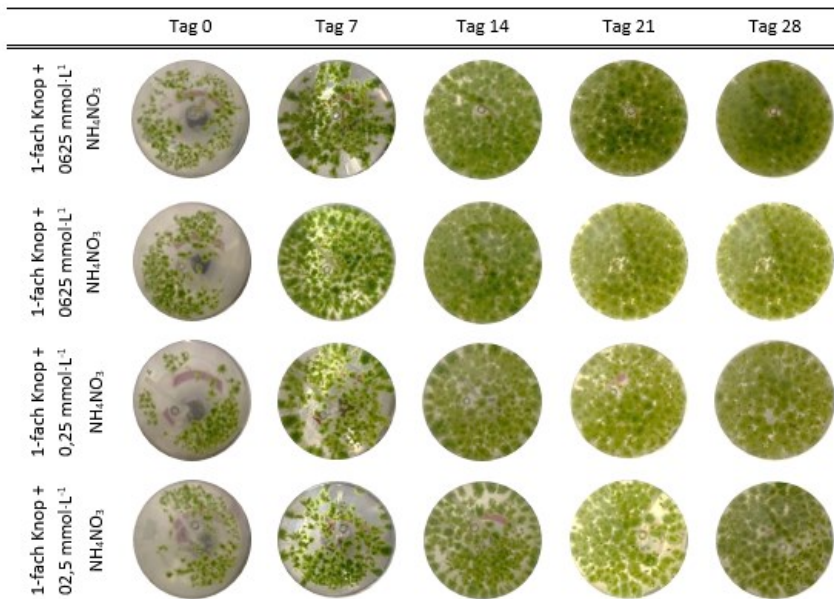


Abbildung 0-15: Fotografische Darstellung der Biomassezunahme aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums von *S. rubellum* (SR) in 1-fachem Knop-Medium mit  $0,625 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  und wöchentlicher Zugabe von  $2 \text{ ml } 125 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ . Die Endbiomassekonzentration lag bei  $c(\text{BTM})=4,98 \pm 0,47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  für Knop-Medium mit  $0,625 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$  und  $c(\text{BTM})=4,53 \pm 0,69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  für Knop-Medium mit wöchentlicher Zugabe von  $2 \text{ ml } 125 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ . Kultivierungsbedingungen:  $T_K=20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $250 \text{ Kulturmedium}$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$ , Dauerlicht,  $\text{PFD}= 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G= 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit  $1\% \text{ CO}_2 \text{ (v/v)}$ ,  $t_p= 28 \text{ d}$ , Anzahl an Kolben pro Parameter:  $2, n=1$ .

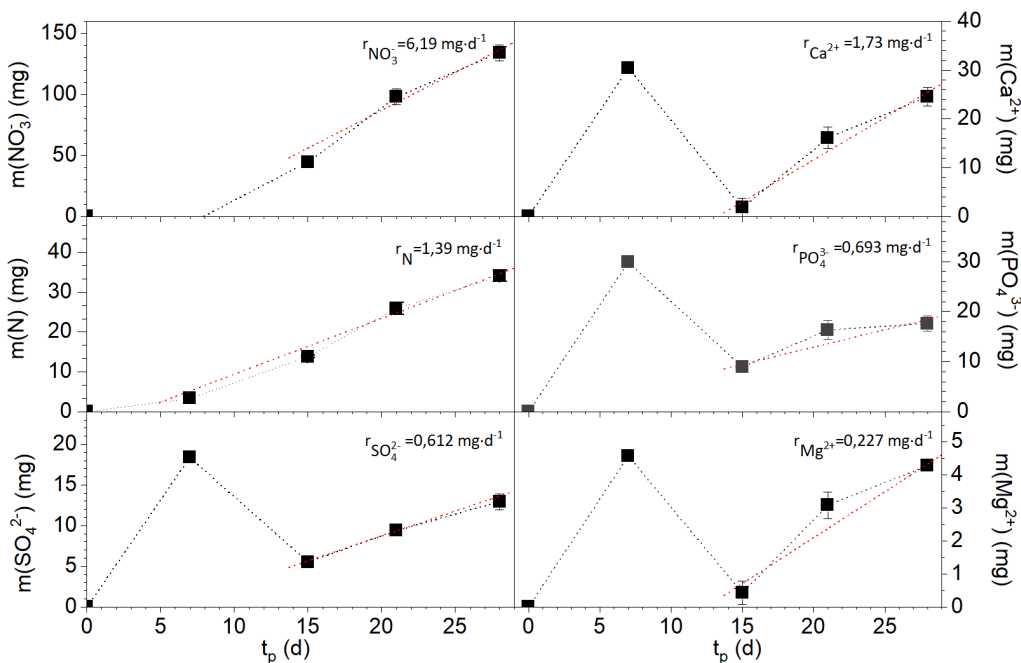


Abbildung 0-16: Aufnahmemenge der Ionen: Nitrat  $m(\text{NO}_3^-)$ , Phosphat  $m(\text{PO}_4^{3-})$ , Sulfat  $m(\text{SO}_4^{2-})$ , Calcium  $m(\text{Ca}^{2+})$ , Magnesium  $m(\text{Mg}^{2+})$ , und Stickstoff  $m(\text{N})$  des Kontrollansatzes von *S. palustre*. Die Ausgleichgerade wurde über einen linearem Fit in Origin von  $t_p=14 \text{ d}$  bis  $28 \text{ d}$  erstellt. Die Steigung  $r$  stellt die durchschnittliche Aufnahmerate der einzelnen Ionen dar. Kultivierungsbedingungen:  $T_K=20 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $250 \text{ Kulturmedium}$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$ , Dauerlicht,  $\text{PFD}= 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G= 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit  $1\% \text{ CO}_2 \text{ (v/v)}$ ,  $t_p= 28 \text{ d}$ , Anzahl an Kolben pro Parameter:  $2, n=1$ .

## Experiment zum Kapitel: Variation der Morphologie

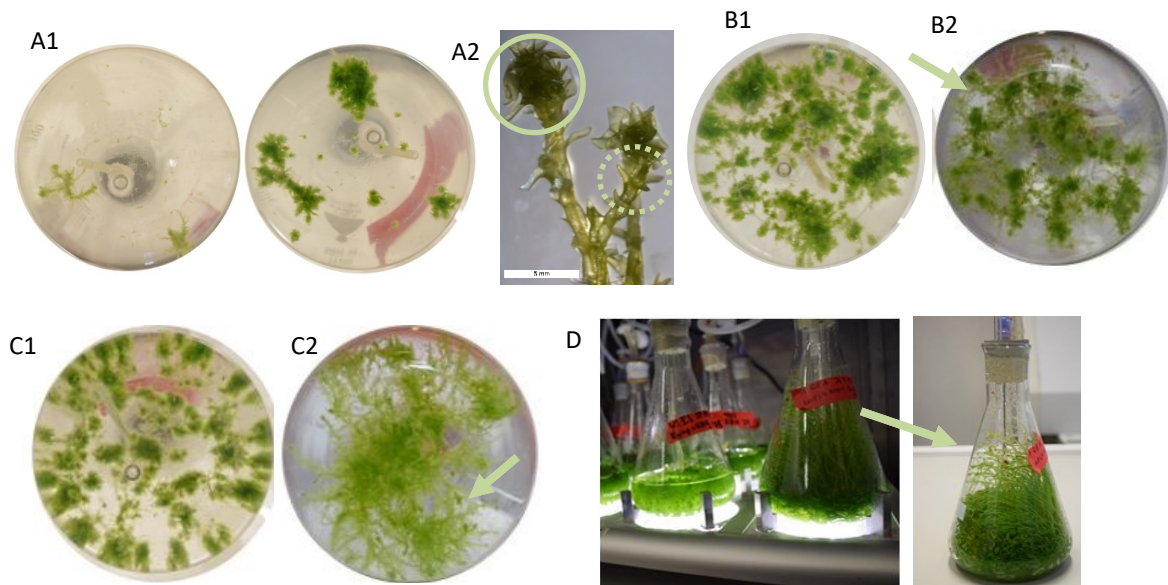


Abbildung 0-17: Vergleich der Morphologie von *S. palustre* kultiviert in Schüttelkolben. Das Torfmoos wurde unter Standardbedingungen kultiviert und in jedem Versuch ein Kultivierungsparameter verändert. A1) Ansicht der Moospflanze am  $t_p = 0$  d und  $t_p = 17$  d unter Standardbedingungen. Starke Beblätterung des Inokulums sowie Bildung von Innovationen und Capitula. A2) Nahaufnahme von *S. palustre* mit einem Binokular (Leica M420). Der gezeigte Skalenbalken entspricht 5 mm. Ein Capitulum ist mit dem durchgehenden grünen Kreis und eine Innovation mit dem gepunkteten Kreis markiert. B) Ansicht der Mooskultur ( $t_p = 21$  d) kultiviert bei einer Schüttelfrequenz von 80 rpm (B1) und 0 rpm (B2). Hierbei war eine vermehrte Ästchenbildung bei dem ungeschüttelten System zu beobachten. C) Ansicht einer unter Standardbedingungen gewachsenen Mooskultur ( $t_p = 15$  d) (photoautotroph) (C1) und ohne Lichtzufuhr im Knop-Medium mit  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Saccharose (C2). Unter heterotrophen Bedingungen ist eine vermehrte Bildung der Ästchen sowie eine Streckung der Stämmchen ohne Bildung von Capitula ersichtlich. D) Ansicht von nach  $t_p = 50$  d aus dem Medium herausgewachsenen Torfmoospflanzen, welche unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Die Torfmoose sind gegen Gravitationsfeld gewachsen und streckten sich zur Lichtquelle. Kultivierungsbedingungen:  $T_K = 20 \pm 1$  °C,  $V_M = 250$  mL 1,0-faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v). Anzahl an Kolben pro Parameter: 1,  $n = 1$ .

## Moosbettreaktor

### Material und Methoden

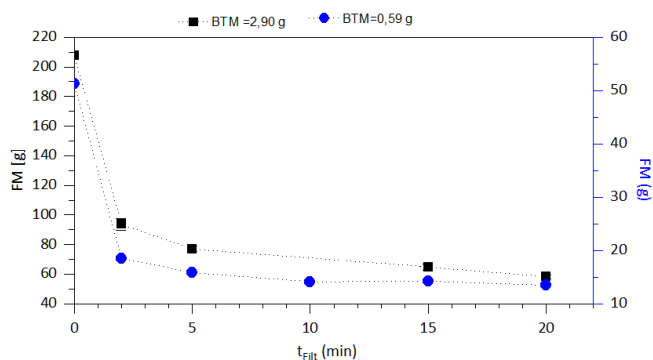


Abbildung 0-18: Abtropfgewicht abhängig von der Filtrationszeit bestimmt für zwei verschiedene Torfmoosmengen (BTM). Dafür wurden das Medium von den *Sphagnum*-Pflanzen über Rundfilter (Porendurchmesser  $1,6 \mu\text{m}$ ; Typ 14a, Carl Roth) aus Cellulose in einem Büchnertrichter bei einem mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe erzeugten Unterdruck für eine Dauer zwischen 0 und 20 Minuten abfiltriert.

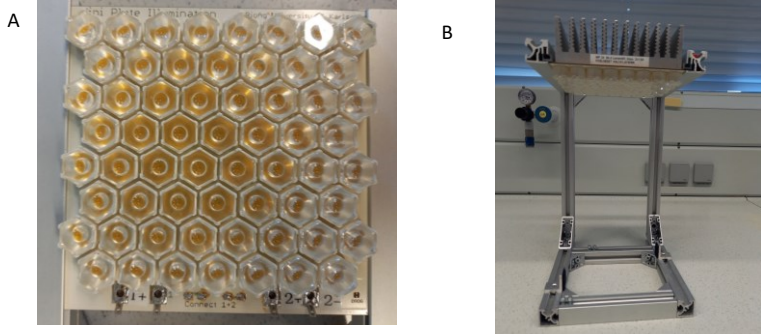


Abbildung 0-19: LED-Modul des Moosbettreaktors. A) Die Lichtfläche bestehend aus 60 warmweißen LEDs und B) Reaktorhalterung mit dem eingebauten LED-Modul

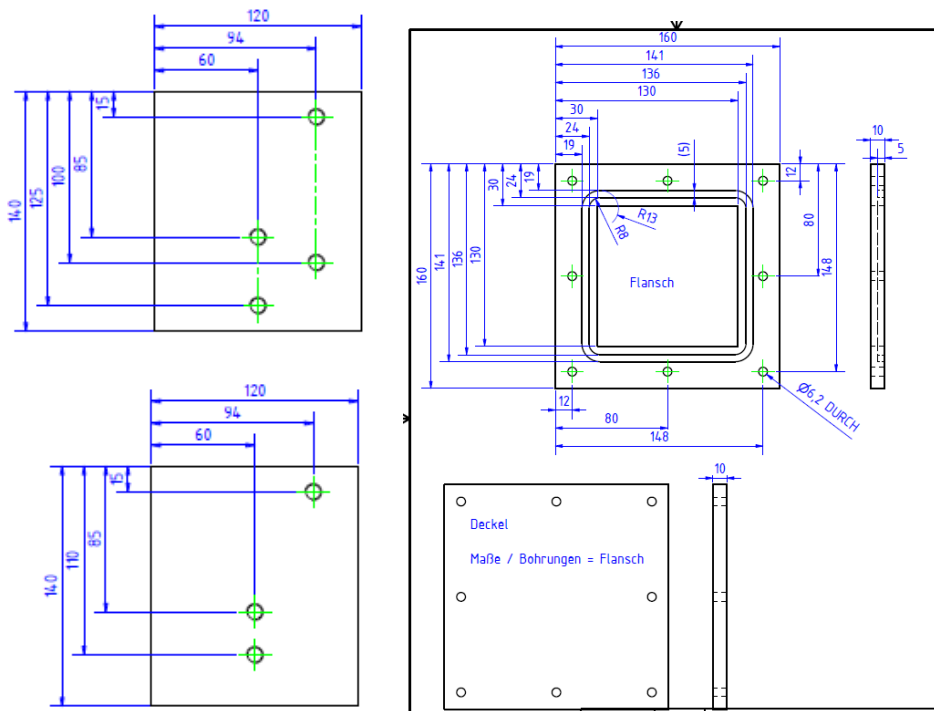


Abbildung 0-20: Technische Zeichnung des Moosbettreaktors

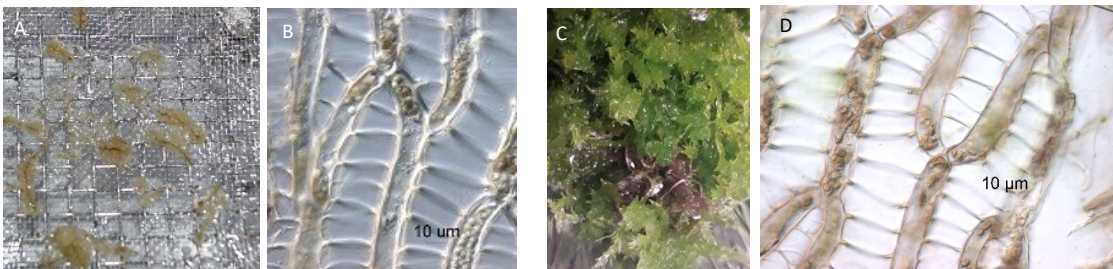


Abbildung 0-21: Vergleich der Mooskultur *S. palustre* nach dem Kontakt mit Materialien aus Edelstahl 1.4301/1.4541 (A,B) und 1.4751. (C,D). Abgebildet sind photographische Aufnahmen der Torfmoose nach dem Kultivierungsende :  $t_p=2$  d (A) im Moosbettreaktor und  $t_p=35$  d (C) im Schüttelkolben; und mikroskopische Aufnahme des Moosblattes unter Lichtmikroskop mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) mit einer 40-fachen Vergrößerung (B, D).

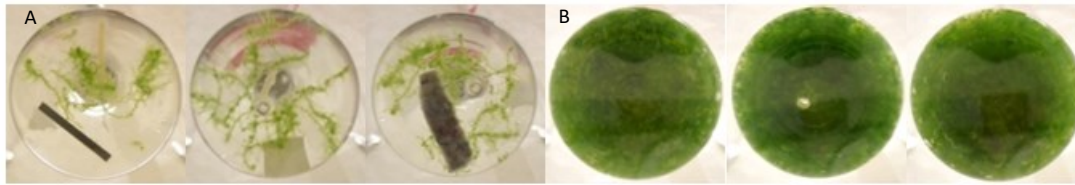


Abbildung 0-22: Experiment zur Bioverträglichkeit von verschiedenen Materialien mit *S. palustre*. A) Ansicht der Mooskultur zur Prozesszeit  $t_p= 0$  und B)  $t_p= 33$  d. Verwendete Materialien (von links): 3D-gedruckter Materialausschnitt aus Polylactid (Gern TEC Pro, Deutschland), Kunststoffgitter (PA6.6, Maschenweite 100  $\mu\text{m}$ , Fadendicke 77  $\mu\text{m}$ , Bückmann, Deutschland), Speichervlies (Polypropylen 450, NIRA GmbH, Deutschland). Kultivierungsbedingungen:  $T_K= 20\pm 1$  °C,  $V_M=250$  mL 1,0faches Knop-Medium,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD}= 100$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_G= 20$   $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  mit 1 %  $\text{CO}_2$  (v/v). Anzahl an Kolben pro Parameter: 1,  $n=1$ .

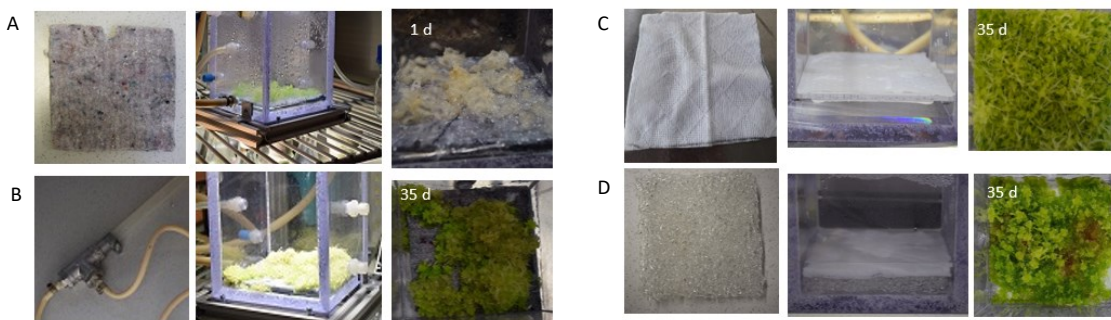


Abbildung 0-23: Etablierung des Wachstum von Torfmoosen im Moosbettreaktor mit verschiedenen Moosträgern. A) von links: Ansicht des Moosträgers : Polypropylen-Speichervlies (500, Nira GmbH & Co.KG, Deutschland), nicht vorgewaschen von oben; Moosträger im MBR; Reaktion des Inokulums von *S. palustre* auf das Material ( $t_p= 1$  d). B) von links: Ansicht der als Pulsationsdämpfer verwendeten T-Verschraubung (1.4408, V4A, Deutschland), welcher an die Zerstäubungsdüse angeschlossen war; Moosträger (Polypropylen-Speichervlies) im MBR; Reaktion von *S. palustre* auf das Material ( $t_p= 35$  d). C) von links: Ansicht des Moosträgers : Staubfilter (Edeka E10, Deutschland) positioniert auf einer Lochplatte (Polycarbonat, Glas Schmidt, Deutschland); Moosträger im MBR; Reaktion von *S. palustre* auf das Material ( $t_p= 35$  d). D) von links: Ansicht des Moosträgers: Glasgitter mit dem Staubfilter; Moosträger im MBR; Reaktion von *S. palustre* auf das Material ( $t_p= 35$  d).

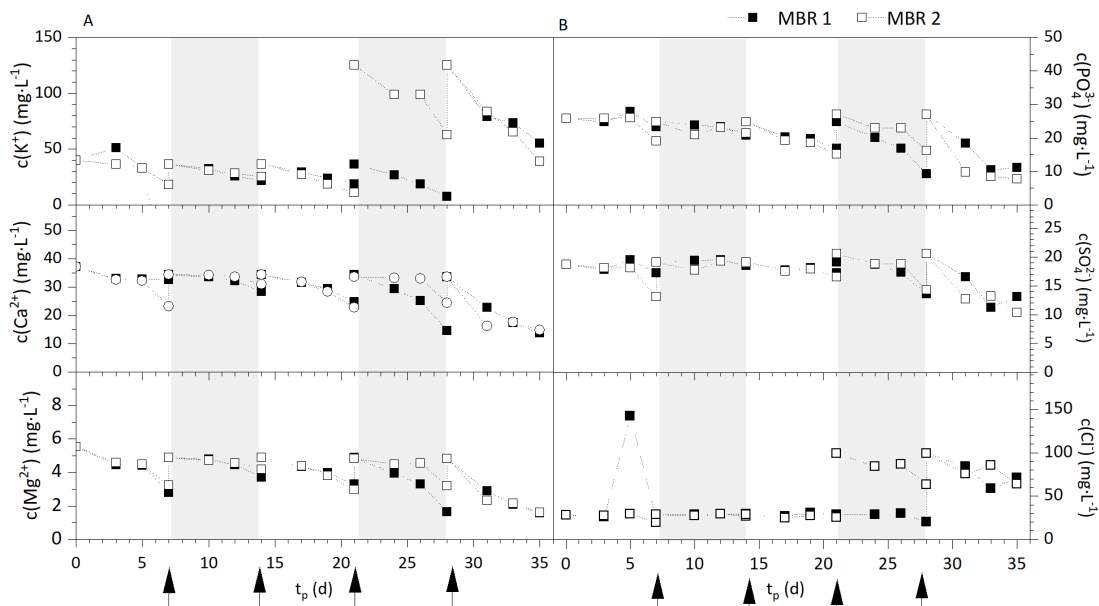


Abbildung 0-24: Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von *S. palustre* im Moosbettreaktor aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums von Torfmoosens für (A) die Kationen: Kalium  $c(\text{K}^+)$ , Calcium  $c(\text{Ca}^{2+})$  und Magnesium  $c(\text{Mg}^{2+})$  sowie für B) die Anionen: Phosphat  $c(\text{PO}_4^{3-})$ , Sulfat  $c(\text{SO}_4^{2-})$  und Chlorid  $c(\text{Cl}^-)$ . Der wöchentliche Medienwechsel ist mit den Pfeilen gekennzeichnet. Kultivierungsparameter:  $T_K= 22 \pm 0,6$  °C,  $\text{PFD}= 300$   $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_G= 1,5$   $\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $X_{\text{CO}_2}= 3$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}= 4$  (ohne pH-Regelung),  $t_p=35$  d,  $n=1$ .



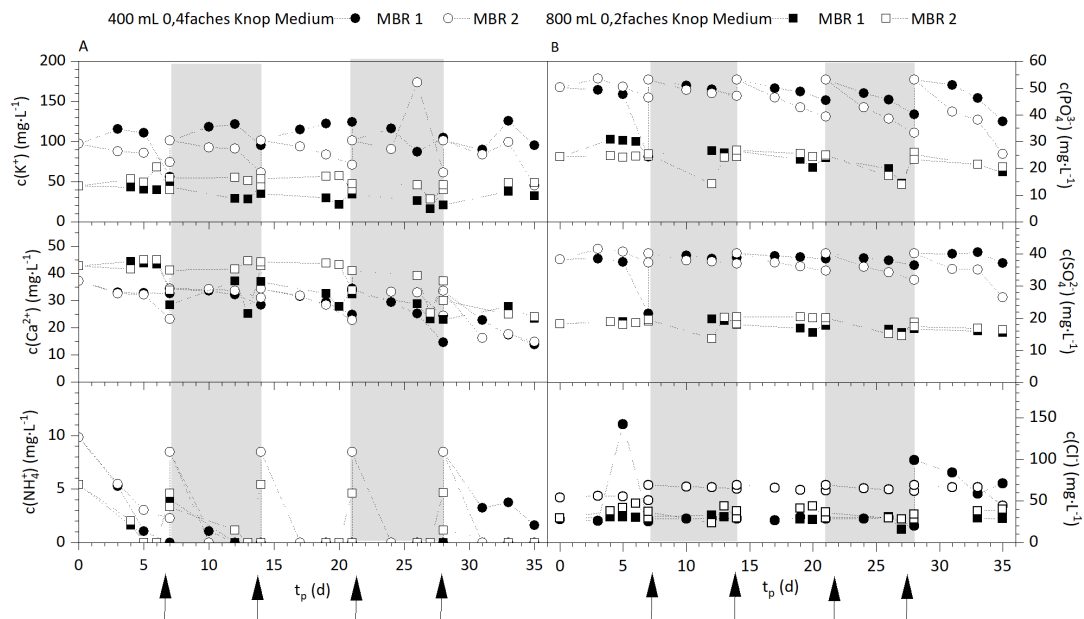


Abbildung 0-25: Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von *S. palustre* im Moosbettreaktor aus dem Experiment zur Etablierung des Kulturmediums. Abgebildet sind die Konzentrationsverläufe im 0,2fachen Knop-Medium mit 800 mL und im 0,4fachen Knop-Medium mit 400 mL für A) die Kationen: Kalium  $c(K^+)$ , Calcium  $c(Ca^{2+})$  und Ammonium  $c(NH_4^+)$ , sowie für B) die Anionen: Phosphat  $c(PO_4^{3-})$ , Sulfat  $c(SO_4^{2-})$  und Chlorid  $c(Cl^-)$ . Der wöchentliche Medienwechsel ist mit den Pfeilen gekennzeichnet. Kultivierungsparameter:  $T_K = 23,5 \pm 0,8 \text{ } ^\circ\text{C}$ ,  $PFD = 300 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 1,5 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{CO_2} = 3 \%$ ,  $pH_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 35 \text{ d}$ ,  $n=1$ .

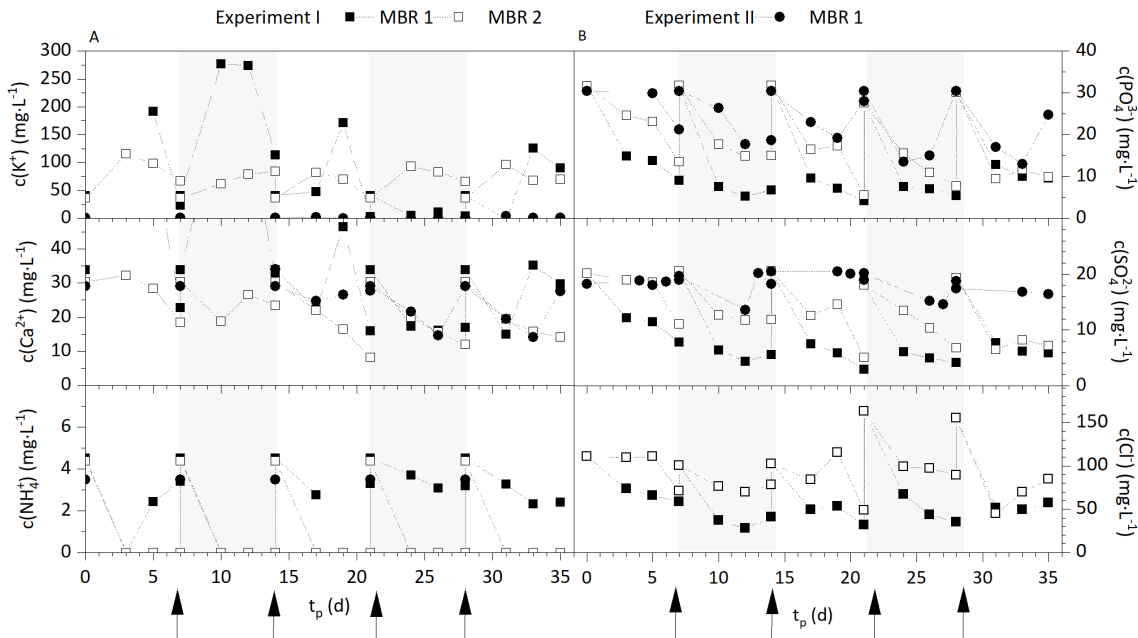


Abbildung 0-26: Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von *S. palustre* im Moosbettreaktor aus dem Experiment zur Etablierung des Kulturmediums in 800 mL des 0,2fachen Knop-Mediums mit  $0,216 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Mg}(\text{NO}_3)_2$  mit (A) die Kationen: Kalium  $c(K^+)$ , Calcium  $c(Ca^{2+})$  und Ammonium  $c(NH_4^+)$  und B) die Anionen: Phosphat  $c(PO_4^{3-})$ , Sulfat  $c(SO_4^{2-})$  und Chlorid  $c(Cl^-)$ . Der wöchentliche Medienwechsel ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Kultivierungsparameter:  $T_K = 23,5 \pm 0,8 \text{ } ^\circ\text{C}$ ,  $PFD = 300 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 1,5 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{CO_2} = 3 \%$ ,  $pH_{\text{Anfang}} = 4$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 35 \text{ d}$ ,  $n=2$ .

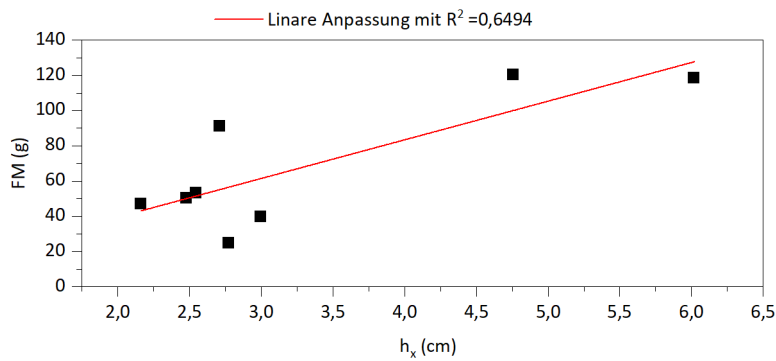


Abbildung 0-27: Korrelation zwischen der Wuchshöhe und der Feuchtmasse des Torfmooses *S. palustre* produziert im MBR. Die Ausgleichsgerade wurde mittels linearem Fit in Origin erstellt.

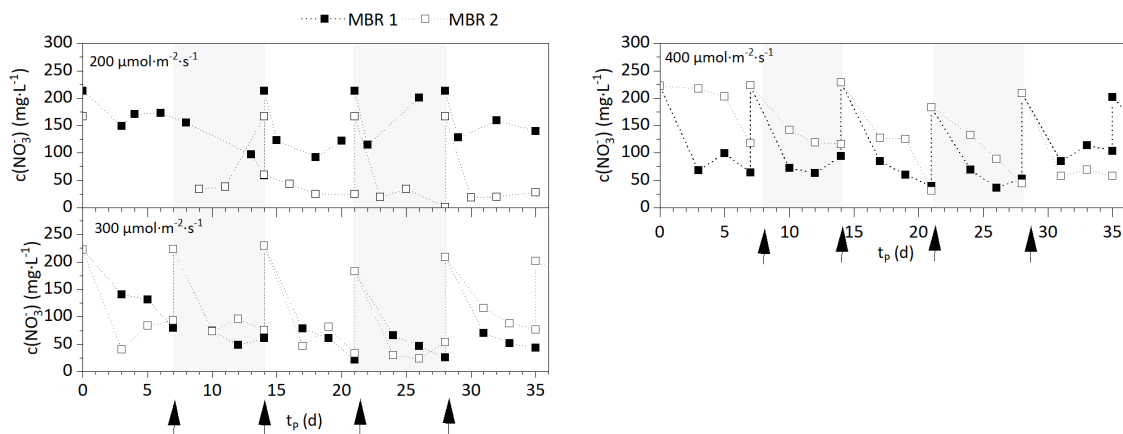


Abbildung 0-28: Verlauf der Nitratkonzentration  $c(\text{NO}_3^-)$  aus dem Experiment zur Untersuchung des Einflusses von der eingestrahelten Photo­nenflussdichte auf das Wachstum des Torfmooses *S. palustre*. Abgebildet sind die Konzentrationen der beiden Duplikate (MBR 1, MBR 2). Kultivierungsparameter:  $T_K = 21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 1,5 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 3\%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 35 \text{ d}$ ,  $n = 1$ .

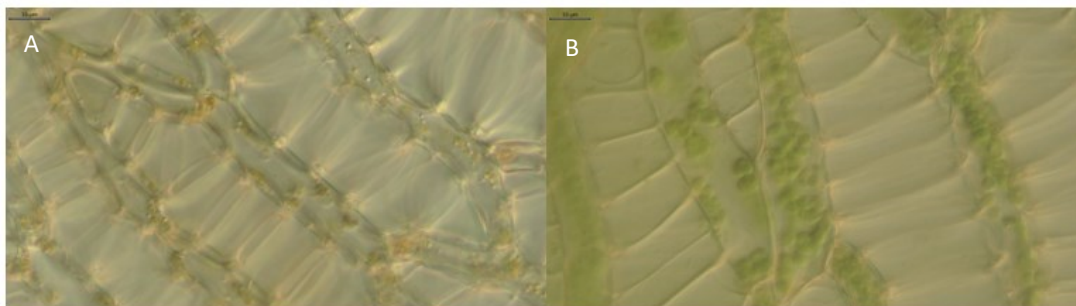


Abbildung 0-29: Mikroskopische Aufnahme eines Astblattes des Mooses *S. palustre* als Draufsicht auf die Blattunterseite aufgenommen mit dem Lichtmikroskop bei Differentialinterferenzkontrast (DIC) mit 40-facher Vergrößerung. A) Probe: 0,2faches 800 mL Knop-Medium aus dem Experiment zur Etablierung des Kultivierungsmedium, B) Probe: Kultivierung ohne Vorbegasung des Kulturmediums.

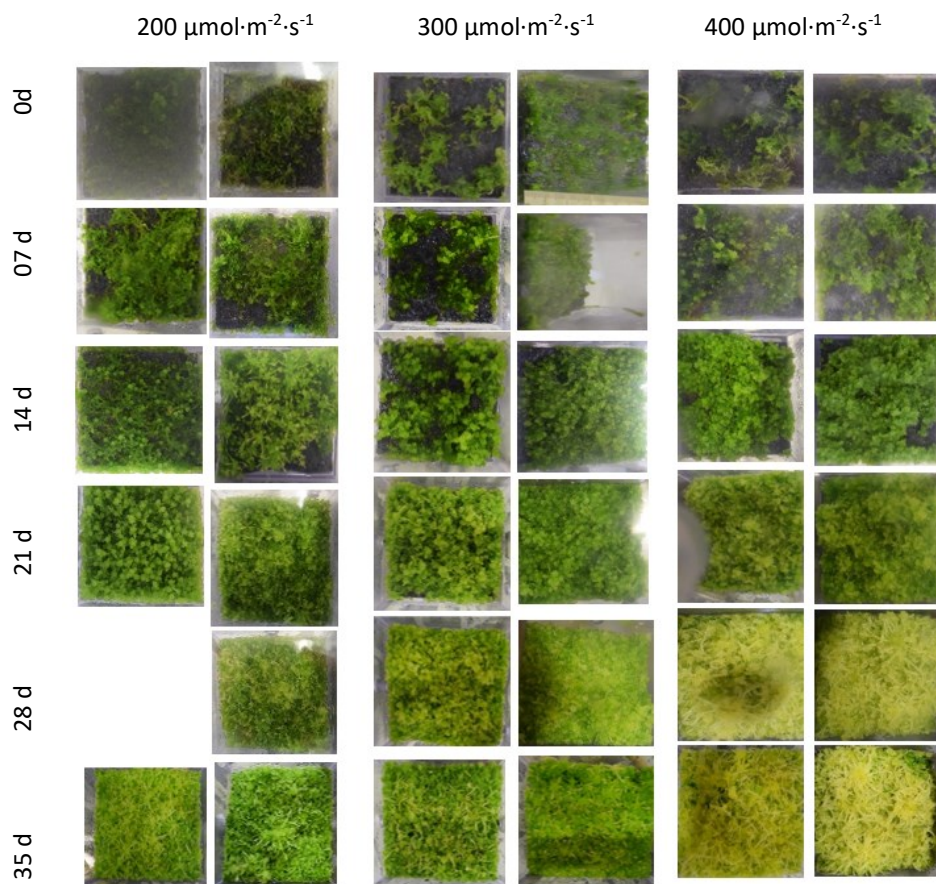


Abbildung 0-30: Bildlicher Wachstumsverlauf der Torfmoosart *S. palustre* im Moosbettreaktor aus dem Experiment zur Untersuchung des Einflusses von drei unterschiedlichen Photonenflussdichten. Abgebildet ist die Ansicht durch den Reaktordeckel der Moosbettreaktoren während der Kultivierung in einem Prozesszeitraum von fünf Wochen. Die Animpfmenge  $m_{\text{FM},0}$  betrug  $7,82 \pm 3,41$  g ( $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $4,26 \pm 0,52$  g ( $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und  $3,51 \pm 0,28$  g ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), Kultivierungsparameter:  $T_K = 21 \pm 2$  °C, Dauerbeleuchtung,  $V_g = 1,5$  L·h<sup>-1</sup>,  $x_{\text{CO}_2} = 3$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35$  d,  $n = 1$ .

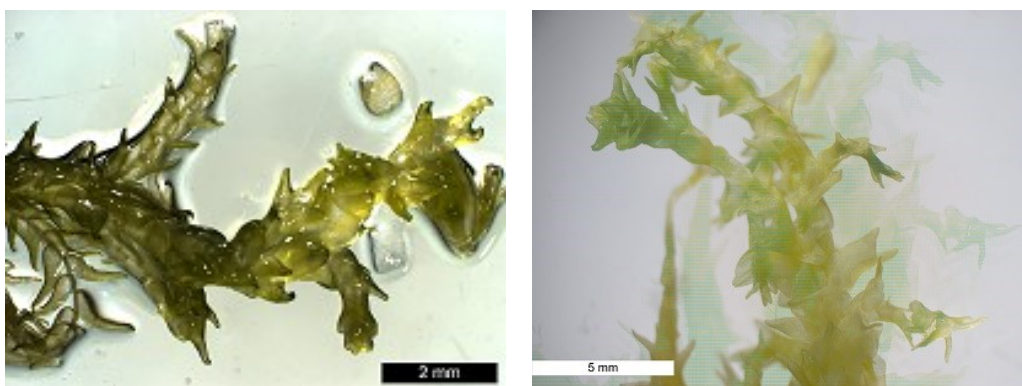


Abbildung 0-31: Aufnahme von *S. palustre* (rechts) und *S. rubellum* (links) mittels eines Binokulars.



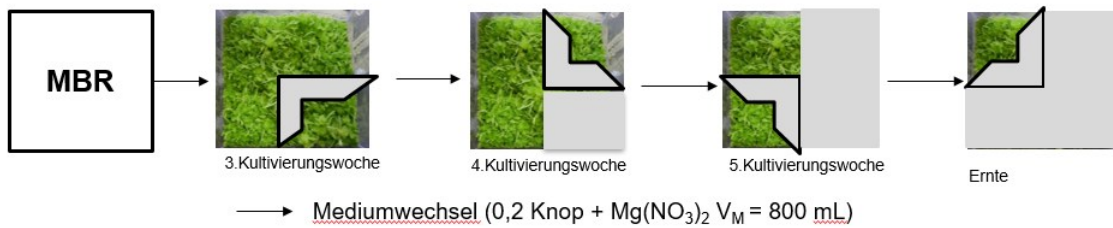


Abbildung 0-33: Schematische Darstellung des Experiments zur Ermittlung der Wachstumskurve von *S. palustre* im Moosbettreaktor. Nach zwei Wochen Kultivierung wurde jeweils vor den weiteren Medienwechsel in einer Sterilwerkbank 1/4 der produzierten Biomasse aus dem Reaktor entnommen und der Rest wurde weiter unter Standardbedingungen kultiviert. Kultivierungsparameter: PFD = 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   $T_K = 23,5 \pm 0,1$  °C,  $V_g = 1,5$  L·h<sup>-1</sup>,  $x_{\text{CO}_2} = 1$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35$  d,  $n = 1$ .

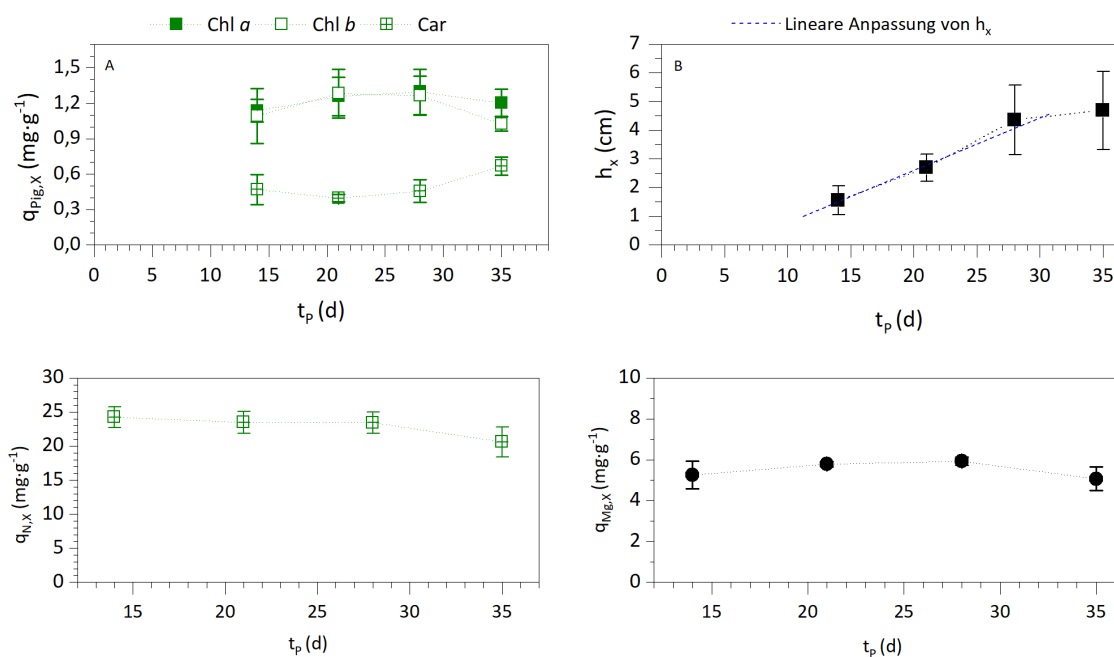


Abbildung 0-32: Verlauf des spezifischen Pigmentanteiles (A), der durchschnittlichen Wuchshöhe (B), des Stickstoff- ( $q_{N,x}$ ) und des Magnesiumgehalts ( $q_{Mg,x}$ ) im Biomassesegment aus dem Versuch zur Ermittlung der Wachstumskurve von *S. palustre*. Das Biomassesegment entspricht der Biomasse, welche auf 1/4 der Reaktorfläche wuchs. Die abgebildeten Werte sind die Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung ( $n = 3$ ). Die Ausgleichsgerade wurde mit einem linearen Fit in Origin erstellt. Kultivierungsparameter: PFD = 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$   $T_K = 23,5 \pm 0,1$  °C,  $V_g = 1,5$  L·h<sup>-1</sup>,  $x_{\text{CO}_2} = 1$  %,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800$  mL und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35$  d,  $n = 1$ .

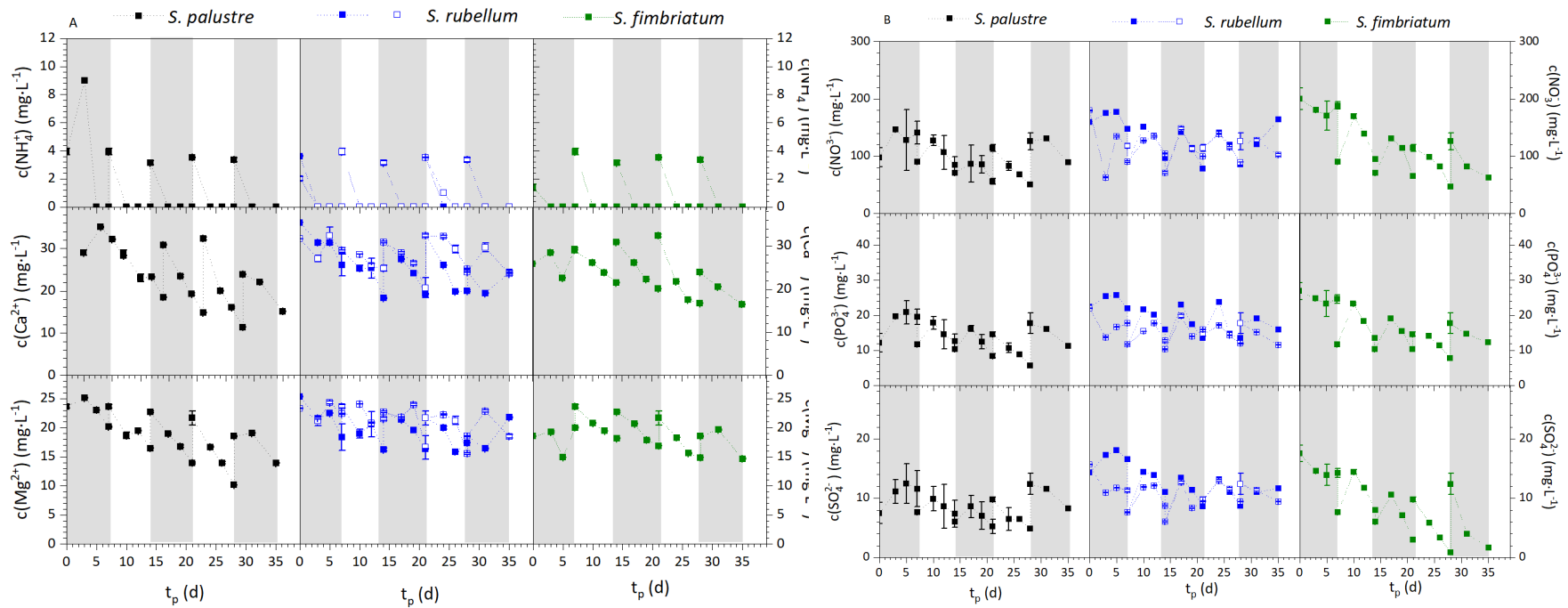


Abbildung 0-34 Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von *S. palustre* (SP), *S. fimbriatum* (SF) und *S. rubellum* (SR) im Moosbettreaktor mit A) Kationenkonzentrationen des Ammoniums  $c(\text{NH}_4^+)$ , Calciums  $c(\text{Ca}^{2+})$  und Magnesiums  $c(\text{Mg}^{2+})$ . Sowie B) Anionenkonzentrationen des Nitrats  $c(\text{NO}_3^-)$ , Phosphats  $c(\text{PO}_4^{3-})$ , und Sulfats  $c(\text{SO}_4^{2-})$ . Der wöchentliche Medienwechsel fand jeweils an den farblich markierten Übergängen zwischen grau und weiß statt. Kultivierungsparameter:  $\text{PFD} = 200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $T_K = 23,5 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V_g = 1,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,  $X_{\text{CO}_2} = 1 \%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4$  (ohne pH-Regelung), MBR-Medium mit  $V_m = 800 \text{ mL}$  und wöchentlichem Medienwechsel,  $t_p = 35 \text{ d}$ ,  $n = 1$ .

## Wave-Photobioreaktor

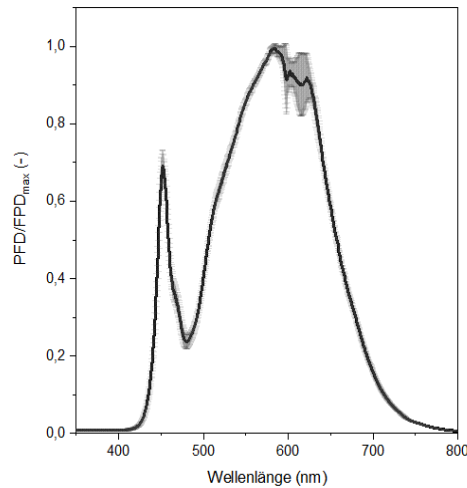


Abbildung 0-35: Emissionsspektrum der LED-Leuchtmittel (MASTER LEDspot PAR20, Philips, Niederlande), welche im Lichtmodul zur Beleuchtung des Wave-Photobioreaktors verwendet wurden. Das Emissionsspektrum des Lichtmoduls wurde mit dem Spektrometer anhand einer Dreifachbestimmung in einem Abstand von 30 cm senkrecht zum LED-Modul aufgenommen. Die x-Achse beschreibt die Wellenlänge des ausgestrahlten Lichts, an der y-Achse wird die relative Lichtintensität dargestellt. Die schwarze Linie stellt der Mittelwert der relativen Intensität dar, während die graue Fläche die Standardabweichung der jeweiligen Messungen wiedergibt.

### Zusammenbau des Wave-Photobioreaktors

Für die Anpassung des Kunststoffbeutels für die Torfmooskultivierung waren Anschlüsse für die  $pO_2$ -Sonde und für die pH-Sonde notwendig. Dafür wurden in die Reaktorfolie drei kreisrunde Löcher mit dem Durchmesser der Schottverschraubungen geschnitten. Die Anschlüsse bestanden aus dem Kunststoff-Sondendurchgang und dem Edelstahl-Sondenadapter (siehe Abbildung 0-36).

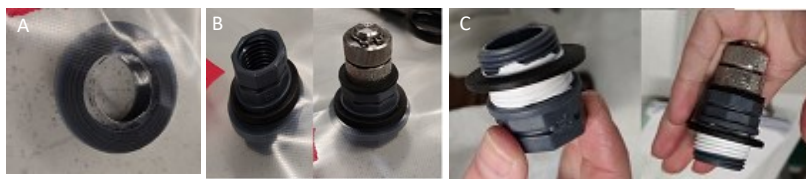


Abbildung 0-36: Sondenanschlüsse des WavePhotobioreaktors. A: Dichtungsring im Reaktorinneren. B: Sondendurchgang und Sondenadapter. C: Abdichtung der Verschraubung mit einem Teflonband und Dichtungsring.

Als Sondenadapter wurden zwei ineinander geschraubte Edelstahl-Sondenadapter ( $\varnothing$  20 mm, BioEngineering AG, Schweiz) verwendet, welche auf einen Sondendurchgang aufgeschraubt wurden. Der Sondendurchgang bestand aus einer Polypropylen-Mutter (Schottverschraubung G 3/4", Landefeld Druckluft und Hydraulik GmbH, Deutschland), welche im Reaktorinneren positioniert war und einem Polypropylen-Gewindestück (Reduziernippel G 3/4" (Außengewinde) – G 1/2" (Innengewinde), Landefeld Druckluft und Hydraulik GmbH, Deutschland). Das Gewindestück wurde über zwei Flachdichtungsringe ( $\varnothing$  25 mm, PVC DR 25 EPDM, Landefeld Druckluft und Hydraulik GmbH, Deutschland) auf die Mutter geschraubt. Die einzelnen Teile wurden folgend in die Reaktorwand integriert. Um die innen liegenden Schottverschraubungen in den Reaktor einzubringen, wurde ein 5 cm langer Schnitt (siehe Abbildung 0-38) in den oberen Teil der Reaktorfolie gesetzt. Die Schottverschraubung und der

poröse Begasungsschlauch wurden durch den Schnitt in das Reaktorinnere eingebracht. Anschließend wurde der Schnitt mit einem Folienstück (8 x 3 cm) aus einem weiteren Kunststoffbeutel überklebt. Die überstehende Fläche wurde durch einen Sekundenkleber mit Aktivator (Plastix, Pattex, Deutschland) verklebt. Der Grund für die Verwendung dieses Klebers liegt daran, dass die Klebnaht des Klebstoffs am besten dicht hielt. Um die Dichtigkeit des *Wave*-Photobioreaktors und der Peripherie zu testen, wurde der Reaktor mit 3 L VE-Wasser gefüllt und für 12 Stunden lang mit einem Luftvolumenstrom von  $1,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  begast.

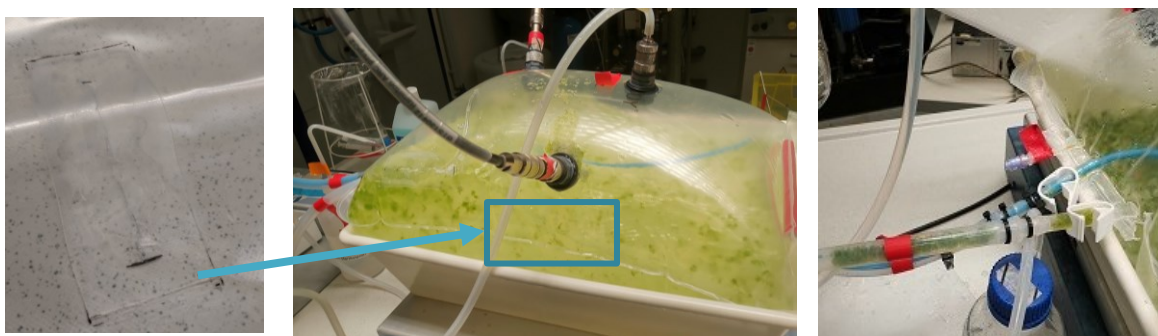


Abbildung 0-38: Inbetriebnahme des *Wave*-Photobioreaktors. Links: die mit Kleber behandelte Stelle. Mitte: in Betrieb genommener 20 L *Wave*-Photobioreaktor mit markierter Klebestelle. Rechts: des mit Torfmoos befüllten Schlauchs der Kondensatrückführung

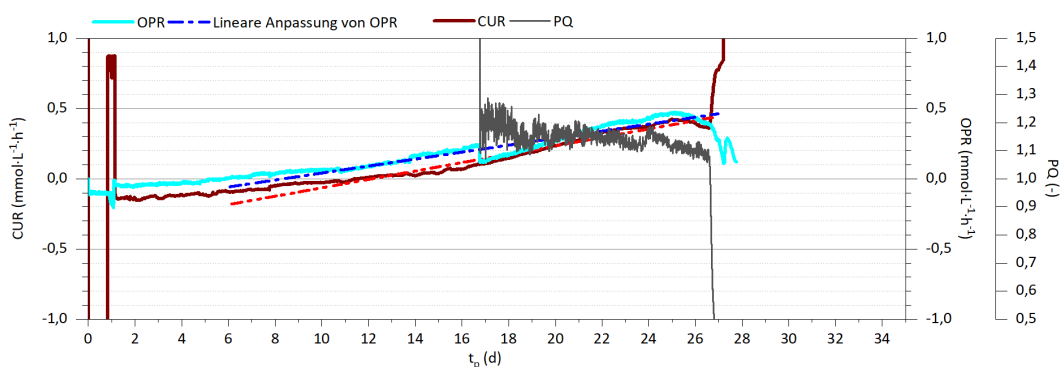


Abbildung 0-37: Prozessverlauf eines Batchprozesses im 3 L *Wave*-Bag-Reaktor mit *S. palustre* mit volumetrischer  $\text{CO}_2$ -Aufnahmerate CUR,  $\text{O}_2$ -Produktionsrate OPR und Photosynthesekoeffizienten PQ. Die gestrichelten Linien stellen die Ausgleichsgeraden dar, welche über eine lineare Regression mit der Software OriginPro® ab dem Versuchstag  $t_p = 9 \text{ d}$  bis zum 25 d (OPR) und ab  $t_p = 11 \text{ d}$  bis 25 d (CUR) bestimmt worden. PQ ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen OPR und CUR. Kultivierungsparameter: 3 L Knop-Medium mit  $1,25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ , Dauerbeleuchtung,  $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $V_g = 50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 2 \%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4$  (ohne pH-Regelung),  $t_p = 30 \text{ d}$ .

## Schlauchreaktor

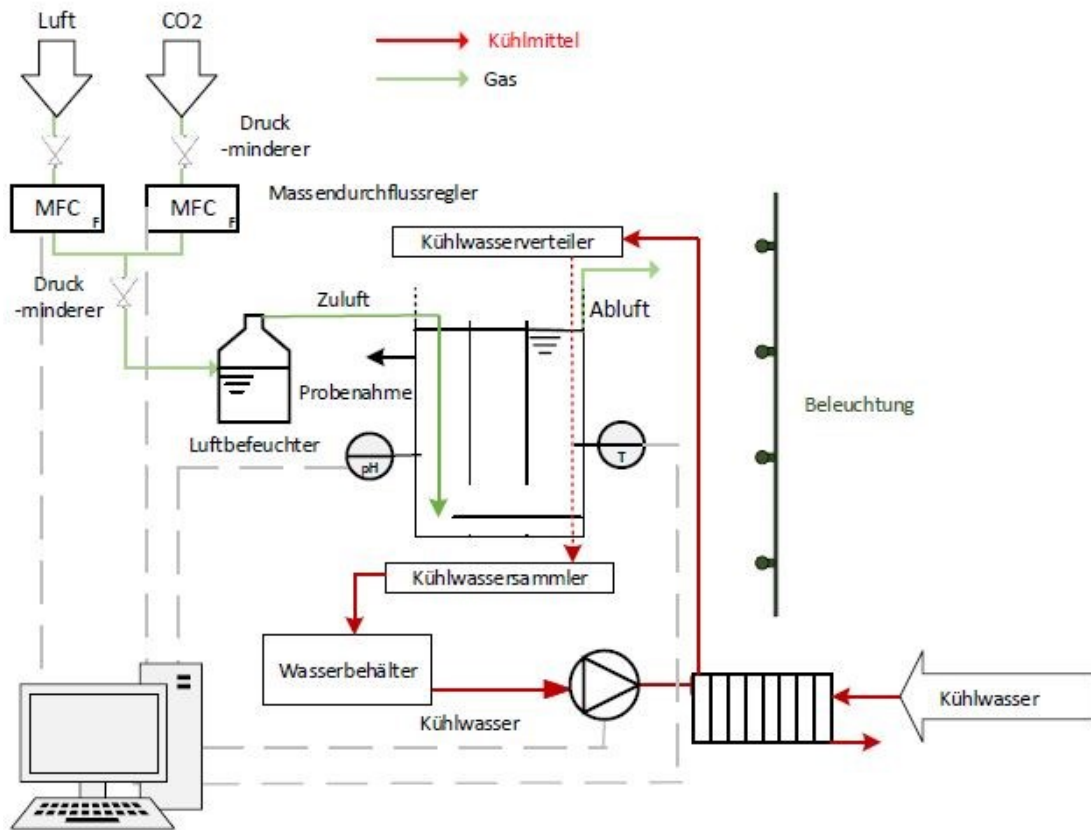


Abbildung 0-40: R&I- Fließschema des Wave-Photobioreaktors. In Grün sind die Gasströme, und in rot der Kühlwasserkreislauf dargestellt

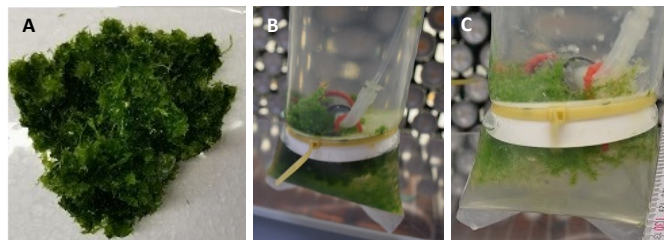


Abbildung 0-39: Bodensatz der im Batch-Verfahren betriebenen Schlauchreaktoren aus dem Experiment zur Etablierung des Wachstums. A) kompakte Torfmoosschicht aus dem 60 L Schlauchreaktor ( $t_p=35$  d), B: abgesetzte Torfmoose in der 2 L Blasensäule ( $t_p=13$  d) und C) in der 2 L Blasensäule mit Hindernissen ( $t_p=13$  d). Kultivierungsparameter:  $T_R=20^\circ\text{C}$ ,  $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $V_g=2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2}=1\%$ ,  $\text{pH}_{\text{Anfang}}=4,0$  (ohne pH-Regelung).

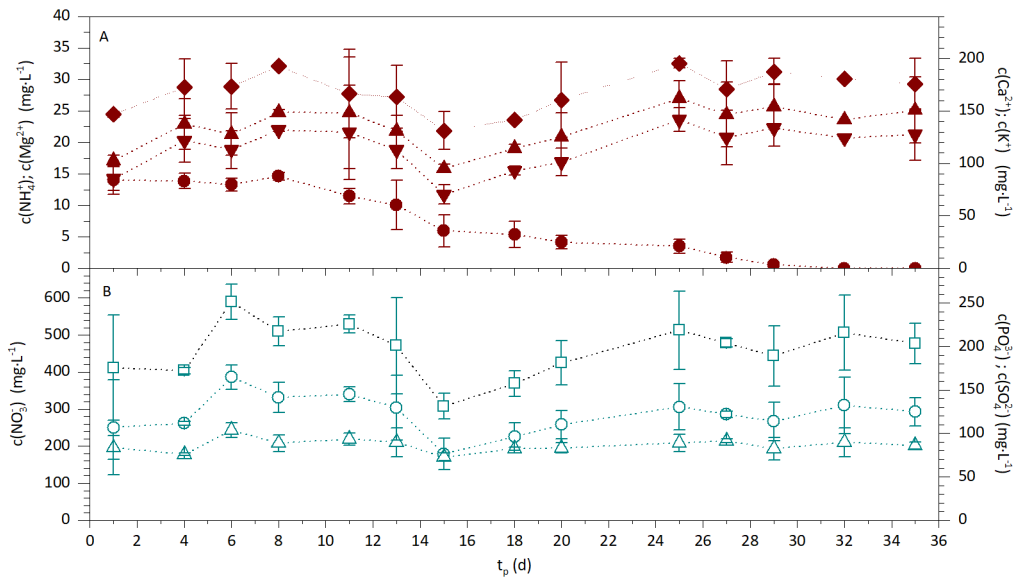


Abbildung 0-41: Nährstoffkonzentrationsverlauf der Kultivierung von *S. palustre* im 60 L Schlauchreaktor mit dem Verlauf A) der Konzentrationen des Ammoniums  $c(\text{NH}_4^+)$ , des Calciums  $c(\text{Ca}^{2+})$  und des Magnesiums  $c(\text{Mg}^{2+})$ , sowie B) der Konzentrationen des Nitrats  $c(\text{NO}_3^-)$ , des Phosphats  $c(\text{PO}_4^{3-})$ , und des Sulfats  $c(\text{SO}_4^{2-})$ . Kultivierungsparameter:  $T_K = 21 \pm 1,8$  °C,  $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 2\%$ , Knop-Medium mit  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung) und  $V_m = 60 \text{ L}$ .

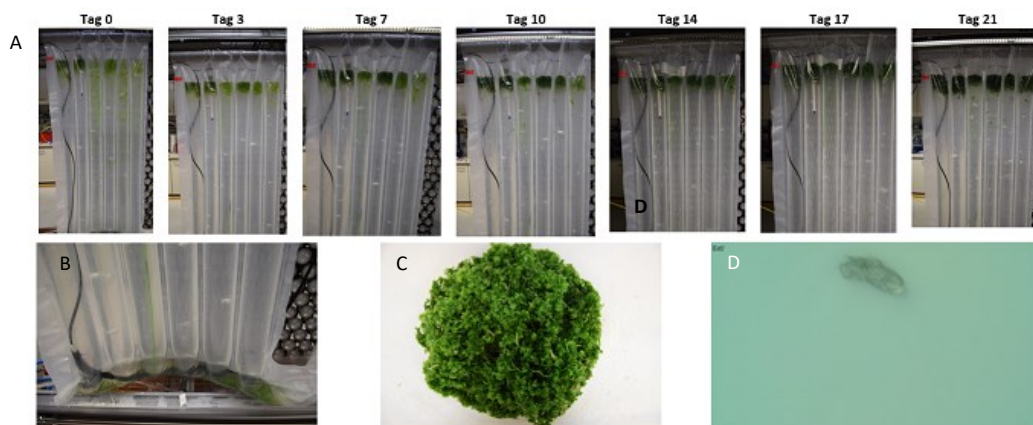


Abbildung 0-42: Wachstumsverlauf von *S. palustre* in dem im Batch-Verfahren betriebenen 25 L Schlauchreaktor mit Temperaturregelung. A) Optische Darstellung der Zunahme der Torfmoosbiomasse im Prozesszeitraum  $t_p = 21 \text{ d}$ . B) Abgesetzte Torfmoose auf dem Reaktorboden zum Versuchstag  $t_p = 1 \text{ d}$ . C) Morphologie der geernteten Torfmoose eines Reaktorsegments. D) Mikroskopische Aufnahme des Kulturmediums am Kultivierungsende ( $t_p = 35 \text{ d}$ ) mit 400facher Vergrößerung bei DIC-Modul. Kultivierungsparameter:  $T_K = 20$  °C,  $\text{PFD} = 300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Dauerbeleuchtung,  $V_g = 2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $x_{\text{CO}_2} = 2\%$ , Knop-Medium mit  $\text{pH}_{\text{Anfang}} = 4,0$  (ohne pH-Regelung) und  $V_m = 25 \text{ L}$ .

## Trickle bed-Reaktor

Der *Trickle-Bed*-Reaktor wurde mit einem Volumen von 125 L und den Innenmaßen 50 x 50 x 50 cm (H x B x T) aus Acrylglas (Plexiglas®) von der Firma Glas Schmidt GmbH, Deutschland, gefertigt. Das Material ließ, ähnlich wie Polycarbonat im Moosbettreaktor, Licht über den gesamten photosynthetisch aktiven Bereich zu. Jedoch war eine Sterilisation durch Autoklavieren aufgrund der geringen Hitzebeständigkeit nicht möglich. [281] Der Reaktor (siehe Abbildung 0-43) wurde angelehnt an den Moosbettreaktor, welcher ein Volumen von 1,5 L aufwies, um das 80-fache vergrößert.

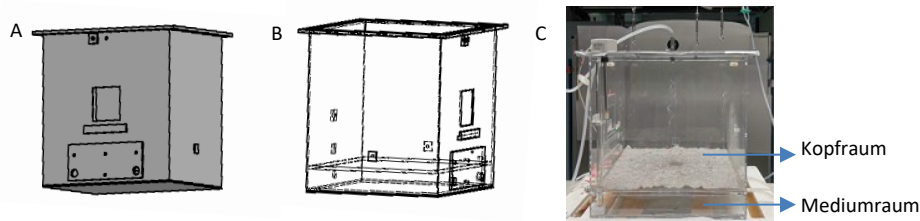


Abbildung 0-43: Technische Zeichnung des von 125 L *Trickle-Bed*-Reaktor. A) Reaktorgehäuse frontal abgebildet. Es sind das Greifloch, sowie die Anschlüsse für die Medienzu- und -abfuhr, sowie die Gaszufuhr zu sehen. B) Reaktorgehäuse von der linken Seite abgebildet. Hierbei sind die Acrylglasumrandung zum Anbringen des Deckels, sowie die 4 Stützleisten für das Moosträgergewebe ersichtlich. C) Ansicht des angefertigten Reaktors mit der Moosauflage und dem Polypropylen-Vlies 500.

Die Grundfläche betrug  $0,25 \text{ m}^2$ . Somit war die Fläche zur Torfmooskultivierung um 25-mal höher als im Moosbettreaktor. Die Wandstärke der seitlichen Reaktorwände betrug 5 mm, die des Bodens 10 mm und des Reaktordeckels 3 mm. Die Materialstärke wurde so gewählt, dass der Reaktorboden der mechanischen Belastung standhält, der Deckel eine möglichst geringe Menge an Licht absorbiert und die Wände sich möglichst wenig wölben. Die Reaktorhöhe betrug 50 cm, damit ein ausreichender Abstand zwischen den Torfmoosen und der Düse zur Medienvernebelung gewährleistet wird. Um den Reaktordeckel befestigen zu können, wurde eine rechteckige Umrandung aus Acrylglas ( $1 \times 3,5 \times 57 \text{ cm}$ ; H x B x T) am oberen Rand der Reaktorwände befestigt. In der Deckelhalterung befand sich mittig eine 2 mm breite Nut, um den Deckel mit einer O-Ringdichtung (FKM 80A, Landefeld, Deutschland) abzudichten. Außerdem wurden 12 Löcher zur Befestigung des Deckels ( $0,4 \times 57 \times 57 \text{ cm}$ ; H x B x T) in die Umrandung gebohrt. Der Reaktor wurde anschließend mit Zylinderschrauben (M6, 30 mm, Landefeld, Deutschland), Unterlegscheiben (A2 433-6 ES, Landefeld, Deutschland) und dazugehörigen Federringen (M6, Landefeld, Deutschland) aus Edelstahl dicht verschlossen. In der Mitte des Reaktordeckels war eine Bohrung ( $\varnothing 10 \text{ mm}$ ) für den Anschluss einer Edelstahl-Vernebelungsdüse (4900, Düsenfabrik, Deutschland) gesetzt. In der rechten Ecke des Deckels war eine zweite Bohrung ( $\varnothing 15 \text{ mm}$ ) für einen radialen Feuchtigkeitssensor (GPTSV 120 R, Guilcor, Frankreich) angebracht.

Als Moosträger wurde eine Acrylglasplatte ( $0,4 \times 49,8 \times 49,8 \text{ cm}$ ; H x B x T) mit Löchern ( $\varnothing 10 \text{ mm}$ ) in einem Abstand von 5 cm von der Firma Glas Schmidt GmbH, Deutschland, eingesetzt. In dem Reaktor wurde die Moosträgerplatte auf einer Höhe von 6 cm, auf einer Acrylglasleiste ( $h=1 \text{ cm}$ ,  $L_A= 50 \text{ cm}$ ,  $L_I= 49,8 \text{ cm}$ ) positioniert, welche an der inneren Reaktorwand festgeklebt war. Somit fand eine Unterteilung des Reaktors in den mit Gas gefüllten Kopfraum und den mit Nährlösung gefüllten Medienraum (siehe Abbildung 0-43). Der Kopfraum befand sich oberhalb des Moosträgers und betrug 110 L. Im Kopfraum war in der rechten Reaktorwand ein Rechteck ( $11 \times 11 \text{ cm}$ ) ausgefräst, um für die Animpfung die Biomasse in das Reaktorinnere bringen zu können. Oberhalb dieser Öffnung befand sich eine weitere Öffnung ( $\varnothing 10 \text{ mm}$ ) zur Abgasabfuhr auf einer Höhe von 47 cm.

Im Medienraum waren Bohrungen für die Anschlüsse der pH-Sonde ( $\varnothing 3/4 \text{ Zoll}$ ), dem Kühlstab ( $\varnothing 3/4 \text{ Zoll}$ ), sowie zur Medienzu-, -abfuhr und der Gaszufuhr ( $\varnothing 1/8 \text{ Zoll}$ ) angebracht. Die Öffnungen wurden ohne Gewinde ausgeführt, da die Reaktorwandung hierfür zu dünn war. Aus diesem Grund kam als Stützstruktur eine weitere



Acrylglasplatte (1 x 29,8 x 12,1 cm, H x B x T) zum Einsatz, welche an der äußeren Reaktorwand festgeklebt wurde (siehe Abbildung 0-44). Auf dieser Platte befanden sich die Bohrungen bei den gleichen Abmessungen wie am Reaktor, hier jedoch mit Gewinde.

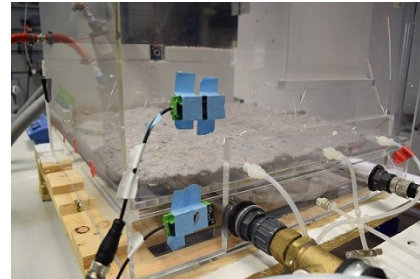
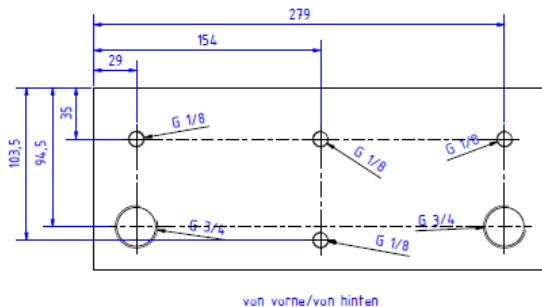


Abbildung 0-44: Acrylglasplatte mit Bohrungen für die pH- Sonde ( $\varnothing$  3/4 Zoll), den Kühlstab ( $\varnothing$  3/4 Zoll), die Medienzufuhr und -abfuhr ( $\varnothing$  1/8 Zoll). Links: CAD-Zeichnung dargestellt mit den Maßangaben. Rechts: Reale Ansicht.

### Begasung

Der Reaktor wurde von unten über das Kulturmedium begast. Dazu wurde zuerst eine Gasmischung über Massendurchflussregler (MassFlo 179C, MKS Instruments, USA) mit einem Vordruck von 2 bar erzeugt und über einen gasdichten Schlauch (Flexilon®P, Angst+Pfister, Deutschland) und einen Luer-Lock-Adapter (Luer-Schlauchverbinder, ROTILABO®, Deutschland) an der linken Reaktorwand in den Reaktor geleitet. Im Inneren des Reaktors befand sich ein ringförmiger Gasverteiler (siehe Abbildung 0-45 C) aus einem Silikonschlauch ( $\varnothing$  10 mm, Wandung: 3 mm, Masterflex, Deutschland). Das Gas trat aus Löchern ( $\varnothing$  2 mm), welche sich in einem regelmäßigen Abstand von 2 cm im Silikonschlauch sich befanden. Die entstandenen Gasblasen strömten durch die Flüssigphase und das Vlies in den Kopfraum.

### Kühlung

Anhand des Temperaturverlaufs in der Flüssigkeit und der Gasphase bei einer Photonenflussdichte von  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (siehe Abbildung 0-46) ist ersichtlich, dass eine Kühlung des Kultivierungssystems notwendig ist. Die Kühlung der Flüssigphase erfolgte über einem Edelstahl-Kühlstab (siehe Abbildung 0-45 C) mit einer Länge von 45 cm und einen Durchmesser von 3 cm. Die Wärme aus dem Kulturmedium wurde über das Kühlwasser ( $T_k=15^\circ\text{C}$ ) abgeführt. Die Temperaturregelung erfolgte über einen PI-Regler, welcher von der Software BioProCon angesteuert wurde. Das gekühlte Medium reichte jedoch nicht, um den Reaktorkopfraum ausreichend zu kühlen, weswegen ein Außenkühlkörper (FLKU 140, Fischer Elektronik, Deutschland) mit den

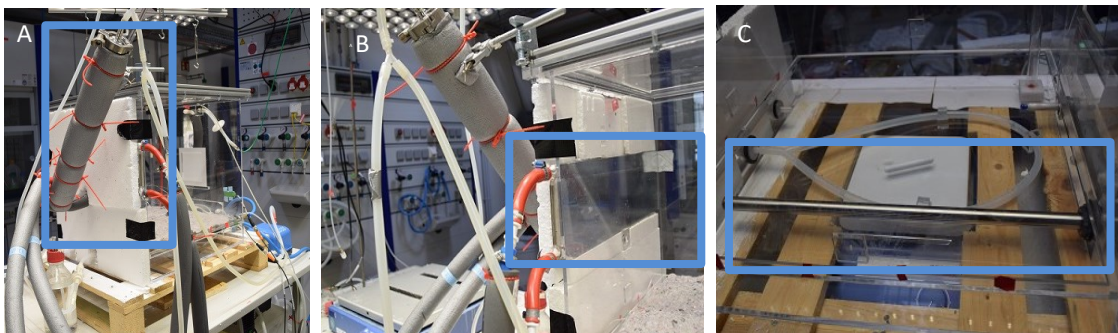


Abbildung 0-45: Ansicht des Kühlsystems im TBR mit einem Glaskondensator (A), einem Außenkühlkörper (B) und einem Kühlstab (C).

Abmaßen 50 cm x 15 cm an die linke Reaktoraußenwand angebracht wurde (siehe Abbildung 0-45 B). Dieser Kühlkörper wurde mit einer gleichgroßen Styroporplatte isoliert und mit Klebeband an der Reaktorwand befestigt.

Der Wärmeaustausch erfolgte durch die Reaktorwand. Das Kühlwasser strömte kontinuierlich in den Kühlkörper, dennoch reichte die Kühlung an heißen Sommertagen bei einer Raumtemperatur von 32 °C nicht aus. Daher wurde ein Kondensator aus Glas (C149400, Graham, Deutschland) an den Reaktor (siehe Abbildung 0-45 A) zur Gaskühlung angeschlossen. Hierbei wurde das Gas aus dem Reaktorkopfraum über eine Öffnung ( $\varnothing$  10 mm) in der rechten Reaktorwand auf einer Höhe von 234 mm mit einer Luftpumpe (V-30, Aqua-Forte, Niederlande) und einem Volumenstrom von  $57 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  gesogen und in den Kondensator geführt, wo es im Gegenstrom über ein Kühlmittel ( $T_{\text{KM}}=-5,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Glysantin, BASF, Deutschland) gekühlt wurde. Die abgekühlte Luft strömte weiter in der Reaktorkopfraum zurück. Das aufgewärmte Kühlmittel wurde in einem Kühlaggregat (Unichiller 015-MPC, huber, Deutschland) wieder auf  $-5 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Durch diese aufwendigen Maßnahmen konnte Reaktortemperatur von  $20,0 \text{ }^\circ\text{C}$  mit einem PI-Regler (siehe Abbildung 0-45 C) aufrechterhalten werden.

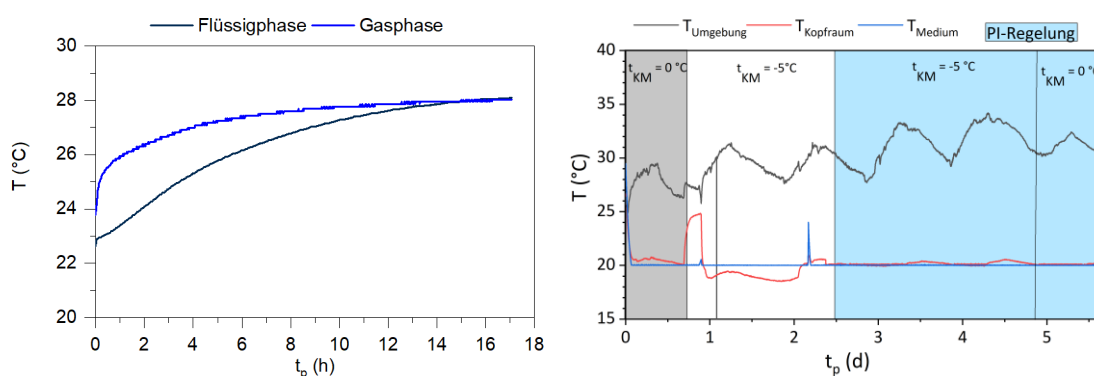


Abbildung 0-46: Temperaturverlauf im *Brickle-Bed*-Reaktor gefüllt mit 25 L Wasser. Links: ohne Kühlungssystem. Abgebildet ist die Temperatur im Kopfraum (Gasphase) gemessen mit einem Arduino-Luftdrucksensor (BMP 280, Bosch, Deutschland), kalibriert mit einem Temperatursensor (Testo 925, Conatex, Deutschland); und die Temperatur im VE-Wasser (Flüssigphase) gemessen mit einer pH-Sonde (Hamilton, Polylite Plus H Arc 120, USA) bei einer PFD =  $800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . In dem Zeitraum von ersten 2 Stunden betrug der produzierte Wärmestrom im gesamten Reaktor 18,8 W. Rechts: der Temperaturverlauf mit der Kühlung des Kulturmediums mittels Kühlstabes; des Kopfraums mit Außenkühlkörper und der Gasphase im Glaskondensator mittels Kühlmittels Glysantin. Abgebildet ist die Umgebungstemperatur ( $T_{\text{Umgebung}}$ ) gemessen mit einer  $\text{pO}_2$ -Sonde (Visiform DO120, Hamilton, USA), die Temperatur im Kopfraum ( $T_{\text{Kopfraum}}$ ) gemessen mit einem Feuchtigkeitssensor (GPTSV 120 R, Guilcor, Frankreich) und die Temperatur im Medium mittels einer pH-Sonde (Hamilton, Polylite Plus H Arc 120, USA). Farblich dargestellt ist der Zeitraum, in welchem die Gasphase ohne Temperaturregelung mit einem Kühlmittel (KM) mit einer Temperatur von  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  (grau) oder  $-5 \text{ }^\circ\text{C}$  (weiß) gekühlt wurde. Blau dargestellt ist der Zeitraum, in welchem die Temperatur über einen PI-Regler geregelt wurde.

### Beleuchtung

Der TBR wurde einseitig von oben mit Hilfe des LEDs-Lichtmoduls beleuchtet, welches bereits für die Kultivierung im *wave* -Photobioreaktor (siehe Kapitel 3.3.2) verwendet wurde. Der vertikale Abstand zwischen dem Moosträger und dem Lichtmodul betrug 70 cm. Das eingefallene Licht wurde im vollständig zusammengebauten Reaktor in Höhe der Lochplatte gemessen. Das Lichtprofil wurde anhand von sechs Messpunkten mit einem Abstand von jeweils 10 cm bei einer eingestellten Photonenflussdichte von  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ermittelt (siehe Abbildung 0-47). Die Erfassung der Lichtintensität erfolgte über einen Lichtsensor (siehe Kapitel 3.3.1) in Form des erhaltenen Mittelwerts bei einer Messzeit von 10 s und wurde dreimal wiederholt. Der weiße Bereich in dem Diagramm markiert fehlende Messwerte, da sich an dieser Stelle der Feuchtigkeitssensor befand. Der Bereich mit geringerer Lichtintensität ( $<250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; blau) könnte durch das herausgefräste Rechteck in der

Reaktorwand Zustandekommen, da durch diese Öffnung die Lichtmessung durchgeführt wurde und nicht mit einer zusätzlichen Acrylglasplatte überdeckt war. Wegen des fehlenden Materials konnte möglicherweise das Licht an der Reaktorwand nicht zurückreflektiert werden bzw. trat teilweise aus dem Reaktor aus. Während der Kultivierung war eine zusätzliche Acrylglasplatte an der Stelle befestigt, um die Lichtverluste zu minimieren. Abgesehen von diesem Punkt weicht die Lichtintensität in dem Reaktor nur ca. 20 % vom Mittelwert ab. Somit war die Lichtverteilung im Reaktor annähernd homogen. Daher war eine Lichtlimitierung in manchen Reaktorbereichen auszuschließen.

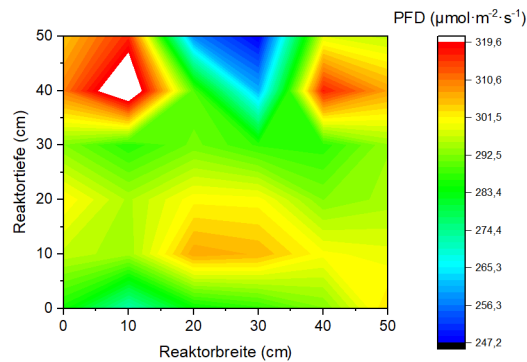


Abbildung 0-47: Lichtprofil im *Trickle-Bed*-Photobioreaktor bei einer PFD =  $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Die Lichtintensität wurde auf dem Moosträger auf dem Vlies in 5 cm Abstand gemessen. Abgebildet sind die Mittelwerte der Triplikate.

### Prozessführungsstrategie

Für die Torfmooskultivierung wurden zwei Prozessführungsstrategien (siehe Abbildung 0-48, Abbildung 0-49) entworfen. Generell handelte es sich um ein Perfusionssystem, bei welchem die Torfmoose auf einem Moosträger positioniert waren und kontinuierlich mit Medium überströmt wurden. Die Torfmoose wurden über einen Plastikfilter an der Öffnung der Medienabfuhr im Reaktor zurückgehalten.

Die erste Prozessführung ist in Abbildung 0-48 schematisch dargestellt, in welcher der Füllstand während der gesamten Kultivierung anhand der Wachstumshöhe geregelt wurde. Die hier zu Grunde liegende Idee kam aus Beobachtungen des Wachstums der Torfmoose bei verschiedenen Wasserständen, wobei sich ein Abstand von 2 cm [16] bzw. 5 cm [8] zwischen dem umgebenen Wasserspiegel und den Capitula der Torfmoose als am besten geeignet für den Nährstofftransport erwies. Um dies im Photobioreaktor zu verwirklichen, wurde eine online Messung des Füllstandes und des Wachstumsstandes der Moose entwickelt. Diese Messmethode basiert auf einer Bildanalyse des jeweils photographisch festgehaltenen Reaktorzustandes und ist detailliert in der Veröffentlichung von Dittmann et al. [266] beschrieben.

Der gewählte Abstand von 2 cm sollte kontinuierlich mittels zwei Peristaltikpumpen (Ecoline Peristaltikpumpe, Ismatec, Deutschland) gehalten werden. Die Medienzufuhr erfolgte aus einer 10 L Vorratsflasche, welche mit einem autoklavierten MBR-Medium befüllt war. Das Medium wurde kontinuierlich über eine Peristaltikpumpe und einen Silikonschlauch ( $\varnothing$  9 mm, Wandung: 2 mm, Masterflex, Deutschland) mit einer Fördermenge von  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  dem Reaktor zugeführt, was einer Flussrate von ungefähr  $3 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  entsprach. Dabei sollte ein sehr langsamer Fluss simuliert werden, welcher der Strömung in den Mooren ( $\sim 1 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ähnelt. [30] Das Medium trat über dem Moosträger auf einer Höhe von 2 cm in den Reaktor ein. Die Medienabfuhr erfolgte 2 cm unter dem Moosträger, ebenso mit einem Volumenstrom von  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  in eine Sammelflasche. Im Vergleich zum Moosbettreaktor wurde es von dort nicht mehr in den Reaktor zurückgeführt. Das frische Medium wurde bei Bedarf über eine sterile Schnellverschlusskupplung (PP, NW 6,4 mm, Bürkle, Deutschland) nachgefüllt. Während der Kultivierung wurde die Wachstumshöhe und der Füllstand des Reaktors stündlich über die BioProCon

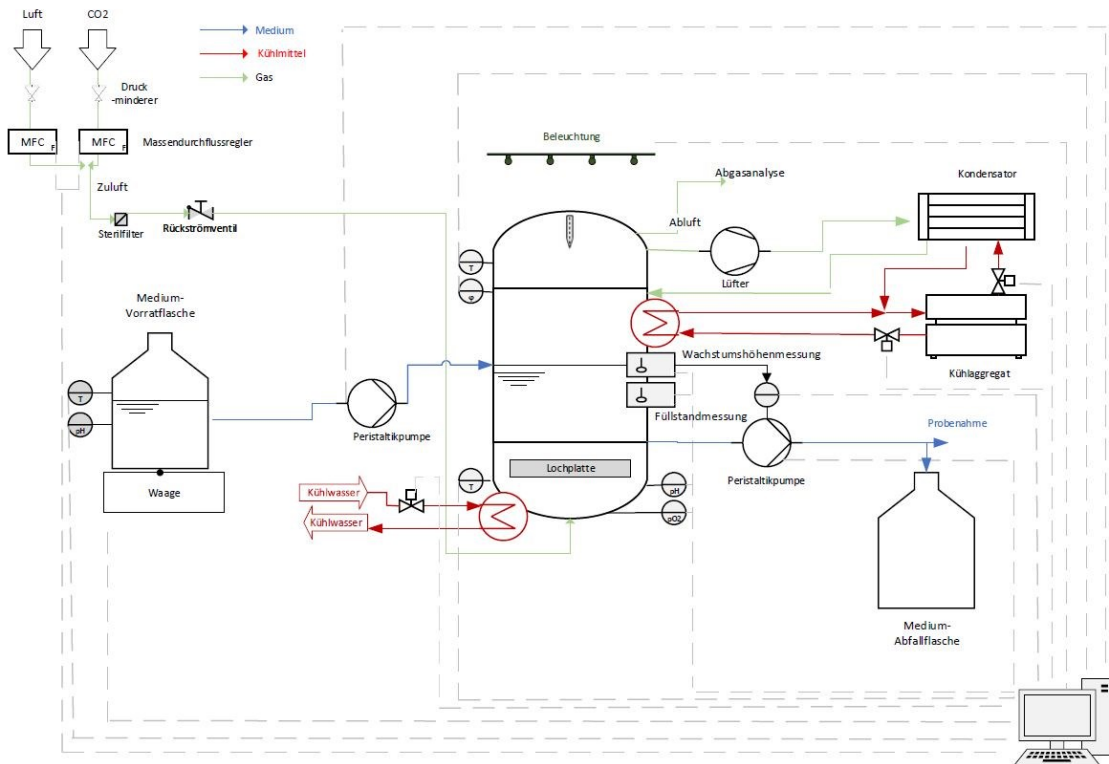


Abbildung 0-48: R&I-Fließschema des *Trickle-Bed*-Photobioreaktors der Variante I. Der Medienstrom ist blau abgebildet, die Kühlmittelstrecke rot und der Gasstrom grün.

geregelt und protokolliert. Um den benötigten Abstand zwischen der Rasenhöhe und dem Füllstand einzustellen, wurde bei einem geringeren Füllstand die gewünschte 2 cm wurde die Peristaltikpumpe der Medienabfuhr für eine gewisse Zeit automatisch über die Software BioProCon abgeschaltet.

Bei der zweiten Variante (siehe Abbildung 0-49) wurde das Kulturmedium zusätzlich vernebelt, um die Torfmoose von oben mit Nährstoffen zu versorgen. Dafür wurde eine Vernebelungsdüse an einer Zahnradpumpe (LP-WT 3000-1JB, Longer, China) angeschlossen, welche das Medium aus der Vorratsflasche mit einem Volumenstrom von  $75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  mit einem Vordruck von 5 bar förderte. Durch den Einsatz der Vernebelungsdüse sollte die mechanische Beanspruchung der Moose durch die Wassertropfen minimiert werden. Da der Pumpenkopf nicht autoklavierbar war, wurde er vor dem Kultivierungsbeginn mit 76 %-igem Ethanol desinfiziert und an zuvor autoklavierten Schläuchen angeschlossen. Um das vernebelte überschüssige Medium aus dem Reaktorraum abzuführen, wurde die Peristaltikpumpe zur Medienabfuhr parallel zur Zahnradpumpe automatisch mit der Steuersoftware BioProCon eingeschaltet und mit einer festen Drehzahl ( $V = 76 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) betrieben. Die Frequenz der Medienzufuhr über die Kegeldüse konnte durch die Vorgabe in BioProCon eingestellt werden. Im Gegensatz zu Variante I wurde der Füllstand des Reaktors nicht geregelt. Die Zuflussrate des Mediums über die Peristaltikpumpe betrug während der gesamten Kultivierungsdauer  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Für die Detektion des Füllstands im Reaktor wurden zwei quaderförmige kapazitive Sensoren (AC004, Autoson, Deutschland) an der äußeren rechten Reaktorwand auf der Ebene des Moosträgers, sowie in Höhe der unteren Kante des Eingriff-Rechteckes (siehe Abbildung 0-44) installiert.

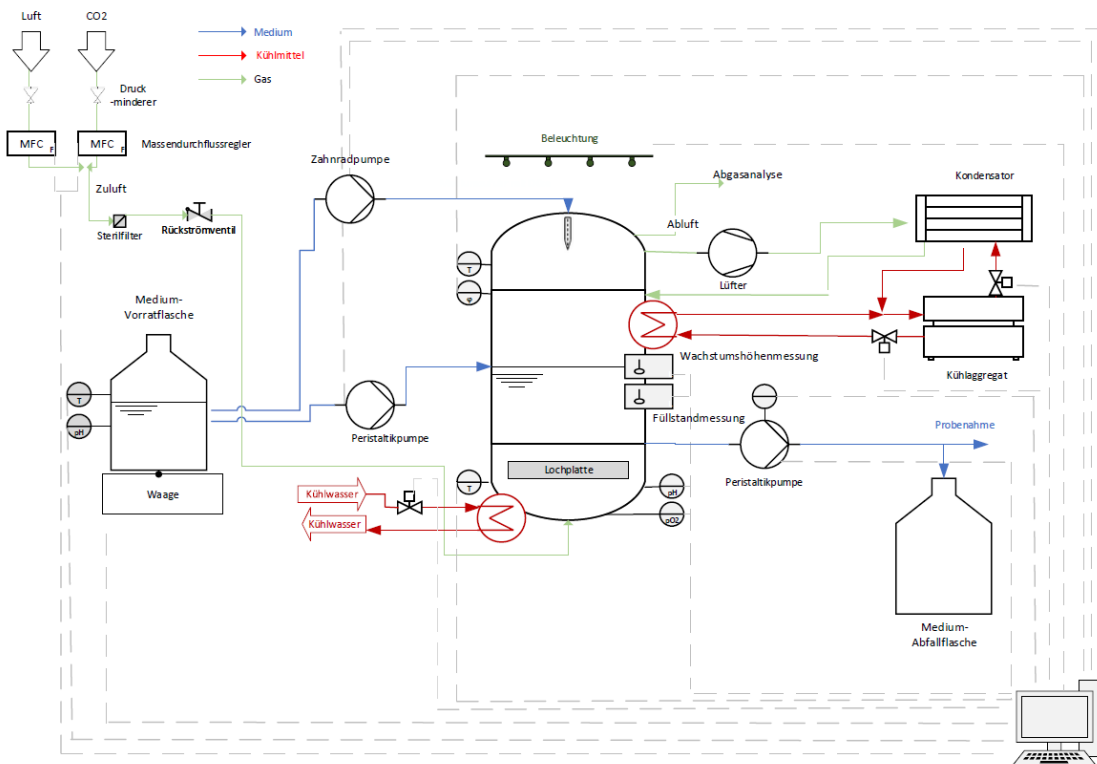


Abbildung 0-49: R&I- Fließschema des *Trickle-Bed*-Photobioreaktors der Variante II. Der Medienstrom ist blau abgebildet, die Kühlmittelstrecke rot und der Gasstrom grün.

## Analytik

Zur Messung, Einstellung bzw. Kontrolle der Wachstumsbedingungen der Torfmoose wurden inline und online Messgrößen erfasst und anhand der Prozesssoftware BioProCon aufgezeichnet. Die Inline-Messdaten waren die Luftfeuchtigkeit und die Temperatur im Reaktorkopfraum, sowie der pH-Wert und die Temperatur des Mediums. Für die Messung der Luftfeuchtigkeit und der Temperatur in der Gasphase des Reaktors kam der Luftfeuchtigkeitssensor (GPTSV 120 R, Guilcor, Frankreich) zum Einsatz. Die Regelung der Luftfeuchtigkeit war in dieser Entwicklungsstufe nicht geplant. Eine pH-Sonde (Polilyte Plus H Arc 120, Hamilton, USA), welche horizontal an der Reaktorwand angebracht war, zeichnete den pH-Wert- und den Temperaturverlauf während der Kultivierung auf. Es fand keine Regelung des pH-Werts statt. Die Analytik-Erweiterung für die Einstellung des Abstandes des Wasserspiegels zu den Capitula des Torfmooses wurde durch die online Messung des Füllstandes, sowie der Wachstumshöhe [266] realisiert.

## Inbetriebnahme des Photobioreaktors

Vor dem Kultivierungsbeginn wurde der Reaktor zusammengebaut, die Reaktorperipherie angeschlossen und kurz vor dem Animpfen das Innere des Reaktorgehäuses mit einer UV-C Lampe (UV-Set Purion 14 W, Purion®, Deutschland) für 45 Minuten in einer abgedunkelten Box desinfiziert. Durch die Desinfizierung entstanden jedoch Risse auf dem Reaktorboden, sowie an einer Reaktorwand (siehe Abbildung 0-50). Da Plexiglas gegenüber UV-C-Licht beständig ist [281], wird als Grund der Materialschäden die eingesetzte Strahlungsbelastung ( $42 \text{ J m}^{-2}$ ) vermutet. Zur Verifizierung wurde eine Acrylglasplatte ( $15 \times 15 \text{ cm}$ ) erneut für 45 Minuten mit der UV-Lampe bestrahlt. Allerdings traten keine Materialschäden auf. Die Firma Glas Schmidt konnte auch keine

---

Begründung für die Beschädigung des Reaktors liefern. Nichtsdestotrotz wurde versucht, den Reaktor in Betrieb zu nehmen. Im befüllten Zustand war er nicht dicht und das Medium trat tropfenweise aus den Rissen aus. Das Kleben der Risse in der Plexiglasplatte mit Silikonkleber und zusätzlicher Klebefolie führte jedoch nicht zum erwarteten Erfolg. Es trat weiterhin Flüssigkeit entlang eines Risses aus dem Reaktor aus. Nach weiteren Abdichtversuchen wurde in diesem Reaktortyp keine Kultivierung im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Leckagen durchgeführt.

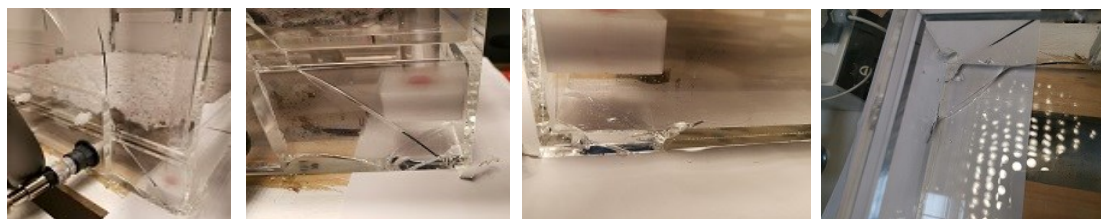


Abbildung 0-50: Photographische Aufnahme der Reaktorschäden nach der UV-C-Behandlung mit einer Dauer von 45 min.

## Integrale Transmission

Um den Wachstumsverlauf der Torfmoose im Kultivierungssystem überwachen zu können, sollte eine Methode zur Quantifizierung des Wachstums entwickelt werden. Die Methode sollte nicht invasiv und außerhalb des Reaktors einsetzbar sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Konzept einer optischen Methode für Schüttelkolbenexperimente entwickelt, bei welchem das aus dem Messaufbau ausgestrahlte Licht auf der Moosoberfläche reflektiert wird. Die Lichtreflexion an der Mooskultur sollte mittels Fotodioden über einen bestimmten Zeitraum von gesamten Kolbenbodenfläche erfasst und anschließend integral mit der vorhandenen Torfmoosbiomasse korreliert werden. Die gemessene physikalische Größe wird somit als integrale Transmission (IT) bezeichnet.

Die erste Version des Messgerätes ist in Abbildung 0-51 dargestellt. Das Gerät bestand aus einem Steuermodul (Leiterplatte, Eigenentwicklung, BTS230615\_V2) und einer Messzelle. Das Steuermodul diente zur Versorgung der Infrarot-Leuchtdioden (IR-LED; SFH 4544, Osram, Deutschland) mit elektrischer Energie und zum Empfang des Signals aus den Fotodioden. Die Messzelle bestand aus einem Kunststoffzylinder ( $\varnothing$  13 cm), IR-Dioden und Fotodioden. Der Zylinder diente den acht IR-Dioden als Halterung, welche gleichmäßig in einer Höhe von 5 cm positioniert waren. Sie wurden parallelgeschaltet und mit einem konstanten Gesamtstrom von 100 mA versorgt. Die Strommessung erfolgte in Reihe mit den LEDs direkt auf der Leiterplatte. Die Wellenlänge der IR-Dioden betrug 950 nm und war so gewählt, dass in den Torfmooszellorganellen, u.a. im Chlorophyll, in diesem Bereich keine Lichtabsorption mehr stattfindet [59] und keine wasserbezogene Absorption des IR-Lichts auftritt [282]. Das ausgestrahlte Licht passierte die Glaswand des Erlenmeyerkolbens, welcher auf einer Glasplatte in dem Zylinder positioniert war. Das durch die Mooskultur durchdringende Licht wurde von 14 Fotodioden (BPV23F, Vishay, USA) detektiert, welche für eine maximale Flächenquantenausbeute an bestimmten Positionen angeordnet waren.

Die auf die Fotodioden einfallenden Photonen erzeugten einen geringen Strom, welcher aufsummiert und anhand eines Transimpedanzverstärkers verstärkt und in eine Spannung umgewandelt wurde. Die Spannung wurde von der Steuerungseinheit (Simatic S7, Siemens, Deutschland) erfasst und mit der institutsinternen Software BioProCon kontinuierlich aufgezeichnet. Als IT-Messgröße wurde das Ausgangssignal in mV über eine Dauer von 30 s integriert. Eine Erhöhung der Messzeit auf bis zu eine Minute war nicht nötig, da sich der IT-Wert nicht änderte. Um die Sedimentation der Kultur während der Messung zu vermeiden, wurde die



Messzelle auf einen Schüttler (IKA ViBrax-VXR, IKA, Deutschland) montiert und bei Bedarf während der Messung mit einer Schüttelfrequenz von 180 rpm in eine radiale Bewegung versetzt. In der ersten Entwicklungsstufe der Messmethode wurde die Leiterplatte nicht temperiert. Die Umgebungstemperatur sowie die Temperatur in der Messzelle wurde mit einem Temperaturmessgeräts über eine Stiftsonde (testo925, conatex, Deutschland) gemessen. Um den Einfluss von externen Lichtquellen zu reduzieren, wurde eine schwarze Kiste über dem gesamten Gerät platziert (nicht in der Abbildung dargestellt).

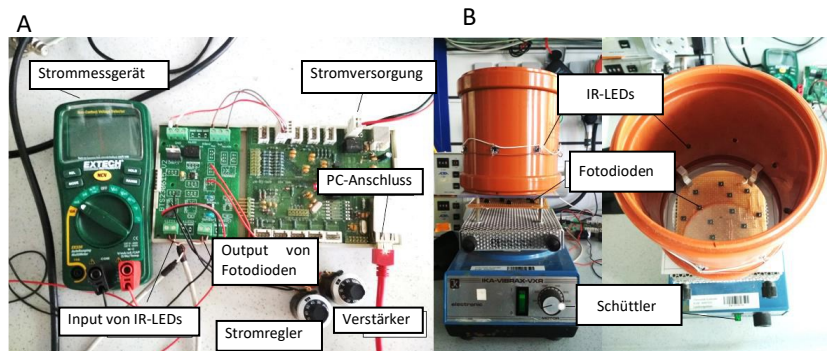


Abbildung 0-51: Set-up der Messmethode zur Messung der integralen optischen Transmission Bildquelle: Möller [207]A) Steuermodul mit Netzteil, Amperemeter, Anschluss an der acht IR-LEDs, Anschluss an der 14 Fotodioden, Stromregler, Verstärker und eine PC-Anbindung, sowie B) die Messeinheit des integralen IT-Geräts mit Kunststoffzylinder inkl. IR-Dioden, Fotodioden und Schüttler.

Um die Sedimentation der Kultur während der Messung zu vermeiden, wurde die Messzelle auf einen Schüttler (IKA ViBrax-VXR, IKA, Deutschland) montiert und bei Bedarf während der Messung mit einer Schüttelfrequenz von 180 rpm in eine radiale Bewegung versetzt. In der ersten Entwicklungsstufe der Messmethode wurde die Leiterplatte nicht temperiert. Die Umgebungstemperatur sowie die Temperatur in der Messzelle wurde mit einem Temperaturmessgeräts über eine Stiftsonde (testo925, conatex, Deutschland) gemessen. Um den Einfluss von externen Lichtquellen zu reduzieren, wurde eine schwarze Kiste über dem gesamten Gerät platziert (nicht in der Abbildung dargestellt).

In einem Experiment wurde überprüft, ob die Messmethode prinzipiell ein Antwortverhalten des Messsignals (IT) auf die zu untersuchende Größe ( $c(\text{BTM})$ ) zeigt. Dafür wurde ein 500 mL Erlenmeyerkolben mit unterschiedlichen Konzentrationen einerseits an einer Algenkultur, die einzellige Mikroalge *Chlorella vulgaris*, und andererseits an dem Torfmoos *S. palustre* befüllt. Als Flüssigkeit wurde VE-Wasser verwendet, da keine signifikante Differenz in der Transmission zwischen dem Knop-Medium und VE-Wasser festgestellt wurde. [212] Für die Messungen wurde jedes Mal derselbe Kolben verwendet, um etwaige Einflüsse auf die Messergebnisse durch unterschiedliche Kolbeneigenschaften zu minimieren. Nach dem Einbringen des befüllten Kolbens in die Messzelle wurde die Schüttelfrequenz auf dem Schüttler auf 180 rpm eingestellt und die Messeinheit mit der schwarzen Box überdeckt. Der Strom zur Versorgung der LEDs betrug insgesamt 100 mA, die Messzeit 30 s und das Ausgangssignal wurde mit dem Faktor 2 verstärkt.

In Abbildung 0-52 sind die Ergebnisse der IT in Abhängigkeit der Biomassekonzentration  $c(\text{BTM})$  in  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  für *C. vulgaris* für 150 mL und 200 mL VE-Wasser und für *S. palustre* für 200 mL Gesamtvolumen dargestellt. Die beiden Graphiken zeigen, dass innerhalb eines definierten Biomassekonzentrationsbereichs das integrierte IT-Signal linear mit der Biomassekonzentration korreliert. Für *Sphagnum palustre* verzeichnet die IT-Kurve einen deutlich flacheren Verlauf, was bedeutet, dass mehr Licht auf die Fotodioden auftraf. Dies könnte an der unterschiedlichen Morphologie der Pflanze und/oder an der möglicherweise geringeren Dichte der Mooskultur liegen, welche bei gleicher Biomassekonzentration mehr Licht durchlässt. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Mooseigenschaften das Licht in höherer Maß vorwärts streuen. Im Bereich geringerer



Biomassekonzentrationen ist ein gegenläufiger Verlauf ersichtlich. Der IT-Wert steigt mit steigender  $c(\text{BTM})$  bis zu einem maximalen Wert, ab welchem die integrale Transmission eine lineare Abnahme verzeichnet. Dieses Phänomen könnte mit der Vorwärtstreuung der Kultur erklärt werden, da das integrierte Signal für entionisiertes Wasser ( $0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) kleiner als das Signal bei geringeren Biomassekonzentrationen war. Ab einer bestimmten  $c(\text{BTM})$  ist es möglich, dass das vorwärtsgestreute Licht nicht mehr direkt auf die Fotodiode trifft, sondern in der Suspension erneut gebrochen wird.

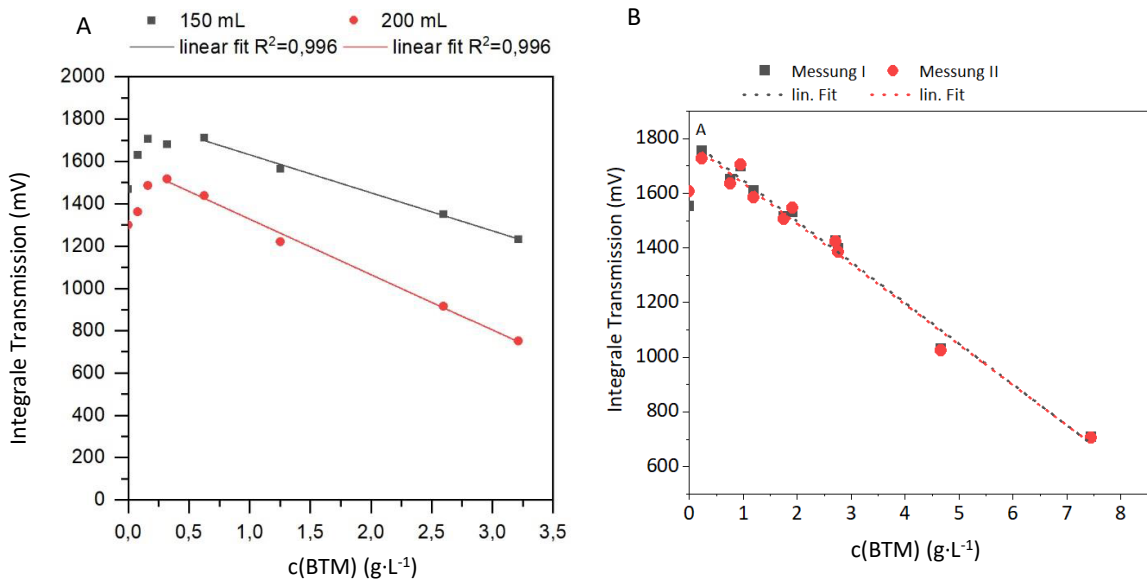


Abbildung 0-52: Korrelation der integralen optischen Transmission mit der Biotrockenmassekonzentration von *Chlorella vulgaris* (A) und mit der Biotrockenmassekonzentration von *S. palustre* (B) in 150 mL bzw. 200 mL VE-Wasser. Die Ausgleichsgerade wurde mittels linearem Fit in OriginPro erstellt. Die Steigungen und die Achsenabschnitte der y-Achse entsprachen für *C. vulgaris*  $y=1809,7 - 179,5 \cdot x$  (150 mL),  $y=1588,7 - 262,1 \cdot x$  (200 mL) und für *S. palustre*  $y=1578,8 - 420,1 \cdot x$  (150 mL) und  $y=1323,9 - 369,0 \cdot x$  (200 mL). Messbedingungen: 500 ml Erlenmeyerkolben, Suspensionsvolumen: 150 ml bzw. 200 ml, Medientyp: entionisiertes Wasser, Raumtemperatur: konstant. Einstellung des Geräts: Strom: 100 mA, Verstärkung: 2, Messzeit: 30 s, Schüttler: 180 rpm.

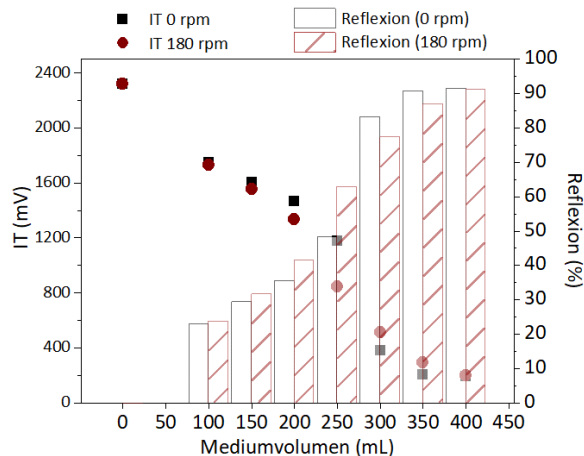


Abbildung 0-53: Korrelation der integralen Transmission mit verschiedenen Medienvolumen mit und ohne Schüttler (180 rpm), sowie des berechneten prozentualen Anteils des nicht transmittierten Lichts. Messbedingungen: 500 ml Erlenmeyerkolben, Medientyp: entionisiertes Wasser, Raumtemperatur = 27 °C. Einstellung des Geräts: Strom: 100 mA, Verstärkung: 2, Messzeit: 30 s, Schüttler: 0 und 180 rpm.

Generell lässt sich anhand dieser Ergebnisse zeigen, dass ab einer bestimmten Biomassekonzentration ein linearer Zusammenhang unter konstanten Bedingungen (Kolben, Volumen, Temperatur) besteht. Bei Änderung

des Flüssigkeitsvolumens oder bei stehender Probe (siehe Abbildung 0-53, 0 rpm) verändert sich das Messsignal deutlich. Hierbei ist zu sehen, dass ein höheres Volumen das transmittierte Licht, unabhängig von der Schüttelfrequenz, deutlich reduziert. Des Weiteren ist aus den Daten ersichtlich, dass für die Signalreduzierung kein konstanter Faktor ermittelt werden konnte, da die IT-Werte bei unterschiedlichen Medientvolumina keinen streng linearen Verlauf aufweisen. Die Schüttelfrequenz beeinflusst die Transmission zudem inkohärent

Der Kolben an sich, sowie die Position des Kolbens in der Messzelle, beeinflusst den Wert der integralen Transmission (siehe Abbildung 0-54). Bei fünffacher Bestimmung des IT-Signals von fünf unterschiedlichen Erlenmeyerkolben differierten die Werte von dem Mittelwert um ungefähr 82 mV (3,5 %), wenn der Schüttler an war und um 84 mV (3,4 %) ohne Schüttler. Da Erlenmeyerkolben nicht für die Messung der Lichttransmission hergestellt werden, ist von ungleichmäßigen Wandstärken und Glaszusammensetzungen auszugehen, welche sich auf die Transmission auswirken können. Eine Veränderung der Ausrichtung des Kolbens innerhalb der Messeinheit (0 rpm) verursachte eine Abweichung zwischen 0,4 % und 2,9 %.

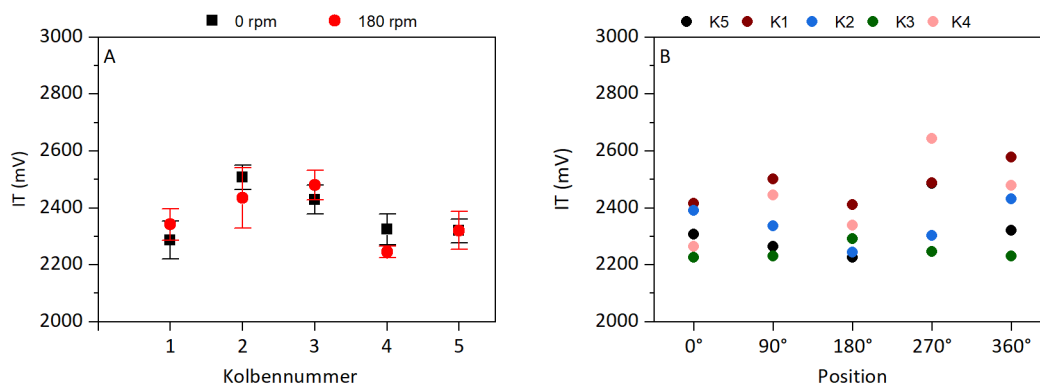


Abbildung 0-54: Korrelation der integralen Transmission mit verschiedenen leeren Kolben in unveränderter Ausrichtung (A) und mit verschiedenen Positionen in der Messeinheit (B) gefüllt mit 200 mL VE-Wasser, mit und ohne Schütteln. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte fünf verschiedener Kolbenposition, die vertikalen Balken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. Messbedingungen: 500 ml Erlenmeyerkolben (Kolbennummer 5), Suspensionsvolumen: 200 ml, Medientyp: entionisiertes Wasser, Raumtemperatur = 27 °C. Einstellung des Geräts: Strom: 100 mA, Verstärkung: 2, Messzeit: 30 s, Schüttler: 180 rpm.

Bei Auftragung aller gemessenen Werte der integralen Transmission über die Torfmoosmenge (Abbildung 0-55) ist ein linearer Trend ersichtlich, allerdings ist die Reproduzierbarkeit aufgrund unterschiedlicher Umgebungstemperaturen, Erlenmeyerkolben und Morphologie der Torfmoose mit ihrem physiologischen Zustand nur eingeschränkt gegeben.

Da diese Parameter während einer Kultivierung nicht konstant gehalten werden können, sollte die Messung durch Minimierung dieser Einflüsse und Maximierung des Biomasseinflusses auf das integrierte Signal verbessert werden, um eine Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten. Der Einfluss der Temperatur auf die elektrischen Komponenten der Leiterplatte könnte minimiert werden, indem eine Temperaturkompensationsschaltung installiert wird. In den Ergebnissen der IT wurde der Einfluss des physiologischen Zustands der Moose, sowie deren Morphologie nicht berücksichtigt. Da sich beide während einer Kultivierung ändern können, sollte die Wechselwirkung auch untersucht werden. Eine Anwendung der LEDs und Fotodioden, welche mit einer Lichtwellenlänge von 750 nm arbeiten, könnte den Einfluss des Volumens auf die Ergebnisse reduzieren, da die Lichtabsorption von Wasser bei 750 nm geringer ist als bei 950 nm. Darüber hinaus sind noch weitere Experimente zur Bestimmung des Lichtwegs innerhalb der Messzelle durchzuführen, um die Anteile der Lichtabsorption im Wasser, der Lichtstreuung auf dem Wasserspiegel und am Kolben, sowie die Lichtreflektion auf der Moosoberfläche zu quantifizieren.

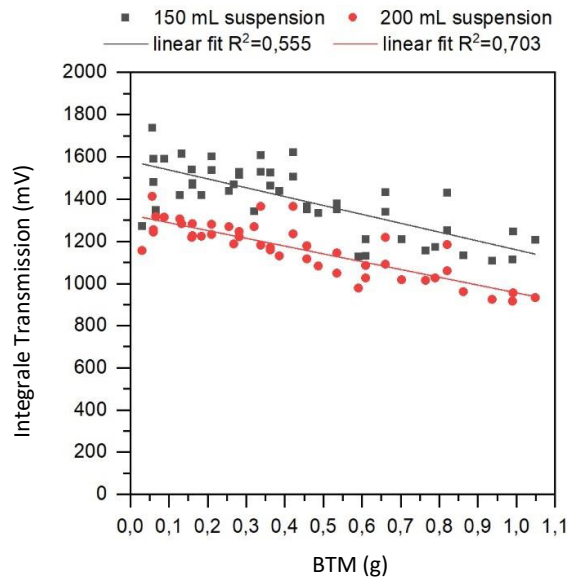


Abbildung 0-55: Korrelation aller gemessenen Werte der integralen optischen Dichte mit der Biotrockenmasse von *S. palustre* in 150 mL und 200 mL VE-Wasser. Die Ausgleichsgerade wurde durch einen linearen Fit in OriginPro erstellt. Die Steigungen und die Achsenabschnitte der y-Achse entsprechen für *S. palustre*  $y=1578,8 - 420,1 \cdot x$  (150 mL) und  $y=1323,9 - 369,0 \cdot x$  (200 mL). Messbedingungen: 500 ml Erlenmeyerkolben, Suspensionsvolumen: 150 ml, 200 ml, Medentyp: entionisiertes Wasser. Einstellung des Geräts: Strom: 100 mA, Verstärkung: 2, Messzeit: 30 s, Schüttler: 180 rpm. Blaue Linie stellt eine Torfmooskonzentration von  $3,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  dar.