



**HOCHSCHULE OSNABRÜCK**  
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Fakultät Agrarwissenschaften und Landschaftsarchitektur

## **Abschlussbericht**

**„LemnaProtein“**

**Entwicklung eines standardisierten Produktionsprozesses  
von Wasserlinsen als alternatives Eiweißfuttermittel  
aus heimischer Erzeugung**

(AZ: 34223/01)



**Verfasser:** Finn Petersen, Johannes Demann, Dina Restemeyer, Anne Radermacher-Bücker, Prof. Dr. Hans-Werner Olf, Prof. Dr. Andreas Ulbrich, Prof. Dr. Heiner Westendarp

**Projektbeginn:** 01.10.2018

**Laufzeit:** 3 Jahre, 6 Monate

**Ort:** Osnabrück

**Jahr:** 2022

**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



Az	<b>34223-01</b>	Referat	Fördersumme	<b>497.067 €</b>
<b>Antragstitel</b>		<b>Entwicklung eines standardisierten Produktionsprozesses von Wasserlinsen als alternatives Eiweißfuttermittel aus heimischer Erzeugung</b>		
<b>Stichworte</b>				
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)	
<b>42 Monate</b>	<b>01.10.2018</b>	<b>31.03.2022</b>	<b>1</b>	
Zwischenberichte	<b>10/2019 und 10/2020</b>			
<b>Bewilligungsempfänger</b>	Prof. Dr. B. Lehmann		Tel	0541 969 5055
	Vizepräsident für Forschung und Transfer und		Fax	
	Nachwuchsförderung		Projektleitung	Prof. Dr. Heiner Westendarp
	Stiftung Fachhochschule Osnabrück		Bearbeiter	Johannes Demann, Prof. Dr. Hans-Werner Olf, Finn Petersen, Dina Restemeyer, Prof. Dr. Andreas Ulbrich
Caprivistraße 30 A				
49076 Osnabrück				

### **Zielsetzung und Anlass des Vorhabens**

Die intensive Tierhaltung im Nordwesten Deutschlands führt zu deutlichen Nährstoffüberschüssen in Form von Gülle, und daraus folgend zu unerwünschten Nährstoffeinträgen in nicht-agrarische Ökosysteme. Diese können beispielsweise zur Eutrophierung von Oberflächengewässern oder zur Verunreinigung des Grundwassers mit Nitrat führen. Derzeit werden für die Nutztierhaltung deutschlandweit Proteinfuttermittel, hauptsächlich in Form von Sojaextraktionsschrot, in einer Größenordnung von ca. 4,5 Mio. t pro Jahr aus Nord- und Südamerika importiert. Dies führt zu hohen Nährstoffüberschüssen in Nordwestdeutschland, zur Abholzung von Regenwäldern, um Anbauflächen zu gewinnen, und zu langen Transportwegen, die zur Verstärkung der globalen Erwärmung beitragen.

Ziel des Projektes ist die Entwicklung eines standardisierten, rezirkulierenden Kultivierungsverfahrens für Wasserlinsen, in welches die Gölledünnphase als alternative Nährstoffquelle integriert werden soll. Dabei soll ein Produktionsprozess zur Erzeugung qualitativ hochwertiger und standardisierter Proteinträger für die Tierernährung anhand verschiedener Umweltparameter definiert und Nährstoffkreisläufe geschlossen werden. Der interdisziplinäre Ansatz hat einen hohen Stellenwert im Projekt, da ein Bioverfahrensprozess zur standardisierten Produktion von pflanzlicher Biomasse entwickelt wird, bei dem die Eignung des Produktes für die Tierernährung zielgebend ist. Im Vordergrund stehen somit Proteinertrag, biologische Wertigkeit und Verdaulichkeit der Aminosäuren der erzeugten Wasserlinsenbiomasse.

### **Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden**

Der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Pflanzenperformance der Wasserlinsenarten *Lemna minor* und *Wolffiella hyalina* wurde in aufeinanderfolgenden Versuchsreihen in einer Klimazelle überprüft. Neben der Wachstumsdynamik (Frisch- und Trockenmasse) wurde hinsichtlich der inneren Qualität der Rohproteingehalt erfasst. Ergebnisse dieser Versuche dienen der parallelen Etablierung und Optimierung eines vertikalen, standardisierten hydroponischen Kultivierungssystems für Wasserlinsen mit einer Produktionsfläche von 25,2 m<sup>2</sup>. In einem weiteren Versuch wurde der Einsatz der Gölledünnphase in der Wasserlinsenkultivierung überprüft.

Da die weitere Verwendung in Mischfuttermitteln eine Trocknung der Wasserlinsen erfordert, wurde in zwei Versuchsreihen der Einfluss verschiedener Vortrocknungsmethoden (Blanchieren, PEF-Behandlung) und Trocknungsverfahren (Konvektions-, Vakuumtrocknung) auf zuvor definierte Qualitätsparameter bei

Wasserlinsen (*Lemna minor*) untersucht. Parallel dazu wurde in einem Fütterungsversuch mit 108 männlichen Masthähnchen die Wirkung unterschiedlicher Wasserlinsenqualitäten auf die Verdaulichkeit von Rohprotein, Aminosäuren und Phosphor sowie auf die Tierleistung geprüft.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • <http://www.dbu.de>

### **Ergebnisse und Diskussion**

Nachdem geeignete Wasserlinsenarten unter Berücksichtigung der ernährungsphysiologischen Anforderungen landwirtschaftlicher Nutztiere identifiziert wurden, konnte der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Pflanzenperformance von *L. minor* und *W. hyalina* untersucht werden. Hierbei wurde der Einfluss der Nährlösungszusammensetzung und -konzentration, der Lichtintensität und -qualität, sowie der Einfluss der Temperatur und der Strömungsgeschwindigkeit auf die Wachstumsdynamik, den Rohproteingehalt und die In-vitro-Verdaulichkeit der beiden Arten untersucht. Der Rohproteingehalt ließ sich vor allem durch die Nährlösung und insbesondere durch ein verändertes Nitrat-Ammonium-Verhältnis beeinflussen. Die Nährlösung hatte ebenfalls einen starken Einfluss auf die Wachstumsdynamik, ebenso wie die Lichtintensität. Bei den Einflussfaktoren Temperatur, Strömungsgeschwindigkeit und Lichtqualität konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen der Entwicklung und Optimierung eines standardisierten hydroponischen Kultursystems mit einer Produktionsfläche von 25,2 m<sup>2</sup>. Der Versuch zum Einsatz der Gölledünnphase hat eine mögliche Erhöhung des Rohproteingehaltes gezeigt.

In den Versuchen zur qualitätsorientierten Trocknung von Wasserlinsen konnte dargestellt werden, dass zuvor erzeugte Qualitäten durch den Trocknungsprozess erheblich beeinflusst werden können. So zeigte sich ein Einfluss der Vortrocknungsverfahren auf die Trockenmasse- und Rohproteinausbeuten. Zudem bewirkten hohe Trocknungstemperaturen eine signifikante Reduktion des Gehalts an fermentlöslichem Rohprotein.

Der Einsatz unterschiedlicher Wasserlinsenchargen in der Fütterung von Masthähnchen ergab signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen sowohl in den Parametern Tageszunahmen, Futteraufnahme und Futterverwertung als auch in den Verdauungswerten. Die standardisierte ileale Verdaulichkeit des Rohproteins variierte zwischen 40,2 und 83,7 %, wobei die höchsten Verdauungskoeffizienten für das Rohprotein und die Aminosäuren bei Tieren ermittelt wurden, die mit *Lemna obscura* (35,5 % Rohprotein) gefüttert wurden. Die Masthähnchen dieser Fütterungsvariante zeigten bei einem Anteil von 25 % in der Ration auch die besten tierischen Leistungen. Für alle Wasserlinsenchargen wurden geringe Gehalte an Phytat ermittelt, wobei sich in der Phosphorverdaulichkeit Schwankungen zwischen den Chargen (50,8 – 78,9 %) zeigten.

### **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

Durch eine breit aufgestellte Öffentlichkeitsarbeit wurden verschiedene Zielgruppen mit der Wasserlinsenthematik angesprochen. Neben wissenschaftlichen Publikationen in ausgewählten Fachzeitschriften konnte die Thematik sowohl auf nationaler als auch auf internationaler Ebene auf ausgewählten Fachtagungen der wissenschaftlichen Community vorgestellt werden. Besonders hervorzuheben ist hierbei die internationale Duckweed Conference in Israel im Jahr 2019. Auch auf der diesjährigen Konferenz werden erneut Beiträge zu den Versuchsergebnissen aus dem LemnaProtein Projekt vorgestellt werden. Zudem befinden sich derzeit Artikel im Review-Prozess. Weitere Veröffentlichungen über die Projektlaufzeit hinaus sind geplant.

### **Fazit**

Die Einstellung der Umweltparameter (Nährlösung, Temperatur, Strömungsgeschwindigkeit, Lichtqualität und -intensität) und deren kontinuierliche Überwachung besitzen eine hohe Relevanz für einen ertragsstabilen und qualitätsorientierten Anbau von Wasserlinsen. Um in Zukunft die großflächige Erzeugung und damit die Bereitstellung erforderlicher Wasserlinsenmengen zu ermöglichen, ist eine weitere Prozessoptimierung und Automatisierung notwendig. Auch besteht weiterer Forschungs- und Optimierungsbedarf zur Integration der Gölledünnphase in die entwickelte Kultivierungsweise von Wasserlinsen.

Insgesamt können unter standardisierten Produktionsbedingungen Wasserlinsen von hoher biologischer Wertigkeit erzeugt werden, die eine interessante Rationskomponente, insbesondere auch in einer stark stickstoff- und phosphorreduzierten Fütterung, sein können. Weitere Untersuchungen mit standardisierten Produkten zur Etablierung praxisgerechter Fütterungskonzepte sind erforderlich.

Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • <http://www.dbu.de>

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
Zusammenfassung.....	1
1 Anlass und Zielsetzung.....	3
2 Projektverlauf.....	4
3 Ergebnisse und Diskussion.....	5
3.1 Optimierung der Wasserlinsen-Produktion.....	5
3.1.1 Etablierung der Wasserlinsen am Standort Haste.....	5
3.1.1.1 Auswahl geeigneter Wasserlinsenarten.....	5
3.1.1.2 Aufbau einer Erhaltungskultur.....	6
3.1.2 Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Pflanzenperformance von <i>W. hyalina</i> und <i>L. minor</i> .....	8
3.1.2.1 Versuch zur Nährlösungszusammensetzung und –konzentration.....	8
3.1.2.1.1 Material und Methoden.....	8
3.1.2.1.2 Ergebnisse.....	14
3.1.2.1.3 Diskussion.....	19
3.1.2.2 Versuch zur Lichtintensität und –qualität.....	22
3.1.2.2.1 Material und Methoden.....	22
3.1.2.2.2 Ergebnisse.....	27
3.1.2.2.3 Diskussion.....	30
3.1.2.3 Versuch zur Temperatur und Strömungsgeschwindigkeiten.....	35
3.1.2.3.1 Material und Methoden.....	35
3.1.2.3.2 Ergebnisse.....	36
3.1.2.3.3 Diskussion.....	38
3.1.3 Entwicklung und Inbetriebnahme des hydroponischen Kultivierungssystems.....	39
3.1.3.1 Wasserlinsenproduktion in Bramsche.....	39
3.1.3.2 Inbetriebnahme des hydroponischen Wasserlinsenkultivierungssystems am Standort Haste.....	40
3.1.3.3 Pilzbefall mit dem Krankheitserreger <i>Pythium myriotylum</i> .....	40

3.1.3.4	Aufbau einer stabilen Kultivierung und Modifizierung des hydroponischen Kultivierungssystems .....	41
3.1.3.5	Versuch zum Einfluss der Lichtintensität auf die systemspezifische Kapazitätsgrenze des hydroponischen Kultivierungssystems.....	43
3.1.4	Versuch zum Einsatz der Gülle-Dünnphase.....	44
3.1.4.1	Material und Methoden .....	44
3.1.4.2	Ergebnisse.....	47
3.1.4.3	Diskussion .....	51
3.2	Wasserlinsen als Futtermittel-Alternative zu importierten Sojaextraktionsschrot ..	53
3.2.1	Versuche zur In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins.....	53
3.2.1.1	Material und Methoden .....	53
3.2.1.2	Ergebnisse.....	54
3.2.1.3	Diskussion .....	54
3.2.2	Versuche zur qualitätsorientierten Trocknung von Wasserlinsen .....	55
3.2.2.1	Material und Methoden .....	55
3.2.2.2	Ergebnisse.....	57
3.2.2.3	Diskussion .....	60
3.2.3	Fütterungsversuch bei Masthähnchen .....	62
3.2.3.1	Material und Methoden .....	62
3.2.3.2	Ergebnisse.....	65
3.2.3.3	Diskussion .....	68
4	Öffentlichkeitsarbeit .....	70
5	Fazit.....	72
6	Literaturverzeichnis.....	74

## Abkürzungsverzeichnis

AID	apparent ileal digestibility (scheinbare ileale Verdaulichkeit)
AME <sub>N</sub>	nitrogen-corrected apparent metabolizable energy (N-korrigierte scheinbar umsetzbare Energie)
AS	Aminosäuren
CPC	crude protein content (Rohproteingehalt)
DT	doubling time (Verdopplungszeit)
FA	Futtermaufnahme
FM	Frischmasse
FWW	Futtermverwertung
fXP	fermentlösbares Rohprotein
IVD	in vitro digestibility of crude protein (In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins)
IVF	indoor vertical farm (vertikale Indoor-Farm)
LM	Lebendmasse
PEF	pulsed electric fields (gepulste elektrische Felder)
RGR	relative growth rate (relative Wachstumsrate)
RPY	relative protein yield (relativer Proteinertrag)
SID	standardized ileal digestibility (standardisierte ileale Verdaulichkeit)
TGZ	tägliche Zunahmen
TM	Trockenmasse
XP	Rohprotein

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell- und Kreislaufcharakter des LemnaProtein-Projektes .....	3
Abbildung 2: Balkenterminplan des LemnaProtein-Projektes (Januar 2019 bis März 2022) ..	5
Abbildung 3: Ablaufdiagramm der Beerntung eines Beckens zur Erfassung der Frischmasse, a: Abernten der Wasserlinsen, b: Spülen und Überführen der Wasserlinsen in ein Netz, c: Schleudern der Wasserlinsen, d: Wägung der Gesamtfrischmasse, e: Wägung der Probemengen und Überführung in die Probengefäße.....	12
Abbildung 4: Ablaufdiagramm der Stickstoffbestimmung nach der Dumas-Verbrennungsmethode, a: Einfüllen der homogenisierten Wasserlinsenprobe in eine Einwaagehilfe, b-c: Herstellung einer Proben-tablette mittels hydraulischer Presse, d: Überführen der Proben-tablette auf den Proben-teller des Leco FP628.....	14
Abbildung 5: Relative Wachstumsrate (RGR; $d^{-1}$ ), bezogen auf das Trockengewicht, für <i>Lemna minor</i> (graue Säulen) und <i>Wolffiella hyalina</i> (weiße Säulen). Die Pflanzen wurden sieben Tage lang in Nährlösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von Nitrat-N zu Ammonium-N (von [100-0] bis [0-100]) in verschiedenen Verdünnungen (1, 5, 10 und 50 % des unverdünnten N-Mediums) kultiviert. Anzahl der Parallelproben $n=4$ , unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanzen innerhalb einer Art, basierend auf einem Einweg-ANOVA-Test, Tuckey $p \leq 0,05$ , die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.....	15
Abbildung 6: Rohproteingehalt (% TM) für <i>L. minor</i> (graue Säulen) und <i>W. hyalina</i> (weiße Säulen), die über sieben Tage in Nährlösungen mit unterschiedlichen $NO_3^-$ -N zu $NH_4^+$ -N Verhältnissen in verschiedenen Verdünnungen, basierend auf dem N-Medium, kultiviert wurden (weitere Erklärungen siehe Tabelle 5).....	16
Abbildung 7: Der relative Proteinertrag, $g \cdot Woche^{-1} \cdot m^{-2}$ (bezogen auf DW) für <i>L. minor</i> (graue Säulen) und <i>W. hyalina</i> (weiße Säulen), die über sieben Tage in Nährlösungen mit unterschiedlichen $NO_3^-$ -N zu $NH_4^+$ -N Verhältnissen in verschiedenen Verdünnungen, bezogen auf das N-Medium, kultiviert wurden (weitere Erklärungen siehe Tabelle 5).....	17
Abbildung 8: Konzentrationsabnahme von Nitrat-N ( $mg \cdot L^{-1}$ ) in den Nährmedien für <i>L. minor</i> (graue Säulen) und <i>W. hyalina</i> (weiße Säulen), die über sieben Tage in Nährlösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von $NO_3^-$ -N zu $NH_4^+$ -N in verschiedenen Verdünnungen kultiviert wurden (für weitere Erklärungen siehe Tabelle 5).....	18
Abbildung 9: Konzentrationsabnahme von Ammonium-N ( $mg \cdot L^{-1}$ ) in den Nährmedien für <i>L. minor</i> (graue Säulen) und <i>W. hyalina</i> (weiße Säulen), die über sieben Tage in Nährlösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von $NO_3^-$ -N zu $NH_4^+$ -N in verschiedenen Verdünnungen kultiviert wurden (für weitere Erklärungen siehe Tabelle 5).....	19
Abbildung 10: A) Schematischer Versuchsaufbau des Kreislaufsystems mit 16 Versuchsbecken und den jeweiligen Zu- und Abläufen, B) Darstellung der einzelnen Belichtungsvarianten während des Versuches .....	23
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in Bezug auf die Steuerungsparameter und die Parametererfassung .....	26
Abbildung 12: Relative Wachstumsrate (RGR; $d^{-1}$ ), basierend auf der Trockenmasse, für <i>Lemna minor</i> (grau schattierte Säulen) und <i>Wolffiella hyalina</i> (weiße Säulen), die Pflanzen wurden über sieben Tage bei unterschiedlichen Lichtintensitäten (50, 100 und 150 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) und Spektralverteilungen (rot/blau: 70/30, 50/50 und 30/70 %) kultiviert ( $n=4$ ,	

unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanzen innerhalb einer Art, Tuckey $p \leq 0,05$ , Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	28
Abbildung 13: Relativer Proteinertrag (RPY; g Woche <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> ), basierend auf der Trockenmasse, für <i>Lemna minor</i> (grau schattierte Säulen) und <i>Wolffiella hyalina</i> (weiße Säulen), die Pflanzen wurden über sieben Tage bei unterschiedlichen Lichtintensitäten (50, 100 und 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und Spektralverteilungen (rot/blau: 70/30, 50/50 und 30/70 %) kultiviert (n=4, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanzen innerhalb einer Art, Tuckey $p \leq 0,05$ , Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) .....	29
Abbildung 14: Chlorophyll-a-Gehalt ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), bezogen auf die Trockenmasse, für <i>Lemna minor</i> (grau schattierte Säulen) und <i>Wolffiella hyalina</i> (weiße Säulen), die Pflanzen wurden über sieben Tage bei unterschiedlichen Lichtintensitäten (50, 100 und 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und Spektralverteilungen (rot/blau: 70/30, 50/50 und 30/70 %) kultiviert (n=4, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanzen innerhalb einer Art, Tuckey $p \leq 0,05$ , Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung).....	30
Abbildung 15: Versuchsaufbau mit drei Kreisläufen mit jeweils vier Versuchsbecken zur Überprüfung des Einflusses der Temperatur und der Wasserlinsenbewegung.....	35
Abbildung 16: Versuchsaufbau und Ablauf zur Überprüfung des Einflusses der Wasserlinsenbewegung und der Temperatur auf die Kultivierung der Wasserlinsenarten <i>L. minor</i> und <i>W. hyalina</i> .....	36
Abbildung 17: Relative growth rate (RGR, d <sup>-1</sup> ) von A: <i>L. minor</i> und B: <i>W. hyalina</i> bei drei unterschiedlichen Wasserlinsenbewegungen (langsam: 0,2-1,6 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , mittel: 1,6-3,0 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , schnell: 3,0-4,4 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und zwei Temperaturen (20 und 24 °C), Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.....	37
Abbildung 18: Rohproteingehalt (% , bezogen auf die Trockenmasse) von A: <i>L. minor</i> und B: <i>W. hyalina</i> bei drei unterschiedlichen Wasserlinsenbewegungen (langsam: 0,2-1,6 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , mittel: 1,6-3,0 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , schnell: 3,0-4,4 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und zwei Temperaturen (20 und 24 °C), Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.....	37
Abbildung 19: Intrinsische Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Temperatur (Balken stellen maximalen Fehler dar, abgeleitet aus den Stickstoff und Phosphor-Massenbilanzen) (Lasfar et al. 2007) .....	38
Abbildung 20: Pilzbefall der Wasserlinsenart <i>L. minor</i> mit dem Erreger <i>Pythium myriotylum</i> in dem hydroponischen Kultivierungssystem am Standort Haste .....	41
Abbildung 21: Inbetriebnahme (links) und Optimierung des vertikalen hydroponischen Produktionssystems für Wasserlinsen (rechts) am Standort Haste.....	42
Abbildung 22: Funktionen verschiedener Wachstumsmodelle (MONETTE et al. 2006; DRIEVER et al. 2005; GOMPERTZ 1825).....	43
Abbildung 23: pH-Wert der unterschiedlichen Nährlösungsvarianten zum Versuchsstart und – ende am Beispiel von <i>W. hyalina</i> .....	46
Abbildung 24: Ammonium-N- bzw. Nitrat-N-Gehalte ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) der unterschiedlichen Nährlösungen für die beiden Wasserlinsenarten <i>L. minor</i> und <i>W. hyalina</i> zum Versuchsstart und nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte $\pm$ SD, n=4) .....	48

Abbildung 25: Trockenmassegehalt (%) der Wasserlinsenarten <i>L. minor</i> und <i>W. hyalina</i> auf den unterschiedlichen Nährlösungen zum Versuchsstart und nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte±SD, n=4).....	49
Abbildung 26: Relative growth rate (RGR, d <sup>-1</sup> ) der Wasserlinsenarten <i>L. minor</i> und <i>W. hyalina</i> auf den unterschiedlichen Nährlösungen nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte±SD, n=4).....	49
Abbildung 27: Verdopplungszeiten (DT, d) der Wasserlinsenarten <i>L. minor</i> und <i>W. hyalina</i> auf den unterschiedlichen Nährlösungen nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte±SD, n=4).....	50
Abbildung 28: Rohproteingehalt (% , bezogen auf die TM) der Wasserlinsenarten <i>L. minor</i> und <i>W. hyalina</i> auf den unterschiedlichen Nährlösungen zum Versuchsstart und nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte±SD, n=4) .....	51
Abbildung 29: Apparatur und Ablauf der Applikation von gepulsten elektrischen Feldern ....	57
Abbildung 30: Trockenmassegehalte (g·kg <sup>-1</sup> ) in der Biomasse (BM) von <i>Lemna minor</i> bei verschiedenen Vortrocknungsbehandlungen und in den unbehandelten Kontrollproben der Versuchsreihen 1 und 2.....	58
Abbildung 31: Ausbeute an Rohprotein(□) und Trockenmasse (▣) in der Biomasse (BM) von <i>Lemna minor</i> (% w/w) bei verschiedenen Vortrocknungsbehandlungen und in den unbehandelten Kontrollproben der Versuchsreihen 1 und 2 .....	59
Abbildung 32: Rohproteingehalt in der Biomasse von <i>Lemna minor</i> nach verschiedenen Vortrocknungs- und Trocknungsbehandlungen in Versuchsreihe 1 und 2 .....	59
Abbildung 33: In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins in der Biomasse von <i>Lemna minor</i> nach verschiedenen Vortrocknungs- und Trocknungsbehandlungen in den Versuchsreihen 1 und 2 .....	60
Abbildung 34: Trockenmassegehalt der Kotproben am 26. Lebenstag (n = 6).....	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Aminosäuregehalte ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ XP) der ausgewählten Wasserlinsenarten unter der Angabe verschiedener Klone (ausgewählte Klone grau hinterlegt) .....	6
Tabelle 2: Zusammensetzung der sieben Stammlösungen ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) für fünf verschiedene Verhältnisse von Nitrat-N zu Ammonium-N ([100-0], [75-25], [50-50], [25-75], [0-100]), basierend auf dem N-Medium .....	10
Tabelle 3: Nährstoffzusammensetzung (mM) des modifizierten N-Mediums mit fünf verschiedenen Verhältnissen von $\text{NO}_3^-$ -N (hellgrau) zu $\text{NH}_4^+$ -N (dunkelgrau) bei einer Anfangskonzentration von 100 %. Diese Konzentrationen wurden auf die Endkonzentrationen von 10 % und 50 %, in einigen Fällen auf 1 % und 5 % verdünnt.....	10
Tabelle 4: Einfluss des Vermahlungsgrades (Kugelmühle, mit Hand „zerstoßen“) auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Gesamt-Stickstoffanalyse (% N) .....	13
Tabelle 5: Nährstoffzusammensetzung (mmol/l und mg/l) des modifizierten N-Mediums mit einem Molverhältnis von 75:25 [ $\text{NO}_3^-$ -N: $\text{NH}_4^+$ -N] bei einer Anfangskonzentration von 100 % (angelehnt an Appenroth 2015), diese Konzentration wurde im Anschluss mit regionalem Leitungswasser auf 10 % verdünnt.....	24
Tabelle 6: Acht Versuchsvarianten mit unterschiedlichen Lichtintensitäten ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) und rot/blau-Verhältnissen.....	24
Tabelle 7: Konzentrationen ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) der einzelnen Nährstoffe im Nährstoffreservoir an Tag 1, 7 und 14, gemittelt über die zwei Versuche für <i>L. minor</i> und <i>W. hyalina</i> .....	25
Tabelle 8: Nährstoffzusammensetzung ( $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) der Sauen Dünngülle (links) und der Stammlösung des modifizierten N-Mediums (rechts).....	46
Tabelle 9: Ammonium-Nitrat-Verhältnis innerhalb der einzelnen Nährlösungsvarianten für die Wasserlinsenarten <i>L. minor</i> und <i>W. hyalina</i> zum Versuchsstart .....	48
Tabelle 10: Einfluss von Nährlösungen (10%ige Verdünnung) mit unterschiedlichen Nitrat-Ammonium-Verhältnissen auf den Gehalt an Rohprotein und fermentlösbares Rohprotein sowie auf die In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins bei <i>L. minor</i> und <i>W. hyalina</i> .....	54
Tabelle 11: PEF-Intensitäten und zugehörige Geräteparameter .....	56
Tabelle 12: Zusammensetzung des Basalfutters .....	63
Tabelle 13: Zusammensetzung und wertbestimmende Inhaltsstoffe der Futtermischungen ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; sofern nicht anders angegeben) .....	63
Tabelle 14: Nährstoffgehalte von getrockneten Wasserlinsenchargen unterschiedlicher Arten ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; sofern nicht anders angegeben) .....	64
Tabelle 15: Leistungsparameter von Masthähnchen (21. – 27. Lebenstag) beim Einsatz unterschiedlicher Wasserlinsenchargen .....	66
Tabelle 16: Scheinbare ileale Verdaulichkeit (%) von Rohprotein, Aminosäuren und Phosphor für die verschiedenen Wasserlinsenchargen .....	66
Tabelle 17: Standardisierte ileale Verdaulichkeit (%) von Rohprotein und Aminosäuren für die verschiedenen Wasserlinsenchargen .....	67

## Zusammenfassung

Die intensive Tierhaltung im Nordwesten Deutschlands führt zu deutlichen Nährstoffüberschüssen in Form von Gülle und daraus folgend zu unerwünschten Nährstoffeinträgen in nicht-agrarische Ökosysteme. Diese können beispielsweise zur Eutrophierung von Oberflächengewässern oder zur Verunreinigung des Grundwassers mit Nitrat führen. Derzeit werden für die Nutztierhaltung deutschlandweit Proteinfuttermittel, hauptsächlich in Form von Sojaextraktionsschrot, in einer Größenordnung von ca. 4,5 Mio. t pro Jahr aus Nord- und Südamerika importiert.

Ziel des LemnaProtein-Projektes war die Entwicklung eines standardisierten, rezirkulierenden Kultivierungsverfahrens für Wasserlinsen, in welches die Gölledünnphase als alternative Nährstoffquelle integriert werden sollte. Dabei sollte ein Produktionsprozess zur Erzeugung qualitativ hochwertiger und standardisierter Proteinträger für die Tierernährung anhand verschiedener Umweltparameter definiert und Nährstoffkreisläufe geschlossen werden. In dem 3,5-jährigen Projekt wurden hierzu verschiedene Versuche in den Bereichen Pflanzenwissenschaften und Tierernährung durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Identifikation geeigneter Wasserlinsenarten unter Berücksichtigung der ernährungsphysiologischen Anforderungen landwirtschaftlicher Nutztiere. Daran anschließend wurde der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Pflanzenperformance von *L. minor* und *W. hyalina* untersucht. Der Rohproteingehalt ließ sich vor allem durch die Nährlösung und insbesondere durch ein verändertes Nitrat-Ammonium-Verhältnis beeinflussen. Die Nährlösung hatte ebenfalls einen starken Einfluss auf die Wachstumsdynamik ebenso wie die Lichtintensität. Bei den Einflussfaktoren Temperatur, Strömungsgeschwindigkeit und Lichtqualität konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen der Entwicklung und Optimierung eines standardisierten hydroponischen Kultursystems mit einer Produktionsfläche von 25,2 m<sup>2</sup>. Der Versuch zum Einsatz der Gölledünnphase hat eine mögliche Erhöhung des Rohproteingehaltes gezeigt. Es besteht aber noch weiterer Forschungs- und Optimierungsbedarf zum standardisierten Einsatz bei der Kultivierung von Wasserlinsen.

In den Versuchen zur qualitätsorientierten Trocknung von Wasserlinsen konnte dargestellt werden, dass zuvor erzeugte Qualitäten durch den Trocknungsprozess erheblich beeinflusst werden können. So zeigte sich ein Einfluss der Vortrocknungsverfahren auf die Trockenmasse- und Rohproteinausbeute. Zudem bewirkten hohe Trocknungstemperaturen eine signifikante Reduktion des Gehalts an fermentlöslichem Rohprotein.

Der Einsatz unterschiedlicher Wasserlinsenchargen in der Fütterung von Masthähnchen ergab signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen sowohl in den Parametern Tageszunahmen, Futteraufnahme und Futtermittelverwertung als auch in den Verdauungswerten. Die

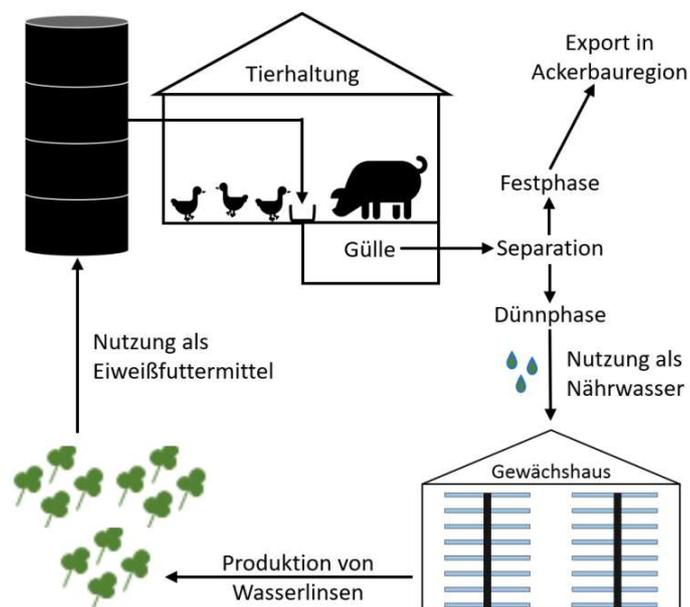
standardisierte ileale Verdaulichkeit des Rohproteins variierte zwischen 40,2 und 83,7 %, wobei die höchsten Verdauungskoeffizienten für das Rohprotein und die Aminosäuren bei Tieren ermittelt wurden, die mit *Lemna obscura* (35,5 % Rohprotein) gefüttert wurden. Die Masthähnchen dieser Fütterungsvariante zeigten bei einem Anteil von 25 % in der Ration auch die besten tierischen Leistungen. Des Weiteren konnten Differenzen der Fütterungsgruppen hinsichtlich der Phosphorverdaulichkeit festgestellt werden. Im Rahmen der laboranalytischen Untersuchung wurden für alle Wasserlinsenproben geringe Gehalte an Phytat (2,9 – 7,8 % des Gesamtphosphorgehaltes) ermittelt. Die Werte liegen damit deutlich unter den Gehalten anderer pflanzlicher Futterkomponenten und deuten an, dass Wasserlinsen eine interessante Rationskomponente in P-reduzierten Futtermischungen für Masthähnchen darstellen können. Der Einsatz von Wasserlinsen in der Fütterung landwirtschaftlicher Nutztiere kann somit zukünftig einen Beitrag für eine nachhaltige und ressourcenschonende Tierhaltung leisten. Weiterer Forschungsbedarf betrifft die Prozessoptimierung und Automatisierung, um die erforderlichen Wasserlinsenmengen kultivieren zu können, sowie die Integration der Gölledünnphase in die entwickelte Kultivierungsweise von Wasserlinsen. Zudem sind Untersuchungen mit standardisierten Produkten zur Etablierung praxisgerechter Fütterungskonzepte erforderlich.

# 1 Anlass und Zielsetzung

Die intensive Tierhaltung im Nordwesten Deutschlands führt zu deutlichen Nährstoffüberschüssen in Form von Gülle und daraus folgend zu unerwünschten Nährstoffeinträgen in nicht-agrarische Ökosysteme. Diese können beispielsweise zur Eutrophierung von Oberflächengewässern oder zur Verunreinigung des Grundwassers mit Nitrat führen. Derzeit werden für die Nutztierhaltung deutschlandweit Proteinfuttermittel, hauptsächlich in Form von Sojaextraktionsschrot, in einer Größenordnung von ca. 4,5 Mio. t pro Jahr aus Nord- und Südamerika importiert. Dies führt zu hohen Nährstoffüberschüssen in Nordwestdeutschland, zur Abholzung von Regenwäldern, um Anbauflächen zu gewinnen, und zu langen Transportwegen, die zur Verstärkung der globalen Erwärmung beitragen.

Die hier skizzierten Problemstellungen wurden durch ein interdisziplinäres Forschungsprojekt an der Hochschule Osnabrück mittels eines innovativen Gesamtkonzepts (Abbildung 1) bearbeitet. Dieses gliederte sich in zwei Arbeitspakete:

- Arbeitspaket A: Entwicklung eines standardisierten Produktionsprozesses für Wasserlinsen
- Arbeitspaket B: Nutzung von Wasserlinsen als Futtermittel-Alternative zu importierten Sojaextraktionsschrot



**Abbildung 1: Modell- und Kreislaufcharakter des LemnaProtein-Projektes**

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines geschlossenen und kontrollierbaren Kultivierungsverfahrens für Wasserlinsen auf Basis der Gölledünnphase. Dabei sollte ein Produktionsprozess zur Erzeugung qualitativ hochwertiger und standardisierter Proteinträger für die Tierernährung anhand verschiedener Umweltparameter definiert werden. Der interdisziplinäre

Ansatz hatte einen hohen Stellenwert im Projekt, da ein Bioverfahrensprozess zur standardisierten Produktion von pflanzlicher Biomasse entwickelt werden sollte, bei dem die Eignung des Produktes für die Tierernährung zielgebend war. Im Vordergrund standen somit Protein-ertrag, biologische Wertigkeit und Aminosäurenverdaulichkeit der erzeugten Wasserlinsenbiomasse. Zur Bewertung der ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Wasserlinsen wurden Fütterungsversuche mit Masthähnchen geplant. Auf Basis der gewonnen wissenschaftlichen Erkenntnisse sollten Fütterungsempfehlungen zum Einsatz von Wasserlinsen bei Masthähnchen erarbeitet werden.

## **2 Projektverlauf**

Mit Projektstart im Oktober 2018 erfolgte eine Einarbeitung in das Thema und die Planung der nächsten Projektschritte. Nach erfolgreicher Literaturrecherche konnten drei Wasserlinsenarten anhand der ernährungsphysiologischen Anforderung landwirtschaftlicher Nutztiere identifiziert werden. Im Januar 2019 wurden diese aus der Sammlung des Institutes für Pflanzenphysiologie der Universität Jena bezogen. Wie dem Balkenterminplan (Abbildung 2) zu entnehmen ist, wurden die ursprünglichen Sterilkulturen am Standort Haste etabliert und weiter kultiviert. Neben der weiteren Planung der anstehenden Versuche und der damit verbundenen Materialbeschaffung wurden erste Vorversuche mit den Wasserlinsenarten durchgeführt. Mitte 2019 fanden pflanzenbauliche Versuche hinsichtlich der Untersuchung des Einflusses verschiedener Umweltparameter auf das Wachstum der Wasserlinsen als ein wesentlicher Bestandteil des Arbeitspakets A statt. Dazu erfolgte zunächst die Überprüfung des Einflusses der Nährlösungszusammensetzung und -konzentration auf die Performance der Wasserlinsen. Weitere Versuche zum Einfluss der Beleuchtung, der Durchflussgeschwindigkeit und der Temperatur folgten Mitte und Ende 2020. Parallel zu den pflanzenbaulichen Versuchen wurde die In-vitro-Verdaulichkeit aller Varianten bestimmt und als ein weiterer Untersuchungsfaktor in das Arbeitspaket B implementiert. Zwischen den Versuchen erfolgten jeweils eine intensive Planung und Vorbereitung sowie eine Auswertung und Aufbereitung der Daten. Ab Mitte Mai konnte auf Basis der Ergebnisse des Nährlösungsversuches eine erste Publikation (Petersen et al. 2021) erarbeitet werden. Der Einsatz der Gölledünnphase wurde erstmalig Mitte 2021 im bestehenden Versuchssystem überprüft. Neben den laufenden pflanzenbaulichen Versuchen erfolgte im Februar 2020 ein Upscaling des Kreislaufsystems. Die Wasserlinsen für die anstehenden Fütterungsversuche wurden zunächst in Kooperation mit der Firma Aqua-Light GmbH in Bramsche erzeugt, bis dann ein eigenes System erworben, modifiziert und für eine engere Betreuung am Standort Haste im Juli 2020 in Betrieb genommen wurde. Auf Basis der pflanzenbaulichen Versuche erfolgte eine kontinuierliche Optimierung des Systems. Die qualitätsorientierte Trocknung der Wasserlinsen fand im Rahmen des Arbeitspaketes B Ende 2020 statt. Parallel dazu wurden Fütterungsversuche mit Masthähnchen durchgeführt, um eine erste



flusst. Der Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Pflanzenperformance der ausgewählten Arten wurde in verschiedenen Versuchen untersucht und wird im weiteren Verlauf der Arbeit dargestellt. Auf Basis der genannten Kriterien wurden *Lemna minor* 9441 (Deutschland, Marburg), *Wolffiella hyalina* 9525 (Indien, Telangana) und *Wolffia microscopica* 2007 & 2005 (Indien, Gujarat) ausgewählt. Bezogen wurden diese im Januar 2019 aus der Sammlung des Institutes für Pflanzenphysiologie der Universität Jena. Hierbei handelte es sich um Sterilkulturen. Zusätzlich zum Aminosäuremuster spricht für *Lemna minor* die bereits erfolgte Aufnahme in die sogenannte „Positivliste“ (notwendig für die Nutzung als Einzelfuttermittel in Deutschland). In Tabelle 1 sind die Aminosäuregehalte der ausgewählten Arten unter der Angabe verschiedener Klone und als Referenz die Aminosäuregehalte von Sojaextraktionsschrot abgebildet.

**Tabelle 1: Übersicht über die Aminosäuregehalte (g·100 g<sup>-1</sup> XP) der ausgewählten Wasserlinsenarten unter Angabe verschiedener Klone (ausgewählte Klone grau hinterlegt)**

Art	Stamm	Lys	Met	Cys	Thr	Val	Literaturnachweis
g·100 g <sup>-1</sup> XP							
<i>L. minor</i>	6570	7,1	2,0	0,3	4,8	6,8	AMADO et al. (1980)
<i>L. minor</i>	6578	6,8			5,1	7,3	AMADO et al. (1980)
<i>L. minor</i>	7194	6,9	2,1	0,4	4,8	6,3	AMADO et al. (1980)
<i>L. minor</i>		5,0	1,4	0,9	4,3	5,0	HANCZAKOWSKI et al. (1995)
<i>L. minor</i>		5,1	1,4	0,8	3,9	4,8	HANCZAKOWSKI et al. (1995)
<i>L. minor</i>	9441	5,0	1,6	1,1	4,1	4,6	APPENROTH et al. (2017)
<b>Mittelwert</b>		<b>6,0</b>	<b>1,7</b>	<b>0,7</b>	<b>4,5</b>	<b>5,8</b>	
<i>W. microscopica</i>	2005	5,7	1,6	1,2	4,7	4,9	Appenroth et al. (2017)
<i>W. microscopica</i>	2007	6,0	1,7	1,6	4,5	5,0	APPENROTH et al. (2018)
<b>Mittelwert</b>		<b>5,9</b>	<b>1,7</b>	<b>1,4</b>	<b>4,6</b>	<b>5,0</b>	
<i>W. hyalina</i>	7376	7,4			5,0	7,4	AMADO et al. (1980)
<i>W. hyalina</i>	7378	6,9	0,8		5,2	7,0	AMADO et al. (1980)
<i>W. hyalina</i>	7426	7,0	1,0		5,4	6,9	AMADO et al. (1980)
<i>W. hyalina</i>	9525	5,8	2,0	1,0	4,2	4,8	APPENROTH et al. (2017)
<b>Mittelwert</b>		<b>6,8</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>5,0</b>	<b>6,5</b>	
Sojaschrot		6,1	1,4	1,5	3,9	4,8	SAUVANT et al. (2004)

### 3.1.1.2 Aufbau einer Erhaltungskultur

Die von der Universität Jena bezogenen Sterilkulturen mussten an der Hochschule Osnabrück im Hinblick auf die zukünftigen Arbeiten und Verwendungszwecke unter nicht-sterilen Bedingungen kultiviert werden. Die größte Herausforderung bei der Kultivierung ist die Adaption an nicht-sterile Wachstumsbedingungen. Insbesondere die ubiquitär vorkommenden Sporen von Fadenalgen können bei ungünstigen Kultivierungsbedingungen innerhalb kürzester Zeit eine Wasserlinsenpopulation schädigen und im Folgenden dafür sorgen, dass das Wachstum der

Wasserlinsen stark gehemmt wird. In der Literatur ist wenig über eine nicht-sterile und algenarme bzw. algenfreie Kultivierung verschiedener Wasserlinsenarten bekannt, da wissenschaftliche Versuche in der Regel unter sterilen Bedingungen und in kleinerem Maßstab stattfinden. Zuerst musste mittels des vorhandenen Wissens ein Kultursystem für die Vermehrung und Erhaltung entwickelt werden. Im Zuge dieses Prozesses wurden in Vorversuchen (ohne statistische Analysen) die Auswirkungen unterschiedlicher Systemveränderungen und Umweltfaktoren auf das Wachstum und die Farbe (als möglicher Indikator für die Pflanzengesundheit) der einzelnen Wasserlinsenarten und das Wachstum von Fadenalgen beobachtet und beurteilt.

Folgende Faktoren wurden untersucht:

- Nährlösungszusammensetzung
- Verdünnungsstufen der Nährlösungen
- Eisenchelatbildner
- Säuren/Laugen zur pH-Regulierung
- Lichtintensität und -qualität
- Photoperiode
- Kultivierungsbecken

Für die Nährlösung wurde ein nitrathaltiges Medium und ein ammoniumhaltiges Medium gewählt. Hergestellt wurde es aus kommerziell erhältlichen Düngern, angelehnt an das nitrathaltige N-Medium, welches unter sterilen Bedingungen die höchsten Wachstumsraten erzielen konnte (APPENROTH 2015). In der Literatur wird hingegen beschrieben, dass bevorzugt Ammonium von den Wasserlinsen aufgenommen wird (CEDERGREEN, VINDBÆK MADSEN 2002; ZHANG et al. 2014). Die Nährmedien wurden in verschiedenen Verhältnissen verdünnt, um weniger überschüssige Nährstoffe vorliegen zu haben, die das Algenwachstum gefördert hätten. Um Eisen pflanzenverfügbar zu halten, liegt es in Düngemittel häufig in Form von Eisenchelat vor. Es gibt verschiedene Chelatbildner (z. B. EDDHA oder EDTA), die unterschiedliche Einflüsse auf die im Produktionsprozess nicht erwünschte Blütenbildung bei Wasserlinsen haben (KHURANA, MAHESHWARI 1983) und in unterschiedlichen pH-Bereichen aktiv sind. Für die geplanten Versuche wurde aufgrund der Vorversuche das EDDHA als Chelatbildner verwendet, da es in einem weiten pH-Bereich von 2 bis 10 stabil ist.

Durch die Aufnahme von Nährstoffen kann sich der pH-Wert in kürzester Zeit deutlich verändern. Abhängig von der vorliegenden Stickstoffform steigt der Wert auf bis zu pH 10 (bei nitrathaltiger Lösung) oder sinkt auf ca. pH 3 (bei ammoniumhaltiger Lösung). Es ist somit von zentraler Bedeutung, den pH-Wert im optimalen Bereich zu stabilisieren. Mit jeder Einheit zugegebener Säure bzw. Lauge gelangen weitere Nährstoffe in die Lösung, die das Wachstum

beeinflussen können und somit ebenfalls berücksichtigt werden müssen. In weiteren Untersuchungen kann diese Herausforderung durch einen Teilwasserwechsel und die Anpassung der Nährlösung umgangen werden.

Strahlungsspektren mit und ohne UV-Anteil wurden mittels LEDs (M30, SANLight) getestet. Die Photoperiode (Beleuchtung pro Tag in Stunden) wurde variiert um das Wasserlinsenwachstum zu steigern und gleichzeitig eine Überwucherung des Systems mit Fadenalgen zu verhindern. Als Kompromiss zwischen Wasserlinsenwachstum und Eindämmung des Algenwachstums hat eine Photoperiode von 12:12 h oder 14:12 h (Tag:Nacht) positive Effekte hervorgebracht.

Schlussendlich wurden sämtliche weiße Kultivierungsbehältnisse durch Schwarze ersetzt, um möglichst wenig Strahlungsreflektion in der Wassersäule zu erzeugen und somit das Algenwachstum weiter zu bremsen. Zudem konnte durch eine höhere Besatzdichte der Wasserlinsen das Algenwachstum ebenfalls eingedämmt werden.

Im Gegensatz zu den anderen beiden Arten erwiesen sich beide Klone von *W. microscopica* bereits in den ersten Wochen unter den nicht-sterilen Bedingungen als schwer kultivierbar. Alle getroffenen Maßnahmen und Veränderungen führten zu keinem zufriedenstellenden Wachstum, weshalb beide Klone dieser Art bereits nach kurzer Zeit für weitere Versuche ausschieden. Nach Rücksprache mit Dr. Appenroth und Mr. Skillicorn (USA) wurde die Beobachtung bestätigt, dass diese Art unter nicht-sterilen Bedingungen als sehr schwer kultivierbar gilt. Im Hinblick auf das weitere Vorhaben und eine spätere Kultivierung der Wasserlinsen sind Arten gefordert, die robust gegen schwankende Umweltparameter sind. Deswegen erschien es sinnvoll, sich auf die Arten *L. minor* und *W. hyalina* zu konzentrieren.

### **3.1.2 Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf die Pflanzenperformance von *W. hyalina* und *L. minor***

#### **3.1.2.1 Versuch zur Nährlösungszusammensetzung und -konzentration**

Ziel dieses Versuches war es, den Einfluss fünf verschiedener Nitrat-N zu Ammonium-N-Verhältnisse in modifizierten N-Medien auf die Wachstumsrate (RGR), den Rohproteingehalt (CPC) und den relativen Proteinertrag (RPY) von *L. minor* und *W. hyalina* zu untersuchen. Um die hemmende Wirkung der Algen auf die Wachstumsrate und Biomasseproduktion der Wasserlinsen zu minimieren, wurden verschiedene Verdünnungsstufen untersucht. Außerdem wurde die Abnahme der  $\text{NO}_3^-$ -N und  $\text{NH}_4^+$ -N -Konzentrationen in den Nährlösungen gemessen, die auf die N-Aufnahme durch die Wasserlinsen zurückzuführen ist.

##### **3.1.2.1.1 Material und Methoden**

Die Versuche wurden in einer Klimakammer (Länge x Breite x Höhe: 4 x 3 x 3 m) mit den Wasserlinsenarten *L. minor* und *W. hyalina* auf dem Campus der Hochschule Osnabrück

durchgeführt. Die Versuche erfolgten in schwarzen PE-Gefäßen mit einem Durchmesser von 24 cm, die jeweils 4 L des N-Mediums enthielten. Alle verwendeten modifizierten Medien basierten auf dem N-Medium. Die folgenden Abkürzungen für die fünf verschiedenen Verhältnisse von  $\text{NO}_3^-$ -N zu  $\text{NH}_4^+$ -N werden nachfolgend verwendet: [100-0] = 100 %  $\text{NO}_3^-$ -N - 0 %  $\text{NH}_4^+$ -N; [75-25] = 75 %  $\text{NO}_3^-$ -N - 25 %  $\text{NH}_4^+$ -N; [50-50] = 50 %  $\text{NO}_3^-$ -N - 50 %  $\text{NH}_4^+$ -N; [25-75] = 25 %  $\text{NO}_3^-$ -N - 75 %  $\text{NH}_4^+$ -N; [0-100] = 0 %  $\text{NO}_3^-$ -N - 100 %  $\text{NH}_4^+$ -N. In Vorversuchen wurde beobachtet, dass das Wachstum der Wasserlinsen durch die Kontamination der Kulturen mit ubiquitären Algen gestört wurde. Um die Pflanzenperformance von Wasserlinsen unter nicht-sterilen Bedingungen (Problematik des Wachstums von Algen und Mikroorganismen) zu bestimmen, wurden zwei Nährstofffaktoren untersucht. Für alle fünf Verhältnisse von  $\text{NO}_3^-$ -N zu  $\text{NH}_4^+$ -N wurden zwei verschiedene Verdünnungen (10 % und 50 % der ursprünglichen Konzentration) verwendet, die durch "/10" und "/50" hinter den Verhältnissen gekennzeichnet sind. Verdünnungen von 1 % und 5 % (/1; /5) wurden in den ersten Experimenten mit [100-0] verwendet, in späteren Experimenten jedoch aufgrund signifikant schlechterer Ergebnisse nicht weiter untersucht. Um das Wachstum von Algen und Bakterien zu minimieren, wurde die Temperatur bei  $20,4 \pm 1,3$  °C gehalten. Als Lichtquelle wurden S4W LED-Elemente (SANlight GmbH, Bludenz, Österreich) mit einer photosynthetisch-aktiven Strahlung von  $350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  verwendet. Die Photoperiode wurde auf 8 h Licht und 16 h Dunkelheit eingestellt. Die sechs Stammlösungen für alle fünf unterschiedlich modifizierten N-Medien wurden hauptsächlich mit handelsüblichen landwirtschaftlichen Düngemitteln und deionisiertem Wasser hergestellt. Für die Herstellung der Stammlösungen wurden die folgenden Produkte verwendet: Krista MKP, Calcinit, Krista K Plus (alle von Yara GmbH & Co. KG, Dülmen, Deutschland), OCI Granular 2 (OCI NV, Amsterdam, Niederlande), Kaliumchlorid, Natriummolybdat Dihydrat technische Qualität (beide AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), Ammoniumchlorid p.a., Calciumchlorid-Dihydrat (beide Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Borax, Mangan (beide Horticoop, Bleiswijk, Niederlande), Epso Combitop (K+S AG, Kassel, Deutschland) und Ferty 72 (Planta Düngemittel GmbH, Regenstauf, Deutschland). Die genaue Formulierung für jede Stammlösung ist Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2: Zusammensetzung der sieben Stammlösungen (g·L<sup>-1</sup>) für fünf verschiedene Verhältnisse von Nitrat-N zu Ammonium-N ([100-0], [75-25], [50-50], [25-75], [0-100]), basierend auf dem N-Medium**

Stammlösung	Produktname	Hauptkomponente	[100-0] (g·L <sup>-1</sup> )	[75-25] (g·L <sup>-1</sup> )	[50-50] (g·L <sup>-1</sup> )	[25-75] (g·L <sup>-1</sup> )	[0-100] (g·L <sup>-1</sup> )
1	Calcinit	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N, Ca <sup>+</sup>	47.2	35.4	23.6	11.8	0
1	Krista K Plus	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N, K <sup>+</sup>	161.8	121.3	80.9	40.4	0
2	NH <sub>4</sub> Cl	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N, Cl <sup>-</sup>	0	0	26.7	53.5	80.2
3	OCI Granular 2	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0	33	33	33	33
4	KCl	K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>	0	29.8	59.6	89.5	119.3
4	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Ca <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup>	0	7.4	14.7	22.1	29.4
5	Krista MKP	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , K <sup>+</sup>	27.2	27.2	27.2	27.2	27.2
6	Epsom Combitop	Mg <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	49.3	49.3	49.3	49.3	49.3
6	Borax	BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
6	Mangan	Mn <sup>2+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
6	MoNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Na <sup>+</sup>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
7	Ferty 72	Fe <sup>3+</sup>	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2

Die Stammlösungen wurden mit lokalem Leitungswasser verdünnt, um die anfänglichen N-Medium-Konzentrationen von 100 % zu erhalten, die in Tabelle 3 aufgeführt sind.

**Tabelle 3: Nährstoffzusammensetzung (mM) des modifizierten N-Mediums mit fünf verschiedenen Verhältnissen von NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N (hellgrau) zu NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (dunkelgrau) bei einer Anfangskonzentration von 100 %. Diese Konzentrationen wurden auf die Endkonzentrationen von 10 % und 50 %, in einigen Fällen auf 1 % und 5 % verdünnt**

NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N-Verhältnis	[100-0]	[75-25]	[50-50]	[25-75]	[0-100]
Substanz	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	10.1	7.6	5.1	2.6	0.1
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0	2.5	5	7.5	10
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1	1	1	1	1
K <sup>+</sup>	9.1	9.1	9.1	9.1	9.1
Mg <sup>2+</sup>	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2.0	3.2	3.2	3.2	3.2
Ca <sup>+</sup>	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
Cl <sup>-</sup>	0.9	3.4	8.4	13.4	18.4
Fe <sup>3+</sup>	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Mn <sup>2+</sup>	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
Zn <sup>2+</sup>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
Na <sup>+</sup>	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

Die Vorkultivierung erfolgte über einen dreitägigen Zeitraum in den unterschiedlich verdünnten und modifizierten Nährmedien, um den Lag-Phase-Effekt auf die RGR-Daten zu vermeiden. Die Experimente dauerten sieben Tage und wurden unter nicht-sterilen Wachstumsbedingungen durchgeführt. Die Gefäße wurden in einem randomisierten Blockdesign in der Klimakammer angeordnet.

### **Nährstoffkonzentration**

Um zu überprüfen, ob sich bestimmte Nährstoffe über den Versuchszeitraum in der Nährlösung anreichern oder deren Konzentration stark absinkt, wurde die Nährlösung beprobt. Die Bestimmung der Nährstoffe mittels der ICP-OES ICAP 7400 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) erfolgte angelehnt an die DIN EN ISO 11885:2009-09. Hierfür wurden die Proben nach der Entnahme filtriert und ein Teil im Anschluss mit Salpetersäure angesäuert und bis zur Analyse gekühlt. Bei der Analyse mit der ICP-OES wurden die Konzentrationen folgender Nährstoffe im Nährmedium bestimmt: Bor, Calcium, Kupfer, Eisen, Kalium, Magnesium, Mangan, Natrium, Phosphor, Schwefel und Zink.

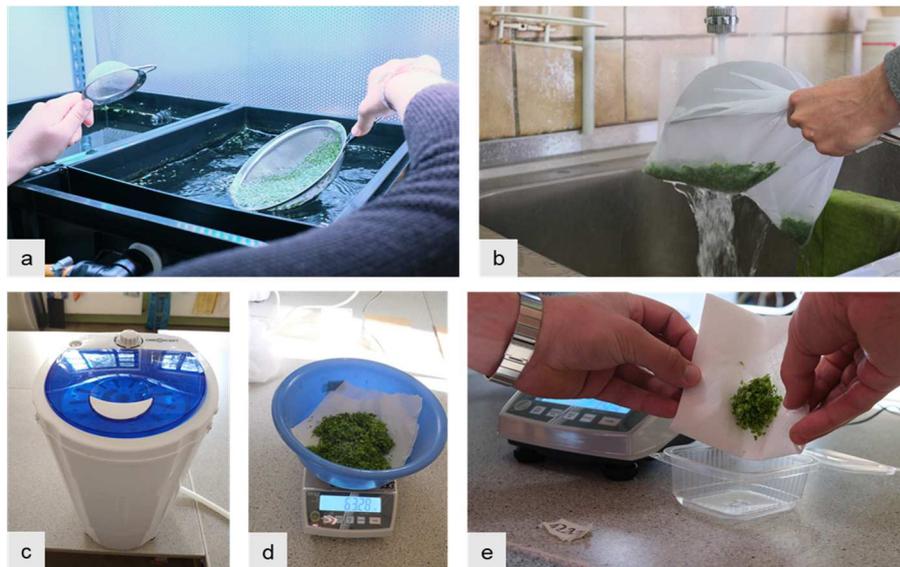
Für die Nitrat- und Ammoniumbestimmung wurde die restliche Nährlösungsprobe am jeweiligen Tag der Probennahme eingefroren (-18 °C) und erst zur Analyse wieder aufgetaut. Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration erfolgte angelehnt an die „Nmin-Methode (Labor)“ (VDLUFA 2012b), die der Nitratkonzentration wurde angelehnt an die Methode „Bestimmung von Nitrat-Stickstoff durch UV-Absorption“ durchgeführt (VDLUFA 2012a). Bei beiden Analysen wurden die Proben entsprechend aufbereitet und auf den für das Analysegerät nachweisbaren Konzentrationsbereich verdünnt. Die Analyse erfolgte mittels des UV/VIS Spectromter Lambda 25 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Die Ergebnisse wurden im Anschluss mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Endkonzentrationen zu berechnen.

### **Frisch- und Trockenmasse**

Für die anfängliche Biomasse wurden die Wasserlinsen aus der Erhaltungskultur nach dem in Abbildung 3 dargestellten Schema abgeerntet, gewaschen und geschleudert. Im Anschluss wurde die gesamte Biomasse durchmischt, um eine Homogenisierung des Materials sicherzustellen. Um einen ähnlichen Oberflächenbedeckungsgrad zu Beginn zu erreichen, wurde eine Startmenge von jeweils 1,5 g für *W. hyalina* und 2 g für *L. minor* in die Becken gegeben. Die unterschiedlichen Startmassen der Wasserlinsen sind auf unterschiedliche Oberflächengrößen der zwei Arten zurückzuführen und resultieren aus Vorversuchen.

Für die Frischmassebestimmung wurde jedes der Kultivierungsbecken nach dem in Abbildung 3 dargestellten Schema abgeerntet. Hierzu wurden die Wasserlinsen mit einem Sieb abgeschöpft und im Anschluss mit Wasser abgespült, um die anhaftende Nährlösung und mögliche Algen zu entfernen. Danach wurden sie in ein Netz überführt, in welchem sie für drei Minuten

in einer Wäscheschleuder („Top Spin Compact“ der Firma oneConcept) geschleudert wurden, um eine standardisierte Entfernung von anhaftendem Wasser sicherzustellen. Daraufhin wurde das Gewicht der gesamten Frischmasse eines jeweiligen Beckens erfasst und Proben für die Rohproteingehaltsbestimmung entnommen. Diese Proben wurden ebenfalls für die Bestimmung der Trockenmasse verwendet. Dafür wurden die Proben für die Rohproteingehaltsbestimmung bei 60 °C (DIN EN ISO 20079:2006-12) für 72 Stunden getrocknet und nach Abkühlung auf Zimmertemperatur mittels einer Feinwaage gewogen.



**Abbildung 3: Ablaufdiagramm der Beerntung eines Beckens zur Erfassung der Frischmasse, a: Abernten der Wasserlinsen, b: Spülen und Überführen der Wasserlinsen in ein Netz, c: Schleudern der Wasserlinsen, d: Wägung der Gesamtfrischmasse, e: Wägung der Probemengen und Überführung in die Probengefäße**

Über den Trockenmassegehalt, der sich aus der eingewogenen Frisch- und Trockenmasse errechnen lässt, konnte die Startmasse und der Zuwachs bezogen auf die Trockenmasse berechnet werden. Zudem wurden die RGR ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{Tag}^{-1}$ ) (1) und die Verdopplungszeit (doubling time, DT) (2) sowohl aus der Frischmasse als auch aus der Trockenmasse angelehnt an ZIEGLER et al. (2015) nach den folgenden Formeln berechnet:

$$\text{RGR} = (\ln x(t_7) - \ln x(t_0)) / (t_7 - t_0) \quad (1)$$

$$\text{DT} = \ln 2 / \text{RGR} \quad (2)$$

Für die Berechnung der RGR (1) wird die Biomasse zum Ende eines jeweiligen Versuches ( $t_7$ ) und die Startbiomasse ( $t_0$ ) benötigt. Der hintere Teil der Formel ( $t_7 - t_0$ ) bezieht sich auf die Versuchsdauer und ist für diesen Versuch gleich 7 zu setzen. Die DT gibt an, in wie vielen Tagen sich eine Ausgangsbiomasse verdoppelt hat.

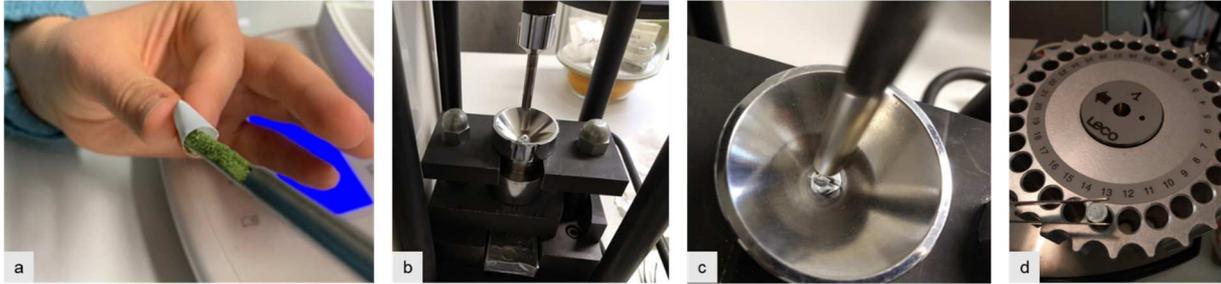
## Rohproteingehalt

Für die Bestimmung des Rohproteingehaltes wurden Proben gezogen, für 72 Stunden bei 60 °C getrocknet und nach der Wägung in luftdicht verschlossene Gefäße überführt. Nach Beendigung aller Versuche erfolgte die Bestimmung des Rohproteingehaltes mittels der Dumas-Verbrennungsmethode (VDLUFA 2004). Hierfür ist es erforderlich, die Proben zuvor zu homogenisieren und zu vermahlen (Siebdurchgang 1 mm). Aufgrund der geringen Probenmengen wurde davon abgesehen, die Proben zu vermahlen, um die hierbei entstehenden Probenmaterialverluste zu verhindern. Stattdessen wurden die Proben in dem jeweiligen Gefäß mittels eines Glasstabes „zerstoßen“. Um eine ausreichende Homogenisierung der Proben sicherzustellen, wurde vor der eigentlichen Messung der Versuchsproben eine Voruntersuchung zum Einfluss des Vermahlungsgrades der Wasserlinsenproben auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durchgeführt (Tabelle 4). Hierfür wurde in jeweils vierfacher Wiederholung das mit einer Kugelmühle vermahlene Probenmaterial und das mit der Hand „zerstoßene“ Material auf deren Stickstoffgehalt überprüft und miteinander verglichen. Den Ergebnissen aus Tabelle 4 kann entnommen werden, dass das „Zerstoßen“ des Probenmaterials zu einer ähnlich guten Reproduzierbarkeit der Daten führt wie das Vermahlen mit der Kugelmühle. Auf dieser Grundlage wurde die Methode des „Zerstoßens“ für die geringen Probenmengen angewendet.

**Tabelle 4: Einfluss des Vermahlungsgrades (Kugelmühle, mit Hand „zerstoßen“) auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Gesamt-Stickstoffanalyse (% N)**

		Wiederholung				Mittelwert	Stabw.	VK %
		1	2	3	4			
Kugelmühle	%N	4,879	4,889	4,847	4,839	4,864	0,0210	0,4317
"zerstoßen"		4,838	4,875	4,906	4,865	4,871	0,0243	0,4993

Für die Einwaage der Probenmenge von etwa 0,17 g – 0,18 g wird eine Einwaagehilfe benötigt. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, wurde hierfür der obere Teil einer Zigarettenhülse verwendet, an der einen Seite verdreht und das Probenmaterial eingefüllt. Nach der Einwaage wurde die andere Seite der Hülse ebenfalls zuge dreht und die Einwaagehilfe inklusive der eingefüllten Probe zu einer Tablette gepresst (siehe Abbildung 4b-c), welche später in den Probenteller des Analysegerätes gegeben wurde (siehe Abbildung 4d). Für die Analyse des Stickstoffgehaltes wurde das Gerät „Leco FP628“ verwendet. Der ermittelte prozentuale Stickstoffgehalt der Probe konnte durch Multiplikation mit einem Umrechnungsfaktor von 6,25 für Futtermittel in den prozentualen Rohproteingehalt umgerechnet werden. Dieser Umrechnungsfaktor eignet sich auch für Wasserlinsen (APPENROTH et al. 2017, CASAL et al. 2000).



**Abbildung 4: Ablaufdiagramm der Stickstoffbestimmung nach der Dumas-Verbrennungsmethode, a: Einfüllen der homogenisierten Wasserlinsenprobe in eine Einwaagehilfe, b-c: Herstellung einer Proben-tablette mittels hydraulischer Presse, d: Überführen der Proben-tablette auf den Probenteller des Leco FP628**

Im Anschluss an die Rohproteingehaltsbestimmung wurde der relative Wochenertrag (RY; g Biomasse, die nach einer einwöchigen Kultivierung ausgehend von 1 g erhalten wurde) anhand der Gleichungen (2) und (3) aus der RGR berechnet:

$$\ln DW_{t7} = \ln DW_{t0} + RGR \cdot (t7 - t0) \quad (2)$$

$$RY = \exp(\ln DW_{t7}) \quad (3)$$

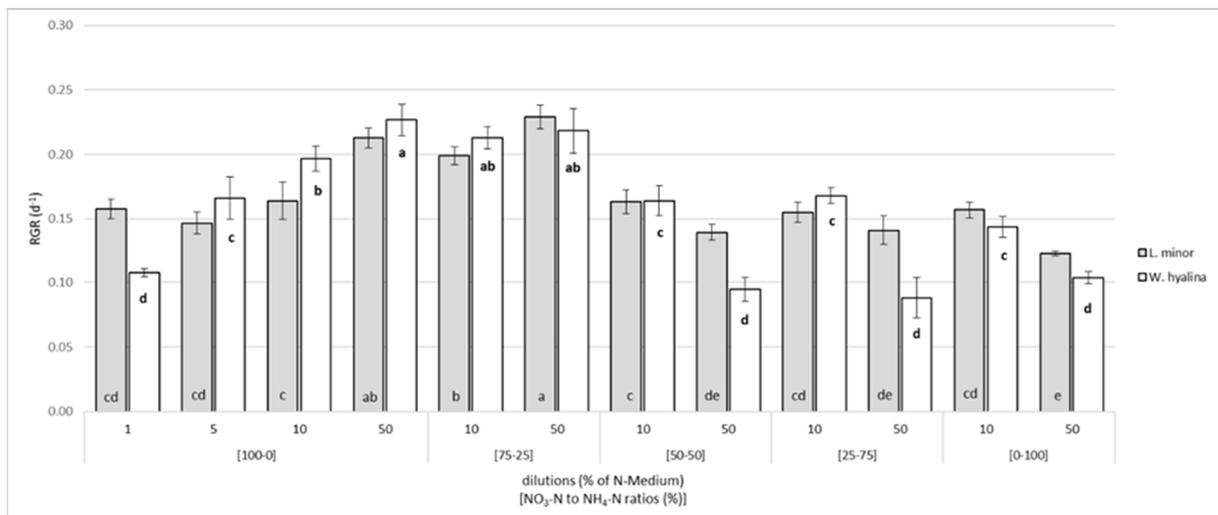
Der RY wurde weiterverwendet, um den relativen Proteinertrag (RPY; g Protein·Woche<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup>) zu berechnen, indem er mit dem Rohproteingehalt (CPC) multipliziert und gemäß Gleichung (4) auf einen Quadratmeter extrapoliert wurde:

$$RPY = RY \cdot CPC / (0,0452 \text{ m}^2 \cdot 100) \quad (4)$$

wobei 0,0452 m<sup>2</sup> die Anbaufläche der im Versuch verwendeten Gefäße ist.

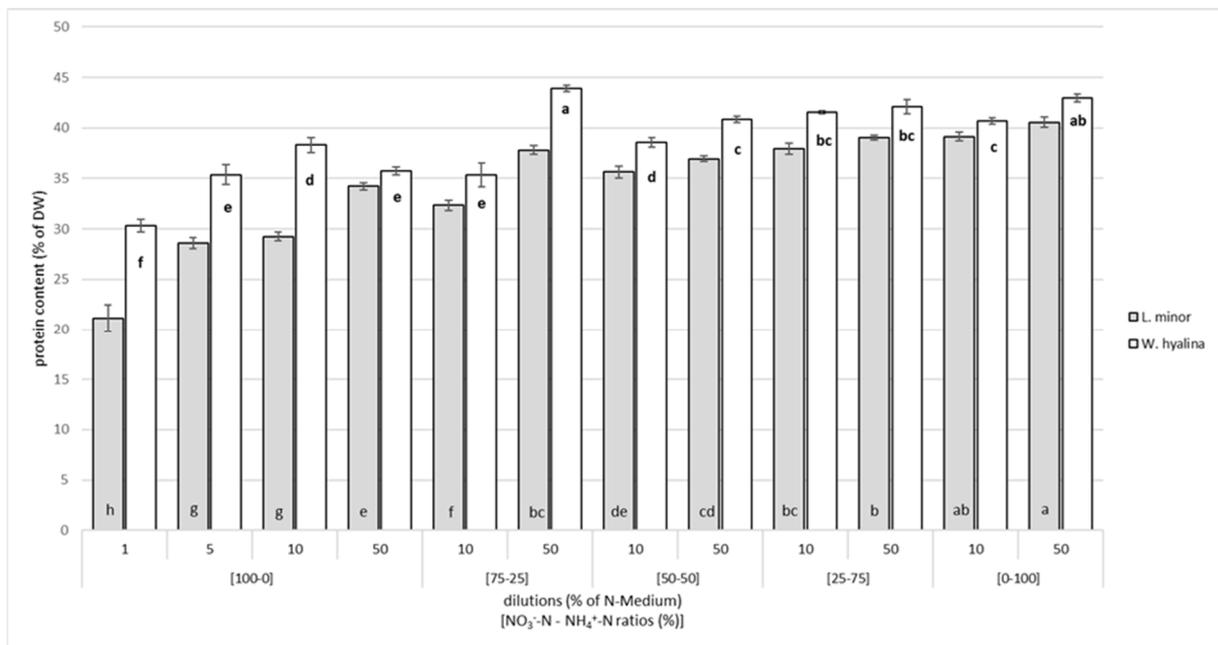
### 3.1.2.1.2 Ergebnisse

Die RGR wurde in Abhängigkeit von den verschiedenen verwendeten Nährmedien bestimmt (Abbildung 5). Der höchste Wert für *L. minor* liegt bei 0,23±0,009 d<sup>-1</sup> bei der Variante [75-25]/50. Die gleiche RGR wurde für *W. hyalina* bei [100-0]/50 ermittelt. Die beiden nitratreichsten Verhältnisse ([100-0] und [75-25]) zeigen bei höheren Nährstoffkonzentrationen (Verdünnungen von 50 %) im Vergleich zu den 10 %igen Verdünnungen eine steigende RGR, die bei *L. minor* in beiden Verhältnissen und bei *W. hyalina* nur in [100-0] signifikant höher ist. In diesen beiden Verhältnissen und Verdünnungen hat *W. hyalina* eine etwas höhere RGR als *L. minor*, außer bei [75-25]/50. Das Gegenteil ist der Fall, wenn die Ammoniumkonzentration steigt. Ein signifikanter Rückgang der RGR wurde für die Verhältnisse [50-50], [25-75] und [0-100] bei *L. minor* im Vergleich zu den 50 %igen Verdünnungen und bei *W. hyalina* im Vergleich zu den 10- und 50 %igen Verdünnungen beobachtet, wobei dieser bei den 50 %igen Verdünnungen stärker ausfiel. Dieser Rückgang führt bei *W. hyalina* zu einer geringen RGR von 0,09±0,015 d<sup>-1</sup> bei [25-75]/50, während der Rückgang bei *L. minor* (0,12±0,002 d<sup>-1</sup> bei [0-100]/50) geringer ausfällt. *L. minor* erreicht höhere RGRs als *W. hyalina* bei einem insgesamt niedrigeren Nährstoffniveau im Vergleich zu den beiden nitratreichsten Verhältnissen, außer bei [100-0]/1.



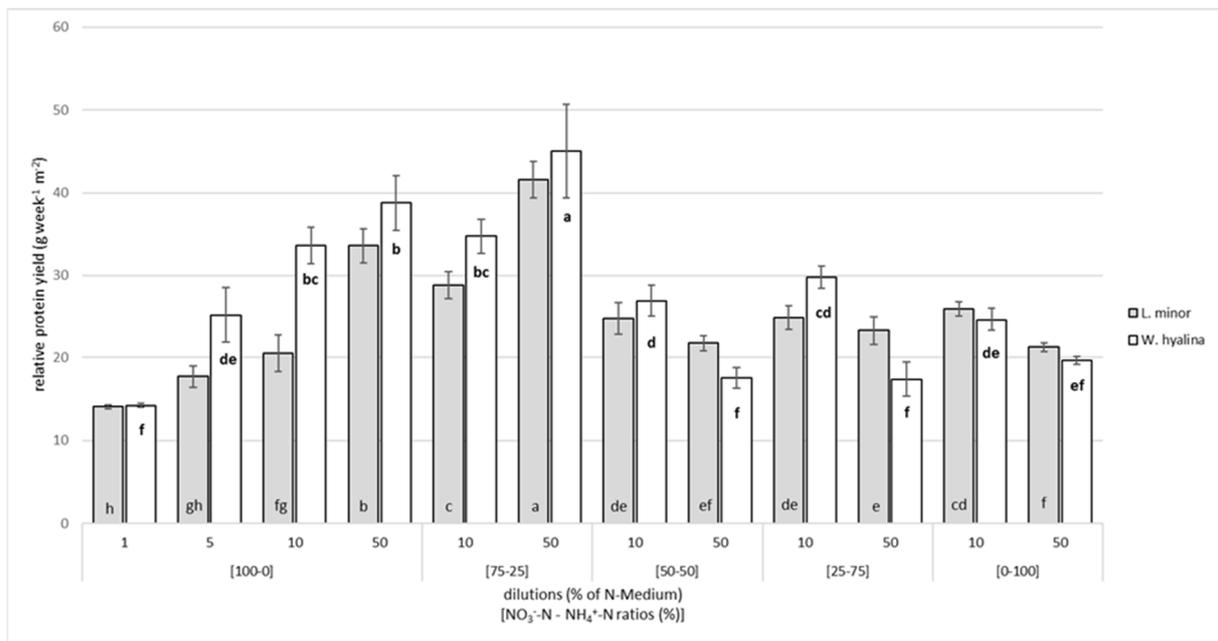
**Abbildung 5: Relative Wachstumsrate (RGR; d<sup>-1</sup>), bezogen auf das Trockengewicht, für *Lemna minor* (graue Säulen) und *Wolffia hyalina* (weiße Säulen). Die Pflanzen wurden sieben Tage lang in Nährlösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von Nitrat-N zu Ammonium-N (von [100-0] bis [0-100]) in verschiedenen Verdünnungen (1, 5, 10 und 50 % des unverdünnten N-Mediums) kultiviert. Anzahl der Parallelproben n=4, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanzen innerhalb einer Art, basierend auf einem Einweg-ANOVA-Test, Tuckey p≤0,05, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an**

Der CPC stieg bei beiden Wasserlinsenarten mit zunehmender Ammoniumkonzentration und einem höheren Verhältnis von Ammonium-N zu Nitrat-N an, jedoch nicht signifikant (Abbildung 6). Eine höhere Verdünnung des Nährmediums (d. h. niedrigere Nährstoffkonzentrationen) führte zu niedrigeren CPCs in jedem Verhältnis. Im Allgemeinen wies *W. hyalina* in jedem Verhältnis und jeder Verdünnung einen höheren CPC auf als *L. minor*. Der höchste CPC in *L. minor* wurde bei [0-100]/50 mit 40,6±0,48 % erreicht, gefolgt von 39,1±0,43 % bei [0-100]/10. Der für *W. hyalina* gemessene Höchstwert beträgt 43,9±0,34 % bei [75-25]/50, was nicht wesentlich höher ist als der zweithöchste CPC-Wert (43,0±0,4 %) bei [0-100]/50. Die geringsten CPC-Werte von 21,1±1,3 % für *L. minor* und 30,3±0,6 % für *W. hyalina* wurden in dem Verhältnis mit der niedrigsten, für die Pflanzen verfügbaren Nährstoffkonzentration ([100-0]/1) erzielt, was deutlich unter den zweitniedrigsten Werten für jede Art liegt.



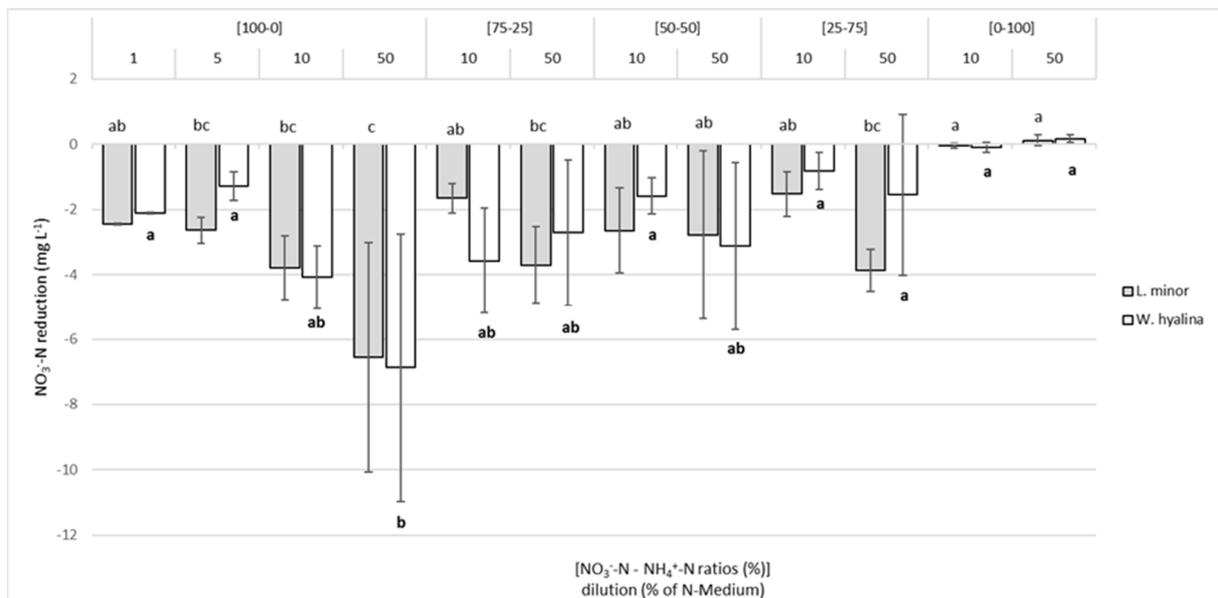
**Abbildung 6: Rohproteingehalt (% TM) für *L. minor* (graue Säulen) und *W. hyalina* (weiße Säulen), die über sieben Tage in Nährlösungen mit unterschiedlichen NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N zu NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N Verhältnissen in verschiedenen Verdünnungen, basierend auf dem N-Medium, kultiviert wurden (weitere Erklärungen siehe Tabelle 5)**

Der höchste RPY ( $\text{g Protein} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) wurde bei beiden Arten bei [75-25]/50 erzielt mit einem signifikanten Unterschied zum zweithöchsten Wert (Abbildung 7).  $41,6 \pm 2,2 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  wurden von *L. minor* und  $45,0 \pm 5,7 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  von *W. hyalina* geerntet. Eine höhere Nährstoffkonzentration in den Verhältnissen [100-0] und [75-25] führte zu einem höheren Proteintrag. *W. hyalina* lieferte unter diesen Bedingungen mehr Protein als *L. minor*. Die Proteinausbeute nahm bei einer Ammoniumkonzentration von 50 % und mehr im Vergleich zu [100-0]/50 und [75-25]/50 für *L. minor* und [75-25]/50 für *W. hyalina* deutlich ab. Insbesondere bei 50 %iger Verdünnung schnitt *W. hyalina* schlechter ab als *L. minor*, während der RPY für beide Arten bei 10 %iger Verdünnung auf einem insgesamt niedrigen Niveau von weniger als  $30 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  etwas höher war. Die minimalen RPYs von  $14,1 \pm 0,24 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  für *L. minor* und  $14,2 \pm 0,28 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  für *W. hyalina* wurden in der Variante [100-0]/1 erzielt.



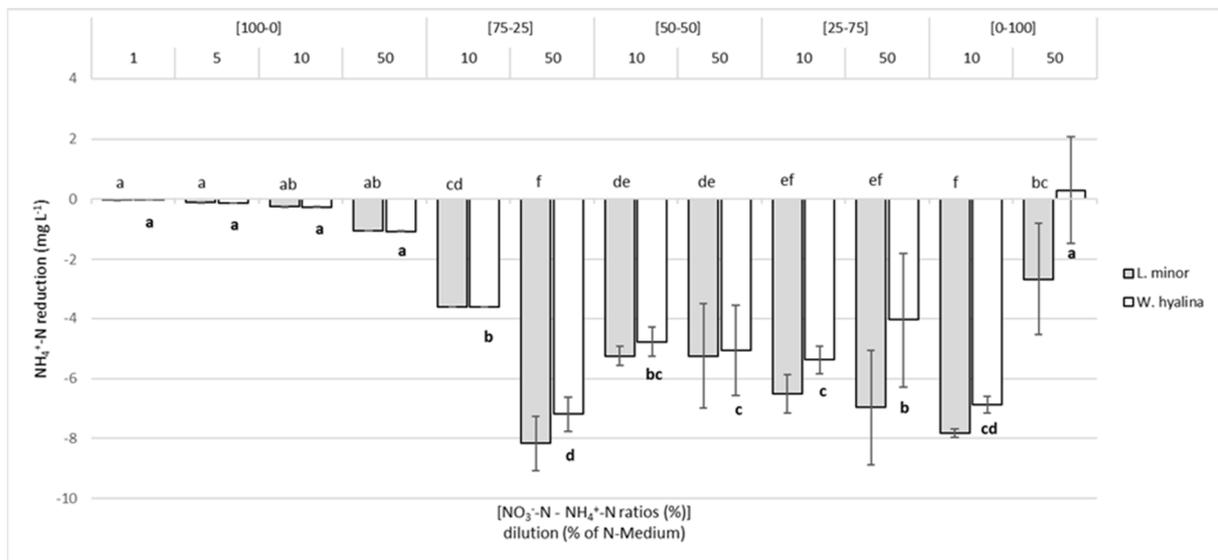
**Abbildung 7:** Der relative Proteinertrag,  $\text{g}\cdot\text{Woche}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  (bezogen auf DW) für *L. minor* (graue Säulen) und *W. hyalina* (weiße Säulen), die über sieben Tage in Nährlösungen mit unterschiedlichen  $\text{NO}_3^-$ -N zu  $\text{NH}_4^+$ -N Verhältnissen in verschiedenen Verdünnungen, bezogen auf das N-Medium, kultiviert wurden (weitere Erklärungen siehe Tabelle 5)

Abbildung 8 zeigt die Gesamtreduktion von  $\text{NO}_3^-$ -N ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) für jedes Verhältnis und jede Verdünnungsstufe an Tag 7. Im reinen Nitratmedium ([100-0]) führte eine höhere  $\text{NO}_3^-$ -N-Konzentration zu einer signifikant höheren absoluten Reduktion bei *L. minor*, aber nicht bei *W. hyalina*. Die höchste Ausgangskonzentration von Nitrat-N ([100-0]/50) führte zu der höchsten absoluten Abnahme von Nitrat-N, d. h.  $6,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  und  $6,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  für *L. minor* bzw. *W. hyalina*. Dies entspricht einer relativen Verringerung von 9,1 % (*L. minor*) und 9,7 % (*W. hyalina*). Im Allgemeinen führten höhere Nitrat-N-Konzentrationen zu einer stärkeren Reduktion, während eine steigende  $\text{NH}_4^+$ -N-Konzentration zu einer sinkenden Nitrat-N-Reduktion führte. Diese Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant. Die maximale relative Reduktion von  $\text{NO}_3^-$ -N wurde für *L. minor* bei [25-75]/10 mit 29,2 % und für *W. hyalina* bei [75-25]/10 mit 29,6 % festgestellt.



**Abbildung 8: Konzentrationsabnahme von Nitrat-N ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in den Nährmedien für *L. minor* (graue Säulen) und *W. hyalina* (weiße Säulen), die über sieben Tage in Nährlösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von  $\text{NO}_3^-$ -N zu  $\text{NH}_4^+$ -N in verschiedenen Verdünnungen kultiviert wurden (für weitere Erklärungen siehe Tabelle 5)**

Abbildung 9 zeigt die Gesamtreduktion von  $\text{NH}_4^+$ -N ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) für jedes Verhältnis und jede Verdünnung an Tag 7. In den [100-0]-Nährmedien war  $\text{NH}_4^+$ -N nur in geringen Konzentrationen vorhanden, die von beiden Wasserlinsenarten fast vollständig abgebaut wurden. Dies gilt auch für [75-25]/10. Die höchsten Gesamtreduktionswerte betragen  $8,1\pm 0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  für *L. minor* und  $7,2\pm 0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  für *W. hyalina* in den [75-25]/50-Behandlungen. Dies entspricht einer relativen Reduktion von 46,8 % (*L. minor*) und 41,6 % (*W. hyalina*). Sowohl die gesamte als auch die relative Reduktion ist bei *L. minor* etwas höher als bei *W. hyalina*. Ein signifikanter Rückgang ist in den reinen Ammoniumlösungen mit der höchsten  $\text{NH}_4^+$ -N-Gesamtkonzentration ([0-100]/50) im Vergleich zur gleichen Verdünnung in den Verhältnissen [75-25], [50-50] und [25-75] zu erkennen. Die relative Reduktion bei *L. minor* beträgt 4,1 % des ursprünglich verfügbaren  $\text{NH}_4^+$ -N, während bei *W. hyalina* keine Reduktion auftritt. Eine Verringerung der gesamten  $\text{NH}_4^+$ -N-Konzentration bei gleichbleibendem Verhältnis der beiden N-Quellen, d. h. [0-100]/10, führte jedoch zu wesentlich höheren Aufnahmeraten für *L. minor* ( $7,8\pm 0,14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 54 % relative Reduktion) und *W. hyalina* ( $6,9\pm 0,27 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 48 % relative Reduktion).



**Abbildung 9: Konzentrationsabnahme von Ammonium-N ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in den Nährmedien für *L. minor* (graue Säulen) und *W. hyalina* (weiße Säulen), die über sieben Tage in Nährlösungen mit unterschiedlichen Verhältnissen von  $\text{NO}_3^-$ -N zu  $\text{NH}_4^+$ -N in verschiedenen Verdünnungen kultiviert wurden (für weitere Erklärungen siehe Tabelle 5)**

### 3.1.2.1.3 Diskussion

Die maximale RGR, die in diesem Versuch erreicht wurde, beträgt für beide Arten  $0,23\text{ d}^{-1}$ , was im Vergleich zu anderen Studien niedriger ist. Für *L. minor* wurde eine RGR von  $0,42\text{ d}^{-1}$  berichtet, während *W. hyalina* mit einem Wert von  $0,519\text{ d}^{-1}$  die höchste RGR aller untersuchten Arten aufwies (ZIEGLER et al. 2015). Der Unterschied in der RGR ist höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen zurückzuführen. Anstelle einer sterilen In-vitro-Anlage wurden beide Wasserlinsenarten in dieser Studie unter nicht sterilen Bedingungen kultiviert. Die Temperatur war  $5\text{ }^\circ\text{C}$  niedriger und die Fotoperiode 16 Stunden kürzer, während die Lichtintensität  $250\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  höher war als bei den Versuchsaufbauten von ZIEGLER et al. (2015). Diese Faktoren sind mögliche Erklärungen für die niedrigeren RGRs.

IATROU et al. (2019) erreichten eine maximale Wachstumsrate von  $0,14\text{ d}^{-1}$  für *L. minor* bei einer Ammonium-N-Konzentration von  $31,9\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  unter Verwendung von sekundär aufbereitetem Abwasser. Dies stimmt mit dem Ergebnis für die gleiche Art in dem durchgeführten Versuch im Verhältnis [50-50]/50 überein (RGR von  $0,14\pm 0,009\text{ d}^{-1}$  bei einer  $\text{NH}_4^+$ -N-Konzentration von  $32,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). CAICEDO et al. (2000) beobachteten, dass die höchste RGR ( $0,3\text{ d}^{-1}$ ) bei *Spirodela polyrhiza* bei den niedrigsten Gesamtammoniumkonzentrationen ( $3,5 - 20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  N; entspricht ca.  $0,25 - 1,4\text{ mM}$ ) erzielt wurde, und nahmen eine optimale  $\text{NH}_4^+$ -N-Konzentration unter  $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  an. ZHANG et al. (2014) ermittelten eine maximale RGR für *L. minor* bei  $3,5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Ammonium-N. Diese Daten stimmen teilweise mit unseren Ergebnissen bezüglich der Gesamtkonzentration von  $\text{NH}_4^+$ -N überein. Hohe RGRs wurden für die Behandlungen [75-25]/10 mit einer anfänglichen  $\text{NH}_4^+$ -N-Konzentration von  $3,6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  und [75-25]/50 mit  $17,3$

mg·L<sup>-1</sup> erzielt. Die 10 %igen Verdünnungen [50-50]/10, [25-75]/10 und [0-100]/10 hatten ähnliche Gesamt-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N-Ausgangswerte von 7,1, 10,7 bzw. 14,4 mg·L<sup>-1</sup>. Die RGR war jedoch bei diesen drei Behandlungen für beide Arten deutlich niedriger. Es kann davon ausgegangen werden, dass andere Faktoren, wie das Verhältnis von Nitrat zu Ammonium einen gewissen Einfluss auf die RGR von *L. minor* und *W. hyalina* haben. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von MEHRER, MOHR (1989) sowie HECHT, MOHR (1990) an *Sinapis alba*-Sämlingen. Sie erklären die nachteiligen Auswirkungen höherer Ammoniumkonzentrationen mit der Tatsache, dass die Ammoniumakkumulation von den Pflanzen unzureichend reguliert wird. Die Stimulierung der Ammoniumassimilation durch gleichzeitig verabreichtes Nitrat scheint die Nitrat-vermittelte Ammoniumtoleranz zu erklären. Ein ähnlicher Mechanismus existiert bei Wasserlinsen, wie kürzlich bei *Landoltia punctata* gezeigt wurde (TIAN et al. 2021). Ein geringer Anteil an Ammonium als Stickstoffquelle scheint das Wachstum von Wasserlinsen zu stimulieren, während höhere Anteile von 50 % und mehr eine wachstumshemmende Wirkung haben.

Etwa sechs NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Transporter und vier NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Transporter sind bei *Arabidopsis thaliana* an der Aufnahme von Stickstoff beteiligt. Nitrat wirkt als Signalmolekül, das Veränderungen in der Expression von Genen, im Stoffwechsel und im Wachstum auslöst. Pflanzen haben verschiedene NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Aufnahmesysteme entwickelt, um in einer sich verändernden Umwelt zu überleben. Während Transporter mit niedriger Affinität für die Aufnahme großer Nitratmengen bei hohen Konzentrationen verantwortlich sind, sichern Transporter mit hoher Affinität das Leben der Pflanzen bei niedrigen Nitratkonzentrationen (ISLAM et al. 2020). Die Aufnahme von Ammonium aus der aquatischen Umwelt ist wichtig, da diese N-Quelle für Pflanzen unter bestimmten Bedingungen die dominierende Form sein kann. Trotz großer Fortschritte in den letzten zwei Jahrzehnten sind viele Aspekte der Regulierung der NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Aufnahme und des Stoffwechsels noch nicht abschließend geklärt (HAO et al. 2020). *Lemna minor*, die in einer NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-haltigen (1:1-Verhältnis zwischen NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N und NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) Nährlösung wuchs, nahm bevorzugt Ammonium statt Nitrat auf. Es wurde untersucht, dass sowohl Wurzeln als auch Fronds Nitrat und Ammonium aus dem Medium aufnehmen. Bei niedrigen N-Konzentrationen nahm das Verhältnis von Wurzel- zu Frondbiomasse zu. Auf morphologischer Ebene wäre der Vorteil ein geringerer Biomasseaufwand pro Flächeneinheit für die Wurzeln im Vergleich zu den Fronds (CEDERGREEN, VINDBÆK MADSEN 2002). FANG et al. (2007) berichten über eine bevorzugte Aufnahme von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> im Vergleich zu NO<sub>3</sub><sup>-</sup> bei *Landoltia punctata*. Turions der Wasserlinse *Spirodela polyrhiza* nahmen <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> viel schneller auf als <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (APPENROTH et al. 1993). Dies wird durch die vorliegenden Daten bestätigt, die zeigen, dass die durchschnittliche relative Aufnahmerate von NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N in fast allen Verhältnissen und Verdünnungen höher war als die von NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N.

Eine Abnahme der Ammoniumkonzentration in der Nährlösung kann je nach pH-Wert durch die Aufnahme von Pflanzen oder durch Verflüchtigung verursacht werden. Bei einem pH-Wert von 8 und 20 °C werden weniger als 5 % des Ammoniums in  $\text{NH}_3$  umgewandelt (EMERSON et al. 1975). Bei der Betrachtung des pH-Wertes des durchgeführten Versuches kann angenommen werden, dass der Großteil des  $\text{NH}_4^+$ -N von den Wasserlinsen aufgenommen wurde. Die Chloridkonzentrationen im Versuch stiegen mit zunehmender Ammoniumzufuhr an, da Ammoniumchlorid teilweise zur Erhöhung der  $\text{NH}_4^+$ -N-Konzentrationen verwendet wurde. LIU et al. (2017) empfehlen für *L. minor* eine NaCl-Konzentration unter 75 mM, um N und P aus dem Wasser zu entfernen. Konzentrationen von 50 mM und höher führten zu einer Abnahme des Frischgewichts und des Chlorophyllgehalts von *L. minor*. Die maximale Cl-Konzentration, die im vorliegenden Versuch verwendet wurde, betrug 9,2 mM in [0-100]/50. Daher können die signifikant reduzierten RGRs für beide Arten in den Verhältnissen [50-50], [25-75] und [0-100] im Vergleich zu [75-25] nicht durch die Anwesenheit von Chlorid verursacht werden.

Wasserlinsen (Art nicht identifiziert), die in Bewässerungsteichen in Jordanien angebaut wurden, ergaben einen durchschnittlichen CPC von 26 % (SHAMMOUT, ZAKARIA 2015). MOHEDANO et al. (2012) untersuchten den CPC von Wasserlinsenarten, die in zwei aufeinanderfolgenden Teichen auf anaerob vergorener Schweinegülle angebaut wurden. Der durchschnittliche CPC im ersten Teich betrug 35 % (bezogen auf die Trockensubstanz) und sank im zweiten Teich, in dem weniger Nährstoffe zur Verfügung standen, auf 28 %. Die geschätzte Produktivität der beiden Teiche betrug  $24 \text{ t} \cdot \text{Jahr}^{-1} \cdot \text{ha}^{-1}$  (ca.  $46 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ). Dieser Wert ist etwas höher als der Höchstwert ( $45 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) der vorliegenden Untersuchung. Die niedrigeren CPCs werden durch eine höhere RGR ( $0,24 \text{ d}^{-1}$ ) kompensiert. CHAKRABARTI et al. (2018) berichteten über einen Ertrag von  $703 \text{ kg} \cdot \text{Monat}^{-1} \cdot \text{ha}^{-1}$  für *L. minor* (ca.  $17,5 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) mit RGRs zwischen  $0,073 \text{ d}^{-1}$  und  $0,422 \text{ d}^{-1}$ . Die Wasserlinsen wurden auf verschiedenen Nährlösungen mit organischem Dünger oder anorganischen Düngemitteln kultiviert. Der endgültige CPC-Wert betrug 36,07 % bei Wasserlinsen, die mit organischem Dünger angebaut wurden, und 27,12 % bei anorganischem Dünger.

Das von APPENROTH et al. (2017) verwendete modifizierte Schenk-Hildebrandt-Medium hatte ein Verhältnis von Nitrat-N zu Ammonium-N von etwa [90-10]. Die Gesamt-Ammonium-N-Konzentration (1,3 mM) war etwa gleich hoch wie in [75-25]/50 (1,24 mM) des modifizierten N-Mediums. Die Nitratkonzentrationen waren in dem modifizierten Schenk-Hildebrandt-Medium höher. Der CPC lag in der vorliegenden Untersuchung bei *L. minor* über 25 % und bei *W. hyalina* in fast allen Verhältnissen und Verdünnungen über 35 %, was auch das Ergebnis von APPENROTH et al. (2017) für beide Arten bestätigt. Lediglich [100-0]/1 zeigte einen niedrigeren Wert von 21,1 % bzw. 30,3 % für *L. minor* und *W. hyalina*. Die Stickstoffverfügbarkeiten in diesen beiden Versuchen unterschieden sich nur geringfügig, was die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen.

Wenn Wasserlinsen in Zukunft in einem landwirtschaftlichen System zur Herstellung von Lebensmitteln und Futtermitteln kultiviert werden sollen, muss ein standardisiertes Kultivierungsverfahren angewandt werden, um eine gleichmäßige Produktqualität zu erzielen. Von großem Interesse für ein standardisiertes nicht-steriles Kultivierungsverfahren ist das Wachstum von Algen und Mikroorganismen und deren Einfluss auf das Wachstum der Wasserlinsen und die Zusammensetzung des Nährmediums. Insbesondere der Einsatz von pflanzenwachstumsfördernden Bakterien kann neue Möglichkeiten eröffnen (KHAIRINA et al. 2021). Neben der Qualität ist auch die Menge an Biomasse und Protein von großer Bedeutung. Die Variation der Ausgangsbiomasse, also der Oberflächenbedeckung, könnte einen wichtigen Einfluss auf die Produktivität eines Systems haben. Je höher die Ausgangsbiomasse, desto höher ist der Nährstoffbedarf im Laufe der Zeit. Daher führen stark verdünnte Nährmedien zu niedrigen Wachstumsraten. Eine anfängliche Oberflächenbedeckung von 20 % scheint optimal für eine hohe RGR zu sein (HUTABARAT, INDRADEWA 2020; VERMA, SUTHAR 2015). Eine geringe anfängliche Biomasse der Wasserlinsen bedeutet jedoch weniger Konkurrenz für andere Organismen hinsichtlich der Faktoren Nährstoffe und Licht. Daher wurde in diesen Versuchen eine anfängliche Oberflächenbedeckung von 60 % gewählt. Um Wachstumshemmungen durch hohe Dichten ("Überbesatz" (FÄRBER et al. 1986)) zu vermeiden, muss eine regelmäßige Ernte erfolgen. In Bezug auf den Proteinertrag sollte der RPY als guter Indikator für die Produktivität eines Wasserlinsensystems angesehen werden.

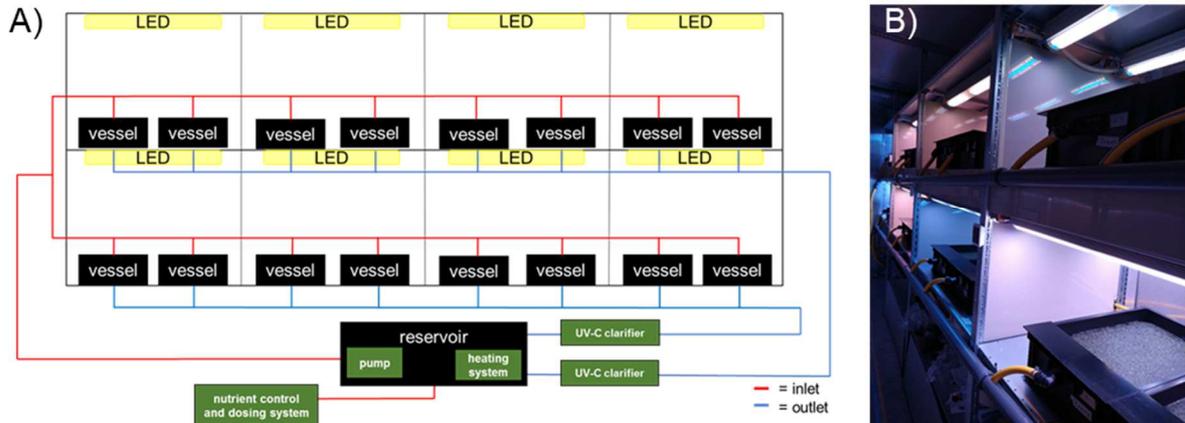
### **3.1.2.2 Versuch zur Lichtintensität und – qualität**

Ziel dieses Versuches war es, den Einfluss des Lichtspektrums und der Lichtintensität auf die Pflanzenperformance von Wasserlinsen (Lemnaceae) in einem hydroponischen, rezirkulierenden Kultursystem zu untersuchen. Dazu werden die Auswirkungen unterschiedlicher Rot-Blau-Verhältnisse und dreier Lichtintensitäten auf das Wachstum, den Chlorophyll-a-Gehalt und den Rohproteingehalt der Arten *Lemna minor* 9441 und *Wolffiella hyalina* 9525 untersucht.

#### **3.1.2.2.1 Material und Methoden**

Die Vorkultivierung und Vermehrung der Wasserlinsenbiomasse von *L. minor* und *W. hyalina* erfolgte in einer gesonderten Gewächshauszelle. Beide Arten wurden bei natürlichem Sonnenlicht zeitversetzt kultiviert. Die Kultivierung erfolgte, wie auch im späteren Versuch, in schwarzen Becken (0,565 x 0,37 m) mit jeweils 15 Litern der zehnprozentigen, in Tabelle 5 aufgeführten, Nährlösung. Der Versuch erfolgte in einem klimatisierten Container an der Hochschule Osnabrück in Haste über die Monate Juni und Juli 2020. In diesem wurde ein geschlossenes Kreislaufsystem installiert, welches 16 Kultivierungsbecken und ein Reservoir umfasste

(Abbildung 10). Durch zwei Heizstäbe in dem Reservoir wurde sichergestellt, dass eine angestrebte Wassertemperatur von etwa 24 °C erreicht wird.



**Abbildung 10: A) Schematischer Versuchsaufbau des Kreislaufsystems mit 16 Versuchsbecken und den jeweiligen Zu- und Abläufen, B) Darstellung der einzelnen Belichtungsvarianten während des Versuches**

Zu Beginn eines jeden Versuches wurde mithilfe der BlueLab Steuerung ein EC-Wert von  $0,6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  für das verwendete Leitungswasser eingestellt, dies entspricht dem in Tabelle 5 dargestellten 1:10 verdünnten N-Medium. Der EC-Wert wurde während des gesamten Versuches über die Software kontrolliert und aufgezeichnet. Hierzu befanden sich dauerhaft drei Messelectroden der BlueLab Steuerung in dem Reservoir (pH-Wert, Temperatur und EC-Wert). Anders als der EC-Wert wurde der pH-Wert nur geloggt, aber nicht durch Säure oder Lauge korrigiert. Um das verdunstete Wasser während des Versuches wieder aufzufüllen und den Wasserstand in dem Reservoir konstant zu halten, wurde ein zweites Becken mit Leitungswasser neben dem Reservoir platziert. Die Becken wurden über einen Schlauch miteinander verbunden und über einen installierten Schwimmer an dem Reservoir wurde das verdunstete Wasser kontinuierlich aufgefüllt. Nach jedem Versuchsdurchgang wurden alle Becken ausgebaut, gereinigt, desinfiziert und neu angeschlossen.

**Tabelle 5: Nährstoffzusammensetzung (mmol/l und mg/l) des modifizierten N-Mediums mit einem Molverhältnis von 75:25 [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N:NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N] bei einer Anfangskonzentration von 100 % (angelehnt an APPENROTH 2015), diese Konzentration wurde im Anschluss mit regionalem Leitungswasser auf 10 % verdünnt**

Nährstoffe	Stammlösung		1:10 verdünnt
	mmol·l <sup>-1</sup>	mg·l <sup>-1</sup>	mg·l <sup>-1</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	7,62	106,68	10,668
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	2,5	35	3,5
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1	95	9,5
K <sup>+</sup>	9,08	354,26	35,426
Mg <sup>2+</sup>	1,31	31,8	3,18
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	3,24	311,248	31,1248
Ca <sup>+</sup>	2,24	89,5	8,95
Cl <sup>-</sup>	3,4	120,75	12,075
Fe <sup>3+</sup>	0,025	1,4115	0,14115
BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	0,005	0,074	0,0074
Mn <sup>2+</sup>	0,013	0,715	0,0715
Na <sup>+</sup>	0,757	17,4	1,74

Die vorliegende Untersuchung umfasste vier aufeinander folgende Versuchsreihen, welche über einen Zeitraum von zwei Monaten durchgeführt wurden. Während der Versuche wurde der Einfluss acht unterschiedlicher Versuchsvarianten untersucht (Tabelle 6). Jede dieser Varianten enthielt hinsichtlich ihres Lichtspektrums 20 % Globalstrahlung (6500 K). Die verbleibenden 80 % wurden im Rot-Blau-Verhältnis variiert. Zudem wurden drei unterschiedliche Lichtintensitäten eingestellt. Für die Beleuchtung wurden dimmbare LEDs LE1200 (DH Licht GmbH, Wülfrath, Deutschland) verwendet. Die gesamte Steuerung der LEDs erfolgte mittels der Software VisuSpectrum 3.0 (DH Licht GmbH, Wülfrath, Deutschland und RAM GmbH Mess- und Regeltechnik, Herrsching, Deutschland). Die Einstellungen wurden für jedes Becken anhand eines Rasters mithilfe des Handphotometers Light Meter LI-250A (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) kontrolliert.

**Tabelle 6: Acht Versuchsvarianten mit unterschiedlichen Lichtintensitäten (µmol/m<sup>2</sup>/s) und Rot-Blau-Verhältnissen**

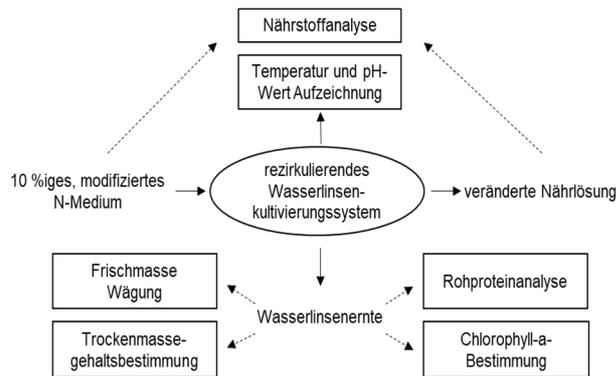
Lichtintensität	Rot-Blau-Verhältnis	Variante
50	70/30	50 - 70/30
50	50/50	50 - 50/50
50	30/70	50 - 30/70
100	70/30	100 - 70/30
100	30/70	100 - 30/70
150	70/30	150 - 70/30
150	50/50	150 - 50/50
150	30/70	150 - 30/70

Um jede Variante in vierfacher Wiederholung für jede der beiden Arten überprüfen zu können, wurden jeweils zwei zeitlich aufeinanderfolgende Versuche (Durchgänge) durchgeführt. Die Durchgänge wurden bei der statistischen Analyse als Blocks angesehen. Die Einzelversuche wurden randomisiert, wobei zwei Wiederholungen der gleichen Variante eine Randomisationseinheit bildeten (Subsampling). Eine Randomisationseinheit ergab sich aus zwei Leuchten und der Abgrenzung zu den angrenzenden Leuchten, sodass sich für die 16 schwarzen Versuchsbecken insgesamt 8 Randomisationseinheiten ergeben haben (Abbildung 10). Jedes Becken ( $0,565 \times 0,37$  m, Kultivierungsfläche:  $0,49 \times 0,37$  m  $\approx$  0,18 m<sup>2</sup>, Wasserhöhe: ca. 0,10 m) wurde an zwei aufeinanderfolgenden Terminen beprobt. Die Datenerhebung erfolgte zu Beginn, nach einwöchiger Kultivierung und zum Ende eines jeden Versuches. Aussagekräftige Ergebnisse wurden nur in der ersten Versuchswoche erzielt, weshalb die Daten der zweiten Woche nicht weiter abgebildet werden. In der zweiten Woche kann ein größerer Effekt durch die veränderte Nährlösung im Vergleich zu den Lichtvarianten angenommen werden (Tabelle 7). Die Analyse der Nährstoffe erfolgte nach denen in Abschnitt 3.1.2.1.1 dargestellten Methoden.

**Tabelle 7: Konzentrationen (mg·l<sup>-1</sup>) der einzelnen Nährstoffe im Nährstoffreservoir an Tag 1, 7 und 14, gemittelt über die zwei Versuche für *L. minor* und *W. hyalina***

Nährstoff (mg/l)	<i>L. minor</i>			<i>W. hyalina</i>		
	Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 0	Tag 7	Tag 14
NH <sub>4</sub> -N	2,394	0,066	0,043	2,186	0,045	0,048
NO <sub>3</sub> -N	9,539	8,314	3,705	13,050	13,907	8,568
B	0,024	0,004	0,001	0,025	0,025	0,021
Ca	48,138	52,028	57,483	43,045	47,383	53,149
Cu	0,011	0,008	0,006	0,007	0,005	0,004
Fe	0,109	0,005	0,001	0,054	0,003	0,000
K	34,126	31,423	28,781	39,958	40,525	36,695
Mg	7,239	7,809	7,892	6,869	8,420	7,814
Mn	0,848	0,167	0,002	0,764	0,011	0,001
Na	14,917	16,726	19,035	13,814	15,313	16,873
P	2,362	1,115	0,205	2,317	1,699	0,929
S	29,350	31,697	33,977	24,961	27,884	29,770
Zn	0,269	0,042	0,044	0,198	0,020	0,013

Insgesamt veränderte sich der pH-Wert während der Versuche kaum. Der Start pH-Wert lag in der Regel bei beiden Versuchen und Arten zwischen 7,6 und 7,7. Im Mittel lag der pH-Wert während der Versuche von *L. minor* bei 7,8 und für die Versuche von *W. hyalina* bei 7,9.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in Bezug auf die Steuerparameter und die Parametererfassung**

ebenfalls auf Abschnitt 3.1.2.1.1. Für die Berechnung des relativen Proteinertrags (RPY; g Protein pro Woche<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup>) wurde die Anbaufläche der im Versuch verwendeten Gefäße auf 0,18 m<sup>2</sup> angepasst.

Der Chlorophyll-a-Gehalt in beiden Wasserlinsenarten wurde nach DIN 38409-60:2019-12 mit Ethanol ( $\omega(\text{EtOH}) = 90\%$ ) als Lösungsmittel bestimmt. Es wurden vier Wiederholungen der Ausgangsbiomasse und vier Wiederholungen jeder Behandlung am Ende der Versuche analysiert. Die Laboranalyse des Chlorophyll-a-Gehalts erfolgte in einer dunklen Umgebung unmittelbar nach der Probenahme nach dem folgenden Schema:

Ein Nettogewicht von  $1 \pm 0,005$  g frischer Wasserlinsenbiomasse wurde in 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, mit 10 ml kochendem Lösungsmittel aufgefüllt und 60 Sekunden lang mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Danach erfolgte eine Abkühlung des Extraktes und eine 30-minütige Ultraschallbadbehandlung im Dunkeln. Anschließend wurde das Extrakt in einen 100-ml-Messkolben filtriert, mit Ethanol bis zur Eichmarke aufgefüllt und erneut durch Schütteln homogenisiert. Das Extrakt wurde in eine Glasküvette gefüllt. Von dem verbleibenden Extrakt wurden 15 ml in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit 100  $\mu\text{l}$  Salzsäure (2 M) versetzt und zur Korrektur der Phäopigmente homogenisiert. Beide Extrakte und das reine Lösungsmittel wurden schließlich in verschiedene Glasküvetten gefüllt und mit einem Spektralphotometer (Specord 40, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) bei 665 und 750 nm analysiert.

Für die Überprüfung des Einflusses des Lichtes auf die Pflanzenperformance der Wasserlinsen wurden die Parameter Frisch- und Trockenmasse, Chlorophyll-a-Gehalt und der Rohproteingehalt ermittelt (Abbildung 11). Die Frisch- und Trockenmasseparameter wurden nach dem in Abschnitt 3.1.2.1.1 beschriebenen Ablauf erfasst und berechnet.

Die Methode der Bestimmung und Berechnung des Rohproteingehaltes basiert

Die Berechnung des Chlorophyll-a-Gehaltes erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\omega_{\text{Chlorophyll-a}} = ((A_{665v} - A_{750v}) - (A_{665n} - A_{750n})) \cdot \frac{R}{R - 1} \cdot \frac{V_E}{m_p \cdot d \cdot \alpha \cdot 1000}$$

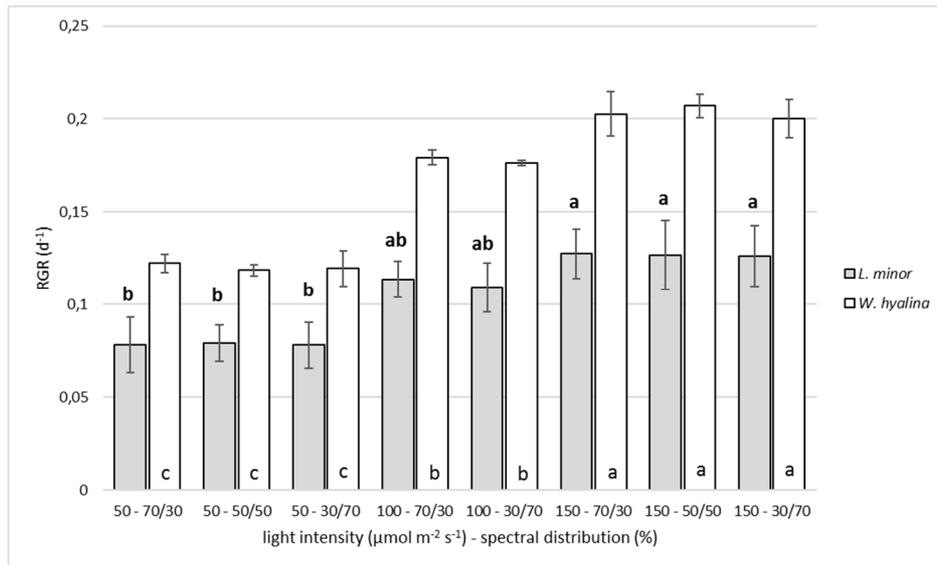
mit

$\omega_{\text{Chlorophyll-a}}$	Massenanteil des Chlorophyll-a in Milligramm je Gramm FM [mg/g FM]
$A_{665v}$	Absorption des Extraktes vor Ansäuerung, gemessen bei 665 nm
$A_{750v}$	Absorption des Extraktes vor Ansäuerung, gemessen bei 750 nm zur Trübungskorrektur
$A_{665n}$	Absorption des Extraktes nach Ansäuerung, gemessen bei 665 nm
$A_{750n}$	Absorption des Extraktes nach Ansäuerung, gemessen bei 750 nm zur Trübungskorrektur
R	Verhältnis von $A_{665v}/A_{665n}$ für reines Chlorophyll-a; hier gilt $R = 1,7$
$V_E$	Volumen des Extraktes in Milliliter [ml]
$m_p$	Masse der eingewogenen Wasserlinseprobe in Gramm [g]
d	Schichtdicke der Messküvette in Zentimeter [cm]; hier gilt $d = 1$
$\alpha$	spezifischer Absorptionskoeffizient für Chlorophyll-a [ $\text{ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ]; hier gilt für 90 % ethanolische Lösung $\alpha = 0,082$

Zusätzlich wurde die Trockensubstanz jeder Probe bestimmt, indem weiteres Pflanzenmaterial bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Die Trockenmassegehalte dienten im Anschluss der Umrechnung von Frisch- in Trockenmasse.

### 3.1.2.2.2 Ergebnisse

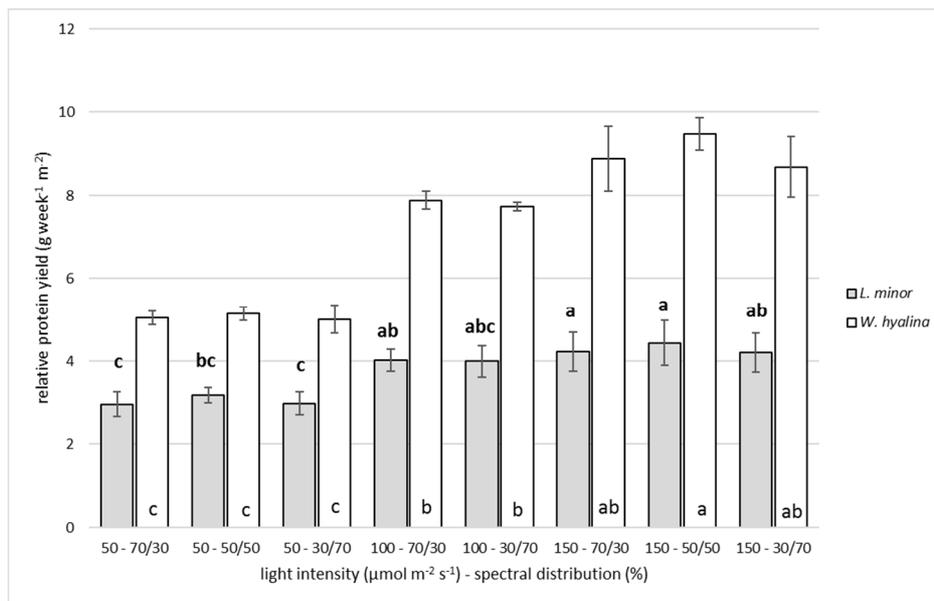
Abbildung 12 zeigt die RGR auf der Grundlage der Trockenmasse (TM). Mit zunehmender Lichtintensität erhöht sich die RGR für beide Arten. Die höchste RGR wird für *L. minor* bei 150-70/30 ( $0,13 \pm 0,013 \text{ d}^{-1}$ ) und für *W. hyalina* bei 150-50/50 ( $0,21 \pm 0,006 \text{ d}^{-1}$ ) erreicht. Die niedrigsten Werte wurden bei 50-30/70 für *L. minor* mit einer RGR von  $0,078 \pm 0,012 \text{ d}^{-1}$  und bei 50-50/50 für *W. hyalina* mit einer RGR von  $0,119 \pm 0,003 \text{ d}^{-1}$  ermittelt. Der prozentuale Anstieg von der niedrigsten zur höchsten RGR beträgt 66,6 % für *L. minor* und 76,5 % für *W. hyalina*. Alle drei Varianten von *L. minor*, die bei  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  kultiviert wurden, sind im Vergleich zu den  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  Varianten signifikant höher. *W. hyalina*, die bei einer Lichtintensität von  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  kultiviert wurden, erreichten signifikant höhere RGRs als die Varianten mit 100 und  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Das Lichtspektrum hatte bei keiner der Behandlungen einen signifikanten Einfluss auf die RGR.



**Abbildung 12: Relative Wachstumsrate (RGR; d<sup>-1</sup>), basierend auf der Trockenmasse, für *Lemna minor* (grau schattierte Säulen) und *Wolffella hyalina* (weiße Säulen), die Pflanzen wurden über sieben Tage bei unterschiedlichen Lichtintensitäten (50, 100 und 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) und Spektralverteilungen (rot/blau: 70/30, 50/50 und 30/70 %) kultiviert (n=4, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanzen innerhalb einer Art, Tuckey p≤0,05, Mittelwert±Standardabweichung)**

Der Rohproteingehalt variiert in einem engen Bereich zwischen 31,83±0,84 % und 32,4±1,18 % für *L. minor* und zwischen 39,25±1,04 % und 40,00±0,75 % für *W. hyalina* bei den verschiedenen Varianten. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in dem Rohproteingehalt für die verschiedenen Lichtintensitäten und Spektralverteilungen innerhalb einer Art festgestellt.

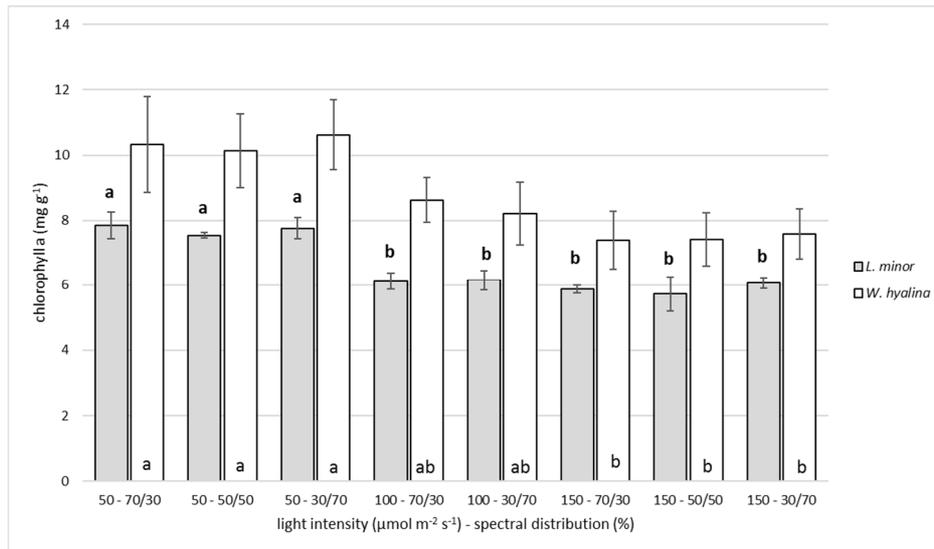
Der relative Proteinertrag (Gramm pro Woche und m<sup>2</sup>), basierend auf der Trockenmasse, ist in Abbildung 13 dargestellt. Er reicht von 2,96±0,298 bis 4,44±0,548 g·Woche<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup> (50-70/30 bzw. 150-50/50) für *L. minor* und für *W. hyalina* von 5,01±0,345 g·Woche<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup> bei 50-30/70 bis 9,48±0,387 g·Woche<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup> bei 150-50/50. Der Unterschied zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Wert beträgt bei *L. minor* 50 % und bei *W. hyalina* 89,2 %. Höhere Lichtintensitäten führten zu höheren relativen Proteinerträgen. Insgesamt erzielt *W. hyalina* über alle Varianten höhere relative Proteinerträge im Vergleich zu *L. minor*. Je höher die Lichtintensität, desto größer ist der Unterschied zwischen den relativen Proteinerträgen der Arten. Dies bedeutet, dass *W. hyalina* bei hohen Lichtintensitäten (150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), im Vergleich zu *L. minor*, mehr Protein synthetisiert als bei den beiden niedrigeren Lichtintensitäten. Die Varianten 50-70/30 und 50-30/70 sind im Vergleich zu allen anderen Varianten mit *L. minor* signifikant niedriger, mit Ausnahme von 100-30/70. Bei *W. hyalina* sind alle Varianten mit einer Lichtintensität von 50 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (50-70/30, 50-50/50 und 50-30/70) im Vergleich zu den anderen Varianten mit höheren Lichtintensitäten signifikant niedriger. Bei keiner der beiden Wasserlinsenarten können signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Spektralverteilungen festgestellt werden.



**Abbildung 13: Relativer Proteinertrag (RPY; g Woche<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>), basierend auf der Trockenmasse, für *Lemna minor* (grau schattierte Säulen) und *Wolffiella hyalina* (weiße Säulen), die Pflanzen wurden über sieben Tage bei unterschiedlichen Lichtintensitäten (50, 100 und 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) und Spektralverteilungen (rot/blau: 70/30, 50/50 und 30/70 %) kultiviert (n=4, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanzen innerhalb einer Art, Tuckey p≤0,05, Mittelwert±Standardabweichung)**

Der Chlorophyll-a-Gehalt ist für beide Arten nach sieben Versuchstagen in Abbildung 14 dargestellt. Er schwankt zwischen 5,32±0,508 mg·g<sup>-1</sup> und 7,29±0,392 mg·g<sup>-1</sup> für *L. minor* bei 150-50/50 bzw. 50-70/30. Der Höchstgehalt für *W. hyalina* beträgt 9,98±1,011 mg·g<sup>-1</sup> Chlorophyll a und wurde bei 50-30/70 erreicht, während der niedrigste Gehalt (6,83±0,389 mg·g<sup>-1</sup>) bei 150-30/70 erreicht wurde. Dies entspricht einem Rückgang von 27 % bei *L. minor* und 31,6 % bei *W. hyalina*.

Bei *L. minor* ist ein signifikanter Rückgang zwischen den Varianten mit der niedrigsten Lichtintensität (50 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) und den beiden höheren Lichtvarianten (100 und 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) zu beobachten. Der Rückgang von der 50 μmol-Behandlung auf 100 und 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> ist nur zwischen den beiden höchsten (150-70/30 und 50-30/70) und den drei niedrigsten (150-70/30, 150-50/50 und 150-30/70) Werten signifikant. Unterschiedliche Lichtspektren haben keinen signifikanten Einfluss auf den Chlorophyll-a-Gehalt der beiden Arten.



**Abbildung 14: Chlorophyll-a-Gehalt (mg·g<sup>-1</sup>), bezogen auf die Trockenmasse, für *Lemna minor* (grau schattierte Säulen) und *Wolffia hyalina* (weiße Säulen), die Pflanzen wurden über sieben Tage bei unterschiedlichen Lichtintensitäten (50, 100 und 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>) und Spektralverteilungen (rot/blau: 70/30, 50/50 und 30/70 %) kultiviert (n=4, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanzen innerhalb einer Art, Tuckey p≤0,05, Mittelwerte±Standardabweichung)**

### 3.1.2.2.3 Diskussion

Die RGR der Wasserlinsen unterscheidet sich in dem durchgeführten Versuch zwischen den Arten und den verschiedenen Wachstumsbedingungen. Eine Erhöhung der Lichtintensität von 50 auf 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> steigerte die RGR von *L. minor* und *W. hyalina* signifikant. Viele andere Untersuchungen bestätigen eine Wachstumszunahme mit zunehmender Lichtintensität (PAOLACCI et al. 2018; WEDGE, BURRIS 1982; LI et al. 2016).

PAOLACCI et al. (2018) berichteten, dass steigende Lichtintensitäten zwischen 6 und 1000 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> die RGR von *L. minor* und *L. minuta*, die in sterilen Wachstumsräumen bei 20 °C mit einem Licht:Dunkel-Zyklus von 16:8 h kultiviert wurden, erhöhen. Bei Lichtintensitäten unter 40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der RGR beider Arten, während oberhalb von 90 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> signifikante, artbezogene Unterschiede erzielt wurden. *L. minor* erreichte bei 150 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> eine RGR von 0,26 d<sup>-1</sup> (PAOLACCI et al. 2018). Diese RGR ist höher als das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung, was an den verschiedenen Anbaubedingungen liegen könnte. Bei vergleichsweise niedrigen Lichtintensitäten zwischen 30 und 105 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> erreichte *Lemna aequinoctialis* in Monokultur bei der höchsten Lichtintensität eine RGR von 0,19±0,0137 d<sup>-1</sup>, während *Lemna punctata* und *Spirodela polyrrhiza* unter denselben Wachstumsbedingungen Wachstumsraten von 0,18±0,0092 d<sup>-1</sup> bzw. 0,15±0,0101 d<sup>-1</sup> erreichten (LI et al. 2016). Eine Erhöhung der Lichtintensität und der Photoperiode führte zu einer Steigerung der Wachstumsrate, der Biomasse und der Stärkeproduk-

tion von *Lemna aequinoctialis*. Unter Berücksichtigung der Beleuchtungskosten wurde ein Optimum in Bezug auf diese Faktoren bei  $110 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  erreicht (YIN et al. 2015). Eine Erhöhung der Lichtintensität um 600 % (von 100 auf  $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) führte zu einer um 25 % höheren RGR von *L. gibba* (STEWART et al. 2020). Dieser RGR-Anstieg ist geringer als der von *L. minor* (66,6 %) und *W. hyalina* (76,5 %) bei einer Erhöhung der Lichtintensität um 200 % in unserer Studie. Die in der vorliegenden Untersuchung erzielten maximalen RGRs von  $0,13 \text{ d}^{-1}$  für *L. minor* und  $0,21 \text{ d}^{-1}$  für *W. hyalina* sind niedriger als die höchsten erreichten Werte von  $0,420\pm 0,018 \text{ d}^{-1}$  bzw.  $0,519\pm 0,055 \text{ d}^{-1}$  für dieselben Klone (ZIEGLER et al. 2015). Unter nicht-sterilen Bedingungen müssen jedoch bestimmte Kultivierungsunterschiede aufgrund von hemmenden Faktoren, wie z. B. Algen- oder Bakterienwachstum, berücksichtigt werden (BRAND et al. 2021; ROIJACKERS et al. 2004). In der verwendeten rezirkulierenden vertikale Indoor-Farm (IVF) für die nicht-sterile Kultur von Wasserlinsen wurde ein stark verdünntes Wachstumsmedium, vergleichsweise niedrige Lichtintensitäten und eine moderate Temperatur verwendet. In Bezug auf die Untersuchung von PETERSEN et al. (2021) ergab das gleiche Nährmedium mit einer Verdünnung von 10 % eine RGR von  $0,21 \text{ d}^{-1}$  für *W. hyalina*, was mit den Ergebnissen der aktuellen Untersuchung übereinstimmt. Im Gegensatz dazu zeigen andere Studien, dass unterschiedliche Lichtintensitäten keinen signifikanten Einfluss auf die RGR von Wasserlinsenarten hatten. Die RGR von *Lemna minor*, die auf synthetischen Molkereiabwässern wuchs, nahm mit steigender Lichtintensität zwischen  $50$  und  $850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  nicht zu (WALSH et al. 2021). *Lemna gibba* erreichte bei unterschiedlichen Lichtintensitäten zwischen  $50$  und  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  konstant hohe Wachstumsraten, höhere Intensitäten führten jedoch zu sinkenden Zeaxanthinwerten (STEWART et al. 2021).

Die in dem Versuch eingestellten Lichtspektren hatten bei beiden Arten keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter. Bislang wurden nur wenige Untersuchungen zu diesem Einflussfaktor in Bezug auf die Wasserlinse durchgeführt. *Landoltia punctata*, kultiviert unter fluoreszierendem weißen Licht, blauer LED und weißer LED bei  $110 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , zeigte keine signifikanten RGR-Unterschiede (GALLEGO et al. 2021). Bei *Spirodela polyrhiza* wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der RGR festgestellt, wenn sie bei  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  mit roten und blauen LEDs (660 bzw. 460 nm) kultiviert wurde (ZHONG et al. 2021), was die Ergebnisse des vorliegenden Versuches unterstreicht. Die gleichzeitige Anwendung eines geeigneten Verhältnisses von roten und blauen Wellenlängen führte zu einer höheren photosynthetischen Effizienz im Vergleich zu anderen Spektren, da die Pflanzen Licht aus diesen Spektren effektiver absorbieren können (ZHONG et al. 2021). *S. polyrhiza*, die auf einem eutrophen Medium kultiviert wurde, erreichte einen signifikant höheren Gesamtbiomasseertrag, wenn ein Rot-Blau-Verhältnis von 2:1 oder 4:1 bei einer Lichtintensität von  $110 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  angewendet wurde, verglichen mit monochromatischen (450, 630 oder 660 nm) oder fluoreszierenden Lichtquellen bei denselben Intensitäten (XU et al. 2019).

Die dargestellten Rohproteingehalte für beide Arten zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Lichtszenarien und reichten von  $31,83 \pm 0,84$  % bis  $32,4 \pm 1,18$  % für *L. minor* und von  $39,25 \pm 1,04$  % bis  $40,00 \pm 0,75$  % für *W. hyalina*. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von STEWART et al. (2021), die zeigten, dass der Rohproteingehalt von *L. gibba*, die bei 50 und  $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  kultiviert wurde, von 25 % auf 46 % anstieg. Ein Anstieg des Rohproteingehalts von 1,5 % auf 2 % (bezogen auf das Frischgewicht) wurde bei *L. minor* beobachtet, wenn sie auf synthetischen Abwässern aus der Milchverarbeitung bei einer Lichtintensität von  $850 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  im Vergleich zu  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  kultiviert wurde. Bei C3-Pflanzen, wie z. B. Wasserlinsen, führen höhere Lichtintensitäten zu einer verstärkten Produktion von Rubisco, einem löslichen Protein (WALSH et al. 2021). Ein geringer Anstieg der Lichtintensität (von 200 auf  $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) erhöhte die prozentuale Aktivierung von Rubisco in *S. polyrhiza* nur geringfügig (MARTINDALE, BOWES 1996). Dies könnte eine Erklärung für die relativ stabilen Rohproteingehalte in der vorliegenden Untersuchung sein. Eine stärkere Erhöhung der Lichtintensität, wie oben beschrieben, führt zu steigenden Rohproteingehalten. Die im vorliegenden Versuch erreichten Rohproteingehalte können für eine vergleichsweise geringe Nährstoffkonzentration und Lichtintensität als hoch angesehen werden, insbesondere bei *W. hyalina*. APPENROTH et al. (2017) berichteten über einen Rohproteingehalt von 35 % für *W. hyalina* und 25 % für *L. minor*. Diese Wasserlinsen wurden mit einem modifizierten Schenk-Hildebrandt-Medium bei  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  kontinuierlichem Weißlicht kultiviert. In einem anderen Versuch wurden die höchsten Rohproteingehalte der drei Arten *Lemna aequinoctialis*, *Lemna punctata* und *Spirodela polyrhiza* ( $33,73 \pm 0,3812$  %,  $32,27 \pm 0,2988$  % bzw.  $36,82 \pm 0,6453$  %) bei  $105 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  unter Verwendung einer ein Zehntel starken Hoagland-Lösung erreicht (LI et al. 2016). PETERSEN et al. (2021) erreichten Rohproteingehalte von 32,4 % für *L. minor* und 35,3 % für *W. hyalina*, wobei sie ein stationäres System mit der gleichen Nährlösung wie in diesen Versuchen verwendeten. WHEELER et al. (1996) gingen davon aus, dass eine kontinuierliche Stickstoffzufuhr bei verschiedenen Kulturen (Weizen, Salat, Kartoffeln und Sojabohnen), die in einem hydroponischen Kreislaufsystem angebaut wurden, höhere Proteingehalte bewirken als bei den gleichen Feldkulturen. Ein solcher Mechanismus könnte auch für den Anstieg des Rohproteingehaltes bei *W. hyalina* verantwortlich sein, die im Kreislaufsystem im Vergleich zum stationären System angebaut wird.

Ein Rot-Blau-Verhältnis von 1:2 kann die Stärkeausbeute deutlich erhöhen, während ein höherer Anteil des roten Spektrums unter eutrophen Bedingungen eine starke induktive Wirkung auf die Turionbildung in *Spirodela polyrhiza* hat (XU et al. 2019). Dies steht im Gegensatz zu den Daten von ZHONG et al. (2021), die bei derselben Art eine erhöhte Stärkeakkumulation unter rotem Licht feststellten, während blaues Licht die Proteinakkumulation förderte. Bei *Wolffia arrhiza* wurden bei Bestrahlung mit Wellenlängen, die weißem, rotem und blauem Licht

entsprechen, keine signifikanten Unterschiede in den Aminosäurekonzentrationen des löslichen Proteins festgestellt (APPENROTH et al. 1982). Diese Daten passen zu unseren Erkenntnissen, dass die angewandte spektrale Verteilung keinen signifikanten Einfluss auf die Rohproteingehalte hatte.

Der relative Rohproteinерtrag war bei *L. minor* im Vergleich zu *W. hyalina* geringer. Die Art *L. minor* erreichte ein Maximum von  $4,44 \pm 0,548 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  bei 150-50/50 und *W. hyalina* von  $9,48 \pm 0,387 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  bei der gleichen Behandlung. Dies entspricht 2,31 bzw. 4,93 t reinem Eiweiß pro Jahr und Hektar. In der Literatur wird eine große Bandbreite an Produktivitäten angegeben. 28,8 und  $34,7 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  für *L. minor* bzw. *W. hyalina* wurden bei Verwendung derselben Nährlösung in einem stationären System mit kleineren Gefäßen erreicht (PETERSEN et al. 2021). MOHEDANO et al. (2012) berichteten über eine Proteinproduktivität von  $24 \text{ t} \cdot \text{Jahr}^{-1} \cdot \text{ha}^{-1}$  (ca.  $46 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ) für Wasserlinsen. CHAKRABARTI et al. (2018) erreichten für *L. minor* einen Biomassertrag von  $703 \text{ kg} \cdot \text{Monat}^{-1} \cdot \text{ha}^{-1}$  (ca.  $17,5 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ). Bei einem Proteingehalt von 27,1 % für Wasserlinsen, die mit anorganischem Dünger angebaut wurden, ergab sich eine Proteinproduktivität von  $4,74 \text{ g} \cdot \text{Woche}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  (CHAKRABARTI et al. 2018). Verglichen mit Sojabohnen mit einem Ertrag von ca.  $3 \text{ t} \cdot \text{Jahr}^{-1} \cdot \text{ha}^{-1}$  und einem Proteingehalt von 40 % (HELMS, ORF 1998), ist die Proteinproduktivität von  $1,2 \text{ t} \cdot \text{Jahr}^{-1} \cdot \text{ha}^{-1}$  im Vergleich zu allen Hochrechnungen der Proteinproduktivität von Wasserlinsen deutlich niedriger.

Der Chlorophyll-a-Gehalt nahm bei beiden untersuchten Arten mit zunehmender Lichtintensität ab. Diese Korrelation wurde auch in weiteren Untersuchungen bei anderen Wasserlinsenarten festgestellt (STEWART et al. 2020; STEWART et al. 2021; PAOLACCI et al. 2018; WALSH et al. 2021; ARTETXE et al. 2002). *L. minor* hatte bei allen untersuchten Lichtintensitäten (6 bis  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) höhere Gesamtchlorophyllgehalte als *L. minuta*, die bei der niedrigsten Lichtintensität bis zu  $1,4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  Chlorophyll der Biomasse erreichte (PAOLACCI et al. 2018). *L. gibba* enthielt ca.  $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$  Chlorophyll a und b bei  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und ca.  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$  bei  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (STEWART et al. 2020; STEWART et al. 2021). Die Reduzierung des Chlorophylls bei hohen Lichtintensitäten ist eine Akklimatisierungsstrategie, die die Pflanze vor lichtbedingten Schäden durch Photooxidation schützt. Im Gegensatz dazu gewährleisten hohe Chlorophyllgehalte bei niedrigen Lichtintensitäten eine maximale Lichtabsorption. Solche Pflanzen sind in der Regel mit Schattentoleranz verbunden (PAOLACCI et al. 2018). Eine höhere RGR und ein höherer relativer Rohproteinерtrag von *W. hyalina* im Vergleich zu *L. minor* in allen untersuchten Varianten könnte durch eine höhere Konzentration von Chlorophyll a in *W. hyalina* erklärt werden, wodurch die Photosynthese effektiver ist als bei *L. minor*.

Die verschiedenen untersuchten Spektralverteilungen hatten keine signifikanten Auswirkungen auf den Chlorophyll-a-Gehalt der beiden Arten. Dies wurde auch von ZHONG et al. (2021) gezeigt, die keine signifikanten Unterschiede bei *S. polyrhiza* feststellten, wenn sie unter rotem, blauem und weißem Licht kultiviert wurde.

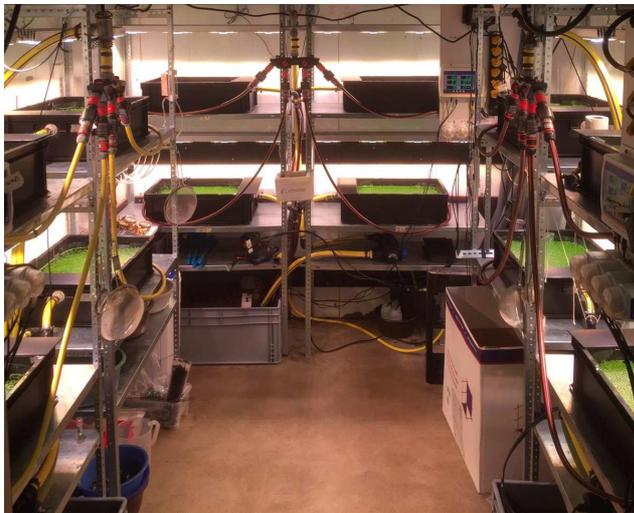
Das für diese Versuche verwendete Wasserlinsen-Kultivierungssystem (Abbildung 10) ist ein kleiner Prototyp einer aquatischen IVF mit Kreislaufsystem. Es wurde für die Durchführung wissenschaftlicher Experimente konzipiert und gebaut. In der Literatur wurde bisher keine praktische Anwendung einer IVF für die Wasserlinsenkultivierung beschrieben, weder in kleinem Maßstab für Experimente noch in großem Maßstab für die Biomasseproduktion. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstreichen, dass die Kultivierung von Wasserlinsen in einem solchen System unter nicht-sterilen Bedingungen möglich ist. Das System zur Nährstoffkontrolle und -dosierung basiert auf EC-Werten. Wenn die tatsächlichen EC-Werte unter den Ziel-EC-Wert fielen, pumpt das Dosiersystem Stammlösung in das Reservoir, bis der Zielwert wieder erreicht wird. Dies ist ein bewährtes System für die Nährstoffdosierung, das in vielen verschiedenen hydroponischen Anwendungen eingesetzt wird. Bei der Anwendung in Kreislaufsystemen werden die Nachteile jedoch deutlich. Ein Ungleichgewicht zwischen der Nährstoffzusammensetzung, der Stammlösungen und der tatsächlichen Nährstoffaufnahme durch die Pflanzen kann zu steigenden Konzentrationen bestimmter Stoffe in Kreislaufsystemen führen, wie in den vorgestellten Ergebnissen zu sehen war. Je länger ein Kreislaufsystem läuft, desto größer werden die Ungleichgewichte. Eine Verarmung an Nährstoffen wie Ammonium, Nitrat, Natrium oder Magnesium kann bei Wasserlinsen aufgrund eines nicht optimalen Nährstoffverhältnisses zu einer Verringerung der RGR und des Rohproteingehaltes führen (WALSH et al. 2020; PETERSEN et al. 2021). Eine Anpassung der Stammlösungen an den tatsächlichen Bedarf der Pflanzen ist aus pflanzenphysiologischen und technischen Gründen schwierig. Viele Pflanzen haben in verschiedenen Entwicklungsstadien einen wechselnden Bedarf. Außerdem müssen die Dosierpumpen bei der Dosierung mehrerer Stammlösungen präzise arbeiten, um das Nährstoffverhältnis gleichmäßig zu halten. Um mehr Daten über das Verhalten von Wasserlinsen in Kreislaufsystemen zu erhalten, sind länger andauernde Experimente erforderlich, in denen ein breites Spektrum an abiotischen und bei nicht-sterilen Experimenten auch an biotischen Parametern untersucht wird. Die Ergebnisse und Erfahrungen dieser Untersuchung wurden bereits erfolgreich in den Betrieb des hydroponischen Kreislaufsystems für den Anbau von Wasserlinsen-Biomasse in einem größeren Maßstab umgesetzt (siehe Abschnitt 3.1.3.4).

### 3.1.2.3 Versuch zur Temperatur und Strömungsgeschwindigkeiten

Ziel des Versuches war es, den Einfluss zweier Wassertemperaturen und dreier Strömungsgeschwindigkeiten, bzw. Wasserlinsenbewegungen auf den Rohproteingehalt und die Wachstumsrate von *L. minor* und *W. hyalina* in einem Kreislaufsystem zu untersuchen. Dazu wurden zwei aufeinanderfolgende Versuche für jede Art durchgeführt, bei welchen in der ersten Woche eine Wassertemperatur von 20 °C und in der zweiten Woche von 24 °C eingestellt wurde. Zusätzlich wurde die Wasserlinsenbewegung zwischen langsam, mittel und schnell eingestellt.

#### 3.1.2.3.1 Material und Methoden

Zur Überprüfung der zwei Wassertemperaturen sowie der drei Wasserlinsenbewegungen wurden zwei aufeinanderfolgende, einwöchige Versuche für jede der beiden Arten (*L. minor*, *W. hyalina*) vom 12.11.2020 bis zum 10.12.2020 durchgeführt. In der ersten Woche wurde in jedem der drei Kreisläufe, welche jeweils vier Wiederholungen in Form von vier Becken umfassten (Abbildung 15) eine Wassertemperatur von 20 °C und in der zweiten Woche eine Temperatur von 24 °C eingestellt. Jeder Kreislauf umfasste vier Kultivierungsbecken, welche jeweils einen Zu- und einen Ablauf besaßen (Abbildung 15 und Abbildung 16). Die Einstellung der Temperatur und der Nährstoffkonzentration erfolgte in dem jeweiligen Nährlösungsreservoir. Dazu wurde zu Beginn eines jeden Versuches mithilfe der Bluelab Steuerung ein EC-

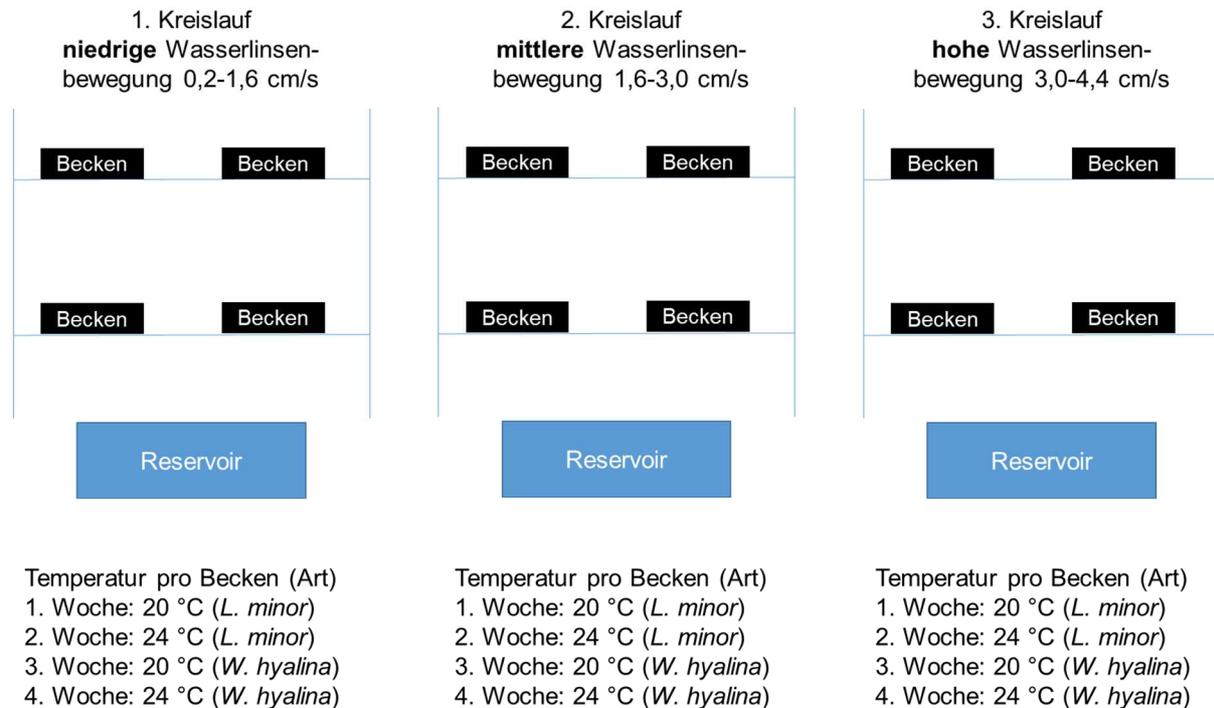


**Abbildung 15: Versuchsaufbau mit drei Kreisläufen mit jeweils vier Versuchsbecken zur Überprüfung des Einflusses der Temperatur und der Wasserlinsenbewegung**

Wert von  $0,6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$  für das verwendete Leitungswasser eingestellt, dies entspricht dem in Tabelle 5 dargestellten 1:10 verdünnten N-Medium. Die Temperaturregulation erfolgte über Heizstäbe in dem Reservoir. Als Leuchtmittel wurden LEDs der Serie S4W der Firma Sanlight eingesetzt, welche ein für das Pflanzenwachstum geeignetes Lichtspektrum abbilden, die Lichtintensität betrug  $350 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Jeder Versuch startete mit 25 g Frischmasse aus der Vorkultivierung für *L. minor* und 20 g für *W. hyalina* pro Becken.

Die Nährlösung wurde durch ein L-förmiges Bauteil auf Höhe der Wasseroberfläche in die Kultivierungsbecken geleitet. Durch unterschiedlich stark eingestellte Strömungsgeschwindigkeiten konnten unterschiedlich starke Wasserlinsenbewegungen erzeugt werden. In jedem Becken wurde mittels eines Maßbandes und

einer Stoppuhr die Wasserlinsengeschwindigkeit in cm pro Sekunde eingestellt. Dieser Vorgang musste nach dem Versuchsstart alle zwei Tage wiederholt werden, da die Wasserlinnenbewegung aufgrund des Wachstum täglich abgenommen hat.

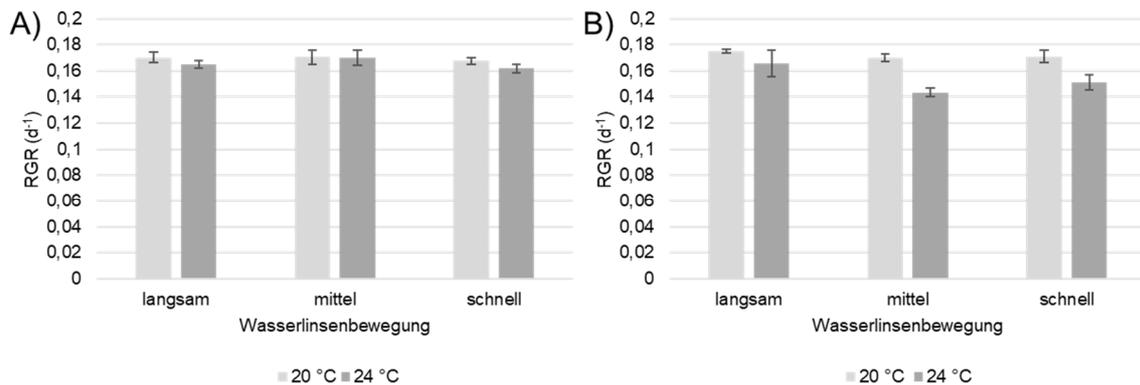


**Abbildung 16: Versuchsaufbau und Ablauf zur Überprüfung des Einflusses der Wasserlinsenbewegung und der Temperatur auf die Kultivierung der Wasserlinsenarten *L. minor* und *W. hyalina***

Um den Einfluss der Temperatur und der Strömungsgeschwindigkeiten zu überprüfen, wurden Frisch- und Trockenmasseparameter und im Anschluss die RGR zu berechnen. Anhand der Trockenmasseproben wurde außerdem der Rohproteingehalt ermittelt. Die durchgeführten Methoden und Berechnungen sind in Abschnitt 3.1.2.1.1 beschrieben.

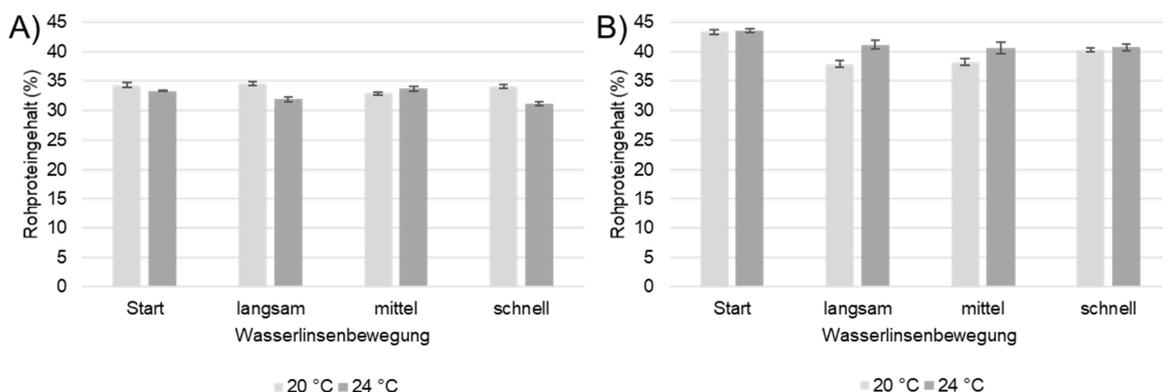
### 3.1.2.3.2 Ergebnisse

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der RGR für beide Arten unter dem Einfluss der Wassertemperatur und der Wasserlinsenbewegung abgebildet. Die mittlere RGR von *L. minor* liegt über alle Varianten in einem Bereich von 0,162 – 0,17 d<sup>-1</sup>. Aufgrund dessen lassen sich keine tendenziellen Unterschiede zwischen den Temperaturen und den Wasserlinsenbewegungen feststellen. Für *W. hyalina* ergeben sich ähnliche mittlere RGRs von 0,14 – 0,175 d<sup>-1</sup>. Tendenziell ist die RGR bei der langsamen Variante bei beiden Temperaturen etwas höher als bei den schnelleren Wasserlinsenbewegungen. Im Vergleich liegt die RGR der 24 °C Variante von *W. hyalina* tendenziell unter derer der 20 °C Variante.



**Abbildung 17: Relative growth rate (RGR,  $d^{-1}$ ) von A: *L. minor* und B: *W. hyalina* bei drei unterschiedlichen Wasserlinsenbewegungen (langsam:  $0,2-1,6 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , mittel:  $1,6-3,0 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , schnell:  $3,0-4,4 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und zwei Temperaturen (20 und 24 °C), Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung**

In Abbildung 18 ist der Rohproteingehalt (%) für beide Arten unter dem Einfluss der Wassertemperatur und der Wasserlinsenbewegung abgebildet. Ähnlich wie bei der RGR liegen die Rohproteingehalte innerhalb einer Art nah beieinander. Für *L. minor* ergeben sich mittlere Rohproteingehalte zwischen 31,1 und 34,6 %. Der Startrohproteingehalt bei dem zweiten Versuch (24 °C) lag 1 % niedriger bei *L. minor* als im ersten Versuch (20 °C). In dem ersten Versuch weist die mittlere Variante den tendenziell niedrigsten Rohproteingehalt auf und in dem zweiten Versuch weist sie den tendenziell höchsten Rohproteingehalt auf (Abbildung 18A). Bei den Ergebnissen von *W. hyalina* zeigen sich bei dem 24 °C Versuch im Vergleich zum 20 °C Versuch tendenzielle Zunahmen in dem Rohproteingehalt. Bei beiden Versuchen ist der Rohproteingehalt im Vergleich zum Startwert tendenziell zurückgegangen. Insgesamt liegen auch bei *W. hyalina* die mittleren Rohproteingehalte mit 37,9 – 43,6 % (Startwert) nah beieinander.

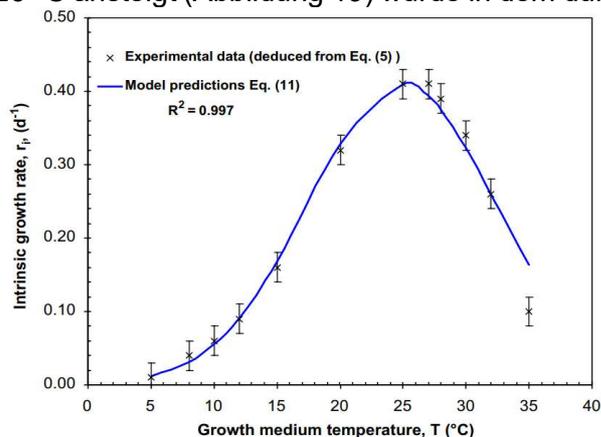


**Abbildung 18: Rohproteingehalt (% bezogen auf die Trockenmasse) von A: *L. minor* und B: *W. hyalina* bei drei unterschiedlichen Wasserlinsenbewegungen (langsam:  $0,2-1,6 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , mittel:  $1,6-3,0 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , schnell:  $3,0-4,4 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) und zwei Temperaturen (20 und 24 °C), Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung**

### 3.1.2.3.3 Diskussion

Bei der Untersuchung des Einflusses zweier Wassertemperaturen und dreier Strömungsgeschwindigkeiten bzw. Wasserlinsenbewegungen auf den Rohproteingehalt und die Wachstumsrate von *L. minor* und *W. hyalina*, konnte kein eindeutiger Effekt beobachtet werden.

Nach IQBAL (1999) kann je nach Art ein Wachstum zwischen 7 und 35 °C verzeichnet werden, wobei das Optimum bei Temperaturen zwischen 25 und 31 °C liegt. Für *L. minor* wird eine maximale intrinsische Wachstumsrate bei einer optimalen Temperatur und Photoperiode von 26 °C bzw. 12 – 13 h beschrieben (LASFAR et al. 2007; VAN DER HEIDE et al. 2006). Da die Wachstumsrate von *L. minor* unter standardisierten Bedingungen bis zu einer Temperatur von 26 °C ansteigt (Abbildung 19) wurde in dem durchgeführten Versuch eine höhere Wachstumsrate während der Kultivierung bei 24 °C im Vergleich zu der 20 °C Kultivierung vermutet.



**Abbildung 19: Intrinsische Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Temperatur (Balken stellen maximalen Fehler dar, abgeleitet aus den Stickstoff und Phosphor-Massenbilanzen) (Lasfar et al. 2007)**

Ein Grund für die unerwarteten Ergebnisse kann eine Nährstoffabnahme im Kreislaufsystem während des Versuchszeitraumes gewesen sein, welche einen stärkeren Effekt gehabt haben könnte als die Temperatur zwischen 20 und 24 °C. Zudem könnte auch der Dichteeffekt den Einfluss der Temperatur während der Versuche überlagert haben. Die Kultur-dichte der Wasserlinsen beeinflusst sowohl ihr Wachstum als auch ihre Zusammensetzung. Durch zu hohe Kulturdichten kommt es zu einer Verringerung der Wachstumsrate (CHAIPRAPAT et al. 2005; DRIEVER et al. 2005; IQBAL 1999; VERMA, SUTHAR 2015; HUTABARAT, INDRADEWA 2020). Da die Kulturdichte mit zunehmender Versuchsdauer angestiegen ist, aber nicht abgeerntet oder konstant gehalten wurde, kann dies das Wachstum ebenfalls beeinflusst haben. Auch für den Rohproteingehalt lässt sich kein eindeutiger Effekt von der Temperatur erkennen.

Da unter natürlichen Bedingungen Wasserlinsen überwiegend auf stehenden oder fast ruhenden Gewässern vorkommen und empfindlich auf starken Wind oder einen erhöhten Wasserstrom reagieren, wurde zu Versuchsbeginn ein negativer Effekt durch hohe Wasserlinsenbewegungen erwartet. Unter natürlichen Bedingungen werden Wasserlinsen durch starken Wind

an das Ufer des Gewässers geblasen und sterben dort zum Teil ab. Sie können höheren Wasserströmungen nur standhalten, wenn sie durch andere Pflanzen, wie zum Beispiel *Eichhornia* oder *Phragmites*, geschützt werden (IQBAL 1999). In der vorliegenden Untersuchung konnte kein eindeutiger Trend zwischen den Wasserlinsenbewegungen festgestellt werden. HUTABARAT, INDRADEWA (2020) konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls keinen Einfluss der überprüften Wasserdurchflüsse auf das Wachstum und die Qualität der Wasserlinsen ermitteln. Durch eigene Beobachtungen, während der Kultivierung der Wasserlinsen im großen hydroponischen Kultivierungssystem (Abbildung 21) zur Biomasseproduktion, konnten negative Auswirkungen durch zu hohe Durchflussraten festgestellt werden. Wie zuvor für den Parameter Temperatur beschrieben, kann der Nährstoff- und Dichteffekt auch den Parameter Wasserlinsenbewegung beeinflusst haben und einen stärkeren Einfluss auf die untersuchten Faktoren gehabt haben, als die Wasserlinsenbewegung. Zudem konnte der Faktor Wasserlinsenbewegung methodisch schwer umgesetzt werden, da die Wasserlinsenbewegung mit zunehmendem Wachstum der Wasserlinsen abgenommen hat. Aufgrund dessen wurde die Bewegung alle zwei Tage neu eingestellt, wobei diese zum Teil schon stark abgenommen hatte. Wie auch in anderen Untersuchungen konnte mit 37,9 – 43,6 % ein höherer Rohproteingehalt für *W. hyalina* als für *L. minor* mit 31,1 – 34,6 % über alle Varianten hinweg ermittelt werden (PETERSEN et al. 2021; APPENROTH et al. 2017). Insgesamt ist es eine Herausforderung, alle Einflussfaktoren bei der Versuchsdurchführung in nicht vollständig standardisierten, hydroponischen Kreislaufsystemen konstant zu halten.

### **3.1.3 Entwicklung und Inbetriebnahme des hydroponischen Kultivierungssystems**

#### **3.1.3.1 Wasserlinsenproduktion in Bramsche**

Zur Produktion der für die Verdaulichkeitsversuche notwendigen Wasserlinsenbiomasse wurde ein Produktionsauftrag an die Firma Aqua-Light GmbH in Bramsche vergeben, da dort bereits ein Kultivierungssystem vorhanden war, welches für die Wasserlinsenkultivierung genutzt werden konnte. Dieses vertikale System besteht aus neun Produktionsebenen (ca. 2,00 x 1,40 x 0,10 m) und einem Nährlösungsreservoir (ca. 2,00 x 1,40 x 0,40 m). Somit stehen insgesamt ca. 25,2 m<sup>2</sup> Produktionsfläche zur Verfügung. Das System ist so aufgebaut, dass zwischen den Ebenen ein Wasseraustausch, jedoch im Regelbetrieb kein Biomasseaustausch stattfindet. Die Arbeitsgruppe an der Hochschule Osnabrück lieferte die Startbiomasse, Nährstoffe, Teile der Technik, Arbeitskraft und Know-how. Kernstück der Technik war die Regelung der Nährstoffkonzentration in der Nährlösung auf Basis des EC-Wertes mit der zugehörigen Dosiereinheit für die Stammlösungen. Aqua-Light stellte das System und weitere Technikkomponenten, wie Pumpen, Beleuchtung und die Stromversorgung zur Verfügung. Die Produktion begann im Februar 2020.

Zu Beginn musste die Startbiomasse vermehrt werden, damit sämtliche Ebenen mit Wasserlinsen bedeckt waren. Fünf Ebenen sollten mit *L. minor* und vier Ebenen mit *W. hyalina* bestückt werden. Während sich *L. minor* gut vermehrte, konnte bei *W. hyalina* schon während der Startphase kaum Wachstum dokumentiert werden. Dieser Zustand verbesserte sich auch durch weitere Nährstoffzugabe, veränderte Strahlungsbedingungen oder Temperaturen nicht. Daher wurde beschlossen die Produktion ausschließlich mit *L. minor* fortzusetzen. Die gemeinsame Nutzung eines Kultursystems mit *L. minor* scheint sich negativ auf das Wachstum von *W. hyalina* auszuwirken, da diese Art in Reinkultur durchaus gute Vermehrungsraten erzielt.

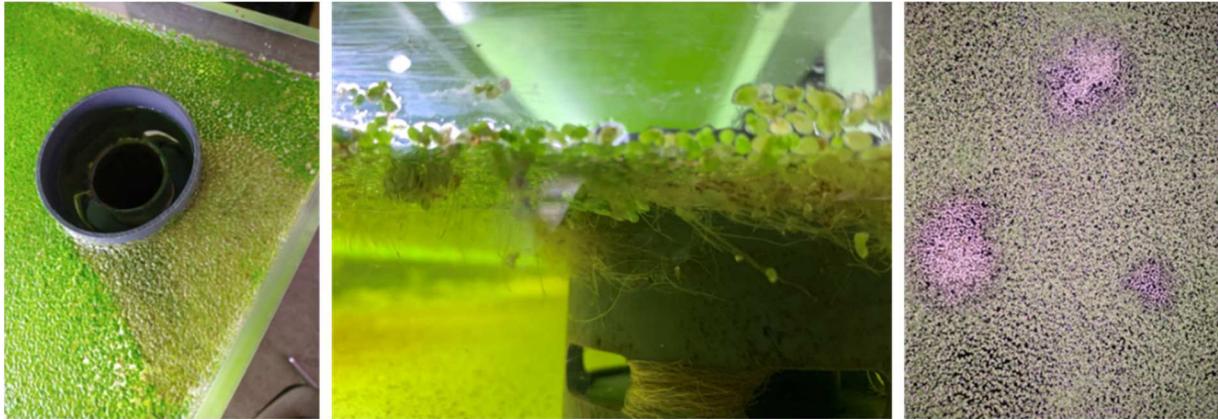
### **3.1.3.2 Inbetriebnahme des hydroponischen Wasserlinsenkultivierungssystems am Standort Haste**

Kurz nachdem die gesamte Produktionsfläche mit *L. minor* bedeckt war und die erste Ernte erfolgte, begannen im März 2020 die Einschränkungen im Zuge der COVID-19-Pandemie. Folglich konnte das System mehrere Wochen nicht adäquat betreut werden. Aufgrund dieser Situation wurde beschlossen, das System zu erwerben, am Standort der Fakultät für Agrarwissenschaften und Landschaftsarchitektur der Hochschule Osnabrück in Haste aufzubauen und selbst zu betreiben. Dadurch konnte eine kontinuierliche Betreuung des Systems sichergestellt werden. Der Aufbau und die Inbetriebnahme am Campus Haste fanden Anfang Juli 2020 statt. Das System wurde weiterhin nur mit der Art *L. minor* betrieben. Mit Hilfe des Labors der Hochschule fanden regelmäßige Untersuchungen in Form von Schnelltests auf den Gehalt verschiedener Nährstoffe in der Nährlösung statt, damit eine gezielte Nachdüngung vorgenommen werden konnte. Nach etwa zwei Wochen konnte die erste Ernte erfolgen.

### **3.1.3.3 Pilzbefall mit dem Krankheitserreger *Pythium myriotylum***

Anfang August 2020 wurde ein Befall der Wasserlinsenart *L. minor* in Form von kreisförmigen Aufhellungen festgestellt. Eine erhöhte Konzentration dieser Aufhellungen konnte in den ruhigen Bereichen der Becken, mit weniger Wasserbewegung, festgestellt werden (Abbildung 20). Zur schnellen Identifikation des Erregers wurden verschiedene Proben zum Pflanzenschutzamt geschickt. Nach einer Sequenzierung stellte sich heraus, dass es sich um den Pilz *Pythium myriotylum* handelte, ein feuchtigkeitsliebender Sporenbildner. Der genaue Eintragsweg konnte nicht eindeutig identifiziert werden, möglich ist eine Kontamination über Staub, Hände, Materialien oder Insekten. Das gesamte System inklusive aller Einzelteile wurde geleert, gesäubert und desinfiziert. In enger Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Brand vom Pflanzenschutzamt Niedersachsen wurde der erste Bericht über *P. myriotylum* an Wasserlinsen in Deutschland erarbeitet (BRAND et al. 2021). Nach einigen Gegenmaßnahmen und Modifizierungen

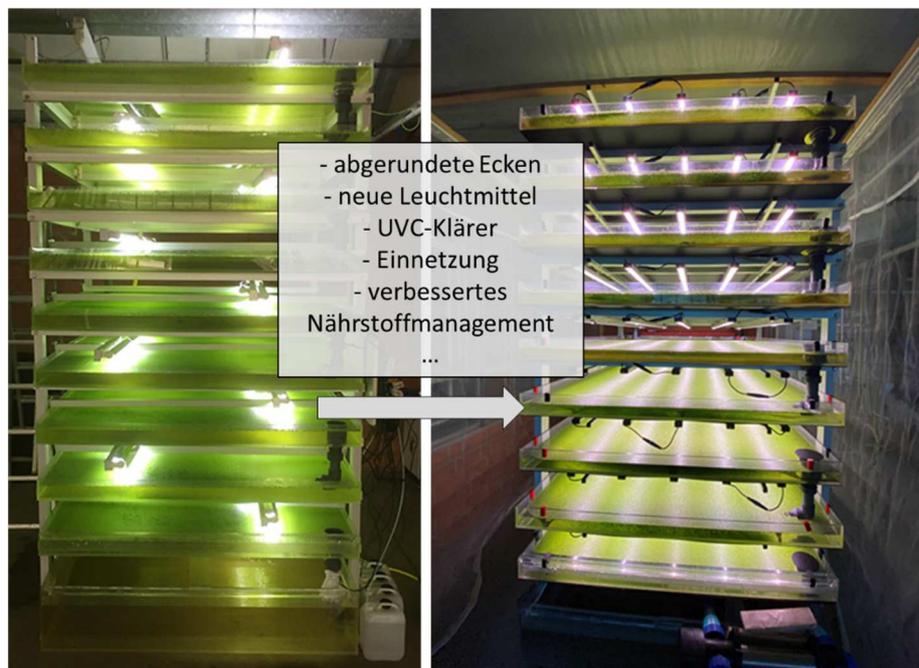
des Kultivierungssystems wurde es wieder in Betrieb genommen. Seitdem konnte kein weiterer Befall von *L. minor* mit dem Krankheitserreger *Pythium myriotylum* festgestellt werden.



**Abbildung 20: Pilzbefall der Wasserlinsenart *L. minor* mit dem Erreger *Pythium myriotylum* in dem hydroponischen Kultivierungssystem am Standort Haste**

#### **3.1.3.4 Aufbau einer stabilen Kultivierung und Modifizierung des hydroponischen Kultivierungssystems**

Bei der ersten Inbetriebnahme des Systems am Standort Haste im Juli 2020 diente dieses direkt für die großflächige Produktion der Wasserlinsenbiomasse (Abbildung 21, links). Für die neue Inbetriebnahme im März 2021 wurde nach dem Pilzbefall (siehe 3.1.3.3) das gesamte System modifiziert (Abbildung 21, rechts). Dies sollte neben der Unterdrückung des Pilzes auch der Standardisierung der Produktion dienen und zukünftige Versuche erleichtern.



**Abbildung 21: Inbetriebnahme (links) und Optimierung des vertikalen hydroponischen Produktionssystems für Wasserlinsen (rechts) am Standort Haste**

Um einem weiteren Pilzbefall vorzubeugen wurde die Kultivierungstemperatur auf 21 °C herabgesetzt. Zudem wurden die vier Ecken einer jeden Ebene durch herausnehmbare Stücke abgerundet. Auf diese Weise wurden mögliche Todzonen im Becken vermieden. Des Weiteren konnte durch eine Einnetzung mit einem Insektenschutznetz das gesamte System vor dem Eindringen von Insekten und aufwirbelndem Staub geschützt werden.

Da es sich um ein geschlossenes System handelt und die Nährlösung nur bei durchgeführten Wasserwechseln ausgetauscht wird, muss das auftretende Algenwachstum in dem System kontrolliert und unterdrückt werden. Hierfür wurde jeweils ein UVC-Klärer am Zulauf und einer am Ablauf des Systems installiert. Zudem erfolgte eine regelmäßige Reinigung des Systems mit integriertem Wasserwechsel. Das Algenwachstum kann zusätzlich durch die Anbringung schwarzer Platten auf der Unterseite der Becken, durch die ein Lichteintrag von der darunterliegenden Ebene vermieden wird, eingedämmt werden. Um gelöste Schwebstoffe und Biofilme aus dem System herauszufiltern, wurde zusätzlich zu den UVC-Klächern ein Siebfilter mit automatischer Rückspülung vor dem Zulauf installiert.

Die bereits installierte BlueLab Steuerung für die Nährstoffdosierung nach EC-Wert wird weiterhin genutzt, allerdings wurde die Nährlösung auf Basis der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Versuche angepasst und die Ammoniumdosierung optimiert. Für eine zentrale Datengenerierung und Speicherung wurde ein Steuerungscomputer der Firma Cultinova installiert. Mithilfe des Datencomputers können die nachträglich installierten LEDs der Firma Sanlight (FLEX-

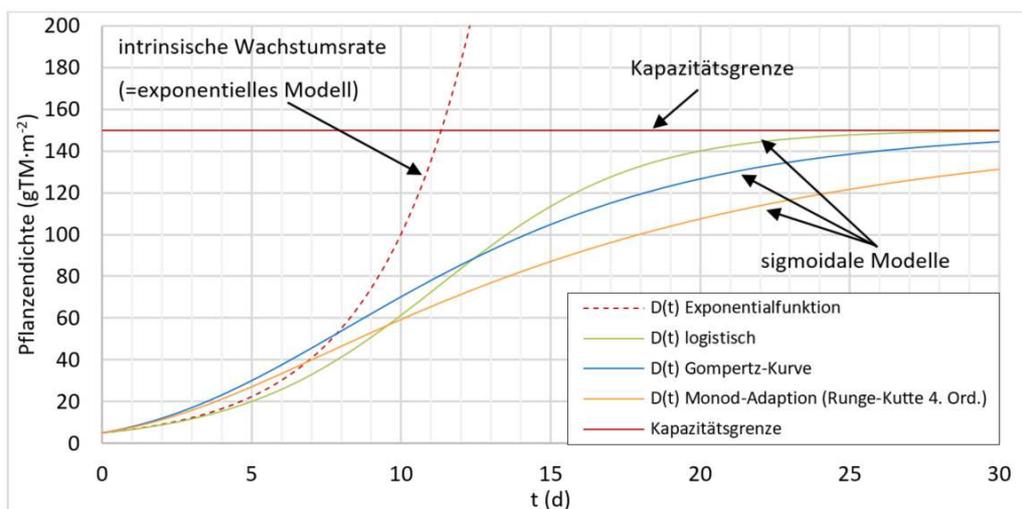
PRO 12 | S4) gesteuert werden. Die neue Beleuchtung mit fünf LEDs pro Ebene ermöglicht, trotz der geringen Abstände, eine optimale Ausleuchtung der Ebenen. Zusätzlich sind die Lampen dimmbar und die Lichtintensität kann, je nach Kultivierungs- und Versuchsziel, angepasst werden. Jede Ebene kann einzeln in einem Intensitätsbereich von 0 bis  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  eingestellt werden.

Für eine regelmäßige Überwachung und Kontrolle des Systems wurde eine Webcam und eine Signalleuchte installiert. Ein Überlauf und verschiedene Ventile verhindern ein unerwünschtes Leer- bzw. Überlaufen des Systems. Durch verschiedene Wasseranschlüsse kann je nach Versuchs- und Kultivierungsbedingungen die Zufuhr variiert werden.

Mittlerweile läuft das System seit März 2021 ununterbrochen und es konnte eine Gesamterntemenge von rund 6 kg Trockenmasse ( $\cong$  ca. 100 kg Frischmasse, Annahme: 6 % TM-Gehalt) für den Fütterungsversuch Ende letzten Jahres produziert werden.

### 3.1.3.5 Versuch zum Einfluss der Lichtintensität auf die systemspezifische Kapazitätsgrenze des hydroponischen Kultivierungssystems

Zur Auslegung einer ertragsorientierten Prozessführung der Wasserlinsenernte wurden im Rahmen eines Forschungs- und Entwicklungsprojektes verschiedene, in der Literatur gegebene Wachstumsmodelle diskutiert. Hierbei wurden sigmoidale Wachstumsfunktionen herangezogen, die es gegenüber einer exponentiellen Betrachtung ermöglichen, die Wachstumsdynamik als Funktion aus einer intrinsischen Wachstumsrate und einer systemspezifischen Kapazitätsgrenze wiederzugeben (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Funktionen verschiedener Wachstumsmodelle (MONETTE et al. 2006; DRIEVER et al. 2005; GOMPERTZ 1825)**

Dadurch lässt sich die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit der Pflanzen von der Pflanzendichte, die vorrangig durch gegenseitige Beschattung bedingt wird, mathematisch beschreiben. Hieraus konnten im Weiteren Berechnungsgrundlagen zur Auslegung von Ernteprozessen entwickelt werden, die es ermöglichen, bei gegebener Erntefrequenz, die optimale Erntemenge, sowie die Pflanzendichte vor und nach der Ernte abzuschätzen. Zudem konnte so die Abhängigkeit des Flächenertrags von der Erntefrequenz beschrieben werden. Um die diskutierten Wachstumsmodelle anhand realer Daten zu validieren und um den Einfluss der Lichtintensität auf die systemspezifische Kapazitätsgrenze näher beschreiben zu können, wurde dieser Zusammenhang im Rahmen einer dem Forschungs- und Entwicklungsprojekt nachgelagerten Masterarbeit in einem Wachstumsversuch näher untersucht.

Hierfür wurden Wasserlinsen der Art *Lemna minor* in einem zweifaktoriellen Versuchsaufbau unter vier verschiedenen Beleuchtungsintensitäten mit sechs verschiedenen Pflanzendichten in jeweils fünffacher Wiederholung für sieben Tage kultiviert. Der Versuch fand in der bereits zuvor beschriebenen entwickelten Pilotanlage für in IVF-Anbau von Wasserlinsen statt. Die einzelnen Varianten und Wiederholungen wurden mithilfe von Rohrzuschnitten voneinander getrennt. Durch den Aufbau des hydroponischen Kreislaufsystems wurden an jeder Stelle des Kultursystems gleiche Nährstoff-, Temperatur und pH-Bedingungen erzeugt. Die Auswertung des Versuchs dauert zum aktuellen Zeitpunkt noch an, jedoch lassen erste Ergebnisse auf einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Lichtintensität und der Kapazitätsgrenze schließen, welcher in dieser Form bislang nicht näher untersucht wurde. Die erhobenen Ergebnisse können im Anschluss der Optimierung der Erntezeitpunkte, der Einstellung des Lichtes und der anfänglichen Biomassendichte dienen.

### **3.1.4 Versuch zum Einsatz der Gölledünnphase**

Ziel des Versuches war es, einen möglichen Einsatz der Dünngülle bei der Kultivierung der Wasserlinsenarten *Lemna minor* und *Wolffiella hyalina* anhand des Wachstums und des Proteingehaltes zu überprüfen. Neben dem standardmäßig eingesetzten N-Medium, wird eine verdünnte Sauendünngülle und eine Variante mit aufgedüngter Sauengülle untersucht.

#### **3.1.4.1 Material und Methoden**

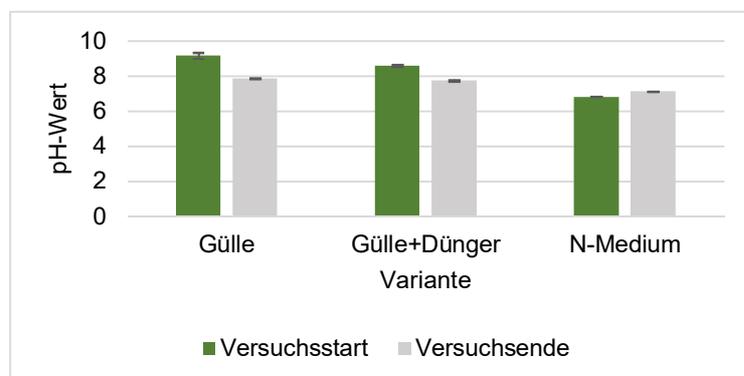
Der Versuch zum Einsatz der Gölledünnphase teilte sich für beide Wasserlinsenarten (*L. minor* und *W. hyalina*) auf jeweils zwölf Becken auf. Für jede der drei Nährlösungsvarianten wurden vier Wiederholungen durchgeführt. Die Dünngülle wurde vom Agrarunternehmen Bernd Büsing zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um Sauengülle, die mit einer Dekanterzentrifuge separiert wurde. Zur Reduzierung der Keimbelastung wurde die Dünngülle vier Stunden in einem Vertikallaborautoklaven der Firma Tuttnauer (Modell 5075 ELV) autoklaviert.

Die Analyse der VDLUFA der einzelnen Nährstoffgehalte ist in Tabelle 8 dargestellt. Die Wasserlinsen wurden für vier Tage in der jeweiligen Nährstoffvariante vorkultiviert um eine mögliche Legphase zu vermeiden. In einem ersten Schritt wurde für die Variante mit der Dünngülle ca. 188 ml Dünngülle (Tabelle 8, links) in jedes der vier Becken gegeben. Für die Variante Dünngülle mit Mineraldüngern wurden 188 ml Dünngülle und zusätzlich mineralische Dünger hinzugegeben, um die gleichen Nährstoffgehalte wie des verdünnten N-Mediums zu erreichen. Für die Variante mit dem N-Medium wurden 46,13 ml jedes Nährstoffs (Tabelle 8, rechts) in jeweils weitere vier Becken gegeben. Alle Becken wurden mit Leitungswasser auf 18,48 l aufgefüllt. In jedes Becken wurden bei dem Versuch mit *Lemna minor* 9,33 g der vorkultivierten Wasserlinsenfrischmasse und bei dem Versuch mit *Wolffiella hyalina* 7 g eingesetzt. Sowohl zum Versuchsbeginn als auch zum Versuchsende, nach einwöchiger Kultivierung, wurden Proben der Wasserlinsen für die Protein- und Nährstoffbestimmung entnommen und bei 60 °C für vier Tage getrocknet. Zudem wurde jeweils eine Nährlösungsprobe zum Versuchsstart und -ende aus jedem Becken gezogen.

**Tabelle 8: Nährstoffzusammensetzung (mg·l<sup>-1</sup>) der Sauen Dünngülle (links) und der Stammlösung des modifizierten N-Mediums (rechts)**

Dünngülle (Schwein)		Stammlösung modifiziertes N-Medium	
Nährstoffe	mg·l <sup>-1</sup>	Nährstoffe	mg·l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> -N	1820	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	106,68
Gesamt-Stickstoff (N)	3470	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	35
CaCl <sub>2</sub> -löslich	1820	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	95
Nitrat-Stickstoff (NO <sub>3</sub> - N), CaCl <sub>2</sub> -löslich	<2	K <sup>+</sup>	354,26
verfügbarer Stickstoff	1820	Mg <sup>2+</sup>	31,8
Phosphor(P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	620	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	311,248
Kalium (K <sub>2</sub> O)	2830	Ca <sup>+</sup>	89,5
Calcium (CaO)	1370	Cl <sup>-</sup>	120,75
Magnesium (MgO)	260	Fe <sup>3+</sup>	1,412
Natrium (Na <sub>2</sub> O)	910	BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	0,074
Gesamt-Schwefel (S)	410	Mn <sup>2+</sup>	0,715
Kupfer (Cu)	0,0189	Na <sup>+</sup>	17,4
Zink (Zn)	0,059		
Bor (B)	0,0017		
Mangan (Mn)	0,0203		
Eisen (Fe)	0,0827		
Chlorid (Cl <sup>-</sup> )	0,9386		

Als Leuchtmittel wurden LEDs der Serie S4W der Firma Sanlight eingesetzt, welche ein für das Pflanzenwachstum geeignetes Lichtspektrum abbilden, die Lichtintensität betrug 350 µmol·m<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>. Die durchschnittliche Lufttemperatur belief sich während des Versuchszeitraumes von *L. minor* auf 18,34±1,37 °C und die Wassertemperatur auf 18,06±0,92 °C. Über den Versuchszeitraum von *W. hyalina* wurde eine Lufttemperatur von 20,29±1,32 °C und eine



**Abbildung 23: pH-Wert der unterschiedlichen Nährlösungsvarianten zum Versuchsstart und – ende am Beispiel von *W. hyalina***

Wassertemperatur von 19,75±0,728 °C gemessen. Zur Kontrolle wurde der pH-Wert sowohl zum Versuchsstart als auch zum Versuchsende erfasst. In Abbildung 23 sind die pH-Werte aller drei Nährlösungsvarianten beispielhaft für *W. hyalina* abgebildet. Zum Versuchsstart konnte ein mittlerer Gehalt von 9,2 für die Gülle-

variante gemessen werden, welcher während des Versuches auf 7,8 abgesunken ist. Für die Gülle+Dünger-Variante konnte eine Abnahme von 8,6 auf 7,7 dokumentiert werden. Der pH-Wert des N-Mediums ist während des Versuchszeitraumes von 6,8 auf 7,1 angestiegen. Für den Versuch von *L. minor* hat sich ein sehr ähnlicher Verlauf abgezeichnet.

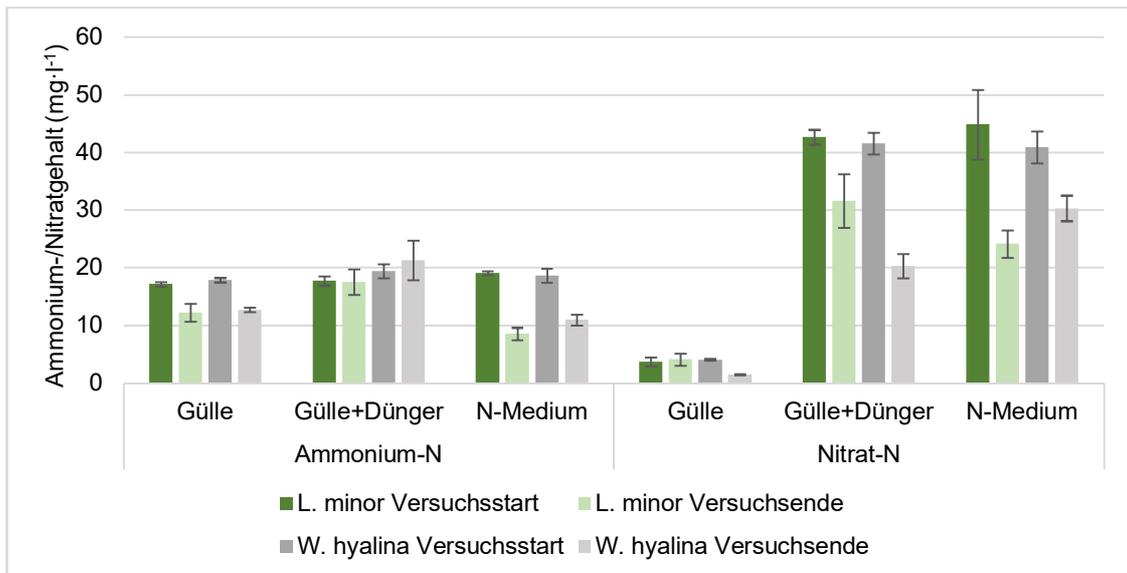
Im Anschluss an die Kultivierung erfolgte die Bestimmung der Nährstoffe in der Nährlösung (vergleiche Punkt 3.1.2.1.1) und in den getrockneten Wasserlinsen der einzelnen Varianten. Für die Bestimmung der Nährstoffe in den Wasserlinsen wurde der mikrowellenbeheizte Druckaufschluss angelehnt an die DIN EN 15621:2012-04 durchgeführt. Dieser dient dazu, Elemente aus den Wasserlinsen freizusetzen und in Lösung zu bringen. In der Lösung wurden die Gehalte der Mengen- und Spurenelemente mit der Plasmaemissionsspektrometrie (ICP-OES) bestimmt (DIN EN ISO 11885:2009-09).

Die Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse, sowie die anschließende Analyse des Rohproteingehaltes erfolgte nach dem in Abschnitt 3.1.2.1.1 beschriebenen Schema.

#### **3.1.4.2 Ergebnisse**

Die größte tendenzielle Veränderung der Nährstoffkonzentrationen lässt sich zwischen den Nährlösungsvarianten bei der Betrachtung des Nitrat- und Ammoniumgehaltes erkennen. Wie in Abbildung 24 dargestellt ist, können sowohl zwischen den unterschiedlichen Nährlösungsvarianten als auch zum Versuchsstart und -ende tendenzielle Unterschiede im Nitrat- und Ammoniumgehalt festgestellt werden. Die Ammoniumstartgehalte liegen bei allen drei Varianten nah beieinander, wohingegen die Nitratstartgehalte bei der Güllevariante tendenziell unter denen der mit mineralischen Nährstoffen versetzten Varianten liegen. Bei beiden Wasserlinsenarten ist eine tendenzielle Ammoniumabnahme bei den Varianten Gülle und N-Medium zu erkennen, innerhalb der Gülle+Dünger-Variante ist keine tendenzielle Abnahme über die einwöchige Kultivierung zu erkennen. In der Gülle+Dünger- und der N-Medium-Variante sind tendenzielle Abnahmen im Nitratgehalt über den Versuchszeitraum erkennbar. Bei der Variante Gülle ist hingegen nur eine tendenzielle Abnahme bei *W. hyalina* zu verzeichnen.

Die weitere Analyse der Nährlösung ergab tendenziell geringere Natriumgehalte im N-Medium im Vergleich zu den Güllevarianten. Zudem können tendenziell geringere Gehalte der Nährstoffe Zink, Mangan, Magnesium, Schwefel, Kalium und Phosphor in der Güllevariante im Vergleich zu den anderen beiden Varianten (mit mineralischen Düngern versetzt) festgestellt werden.



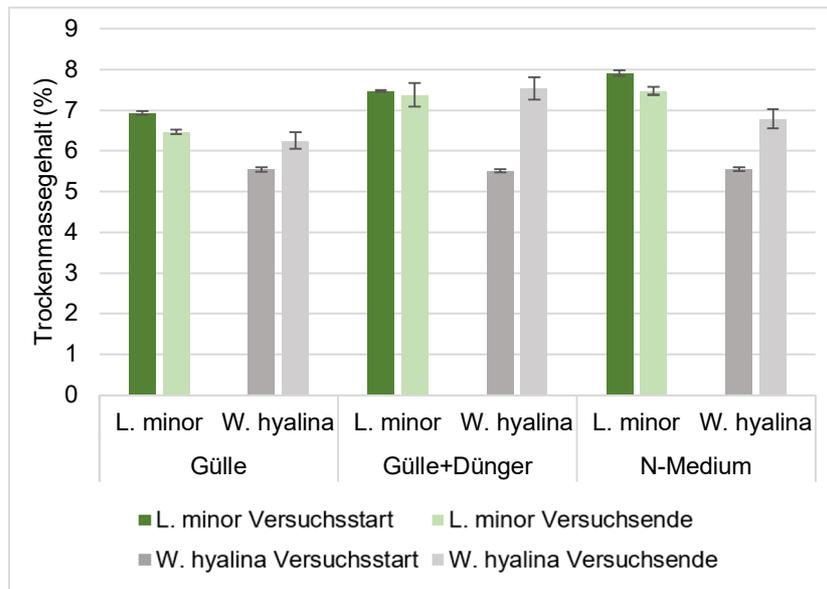
**Abbildung 24: Ammonium-N- bzw. Nitrat-N-Gehalte (mg·l<sup>-1</sup>) der unterschiedlichen Nährlösungen für die beiden Wasserlinsenarten *L. minor* und *W. hyalina* zum Versuchsstart und nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte±SD, n=4)**

In Tabelle 9 ist das Start Ammonium-Nitrat-Verhältnis für alle drei Nährlösungsvarianten dargestellt. Es ist erkennbar, dass in der Güllevariante das Verhältnis einen deutlich höheren Ammoniumgehalt widerspiegelt. Bei den beiden mit mineralischen Düngern hergestellten Varianten ist das Verhältnis hingegen zum Nitrat verschoben.

**Tabelle 9: Ammonium-Nitrat-Verhältnis innerhalb der einzelnen Nährlösungsvarianten für die Wasserlinsenarten *L. minor* und *W. hyalina* zum Versuchsstart**

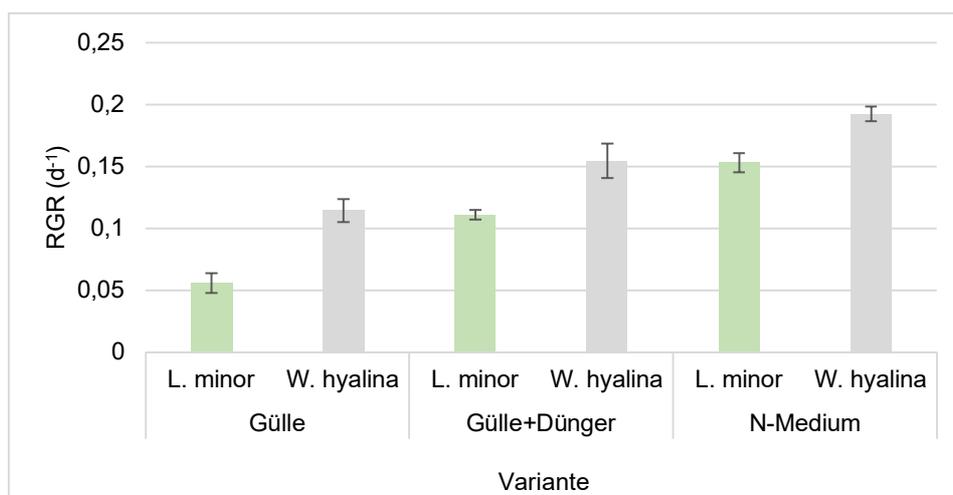
	Ammonium-Nitrat-Verhältnis	
	<i>L. minor</i>	<i>W. hyalina</i>
Gülle	4,7 : 1	4,6 : 1
Gülle+Dünger	1 : 2,4	1 : 2,1
N-Medium	1 : 2,3	1 : 2,2

Abbildung 25 zeigt die Trockenmassegehalte der beiden Wasserlinsenarten auf den verschiedenen Nährlösungen zum Versuchsstart und nach einwöchiger Kultivierung. Der Trockenmassegehalt von *L. minor* ist mit zunehmendem Mineraldüngeranteil in der Nährlösung tendenziell angestiegen. Der Start-Trockenmassegehalt unterscheidet sich bei der Art *L. minor* kaum zu dem Endgehalt, wobei eine tendenzielle Abnahme während des Versuchszeitraumes erkennbar ist. *W. hyalina* weist im Vergleich zu *L. minor* tendenziell geringere Trockenmassegehalte zum Versuchsstart auf. Diese steigen während des Versuchszeitraumes in allen drei Varianten tendenziell an und nähern sich zum Versuchsende den Gehalten von *L. minor*.



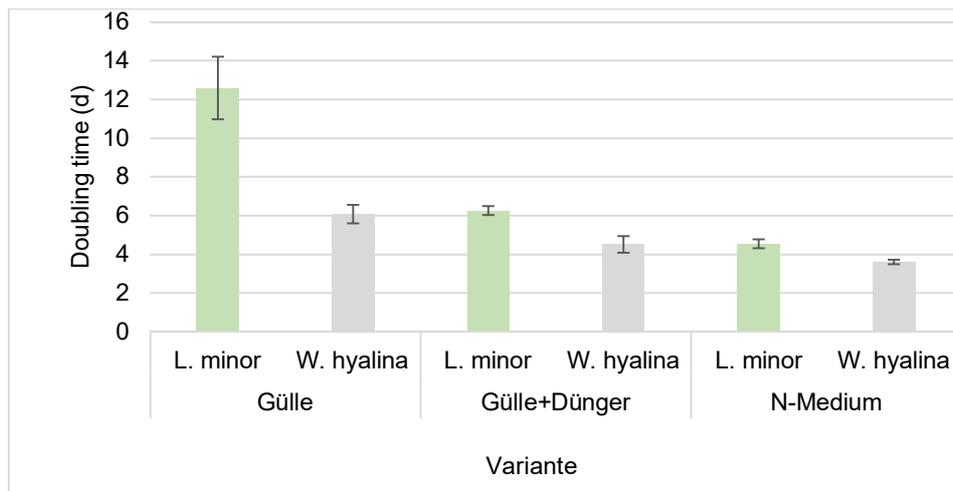
**Abbildung 25: Trockenmassegehalt (%) der Wasserlinsenarten *L. minor* und *W. hyalina* auf den unterschiedlichen Nährlösungen zum Versuchsstart und nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte $\pm$ SD, n=4)**

Auf Basis der Daten der Trockenmasse wurde für den einwöchigen Versuchszeitraum die Wachstumsrate und die Verdoppelungszeit (doubling time, DT) berechnet. Die Ergebnisse sind für beide Arten auf den unterschiedlichen Nährlösungen in Abbildung 26 und Abbildung 27 zu sehen. Es zeigt sich ein deutlicher Trend in der Zunahme der Wachstumsrate mit steigendem Anteil an mineralischen Düngern und der gleichzeitigen Abnahme an Dünngülle in der Nährlösung ab. Die Wachstumsraten von *W. hyalina* liegen mit maximal  $0,19 \pm 0,006 \text{ d}^{-1}$  tendenziell über denen von *L. minor* mit maximal  $0,15 \pm 0,008 \text{ d}^{-1}$  (Abbildung 26).



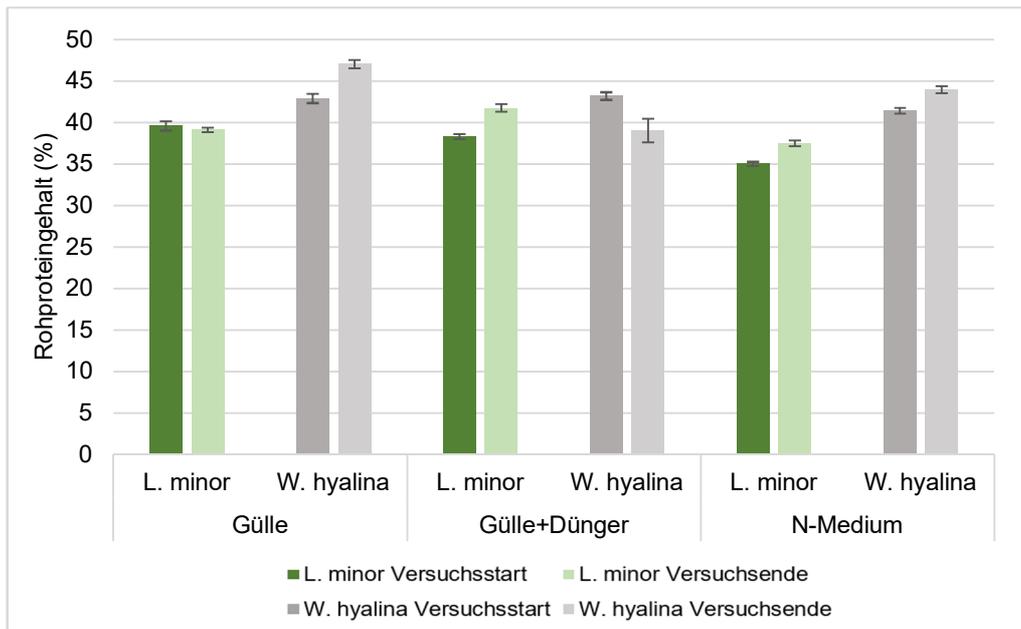
**Abbildung 26: Relative growth rate (RGR,  $\text{d}^{-1}$ ) der Wasserlinsenarten *L. minor* und *W. hyalina* auf den unterschiedlichen Nährlösungen nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte $\pm$ SD, n=4)**

Die Verdopplungszeit der beiden Arten, auf den unterschiedlichen Nährlösungen, verhält sich umgekehrt zur RGR. Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Trend in der Abnahme der DT mit steigendem Anteil an mineralischen Düngern und der gleichzeitigen Abnahme an Düngergülle in der Nährlösung (Abbildung 27). Die tendenziell schnellsten Verdopplungszeiten können für beide Arten mit durchschnittlich  $3,6 \pm 0,11$  Tagen für *W. hyalina* und  $4,5 \pm 0,229$  Tagen für *L. minor* auf dem N-Medium festgestellt werden. Insgesamt weist *W. hyalina* tendenziell schnellere Verdopplungszeiten auf als *L. minor*.



**Abbildung 27: Verdopplungszeiten (DT, d) der Wasserlinsenarten *L. minor* und *W. hyalina* auf den unterschiedlichen Nährlösungen nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=4)**

In Abbildung 28 sind die prozentualen Rohproteingehalte der beiden Wasserlinsenarten für alle drei Nährlösungsvarianten zum Versuchsstart und nach einwöchiger Kultivierung abgebildet. Für *L. minor* zeigen sich die tendenziell höchsten Rohproteingehalte für die Güllevariante und die mit mineralischen Düngern versetzte Güllevariante. Für *W. hyalina* weist die Güllevariante die tendenziell höchsten Rohproteingehalte auf. Bei der Kultivierung von *L. minor* ist der Rohproteingehalt auf der Güllevariante nach einer Woche tendenziell unverändert und steigt bei den anderen, mit mineralischen Düngern versetzten Varianten tendenziell an. Für die Art *W. hyalina* zeigt sich ein tendenzieller Anstieg des Rohproteingehaltes auf den Varianten Gülle und N-Medium. Auf der Variante Gülle+Dünger kann eine tendenzielle Abnahme während des Versuchszeitraumes beobachtet werden. Die Rohproteingehalte von *W. hyalina* liegen mit durchschnittlich  $47,08 \pm 0,49$  % auf der Güllevariante tendenziell über denen von *L. minor* mit  $41,79 \pm 0,47$  % auf der Gülle+Dünger-Variante.



**Abbildung 28: Rohproteingehalt (% , bezogen auf die TM) der Wasserlinsenarten *L. minor* und *W. hyalina* auf den unterschiedlichen Nährlösungen zum Versuchsstart und nach einwöchiger Kultivierung (Mittelwerte $\pm$ SD, n=4)**

### 3.1.4.3 Diskussion

Mit Hilfe des Versuches wurde ein möglicher Einsatz einer Sauendünggülle bei der Kultivierung der Wasserlinsenarten *L. minor* und *W. hyalina* anhand von Wachstumsparametern und Rohproteingehalten untersucht. Bei der Betrachtung der Wachstumsparameter (RGR und DT) kann ein deutlicher Trend zwischen den verschiedenen Nährlösungen erkannt werden. Die tendenziell höchsten Wachstumsraten und schnellsten Verdopplungszeiten können auf dem Referenzmedium (N-Medium, 50%ig) festgestellt werden. Ein zunehmender Anteil an Dünggülle in der Nährlösung wirkt sich negativ auf das Wachstum aus (Abbildung 26 und Abbildung 27). Die Wachstumsraten von *W. hyalina* liegen mit maximal  $0,19\pm 0,006\text{ d}^{-1}$  tendenziell über denen von *L. minor* mit maximal  $0,15\pm 0,008\text{ d}^{-1}$  (Abbildung 26). ZIEGLER et al. (2015) haben unter sterilen Laborbedingungen bei einer Dauerbelichtung von  $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und der Kultivierung auf einem modifizierten Schenk-Hildebrand-Medium eine noch höhere RGR von  $0,420\pm 0,018\text{ d}^{-1}$  für den selben *L. minor* Klon 9441 herausfinden können. Allerdings wurde hier, anders als in der vor liegenden Arbeit, ein höher konzentriertes Nährmedium eingesetzt, welches wöchentlich erneuert wurde. Für *W. hyalina* 9525 wurde die RGR ebenfalls unter den gleichen Laborbedingungen erfasst. Wie auch in dem vorliegenden Versuch haben die Untersuchungen für *W. hyalina* eine höhere RGR von  $0,519\pm 0,055\text{ d}^{-1}$  im Vergleich zu *L. minor* ergeben (ZIEGLER et al. 2015).

Der negative Einfluss der Sauendünggülle auf das Wachstum der beiden Wasserlinsenarten kann verschiedene Gründe haben. Zum einen sind in der Dünggülle, verglichen mit dem N-Medium, teilweise geringere Gehalte an Spurenelementen vorhanden (Tabelle 8). Zum anderen weist die Gülle einen sehr hohen pH-Wert auf, weshalb die Güllevariante zum Versuchstart einen pH-Wert von 9,2 erreicht, die Gülle+Dünger-Variante einen pH-Wert von 8,6 und die Mineraldüngervariante einen Wert von 6,8. MCLAY (1976) hat ein Optimum des Wachstums bei einem pH-Wert um bzw. unter dem Neutralpunkt sowie eine generelle Abnahme des Wachstums im alkalischen Bereich für Wasserlinsen herausgestellt. Der pH-Wert beeinflusst die Löslichkeit von Phosphat und von bestimmten Spurenelementen (u. a. Zink, Mangan, Eisen) (LANDOLT, KANDELER 1987). Bei pH-Werten um die 9,3 kann Phosphor beispielsweise mit Calcium ausfallen und ist damit nicht mehr pflanzenverfügbar (GWAZE und MWALE 2015). MCLAY (1976) führt an, dass der Einfluss des pH-Wertes auf das Wachstum stark von der jeweiligen Umgebung abhängt. Deswegen ist es schwierig, Toleranzgrenzen für die einzelnen Arten zu bestimmen, da beispielsweise die Verfügbarkeit von Nährstoffen oder die Löslichkeit toxischer Stoffe einen Einfluss auf das Pflanzenwachstum haben können (MCLAY 1976). Aufgrund des hohen Ammoniumgehaltes in den Güllevarianten und des hohen Nitratgehaltes in dem N-Medium nähern sich die durchschnittlichen pH-Werte der unterschiedlichen Nährlösungsvarianten mit 7,1 – 7,8 nach einwöchiger Kultivierung an (Abbildung 23). Neben der Verfügbarkeit von Nährstoffen beeinflusst der pH-Wert das Gleichgewicht von Ammonium zu Ammoniak. Bei höheren Stickstoffkonzentrationen ist der Einfluss höher als bei niedrigen (CAICEDO et al. 2000). Mit einem steigenden pH-Wert der Nährlösung nimmt der  $\text{NH}_4^+$ -Anteil ab und der  $\text{NH}_3$ -Anteil steigt an. Dies führt dazu, dass bei höheren pH-Werten den Pflanzen das bevorzugte Ammonium nur noch in geringen Mengen zur Verfügung steht (GWAZE, MWALE 2015; KÖRNER et al. 2001). Gleichzeitig entsteht mehr freies Ammoniak, welches bei Konzentrationen  $> 100 \text{ mg NH}_3 \cdot \text{l}^{-1}$  eine toxische Wirkung auf die Wasserlinsen hat (LENG et al. 1995).

Entgegengesetzt den Wachstumsparametern zeigt sich bei der Betrachtung des Rohprotein-gehaltes ein positiver Effekt des Gülleeinsatzes. Die tendenziell höchsten Rohproteingehalte können für *W. hyalina* mit  $47,08 \pm 0,49 \%$  auf der Güllevariante festgestellt werden und für *L. minor* mit  $41,79 \pm 0,47 \%$  auf der Gülle+Dünger-Variante. Ein Grund für die erhöhten Rohproteingehalte in den Güllevarianten kann der erhöhte Ammoniumgehalt im Vergleich zum Nitratgehalt sein. Wasserlinsen bevorzugen bei der Stickstoffaufnahme Ammonium anstelle von Nitrat, da Stickstoff in der Ammoniumform direkt in Pflanzenprotein umgewandelt wird, anstatt assimiliert und anschließend reduziert zu werden, wie es bei Nitrat der Fall ist (EL-SHAFI et al. 2007). Auch in früheren Untersuchungen konnte der Rohproteingehalt durch einen höheren Ammoniumgehalt zum Teil gesteigert werden (PETERSEN et al. 2021). Insgesamt weist *W.*

*hyalina* tendenziell höhere Rohproteingehalte auf als *L. minor*. Da dies auch in anderen Untersuchungen festgestellt wurde, scheint dies artspezifisch zu sein (PETERSEN et al. 2021; APPENROTH et al. 2017).

Bei dem durchgeführten Versuch handelt es sich um einen ersten Einsatz der Dünngülle in der Wasserlinsenkultivierung am Standort Haste. Um den Einsatz der Dünngülle zu verbessern, gilt es in Zukunft den pH-Wert der eingehenden Dünngülle zu kontrollieren und ggf. herabzusetzen. Zudem müssen alle wachstumsrelevanten Nährstoffe kontrolliert und ggf. ergänzt werden, ähnlich wie bei der Gülle+Dünger-Variante. Positiv hervorzuheben ist der Einfluss der Dünngülle auf den Rohproteingehalt.

## **3.2 Wasserlinsen als Futtermittel-Alternative zu importierten Sojaextraktionsschrot**

### **3.2.1 Versuche zur In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins**

Ziel der Untersuchung war es, den Einfluss verschiedener Umweltfaktoren während der Wasserlinsenkultivierung auf den Gehalt an fermentlösbarem Protein und damit auch auf deren In-vitro-Verdaulichkeit zu prüfen.

#### **3.2.1.1 Material und Methoden**

Die Untersuchungen zur Lichtintensität/-qualität, zur Temperatur und zu den Strömungsgeschwindigkeiten wurden nach den unter 3.1.2 beschriebenen Methoden durchgeführt. Lediglich die Versuche zur Nährstoffkonzentrationen wurden geringfügig modifiziert. Da in den vorhergehenden Versuchen ein Nitrat-Ammonium-Verhältnis von 75:25 die höchste relative Proteinausbeute bei von *L. minor* und *W. hyalina* erzielte, wurden, abweichend von den vorherigen Untersuchungen (siehe 3.1.2.1), drei unterschiedliche nitratreiche Nährstofflösungen in 10%iger Verdünnung geprüft:

[87,5/12,5] = 87,5 % NO<sub>3</sub>—N und 12,5 % NH<sub>4</sub>+—N

[75/25] = 75 % NO<sub>3</sub>—N und 25 % NH<sub>4</sub>+—N

[62,5/37,5] = 62,5 % NO<sub>3</sub>—N und 37,5 % NH<sub>4</sub>+—N

Die Startbiomasse betrug 20 g für *L. minor* und 15 g für *W. hyalina* bei jeweils 20 Liter Nährlösung. Der Rohproteingehalt wurde mit der Verbrennungsmethode nach Dumas ermittelt (VDLUFÄ Methodenbuch III, Methode 4.1.2, 5). Der Gehalt an fermentlösbarem Rohproteins (fXP) wurde in Anlehnung an die VDLUFÄ Methode III 4.2.1 bestimmt. Die In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins wurde als Quotient aus fermentlösbarem Rohprotein und Rohprotein berechnet.

Die Daten wurden anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse unter Verwendung des Programms SPSS (Version 26.0.0.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) statistisch ausgewertet. Um Unterschiede zwischen den Nährstoffvarianten zu prüfen, wurde der LSD-Test herangezogen.

### 3.2.1.2 Ergebnisse

Änderungen in den Umweltfaktoren Lichtintensität/-qualität, Temperatur und Strömungsgeschwindigkeiten hatten keinen Einfluss auf den Gehalt an fermentlösbarem Rohprotein und auf die In-vitro-Verdaulichkeit. Für die verschiedenen Nährstofflösungen konnte indessen ein signifikanter Effekt auf den Rohproteingehalt in der Trockenmasse ermittelt werden (Tabelle 10). Bei beiden Wasserlinsenarten führte ein Nitrat-N-Ammonium-N-Verhältnis von 62,5:37,5 zu den höchsten Rohproteingehalten. Die niedrigsten Rohproteingehalte wurden für die Nährlösung [87,5/12,5] ermittelt. Auch der Gehalt an fermentlösbarem Rohprotein war für diese Nährlösung sowohl für *L. minor* als auch für *W. Hyalina* am geringsten. Zwischen den Nährlösungen [75/25] und [62,5/37,5] konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Gleiches Bild zeigte sich für die In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins, welche in allen drei Varianten auf einem hohen Niveau lag.

**Tabelle 10: Einfluss von Nährlösungen (10%ige Verdünnung) mit unterschiedlichen Nitrat-Ammonium-Verhältnissen auf den Gehalt an Rohprotein und fermentlösbarem Rohprotein sowie auf die In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins bei *L. minor* und *W. hyalina***

Nährlösung	1	2	3
Nitrat-Ammonium-Verhältnis	[87,5/12,5]	[75/25]	[62,5/37,5]
<b><i>Lemna minor</i></b>			
XP (% TM)	33,86±0,374 <sup>a</sup>	35,46±0,52 <sup>b</sup>	36,60±0,28 <sup>c</sup>
fXP (% TM)	27,08±0,35 <sup>a</sup>	29,52±0,73 <sup>b</sup>	29,75±0,41 <sup>b</sup>
In-vitro-Verdaulichkeit XP (%)	79,97±1,04 <sup>a</sup>	83,27±2,20 <sup>b</sup>	81,29±1,39 <sup>ab</sup>
<b><i>Wolffiella hyalina</i></b>			
XP (% TM)	41,26±0,23 <sup>a</sup>	42,94±0,12 <sup>b</sup>	42,98±0,20 <sup>b</sup>
fXP (% TM)	31,30±0,52 <sup>a</sup>	33,55±0,48 <sup>b</sup>	33,50±0,45 <sup>b</sup>
In-vitro-Verdaulichkeit XP (%)	75,85±0,86 <sup>a</sup>	78,14±1,48 <sup>b</sup>	77,95±1,17 <sup>b</sup>

<sup>abc</sup> innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Varianten (P < 0,001)

### 3.2.1.3 Diskussion

Die Rohproteingehalte sind vergleichbar mit denen im ersten Versuch zum Einfluss des Nitrat-Ammonium-Verhältnisses. Die dort erörterten Diskussionspunkte können somit auf die vorliegenden Ergebnisse übertragen werden (siehe Kapitel 3.1.2.1.3).

Die in diesem Versuch ermittelten In-vitro-Verdaulichkeiten entsprechen dem Niveau früherer Studien. So stellte DEWANJI (1993) beispielsweise für *L. minor* (BEUKELAAR et al. 2019) eine In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins von 77,9 % fest. Andere Autoren dokumentierten mit 62,2 bis 69 % etwas niedrigere Werte (LY, PRESTON 2001, LY et al. 2002). Dabei zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass eine hohe In-vitro-Verdaulichkeit des XP oftmals mit einem hohen XP-Gehalt einhergeht. Dieser Zusammenhang konnte auch in dem vorliegenden Versuch und im Verdaulichkeitsversuch dokumentiert werden (vgl. Kapitel 3.2.3).

Nach RAVINDRAN, BRYDEN (1999) kann die In-vitro- Verdaulichkeit verwendet werden, um Proteinquellen hinsichtlich ihrer Verdaulichkeit zu rangieren. Dieses wird auch durch die Verdaulichkeitsstudie bestätigt, in der die Rangierung der In-vivo-Verdaulichkeit mit der In-vitro-Verdaulichkeit unterschiedlicher Wasserlinsenqualitäten übereinstimmt. Allerdings ist ein Vergleich von Wasserlinsen und anderen Proteinträgern anhand dieses Parameters nur eingeschränkt möglich. Eine Rolle spielt in diesem Zusammenhang der vergleichsweise hohe Anteil an NPN-Verbindungen in den Wasserlinsen (19,3 % des XP), welcher in anderen Proteinträger wie Soja- oder Rapsextraktionsschrot mit 8,5 bzw. 6,5 % NPN im XP deutlich geringer ist (CHANZANAGH et al. 2019). NPN-Verbindungen sind löslich und werden daher bei der Bestimmung des fermentlöslichem XP miteingefasst, können jedoch mit Ausnahme der freien Aminosäuren von Monogastriern nicht für die Bildung von Leistungsprodukten genutzt werden. Der Anteil dieser freien Aminosäuren in Wasserlinsen ist wiederum gering. ZHANG et al. (2018) geben ihn mit 0,16 – 2,45 % des Gesamt-Lysins und mit bis zu 0,25 % des Gesamt-Methionins an.

Abschließend kann mit dieser Untersuchung gezeigt werden, dass die Optimierung des Nitrat-Ammonium-Verhältnisses nicht nur zur einer Erhöhung der Proteingehalte, sondern auch zu einer verbesserten Proteinqualität beitragen kann.

### **3.2.2 Versuche zur qualitätsorientierten Trocknung von Wasserlinsen**

Ziel der Untersuchung war es, verschiedene Vortrocknungsmethoden und Trocknungsverfahren auf zuvor definierte Qualitätsparameter bei Wasserlinsen (*Lemna minor*) zu prüfen und damit einen Beitrag zur qualitätsorientierten Optimierung der Trocknung von Wasserlinsen zu leisten.

#### **3.2.2.1 Material und Methoden**

Insgesamt wurden zwei Versuchsreihen mit verschiedenen Vortrocknungs- und Trocknungsverfahren durchgeführt. Als Vortrocknungsverfahren wurden das Blanchieren und die Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern (PEF, pulsed electric fields) in drei unterschiedlichen Intensitäten (Tabelle 11) geprüft. Die Wirkungsweise besteht darin, entweder durch Hitze (Blanchieren) oder durch elektrische Spannung (PEF) die Zellmembran und auch die Zellwände zu perforieren und so ggf. die Trocknung zu erleichtern. Als Trocknungsmethoden kamen die Konvektions- und Vakuumtrocknung zur Anwendung. Versuchsreihe 1 untersuchte den Einfluss des Blanchierens von Wasserlinsen bei nachfolgender Vakuum- oder Konvektionstrocknung. In Versuchsreihe 2 wurden unterschiedliche Vorbehandlungen (unbehandelt, blanchiert, PEF 1-1, PEF 15-3, PEF 45-3) in Kombination mit beiden Trocknungsmethoden geprüft. Im Versuch 1 wurde die Vortrocknungsbehandlung in vierfacher Wiederholung und im

Versuch 2 in dreifacher Wiederholung geprüft. In beiden Versuchsreihen wurden die Proben nach der Vorbehandlung halbiert und jeweils einer Trocknungsmethode zugeführt.

Für alle Untersuchungen wurden Reinkulturen der Wasserlinsenspezies *Lemna minor* aus dem hochschuleigenen Anbau verwendet. Nach der Ernte wurde zunächst das äußerlich an den Wasserlinsen anhaftende Wasser mit einem Schleudertrockner über eine Dauer von 3 min entfernt (Top Spin Compact Chal-Tec GmbH, Berlin). Anschließend wurden jeweils 200±5 g Pflanzenmaterial zur weiteren Aufbereitung in Nylonstrümpfe gefüllt.

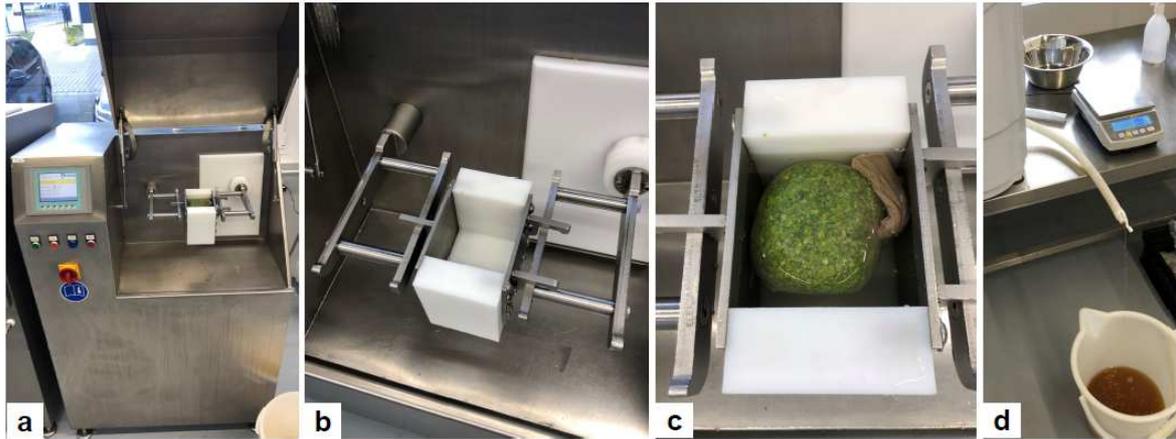
**Tabelle 11: PEF-Intensitäten und zugehörige Geräteparameter**

Bezeichnung	Spezifischer Energieeintrag in $\text{kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$	Feldstärke in $\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$	PEF-Zelle <sup>1</sup>
PEF 1-1	1	1	A
PEF 15-3	15	3	B
PEF 45-3	45	3	B

<sup>1</sup>Abmessung der PEF-Zellen: A = 20 x 30 x 20 cm; B = 14 x 11 x 18 cm (Länge x Breite x Höhe)

Das Blanchieren erfolgte in einem herkömmlichen Wasserkocher. Die vorbereiteten Proben wurden für 1 min in siedendes destilliertes Wasser gegeben und im Anschluss ein weiteres Mal für 3 min geschleudert. Für die PEF-Behandlung wurde eine Versuchsanlage im Labormaßstab (PEFPilot™ Version III, Elea GmbH, Quakenbrück, Deutschland) verwendet, die die notwendige elektrische Spannung von 30 kV für eine Batch-Anwendung lieferte. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 29 dargestellt. Auch bei diesen Proben wurde das äußerlich anhaftende Wasser nach der Behandlung mit einem Schleudertrockner entfernt. Die Frischmasse wurde jeweils vor und nach dem Vortrocknungsverfahren für jede einzelne Probe ermittelt. Vor der anschließenden Trocknung wurden alle Proben in einer Messermühle (Retsch Grindomix GM 200) zerkleinert. Die Konvektionstrocknung wurde in einem Trockenschrank bei 105 °C (U40, Memmert, Schwabach, Deutschland) und vollständig geöffnetem Abluftauslass durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 25±2 g Pflanzenmaterial in Aluminiumtrockenschalen (Ø 8 cm, h = 2,5 cm) eingewogen. Nach 11-stündiger Trocknung wurden die Proben direkt in einen Exsikkator überführt, um auf Raumtemperatur abzukühlen.

Für die Vakuumtrocknung stand ein Gerät des Herstellers Binder (VD 53, E2.1) zur Verfügung. Als Probengefäße wurden Glaspetrischalen (Ø 10 cm; h = 1,5 cm) verwendet. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Oberflächen der Petrischalen und der Aluminiumschalen (Konvektionstrocknung) herzustellen, wurde die Einwaage auf 50±2 g erhöht. Vor der Trocknung wurde der Schrank mit den Proben auf 45 °C vorgewärmt und der Luftdruck auf 1 mbar gesenkt. Die Trocknungszeit betrug 20 h. Nach dem Trocknungsprozess wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung in einem Exsikkator aufbewahrt.



**Abbildung 29: Apparatur und Ablauf der Applikation von gepulsten elektrischen Feldern**  
 (a) PEF-Applikationsgerät mit geöffnetem Deckel, (b) Ansicht auf die Kathode und Anode, sowie die leere kleine Behandlungszelle (Feldstärke  $3 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), (c) mit Wasser und Probe gefüllte Behandlungszelle, (d) Schleudern inkl. Auffangen des Zentrats und anschließende Rückwaage der behandelten Proben

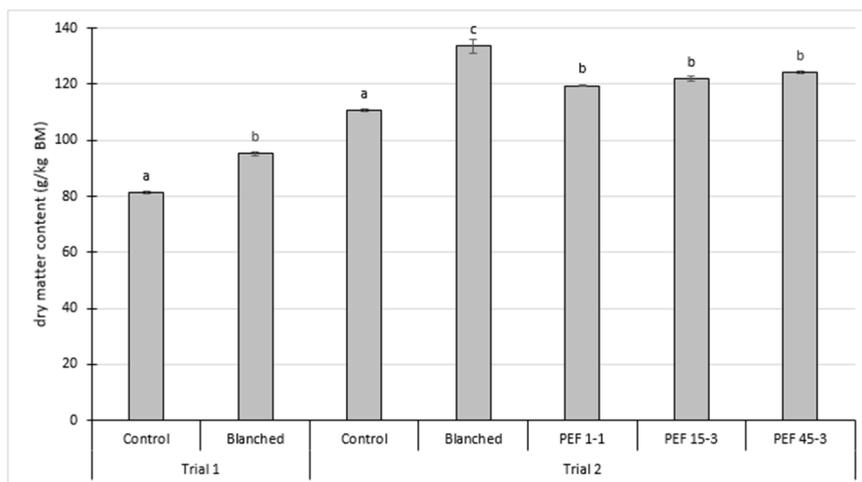
Die Analytik des Probenmaterials erfolgte jeweils nach der Vorbehandlung (Blanchieren, PEF-Behandlung) und im Anschluss an die Trocknung. Da sich während der Trocknung neue feste Strukturen bildeten, mussten die getrockneten, zerkleinerten Wasserlinsen erneut vermahlen werden. Hierfür wurde eine Analysenmühle (Typ A 10, Fa. Janke & Kunkel IKA Labortechnik) verwendet. Die Analyse des Pflanzenmaterials erfolgte entsprechend den amtlichen VDLUFA-Methoden (VDLUFA 2012c): Trockenmassegehalt (TM) nach Methode III 3.1; Rohproteingehalte (XP) nach Methode III 4.1.1 und Gehalt an fermentlöslichen Rohproteins (fXP) nach Methode III 4.2.1..

Die Daten wurden mit der Prozedur Mixed in SPSS (Version 26.0.0.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) statistisch analysiert. Die Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt. Für multiple Mittelwertvergleiche wurde die Bonferroni-Korrektur angewandt. Um den Einfluss verschiedener Trocknungsverfahren zu prüfen, wurde der LSD-Test herangezogen. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 3.2.2.2 Ergebnisse

Abbildung 30 zeigt die Trockenmassengehalte von *Lemna minor* beider Versuchsreihen nach den unterschiedlichen Vortrocknungsmethoden. Im unbehandelten Probenmaterial variierten die Trockenmassengehalte und lagen bei  $81,4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (Kontrolle 1) bzw.  $110,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (Kontrolle 2). In beiden Versuchsreihen führte das Blanchieren zu einem signifikanten Anstieg der Trockenmasse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der höchste Trockenmassengehalt wurde dabei mit  $133 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  in Versuchsreihe 2 erzielt. Auch die PEF-Behandlung führte zu

einem signifikanten Anstieg der Trockenmassegehalte. Die verschiedenen Energieeinträge zeigten jedoch keinen Unterschied.

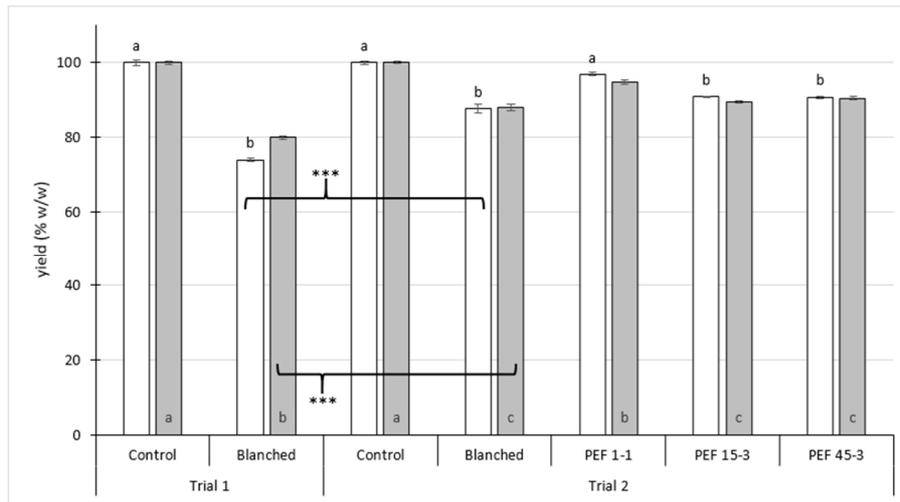


**Abbildung 30: Trockenmassegehalte ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) in der Biomasse (BM) von *Lemna minor* bei verschiedenen Vortrocknungsbehandlungen und in den unbehandelten Kontrollproben der Versuchsreihen 1 und 2**

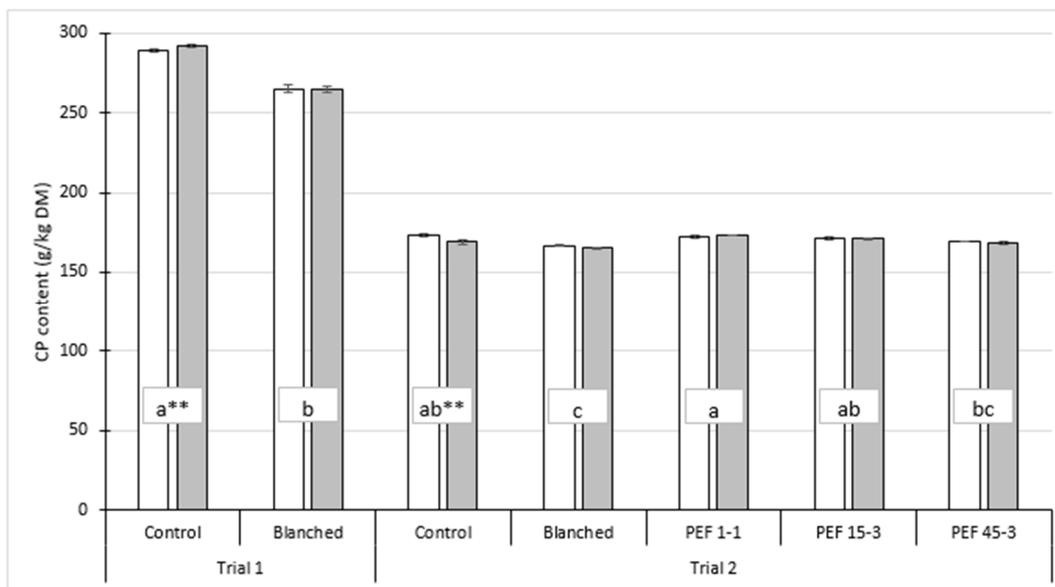
(a,b,c kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Versuchsreihe;  $p < 0,01$  mit Bonferroni-Korrektur)

Alle Vortrocknungsverfahren führten zu einer signifikanten Abnahme der Trockenmasseausbeute (Abbildung 31). Auch die Rohproteinausbeute wurde durch die Vorbehandlung, mit Ausnahme der PEF-1-1-Behandlung, signifikant reduziert. Zwischen den Behandlungen PEF 15-3 und PEF 45-3, die unterschiedliche spezifische Energieeinträge aufwiesen, wurde indessen kein Unterschied in der Ausbeute von Trockenmasse oder Rohprotein festgestellt. Beim Blanchieren unterschieden sich die Ergebnisse zwischen Versuchsreihe 1 und 2 signifikant voneinander. In beiden Versuchen wurden beim Blanchieren die jeweils niedrigsten Werte ermittelt (73,9 bzw. 87,7 % XP und 79,9 bzw. 88,0 % TM; Versuch 1 bzw. Versuch 2).

Analog zu den unterschiedlichen Rohproteingehalten im Ausgangsmaterial beider Versuche (24,8 und 19,1  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Frischmasse) wichen auch die Gehalte in den getrockneten Wasserlinsen ohne Vorbehandlung (Kontrolle 1 bzw. 2) stark voneinander ab (291 und 171  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  TM). Dabei hatte die Trocknungsmethode in beiden Versuchsreihen einen signifikanten Effekt auf den Rohproteingehalt der Kontrollproben. In Versuch 1 wurden bei konvektiver Trocknung signifikant höhere Rohproteingehalte im Probenmaterial ermittelt. Im Versuch 2 wurden gegensätzliche Ergebnisse erzielt, und die Vakuumtrocknung bei 40 °C führte zu höheren Werten. Bei allen anderen Proben mit unterschiedlicher Vorbehandlung hatte die Trocknungsmethode keinen Einfluss auf den Rohproteinhalt. In beiden Versuchsreihen reduzierte das Blanchieren die Rohproteingehalte signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 32).



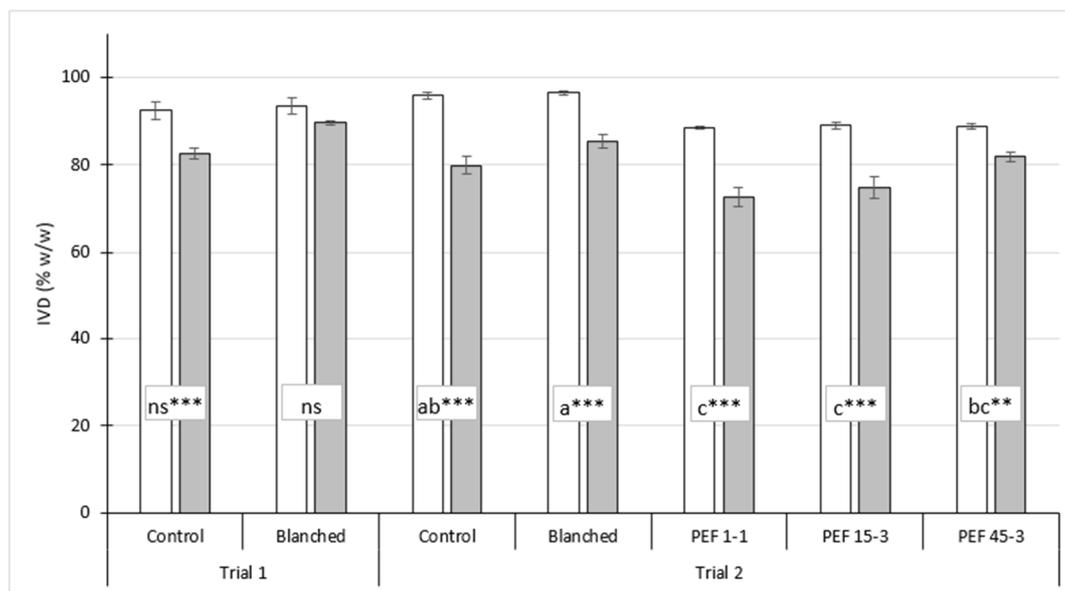
**Abbildung 31: Ausbeute an Rohprotein (□) und Trockenmasse (■) in der Biomasse (BM) von *Lemna minor* (% w/w) bei verschiedenen Vortrocknungsbehandlungen und in den unbehandelten Kontrollproben der Versuchsreihen 1 und 2** (a,b,c kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Versuchsreihe mit  $p < 0,01$ ; \*\*\*kennzeichnen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsreihen mit Bonferroni-Korrektur)



**Abbildung 32: Rohproteingehalt in der Biomasse von *Lemna minor* nach verschiedenen Vortrocknungs- und Trocknungsbehandlungen in Versuchsreihe 1 und 2** (□: Vakuumtrocknung bei 40 °C; ■: Konvektionstrocknung bei 105 °C; a,b,c kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Versuchsreihe für den Hauptfaktor Vortrocknungsbehandlung;  $p < 0,01$  mit Bonferroni-Korrektur; \*\* kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Trocknungsmethoden innerhalb der jeweiligen Vortrocknungsbehandlung mit LSD-Test)

In allen Proben (unbehandelt, behandelt) wurden bei einer Trocknungstemperatur von 105 °C geringere In-vitro-Verdaulichkeiten ermittelt als bei der niedriger temperierten Vakuumtrocknung (Abbildung 33). Lediglich für das blanchierte Probenmaterial in Versuch 1 konnte kein

signifikanter Effekt der Trocknungsmethode festgestellt werden. Während die PEF-Behandlungen in Kombination mit der Vakuumtrocknung keine Unterschiede in der In-vitro-Verdaulichkeit hervorbrachten, wurde bei konvektiver Trocknung und PEF 45-3 die In-vitro-Verdaulichkeit gegenüber PEF 1-1 signifikant erhöht (81,9 vs. 72,5 %). Letzteres Ergebnis stellte auch den niedrigsten Wert in beiden Versuchen dar. Die höchste In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins wurde für die blanchierten, vakuumgetrockneten Wasserlinsen in Versuch 2 festgestellt.



**Abbildung 33: In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins in der Biomasse von *Lemna minor* nach verschiedenen Vortrocknungs- und Trocknungsbehandlungen in den Versuchsreihen 1 und 2**

(□: Vakuumtrocknung bei 40 °C; ■: Konvektionstrocknung bei 105 °C; a,b,c kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Versuchsreihe für den Hauptfaktor Vortrocknungsbehandlung;  $p < 0,01$  mit Bonferroni-Korrektur; \* kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Trocknungsmethoden innerhalb der jeweiligen Vortrocknungsbehandlung mit LSD-Test)

### 3.2.2.3 Diskussion

Für alle Vortrocknungsverfahren konnte ein signifikant negativer Einfluss auf den Rohprotein-gehalt in der Trockenmasse beobachtet werden. Dieses Ergebnis ließ sich augenscheinlich durch die Trübung des nach der Vorbehandlung aufgefangenen Zentrats bestätigen. Offenbar war es sowohl durch das Blanchieren als auch durch die PEF-Behandlung zu einer erwartungsgemäßen Zerstörung von Zellstrukturen gekommen (LEWICKI 2006; TOEPFL et al. 2014) und infolgedessen zu einem Verlust von Inhaltsstoffen u. a. von Protein. Die Höhe der Verluste kann zudem mit der angewandten Methodik in Zusammenhang gebracht werden. So

war im Rahmen der Vorbehandlung jeweils ein Wiederbefeuchten der Proben und eine anschließende Entfernung des Wassers im Schleudertrockner notwendig. Die während des Schleudergangs auf das Produkt einwirkenden Zentrifugalkräfte können ebenso stark wie die Vorbehandlung selbst zum Verlust von Inhaltsstoffen geführt haben. Entsprechend stellten auch LAWSON et al. (1974) bei der Anwendung mechanischer Trocknungsverfahren bei Wasserlinsen einen Verlust von Proteinen über den Presssaft fest.

Für die Haupttrocknungsmethoden (Konvektions-, Vakuumtrocknung) konnte kein eindeutiger Effekt auf den Rohproteingehalt ermittelt werden. In Versuch 1 führte die Konvektionstrocknung zu einem signifikant höheren Rohproteingehalt, in Versuch 2 die Vakuumtrocknung. Eine Rolle können in diesem Zusammenhang verschiedene Qualitäten des Ausgangsmaterials sowie unterschiedliche Zeitspannen zwischen Ernte und Trocknung und damit einhergehende Produktveränderungen gespielt haben.

Im Hinblick auf die Rohproteinqualität konnte indessen ein Einfluss des Trocknungsverfahrens nachgewiesen werden. Bei höherer Temperatureinwirkung wurden geringere Gehalte des fermentlöslichen Rohproteins und eine entsprechend reduzierte In-vitro-Verdaulichkeit ermittelt. Auch REID (2004) untersuchte unterschiedliche Trocknungsverfahren bei Wasserlinsen (Trocknung im Trockenschrank [55 °C, 48 h], Solar- und Gefriertrocknung) und stellte einen Einfluss auf die Proteinfractionen im getrockneten Pflanzenmaterial fest. In Anlehnung an eine Proteinfractionierung nach LICITRA et al. (1996) konnten nach der Trocknung im Trockenschrank signifikant geringere Gehalte an pufferlöslichem Protein (B1) und höhere Gehalte der Fractionen B2 und B3 in den Wasserlinsenproben nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten CHANTIRATI, CHUMPAWADE (2011), die bei kurzfristiger Hitzeeinwirkung (150 °C, 2 – 8 min) eine Abnahme an schnell löslichem Protein in mehlförmigen Pflanzenmaterial von *Wolffia globosa* L. ermitteln konnten. Insbesondere bei der Trocknung proteinhaltiger Futtermittel kommen der Temperatur und der Dauer der Erhitzung eine wesentliche Bedeutung zu, da mit zunehmender Hitzeeinwirkung die Proteinlöslichkeit abnimmt bzw. Denaturierungseffekte zunehmen. Eine der auftretenden chemischen Reaktionen ist die Maillard-Reaktion, bei der sich aus Aminosäuren und Kohlenhydraten Produkte bilden, die enzymatisch nicht mehr spaltbar sind (KIRCHGESSNER et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weitere Untersuchungen zur Trocknung von Wasserlinsen erforderlich sind. Da vermutet wird, dass die stoffliche Zusammensetzung des Ausgangsmaterials einen nicht unerheblichen Einfluss auf den Trocknungsprozess hat, kommt der standardisierten Erzeugung von Wasserlinsen auch in diesem Zusammenhang eine große Bedeutung zu. Weiterer Forschungsbedarf besteht vor allem hinsichtlich der während der Trocknung auftretenden Rohproteinverluste und ihrer ernährungsphysiologischen Bedeutung.

### **3.2.3 Fütterungsversuch bei Masthähnchen**

Ziel der Untersuchung war es, die Wirkung unterschiedlicher Wasserlinsenqualitäten auf die Verdaulichkeit von Rohprotein, Aminosäuren und Phosphor sowie auf die Tierleistung von Masthähnchen zu prüfen und damit einen Beitrag zur ernährungsphysiologischen Bewertung von Wasserlinsen als Proteinfuttermittel in der Geflügelfütterung zu leisten.

#### **3.2.3.1 Material und Methoden**

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden in der Forschungseinrichtung der Technischen Hochschule Bingen durchgeführt und zuvor vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt (Zulassungsnummer: G 18-20-021). Für die Untersuchung standen 108 männliche Eintagsküken der Genetik Ross 308 zur Verfügung. Diese erhielten über die ersten 17 Tage ein handelsübliches Starterfutter. Am 18. Tag wurden die Tiere in Einzelkäfige verbracht. Es folgte eine 3-tägige Adaptionsphase, um die Tiere an ein pelletiertes Basalfutter zu gewöhnen (Tabelle 12), bevor diese am 21. Tag zufällig auf sechs Fütterungsgruppen verteilt wurden. In den Rationen der Versuchsgruppen A50, B50, C25, C50 und C75 wurde das basale Futter zu unterschiedlichen Anteilen durch Wasserlinsen verschiedener Qualitäten ersetzt (Tabelle 13 und 14). Als unverdaulicher Marker wurde allen Rationen zusätzlich Titandioxid ( $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  Futter) beigemischt. Während der gesamten Versuchszeit hatten die Masthähnchen freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Klimatisierung und die Beleuchtung erfolgten gemäß den gängigen Empfehlungen.

Zu Beginn und am Ende der 6-tägigen Versuchsperiode fand jeweils eine Einzeltierwägung und eine Futterrückwaage zur Ermittlung von Lebendmasseentwicklung und Futteraufnahme statt. Für die Probengewinnung wurden die Tiere am 27. Tag betäubt und unblutig mittels Genickbruch getötet. Der Darminhalt wurde aus einem Abschnitt zwischen Meckel'schem Divertikel und 4 cm vor der Ileo-Caecal-Klappe nach standardisierter Methode entnommen. Die Chymusproben wurden gefriergetrocknet, zu Poolproben (vier je Fütterungsgruppe) vermengt und für die anschließende Analyse vermahlen.

Die eingesetzten Wasserlinsenchargen und Futtermittel wurden auf Trockenmasse, Rohnährstoffe, Aminosäuren, Calcium, Phosphor und  $\text{TiO}_2$  analysiert. Zudem wurden der Gehalt an fermentlösbarem Rohprotein und an antinutritiven Substanzen (Trypsin-Inhibitoren, Tannine, Phytat) in den Wasserlinsenchargen bestimmt. Die Chymusproben wurden hinsichtlich der Parameter Aminosäuren, Stickstoff, Phosphor und  $\text{TiO}_2$  untersucht. Zudem erfolgte eine Bestimmung der Trockenmasse- und Rohaschegehalte in den Kotproben.

**Tabelle 12: Zusammensetzung des Basalfutters**

Komponenten	Anteile in der Ration (g·kg <sup>-1</sup> )
Mais	433,5
Weizen	150,0
Sojaextraktionsschrot (46 % XP)	261,0
Rapseextraktionsschrot	60,0
Pflanzenfett (GVO-frei)	59,5
Calciumcarbonat	12,3
L-Lysin (78%)	3,0
L-Threonin	0,9
L-Methionin	2,6
Monocalcium-Phosphat	9,0
NaHCO <sub>3</sub> +NaCl	3,0
Vormischung*	5,2
* je kg Vormischung:	
Vitamin A (3a672a) 10000 IE, Vitamin D <sub>3</sub> (3a671) 4000 IE, Vitamin E (all-rac-alpha-Tocopherylacetat) (3a700) 38 IE, Selen (3b801, Na-Selenit) 0,34 mg, Kupfer (3b405, Kupfer-(II)-sulfat, Pentahydrat) 6,5 mg, Kupfer (3b4.10, Methionin-Kupferchelate, Hydrat) 8,3 mg, Zink (3b603, Zinkoxid) 31,2 mg, Zink(3b6.10, Methionin- Zinkchelate, Hydrat) 34,6 mg, Mangan (3b502, Mangan-(II)-oxid) 2,8 mg, Mangan (3b5.10, Methionin- Manganchelate, Hydrat) 34,6 mg, Eisen (3b103, Eisen-(II)-sulfat, Monohydrat) 76,6 mg, Iod (3b202, Calciumjodat) 1,1 mg, Calciumsalz des Hydroxyanalog von Methionin 2,23 g	
6-Phytase EC 3.1.3.26 (Quantum Blue) (4a19) 260 FTU, Endo-1,4-Beta-Xylanase EC 3.2.1.8 (4a15) 610 U, Endo 1,3 (4)-β-Glucanase EC 3.2.1.6 (4a15) 76 U	
Butylhydroxytoluol (E321) 60,8 mg, Sepiolith (E562) 0,3 mg	

**Tabelle 13: Zusammensetzung und wertbestimmende Inhaltsstoffe der Futtermischungen (g·kg<sup>-1</sup>; sofern nicht anders angegeben)**

Versuchsgruppen	A50	B50	C25	C50	C75	D
Charge A	500					
<i>Lemna minuta</i> , <i>Lemna minor</i>						
Charge B		500				
<i>Spirodela polyrhiza</i>						
Charge C			250	500	750	
<i>Lemna obscura</i>						
Basalfutter	500	500	750	500	250	1000
TiO <sub>2</sub>	5	5	5	5	5	5
<b>Analysierte Nährstoffgehalte:</b>						
Trockenmasse	921	893	901	911	922	890
Rohasche	99,5	117	57,2	56,7	56,2	58,2
Rohprotein	181	215	232	277	322	188
Phosphor	7,50	5,72	5,81	5,66	5,50	6,02
Calcium	14,2	18,9	9,80	10,6	11,3	9,10
Rohfett	58,5	54,9	81,9	76,3	70,7	87,7
Rohfaser	78,6	71,1	56,0	78,1	100,2	34,3
AME <sub>N</sub> (MJ/kg)	9,50	9,35	11,9	10,9	9,87	12,9
Calcium-Phosphor-Verhältnis	1,91	3,30	1,69	1,86	2,05	1,52

**Tabelle 14: Nährstoffgehalte von getrockneten Wasserlinsenchargen unterschiedlicher Arten ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; sofern nicht anders angegeben)**

Charge	A	B	C
Art	<i>Lemna minuta,</i> <i>Lemna minor</i>	<i>Spirodela polyrhiza</i>	<i>Lemna obscura</i>
Trockenmasse	953	897	934
Rohprotein	175	246	370
Rohfett	29,5	22,4	65,4
Stärke	140	81	59
Zucker	*	11,7	*
Rohfaser	124	109	123
Neutral-Detergenzien-Faser	421	275	294
Säure-Detergenzien-Faser	200	234	186
Säure-Detergenzien-Lignin	30,5	56,5	29,0
Rohasche	142	177	56,0
AME <sub>N</sub>	6,25	5,90	8,92
Fermentlösbares Rohprotein	109	168	291
In-vitro-Verdaulichkeit XP (%)	61,9	68,3	78,6
Methionin	2,26	3,26	7,42
Cystein	1,63	2,45	4,06
Lysin	6,88	10,20	22,87
Threonin	6,14	8,76	15,88
Tryptophan	2,45	3,47	7,54
Arginin	7,58	12,97	22,98
Isoleucin	6,23	8,46	17,05
Leucin	10,94	15,31	31,67
Valin	7,50	11,33	21,24
Histidin	2,33	3,49	7,78
Phenylalanin	7,08	9,76	19,85
Glycin	7,90	10,55	19,51
Serin	6,29	8,78	16,07
Prolin	6,48	8,87	16,90
Alanin	8,57	12,40	21,70
Asparagin	14,51	26,44	32,41
Glutamin	14,90	22,73	37,74
Calcium	19,5	28,8	12,1
Phosphor	9,00	5,55	5,37
Ca-P-Verhältnis	2,16	5,19	2,25
Phytinphosphor	0,48	0,17	0,43
Phytat	1,72	0,59	1,52
Phytinphosphor (% Gesamt-P)	5,44	3,06	8,01
Tannin <sup>+</sup> ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	2943	2890	303
Trypsininhibitor-Aktivität ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	**	**	**

\*: unterhalb der Bestimmungsgrenze von  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Frischmasse

\*\* : unterhalb der Bestimmungsgrenze von  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  Frischmasse

+: berechnet als Pyrogallol

Die Probenvorbereitung für die Bestimmung von Phosphor und Titandioxid erfolgte nach BVL L 00.00-19/1:2015-06 und DIN EN 13805:2014-12, die anschließende Analyse nach DIN EN 13805:2014-12. Die Bestimmung der Aminosäuregehalte wurde mit den von LLAMES, FONTAINE (1994) beschriebenen Methoden durchgeführt. Der Gesamtstickstoffgehalt wurde mit der Verbrennungsmethode nach Dumas ermittelt. Durch Multiplikation des Stickstoffgehalt-

es mit dem Faktor 6,25 wurde der Rohproteingehalt der Proben errechnet (AOAC International 2005; Methode 968.06). Trockenmasse, Rohasche, Rohfaser und Rohfett wurden gemäß den in Verordnung (EG) Nr. 152/2009 beschriebenen Methoden analysiert. Weitere Nährstoffe wurden nach den amtlichen Vorschriften zur Futtermitteluntersuchung bestimmt (VDLUFA 2012c): Fermentlösbares Rohprotein nach Methode 4.2.1, Neutral-Detergenzien-Faser nach Methode 6.5.1; Säure-Detergenzien-Faser nach Methode 6.5.2, Säure-Detergenzien-Lignin nach Methode 6.5.3 und Calcium nach Methode 10.8.2. Die Trypsin-Inhibitor-Aktivität (TIA) wurde nach DIN EN ISO 14902:2002-02 und der Gerbstoffgehalt nach der Methode 2.8.18 (PY) des Europäischen Arzneibuch (2017) analysiert. Die Bestimmung von Inositol-phosphaten erfolgte gemäß ZELLER et al. (2015) mit 0,5 M HCl als Extraktionsmittel.

Der Gehalt an AME<sub>N</sub> wurde nach der Formel für Mischfutter für Geflügel (WPSA 1984; JENSEN 1999) geschätzt. Die In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins wurde als Quotient aus fermentlösbarem Rohprotein und Rohprotein berechnet. Die scheinbare ileale Verdaulichkeit (apparent ileal digestibility, AID) wurde gemäß der Differenzmethode nach NALLE et al. (2010) und RAVINDRAN et al. (2017) berechnet. Die standardisierte ileale Verdaulichkeit (standardized ileal digestibility, SID) wurde unter Berücksichtigung der basalen endogenen Verlusten auf Grundlage einer stickstofffreien Ration gemäß ADEOLA et al. (2016) ermittelt.

Die Daten wurden anhand einer einfaktoriellen Varianzanalyse unter Verwendung des Programms SPSS (Version 26.0.0.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) statistisch ausgewertet.

### **3.2.3.2 Ergebnisse**

Die höchsten täglichen Zunahmen und Lebendgewichte am 27. Versuchstag wurden für die Tiere der Versuchsgruppe C25 festgestellt. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Gruppe D) bestand jedoch nicht. Alle anderen Versuchsvarianten führten zu einer signifikant reduzierten Gewichtsentwicklung. Die geringsten Zunahmen wurden dabei mit 21,6 g pro Tag für die Versuchsgruppe C75 dokumentiert. Hinsichtlich der Futteraufnahme unterschieden sich die Fütterungsgruppen A50, B50, C25 und D nicht voneinander. Die Versuchsgruppen C50 und C75 nahmen mit 109,3 g je Tag bzw. 74,9 g je Tag die geringsten Futtermengen auf. Die Futtermittelnutzung war in den Versuchsgruppen A50 und C75 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant schlechter. Die beste Futtermittelnutzung innerhalb der Versuchsvarianten zeigten die Masthähnchen der Gruppe C25. Die Leistungsparameter sind in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 15: Leistungsparameter von Masthähnchen (21. – 27. Lebenstag) beim Einsatz unterschiedlicher Wasserlinsenchargen**

Fütterungsgruppe <sup>1</sup>	A50	B50	C25	C50	C75	D
Charge	A	B	C	C	C	-
n	18	17	18	17	14	17
XP (g·kg <sup>-1</sup> )	181	215	233	277	322	188
LM 21. Tag (g)	1186±20	1192±20	1180±19	1191 ±20	1188±22	1195±21
LM 27. Tag (g)	1587±34 <sup>b</sup>	1665±32 <sup>b</sup>	1848±29 <sup>a</sup>	1608 ±30 <sup>b</sup>	1317±29 <sup>c</sup>	1821±33 <sup>a</sup>
<b>21. – 27. Lebenstag</b>						
TGZ (g·Tier <sup>-1</sup> )	66,9±3 <sup>b</sup>	78,8±3,4 <sup>b</sup>	111,4±2,6 <sup>a</sup>	69,6±3,4 <sup>b</sup>	21,6±2,4 <sup>c</sup>	104,3±3,1 <sup>a</sup>
FA (g·Tier <sup>-1</sup> )	858±30 <sup>a</sup>	880±30 <sup>a</sup>	896±16 <sup>a</sup>	656±15 <sup>b</sup>	449±14 <sup>c</sup>	925±18 <sup>a</sup>
FA (g·Tier und Tag <sup>-1</sup> )	143,0±5,0 <sup>a</sup>	146,7±5,0 <sup>a</sup>	149,4±2,6 <sup>a</sup>	109,3±2,5 <sup>b</sup>	74,9±2,3 <sup>c</sup>	154,2±2,9 <sup>a</sup>
FVW (kg·kg <sup>-1</sup> )	2,16±0,04 <sup>c</sup>	1,88±0,03 <sup>bc</sup>	1,35±0,02 <sup>a</sup>	1,61±0,06 <sup>ab</sup>	3,93±0,35 <sup>d</sup>	1,49±0,03 <sup>ab</sup>

<sup>abcd</sup> innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (p < 0,05)  
<sup>1</sup>detaillierte Beschreibung siehe Tabelle 13

Den Tabellen 16 und 17 sind die scheinbare und die standardisierte Rohprotein- und Aminosäurenverdaulichkeiten für die verschiedenen Wasserlinsenchargen zu entnehmen. Die Fütterungsvarianten C25, C,50 und C75 wiesen im Vergleich zu den Varianten A und B signifikant höhere Verdaulichkeitswerte für Rohprotein und die untersuchten Aminosäuren auf. Mit Blick auf die einzelnen Aminosäuren wurde für Cystein in allen Fütterungsgruppen die geringste scheinbare Verdaulichkeit ermittelt. Die Phosphorverdaulichkeit variierte zwischen 50,8 und 78,9 %. Die signifikant höchsten P-Verdaulichkeitswerte wurden für die Gruppe A festgestellt.

**Tabelle 16: Scheinbare ileale Verdaulichkeit (%) von Rohprotein, Aminosäuren und Phosphor für die verschiedenen Wasserlinsenchargen**

Fütterungsgruppe <sup>1</sup>	A50	B50	C25	C50	C75
Charge	A	B	C	C	C
n*	4	4	4	4	4
XP	34,1±1,2 <sup>c</sup>	55,3±1,5 <sup>b</sup>	79,8±1,5 <sup>a</sup>	80,8±0,5 <sup>a</sup>	78,0±1,0 <sup>a</sup>
Methionin	45,3±2,1 <sup>c</sup>	65,5±2,0 <sup>b</sup>	87,9±1,1 <sup>a</sup>	89,0±0,3 <sup>a</sup>	87,0±0,5 <sup>a</sup>
Cystein	-7,0±3,5 <sup>c</sup>	27,5±3,2 <sup>b</sup>	73,2±1,9 <sup>a</sup>	76,1±0,9 <sup>a</sup>	75,2±1,3 <sup>a</sup>
Met + Cys	23,2±2,1 <sup>c</sup>	48,6±2,3 <sup>b</sup>	82,7±1,4 <sup>a</sup>	84,3±0,4 <sup>a</sup>	82,6±0,8 <sup>a</sup>
Lysin	45,7±1,7 <sup>c</sup>	64,0±2,0 <sup>b</sup>	91,0±1,3 <sup>a</sup>	91,5±0,4 <sup>a</sup>	89,5±0,7 <sup>a</sup>
Threonin	35,2±2,0 <sup>c</sup>	55,2±2,0 <sup>b</sup>	82,1±1,6 <sup>a</sup>	83,8±0,4 <sup>a</sup>	81,7±0,9 <sup>a</sup>
Tryptophan	32,0±2,1 <sup>c</sup>	61,0±1,6 <sup>b</sup>	79,5±1,1 <sup>a</sup>	82,1±0,4 <sup>a</sup>	81,3±0,7 <sup>a</sup>
Arginin	55,2±1,9 <sup>c</sup>	72,9±1,3 <sup>b</sup>	90,6±0,5 <sup>a</sup>	91,5±0,5 <sup>a</sup>	91,0±1,0 <sup>a</sup>
Isoleucin	45,0±2,4 <sup>c</sup>	63,4±1,9 <sup>b</sup>	85,8±1,3 <sup>a</sup>	87,4±0,4 <sup>a</sup>	85,3±0,7 <sup>a</sup>
Leucin	48,0±1,9 <sup>c</sup>	65,8±1,7 <sup>b</sup>	88,0±1,1 <sup>a</sup>	88,8±0,3 <sup>a</sup>	86,7±0,6 <sup>a</sup>
Valin	44,1±2,4 <sup>c</sup>	62,0±1,6 <sup>b</sup>	86,1±1,3 <sup>a</sup>	87,7±0,4 <sup>a</sup>	85,7±0,7 <sup>a</sup>
Histidin	28,1±3,0 <sup>c</sup>	50,1±2,4 <sup>b</sup>	84,9±1,6 <sup>a</sup>	86,5±0,6 <sup>a</sup>	84,3±0,8 <sup>a</sup>
Phenylalanin	47,4±1,9 <sup>c</sup>	66,5±1,5 <sup>b</sup>	87,4±1,1 <sup>a</sup>	88,7±0,3 <sup>a</sup>	86,8±0,5 <sup>a</sup>
Glycin	31,7±1,8 <sup>c</sup>	51,6±1,4 <sup>b</sup>	79,0±1,5 <sup>a</sup>	80,6±0,5 <sup>a</sup>	78,9±0,7 <sup>a</sup>
Serin	29,3±2,2 <sup>c</sup>	54,6±2,0 <sup>b</sup>	79,2±2,0 <sup>a</sup>	80,9±0,3 <sup>a</sup>	79,7±0,9 <sup>a</sup>
Prolin	24,2±1,9 <sup>c</sup>	45,1±2,1 <sup>b</sup>	82,1±1,0 <sup>a</sup>	84,0±0,4 <sup>a</sup>	83,1±0,9 <sup>a</sup>
Alanin	48,0±1,8 <sup>c</sup>	64,8±1,5 <sup>b</sup>	86,6±1,4 <sup>a</sup>	87,6±0,2 <sup>a</sup>	85,0±0,6 <sup>a</sup>
Asparagin	43,4±1,7 <sup>c</sup>	67,3±1,6 <sup>b</sup>	85,6±1,4 <sup>a</sup>	87,8±0,4 <sup>a</sup>	86,0±0,8 <sup>a</sup>
Glutamin	31,5±2,5 <sup>c</sup>	54,6±2,0 <sup>b</sup>	86,6±1,4 <sup>a</sup>	88,6±0,5 <sup>a</sup>	86,1±0,8 <sup>a</sup>
AS gesamt	39,2±1,9 <sup>c</sup>	60,3±3,8 <sup>b</sup>	85,2±1,3 <sup>a</sup>	86,7±0,4 <sup>a</sup>	84,8±0,7 <sup>a</sup>
P	78,9±1,2 <sup>a</sup>	50,8±1,8 <sup>c</sup>	67,8±2,0 <sup>b</sup>	68,1±2,0 <sup>b</sup>	63,7±1,0 <sup>b</sup>

<sup>abcd</sup> innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (p < 0,01)  
\*gepoolte Proben jeweils 3 – 4)  
<sup>1</sup>detaillierte Beschreibung siehe Tabelle 13

**Tabelle 17: Standardisierte ileale Verdaulichkeit (%) von Rohprotein und Aminosäuren für die verschiedenen Wasserlinsenchargen**

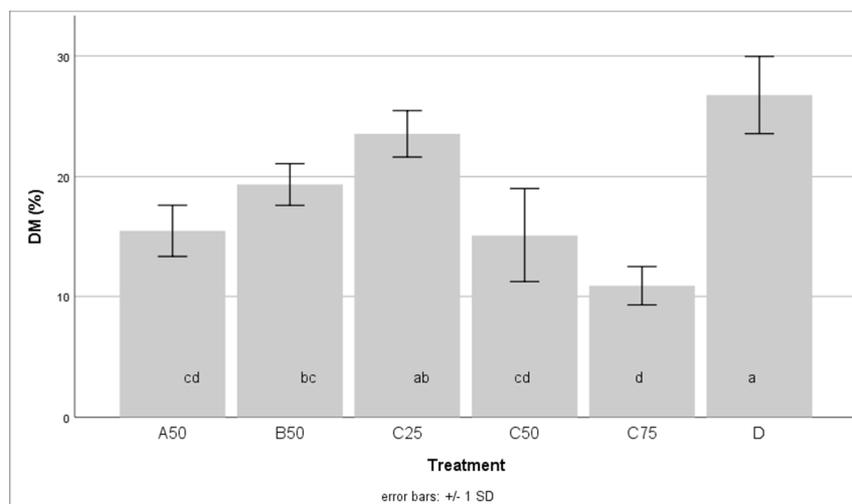
Fütterungsgruppe <sup>1</sup>	A50	B50	C25	C50	C75
Charge	A	B	C	C	C
n*	4	4	4	4	4
XP	40,2±1,2 <sup>c</sup>	59,6±1,5 <sup>b</sup>	82,7±1,5 <sup>a</sup>	83,7±0,5 <sup>a</sup>	80,9±1,0 <sup>a</sup>
Methionin	49,9±2,1 <sup>c</sup>	68,5±2,0 <sup>b</sup>	89,3±1,1 <sup>a</sup>	90,4±0,3 <sup>a</sup>	88,4±0,5 <sup>a</sup>
Cystein	16,9±3,5 <sup>c</sup>	42,5±3,2 <sup>b</sup>	82,6±1,9 <sup>a</sup>	85,6±0,9 <sup>a</sup>	84,6±1,3 <sup>a</sup>
Met + Cys	35,9±2,1 <sup>c</sup>	56,8±2,3 <sup>b</sup>	86,9±1,4 <sup>a</sup>	88,5±0,4 <sup>a</sup>	86,9±0,8 <sup>a</sup>
Lysin	51,1±1,7 <sup>c</sup>	67,4±2,0 <sup>b</sup>	92,5±1,3 <sup>a</sup>	93,1±0,4 <sup>a</sup>	91,1±0,7 <sup>a</sup>
Threonin	44,6±2,0 <sup>c</sup>	61,4±2,0 <sup>b</sup>	85,7±1,6 <sup>a</sup>	87,3±0,4 <sup>a</sup>	85,3±0,9 <sup>a</sup>
Tryptophan	35,5±2,1 <sup>c</sup>	63,3±1,6 <sup>b</sup>	80,6±1,1 <sup>a</sup>	83,2±0,4 <sup>a</sup>	82,4±0,7 <sup>a</sup>
Arginin	60,1±1,9 <sup>c</sup>	75,6±1,3 <sup>b</sup>	92,2±0,5 <sup>a</sup>	93,1±0,5 <sup>a</sup>	92,6±1,0 <sup>a</sup>
Isoleucin	50,7±2,4 <sup>c</sup>	67,3±1,9 <sup>b</sup>	87,8±1,3 <sup>a</sup>	89,4±0,4 <sup>a</sup>	87,3±0,7 <sup>a</sup>
Leucin	52,9±1,9 <sup>c</sup>	69,1±1,7 <sup>b</sup>	89,7±1,1 <sup>a</sup>	90,4±0,3 <sup>a</sup>	88,4±0,6 <sup>a</sup>
Valin	50,5±2,4 <sup>c</sup>	66,0±1,6 <sup>b</sup>	88,4±1,3 <sup>a</sup>	89,9±0,4 <sup>a</sup>	87,9±0,7 <sup>a</sup>
Histidin	35,5±3,0 <sup>c</sup>	54,7±2,4 <sup>b</sup>	87,1±1,6 <sup>a</sup>	88,7±0,6 <sup>a</sup>	86,4±0,8 <sup>a</sup>
Phenylalanin	52,4±1,9 <sup>c</sup>	69,9±1,5 <sup>b</sup>	89,1±1,1 <sup>a</sup>	90,4±0,3 <sup>a</sup>	88,5±0,5 <sup>a</sup>
Glycin	37,4±1,8 <sup>c</sup>	55,6±1,4 <sup>b</sup>	81,3±1,5 <sup>a</sup>	82,9±0,5 <sup>a</sup>	81,1±0,7 <sup>a</sup>
Serin	37,8±2,2 <sup>c</sup>	60,3±2,0 <sup>b</sup>	82,5±2,0 <sup>a</sup>	84,2±0,3 <sup>a</sup>	82,9±0,9 <sup>a</sup>
Prolin	31,5±1,9 <sup>c</sup>	50,2±2,1 <sup>b</sup>	84,8±1,0 <sup>a</sup>	86,8±0,4 <sup>a</sup>	85,9±0,9 <sup>a</sup>
Alanin	52,3±1,8 <sup>c</sup>	67,6±1,5 <sup>b</sup>	88,3±1,4 <sup>a</sup>	89,2±0,2 <sup>a</sup>	8,6±0,6 <sup>a</sup>
Asparagin	48,2±1,7 <sup>c</sup>	69,8±1,6 <sup>b</sup>	87,7±1,4 <sup>a</sup>	89,9±0,4 <sup>a</sup>	88,1±0,8 <sup>a</sup>
Glutamin	37,8±2,5 <sup>c</sup>	58,5±2,0 <sup>b</sup>	89,0±1,4 <sup>a</sup>	91,0±0,5 <sup>a</sup>	88,6±0,8 <sup>a</sup>
AS gesamt	45,2±1,9 <sup>c</sup>	64,1±1,7 <sup>b</sup>	87,4±1,3 <sup>a</sup>	88,9±0,4 <sup>a</sup>	87,0±0,7 <sup>a</sup>

<sup>abcd</sup> innerhalb einer Zeile kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (P < 0,01)

\*gepoolte Proben jeweils 3 – 4)

<sup>1</sup>detaillierte Beschreibung siehe Tabelle 13

Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Kot-Trockenmassebestimmung am 26. Versuchstag. Für alle Versuchsvarianten, ausgenommen Variante C25, konnten signifikant geringere Trockenmassegehalte im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Die Kotproben der Gruppe C75 wiesen mit 11 % die geringsten Trockenmassegehalte auf.



**Abbildung 34: Trockenmassegehalt der Kotproben am 26. Lebenstag (n = 6)**  
a,b,c,d kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen; p < 0,01

### 3.2.3.3 Diskussion

#### *Nährstoffgehalte*

Die Rohproteingehalte der Wasserlinsenchargen variierten zwischen 184 und 396 g·kg<sup>-1</sup> TM. Ähnliche Werte wurden auch in Untersuchungen von STADTLANDER et al. (2019) und KHANUM et al. (2005) in Wasserlinsen nachgewiesen. Die höchsten Gehalte wurden für die Charge C (*Lemna obscura*) festgestellt, welche auch ein günstiges Aminosäureverhältnis aufwies. Da der Proteinbedarf beim Geflügel, wie bei allen Monogastriern, einen Bedarf an Aminosäuren beinhaltet, ist neben dem Proteingehalt das Aminosäuremuster für die Bewertung von Futtermitteln relevant. Für Geflügel, welches sich im Wachstum befindet, ist das schwefelhaltige Methionin die erstlimitierende Aminosäure (RAVINDRAN, BRYDEN 1999). Die Methioningehalte sind in der Charge C mit 2 g je 100 g Rohprotein höher als in den Chargen A und B und übertreffen auch die in Sojaextraktionsschrot nachgewiesenen Methioningehalte (SAUVANT et al. 2004). Der Lysingehalt liegt mit einem Anteil von 6,2 % im Gesamtprotein ebenfalls über den Gehalten verschiedener anderer Proteinfuttermittel (SAUVANT et al. 2004). Im Rahmen einer proteinreduzierten Fütterung kann somit der Einsatz von Wasserlinsen als Rationskomponente den Bedarf an synthetischen Aminosäuren verringern. Die geringeren Aminosäuregehalte in den Chargen A und B weisen jedoch darauf hin, dass die Wasserlinsenart und die Qualität der Charge bei der Rationsgestaltung zu berücksichtigen sind.

#### *Leistungsparameter*

Insgesamt nahm die Futterraufnahme der Tiere mit zunehmenden Anteilen an Wasserlinsen in der Ration ab. Analog dazu fielen auch die Lebendgewichte in den Versuchsgruppen signifikant niedriger aus als bei der Kontrolle. Lediglich für die Fütterungsvariante mit dem niedrigsten Wasserlinsenanteil (250 g·kg<sup>-1</sup>) wurde kein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren festgestellt. Diese Resultate decken sich mit den Erkenntnissen früherer Untersuchungen, die negative Effekte auf die Wachstumsparameter bei steigenden Einsatzraten in der Masthähnchenfütterung beschreiben (KUSINA et al. 1999; KABIR et al. 2005). Allerdings muss bei der Interpretation der erfassten Leistungsparameter berücksichtigt werden, dass die Versuchsdauer auf sechs Tage begrenzt war und somit auch die Aussagefähigkeit hinsichtlich der Einflüsse auf das Wachstum limitiert ist. Die Leistungsdaten können daher nur als ergänzende Angaben angesehen werden. Hinzu kommt, dass der Austausch des Basalfutters durch Wasserlinsen ohne weitere Optimierung der Nährstoffversorgung erfolgte. Die Futtermischungen wiesen daher zum Teil erhebliche Unterschiede in den Nährstoffgehalten auf (Tabelle 13). Wenn davon ausgegangen wird, dass die Futterraufnahme beim Geflügel von der Energiedichte der Ration mitbestimmt wird (BELLOF et al. 2005), hätte die Futterraufnahme in den Versuchsgruppen ansteigen müssen. Da die Versuchstiere aber dennoch weniger Futter auf-

nahmen, müssen andere Faktoren wie z. B. antinutritive Substanzen den Verzehr negativ beeinflusst haben. Weitere Untersuchungen zum Einsatz von Wasserlinsen als Komponente in isoenergetischen und isonitrogenen Rationen über einen längeren Versuchszeitraum sind somit erforderlich.

#### *Protein- und Aminosäurenverdaulichkeit*

Die Ergebnisse zur In-vitro-Verdaulichkeit des Rohproteins variierten zwischen den einzelnen Chargen und entsprechen mit Werten zwischen 62,9 – 78,6 % einem Bereich, der auch in früheren Studien ermittelt wurde ( DEWANJI 1993; LY, PRESTON 2001; LY et al. 2002). Die in vitro festgestellte Rangierung der Wasserlinsenchargen hinsichtlich ihrer Verdaulichkeit konnte in den Untersuchungen am lebenden Tier bestätigt werden. Die höchsten Verdaulichkeitswerte für die einzelnen Aminosäuren wies die Charge C auf. Die Verdaulichkeitswerte sind mit denen von Sojaextraktionsschrot (Lys 90,7; Met 92,3; Cys 85,4 % SID; ADEDOKUN et al. 2014) oder der Mikroalge *Spirulina platensis* (Lys 81,2; Met 82,4; Cys 77,8 % SID; TAVERNARI et al. 2018) vergleichbar und liegen über denen von Rapsextraktionsschrot (Lys 76,9; Met 81,9; Cys 77,0 % SID; KIM et al. 2012). Vergleichbare Daten zur Verdaulichkeit von Wasserlinsen bei Masthähnchen existieren in der aktuellen Literatur nicht. Im Vergleich zu den Chargen A und B, deren Aminosäurenverdaulichkeit signifikant geringer war, enthielt Charge C deutlich weniger Tannine (Tabelle 14). Der Gehalt liegt auch unterhalb der bisher in Wasserlinsen nachgewiesenen Konzentrationen von 667 bis 6588 mg·kg<sup>-1</sup>TM (ausgedrückt als Pyrogallol; KALITA et al. 2007 und NEGESSE et al. 2009). Tannine haben die Fähigkeit, einen Komplex mit Proteinen durch Wasserstoffbindung und kovalente Bindungen zu bilden. Dies führt zur Präzipitation von Proteinen, so dass sie für die Absorption nicht verfügbar sind (TEUSCHER et al. 2020). Es liegt daher nahe, dass der Tanningehalt in den Wasserlinsen mit der Verdaulichkeit korreliert ist. Die Verdaulichkeit des Eiweißes aus pflanzlichen Quellen hängt zudem eng von der Bindung der Proteine an Zellwandbestandteile ab (THEANDER et al. 1989). In diesem Zusammenhang sind auch die Faserfraktionen (NDF, ADF, ADL) in den Wasserlinsen zu betrachten. Sie wiesen ebenfalls große Varianzen auf und können einen Einfluss auf die Verdaulichkeit haben, welcher zu prüfen bleibt.

#### *Phosphorverdaulichkeit*

Analog zur Protein- und Aminosäurenverdaulichkeit haben bislang keine Untersuchungen mit Wasserlinsen zur Bestimmung der Phosphorverdaulichkeit bei Masthähnchen stattgefunden. Die Phosphorverdaulichkeit der Chargen wies erhebliche Variationen auf. Die geringste Phosphorverdaulichkeit wurde für die Ration der Charge B festgestellt. Einen maßgeblichen Einfluss auf die Verdaulichkeit des Phosphors hat der Anteil an Phytinsäure gebundenem Phos-

phor in den Rationskomponenten. Da monogastrischen Tieren das für die Hydrolyse von Phytin notwendige Enzym Phytase fehlt bzw. es nur mit sehr geringer Aktivität vorhanden ist (LOPEZ et al. 2000), kann Phytinphosphor zunächst als unverdaulich betrachtet werden. In Getreide oder Eiweißfuttermitteln liegt etwa zwei Drittel des Phosphors als Phytinphosphor vor (EECKHOUT, PAEPE 1994). Die Anteile an Phytinphosphor in den untersuchten Wasserlinsenchargen fielen deutlich geringer aus und waren in der Charge B am geringsten, so dass die reduzierte P-Verdaulichkeit der Charge B hiermit nicht zu erklären ist. Eine Rolle könnte indessen das Calcium-Phosphor-Verhältnis spielen, welches deutlich weiter war als in den Rationen der Chargen A und C. Bereits in früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Phosphorverdaulichkeit mit einem weiten Calcium-Phosphor-Verhältnis abnimmt (PLUMSTEAD et al. 2008). Für die verschiedenen Rationen der Charge C, die sich in den Wasserlinsenanteilen und auch im Calcium-Phosphor-Verhältnis voneinander unterschieden, war allerdings kein Unterschied in der Phosphorverdaulichkeit festzustellen (Tabelle 16). Insgesamt lässt sich daher zum derzeitigen Zeitpunkt nicht konstatieren, welche Faktoren die P-Verdaulichkeit in Wasserlinsen beeinflussen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *Lemna obscura* mit einem Anteil von bis zu 25 % als Proteinträger im Geflügelmastfutter eingesetzt werden kann. Als limitierende Faktoren für eine ausreichende Futteraufnahme und Wachstumsleistung sind eine schlechte Schmackhaftigkeit und relativ hohe Fasergehalte zu sehen. Ein Augenmerk ist auch auf den Tanningehalt zu richten, welcher die Verdaulichkeit von Protein und Aminosäuren reduzieren kann. Um eine bedarfsgerechte Versorgung und einen sicheren Einsatz von Wasserlinsen in der Geflügelfütterung gewährleisten zu können, sind daher standardisierte Produkte erforderlich.

#### **4 Öffentlichkeitsarbeit**

Durch eine breit aufgestellte Öffentlichkeitsarbeit wurden verschiedene Zielgruppen mit der Wasserlinsenthematik angesprochen. Neben wissenschaftlichen Publikationen in ausgewählten Fachzeitschriften konnte die Thematik sowohl auf nationaler als auch auf internationaler Ebene auf ausgewählten Fachtagungen der wissenschaftlichen Community vorgestellt werden. Besonders hervorzuheben ist hierbei die internationale Duckweed Conference in Israel im Jahr 2019. Auf der diesjährigen Konferenz werden erneut Beiträge zu den Versuchsergebnissen aus dem LemnaProtein-Projekt vorgestellt. Zudem befinden sich derzeit Artikel im Review-Prozess. Weitere Veröffentlichungen, über die Projektlaufzeit hinaus, sind geplant.

### **Wissenschaftliche Publikationen (peer-reviewed)**

BRAND, T., PETERSEN, F., DEMANN, J., WICHURA, A. (2021): First report on *Pythium myriotylum* as pathogen on duckweed (*Lemna minor* L.) in hydroponic systems in Germany. *Journal of Cultivated Plants* 73, 316–323.

PETERSEN, F., DEMANN, J., RESTEMEYER, D., ULBRICH, A., OLFS, H.-W., WESTENDARP, H., APPENROTH, K.-J. (2021): Influence of the Nitrate-N to Ammonium-N Ratio on Relative Growth Rate and Crude Protein Content in the Duckweeds *Lemna minor* and *Wolffia hyalina*. *Plants* 10, 1741.

PETERSEN, F., DEMANN, J., RESTEMEYER, D., OLFS, H.-W., WESTENDARP, H., APPENROTH, K.-J., ULBRICH, A. (2022): Influence of light intensity and spectrum on duckweed growth and proteins in a small-scale, re-circulating indoor vertical farm. *Plants*, accepted.

### **Wissenschaftliche Publikationen (in Arbeit)**

DEMANN, J., PETERSEN, F., DUSEL, G., BOG, M., DEVLAMYNCK, R., ULBRICH, A., OLFS, H.-W., WESTENDARP, H., WOLF, P. (2022): Nutritional Value of Duckweed as high protein Feedstuff for Broiler Chickens – Digestibility of Crude Protein, Amino Acids and Phosphorus. *Poultry Science*, submitted.

PETERSEN et al. (2022): Re-circulating Indoor Vertical Farm for an automated and standardized duckweed biomass production.

### **Vorträge**

PETERSEN, F., DEMANN, J., RESTEMEYER, D., ULBRICH, A., OLFS, H.-W., WESTENDARP, H., APPENROTH, K.-J. (2019): Kulturbedingungen für den Intensivanbau von Wasserlinsen zur Futtermittelherstellung. 48. Osnabrücker Kontaktstudientage 2019, 09.11.2019.

RESTEMEYER, D.; PETERSEN, F.; VON SALZEN, J.; DARGATZ, T.; DEMANN, J.; EILIGMANN, L.; OLFS, H.-W.; WESTENDARP, H.; ULBRICH, A. (2020): LemnaProtein–Projekt: Wasserlinsenkultursystem in IVF. 49. Osnabrücker Kontaktstudientage 2020, 07.11.2020.

### **Poster**

DEMANN, J., BEHN, H., OLFS, H.-W., ULBRICH, A., WESTENDARP, H. (2018): Wasserlinsen als proteinreiches Futtermittel – produziert auf Basis der Gülle Dünnpfase. 47. Osnabrücker Kontaktstudientage 2018, 09.11. 2018.

PETERSEN, F., DEMANN, J., RESTEMEYER, D., ULBRICH, A., OLFS, H.-W., WESTENDARP, H., APPENROTH, K.-J. (2019): Development of a standardized production process for duckweed, to be used as a protein rich soybean replacement in animal nutrition. 5th International ICDRA Conference, 09.09 – 12.09.2019, Israel.

### **Weiteres**

DEMANN, J. (2021): Bestimmung der Verdaulichkeit von Protein und Phosphor in Wasserlinsen beim Broiler. Vortrag im Modul Rationsgestaltung und Fütterungsstrategien: Schweine und Geflügel, 22.3.2021, Hochschule Osnabrück.

DEMANN, J., WESTENDARP, H (2019): Wasserlinsen als Futtermittelalternative zu importierten Sojaextraktionsschrot – Qualitätsmanagement Neue Futtermittel. Vortrag im Modul Qualitätsmanagement Futtermittel, 21.05.2019, Hochschule Osnabrück.

PETERSEN, F. (2021): Student Spotlight: Finn Petersen. Duckweed Forum 33, vol 9 (2), 46-47.

RESTEMEYER, D., PETERSEN, F., DECK, S., ULBRICH, A. (2022): Pflanzenperformance von Wasserlinsen (Lemnaceae) unter dem Einfluss des Lichtspektrums und der Lichtintensität. DH Licht Katalog 2022, DH Licht GmbH.

WESTENDARP, H. (2021): Wasserlinsen. In: Durst, L., Freitag, M., Bellof, G. (Hrsg.) „Futtermittel für landwirtschaftliche Nutztiere“. Frankfurt am Main: DLG-Verlag, 577–582.

## **5 Fazit**

Mit Hinblick auf eine nachhaltige und ressourcenschonende Nutztierhaltung stellen Wasserlinsen eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Proteinfuttermitteln dar, da sie nicht nur regional, sondern auch ackerflächenunabhängig erzeugt werden können und geschlossene Nährstoffkreisläufe ermöglichen. Aus ernährungsphysiologischer Sicht zeichnen sich Wasserlinsen insbesondere durch hohe Proteingehalte, ein günstiges Aminosäuremuster und einen geringen Anteil an phytatgebundenem Phosphor und hohe Verdaulichkeiten aus. Die Nährstoffgehalte der Wasserlinsen unterliegen allerdings starken Schwankungen. Die Nährlösung, insbesondere das Ammonium-Nitrat-Verhältnis, beeinflusst den Rohproteingehalt der Wasserlinsen signifikant, deshalb kommt diesem Umweltparameter eine entscheidende Bedeutung zu. Weitere Umweltfaktoren wie die Temperatur, die Strömungsgeschwindigkeit,

die Lichtqualität und -intensität beeinflussen indessen primär die Wachstumsdynamik und somit den Ertrag. Die Einstellung der genannten Umweltparameter und deren kontinuierliche Überwachung besitzen daher eine hohe Relevanz für einen ertragsstabilen und qualitätsorientierten Anbau von Wasserlinsen. Um in Zukunft die großflächige Erzeugung und damit die Bereitstellung erforderlicher Wasserlinsenmengen zu ermöglichen, ist eine weitere Prozessoptimierung und Automatisierung notwendig, unter anderem um den Arbeitsaufwand weiter zu reduzieren. Auch nachfolgende Prozessschritte wie die Trocknung müssen mit Hinblick auf die Qualitätssicherung Berücksichtigung finden.

Insgesamt können unter standardisierten Produktionsbedingungen Wasserlinsen von hoher biologischer Wertigkeit erzeugt werden, die eine interessante Rationskomponente, insbesondere auch in einer stark stickstoff- und phosphorreduzierten Fütterung, sein können. Weitere Untersuchungen mit standardisierten Produkten zur Etablierung praxisgerechter Fütterungskonzepte sind erforderlich.

## 6 Literaturverzeichnis

- ADEDOKUN, S.A., JAYNES, P., ABD EL-HACK, M.E., PAYNE, R.L., APPLGATE, T.J. (2014): Standardized ileal amino acid digestibility of meat and bone meal and soybean meal in laying hens and broilers. In: *Poultry Science* 93 (2), 420 – 428. DOI: 10.3382/ps.2013-03495.
- ADEOLA, O., XUE, P.C., COWIESON, A.J., AJUWON, K.M. (2016): Basal endogenous losses of amino acids in protein nutrition research for swine and poultry. In: *Animal Feed Science and Technology* 221, 274 – 283. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2016.06.004.
- AMADO, R., MUELLER-HIEMEYER, R., MARTI, U. (1980): Proteingehalt, Aminosäurezusammensetzung und Neutralzuckergehalt von Lemnaceen: Vorläufige Mitteilung. In: *Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Eidg. Tech. Hochschule, Stiftung Rübél (Zürich)* 70, 102 – 117.
- AOAC International (2005): Official methods of analysis of AOAC International. 18th. ed. Gaithersburg, MD: AOAC Int.
- APPENROTH, K.J. (2015): Media for in vitro-cultivation of duckweed. *Duckweed Forum* 3, 180–186..
- APPENROTH, K.J., AUGSTEN, H., LIEBERMANN, B., FEIST, H. (1982): Effects of Light Quality on Amino Acid Composition of Proteins in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. using a Specially Modified Bradford Method. In: *Biochem. Physiol. Pflanz.* 177 (3), 251 – 258. DOI: 10.1016/S0015-3796(82)80008-5.
- APPENROTH, K.J., AUGSTEN, H., MATTNER, A., TELLER, S., DÖHLER, G. (1993): Effect of UVB irradiation on enzymes of nitrogen metabolism in turions of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden. In: *J. Photochem. Photobiol. B* 18 (2-3), 215 – 220. DOI: 10.1016/1011-1344(93)80066-I.
- APPENROTH, K.J., SREE, K.S., BOG, M., ECKER, J., SEELIGER, C., BÖHM, V., LORKOWSKI, S., SOMMER, K., VETTER, W., TOLZIN-BANASCH, K., KIRMSE, R., LEITERER, M., DAWCZYNSKI, C., LIEBISCH, G., JAHREIS, G. (2018): Nutritional value of the duckweed species of the genus *Wolffia* (Lemnaceae) as human food. In: *Front. Chem.* 6, 483. DOI: 10.3389/fchem.2018.00483.
- APPENROTH, K.J., SREE, K.S., BÖHM, V., HAMMANN, S., VETTER, W., LEITERER, M., JAHREIS, G. (2017): Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. In: *Food Chem.* 217, 266 – 273. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.116.
- ARTETXE, U., GARCÍA-PLAZAOLA, J.I., HERNÁNDEZ, A., BECERRIL, J.M. (2002): Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. In: *Plant Physiol. Biochem.* 40 (10), 859 – 863. DOI: 10.1016/S0981-9428(02)01446-8.
- BELLOF, G., SCHMIDT, E., RISTIC, M. (2005): Einfluss abgestufter Aminosäuren-Energie-Verhältnisse im Futter auf die Mastleistung und den Schlachtkörperwert einer langsam wachsenden Herkunft in der ökologischen Broilermast. In: *Arch. Geflügelk.* 69 (6), 252 – 260.
- BEUKELAAR, M.F. de, ZEINSTR, G.G., MES, J.J., FISCHER, A.R. (2019): Duckweed as human food. The influence of meal context and information on duckweed acceptability of Dutch consumers. In: *Food Quality and Preference* 71, 76 – 86. DOI: 10.1016/j.foodqual.2018.06.005.

BRAND, T., PETERSEN, F., DEMANN, J., WICHURA, A. (2021): First report on *Pythium myriotylum* as pathogen on duckweed (*Lemna minor* L.) in hydroponic systems in Germany. In: *Journal of Cultivated Plants* 73, 316 – 323. DOI: 10.5073/JFK.2021.09-10.02.

BVL L 00.00-19/1:2015-06 (2015): Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Elementspuren in Lebensmitteln - Druckaufschluss (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN EN 13805, Ausgabe Dezember 2014). Berlin: Beuth Verlag GmbH.

CAICEDO, J., VAN DER STEEN, N.P., ARCE, O., GIJZEN, H.J. (2000): Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). In: *Water Res.* 34 (15), 3829 – 3835. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00128-7.

CEDERGREEN, N., VINDBÆK MADSEN, T. (2002): Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. In: *New Phytol.* 155 (2), 285 – 292. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2002.00463.x.

CHAIPRAPAT, S., CHENG, J., CLASSEN, J.J., LIEHR, S.K. (2005): Role of internal nutrient storage in duckweed growth for swine wastewater treatment. In: *Transactions of the ASAE* 48 (6), 2247 – 2258. DOI: 10.13031/2013.20088.

CHAKRABARTI, R., CLARK, W.D., SHARMA, J.G., GOSWAMI, R.K., SHRIVASTAV, A.K., TOCHER, D.R. (2018): Mass production of *Lemna minor* and its amino acid and fatty acid profiles. In: *Front. Chem.* 6, 479. DOI: 10.3389/fchem.2018.00479.

CHANTIRATI, A., CHUMPAWADE, S. (2011): Effect of Heat-treatment on Ruminal Protein Degradability of *Wolffia* Meal (*Wolffia globosa* L. Wimm). In: *Asian J. of Animal Sciences* 5 (3), 183 – 189. DOI: 10.3923/ajas.2011.183.189.

CHANZANAGH, E.G., SEIFDAVATI, J., GHESHLAGH, F.M.A., ABDIBENEMAR, H., SEYEDSHARIFI, R. (2019): Protein Fractions of Some Plant and Animal Protein Sources Using CNCPS Method. In: 1, 1 – 6.

DEWANJI, A. (1993): Amino acid composition of leaf proteins extracted from some aquatic weeds. In: *J. Agric. Food Chem.* 41 (8), 1232 – 1236. DOI: 10.1021/jf00032a013.

DIN 38409-60:2019-12: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H) - Teil 60: Photometrische Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration in Wasser (H 60).

DIN EN 13805:2014-12 (2014): Lebensmittel-Bestimmung von Elementspuren-Druckaufschluss; Deutsche Fassung EN 13805:2014. Berlin: Beuth Verlag GmbH.

DIN EN 15621:2012-04: Futtermittel - Bestimmung von Calcium, Natrium, Phosphor, Magnesium, Kalium, Schwefel, Eisen, Zink, Kupfer, Mangan und Kobalt nach Druckaufschluss mittels ICP-AES.

DIN EN ISO 11885:2009-09: Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von ausgewählten Elementen durch induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie (ICP-OES).

DIN EN ISO 14902:2002-02 (2002): Futtermittel - Bestimmung der Trypsin-Inhibitor-Aktivität von Sojaerzeugnissen (ISO 14902:2001); Deutsche Fassung EN ISO 14902:2001. Berlin: Beuth Verlag GmbH.

DIN EN ISO 20079:2006-12: Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) - Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ISO 20079:2005).

- DRIEVER, S.M., VAN NES, E.H., ROIJACKERS, R.M.M. (2005): Growth limitation of *Lemna minor* due to high plant density. In: *Aquatic Botany* 81 (3), 245 – 251. DOI: 10.1016/j.aquabot.2004.12.002.
- EECKHOUT, W., PAEPE, M. de (1994): Total phosphorus, phytate-phosphorus and phytase activity in plant feedstuffs. In: *Animal Feed Science and Technology* 47 (1-2), 19 – 29. DOI: 10.1016/0377-8401(94)90156-2.
- EL-SHAFI, S.A., EL-GOHARY, F.A., NASR, F.A., VAN DER STEEN, N.P., GIJZEN, H.J. (2007): Nutrient recovery from domestic wastewater using a UASB-duckweed ponds system. In: *Bioresource technology* 98 (4), 798 – 807. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.03.011.
- EMERSON, K., RUSSO, R.C., LUND, R.E., THURSTON, R.V. (1975): Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations: Effect of pH and Temperature. In: *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32 (12), 2379 – 2383. DOI: 10.1139/f75-274.
- Europäisches Arzneibuch (2017): Amtliche deutsche Ausgabe (Ph. Eur. 8.0). Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- FANG, Y.Y., BABOURINA, O., RENGEL, Z., YANG, X.E., PU, P.M. (2007): Ammonium and nitrate uptake by the floating plant *Landoltia punctata*. In: *Annals of Botany* 99 (2), 365 – 370. DOI: 10.1093/aob/mcl264.
- FÄRBER, E., KÖNIGSHOFER, H., KANDELER, R. (1986): Ethylene Production and Overcrowding in Lemnaceae. In: *Journal of Plant Physiology* 124 (3-4), 379 – 384. DOI: 10.1016/S0176-1617(86)80050-5.
- FULLER, M.F. (2004): The encyclopedia of farm animal nutrition. Wallingford: CABI.
- GALLEGO, L.M., CHIEN, Y.-H., ANGELES JR, I.P. (2021): Effects of light source and photoperiod on growth of duckweed *Landoltia punctata* and its water quality. In: *Aqua. Res.* 53 (2), 398 – 408. DOI: 10.1111/are.15581.
- GOMPERTZ, B. (1825): On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. In: *Phil. Trans. R. Soc.* 115, 513 – 583. DOI: 10.1098/rstl.1825.0026.
- GWAZE, F.R., MWALE, M. (2015): The Prospect of Duckweed in Pig Nutrition. A Review. In: *J. Agric. Sci.* 7 (11), 189 – 199. DOI: 10.5539/jas.v7n11p189.
- HANCZAKOWSKI, P., SZYMCZYK, B., WAWRZYŃSKI, M. (1995): Composition and nutritive value of sewage-grown duckweed (*Lemna minor* L.) for rats. In: *Animal Feed Science and Technology* 52 (3-4), 339 – 343. DOI: 10.1016/0377-8401(94)00729-S.
- HAO, D.-L., ZHOU, J.-Y., YANG, S.-Y., QI, W., YANG, K.-J., SU, Y.-H. (2020): Function and Regulation of Ammonium Transporters in Plants. In: *IJMS* 21 (10), 3557. DOI: 10.3390/ijms21103557.
- HECHT, U., MOHR, H. (1990): Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings. In: *Physiol. Plant.* 78 (3), 379 – 387. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1990.tb09052.x.
- HELMS, T.C., ORF, J.H. (1998): Protein, Oil, and Yield of Soybean Lines Selected for Increased Protein. In: *Crop Sci.* 38 (3), 707 – 711. DOI: 10.2135/cropsci1998.0011183X003800030015x.

- HUTABARAT, R.C.S.M., INDRADEWA, D. (2020): Effects of water flow rate and surface cover plant density on the growth of duckweed (*Lemna minor* L.). In: *ipas* 5 (2), 98. DOI: 10.22146/ipas.46517.
- IATROU, E.I., KORA, E., STASINAKIS, A.S. (2019): Investigation of biomass production, crude protein and starch content in laboratory wastewater treatment systems planted with *Lemna minor* and *Lemna gibba*. In: *Environ. Technol.*, 2649 – 2656. DOI: 10.1080/09593330.2018.1448002.
- IQBAL, S. (1999): Duckweed aquaculture – Potentials, possibilities and limitations for combined wastewater treatment and animal feed production in developing countries. <https://www.coebbe.nl/sites/default/files/documenten/Duckweed-aquaculture.pdf>, zuletzt aktualisiert am 01.02.2017.
- ISLAM, S., ISLAM, R., KANDWAL, P., KHANAM, S., PROSHAD, R., KORMOKER, T., TUSHER, T.R. (2020): Nitrate transport and assimilation in plants: a potential review. In: *Archives of Agronomy and Soil Science*, 1 – 18. DOI: 10.1080/03650340.2020.1826042.
- JENSEN, M.H. (1999): HYDROPONICS WORLDWIDE. In: *Acta Hort.* (481), 719 – 730. DOI: 10.17660/ActaHortic.1999.481.87.
- KABIR, J., ISLAM, M.A., AHAMMAD, M.U., HOWLIDER, M.A.R. (2005): Use of duckweed (*Lemna minor*) in the diet of broiler. In: *Indian J. Anim. Res* 39, 31 – 35.
- KALITA, P., MUKHOPADHYAY, P.K., MUKHERJEE, A.K. (2007): Evaluation of the nutritional quality of four unexplored aquatic weeds from northeast India for the formulation of cost-effective fish feeds. In: *Food Chemistry* 103 (1), 204 – 209. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.007.
- KHAIRINA, Y., JOG, R.N., BOONMAK, C., TOYAMA, T., OYAMA, T., MORIKAWA, M. (2021): Indigenous bacteria, an excellent reservoir of functional plant growth promoters for enhancing duckweed biomass yield on site. In: *Chemosphere* 268, 129247. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129247.
- KHANUM, J., CHWALIBOG, A., HUQUE, K.S. (2005): Study on digestibility and feeding systems of duckweed in growing ducks. In: *Livestock Research for Rural Development* 17 (5).
- KHURANA, J.P., MAHESHWARI, S.C. (1983): Floral Induction in *Wolffia microscopica* by Salicylic Acid and Related Compounds under Non-inductive Long Days. In: *Plant and Cell Physiology* 24 (5), 907 – 912. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076594.
- KIM, E.J., UTTERBACK, P.L., PARSONS, C.M. (2012): Comparison of amino acid digestibility coefficients for soybean meal, canola meal, fish meal, and meat and bone meal among 3 different bioassays. In: *Poultry Science* 91 (6), 1350 – 1355. DOI: 10.3382/ps.2011-01861.
- KIRCHGESSNER, M., ROTH, F.X., SCHWARZ, F.J., STANGL, G.I. (Hrsg.) (2014): Tierernährung - Leitfaden für Studium und Praxis. Frankfurt am Main: DLG-Verlag.
- KÖRNER, S., DAS, S.K., VEENSTRA, S., VERMAAT, J.E. (2001): The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. In: *Aquatic Botany* 71 (1), 71 – 78. DOI: 10.1016/S0304-3770(01)00158-9.
- KUSINA, J., MUTISI, C., GOVERE, W., MHONA, R., MURENGA, K., NDAMBA, J., TAYLOR, P. (1999): Evaluation of Duckweed (*Lemna minor*) as a feed ingredient in the finisher diets of broiler chickens. In: *Jassa* 5 (1). DOI: 10.4314/jassa.v5i1.16905.

LANDOLT, E., KANDELER, R. (1987): Biosystematic Investigations in the Family of Duckweeds (Lemnaceae) (Vol. 4), The Family of Lemnaceae – A Monographic Study. Zürich: Geobotanisches Institut ETH.

LASFAR, S., MONETTE, F., MILLETTE, L., AZZOUZ, A. (2007): Intrinsic growth rate: a new approach to evaluate the effects of temperature, photoperiod and phosphorus-nitrogen concentrations on duckweed growth under controlled eutrophication. In: *Water Res.* 41 (11), 2333 – 2340. DOI: 10.1016/j.watres.2007.01.059.

LAWSON, T.B., BRAUD, H.J., WRATTEN, F.T. (1974): Methods of drying duckweed, Lemnaceae: American Society of Agricultural Engineers, Paper.

LENG, R.A., STAMBOLIE, J.H., BELL, R. (1995): Duckweed - a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish. In: *Livestock Research for Rural Development* 7, 36.

LEWICKI, P.P. (2006): Design of hot air drying for better foods. In: *Trends in Food Science & Technology* 17 (4), 153 – 163. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.10.012.

LI, Y., ZHANG, F., DAROCH, M., TANG, J. (2016): Positive effects of duckweed polycultures on starch and protein accumulation. In: *Bioscience reports* 36 (5). DOI: 10.1042/BSR20160158.

LICITRA, G., HERNANDEZ, T.M., VAN SOEST, P.J. (1996): Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. In: *Animal Feed Science and Technology* 57 (4), 347 – 358. DOI: 10.1016/0377-8401(95)00837-3.

LIU, C., DAI, Z., SUN, H. (2017): Potential of duckweed (*Lemna minor*) for removal of nitrogen and phosphorus from water under salt stress. In: *J. Environ. Manage.* 187, 497 – 503. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.11.006.

LLAMES, C.R., FONTAINE, J. (1994): Determination of Amino Acids in Feeds: Collaborative Study. In: *Journal of AOAC International* 77 (6), 1362 – 1402. DOI: 10.1093/JAOAC/77.6.1362.

LOPEZ, H.W., VALLERY, F., LEVRAT-VERNY, M.A., COUDRAY, C., DEMIGNÉ, C., RÉMÉSY, C. (2000): Dietary phytic acid and wheat bran enhance mucosal phytase activity in rat small intestine. In: *The Journal of nutrition* 130 (8), 2020 – 2025. DOI: 10.1093/jn/130.8.2020.

LY, J., PRESTON, T.R. (2001): In vitro estimates of nitrogen digestibility for pigs and water-soluble nitrogen are correlated in tropical forage feeds. In: *Livestock Research for Rural Development* 13.

LY, J., SAMKOL, P., PRESTON, T.R. (2002): Nutritional evaluation of aquatic plants for pigs: pepsin/pancreatin digestibility of six plant species. In: *Livestock Research for Rural Development* 14.

MARTINDALE, W., BOWES, G. (1996): The effects of irradiance and CO<sub>2</sub> on the activity and activation of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase in the aquatic plant *Spirodela polyrrhiza*. In: *J Exp Bot* 47 (6), 781 – 784. DOI: 10.1093/jxb/47.6.781.

MCLAY, C.L. (1976): The effect of pH on the population growth of three species of duckweed: *Spirodela oligorrhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza*. In: *Freshwater Biol* 6 (2), 125 – 136. DOI: 10.1111/j.1365-2427.1976.tb01596.x.

- MEHRER, I., MOHR, H. (1989): Ammonium toxicity: description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its causation. In: *Physiol. Plant.* 77 (4), 545 – 554. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1989.tb05390.x.
- MOHEDANO, R.A., COSTA, R.H.R., TAVARES, F.A., BELLI FILHO, P. (2012): High nutrient removal rate from swine wastes and protein biomass production by full-scale duckweed ponds. In: *Bioresour. Technol.* 112, 98 – 104. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.083.
- MONETTE, F., LASFAR, S., MILLETTE, L., AZZOUZ, A. (2006): Comprehensive modeling of mat density effect on duckweed (*Lemna minor*) growth under controlled eutrophication. In: *Water research* 40 (15), 2901 – 2910. DOI: 10.1016/j.watres.2006.05.026.
- NALLE, C.L., RAVINDRAN, V., RAVINDRAN, G. (2010): Nutritional value of faba beans (*Vicia faba* L.) for broilers: Apparent metabolisable energy, ileal amino acid digestibility and production performance. In: *Animal Feed Science and Technology* 156 (3), 104 – 111. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2010.01.010.
- NEGESSE, T., MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. (2009): Nutritive value of some non-conventional feed resources of Ethiopia determined by chemical analyses and an in vitro gas method. In: *Animal Feed Science and Technology* 154 (3-4), 204 – 217. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2009.09.010.
- PAOLACCI, S., HARRISON, S., JANSEN, M.A.K. (2018): The invasive duckweed *Lemna minuta* Kunth displays a different light utilisation strategy than native *Lemna minor* Linnaeus. In: *Aquat. Bot.* 146, 8 – 14. DOI: 10.1016/j.aquabot.2018.01.002.
- PETERSEN, F., DEMANN, J., RESTEMEYER, D., ULBRICH, A., OLFS, H.-W., WESTENDARP, H., APPENROTH, K.-J. (2021): Influence of the Nitrate-N to Ammonium-N Ratio on Relative Growth Rate and Crude Protein Content in the Duckweeds *Lemna minor* and *Wolffia hyalina*. In: *Plants* 10 (8), 1741. DOI: 10.3390/plants10081741.
- PLUMSTEAD, P.W., LEYTEM, A.B., MAGUIRE, R.O., SPEARS, J.W., KWANYUEN, P., BRAKE, J. (2008): Interaction of calcium and phytate in broiler diets. 1. Effects on apparent prececal digestibility and retention of phosphorus. In: *Poultry Science* 87 (3), 449 – 458. DOI: 10.3382/ps.2007-00231.
- RAVINDRAN, V., ADEOLA, O., RODEHUTSCORD, M., KLUTH, H., VAN DER KLIS, J.D., VAN EERDEN, E., HELMBRECHT, A. (2017): Determination of ileal digestibility of amino acids in raw materials for broiler chickens – Results of collaborative studies and assay recommendations. In: *Animal Feed Science and Technology* 225, 62 – 72. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2017.01.006.
- RAVINDRAN, V., BRYDEN, W.L. (1999): Amino acid availability in poultry—in vitro and in vivo measurements. In: *Aust. J. Agric. Res.* 50 (5), 889. DOI: 10.1071/AR98174.
- REID, W.S. (2004): Exploring duckweed (*Lemna gibba*) as a protein supplement for ruminants using the Boer goat (*Capra hircus*) as a model. Masterarbeit (M. Sc.). North Carolina State University Raleigh.
- ROIJACKERS, R., SZABÓ, S., SCHEFFER, M. (2004): Experimental analysis of the competition between algae and duckweed. In: *Arch. Hydrobiol.* 160 (3), 401 – 412. DOI: 10.1127/0003-9136/2004/0160-0401.

SAUVANT, D., PEREZ, J.-M., TRAN, G. (2004): Tables of composition and nutritional value of feed materials. Pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses and fish. 1. publ. Wageningen u.a.: Wageningen Academic Publ. [u.a.].

SHAMMOUT, M.W., ZAKARIA, H. (2015): Water lentils (duckweed) in Jordan irrigation ponds as a natural water bioremediation agent and protein source for broilers. In: *J. Ecol. Eng.* 83, 71 – 77. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2015.05.041.

STADTLANDER, T., FÖRSTER, S., ROSSKOTHEN, D., LEIBER, F. (2019): Slurry-grown duckweed (*Spiradela polyrhiza*) as a means to recycle nitrogen into feed for rainbow trout fry. In: *Journal of Cleaner Production* 228, 86 – 93. DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.04.196.

STEWART, J.J., ADAMS, W.W., ESCOBAR, C.M., LÓPEZ-POZO, M., DEMMIG-ADAMS, B. (2020): Growth and Essential Carotenoid Micronutrients in *Lemna gibba* as a Function of Growth Light Intensity. In: *Frontiers in plant science* 11, 480. DOI: 10.3389/fpls.2020.00480.

STEWART, J.J., ADAMS, W.W., LÓPEZ-POZO, M., DOHERTY GARCIA, N., MCNAMARA, M., ESCOBAR, C.M., DEMMIG-ADAMS, B. (2021): Features of the Duckweed *Lemna* That Support Rapid Growth under Extremes of Light Intensity. In: *Cells* 10 (6), 1481. DOI: 10.3390/cells10061481.

TAVERNARI, F.D.C., ROZA, L.F., SUREK, D., SORDI, C., SILVA, M.L.B.D., ALBINO, L.F.T., MIGLIORINI, M.J., PAIANO, D., BOIAGO, M.M. (2018): Apparent metabolisable energy and amino acid digestibility of microalgae *Spirulina platensis* as an ingredient in broiler chicken diets. In: *British Poultry Science* 59 (5), 562 – 567. DOI: 10.1080/00071668.2018.1496401.

TEUSCHER, E., LINDEQUIST, U., MELZIG, M.F. (2020): Biogene Arzneimittel. Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie. 8. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

THEANDER, O., WESTERLUND, E., ÅMAN, P., GRAHAM, H. (1989): Plant cell walls and monogastric diets. In: *Animal Feed Science and Technology* 23 (1-3), 205 – 225. DOI: 10.1016/0377-8401(89)90098-9.

TIAN, X., FANG, Y., JIN, Y., YI, Z., LI, J., DU, A., HE, K., HUANG, Y., ZHAO, H. (2021): Ammonium detoxification mechanism of ammonium-tolerant duckweed (*Landoltia punctata*) revealed by carbon and nitrogen metabolism under ammonium stress. In: *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* 277, 116834. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116834.

TOEPFL, S., SIEMER, C., SALDAÑA-NAVARRO, G., HEINZ, V. (2014): Overview of Pulsed Electric Fields Processing for Food. In: SUN, D.-W. (Hrsg.) „Emerging Technologies for Food Processing“: Elsevier, 93 – 114.

VAN DER HEIDE, T., ROIJACKERS, R.M.M., VAN NES, E.H., PEETERS, E.T. (2006): A simple equation for describing the temperature dependent growth of free-floating macrophytes. In: *Aquatic Botany* 84 (2), 171 – 175. DOI: 10.1016/j.aquabot.2005.09.004.

VDLUFA (2004): VDLUFA-Methodenbuch Band 3 "Futtermitteluntersuchung", Methode 4.1.2 "Bestimmung von Rohprotein mittels Dumas-Verbrennungsmethode". Darmstadt: VDLUFA-Verlag.

VDLUFA (2012a): VDLUFA-Methodenbuch Band 1 „Die Untersuchung der Böden“, Methode A 6.1.1.1 "Bestimmung von Nitrat-Stickstoff durch UV-Absorption". 4. Aufl. Darmstadt: VDLUFA-Verlag.

VDLUFA (2012b): VDLUFA-Methodenbuch Band 1 „Die Untersuchung der Böden“, Methode A 6.1.4.1 “Bestimmung von mineralischem Stickstoff (Nitrat und Ammonium) in Bodenprofilen (Nmin-Labormethode)”. Darmstadt: VDLUFA-Verlag.

VDLUFA (Hrsg.) (2012c): VDLUFA-Methodenbuch Band 3 "Die chemische Untersuchung von Futtermitteln". 3. Aufl. Darmstadt: VDLUFA-Verlag.

VERMA, R., SUTHAR, S. (2015): Impact of density loads on performance of duckweed bio-reactor. A potential system for synchronized wastewater treatment and energy biomass production. In: *Environ. Prog. Sustainable Energy* 34 (6), 1596 – 1604. DOI: 10.1002/ep.12157.

Verordnung (EG) Nr. 152/2009 (: Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27 Januar 2009 zur Festlegung der Probennahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln. AB L 54/1.

WALSH, É., KUEHNHOLD, H., O'BRIEN, S., COUGHLAN, N.E., JANSEN, M.A.K. (2021): Light intensity alters the phytoremediation potential of *Lemna minor*. In: *Environ Sci Pollut Res* 28 (13), 16394 – 16407. DOI: 10.1007/s11356-020-11792-y.

WALSH, É., PAOLACCI, S., BURNELL, G., JANSEN, M.A.K. (2020): The importance of the calcium-to-magnesium ratio for phytoremediation of dairy industry wastewater using the aquatic plant *Lemna minor* L. In: *International journal of phytoremediation*, 1 – 9. DOI: 10.1080/15226514.2019.1707478.

WEDGE, R.M., BURRIS, J.E. (1982): Effects of light and temperature on duckweed photosynthesis. In: *Aquat. Bot.* 13, 133 – 140. DOI: 10.1016/0304-3770(82)90047-X.

WHEELER, R.M., MACKOWIAK, C.L., SAGER, J.C., KNOTT, W.M., BERRY, W.L. (1996): Proximate composition of CELSS crops grown in NASA's biomass production chamber. In: *Adv. Space Res.* 18 (4-5), 43 – 47. DOI: 10.1016/0273-1177(95)00860-H.

WPSA (1984): The prediction of apparent metabolizable energy values for poultry in compound feeds. In: *World's Poult. Sci. J.* 40, 181 – 182.

XU, Y.-L., TAN, L., GUO, L., YANG, G.-L., LI, Q., LAI, F., HE, K.-Z., JIN, Y., DU, A., FANG, Y., ZHAO, H. (2019): Increasing starch productivity of *Spirodela polyrhiza* by precisely control the spectral composition and nutrients status. In: *Ind Crops Prod* 134, 284 – 291. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.04.002.

YIN, Y., YU, C., YU, L., ZHAO, J., SUN, C., MA, Y., ZHOU, G. (2015): The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. In: *Bioresource technology* 187, 84 – 90. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.03.097.

ZELLER, E., SCHOLLENBERGER, M., KÜHN, I., RODEHUTSCORD, M. (2015): Hydrolysis of phytate and formation of inositol phosphate isomers without or with supplemented phytases in different segments of the digestive tract of broilers. In: *Journal of nutritional science* 4 (e1), 1-12. DOI: 10.1017/jns.2014.62.

ZHANG, K., CHEN, Y.-P., ZHANG, T.-T., ZHAO, Y., SHEN, Y., HUANG, L., GAO, X., GUO, J.-S. (2014): The logistic growth of duckweed (*Lemna minor*) and kinetics of ammonium uptake. In: *Environ. Technol.* 35 (5), 562 – 567. DOI: 10.1080/09593330.2013.837937.

ZHANG, X., CHEN, H., WU, D., GU, W., SUN, X., CHEN, J., WU, Q. (2018): Determination of Free Amino Acids in Three Species of Duckweed (Lemnaceae). In: *Journal of Food Quality* 2018, 1 – 15. DOI: 10.1155/2018/7673652.

ZHONG, Y., LE WANG, MA, Z., DU, X. (2021): Physiological responses and transcriptome analysis of *Spirodela polyrhiza* under red, blue, and white light. In: *Planta* 255 (1), 11. DOI: 10.1007/s00425-021-03764-4.

ZIEGLER, P., ADELMANN, K., ZIMMER, S., SCHMIDT, C., APPENROTH, K.J. (2015): Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. In: *Plant Biol.* 17, 33 – 41. DOI: 10.1111/plb.12184.