



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

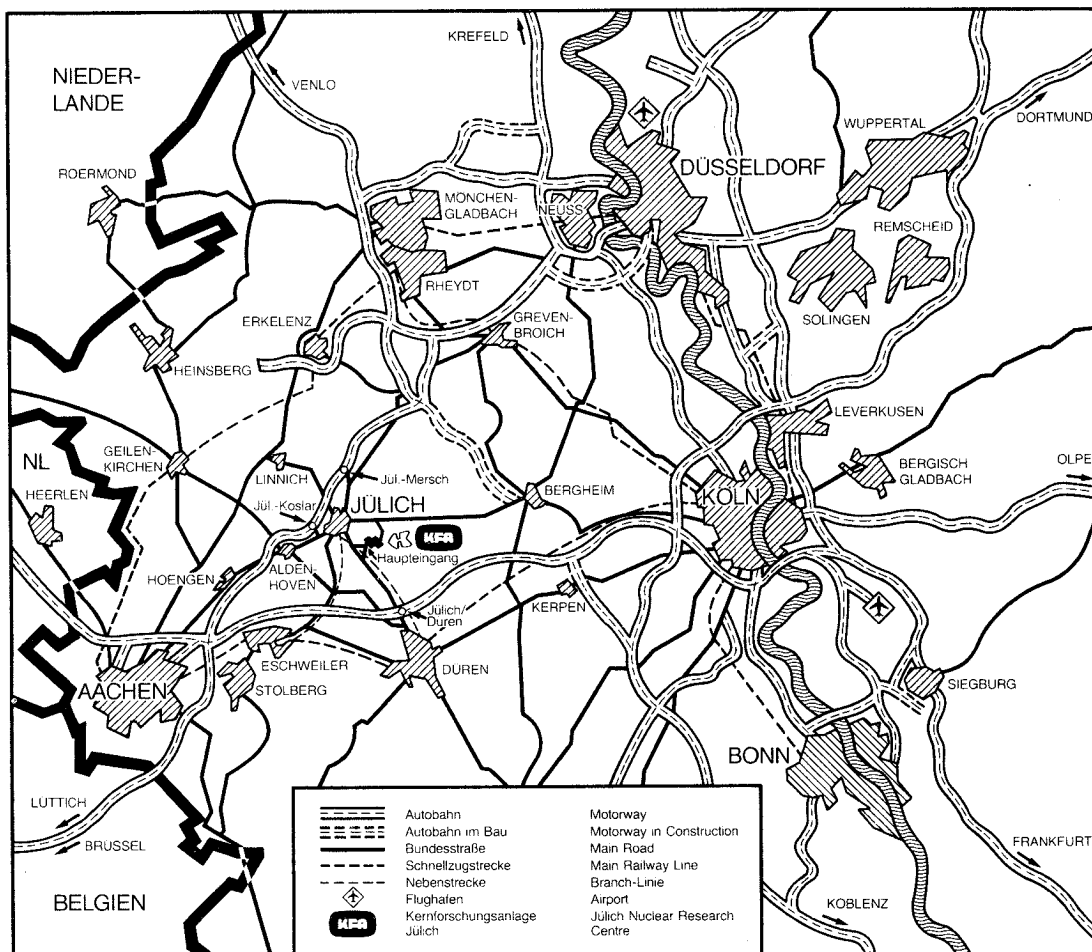
Institut für Biotechnologie

**Nutzung von 1-Naphthalinsulfonsäure
als Schwefelquelle für die
Grünalge *Scenedesmus obliquus*
im Vergleich mit Sulfat**

von

Markus Luther

Jül-2236
Oktober 1988
ISSN 0366-0885



Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2236
 Institut für Biotechnologie Jül-2236

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
 Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
 Telefon: 02461/610 · Telex: 833 556-0 kf d

**Nutzung von 1-Naphthalinsulfonsäure
als Schwefelquelle für die
Grünalge *Scenedesmus obliquus*
im Vergleich mit Sulfat**

von

Markus Luther

D 82 (Diss. T.H. Aachen)

Abstract

Naphthalenesulfonic acids are mainly used for the manufacture of dyes and tensides for the textile industry. As rather persistent xenobiotics, they are not or only slowly degraded in wastewater treatment plants. Up to 10% of the total organic carbon in the river Rhine results from sulfonic acids.

In batch experiments, it is shown, that the green alga *Scenedesmus obliquus* was able to use 1-naphthalenesulfonic acid as sulfur source, even in the presence of moderate concentrations of sulfate. At higher sulfate concentrations, the uptake and use of the naphthalenesulfonic acid was reduced largely.

In continuous culture (tubidostat), the growth of *Scenedesmus obliquus* with 1-naphthalenesulfonic acid was extremely slow compared with growth obtained with sulfate as sole sulfur source. Growth rates were higher at lower pH-values and since the naphthalenesulfonic acid uptake is coupled with the growth rate, higher naphthalene sulfonic acid removal rates were obtained. The removal efficiency of approximately 14% could be increased to 35% with feedback algal biomass in a specially constructed chemostat.

With radioactive labelled naphthalenesulfonic acid, it could be shown that *Scenedesmus obliquus* is able to take up naphthalenesulfonic acid without any adaptation and removes the sulfonic acid group from the molecule as sulfur source, leaving the naphthalene ring undegradated.

Cell-free extracts of *Scenedesmus obliquus* showed higher desulfonation rates compared to the in-vitro experiments. Desulfonation was catalysed by enzymes which needed NAD as cofactor. In cell-free extract, sulfite was found as the desulfonation product, beside 1-naphthol, 1,4-tetralon, and 1,4-naphthochinone as organic metabolites.

Inhaltsverzeichnis

1.0	Einleitung	1
2.0	Material und Methoden	6
2.1	Organismen	6
2.2	Kulturtechnik	6
2.2.1	Nährlösungen	6
2.2.1.1	Medien für die kontinuierlichen Versuche	8
2.2.1.2	Inkubationen mit markierten Sulfonsäuren	8
2.2.2	Stammkultur	12
2.2.3	Vorkultur	12
2.3	Kultursysteme	13
2.3.1	Kultursystem für die Batchversuche	13
2.3.2	Kontinuierliche Kulturen im Turbidostaten	14
2.3.3	Kontinuierliche Kulturen im Chemostaten mit Biomasserückhaltung	17
2.3.4	Kontrolle auf Fremdinfection	20
2.3.5	Bestimmung der Quantenflußdichte	20
2.3.6	Messung der optischen Dichte	21
2.3.7	Ermittlung des Trockengewichtes	21
2.4	Analysen	21
2.5	Analyse der Pigmente	21
2.5.1	Bestimmung des Gesamtchlorophyllgehaltes	22
2.5.2	Bestimmung des Gesamtcarotinoidgehaltes	24
2.6	Organische Kohlenstoffbestimmung der Algen (POC - Bestimmung)	24
2.7	Bestimmung des C-H-N - Verhältnisses der Biomasse	25
2.8	Bestimmung von Sulfit	25
2.9	Bestimmung von Sulfat	26
2.9.1	Sulfatbestimmung mittels Bariumchlorid	26
2.9.2	Probenaufbereitung für die Ionenbestimmung	26
2.9.3	Sulfatbestimmung mittels Ionenaustauschchromatographie	27
2.9.4	Theorie der Ionenaustauschchromatographie	27
2.9.5	Aufbau des Ionenchromatographen	28
2.9.6	Analyse der Sulfationen	28
2.10	Aromatenbestimmung mittels Ionenpaarchromatographie	29
2.10.1	Theorie der Ionenpaarchromatographie	29
2.10.2	Analyse der Aromaten	30

2.11	Enzymisolation	32
2.11.1.1	Zellabtrennung	32
2.11.1.2	Zellaufschluß	32
2.11.1.3	Erstellung des Rohextraktes	32
2.11.1.4	Löslichkeitsfraktionierung	32
2.11.1.5	Entsalzung der ausgefällten Fraktionen	33
2.12	Proteinbestimmung	33
2.13	Identifikation der Abbauprodukte	33
2.14	Synthese von 1-Naphthalinsulfonsäure	34
2.14.1	Umsetzung von 1-Naphthalinsulfonsäurechlorid zu 1-Naphthalinsulfonsäure	34
2.14.2	Synthese von schwefel- und kohlenstoff-markierter Naphthalinsulfonsäure	35
2.14.2.1	Besonderheiten bei der ^{35}S -Markierung	36
2.14.2.2	Besonderheiten bei der ^{14}C -Markierung	37
2.15	Messungen mit dem LSC	38
2.15.1	Probenvorbereitung	38
2.15.2	Korrektur des Quenching	38
2.16	Theoretische Grundlagen der Wachstumsberechnung	40
2.17	Statistische Auswertung und Zeichnung von Meßdaten	41
3.0	Resultate	42
3.1	Versuche mit Batchkulturen	42
3.1.1	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit verschiedenen Sulfatkonzentrationen als S-Quelle	43
3.1.2	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit verschiedenen 1-NS Konzentrationen als S-Quelle	53
3.1.3	Einfluß der Restsulfatkonzentration bei gleichzeitiger Zugabe von 0.217mM 1-NS	61
3.1.4	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit Sulfat und Sulfonsäure nach "S" - freier Vorinkubation	64
3.1.5	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> bei gleichzeitiger Gabe von 0.217mM 1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen	68
3.2	Kontinuierliche Kulturen mit <i>Scenedesmus obliquus</i>	77
3.2.1	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> im Turbidostaten bei einer Sulfatkonzentration von 0.14 mM	78

3.2.2	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> im Turbidostaten bei einer	
	1-NS-Konzentration von 0.869 mM	84
3.2.2.1	Die Einfahrphase	84
3.2.2.2	Versuche bei konstanter Zugabe von 0.869 mM 1-NS	89
3.2.3	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit 0.869 mM 1 - NS in Gegenwart von	
	verschiedenen Sulfatkonzentrationen	94
3.2.4	Zur pH-Abhängigkeit des Sulfat- und Sulfonat- limitierten Wachstums	
	von <i>Sc.obliquus</i>	100
3.2.5	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> im Chemostaten mit kontinuierlicher	
	Biomasserückhaltung	107
3.2.5.1	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit 0.0703 mM Sulfat und 0.869 mM	
	1-NS	107
3.2.5.2	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit 0.112 mM Sulfat und 0.869 mM	
	1-NS	112
3.3	Versuche mit radioaktiv - markiertem Substanzen	118
3.3.1	Langzeitversuche mit radioaktiven Substanzen	118
3.3.1.1	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit inhomogen geträgerter	
	1-Naphthalinsulfonsäure (S-markiert)	118
3.3.1.2	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit homogen geträgerter	
	1-Naphthalinsul fonsäure (S-markiert)	125
3.3.1.3	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit Sulfat (S-markiert)	129
3.3.1.4	Wachstum von <i>Sc. obliquus</i> mit	
	C-markierter-1-Naphthalinsulfonsäure	131
3.3.2	Kurzzeitversuche mit radioaktiven Substanzen	133
3.3.2.1	Aufnahmekinetik für Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure	133
3.3.2.2	Zur pH-Abhängigkeit der Aufnahme von Sulfat und	
	1-Napthalinsulfonsäure	135
3.3.2.3	Aufnahme von Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure in Na- und K-	
	freiem Medium	137
3.3.2.4	Aufnahme von Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure in Anwesenheit	
	von Valinomycin	139
3.4	Versuche mit Zellrohextrakt	140
3.4.1	Haltbarkeit des Zellrohexraktes	140
3.4.2	Reinigung des Zellrohexraktes	142
3.4.3	Temperaturabhängigkeit der Desulfonierung	144
3.4.4	Einfluß der 1-NS-Konzentration und des Proteingehaltes auf die	
	enzymatische Desulfonierung	145

3.4.5	Sulfitbildung aus der enzymatischen Desulfonierung	148
3.4.6	Einfluß von Cofaktoren auf die enzymatische Desulfonierung	149
3.4.7	Sulfatbildung als Sekundärmetabolit der Desulfonierung	151
3.5	Abbauprodukte von 1-Naphthalinsulfonsäure	153
3.5.1	Referenzsubstanzen	156
3.5.2	Identifikation der Abbauprodukte	162
3.5.2.1	Proben aus dem Batchversuch	162
3.5.2.2	Probe aus einer kontinuierlichen Kultur	164
3.5.2.3	Probe aus dem Versuch mit Zellrohexrakt	165
4.0	Diskussion	167
4.1	Batchkulturen	167
4.2	Kontinuierliche Kulturen	179
4.3	Die Optimierung der Desulfonierung von 1-Naphthalinsulfonsäure	181
4.4	Transport von Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenzelle	183
4.5	Enzymatische Desulfonierung	184
4.6	Abbauprodukte der Desulfonierung	186
4.7	Einordnung der Desulfonierung in den biologischen Zusammenhang	187
4.8	Ausblick für die Abwasserreinigung	188
5.0	Zusammenfassung	190
6.0	Literaturverzeichnis	193
7.0	Verzeichnis der Abbildungen	207
8.0	Danksagung	211

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Bq.	Becquerel
MBq.	Megabecquerel
TBq.	Terabecquerel
bzw.	beziehungsweise
C	Temperatur in Celsius
ca.	Circa
Car.	Carotinoid
Chl a	Chlorophyll a
cm	Centimeter
CPM	Counts per minutes
D	Verdünnungsrate
d	Tag
d	pro Tag
d.h.	das heißt
DOC	Dissolved organic carbon
DPM	Desintegrations per minutes
E	Extinktion
g	Gramm

GMT	Greenwich Mean Time
h	Stunde
h	pro Stunde
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IBT	Institut für Biotechnologie in der Kernforschungsanlage Jülich
Kap.	Kapitel
K oder K	Halbsättigungskonstante
l	Liter
LSC	Liquid Scintillation Counter
M	Mol
mM	Millimol
μ M	Mikromol
m	Meter
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
ml	Milliliter
μ l	Mikrometer
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
μ	Wachstumsrate
μ E	Mikroeinstein

N	Normalität
n	Anzahl der Meßwerte
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
1-NS	1-Naphthalinsulfonsäure
OD	Optische Dichte bei 560nm
o.g.	oben genannten
pers.	persönlich
r	Korrelationskoeffizient
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAG	Sammlung für Algenkulturen, Göttingen
Sc.	<i>Scenedesmus</i>
sec	Sekunde
sp.	Spezies
s.S.	siehe Seite
t	Zeit
Tab.	Tabelle
V	Volt
vgl.	vergleiche
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

1.0 Einleitung

Naphthalinsulfonsäuren sind wichtige Ausgangsstoffe für eine Reihe von Produkten der chemischen Industrie. So benutzt die textilverarbeitende Industrie Naphthalinsulfonsäuren als Netzmittel, um bei Textilfasern die Oberflächenspannung herabzusetzen, wodurch sie für Farbstoffe und andere Veredelungsprozesse zugänglich werden (Schweitzer, 1964; Ullmann, 1960). Ebenso setzt man sie als Additive dem Motoröl zu, um den Ölfilmabrieb bei laufendem Motorbetrieb zu verhindern (Jentsch, 1978). Naphthalinsulfonsäuren werden weiterhin als wichtige Ausgangsprodukte der chemischen Farbstoffproduktion benötigt, wo sie als Komponenten zur Farbstoffherstellung, hauptsächlich für Säurefarbstoffe, Verwendung finden. Hier werden Naphthalinsulfonsäuren zu Hydroxynaphthalinsulfonsäuren, Aminosulfonsäuren oder Aminohydroxynaphthalinsulfonsäuren umgesetzt, und dann als Farbstoffzwischenprodukte zu Farbstoffen weiterverarbeitet (Ullmann, 1979; Schweitzer, 1964).

Hergestellt werden Sulfonsäuren üblicherweise im Chargen-Betrieb. Sie werden meist als Natriumsalze ausgefällt, wodurch eine Ausbeute von 90 - 96% erzielt wird. Der Rest gelangt ins Abwasser. Da Naphthalinsulfonsäure relativ persistent sind - sie gelten als Xenobiotica, d.h. nicht in der Natur vorkommende, anthropogene Substanzen - ist es nicht verwunderlich, daß sie in Binnengewässern nachgewiesen werden. Aus einer Untersuchung von Malle (1978) ging hervor, daß im Rhein je nach Wasserführung 7 - 15% der gelösten organischen Substanzen Sulfonsäuren sind, d.h. zum Teil auch Naphthalinsulfonsäuren.

Naphthalinsulfonsäuren werden als Problemstoffe angesehen (Quentin, 1978; Zahn und Wellens, 1980), da sie weder in Kläranlagen degradiert oder abgebaut werden, noch aufgrund ihrer sehr guten Wasserlöslichkeit an den Belebtschlamm adsorbiert werden. Sie stellen für die Farbstoffindustrie ein Problem dar, da für sie, wenn sie in Fabrikabwässern in deutliche faßbaren Konzentrationen vorliegen, nach dem Abwasserabgabengesetz Gebühren entrichtet werden müssen.

Der biologische aerobe Abbau bzw. die Oxidation (Hydroxylierung) von aromatischen Verbindungen hängt von der enzymatischen Ausstattung der Mikroorganismen und von dem Aromaten selbst ab. So werden an den Aromaten entweder durch eine Dioxygenase zwei Hydroxylgruppen (Ensley, 1982; Cerniglia, 1980) oder durch eine Monooxygenase eine Hydroxylgruppe substituiert (Cerniglia, 1980; Smith, 1979). In beiden Fällen wird molekularer in der wässrigen

Phase gelöster Sauerstoff benötigt (Schegel, 1981), wobei im Falle der Dioxygenase beide Sauerstoffatome in den Aromaten eingebaut werden, im Falle der Monooxygenase nur ein Atom, während das andere mit Wasserstoff des dazu nötigen Wasserstoffdonators zu Wasser reduziert wird. Nach der Hydroxylierung kann der Ring weiter oxidiert werden, was zum Aufbrechen des Aromaten führt, so daß er dann metabolisiert werden kann. Die Hydroxylierbarkeit von Aromaten wird jedoch eingeschränkt, wenn nicht sogar unmöglich, wenn am aromatischen Ring Chlor-, Nitro-, Sulfonatgruppen substituiert sind (Knackmuss, 1976; Reinecke et al., 1978).

Viele Forschungen über die Abbaubarkeit sulfonierter Aromaten durch Bakterien betrafen den Abbau von linearen Alkylbenzoesulfonaten (LAS) (Großler u. Miess, 1987), die in großen Mengen (90000 t/a) als Waschmitteltenside in die Kläranlage gelangen, wo sie mindestens zu 80% abbaubar sein müssen (BGBL, 1986). Diese Stoffklasse scheint in den Kläranlagen relativ gut abbaubar zu sein.

Knackmuss und Mitarbeiter (Brilon, 1981) konnten nach langwieriger Selektion Bakterien isolieren, die in der Lage waren, 1-Naphthalinsulfonsäure und 2-Naphthalinsulfonsäure als Kohlenstoffquelle zu nutzen, wobei als erster Metabolit 1,2-cis-Dihydroxynaphthalindiol gefunden wurde. Dies ließ den Schluß zu, daß diese Reaktion durch eine Dioxygenase katalysiert wurde. Gab man den Bakterien jedoch Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquellen an, so reicherten sich im Medium einfache Hydroxynaphthaline wie 2-Naphthol beim Einsatz von 2-Naphthalinsulfonsäure an, die nicht weiter verwertet werden konnte (Zürner et al., 1987). Hier mußte die Desulfonierung durch eine Monooxygenase erfolgt sein.

Ebenso wie mit Bakterien wurde auch mit Mikroalgen versucht, substituierte aromatische Verbindungen zu metabolisieren. Daß man normalerweise Algen nicht zur Abwasserreinigung einsetzt, hängt wohl damit zusammen, daß sie für einfache Kohlenstoffverbindungen wie Acetat eine wesentlich geringere Substratspezifität besitzen als die Bakterien (Fingerhut, 1985) und somit im Mischsystem autotroph wachsen. Dadurch sind sie im Vergleich zu Bakterien bei der Abwasserreinigung "uninteressante Organismen". Hinzu kommt noch, daß Algen-Bakterien-Mischsysteme eine schlechte Raum-Zeit-Ausbeute aufweisen, so daß solche sie aufgrund des großen Anfalls von Abwasser in unseren Breiten nicht eingesetzt werden.

In einem umfangreichen Testprogramm wurde bei der Firma Henkel untersucht, ob Algen - Bakterien - Mischkulturen Xenobiotika wie z.B. 2-Nitrophenol, 3,4,-Dichlorphenol und 1,5-Naphthalindisulfonsäure abbauen konnten (Steber, 1985). Dort konnte methodisch bedingt keine unterstützende Wirkung des bakteriellen Abbaues solcher Xenobiotika durch die Anwesenheit von Mikroalgen festgestellt werden.

Dennoch sind Mikroalgen in der Lage, aromatische Verbindungen zumindest zum Teil zu metabolisieren. So konnte Cerniglia et al. (1980, 1980) nachweisen, daß Cyanobakterien Naphthalin und Biphenyle hydroxylieren können. Ebenso war die Grünalge *Chlamydomonas* sp. in der Lage, 2-Chlor-,3,5-Dinitrobenzoat zur 2-Hydroxy-muconsäure-semialdehyd zu metabolisieren, auch wenn das Reaktionsprodukt von ihr nicht zum Biomasseaufbau verwertet wurde (Jacobson u. Alexander, 1963).

Bei dem Abbau sulfonierter aromatischer Verbindungen konnten Biedlingmaier und Schmidt (1983) zeigen, daß sulfonierte Detergenzien wie LAS von der Grünalge *Chlorella fusca* als Schwefelquelle genutzt werden konnte, wobei die Verfügbarkeit des Schwefels von der Länge der Seitenkette des LAS abhing. Ebenso konnten sie zeigen, daß bei Zugabe von verschiedenen organischen Schwefelverbindungen die Schlüsselenzyme des Schwefelmetabolismus und der Chlorophyllgehalt der Algen sehr beeinträchtigt wurden, d.h. die Algen wiesen Mangelercheinungen auf (Biedlingmaier u. Schmidt, 1987; Krauss u. Schmidt, 1987). Soeder et al. (1987) wiesen ebenfalls nach, daß verschiedene Grünalgen 1-Naphthalinsulfonsäure und 2-Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle nutzen konnten, wobei die Algen bis zu 80% des Wachstums erreichten, die sie sonst in sulfathaltigem Medium erzielten. Als Abbauprodukt wurde 1-Naphthol aus der Desulfonierung von 1-Naphthalinsulfonsäure gefunden. Wurden geringe Mengen an Sulfat hinzugefügt, stieg wohl die Wachstumsrate der Algen, aber nicht die Desulfonierungsrate. In meiner Diplomarbeit (1984) konnte ich nachweisen, daß die Grünalge *Scenedesmus obliquus* verschiedene Naphthalinsulfonsäuren als Schwefelquelle nutzen konnten, wobei je nach Naphthalinsulfonsäure die Alge verschiedene Wachstumsraten aufwies (siehe Abb. 1).

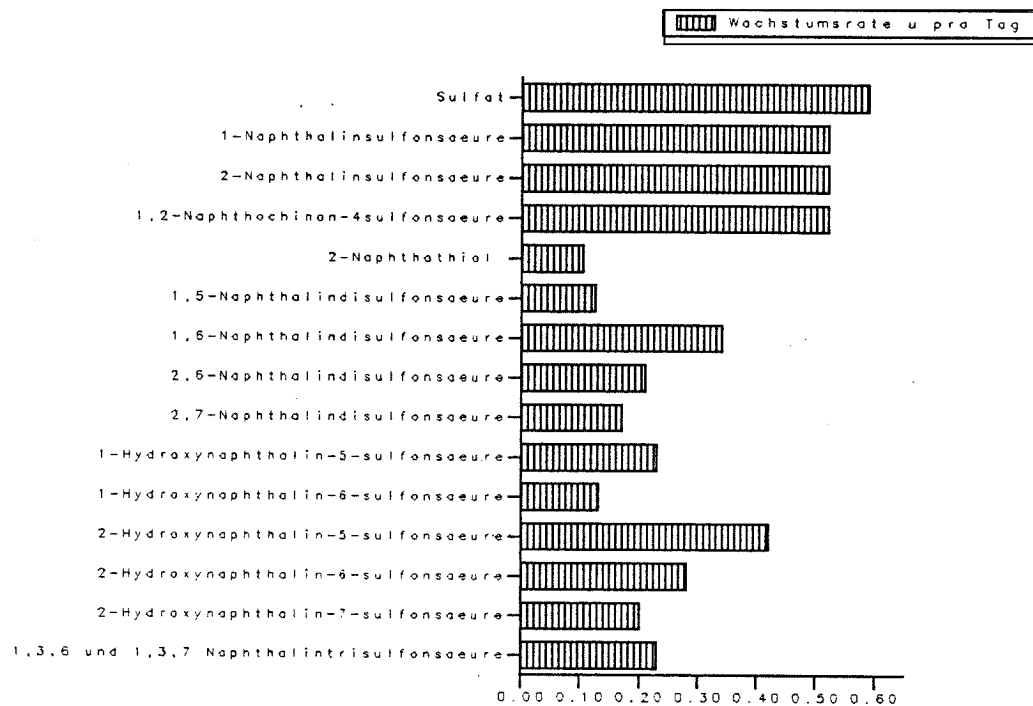


Abb. 1. Wachstum von *Sc.obliquus* in verschiedenen Naphthalinsulfonsäuren als Schwefelquelle

Unter diesen Sulfonsäuren waren sowohl Mono-, Di-, Trisulfonate als auch Hydroxynaphthalinsulfonsäuren. Je nach Sulfonsäure zeigten die Algen nach einer Adaptationsperiode unterschiedlichste Wachstumsraten. Ebenso wurde das aus der Desulfonierung von 1-Naphthalinsulfonsäure entstehende 1-Naphthol untersucht und festgestellt, daß 1-Naphthol sich abiotisch verändert und somit nur noch zum Teil nachgewiesen werden konnte. Die kalkulierten Desulfonierungsraten zeigten, daß unter diesen Bedingungen die Algen die 1-Naphthalinsulfonsäure mit weitaus geringen Raten desulfonierten als bei Soeder et al. (1987) beschrieben wurde. Dieses wurde auf die erheblichen Unterschiede in den Wachstumsbedingungen für die Algen zurückgeführt (Luther u. Soeder, 1987).

In der hier vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welche Unterschiede zeigen sich, wenn *Scenedesmus obliquus* einerseits mit Sulfat, andererseits 1-Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle zur Verfügung steht?
2. Welchen Einfluß hat Sulfat auf die Desulfonierung von 1-Naphthalinsulfonsäure, wenn beide Schwefelquellen den Algen gleichzeitig zur Verfügung stehen?
3. Lassen sich die in semistatischer Kultur gewonnenen Ergebnisse in kontinuierlicher Kultur verifizieren?
4. Wie kann die Desulfonierung durch Veränderung von Kultivierungsparametern gesteigert werden?
5. Stimmen die Abnahmeraten der 1-Naphthalinsulfonsäure im Medium mit dem Einbau von ^{35}S -markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in den Algen überein, d.h. gibt es eine Kopplung zwischen Biomasseproduktion und Desulfonierung?
6. Bauen die Algen den Kohlenstoff des aromatischen Ringes in ihre Biomasse ein?
7. Welche enzymatische Reaktion katalysiert die Desulfonierung?
8. In welcher Form liegt der abgespaltene Schwefel vor?
9. Welche weiteren Abbauprodukte außer 1-Naphthol entstehen aus der Desulfonierung von 1-Naphthalinsulfonsäure?
10. Wie wird die 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algen aufgenommen?
11. Was läßt sich über den Mechanismus der Aufnahme von 1-NS in die Algen aussagen?

2.0 Material und Methoden

2.1 Organismen

Scenedesmus obliquus (SAG 276-3a) wurde für die Versuche ausgewählt, da sie als ubiquitär vorkommende Süßwasseralge bekannt ist (Uherkovich, 1966; Hegewald, 1981). Da sie bei den Versuchen von Soeder et al. (1987) im Vergleich zu anderen Algen gute Wachstumsraten mit 1-Naphthalin-sulfonsäure als Schwefelquelle aufwies, und auch bei den Versuchen mit 14 verschiedenen Sulfonsäuren erfolgreich eingesetzt wurde (Luther, 1984), war sie für die weitere Arbeit am geeignetsten.

2.2 Kulturtechnik

2.2.1 Nährlösungen

Die Nährlösung N8, in der *Scenedesmus obliquus* optimal wächst, geht auf Soeder et al. (1967) zurück; die Spurenelementlösung PAZ auf Payer et Trültzsch (1972). Sie wurde für die Versuche modifiziert, ohne daß die Ionenkonzentrationen geändert wurden.

Im einzelnen setzte sich die **Nährlösung N8** aus folgenden Substanzen zusammen:

KNO ₃	1000	mg/l
CaCl ₂ ·x5H ₂ O	10	mg/l
Na ₂ HPO ₄ ·x12H ₂ O	260	mg/l
KH ₂ PO ₄	740	mg/l
MgSO ₄ ·x7H ₂ O	50	mg/l
FeEDTA	1	ml/l
Spurenelementlösung	1	ml/l
entionisiertes H ₂ O	ad 1000ml	

Spurenelement - Stammlösung:

MnCl ₂ ·x4H ₂ O	99	mg/l
ZnSO ₄ ·x7H ₂ O	6.3	mg/l
NiSO ₄ ·x6H ₂ O	26.3	mg/l
CoSO ₄ ·x7H ₂ O	2.81	mg/l
CuSO ₄ ·x5H ₂ O	4.99	mg/l
Al(SO ₄) ₃ ·x18H ₂ O	6.66	mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·x4H ₂ O	1.76	mg/l
NH ₄ VO ₃	2.91	mg/l
KJ	249	mg/l
KBr	238	mg/l
LiCl	8.48	mg/l
H ₃ BO ₃	30.9	mg/l

FeEDTA - Stammlösung:

Fe(NO ₃) ₃	1.447	mg/l
EDTA (Titriplex III)	1.33	mg/l

Es zeigte sich aber durch die quantitative Bestimmung des Sulfates mittels Ionenchromatographie, daß die eingewogene Menge von 50mg/l Sulfat nicht der gewünschten Konzentration von 2.02×10^{-4} M/l entsprach, sondern nur 1.4×10^{-4} M/l. Dieses bedeutete, daß das MgSO₄ mehr Wassermoleküle besaß, als angegeben war.

Das Medium wurde für die Versuche mit 1-Naphthalinsulfonsäure als Schwefel - Quelle wie folgt modifiziert:

1. Die FeEDTA - Stammlösung nach Soeder (1967) wurde ursprünglich mit FeSO₄ angesetzt, was den Sulfatgehalt des Mediums um 23µg/l erhöhte. FeEDTA wurde daraufhin mit FeNO₃ angesetzt.
2. Bei den Abbauprobversuchen mit den Sulfonsäuren wurde das Magnesium des MgSO₄ durch MgCl₂·x6H₂O (4,18mg/l) ausgetauscht.

Trotzdem war der Restsulfatgehalt noch ca. 1.1mg/l, verursacht durch die Verunreinigung anderer Chemikalien.

Das Wasser wurde zuerst über eine Umkehrosmoseanlage (Millipore RO 60) und dannach nochmal durch eine nachgeschaltete Christ - Ministil - Anlage entionisiert

Alle Medien wurden im Autoklaven bei 121°C in Glasbehältern autoklaviert.

2.2.1.1 Medien für die kontinuierlichen Versuche

Bei den Versuchen mit gleichzeitiger Sulfat- und 1 - Naphthalinsulfonsäuregabe wurde das $MgCl_2$ so dosiert, daß die Gesamtmagnesiumkonzentration mit der des N8-Medium (Kap.2.2.1) übereinstimmte.

Für das pH - abhängige Wachstum der Algen im Turbidostaten wurde der Phosphatpuffer auf ein Zehntel reduziert, um weniger an Lauge und Säure ins System titrieren zu müssen. Als Lauge wurde 1 N NaOH und als Säure 1 N ortho - Phosphorsäure verwandt.

Die Aufbereitung des Wassers und die Sterilisation der Medien erfolgte wie in Kap. 2.2.1. beschrieben.

2.2.1.2 Inkubationen mit markierten Sulfonsäuren

Langzeitinkubationen mit markierter 1-NS:

Zur Überprüfung der Versuchsergebnisse mit nicht radioaktiven Substanzen wurden die Algen über einen Zeitraum von fünf Tagen mit den Radioisotopen als Schwefelquelle inkubiert.

Einen Überblick über die durchgeführten Versuchsansätze gibt folgende Tabelle:

Nr.	Vorkultur	Kulturmedium
1	N8	N8 + ^{35}S 1-NS inhomogen
2	N8 + 1-NS	N8 + ^{35}S 1-NS inhomogen
3	N8 + 1-NS, S-frei	N8 + ^{35}S 1-NS inhomogen
4	N8 + 1-NS	N8 + ^{35}S 1-NS homogen
5	N8 + 1-NS, S-frei	N8 + ^{35}S 1-NS homogen
6	N8	N8 + ^{35}S markiertes SO_4^{2-}
7	N8	N8 + ^{14}C markierte 1-NS

Tab. 1: Langzeitinkubationen mit markierter 1-NS

Die Bezeichnung homogene und inhomogene 1-Naphthalinsulfonsäure geht auf die Trägerung des radioaktiven Syntheseproduktes zurück. Detailliert ist dieses in Kap.2.14.1 beschrieben.

Alle Kulturen hatten ein Gesamtvolumen von 75 ml. Die Versuchsansätze wurden zweifach angesetzt und ausgewertet.

Die markierten 1-NS wurde den Kulturmedien in Form von zuvor angesetzten Stammlösungen zugesetzt, deren Konzentration jeweils 7,5 g/l betrug. Durch Zusatz von je 1ml Stammlösung zu 74 ml Kulturmedium wurde eine 1-NS Konzentration von 100 mg 1-NS/l erreicht.

Für Versuch Nr. 6 wurde eine Stammlösung mit 10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /l angesetzt, welcher 50 μl einer ^{35}S markierten Sulfatlösung (Amersham Buchler, Art. Nr. SJS.1) zugegeben wurde. Dies rief keine wesentliche Änderung der Sulfatkonzentration in der Stammlösung hervor, da das Präparat bei einem Gesamtvolumen von etwa 1 ml und einer Gesamtaktivität von 37 MBq (1 mCi) eine spezifische Aktivität von 0,9 - 1,5 TBq (10^{12} Bq) pro mg Schwefel besaß. Damit ergab sich eine Erhöhung des Sulfatgehalts der Stammlösung von etwa 12 μg . Durch Zugabe von 962 μl der Stammlösung zu den Kulturmedien wurde eine Sulfatkonzentration von 50mg/l eingestellt.

An jedem Tag wurde die OD der Kultursuspension gemessen, und aus jedem Kolben eine Probe von 5 ml entnommen. Die Abtrennung der Algen vom Kulturmedium erfolgte durch Filtrierung der Proben über Sterilfilter (Satorius) mit 0,2 μm Porenweite. Der Algenniederschlag wurde je einmal mit ca. 5 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Aktivität der an den Filtern haftenden Algen

wurden mit einem Liquid Scintillator Counter (LSC) bestimmt. Die für die Quantifizierung notwendigen Standardlösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

Versuche 1-5: 3x je 50 μ l Stammlösung ^{35}S 1-NS inhomogen bzw. homogen + 950 μ l H_2O + 10 ml Insta-Gel

Versuch 6: 2x je 1 ml Inkubationslösung ohne Algen + 10 ml Insta-Gel

Versuch 7: 2x je 1 ml Inkubationslösung ohne Algen + 10 ml Insta-Gel

Kurzzeitinkubationen:

Durch Kurzzeitinkubationen über einen Zeitraum von maximal 90 Minuten sollte die Beeinflussung der Aufnahme von Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure durch Änderung der Milieubedingungen (pH-Wert, Na^+ - und K^+ -freies Medium, Zugabe von Valinomycin) untersucht werden.

Für jeden der drei nachfolgend beschriebenen Versuche wurden je 100 ml Algensuspension mit etwa 1 g TS/l aus einer Turbidostatenkultur entnommen. Diese Suspension wurde dreimal zentrifugiert und jeweils in S-freiem N8 Medium resuspendiert. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Algen in 10 ml S-freiem N8 Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden jeweils 250 μ l in 10 ml S-freies N8 Medium im Schüttelkolben gegeben, so daß die Ansätze etwa 200 mg TS/l hatten. Vor dem Zusatz der ^{35}S markierten 1-NS (inhomogen) bzw. des $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ wurden die Algen 30 Minuten lang zur Adaption an die jeweiligen Bedingungen (pH des Mediums, Abwesenheit von Na^+ bzw. K^+) vorinkubiert. Die markierten Verbindungen wurden dann konzentriert in Form von Stammlösungen zugesetzt. Die eingestellte Konzentration für die Ansätze mit 1-NS war 100 mg/l für Sulfat 50 mg/l. Das Gesamtvolumen der Ansätze war nach Zusatz der Algen und der Radiochemikalien etwa 10 ml (Ausnahme: Inkubation über 90 Minuten etwa 50 ml). Alle Ansätze wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Probennahme wurde jedem Kolben 5ml Suspension entnommen und die darin enthaltenen Algen über Sterilfilter (Satorius) mit 0,2 μ m Porenweite abfiltriert. Die Aktivität der an den Filtern haftenden Algen wurde, wie in Kap. 2.15. beschrieben, bestimmt. Eine

Quantifizierung der Meßwerte wurde nicht durchgeführt, da keine Standardproben gemessen wurden.

Inkubation über 90 Minuten:

Um die Aufnahmegeschwindigkeit der Sulfonsäure und des Sulfates ermitteln zu können, wurden folgende Ansätze durchgeführt:

	Medium	radiochemischer Zusatz
1	N8, S-frei	^{35}S 1-NS inhomogen
2	N8, S-frei	^{35}S markiertes Sulfat

Jedem der Medien wurde sofort nach Zusatz der markierten Substanzen (0 Minuten) und dann nach 15, 30, 60 und 90 Minuten eine Probe entnommen:

Inkubation bei verschiedenen pH-Werten des Kulturmediums:

Mit Natronlauge bzw. Salzsäure wurden die pH-Werte der Kulturmedien in Abstufungen von pH 0,5 auf 5,5 bis 9,0 eingestellt. Dem einen Teil der Medien wurde ^{35}S 1-NS zugesetzt und 15 Minuten lang inkubiert, dem anderen Teil ^{35}S markiertes Sulfat und 2 Minuten lang inkubiert, so daß für beide Inkubationsarten eine vollständige pH-Reihe erhalten wurde.

Inkubation in Na- bzw. K-freiem Kulturmedium:

Es wurde in folgenden Medien jeweils mit ^{35}S 1-NS und Sulfat inkubiert:

N8 Medium

Na-freies Medium: wie N8, Na_2HPO_4 ersetzt durch K_2HPO_4

K-freies Medium: wie N8, KNO_3 ersetzt durch $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2,36 g/l) und KH_2PO_4 ersetzt durch NaH_2PO_4

Inkubation mit Valinomycin:

Es wurde in folgenden Medien jeweils mit ^{35}S 1-NS und Sulfat inkubiert:

N8 Medium

N8 Medium mit Valinomycin (5 μmol)

N8 Medium, K^+ -frei mit Valinomycin (5 μmol)

2.2.2 Stammkultur

Die Algen wurde aus der Stammsammlung des IBT-3 der Kernforschungsanlage Jülich entnommen. Sie wurden dort auf Schrägagar gezogen und in einer Klimakammer bei Wechsellicht gehalten.

2.2.3 Vorkultur

Mit einer Impföse wurde die Alge *Scendesmus obliquus* direkt vom Schrägagar in einen mit N8-Medium gefüllten Erlenmeyerkolben überimpft. Nach 2-3 Wochen hatten die Algen die Wachstumsraten erreicht, um für die eigentlichen Versuche eingesetzt werden zu können.

2.3 Kultursysteme

2.3.1 Kultursystem für die Batchversuche

Die Versuche wurden in Schüttelkolben durchgeführt, wie sie auch in der Toxizitätsprüfung verwandt werden bzw. vorgeschrieben sind (Brinkmann u. Kühn, 1974, 1977, 1980; Trahant et al., 1979; Anon, 1971; Galassi u. Vighi, 1981; OECD, 1983).

Die Vorkulturen aus dem N8-Medium wurden dann in die eigentlichen Kulturmedien (50 ml) überimpft, wobei eine optische Dichte von $E_{570} = 0.05$ eingestellt wurde. Die Versuchsdauer betrug fünf Tage. Anschließend wurden die Algen dreimal in frisches Medium überimpft, und konnten sich so an das jeweilige Medium adaptieren. Als sich die Wachstumsraten der Algen nicht mehr von denen des vorherigen Ansatzes änderten, konnten die eigentlichen Messungen durchgeführt werden.

Als Kultursystem dienten 250ml Thunberg-Küvetten; dieses sind Erlenmeyer-Kolben mit 2 Schikanen und einem Rundküvetten-Ansatz, der direkte Messung der optischen Dichte im Photometer (Dr.Lange, Medico- Photometer) zuläßt.

Die Küvetten wurden mit Wattestopfen geschlossen, so daß ein Gasaustausch mit der Atmosphäre bestand. Die Turbulenz in den Küvetten wurde durch ein Tischschüttelgerät (Infors TU I) mit 125 rpm erzeugt. Die im Labor befindliche Klimaanlage hielt die Temperatur auf $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Beleuchtet wurden die Kulturen mit 6 Leuchtstoffröhren (Osram I, white cool, 40W), die 25 cm oberhalb des Tabulators angebracht waren. Diese gaben durch direkte Einstrahlung Licht in einer Lichtstärke von $117 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Da der Tabulator des Tischschüttelgerätes aus einer Aluminiumplatte bestand, wurde ein nicht unerheblicher Teil des eingestrahnten Licht von $71 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ reflektiert, wodurch die Beschattung der Kultur durch den Wattestopfen vermindert wurde.

Die Versuche wurden im Dauerlicht durchgeführt, was den Vergleich im Tubidostaten möglich machte.

Jeder Inkubationsansatz bei einer bestimmten Schwefelkonzentration wurde im Doppelansatz angesetzt, um eventuelle Wachstumsschwankungen der Algenkulturen auszugleichen.

Die Versuche wurden mit der Organismenkonzentration, die der gewünschten Ausgangs- Optischen Dichte (OD) im Kulturgefäß entsprach, gestartet.

Das Inoculum der Kulturen wurde wie folgt berechnet:

$$v = \frac{OD_o}{OD_x} v_r$$

v = Volumen des Inoculums

OD_o = gewünschte Ausgangs - OD im Kulturgefäß

OD_x = OD des Inoculums

v_r = Volumen des Kulturgefäßes

2.3.2 Kontinuierliche Kulturen im Turbidostaten

Der Turbidostat als kontinuierliches Kultursystem für die Algen wurde gewählt, weil die Algen unter den jeweils eingestellten Biomassekonzentrationen im Fermenter immer mit maximaler Wachstumsrate wachsen (Pirt, 1975). Im Gegensatz zum Chemostaten als kontinuierliches Kultursystem, bei dem der Mediumszufluß eingestellt wird, und somit sich die Biomassekonzentration im Fermenter nach dem Nährstoffangebot richtet, wird der Mediumszufluß durch die Wachstumsrate der Algen geregelt. Denn steigt die Biomassekonzentration, die durch das Durchflußphotometer permanent gemessen wird, im Fermenter über den eingestellten Wert an, wird durch den Mediumszufluß die Konzentration auf den eingestellten Wert zurückverdünnt.

Der höhere apparative Aufwand bringt den Vorteil, daß der Übergang von einem Fließgleichgewicht zum nächsten wesentlich schneller erfolgt als im Chemostaten. Während im Chemostaten dieser Übergang mindestens drei Aufenthaltszeiten benötigt wird, stellt sich im Turbidostaten das neue Fließgleichgewicht sofort ein. Aufgrund der Vielzahl von Experimenten war somit der Turbidostat geeigneter als der Chemostat, da die "Totzeiten" minimal waren.

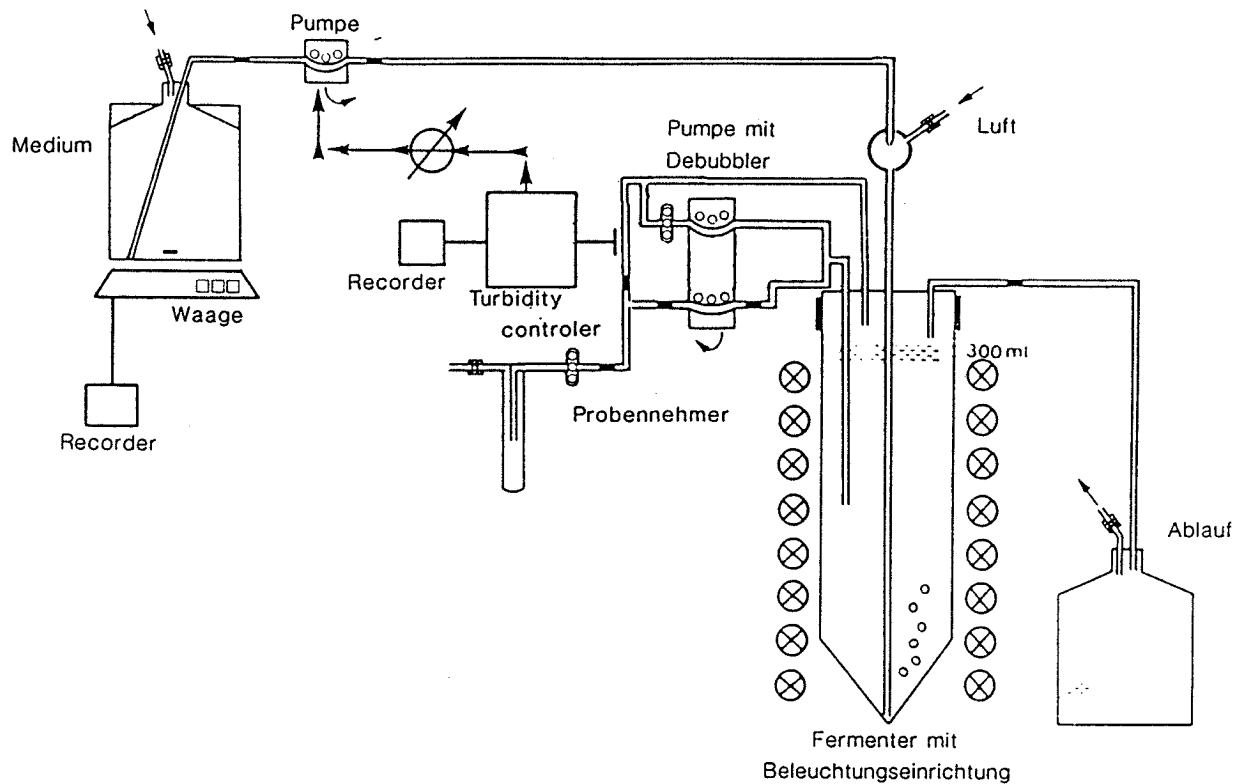


Abb. 2. Aufbau des Turbidostaten

Als Fermentergefäß diente ein 2000ml Glasgefäß vom Typ nach Soeder und Groeneweg (1978). Der Fermenter besaß 4 Öffnungen, von denen zwei für die Nährstoffversorgung (Mediumszulauf und Fermenterablauf) benötigt wurden, die zwei anderen für den Bypass (Zu- und Ablauf).

Die Nährlösung wurde durch eine Pumpe (Gilson, Minipuls 2) aus der Vorratsflasche abgepumpt. Der Medienfilm wurde direkt über dem Kulturgefäß durch einen Tropfenfänger unterbrochen, der ein mögliches Rückwandern der Organismen in die Medienflasche verhinderte. Zusammen mit dem dort zugeleiteten Gasgemisch aus Luft und 1% CO₂, das über einen Sterilfilter in den Medienfluß eingeleitet wurde, wurde die Nährlösung durch ein Glasrohr direkt über dem Boden des

Reaktors in das Gefäß eingeleitet. Dieses Versorgungssystem bewirkte eine sofortige Durchmischung der Kultur mit neuem Medium und eine hohe Turbulenz, so daß sich die Algen nicht am Boden absetzen konnten. Der sich im Fermenter aufbauende Überdruck bewirkte gleichzeitig als Niveauregelung einen kontinuierlichen Austritt der Kultursuspension, die in einer Auffangflasche gesammelt wurde.

Die Verbindungen von der Vorrats- wie zur Auffangflasche bestanden aus Teflonschläuchen mit einem Querschnitt von 1,5mm. Dieser geringe Durchmesser hielt das Totvolumen in den Schläuchen möglichst gering. Um den Austausch der Flaschen und der Pumpenschläuche zu ermöglichen, wurden Schnelkupplungen aus VA-Stahl (Schlüter,1984; Fingerhut,1985) genommen, die nach Abflammen einen infektionsfreien Anschluß ermöglichten.

Die Temperatur wurde konstant gehalten, indem der Fermenter in einem temperierbaren Wasserbad stand, welches auf eine Temperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ eingestellt wurde.

Beleuchtet wurde die Kultur durch eine Lichtbank, in der 8 Leuchtstoffröhren (Osram Lumilux-white, 65 W, 220V) angebracht waren. Diese gaben eine Beleuchtungsstärke von $200 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$.

Der Bypass war nötig, um kontinuierlich die Biomasse erfassen und kontrollieren zu können. Als Meß- und Regeleinrichtung wurde ein Turbidity Controller (New Brunswick Scientific, Modell TD 200) verwandt, der mittels einer Durchlaufküvette kontinuierlich die Biomasse ermittelte und daraufhin die Pumpe des Mediumzulaufes ansteuerte. Für den Bypass wurde eine Schlauchpumpe (Watson-Marlow, 502S/R) mit einem Fördervolumen von 200ml/min verwendet, (innerer Schlauchquerschnitt von 4mm). Um einen schnellen Fluß in den Silikonschläuchen zu ermöglichen, wurden diese auf einen Querschnitt von 2mm verkleinert. Damit ein Austausch von Teilen des Bypasses möglich war, wurden Glasrohre als Kupplungen mit einem Querschnitt von 2mm genommen.

Das Probenentnahmesystem wurde so flexibel gestaltet, daß es nach Art der zu bestimmenden Parameter entweder das gesamte System ausgetauscht werden konnte (Reagenzgläser gegen Meßzylinder) oder aber nur über einen Schraubverschluß verbundene Probeentnahmegefäße der verschiedenen Größen. Somit konnte man das Probenvolumen von 5ml bis 100ml variieren. Auch war es durch dieses System möglich, das Inoculum in die Kultur einzubringen, indem die Pumpe in gegengesetzter Richtung pumpte und so das Inoculum aus dem Probengefäß ansaugte.

Für die Versuche mit konstanter pH-Regelung wurde der Bypass erweitert, indem eine pH-Elektrode mit Durchlaufgefäß (Ingold-Elektrode, Best.-Nr.402-611 und 612) eingefügt wurde. Als pH - Meter wurde ein Meßgerät (Kuntze, UN 11.3) an die Elektrode angeschlossen, daß zum einen den Vorteil hat, daß eine Vergleichselektrode an den selben Meßgeber angeschlossen wurde und damit die Nacheichung der sterilisierten sich in dem System befindlichen Elektrode einfacher war, zum anderen, daß die anzusteuernde Hubkolbenpumpe (B.Braun, FE 211) so angesteuert werden konnten, daß Abweichungen vom eingestellten pH-Wert durch Titration ausgeglichen werden konnten.

Da der Bypass zusätzlich zu der Belüftung Turbulenz erzeugte, wurde die Säure- bzw. Laugezufuhr (1n HCl bzw. 1n NaOH) an den Bypass angeschlossen. Dadurch war eine schnelle Durchmischung der Kultursuspension gegeben.

2.3.3 Kontinuierliche Kulturen im Chemostaten mit Biomasserückhaltung

Aufgrund der Ergebnisse im Turbidostaten mußte das Kultursystem nun so modifiziert werden, daß zum einen eine gute Nährstoffversorgung gewährleistet war, zum anderen die Produktivität der Algen erhöht werden konnte. So wurde ein Chemostat mit kontrollierter Biomasserückführung aufgebaut. Auch wenn kontinuierlich Medium in den Fermenter einfloß, wodurch das System einen Chemostaten darstellte, glich das Gesamtsystem mehr einem Turbidostaten. Denn ebenso wie im turbidostatischen Aufbau wurde die Biomasse permanent kontrolliert und konstant gehalten. Wurde der eingestellte Wert der Biomassekonzentration unterschritten, so wurde solange die Kultursuspension mittels Cross-flow-Filtration eingengt, bis die Konzentration wieder erreicht war. Der somit ermittelte Ablauf entsprach dann der maximalen Wachstumsrate unter den eingestellten Bedingungen.

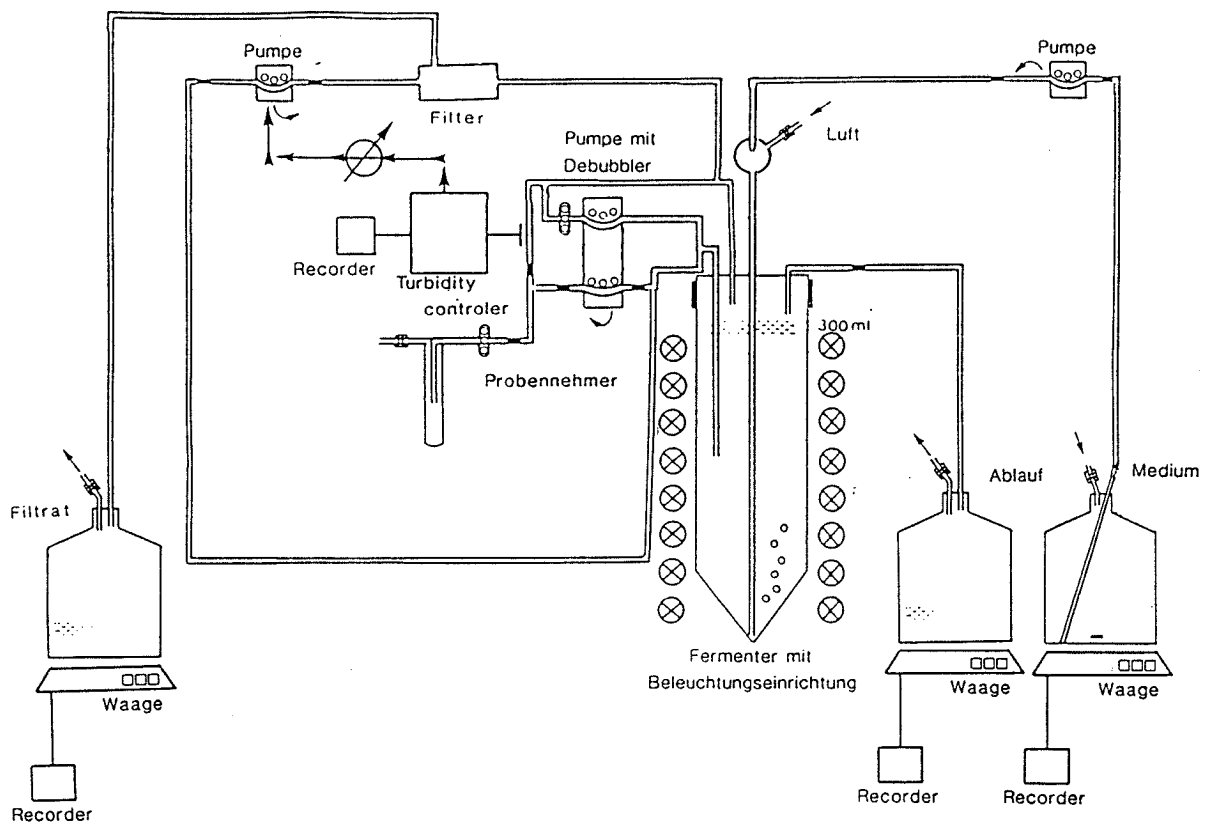


Abb. 3. Schema des Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung

Die Nährlösung wurde durch eine Pumpe (Gilson, Minipuls 2) aus der Vorratsflasche abgepumpt. Der Medienfilm wurde direkt über dem Kulturgefäß durch einen Tropfenfänger unterbrochen, der ein mögliches Rückwandern der Organismen in die Medienflasche verhinderte. Zusammen mit dem dort zugeleiteten Gasgemisch aus Luft und 1% CO₂ das über einen Sterilfilter in den Medienfluß eingeleitet wurde, wurde die Nährlösung durch ein Glasrohr direkt über dem Boden des Reaktors in das Gefäß eingeleitet. Dieses Versorgungssystem bewirkte eine sofortige Durchmischung der Kultur mit neuem Medium und eine hohe Turbulenz, durch die die Algen sich nicht am Boden absetzen konnten. Der sich im Fermenter aufbauende Überdruck bewirkte gleichzeitig als Niveauregelung einen kontinuier-

lichen Austritt der Kultursuspension, die in einer Auffangflasche gesammelt wurde.

Die Verbindungen von der Vorrats- wie zu der Auffangflasche bestanden aus Teflonschläuchen mit einem Querschnitt von 1,5 mm. Dieser geringe Durchmesser hielt das Totvolumen in den Schläuchen möglichst gering. Um den Austausch der Flaschen und den Pumpenschläuchen zu ermöglichen wurden Schnellkupplungen aus VA-Stahl (Schlüter, 1984; Fingerhut, 1985) genommen, die einen infektionsfreien Anschluß ermöglichten.

Die Temperatur wurde konstant gehalten, indem der Fermenter in einem temperierbaren Wasserbad stand, welches eine Temperatur von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ besaß.

Beleuchtet wurde die Kultur durch eine Lichtbank, in der 8 Leuchtstoffröhren (Osram Lumilux-white, 65 W, 220 V) angebracht waren. Diese gaben eine Beleuchtungsstärke von $200 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{sec}^{-1}$.

Zur kontinuierlichen Erfassung der Biomasse und zur Biomasserückhaltung war ein Bypass erforderlich.

Im Bypass erfolgte folgende Aufteilung:

1. Ein Teil der Nährlösung wurde zur kontinuierlichen Erfassung der Biomassekonzentration gebraucht. Als Meß- und Regeleinrichtung wurde ein Turbidity controller (New Brunswick Scientific, Modell TD 200) verwandt, der mittels einer Durchlaufküvette kontinuierlich die Biomasse ermittelte und daraufhin die Pumpe zum Filter ansteuerte. Für den Bypass diente eine Pumpe (Watson-Marlow, 502S/R) mit einem Födervolumen von 200 ml/min, bei einem Schlauchquerschnitt von 4mm innen. Um einen schnellen Fluß in den Silikonschläuchen zu ermöglichen, wurden diese mit einem Querschnitt von 2 mm gewählt. Um einen Austausch von Teilen des Bypasses zu ermöglichen, wurden Glasrohre als Kupplungen mit einem Querschnitt von 2 mm genommen.
2. Die restliche Nährlösung wurde über ein Biomasserückhaltesystem geschickt, das aus einer Glasröhre mit 300 ml Fassungsvermögen bestand, in der ein Polypropylenschlauch (Enka) gespannt war. Das Schlauchmaterial war normalerweise hydrophob und konnte durch Alkohol hydrophil gemacht werden. Durch Staudruck wurde ein Teil der Kultursuspension ohne Algen nach außen gedrückt. Dieses Filtrat wurde durch eine Pumpe (B. Braun FE 211) in eine Auffangflasche abgeführt. Der Staudruck wurde dadurch erzeugt, daß der Zulaufschlauch einen Innendurchmesser von 6 mm hatte, der Auslaufschlauch nur von 2 mm.

Um zu verhindern, daß sich die Algen an der Innenwand des Polypropylen-schlauches anhefteten, wurde eine Pumpe (Watson- Marlow 502S) gewählt, die pulsierend pumpte.

Der Zulauf der Nährlösung, der Ablauf und der Ablauf des Filtrats wurden getrennt aufgezeichnet. Die Gefäße standen auf Waagen (Sartorius); die Gewichts-differenzen wurden über einen AD-Wandler (Sartorius) auf einem Hybridrecorder (Chessell, Mod. 4001) aufgezeichnet.

2.3.4 Kontrolle auf Fremdinfection

Die Kulturen wurden jede Woche einmal auf Fremdinfection durch Bakterien untersucht; dies geschah durch Ausstreichen der Kultursuspension auf Bakterienagar.

Dieser wurde wie folgt angesetzt:

- 1 Liter N8 - Nährlösung
- 2.5g Nährbouillon (Art. No. 5443)
- 10 g Agar

Der Agar wurde gekocht, autoklaviert und in Petrischalen gegossen.

1 ml der Kultursuspension wurde auf dem Agar ausgestrichen und 2 Tage im Brutschrank bei 30°C bebrütet.

Wurden Bakterienkolonien auf dem Agar gefunden, so wurde die Kultursuspension verworfen und neu angesetzt.

2.3.5 Bestimmung der Quantenflußdichte

Die Quantenflußdichte wurde mit einem Sensor (Li - 190 SB) und angeschlossenem Quantenflußmeter (Li - 185 B) der Fa. Lamda Instruments Corporation gemessen. Der Sensor erfaßte nur die Quantenmenge der photosynthetisch wirksamen Strahlung (400 - 700nm) in $\mu E \times m^{-2} \times s^{-1}$, unabhängig von der Energie der Photonen.

2.3.6 Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte diente als Wachstumsparameter. Zur Messung wurde ein Dr.Lange Medico-Photometer mit einem Gilson-Filter 570nm benutzt. Die Küvetten waren Präzisionsrundglasküvetten mit einem Querschnitt von 2cm. Dieses Photometer wurde einem Spektralphotometer vorgezogen, da eine gute Korrelation zwischen Trockengewicht und optischer Dichte bestand, wie es auch von Hartig (1986) beschrieben ist.

2.3.7 Ermittlung des Trockengewichtes

Das Trockengewicht der Algen wurde durch Filtrieren und anschließendem Trocknen des Filters bestimmt.

Je nach der optischen Dichte der Algensuspension wurden 10 - 50ml der Suspension mit einem 0,2 μ m Membranfilter (Sartorius) abgefiltert. Die Filter wurden zuvor 1 h im Trockenschrank bei 105°C getrocknet und das Leergewicht bestimmt. Die abgefilterten Algen wurden wiederum 1 h im Trockenschrank getrocknet und dann ausgewogen. Die Differenz ergab dann das Trockengewicht der Algen.

Bei jeder Probennahme wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Da bei jedem Steady-State mindestens 5 Messungen der Trockengewichte vorgenommen wurden, war die Abweichung vom Mittelwert nicht größer als 10%.

2.4 Analysen

2.5 Analyse der Pigmente

Wichtige Parameter zur Bestimmung des physiologischen Zustands der Algen sind die Gehalte der Chlorophylle und Carotinoide. Unter S-limitierten Bedingungen trat bei den Versuchen eine Änderung der Färbung der Algen von Grün zu Bläugelb auf. Dieses wurde auch von Bolze und Soeder (1978) beobachtet.

Während der Batchversuche wurden die Pigmente der Algen jeden Tag bestimmt. War das arithmetrische Mittel aus den Doppelansätzen größer als 10%, so wurde die Messung verworfen.

Bei der Bestimmung der Pigmente der Algen im Turbidostaten wurden pro Steady-State mindestens 5 Doppelbestimmungen durchgeführt, so daß insgesamt die Standardabweichung nicht größer als 10% war.

2.5.1 Bestimmung des Gesamtchlorophyllgehaltes

Die hier angewandte Bestimmung des Gesamtchlorophylls wurde von Nusch (1980) beschrieben. Sie wurde wie folgt modifiziert, wobei auf die Resultate von Satory (1982) zurückgegriffen wurde, der Chlorophyllmessungen verglichen und optimiert hatte.

3 - 10ml Kultursuspension wurden 5 Minuten bei 5500 rpm (Ecco - Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Algen in 3ml mit $MgSO_4$ gesättigten, absoluten Äthanol resuspendiert. Die Algen wurden 10 Minuten bei 78°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben wurde erneut zentrifugiert, und der Überstand bei 775nm und 665nm gemessen. Alle Aufbereitungsschritte nach dem 1. Schritt erfolgten im Dunkeln.

Zur Differenzierung zwischen Chlorophyll und Phaeophytin wurde das Chlorophyll durch Ansäuren mit HCl ($5 \times 10^{-3} mmol/l$) in Phaeophytin überführt und nach 10 Minuten nochmals bei den Wellenlängen im Photometer gemessen.

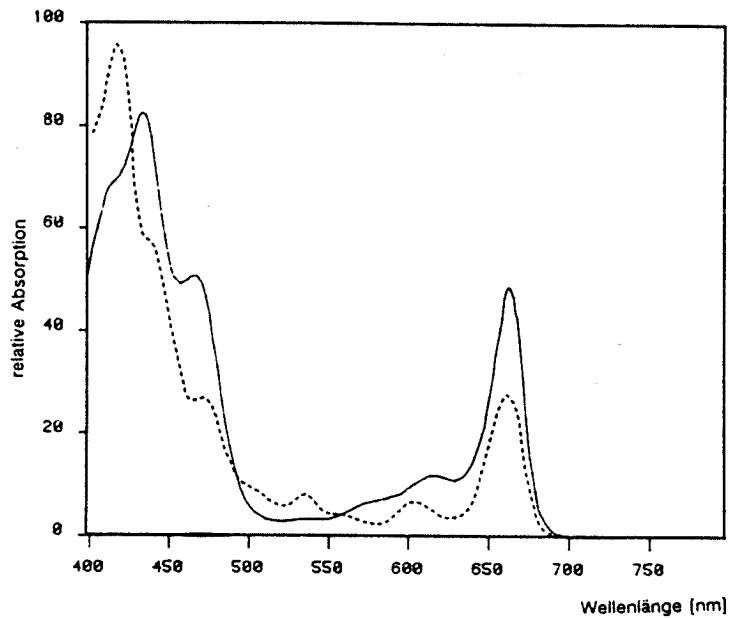


Abb. 4. Adsorptionsspektrum eines Ethanolextraktes von *Sc. obliquus*

Der Gehalt an Chlorophyll und Phaeophytin errechnete sich nach der Formel von Nusch und Palme (1975) :

$$\text{mg Chlorophyll/l} = (E_{665}v.\text{As.} - E_{665}n.\text{As.}) \times 28.67 \times \left(\frac{v}{V \times L} \right)$$

$$\text{mg Phaeophytin/l} = (E_{665}n.\text{As.}) \times 21.236 \times \left(\frac{v}{V \times L} \right)$$

$E_{665}v.\text{As.}$ = Extinktion bei 665nm vor Ansäuerung der Probe

$E_{665}n.\text{As.}$ = Extinktion bei 665nm nach Ansäuerung der Probe

v = Extraktionsvolumen in ml

V = Probevolumen in l

L = Küvettenlänge in cm

2.5.2 Bestimmung des Gesamtcarotinoidgehaltes

Die Carotinoidbestimmung geht auf die Methode zurück, die bei Hellebust and Craigie (1983) im Handbook of Phycological Methods beschrieben wurde. Dabei wurden die verschiedenen Carotinoide als Summe erfaßt und gemessen.

Die Aufbereitung der Algen war dieselbe wie die bei der Chlorophyllmessung. Der Gehalt an Carotinoiden errechnete sich nach folgender Formel, wobei ein Faktor eingefügt wurde, um den Gehalt auf einen Liter beziehen zu können:

$$\text{mg Carotinoid/l} = \frac{(E_{450} \times V \times f \times 10 \times a)}{2500}$$

E_{450} = Extinktion bei 450nm

V = Probevolumen in ml

f = Verdünnungsfaktor

2500 = Durchschnittlicher Extinktionskoeffizient bei 450nm

a = Umrechnungsfaktor von Probevolumen auf Liter

2.6 Organische Kohlenstoffbestimmung der Algen (POC - Bestimmung)

Die Bestimmung des organischen Kohlenstoffes diente zur weiteren Charakterisierung der Algenbiomasse, da Chlorophyll und Trockengewicht als nicht ausreichend erschienen.

Zur Bestimmung wurde der "Total Organic Carbon" - Analyser der Fa. Beckmann (915B) benutzt. Das Meßprinzip beruht auf der Oxidation des Kohlenstoffes zu CO_2 , welches in einem Infrarotphotometer gemessen werden konnte. Das Analysengerät besaß zwei getrennte Verbrennungsrohre, einen für anorganischen, den anderen für organischen Kohlenstoff. Der anorganische Kohlenstoff wurde bei 300°C im sauren Milieu zu CO_2 umgesetzt. Der Gesamtkohlenstoff (anorganischer wie organischer) wurde bei 1000°C mit Luft zu CO_2 oxidiert. Die Differenz zwischen Gesamtkohlenstoff und anorganischem Kohlenstoff ergab dann den Anteil an organischem Kohlenstoff.

Anhand einer Eichreihe (0 - 100mg/l) mit Na_2CO_3 und NaHCO_3 ließ sich der Kohlenstoffgehalt mit einer Genauigkeit von ± 2 mg bestimmen.

Die Algensuspension (10 - 20 ml) wurde zuerst abzentrifugiert, 3x in destilliertem Wasser resuspendiert, und in das gleiche Volumen (10 - 20ml) wieder aufgenommen. Durch diese Prozedur wurden weder die C-haltige Exkrete, die von den Algen ins Medium abgegeben werden, noch die Aromaten die Meßung mitgemessen.

2.7 Bestimmung des C-H-N - Verhältnisses der Biomasse

20ml der Algensuspension wurde bei 5000rpm (Ecco -Tischzentrifuge) 5min abzentrifugiert und in entionisiertem Wasser aufgenommen. Nach dem zweiten Zentrifugieren wurden sie in 1ml entionisiertem Wasser aufgenommen, und in kleinen Schraubdeckelgläschen eingefroren und dann lyophilisiert.

Die Proben im C-H-N - Analyser (Perkin-Elmer 240B) analysiert. Dazu wurde eine Mindestprobenmenge von 1mg Trockensubstanz benötigt (Analysengenauigkeit von ca. 0.1%).

2.8 Bestimmung von Sulfit

Die bei der Enzymmessung entstandenen Sulfitionen wurden mit der Sulfitbestimmungsmethode nach Grant (1947) colorometrisch erfaßt. Sulfit bildet in Anwesenheit von Formaldehyd mit Fuchsin einen rotgefärbten Komplex, der bei 580nm im Photometer gut gemessen werden kann.

Auch konnte freies Sulfit mit der Methode nach Schwenn und Schrieck (1987) bestimmt werden, wobei aber radioaktiv - markiertes ^{35}S -1-NS verwendet wurde. Nach Inaktivierung der Enzymlösung mittels Aceton wurde das freie Sulfit bei 60° C aus dem Inkubationsgefäß ausgetrieben und in Trioctylamin (Fluka, Nr. 9830) aufgefangen. Durch Meßung der Radioaktivität im Szintillator konnte die Quantität des freien Sulfits ermittelt werden.

2.9 Bestimmung von Sulfat

Für die Sulfatbestimmung wurden zwei Methoden angewandt. Die eine wurde zur schnellen Überprüfung der Bildung von Sulfationen bei der Enzymisolierung verwandt. Bei der zweiten wurden die Sulfationen mittels Ionenaustauschchromatographie ermittelt, die exakte und sehr gut reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

2.9.1 Sulfatbestimmung mittels Bariumchlorid

Der Test beruht auf der in Lange und Vejdeklev "Photometrische Analyse" (1980) angegebenen Methode. Gibt man zu Sulfationen Barium in Form von Bariumchlorid, so bildet sich das schwer lösliche Bariumsulfat, welches durch Auswägen quantifiziert werden kann. Da aber Bariumsulfat auch eine Trübung der Suspension hervorruft, konnten geringe Mengen an Bariumsulfat auch direkt im Photometer bei 570nm bestimmt werden. Diese Modifikation wurde zusammen mit Herrn Prof. Dr. Kneifel so ausgearbeitet, daß sie als Schnelltest eingesetzt werden konnte.

Der Test wurde wie folgt durchgeführt:

- 1000µl Probe
- 10µl 0.1n HCl zur Ansäuerung
- 1000µl BaCl₂ (0.5mol/l BaCl₂ in 0.1mol/l HCl)
- nach 2 min gegen H₂O bei 570nm im Photometer messen

2.9.2 Probenaufbereitung für die Ionenbestimmung

5-10ml Kultursuspension wurden durch einen 0.2µ Membranfilter (Satorius) abgefiltert. Diese geringe Porenweite des Filters war notwendig, damit das Filtrat möglichst partikelfrei war. Denn es bestand die Gefahr, daß die Analysen nicht reproduzierbar waren und außerdem die Chromatographiesäulen verstopften. Da keine weiteren Veränderungen eintreten sollten, wurden die Proben bei -10°C eingefroren.

Ein Probenvergleich zwischen eingefrorenen und nicht eingefrorenen Proben zeigte, daß sich die Ionenkonzentration nicht durch die Probenaufbewahrung änderte.

2.9.3 Sulfatbestimmung mittels Ionenaustauschchromatographie

Die Bestimmung von Anionen wurde mittels eines Ionenchromatographen der Fa. Dionex (Modell 2000i) durchgeführt. Im folgendem soll kurz das Prinzip erklärt werden.

2.9.4 Theorie der Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie wurde 1975 von Small, Stevens und Baumann als neue Analytik- Methode entwickelt. Dieses ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, das auf die Verteilung eines Stoffes zwischen der mobilen und der stationären Phase beruht. Die stationäre Phase besteht aus inerten oberflächensulfonierten Polystyrol/Divinylbenzol-Teilchen, an der durch elektrostatische und van-der-Waal'sche Kräfte sog. Latex-Teilchen gebunden sind. Diese tragen die Austauschergruppe NR_3^+ . Dieses System hat den Vorteil, daß es über den ganzen pH-Bereich stabil bleibt. Als Elutionsmittel wird ein Puffer aus Dinatriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat verwandt, dessen Elutionsstärke durch das Verhältnis des Puffers bestimmt ist und bei der Dedektion der Ionen eine große Rolle spielt.

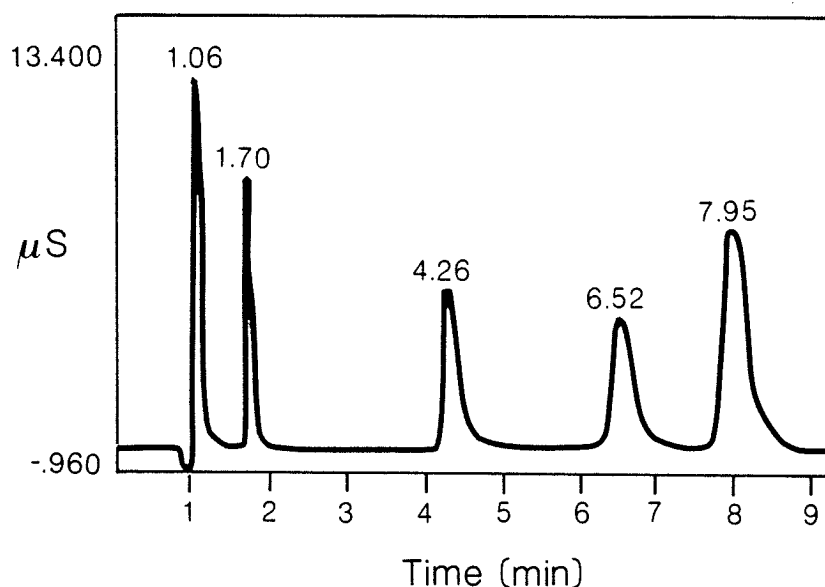
Bevor die Ionen dedektiert werden, werden sie noch durch einen Ionenaustauscher (Supressorsäule) geschickt. Hier wird zum einen Natriumhydrogencarbonat in kaum dissoziierbare Kohlensäure überführt, indem das Natrium gegen ein Wasserstoffion ausgetauscht wird. Dieser Vorgang wird als Supression des als Eluens fungierenden Elektrolyten bezeichnet. Zum anderen werden die Ionen in ihre entsprechenden Mineralsäuren überführt, so daß die Säuren in Gegenwart der schwach dissoziierten Kohlensäure sehr empfindlich nachgewiesen werden können.

2.9.5 Aufbau des Ionenchromatographen

Der prinzipielle Aufbau des Ionenchromatographen (Dionex, Mod. 2000i) ist den konventionellen HPLC - Geräten ähnlich. Zur Automatisierung wurde anstelle des Injektionsventiles ein Probennehmer (Millipore, WISP) installiert.

Als Anionenaustauschersäule wurde eine Trennsäule HPIC - AS4a und als Detektorsäule ein Membransuppressor (AMMS-1) verwendet.

Die folgende Abbildung zeigt ein Chromatogramm der detektierbaren Anionen:



PEAK NO.	RET. TIME	PEAK NAME	EFFICIENCY	ASSYMETRY
1	1.06	Flouride	1.727E+03	.38
2	1.70	Chloride	2.967E+03	.41
3	4.26	Nitrate	1.643E+03	.27
4	6.52	Phophate	2.601E+03	.49
5	7.96	Sulfate	2.742E+03	.45

Abb. 5. Chromatogramm der detektierbaren Anionen

2.9.6 Analyse der Sulfationen

Da nur das Sulfat bestimmt wurde, wurde der Integrator (Shimadzu CRA-3a) auf Sulfat geeicht. Als Standard diente Sulfat aus H_2SO_4 (Titrisol, Merck Art.Nr. 9872). Das Eluens mußte geringer konzentriert angesetzt werden, als es für die Trennung der Ionen im mg - Bereich benötigt wird, denn aufgrund des hohen Phosphatgehalts (ca. 1g/l) im Medium N8 konnte das Sulfat nicht mehr vom Phosphat getrennt werden. Es war nur ein Phosphatpeak mit Tailing zu erkennen.

Durch das schwächere Eluens wurde die Retentionszeit der Ionen verlängert, aber das Sulfat konnte vom Phosphat getrennt werden.

Das Eluens setzte sich aus 0.75mmol/l NaHCO_3 und 1,4mmol/l Na_2CO_3 zusammen. Das Probevolumen betrug, vorgegeben durch die Probenschleife, 5 μl .

2.10 Aromatenbestimmung mittels Ionenpaarchromatographie

2.10.1 Theorie der Ionenpaarchromatographie

Mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie ist es möglich, hydrophobe An- und Kationen zu analysieren, wobei die Selektivität der Trennsäule durch das Eluens bestimmt wird.

Die stationäre Phase besteht aus einem makroporen Polystyrol-/ Divinylbenzol-Copolymerisat, das einen unpolaren Charakter und eine große Oberfläche besitzt. Dem Eluens wird ein Ionenpaarreagenz (z.B. Tetrabutylammoniumhydroxid) zugefügt. Dieses Reagenz formt mit dem entgegengesetzt geladenen Probe-Ion sogenannte Ionenpaare.

Der exakte Mechanismus der Ionenpaarchromatographie ist noch unklar. Derzeit gibt es drei Hypothesen, die es zu erklären versuchen.

Horvath, Melander und Molnar(1976,1977) vertreten die Ansicht, daß in der wässrigen Phase Ionenpaare gebildet werden, dessen unpolarer Charakter durch die Wahl des Ionenpaarreagenz bestimmt wird, und diese an der unpolaren Phase absorbiert wird.

Hoffmann, Liao (1977) und Kissinger (1977) unterstützen das Ionenaustausch - Modell, wonach das Ionenpaarreagenz an der Oberfläche der stationären Phase absorbiert wird und somit ähnlich eines Ionenaustauschers funktionieren würde. Mit diesen beiden Theorien läßt sich erklären, daß mit der Verlängerung der Aalkette des Ionenpaarreagenzes eine Verlängerung der Retentionszeit einhergeht.

Das dritte Modell wurde von Briedlingmeier et al. (1979) als Ionen- Wechselwirkungs- Modell eingeführt, welches auf Leitfähigkeitsmessungen beruht. Diese schließt nun die Ionenpaarbildung in der mobilen Phase aus. Dagegen wird eine hohe Oberflächenspannung an den Grenzflächen aufgrund des hydrophoben Charakters der stationären Phase und des polaren der wässrigen mobilen Phase auf-

gebaut. So besitzt die stationäre Phase Affinität zu den Komponenten der mobilen Phase. So würde sich an der Oberfläche eine elektrisch geladene Doppelschicht aufbauen, wobei die erste Schicht mit dem Ionenpaarreagenz und dem organischen Lösungsmittel an der stationären Phase absorbiert wäre, und in der zweiten Schicht die hydrophoben Gegenionen. Die Selektivität des Systems basiert auf der Tatsache, daß die Ladungsdichte in der äußeren Region der Doppelschicht vom Hydratisierungsgrad des Gegenions abhängig ist, so daß Ionen mit geringem Hydratisierungsgrad längere Retentionszeit besitzt.

2.10.2 Analyse der Aromaten

Der Aufbau des Chromatographen war dem der Ionenchromatographie mit Ausnahme der Detektion identisch. Die Aromaten wurden über ein UV - Spektralphotometer (Knauer No.87.00) bei einer Wellenlänge von 254nm bestimmt.

Als Trennsäule wurde eine MPIC - NS1 mit der Vorsäule MPIC-NG1 benutzt.

Als günstigstes Elutionsmittel erwies sich ein Gemisch aus 35 Acetonitril / 65 H_2O mit 0.2 Tetrabutylammoniumhydroxid. Dabei hatte NS-1 eine Retentionszeit von ca.10 Minuten und 1-Naphthol von 12 Minuten. Die folgende Abbildung zeigt das entsprechende Chromatogramm:

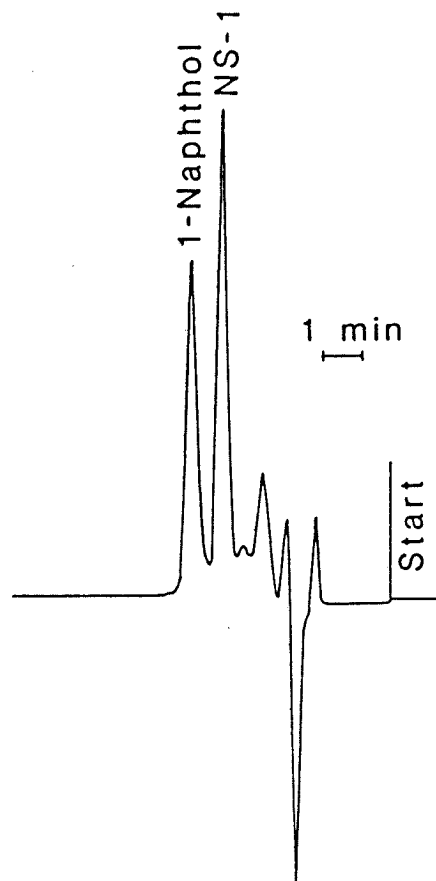


Abb. 6. Chromatogramm von 1 - NS und 1 - Naphthol

2.11 Enzymisolation

2.11.1.1 Zellabtrennung

Die Algensuspension wurde bei 5000 rpm und 5 Minuten in einer Tischzentrifuge (Ecco, Mod.5170) abzentrifugiert. Dann wurden die Algen in entionisiertem Wasser resuspendiert und wieder abzentrifugiert.

2.11.1.2 Zellaufschluß

Die Algen wurden in einer Zelmühle (Vibrogen, Vi 4) mit Glasperlen (2mm) bei 10°C aufgeschlossen. Es wurde 3 x 2 Minuten mit einer halben Minute Pause die Kultursuspension gemahlen.

Dieses Verfahren hat zu den anderen Aufschlußverfahren den Vorteil, daß über 75% der Algenzellen aufgeschlossen werden konnten.

2.11.1.3 Erstellung des Rohextraktes

Zuerst wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10000 g (Haereus- Christ, Minizentrifuge) und 10min abgetrennt.

Die Zellorganellen wurden durch Ultrahochzentrifugation (Du Pont Instr., Sorvall OTD-50) bei 100000 g und einer Stunde von dem Zellextrakt getrennt.

2.11.1.4 Löslichkeitsfraktionierung

Die Zellproteine wurden durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Zugabe ausgefällt. Es wurden drei Fraktionen hergestellt: 0 - 30%, 30 - 60%, 60 - 100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Jede Fraktion wurde bei 10000g abzentrifugiert, der Proteingehalt bestimmt (Kap. 2.12.), und die Enzymaktivität gemessen.

2.11.1.5 Entsalzung der ausgefällten Fraktionen

Die Fraktionen wurden durch Ausschlußchromatographie (MG > 5000; PD-10, Sigma Chemicals) entsalzt, wobei die Säule mit entsprechendem Puffer vorkalibriert wurde.

Die erste Fraktion von 2ml wurde verworfen, weil sie keine Proteine enthielt. Die zweiten 2ml enthielten die gesamte Proteinlösung. Die nachfolgenden Fraktionen waren durch Sulfat verunreinigt.

2.12 Proteinbestimmung

Den Gehalt an Protein in der Algenextraktlösung wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt.

Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin(Sigma, No. A-9647) genommen, und eine Eichreihe mit 0 - 1g/l Protein erstellt.

2.13 Identifikation der Abbauprodukte

Die Abbauprodukte der Desulfonierung wurden mittels HPLC identifiziert. Die Bedingungen für die HPLC sind bei Soeder et al. (1987) beschrieben.

Da aus anderen Veröffentlichungen Abbauprodukte bei dem Abbau anderer aromatischer Verbindungen wie Naphthalin (Cerniglia, 1980) bekannt sind, wurden folgende Substanzen als Referenzen eingesetzt, um die Identifikation unbekannter Peaks im Chromatogramm zu erleichtern.

Die Tabelle zeigt die Substanzen mit ihren Retentionszeiten:

Referenzsubstanzen	Retentionszeiten in Minuten
1 - Naphthol	11.77
1,2 - cis - Dihydroxynaphthodiol	3.65
1,2 - trans - Dihydroxynaphthodiol	3.73
1 - Hydroxy - 4 - tetralon	4.15
1,4 - Naphthochinon	9.50

Tab. 2: Eingesetzte Referenzsubstanzen und ihre Retentionszeiten

2.14 Synthese von 1-Naphthalinsulfonsäure

2.14.1 Umsetzung von 1-Naphthalinsulfonsäurechlorid zu 1-Naphthalinsulfonsäure

Da die im Handel erhältlichen 1-Naphthalinsulfonsäuren entweder zu hoch mit anderen aromatischen Verbindungen verunreinigt waren oder zuviel Sulfat enthielten, wurde 1-Naphthalinsulfonsäure aus 1-Naphthalinsulfonsäurechlorid wie folgt hergestellt:

0.11 mol 1-Naphthalinsulfonsäurechlorid (Merck Nr. 820856) wurden in 100 ml H₂O mit 0.22 mol NaOH versetzt und langsam erhitzt. Die Reaktion wurde auf den pH-Wert hin kontrolliert, da zu Anfang dieser sehr alkalisch, nach der Umsetzung im neutralen Bereich war. Zur Entfernung noch störender Verbindungen wurde Aktivkohle zugegeben, und dann das Gemisch gefiltert. Beim Abkühlen des Filtrates auf Raumtemperatur kristallisierte die 1-Naphthalinsulfonsäure aus.

Bei dieser Umsetzung wurde 1-Naphthalinsulfonsäure mit einer Ausbeute von ca. 70% und einer Reinheit von über 99% gewonnen.

2.14.2 Synthese von schwefel- und kohlenstoff-markierter Naphthalinsulfonsäure

Die radioaktive 1-Naphthalinsulfonsäure konnte nicht wie oben synthetisiert werden, da 1-Naphthalinsulfonsäurechlorid nicht als markierte Substanz zu erhalten war.

So wurde die Sulfonierung von Naphthalin mit konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt. Dabei mußten die Reaktionsbedingungen optimiert werden, da in der Literatur nur Eckdaten angegeben waren (Ferri, 1970). Darüberhinaus mußte sichergestellt werden, daß die 1-Naphthalinsulfonsäure möglichst rein vorlag, da bei der Reaktion immer auch 2-Naphthalinsulfonsäure entsteht. Ebenso wird auch die Schwefelsäure nicht vollständig an das Naphthalin substituiert und somit auch in dem Ansatz noch mit vorliegt.

In Ansätzen mit nicht radioaktivem Naphthalin und Schwefelsäure wurden vorher die Reaktionsbedingungen ausgetestet (Solscheid, 1987).

Die optimalen Reaktionsbedingungen waren:

Temperatur: 40°C

Säureüberschuß: 4-fach

Reaktionszeit: 1 Stunde

Die so hergestellte 1-Naphthalinsulfonsäure enthielt etwa 16% 2-Naphthalinsulfonsäure. Die Herstellung von 1-NS mit weniger als 10% 2-NS hätte auf dem ausgewählten Syntheseweg nur unter Inkaufnahme einer sehr geringen Ausbeute erreicht werden können. Die überschüssige Schwefelsäure konnte weitgehend durch Ausfällen mit BaCl_2 entfernt werden.

2.14.2.1 Besonderheiten bei der ^{35}S -Markierung

Ausgangsmaterial für die Synthese war:

[^{35}S] Schwefelsäure, (Amersham Buchler Art. Nr. SJ.44)

Aktivitätsdaten am 2.2.1987 12.00h GMT:

Gesamtaktivität: 203,5 MBq

spez. Aktivität: 700 MBq/mmol

radiochem. Reinheit: 99% (papierchromatographisch)

Die Ampulle enthielt somit 0,291 mmol bzw. 15,5 μl Schwefelsäure. Daher wurde nach dem Öffnen der Ampulle mit 10 μl 95-98%iger Schwefelsäure geträgert. 22,2 μl des so hergestellten Gemisches wurden mit einer Pipette entnommen und für die Reaktion verwendet. Ansatzgröße und Durchführung sind in Kap. 2.12.2 beschrieben.

Nach dem Trocknen des Produktes im Exsikkator (3 Tage über Phosphorpentoxid) wurde wie folgt geträgert:

14,51 mg Produkt

+ 276,80 mg reine 1-Naphthalinsulfonsäure (Na-Salz)

+ 52,72 mg reine 2-Naphthalinsulfonsäure (Na-Salz)

Diese Charge wird im folgenden als *homogen geträgerte 1-NS* bezeichnet.

13,40 mg Produkt

+ 329,14 mg reine 1-Naphthalinsulfonsäure (Na-Salz)

Diese Charge wird im folgenden als *inhomogen geträgerte 1-NS* bezeichnet.

Die Auftrennung des Syntheseproduktes in zwei unterschiedlich geträgerte Chargen wurde durchgeführt, um feststellen zu können, ob 1-NS und 2-NS von den Algen unterschiedlich gut bzw. schnell aufgenommen werden.

Die inhomogen geträgerte 1-NS enthielt chemisch betrachtet weniger als 1 % 2-NS, während etwa 16 % der Gesamtaktivität vom 2-NS herrührte. Die homogen geträgerte 1-NS enthielt chemisch betrachtet etwa 16 % 1-NS, von dem auch 16

% der Gesamtaktivität herrührten. Bei gleich guter Aufnahme beider NS-Isomeren durch die Algen müßten mit beiden Chargen gleiche Meßwerte für die 1-NS Aufnahme erhalten werden, eine unterschiedlich gute Aufnahme würde sich im Verhältnis der Meßwerte niederschlagen.

Die so geträgerten Produkte wurden in je 2 ml heißem Wasser gelöst und mit je 140 µl 0,1 M Bariumchlorid-Lösung versetzt. Das so ausgefällte Bariumsulfat wurde abfiltriert. Die Mutterlaugen wurden durch Überleiten eines Stickstoffstromes getrocknet. Die so erhaltenen Produkte wurden erneut im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

2.14.2.2 Besonderheiten bei der ^{14}C -Markierung

Ausgangsmaterial für die Synthese war:

[1(4,5,8)- ^{14}C] Naphthalin, (Amersham Buchler, Art. Nr. CFA.36)

Aktivitätsdaten vom 31.7.84

Gesamtaktivität: 2 x 9,25 MBq

spez. Aktivität: 166,5 MBq/mmol

radiochem. Reinheit: 98,3% mit GL-Radiochromatographie, 97% mit DC

Die Lieferung erfolgte in 2 Ampullen, in die das Naphthalin in Lösung überführt und dann darin eingedampft worden war. Um das Naphthalin in das Reaktionsgefäß einzubringen, wurde es in n-Hexan erneut gelöst. Die Lösung wurde mit einer Spritze transferiert. Das n-Hexan wurde schließlich durch Überleiten eines Stickstoffstromes abgeblasen.

Auf diese Weise konnten etwa 60% des erhaltenen Naphthalins in das Reaktionsgefäß eingebracht werden.

Ansatz:

8,36 mg (0,065 mmol) Naphthalin, (Amersham Buchler, Art. Nr. CFA.36)

25,5 mg (0,261 mmol) Schwefelsäure, (Merck, Art. Nr. 713)

Die Reaktion wurde durchgeführt wie in Kap. 4.2.2 beschrieben. Nach dem Trocknen des Produktes im Exsikkator über Phosphorpentoxid wurde wie folgt geträgert:

12,92 mg Produkt
+ 128,06 mg reine 1-Naphthalinsulfonsäure (Na-Salz)

Eine Sulfatfällung wurde nicht durchgeführt, da durch das vorhandene Restsulfat (max. 4%) keine Störung der vorgesehenen Messungen mit ^{14}C -markierter 1-NS zu erwarten war.

2.15 Messungen mit dem LSC

Die von den Algen während der Inkubationen aufgenommene Aktivität wurde durch Messung mit einem Tri-Carb-Liquid-Szintillationszähler der Fa. Packard Instruments bestimmt.

2.15.1 Probenvorbereitung

Die zur Probennahme verwendeten Filter wurden zusammen mit den anhaftenden Algen in Zählfläschchen gegeben. Dazu wurden 1 ml destilliertes Wasser und 10 ml Szintillatorgel Insta-Gel der Fa. Packard Instruments zugegeben. Diese Mischungen wurden kräftig geschüttelt, nach einigen Ruhestunden im Kühlschrank nochmals geschüttelt. Danach hatten sich die Filter aufgelöst.

Um einen Bezug zwischen Masse und gemessener Aktivität herstellen zu können, wurden jeweils Standardproben mit bekannter Masse an aktivem Material mitgemessen.

2.15.2 Korrektur des Quenching

Die in den Proben enthaltenen Algen minderten die Zählausbeute je nach Algenkonzentration mehr oder weniger stark. Die Erfassung dieses Quencheffektes erfolgte durch die Aufnahme von Quenchreihen. Hierzu wurde zunächst die Zählrate in einer als ungequencht angenommenen Probe bestimmt (R_{NQ}). Anschließend wurden Proben mit der gleichen Aktivität wie die ungequenchte Probe unterschiedlich große Mengen an Algen zugesetzt und die Zählraten (R_Q) dieser nunmehr gequenchten Proben bestimmt. Durch Bildung des Quotienten $\frac{R_Q}{R_{NQ}}$ wurde die Zähleffektivität bei der jeweiligen Algenkonzentration ermittelt.

Der LSC ermittelt zusätzlich zur Zählrate den sogenannten QIP (Quenching Index Parameter) einer jeden Probe. Hierzu wird ein Prüfstrahler bekannter Aktivität in die Nähe des Zählfläschchens im Messraum des Gerätes gebracht. Die durch die im Fläschchen vorhandene quenchende Substanz verursachte Minderung der Zählrate des Prüfstrahlers wird erfaßt und hieraus der QIP bestimmt, der damit von der Konzentration der quenchenden Substanz abhängig ist. Die im Zählfläschchen vorhandene Aktivität kann hierbei vernachlässigt werden, da sie im Vergleich zur Aktivität des Prüfstrahlers sehr klein ist.

Trägt man die von jeder Probe ermittelten Effektivitätswerte und QIP gegeneinander auf, so erhält man eine Quenchkurve für das jeweilige Nuklid in Verbindung mit der jeweiligen quenchenden Substanz. Anhand dieser Kurve kann die Zähleffektivität, auch bei unbekannter Konzentration an quenchender Substanz in der Probe, bestimmt werden.

Quenchkurven wurden aufgenommen für ^{14}C bzw. ^{35}S in Kombination mit Algen bzw. Algen mit Celluloseacetatfiltern. Die Meßwerte aus den Inkubationen wurden auf diese Weise korrigiert.

2.16 Theoretische Grundlagen der Wachstumsberechnung

1. Berechnung des Algenwachstums in Batchkulturen

Die Algen waren im gewählten Meßzeitraum von 5 Tagen großteils in der exponentiellen Wachstumsphase. In dieser Phase wurde die Wachstumsrate der Algen bestimmt. Im Idealfall nehmen Zellzahl, Protein und Trockengewicht der Algen mit konstanten Raten zu (Pirt, 1975). Da sich aber in einer statischen Kultur sowohl die Milieubedingungen wie Substratkonzentration, Zelldichte als auch die physikalischen Bedingungen wie pH-Wert, Lichtverhältnisse permanent ändern, war diese konstante Zunahme der Biomasse nicht immer gewährleistet. Um dennoch die Kulturansätze miteinander vergleichen zu können, wurde eine durchschnittliche Wachstumsrate μ ermittelt, wie es auch für den OECD-Test (1983) angegeben wird.

Diese durchschnittliche Wachstumsrate errechnete μ sich aus den zu den Zeiten t und t_0 gemessenen Dichten der Algensuspension OD_t und OD_0 nach folgender Formel:

$$\mu = \frac{(\ln OD_t - \ln OD_0)}{(\Delta t)}$$

2. Berechnungen des Algenwachstums in kontinuierliche Kulturen

Im Turbidostaten als Kultursystem fließt nahezu kontinuierlich Medium ins Kulturgefäß ein, so daß der Zuwachs der Algen durch den Ausdruck

$$\mu = \frac{dx}{dt}$$

beschrieben werden kann, wobei die Algen sich immer in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Da ein Fließgleichgewicht, "Steady State", zwischen Durchflußrate (D) und Wachstumsrate (μ) der Algen besteht, ist

$$\mu = D$$

Für ein turbidostatisch betriebenes Kultursystem gilt zudem, daß bei der eingestellten Biomassekonzentration im Fermenter die Durchflußrate (D) sich nach der Wachstumsrate einstellt, da bei Erhöhung der Biomassekonzentration die Zuflußpumpe solange Medium in den Fermenter

pumpt, bis die eingestellte Biomassekonzentration wieder erreicht wird. Somit spiegelt sich in der Durchflußrate die maximale Wachstumsrate wieder, so daß gilt:

$$\mu_{\max} = D$$

2.17 Statistische Auswertung und Zeichnung von Meßdaten

Die statistische Auswertung und Modellierung der Meßdaten wurden von mir mit Hilfe eines Statistik-Paketes (Stat-Pak, North- West- Analytical, Portland) auf einem Personal Computer (Alphatronic P3, Triumph- Adler) durchgeführt.

Die Zeichnungen wurden im Großrechner (IBM - Rechner - Verbund) mit der Software GDDM geplottet.

Der Text wurde ebenfalls im Großrechner mit dem GML - Schreibprogramm erstellt, wobei die Abbildungen direkt in den Text eingebunden werden konnten.

3.0 Resultate

3.1 Versuche mit Batchkulturen

Die Batchversuche mit *Scenedesmus obliquus* wurden als Doppelansätze in Schüttelkolben durchgeführt, wie sie auch für Toxizitätsprüfungen verwandt werden bzw. vorgeschrieben sind (s. S. 13). Der Meßzeitraum für einen Versuch betrug 4 bzw. 5 Tage und die Gesamtinkubationsdauer der Algen bei den jeweiligen Schwefelkonzentrationen 3 Monate.

Über die gesamte Inkubationsdauer wurde in jedem Versuch die Zunahme der Kulturdichte (Optische Dichte als Extinction bei 570nm) gemessen, und daraus die durchschnittliche Wachstumsrate der Algen berechnet. Da die Versuchsbedingungen und das Inoculum konstant gehalten wurden, konnte eine Standardabweichung der Wachstumsraten weniger als 5% erreicht werden. Im letzten Versuch wurde dann außerdem der Pigmentgehalt der Algen und die Abnahme der Schwefelkonzentration im Medium gemessen.

Die Erfassung der Algenpigmente Chlorophyll und Carotinoide war deshalb interessant, weil bei niedrigen Schwefelgehalten im Medium eine Farbveränderung der Algen von grün zu gelbgrün zu sehen war. Dieses deutete bereits zu Anfang der Versuche an, daß es einen Zusammenhang zwischen dem Schwefelgehalt im Medium und dem Pigmentgehalt der Algen geben mußte.

Die maximal eingesetzte Sulfatkonzentration im Medium entsprach der bei der Nährlösung N8 angegebene Schwefelkonzentration (Soeder et al., 1967).

Die Konzentration der Naphthalinsulfonsäure im Medium richtete sich erst einmal nach der S-Konzentration für das N8-Medium, wurde aber auch erhöht, um festzustellen, inwieweit sich die Wachstumsraten, die bei Luther und Soeder (1987) mit dieser Konzentration erreicht wurden, noch steigern ließen.

3.1.1 Wachstum von *Sc. obliquus* mit verschiedenen Sulfatkonzentrationen als S-Quelle

Schwefel ist ein wichtiger Makronährstoff für alle Algen, der meist in der Umwelt als Sulfat vorkommt. Wird Sulfat von den Algen aufgenommen, so wird er entweder partiell reduziert, um Sulfonlipide oder zelleigene Sulfonsäuren zu bilden, oder total auf das Thiol-Niveau, um von dort aus in Aminosäuren wie Cystein und Methionin, in das Coenzym A, Biotin oder Biotin u.v.m. eingebaut zu werden.

So führt Sulfatmangel bei Algen zu einem dazu, daß gewisse Enzymaktivitäten des Sulfatmetabolismus, wie z.B. die Cysteinsynthetase (Krauss u. Schmidt, 1986) zunehmen, während auf der anderen Seite die Konzentrationen an Chlorophyll (Biedlingmaier u. Schmidt, 1983) oder Sulfonlipide (Sandmann u. Böger, 1982) abnehmen. Speziell die dadurch eingeschränkte Photosyntheseleistung der Algen führt zur Erniedrigung des Wachstums und der Erhöhung der extraellulären organischen Substanz (Bolze, 1976).

Durch die sensitive Meßmethode der Ionenchromatographie war es im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen nun möglich, in einem anerkannten Batchtestsystem (OECD, 1983) und in einem kontinuierlichen Turbidostaten die Sulfatabhängigkeit der Algen zu bestimmen. In allen Medien für Grünalgen kann Sulfat aufgrund seiner niedrig eingesetzten Konzentration am ehesten zur Nährstofflimitierung führen. Desweiteren wurde der Einsatz von Sulfat nötig, um diese Ergebnisse als Standard gegenüber der Abhängigkeit der Algen von der 1-Naphthalinsulfonsäurekonzentration benutzen zu können.

Meist wurde die Sulfataufnahme in Tracerexperimenten mit radioaktivem ^{35}S -Sulfat bei Inkubationszeiten von Minuten bis zu wenigen Stunden (Hellebust u. Craigie, 1983; Hudson, 1971; Wedding u. Bläck, 1960) oder über einen Tag zur Bestimmung des Schwefelgehaltes der Algenbiomasse durchgeführt (Soeder et al., 1987).

In diesem Versuch sollte über den Inkubationszeitraum von 5 Tagen sowohl die Abnahme des Sulfates im Medium als auch die Biomassezunahme und der Pigmentgehalt der Algen als physiologische Parameter der Algen bestimmt werden, um den Einfluß der verschiedenen Sulfatkonzentrationen auf die Algen zu untersuchen.

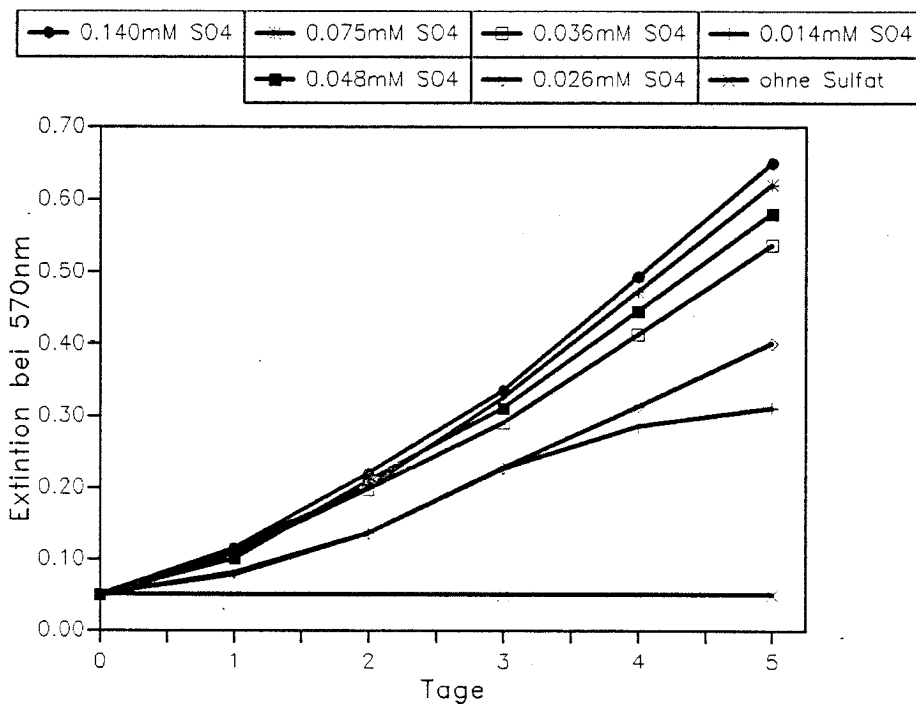


Abb. 7. Zunahme der Kulturdichte von *Sc.obliquus* in Abhängigkeit von der Sulfatanfangskonzentration (Batchversuche):

Mittelwerte aus zwei parallel angesetzten Kulturansätzen über 9 Wochen

Die Kulturdichte der Algen nahm mit steigender Anfangssulfatkonzentration zu. Dieses bedeutete, daß die Algen, zumindest unterhalb von 0.14mM Anfangssulfatkonzentration, limitiert durch die Sulfatkonzentration wuchsen. Im Kontrollansatz ohne Sulfat wurde kein Wachstum über den gesamten Versuch mehr festgestellt. Da sie auch nicht - wie es bei den anderen Ansätzen möglich war - durch Überimpfen in Medium mit 0.14 mM Sulfat reaktiviert werden konnten, kann man davon ausgehen, daß die Algen abgestorben waren. Die Algen in den geringeren Sulfatansätzen von 0.013mM und 0.026mM Sulfat zeigten über die gesamte Versuchsdauer deutlich geringere Zunahmen ihrer Dichte als die Algen in den anderen Ansätzen. Nach 5 Tagen wurde die stationäre Phase von den Algen in der Anfangssulfatkonzentration von 0.013mM Sulfat erreicht.

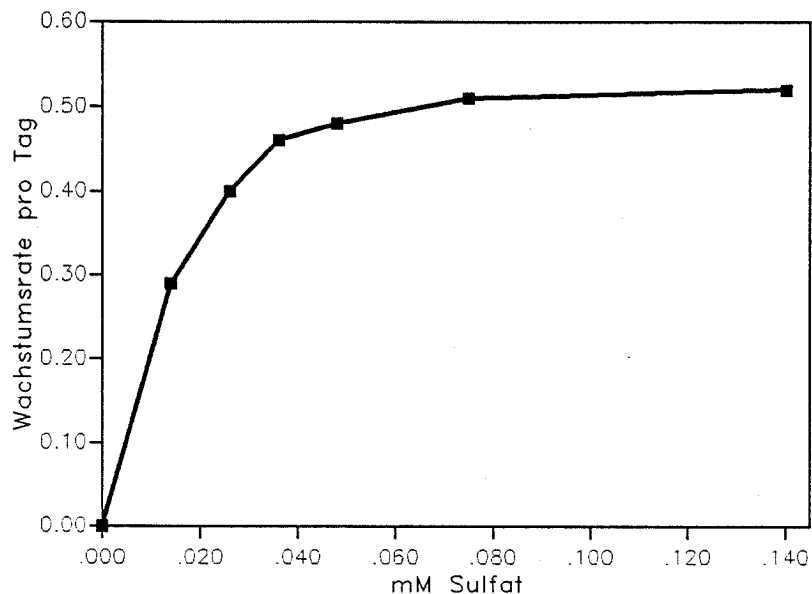


Abb. 8. Wachstumsraten von *Sc. obliquus* in Abhängigkeit von der Anfangssulfatkonzentration (Batchversuch):

Mittelwerte aus zwei parallel angesetzten Kulturansätzen über 9 Wochen

Trägt man die Wachstumsraten der Algen gegen die Sulfatkonzentration zu Versuchsbeginn, so ergibt sich daraus eine Sättigungskinetik (Abb. 8.), wobei die höchste Wachstumsrate von durchschnittlich $\mu = 0.52$ pro Tag über 5 Tage mit der höchst eingesetzten Sulfatmenge von 0.14mM erreicht wurde. Die in diesem Versuch in Dauerlicht erzielte höchste Wachstumsrate war etwas geringer als die in 16 : 8 Stunden Hell : Dunkel Rhythmus erzielten der von $\mu = 0.60$ pro Tag unter sonst gleichen Kulturbedingungen bei Soeder und Luther (1987) angegebenen. Dieser Unterschied ist dadurch zu erklären, daß die Algen im Licht : Dunkel Rhythmus besser wachsen können und die maximalen Wachstumsraten bei Synchronkulturen mit 16 : 8 Stunden Hell : Dunkel Wechsel erzielt werden (Langowska u. Zawadzki, 1979).

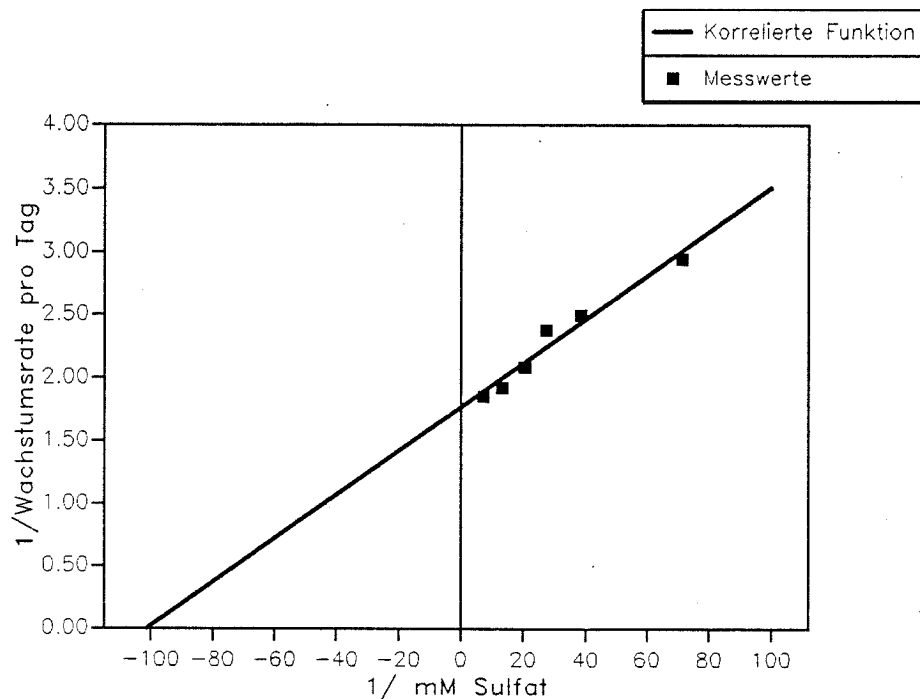


Abb. 9. Lineweaver - Burk - Kinetik des Algenwachstums mit Sulfat als Schwefelquelle (Batchversuch):
Mittelwerte aus zwei Parallelansätzen

Die nach Lineweaver - Burk aus den Meßwerten berechnete maximale Wachstumsrate der Algen betrug $\mu_{\max} = 0.55$ pro Tag ($r = 0.97$; $n = 6$) (Abb. 3) und stimmte somit gut mit der tatsächlich ermittelten höchsten Wachstumsrate überein. Ebenso wurde nach dieser Auftragung die Substrataffinität der Algen zum Sulfat mit einem K_s von 0.0099 mM ($r = 0.97$; $n = 6$) errechnet. Einen ähnlich hohen K_s -Wert wurde für *Chlorella pyrenoidosa* von K_s 0.012 mM (Vallee u. Jeanjean, 1968) ermittelt.

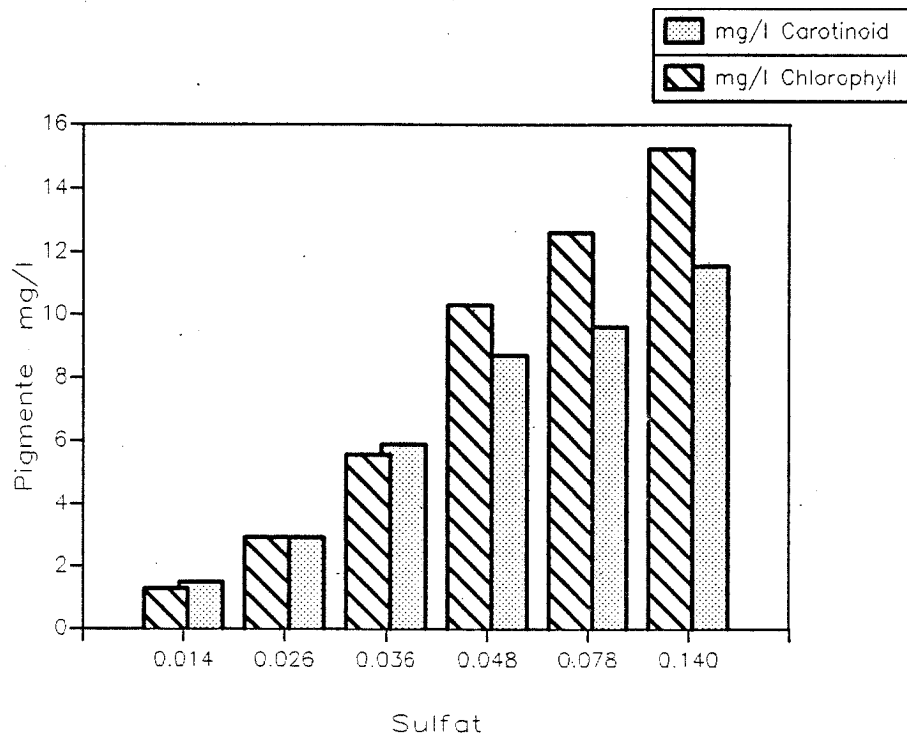


Abb. 10. Pigmentkonzentration von *Sc. obliquus* nach 5 Tagen in Abhängigkeit von der Sulfatanfangskonzentration (Batchversuch):

Mittelwerte aus zwei Kulturansätzen (Doppelbestimmung)

Parallel zur Zunahme der Kulturdichte stieg auch die Konzentration der untersuchten Pigmente Chlorophyll und Carotinoide an. Zu Versuchsende zeigte sich ebenso eine Abhängigkeit der Pigmentkonzentration von der eingesetzten Sulfatmenge (Abb. 10.). Nur bei dem Ansatz mit 0.014mM Sulfat in Medium nahm nach dem dritten Tag die Chlorophyll- und Carotinoidkonzentration etwas ab, auch wenn die Algendichte noch leicht weiter anstieg. Dieses könnte dadurch zu erklären sein, daß in diesem Ansatz die Algen ab dem dritten Tag schon unter Schwefelmangel litten (siehe dazu Tab. 3).

Inkubationsansatz	% Chl a	% Car	Chl a : Car
0.014 mM	0.4	0.45	1:1.1
0.026 mM	0.725	0.725	1:1
0.036 mM	1.03	1.09	1:1
0.048 mM	1.77	1.5	1:0.85
0.078 mM	2.02	1.54	1:0.76
0.140 mM	2.33	1.77	1:0.75

Tab.3: Pigmente in Prozent an der Biomasse und Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid nach 5 Tagen bei unterschiedlichen Sulfat-Ausgangskonzentrationen

Die Berechnung zeigte, daß je geringer die Sulfatkonzentration zu Versuchsbeginn war, desto niedriger lag der prozentuale Gehalt von Chlorophyll und Carotinoid an der Biomasse zu Versuchsende. Wie in Tab. 3 dargestellt, ging der Chlorophyllgehalt von 2.33% und der Carotinoidgehalt von 1.77% bis auf 0.4% bzw. 0.45% der Biomasse zurück.

Das Verhältnis von Chlorophyll : Carotinoid änderte sich mit abnehmender Sulfatkonzentration von 1:0.75 zu 1:1.1. Diese Änderung wurde auch anhand der Gelbfärbung der Algen visuell wahrgenommen.

Da die Algen noch weiter an Biomasse zunahmen, obwohl der Pigmentgehalt sich schon reduziert hatte, scheint der Pigmentgehalt ein empfindlicherer Indikator für Sulfatmangel als die Biomasse zu sein.

Die Abnahme der Sulfatkonzentration im Medium konnte das erste Mal über den gesamten Inkubationszeitraum beobachtet werden. Während in der Vergangenheit derartige Messungen wegen der fehlenden bzw. zu ungenauen Analytik (Bariumsulfatmethode) nicht durchgeführt wurden, und somit Versuche nur mit vorher berechneten Ausgangskonzentrationen durchgeführt wurden, ist es mit der Ionenchromatographie möglich, geringe Menge an Sulfat quantitativ zu erfassen.

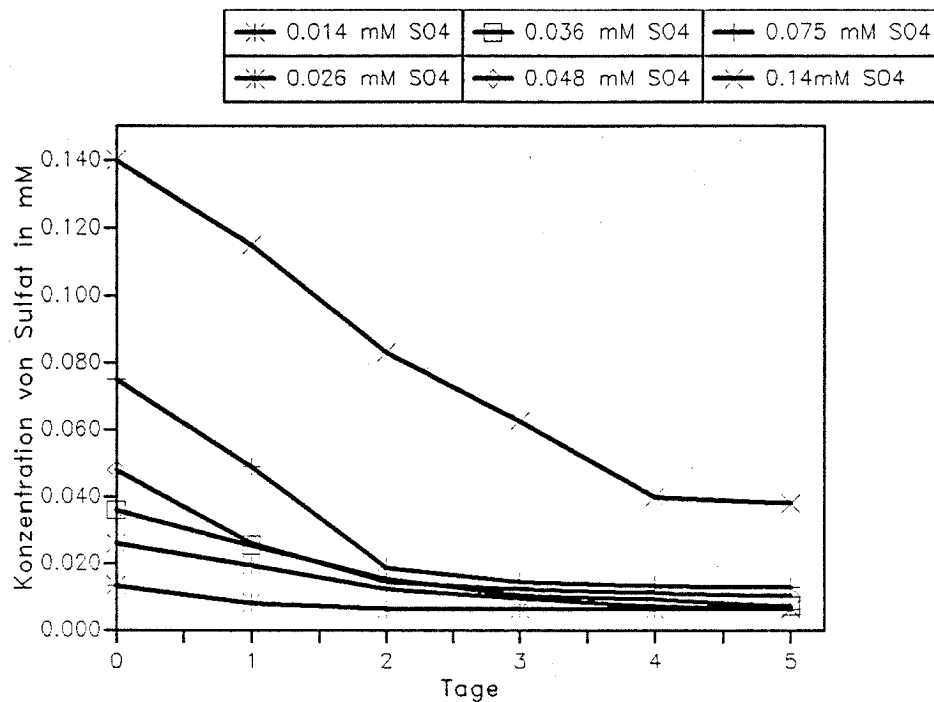


Abb. 11. Abnahme der Sulfatkonzentration im Medium (Batchversuch):

Mittelwert aus zwei Kulturansätzen (Doppelbestimmung)

Wegen der Wichtigkeit dieser Befunde für die weiteren Versuche sind die Ergebnisse auch als Tabelle aufgeführt (Tab. 4).

Inkubationsansatz	Beginn	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	Summe
0.014 mM	0.0135	0.0083	0.0073	0.0065	0.0063	0.0063	0.0074
0.026 mM	0.026	0.0196	0.0125	0.0095	0.0073	0.0067	0.0129
0.036 mM	0.036	0.0255	0.0155	0.0105	0.0095	0.0075	0.0285
0.048 mM	0.048	0.0261	0.0145	0.0125	0.0114	0.0104	0.0376
0.075 mM	0.075	0.0489	0.0189	0.0145	0.0135	0.0130	0.0620
0.14 mM	0.140	0.115	0.083	0.0625	0.040	0.038	0.1020

Tab.4: Abnahme der verschiedenen Sulfatkonzentrationen im Medium während der Inkubationsdauer von 5 Tagen

Die Algen nahmen am Anfang des Versuches die größte Menge an Sulfat auf; danach verminderte sich die Aufnahmerate drastisch. Dieses könnte zum einen daran liegen, daß bei verminderter Sulfatkonzentration im Medium den Algen immer

weniger Sulfat zur Aufnahme zur Verfügung stand. Zum anderen verringerte sich das Wachstum der Algen aufgrund der höheren Biomasse, die zur Selbstbeschattung führte; besonders deutlich war dies bei dem Ansatz mit 0.14mM Sulfatanfangskonzentration zu sehen.

Die verbleibende Sulfatkonzentration sank in diesen Versuch niemals unter 0.0063 mM (siehe Tab. 4: Ansatz mit 0.014mM, 0.026mM und 0.036mM Sulfat). Dies bedeutet, daß *Scenedesmus obliquus* nicht in der Lage ist, unterhalb dieser Konzentration von 0.0063 mM Sulfat weiter aufnehmen zu können. Solche Schwellenwerte sind auch für andere Substrate und andere Organismen beschrieben worden (Button, 1985).

Die Abnahme war in jedem der Ansätze exponentiell und kann wie folgt in einer Formel zusammengefaßt werden, wobei die Schwellenkonzentration der Aufnahme des Sulfates als Konstante miteingeht:

$$C = C_0 e^{(-0.00526x)} + 0.0063 \quad r = 0.92, n = 36 \quad (1)$$

C = verbleibende Sulfatkonzentration in mM zum Zeitpunkt t_x

C_0 = eingesetzte Sulfatmenge in mM

x = Biomasse in mg TS/l

Die Formel zeigt deutlich, daß die exponentielle Abnahme der Sulfatkonzentration im Medium von der Biomasse zum Zeitpunkt t_x abhängt, wobei die Höhe der Abnahme bestimmt ist durch die eingesetzte Sulfatmenge.

Korreliert man nun die Wachstumsraten mit der Differenz aus der eingesetzten Sulfatmenge und der verbliebenen Restsulfatmenge (= Sulfatelimination), so kann man es wie folgt mathematisch ausdrücken:

$$\Delta C = 4.928 \times \mu^{6.069} \quad r = 0.97, n = 7 \quad (2)$$

Δ = aufgenommenes Sulfat in mM nach 5 Tagen

μ = Wachstumsrate pro Tag

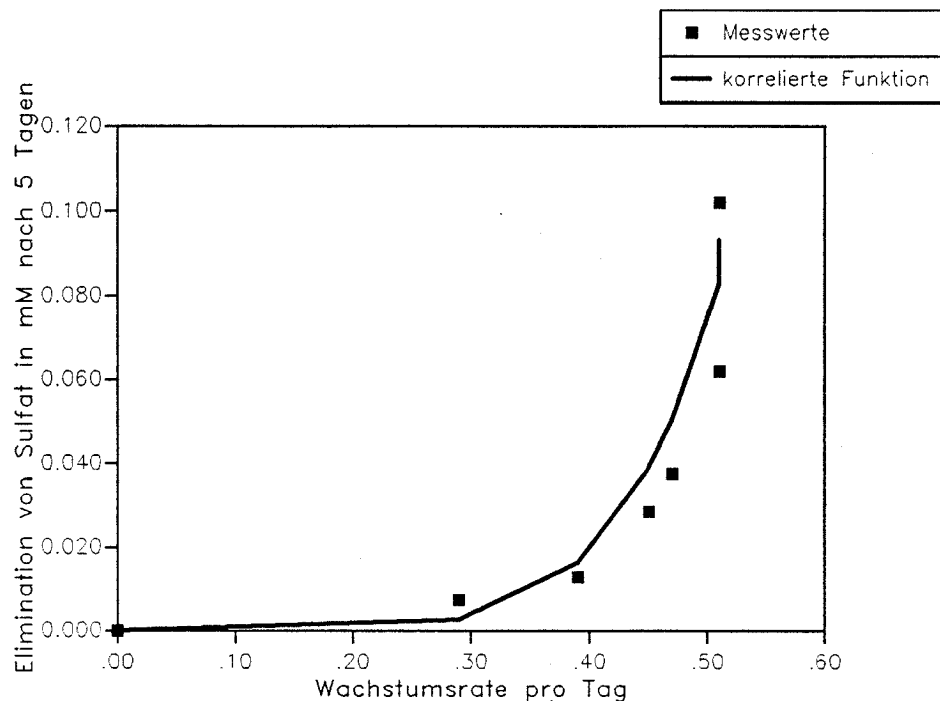


Abb. 12. Korrelation der Wachstumsraten mit der Sulfatelimination im Medium (Batchversuch):

Korrelation von 7 Mittelwerten

Die Abb. 12. zeigt, daß diese Funktion gut die Korrelation zwischen Wachstumsrate der Algen und der aus dem Medium entfernten Sulfatkonzentration wieder spiegelt.

Da die Abnahme der Sulfatkonzentration im Medium der direkt bestimmten Aufnahme des Sulfates in die Algen (vergl. Kapitel 3.3.1.3) entsprach, kann man die beobachtete Abnahme der Sulfatkonzentration gleich der Aufnahme in die Algen setzen.

Am Versuchsanfang nahmen die Algen proportional mehr Sulfat pro mg Biomasse auf als am Ende (Tab. 4). So war z.B. der sich daraus errechnende Schwefelgehalt der Algen im Ansatz mit 0.14mM Sulfat am ersten Tag 1.1% und fiel zu Versuchsende am 5.Tag auf 0.502% ab (Tab. 4). So wurde in diesem Zusammenhang von Wedding u. Black (1960) und Utkilen et al. (1976) nachgewiesen, daß die innere Schwefelkonzentration der Algen von der externen Schwefelkonzentration im Medium abhängt.

Sulfat im Medium bei Versuchsbeginn	Biomasse mg/l	Schwefel mg/l	Schwefelgehalt % der Biomasse
0.014mM	311	0.236	0.075
0.026mM	400	0.412	0.132
0.036mM	537	0.912	0.169
0.048mM	580	1.203	0.207
0.078mM	620	1.984	0.320
0.140mM	650	3.264	0.502

**Tab.5: Berechnung des prozentualen Schwefelgehaltes an der Biomasse nach 5 Tagen
Versuchsdauer bei unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen**

Am Versuchsende lag die Aufnahme des Gesamtschwefel in die Biomasse zwischen 0,075% und 0,502%, je nachdem, wieviel Schwefel ihnen zu Anfang zur Verfügung stand. (Tab. 5). In der Literatur wird für Algen wie *Chlorella* und *Euglena* Schwefelgehalte von 0.1 bis 1.2% in der Biomasse angegeben (Raven, 1981). Für *Scenedesmus obliquus* geben Soeder et al. (1987) Schwefelgehalte von 0.15 bis 0.7% an, wobei sich die Kulturbedingungen, mit Ausnahme des Mediums, von den hier ausgewählten unterschieden. Dieses deutet darauf hin, daß die Sulfatkonzentration im Medium und das davon abhängige Wachstum der Algen den Schwefelgehalt in deren Biomasse bestimmen.

Der Versuch zeigt deutlich, daß *Scenedesmus obliquus* sulfatabhängig wächst, wobei die Pigmente der Algen, Chlorophyll und Carotinoid, mit der gleichen Abhängigkeit zunahmen. Die Algen nahmen, je höher die Sulfatkonzentration im Medium war, mehr Sulfat auf, was direkten Einfluß auf den Schwefelgehalt der Biomasse hatte. Sie waren nicht in der Lage, Sulfat unterhalb einer Außensulfatkonzentration von 0.0063mM aufzunehmen.

3.1.2 Wachstum von *Sc. obliquus* mit verschiedenen 1-NS Konzentrationen als S-Quelle

Algen sind in der Lage, organisch gebundene Schwefelverbindungen wie Cystein oder Methionin aufzunehmen und partiell zu metabolisieren (O'Kelley, 1974; Sirensky, 1977). *Scenedesmus obliquus* kann verschiedene Naphthalinsulfonsäuren als alleinige Schwefelquelle nutzen, wie Luther und Soeder (1987), als auch Soeder et al. (1987) nachgewiesen.

Nachdem im vorherigen Kapitel die Abhängigkeit des *Scenedesmus obliquus* von der Sulfatkonzentration dokumentiert wurde, sollte in der folgenden Versuchsreihe festgestellt werden, wie einerseits das Wachstum der Algen von der eingesetzten Konzentration der 1 - Naphthalinsulfonsäure abhängt, und zum anderen, welche Desulfonierungsraten unter den gewählten Bedingungen erreicht werden können.

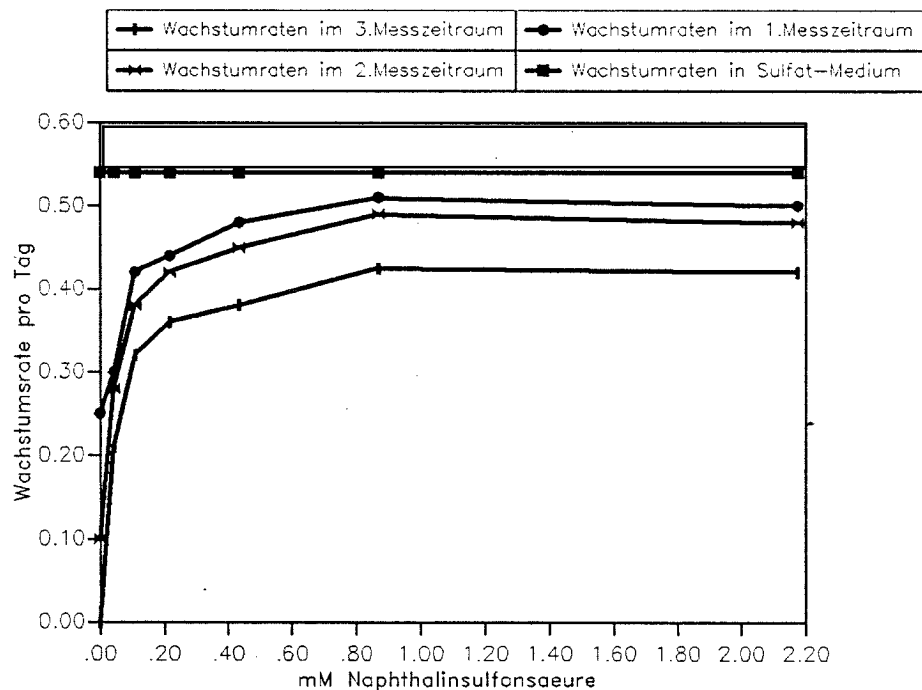


Abb. 13. Adaptation der Algen von Sulfat zum Sulfonat als Schwefel-Quelle (Batchversuch):
Meßwerte aus zwei Parallelansätzen

Wie schon bei Luther und Soeder (1987) beschrieben, nahmen die Wachstumsraten von *Scenedesmus obliquus* nach dem Überimpfen von sulfathaltigem in sulfonsäurehaltiges Medium zwischen 10 - 50% von der vorherigen Wachstumsrate ab. Erst ab dem dritten Meßzeitraum stabilisierten sich die Wachstumsraten der Algen in den jeweiligen Konzentrationsansätzen. Das stufenweise Absinken der Wachstumsrate könnte sicherlich zum einen dadurch bedingt sein, daß durch das Überimpfen in sulfonsäurehaltige Medien ebenso Sulfat mit in das neue Medium mitüberimpft wurde, und die Wachstumsraten der Algen durch das Restsulfat-Sulfonsäure-Verhältnis bestimmt wurden. Zum anderen scheint es, als ob sich die Algen an die Sulfonsäure als S-Quelle adaptieren mußten, so daß die Wachstumsrate noch weiter absank. Endgültig konnte dieses erst durch Einsatz von radioaktiv markierter Sulfonsäure geklärt werden (s. Kap. 3.3.1).

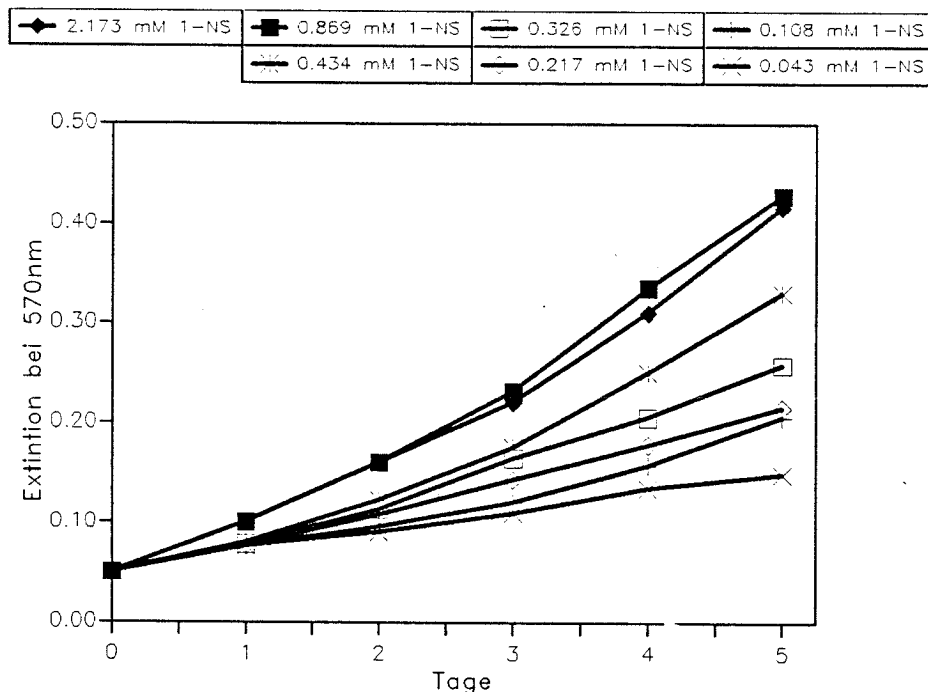


Abb. 14. Biomassezunahme von *Sc. obliquus* in Abhängigkeit von der Sulfonatkonzentration (Batchversuch):

Mittelwerte aus zwei parallel angesetzten Kulturansätzen

Inkubationsdauer: 9 Wochen

Die Algendichte nahm mit steigender 1-Naphthalinsulfonsäurekonzentration zu, d.h. die Algen wuchsen abhängig von der ihr angebotenen 1-NS-Konzentration.

Die Biomassezunahme der Algen in dem Ansatz mit 2.17mM Sulfonsäure war etwas geringer als die der Algen in dem Ansatz mit 0.869mM, so daß wohl eine geringfügige Hemmung vorgelegen haben könnte.

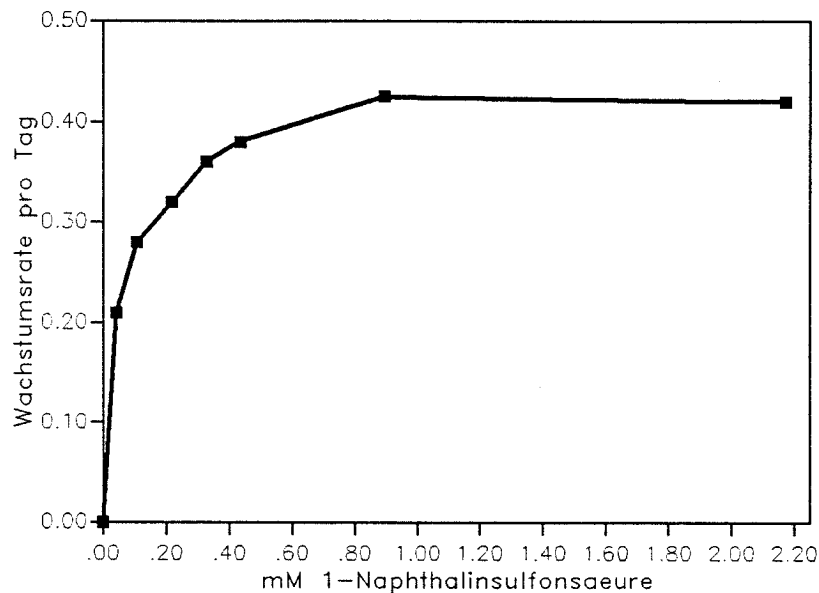


Abb. 15. Wachstumsraten von *Sc. obliquus* in Abhängigkeit von der Sulfonatanfangskonzentration (Batchversuch):

Mittelwerte aus zwei Parallelansätzen

Inkubationsdauer: 9 Meßperioden

Die Auftragung der über 5 Tage gemittelten Wachstumsraten der Algen gegen die Sulfonsäureausgangskonzentration zeigt, daß die Wachstumskinetik einer Sättigungskinetik folgt (Abb. 15). Die höchste Wachstumsrate von $\mu = 0.425$ pro Tag wurde bereits bei der Naphthalinsulfonsäurekonzentration von 0.869mM im Medium erzielt. Bei der noch höheren Konzentration von 2.17mM nahm die Wachstumsrate der Algen auf $\mu = 0.41$ pro Tag ab.

Die nach Lineweaver-Burk berechnete maximale Wachstumsrate zeigte eine gute Übereinstimmung mit der experimentell gewonnenen höchsten Wachstumsrate. Die maximale Wachstumsrate betrug $\mu_{\max} = 0.434$ pro Tag ($r=98$, $n=7$). Dieses entspricht einer Abweichung von 2% zum Experiment. Gegenüber des $\mu_{\max}$ -Wertes

der in Sulfat inkubierten Algen war der für 1-NS ermittelte 21% niedriger ($\mu_{\max}$ für Sulfat: 0.55 pro Tag; $\mu_{\max}$ für 1-NS: 0.434 pro Tag).

Die ebenso aus der Auftragung ermittelte Substrataffinität für 1-Naphthalinsulfonsäure betrug $K_s = 0.046\text{mM}$ und war damit 4.64 fach höher als der K_s -Wert für Sulfat.

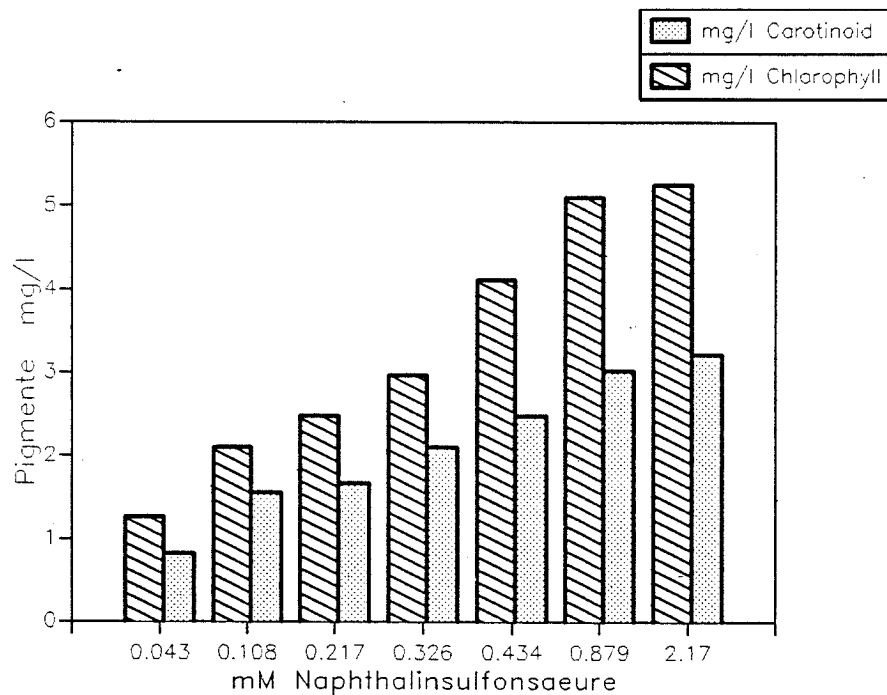


Abb. 16. Pigmentkonzentration von *Sc. obliquus* nach 5 Tagen in Abhängigkeit von der Sulfonatanfangskonzentration(Batchversuch):
Mittelwerte aus zwei Kulturansätze (Doppelbestimmung)

Die Zunahme der Pigmente Chlorophyll und Carotinoid korrelierte gut mit der Zunahme der Kulturdichte, da mit steigender Sulfonsäurekonzentration der Pigmentgehalt anstieg (Abb. 16). In dem Ansatz mit der niedrigsten 1-NS-Konzentration von 0.043 mM wurde ab dem dritten Tag eine leichte Abnahme der Pigmente trotz weiterer Biomassezunahme gemessen. Auch hier scheint wie bei dem Ansatz mit 0.014mM Sulfat (Kap. 3.1.1) Schwefelmangel aufgetreten zu sein.

Inkubationsansatz	% Chl a	% Car	Chl a : Car
0.043mM	0.85	0.55	1:0.64
0.0108mM	1.13	0.64	1:0.56
0.217mM	1.14	0.69	1:0.60
0.326mM	1.12	0.65	1:0.59
0.434mM	1.24	0.74	1:0.50
0.879mM	1.19	0.70	1:0.59
2.17mM	1.26	0.77	1:0.61

Tab. 6: Pigmente in Prozent an der Biomasse und das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid nach 5 Tagen Versuchsdauer bei unterschiedlichen Sulfonsäure-Ausgangskonzentrationen

Die prozentualen Anteile von Chlorophyll und Carotinoid an der Biomasse zeigen kaum Änderungen trotz steigender 1- Naphthalinsulfonsäurekonzentrationen, so daß ein durchschnittlicher Chlorophyllgehalt von $1.18 \pm 0.05\%$ und ein durchschnittlicher Carotinoidgehalt von $0.69 \pm 0.04\%$ ermittelt wurde. Ausnahme war der Ansatz mit 0.043 mM 1 - Naphthalinsulfonsäure, wo der Pigmentgehalt der Algen auf 0.85% Chlorophyll und 0.55% Carotinoid an der Biomasse zurückging. Da sich der prozentuale Anteil der Pigmente an der Biomasse nicht änderte, blieb im Gegensatz zu den Versuchen mit abgestufter Sulfatanfangskonzentration auch das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid mit $1:0.59 \pm 0.02$ konstant.

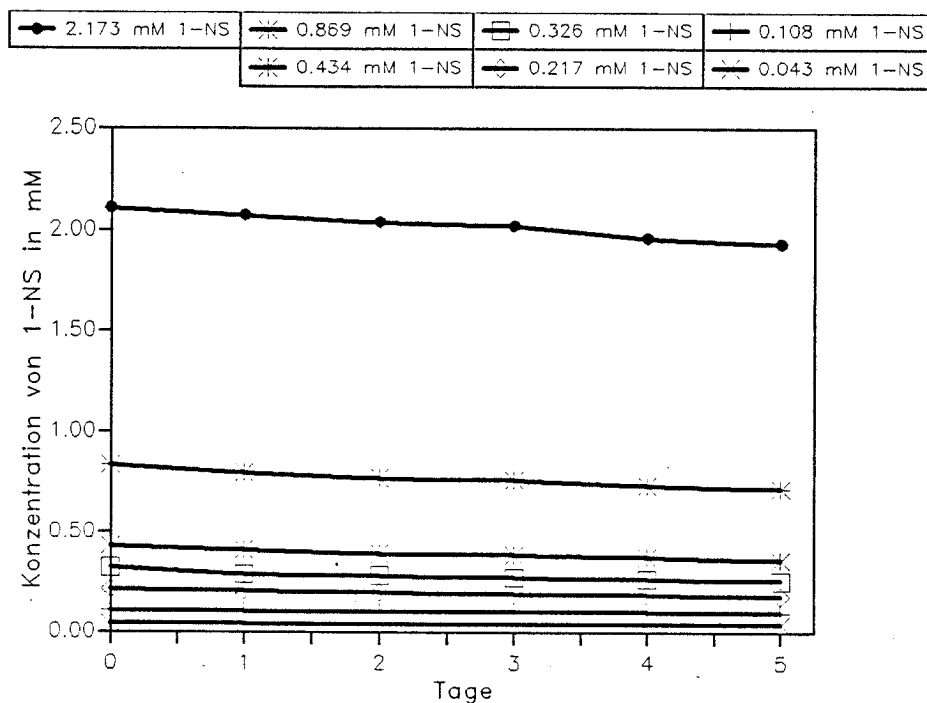


Abb. 17. Abnahme der Sulfonatkonzentration im Medium (Batchversuch):
Mittelwerte aus zwei Kulturansätze (Doppelbestimmung)

Aufgrund der sehr hohen Sulfonsäurekonzentrationen ist die Abb. 17 noch in Tabellenform wiedergegeben, um die Desulfonierungsraten in den verschiedenen Ansätzen zu dokumentieren.

Inkubationsansatz	Beginn	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag	Summe
0.043 mM	0.043	0.041	0.0402	0.0400	0.0388	0.0382	0.0048
0.108 mM	0.108	0.104	0.103	0.102	0.101	0.097	0.011
0.217 mM	0.217	0.209	0.201	0.192	0.189	0.181	0.036
0.326 mM	0.323	0.290	0.283	0.274	0.266	0.257	0.065
0.434 mM	0.430	0.410	0.393	0.386	0.376	0.360	0.069
0.869 mM	0.835	0.795	0.769	0.760	0.732	0.717	0.117
2.170 mM	2.108	2.073	2.039	2.021	1.960	1.932	0.175

Tab.7: Abnahme der verschiedenen Sulfonsäurekonzentrationen im Medium
während der Inkubationsdauer von 5 Tagen

Ebenso wie bei dem Sulfatversuch (Kap. 3.1.1) nahm die 1-NS-Konzentration zu Anfang des Versuches in jedem Ansatz stärker ab als gegen Ende. Dieses deutet

darauf hin, daß die Aufnahme der Sulfonsäure ebenso abhängig von der Anfangskonzentration ist, wie es auch für Sulfat festgestellt wurde, und es wahrscheinlich für alle Abhängigkeiten von der Konzentration einer limitierenden Substanz gilt.

In dem Ansatz mit 0.0434mM war die Konzentration im Medium am 4. und 5.Tag nahezu gleich, was den Schluß zuläßt, daß *Scenedesmus obliquus* für die Aufnahme einen Schwellenwert von ca. 0.038mM besitzt, unterhalb dessen keine Sulfonsäure mehr aufgenommen werden konnte. Im Vergleich zum Restsulfatgehalt von 0.0063mM im Medium, welches nicht mehr von den Algen aufgenommen werden kann, ist der Schwellenwert für die Aufnahme von 1-NS 6-fach höher als für Sulfat.

Man kann die Abnahme wie folgt beschreiben, wobei die Schwellenwertkonzentration von 0.038mM mit einbezogen wurde:

$$C = C_0 e^{-0.00062073x} + 0.038 \quad r = 0.91, n=42 \quad (3)$$

C = verbleibende Sulfonsäurekonzentration in mM zum Zeitpunkt t_x

C_0 = eingesetzte Sulfonsäuremenge in mM

x = Biomassekonzentration in mg TS/l

Durch die Formel läßt sich gut beschreiben, daß die verbleibende Sulfonsäurekonzentration zum Zeitpunkt t_x abhängig ist von der anfangs eingesetzten Sulfonsäurekonzentration und von der Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t_x .

Ebenso kann eine Abhängigkeit zwischen der Wachstumsrate und der in diesem Zeitraum eliminierten 1-Naphthalinsulfonsäuremenge festgestellt werden, die wie folgt beschrieben werden kann:

$$\Delta C = 13.433 \mu^{5.3364} \quad r = 0.91, n=7 \quad (4)$$

Δ = aufgenommene Sulfonsäure in mM nach 5 Tagen

μ = Wachstumsrate pro Tag

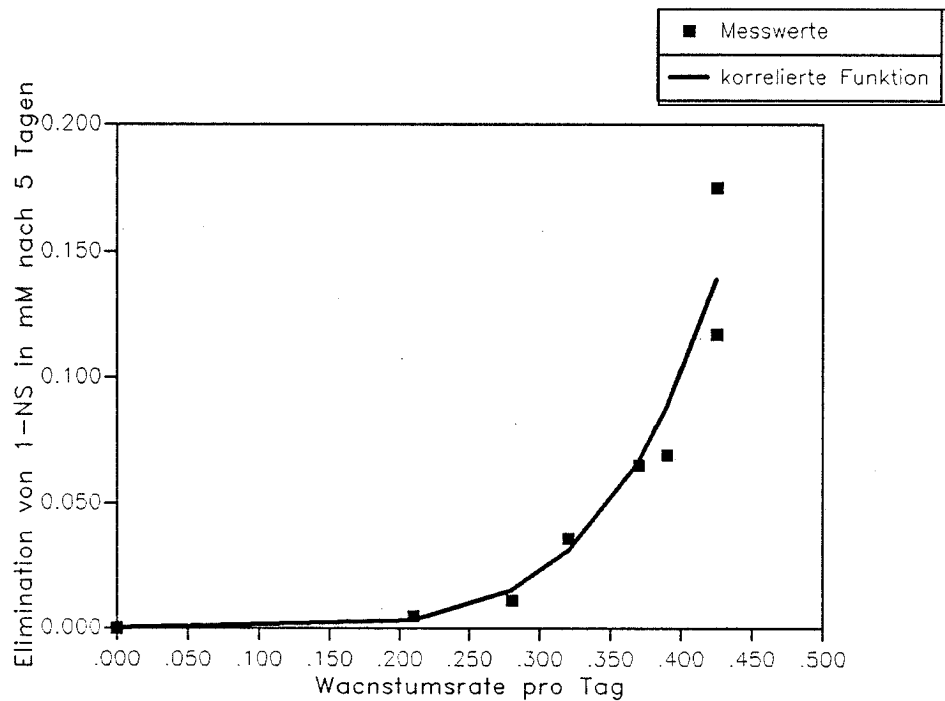


Abb. 18. Korrelation der Wachstumsraten mit der Sulfonateelimination im Medium (Batchversuch):
Korrelation aus 8 Mittelwerten

Diese Korrelation zeigt die direkte Abhängigkeit der Eliminationsleistung von der Wachstumsrate auf.

Da durch die Inkubation mit radioaktiv markierter ^{35}S -1- Naphthalinsulfonsäure (Kap. 3.3.1.1.) gezeigt werden konnte, daß sich in den Algen nahezu die gleiche Konzentration an ^{35}S -1-NS befand, die als Abnahme der Konzentration gemessen wurde, kann die Abnahme der Sulfonsäure im Medium gleich der Aufnahme der Sulfonsäure in die Biomasse bzw. der Desulfonierungsrate gesetzt werden.

Sulfonsäure zu Versuchsbeginn	Biomasse mg/l	Schwefel mg/l	Schwefelgehalt % der Biomasse
0.043mM	221	0.1536	0.103
0.108mM	263	0.352	0.1338
0.217mM	301	1,152	0.382
0.326mM	392	2.08	0.53
0.434mM	462	2.208	0.392
0.879mM	599	3.744	0.625
2.170mM	582	5.60	0.962

Tab.8: Berechnung des prozentualen Schwefelgehaltes an der Biomasse

Da zu Versuchsbeginn die Abnahme der Sulfonsäure proportional größer war als der Biomassezuwachs der Algen, nahm z.B. der Schwefelgehalt der Algen in dem Ansatz mit 0.869mM von 1.5% am ersten Tag auf 0.625% am fünften Tag ab. Aus Tab. 7 wird ersichtlich, daß der Schwefelgehalt in den Algen mit zunehmender 1-NS Konzentration steigt. Die Schwefelgehalte der Algen variierten von 0.103% bis zu 0.962%, je nachdem, wieviel Sulfonsäure am Anfang zur Verfügung stand.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Algen limitiert durch die 1- Naphthalinsulfonsäurekonzentration wuchsen, wobei auch die Pigmentkonzentration davon beeinflusst wurde. Ebenso war die Desulfonierungsrate abhängig von der eingesetzten Konzentration an 1-NS und der Wachstumsrate der Algen.

3.1.3 Einfluß der Restsulfatkonzentration bei gleichzeitiger Zugabe von 0.217mM 1-NS

Wie schon in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, konnte in der Nährlösung ein Restsulfatgehalt von ca. 0.008 mM durch Verunreinigungen der anderen Chemikalien nachgewiesen werden. Bei Soeder et al. (1987) und bei Luther und Soeder (1987) wurde damals angenommen, daß diese Restsulfatkonzentration im Medium keinen Einfluß auf das Wachstum der Algen und die Desulfonierung haben.

Deshalb sollte untersucht werden, ob diese geringe Menge an Sulfat im Medium in Anwesenheit von einer wesentlich höheren Sulfonsäurekonzentration noch

verwertet werden kann, und inwieweit dieses eine Rolle bei der Verwertung der Sulfonsäure spielen könnte. Die Sulfonsäureanfangskonzentration im Medium betrug zu Beginn 0.217 mM 1-NS.

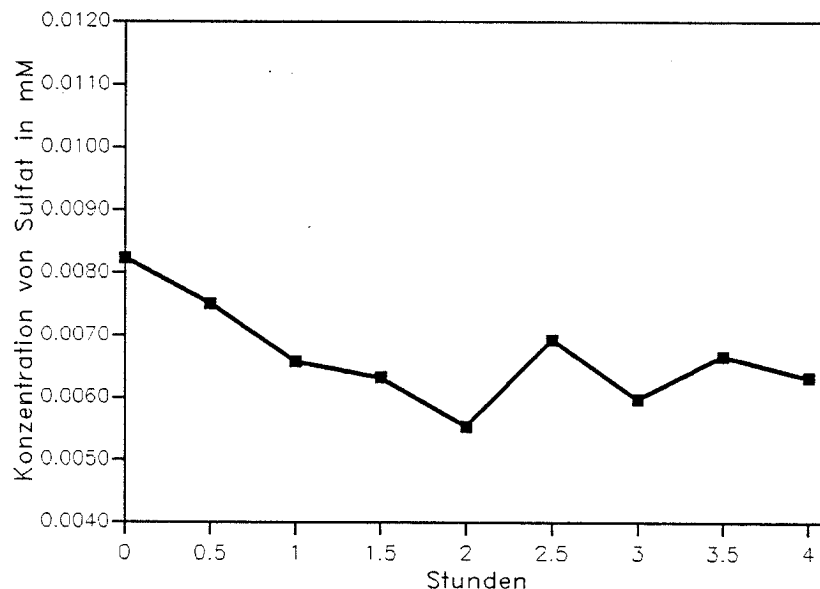


Abb. 19. Abnahme der Restsulfatkonzentration im Medium in den ersten 4 Stunden in Gegenwart von 0.217mM 1-NS (Batchversuch):
Doppelbestimmung der Meßwerte

In den ersten zwei Stunden des Versuches nahm die Sulfatkonzentration im Medium von 0.008 mM auf die Schwellenwertkonzentration von 0.0063 mM ab. Danach schwankte die Konzentration um 0.0063 ± 0.0003 mM (s. S.48), was im Bereich der Meßgenauigkeit lag. Dieses bedeutet, daß *Scenedesmus obliquus* 0.0017 mM Sulfat in den ersten zwei Stunden aufgenommen hatte. Diese Menge an Sulfat entsprach ungefähr der Menge, welche die Algen im Versuch mit 0.014 mM Sulfat zwischen dem zweiten und dritten Meßtag aufgenommen hatten.

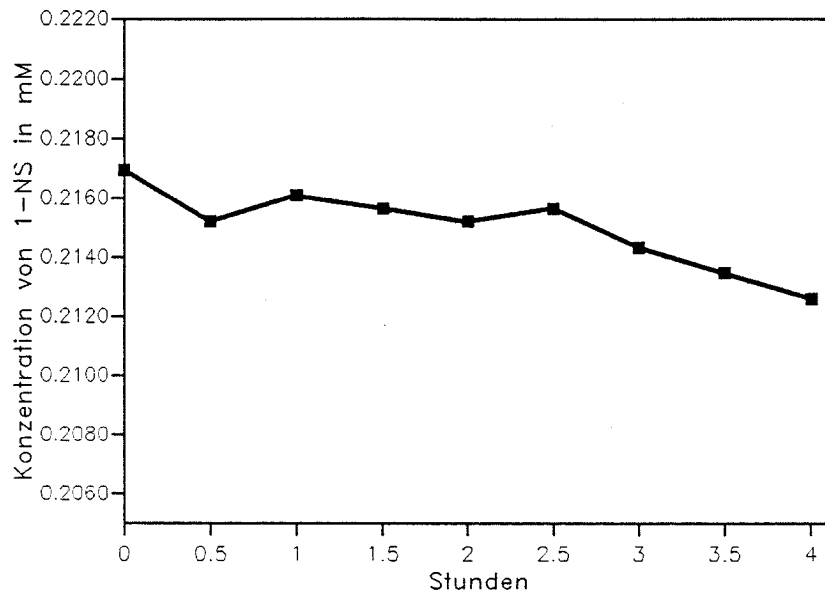


Abb. 20. Abnahme der Sulfonatkonzentration in den ersten 4 Stunden (Batchversuch):
Doppelbestimmung der Meßwerte

Die Sulfonsäurekonzentration nahm in diesem Zeitraum linear von 0.217 mM auf 0.213 mM ab, wie es in der Abb. 20 zusehen ist.

In diesem Meßzeitraum von 4 Stunden konnte aber noch keine signifikante Zunahme der Kulturdichte gemessen werden, so daß die zu anfangs eingestellte Kulturdichte von $E_{570} = 0.05$ auch am Versuchsende gemessen wurde.

Da die Algen in den ersten vier Stunden 0.0017 mM Sulfat und 0.003 mM 1-Naphthalinsulfonsäure aufnahmen, kann man nicht ausschließen, daß diese Menge an Sulfat die Algen bezüglich ihres Wachstums und ihrer Vitalität beeinflussen kann. Der Versuch zeigt auch, daß die Algen auch minimale Sulfatmengen bei Anwesenheit der hohen Sulfonsäurekonzentration aufnehmen können, wobei aber auch gleichzeitig 1-NS von den Algen aufgenommen wird.

3.1.4 Wachstum von *Sc. obliquus* mit Sulfat und Sulfonsäure nach "S" - freier Vorinkubation

Da die Algen geringe Mengen an Sulfat bei gleichzeitig hoher Sulfonsäurekonzentration noch verwerten können (siehe Kap. 4.1.3.) wurde *Scenedesmus obliquus* erst in "S-freiem"-Medium vorinkubiert, um ausschließen zu können, daß zur Verwertung der Sulfonsäure Sulfat notwendig ist. Da die Algen nicht in der Lage sind, ohne eine Schwefelquelle wachsen zu können, wurden sie erst in "S-freiem" Medium vorinkubiert, bis die Kulturdichte über 3 Tage konstant war, und dann die Schwefelquellen zugegeben. Durch diese Vorinkubation konnte man davon ausgehen, daß das Sulfat bis zur Schwellenwertkonzentration verbraucht gewesen sein mußte, und somit die Algen auf weitere Schwefelmengen angewiesen waren.

Nach Konstanz der Kulturdichte wurde den Algen 1- Naphthalinsulfonsäure und Sulfat in folgenden Konzentration zugegeben:

1. 0.217mM 1-NS ohne Sulfat
2. 0.217mM 1-NS + 0.0026mM Sulfat
3. 0.217mM 1-NS + 0.026mM Sulfat

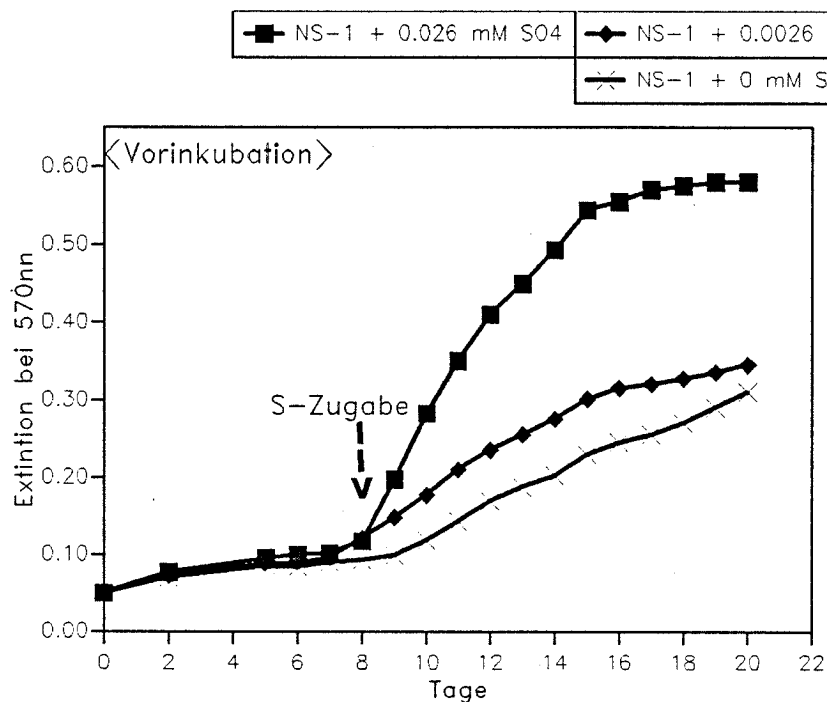


Abb. 21. Biomassezunahme von *Sc. obliquus* nach S - freier Inkubation (Batchversuch):

In den ersten 5 Tagen der S-freien-Inkubation nahm die Kulturdichte der Algen von $E_{570} = 0.05$ auf $E_{570} = 0.09$ zu. Dies war darauf zurückzuführen, daß die Algen das Restsulfat aufnahmen, welches als Verunreinigung durch Chemikalien ins Medium eingetragen wurde. Da die Biomasse in den nächsten zwei Tagen nicht weiter anstieg, konnte davon ausgegangen werden, daß die Algen das Sulfat weitestgehend aufgenommen hatten.

Nach Zugabe der Schwefelquellen am 7. Tag nahm die Kulturdichte in allen drei Versuchsansätzen zu, wobei die Algen mit der höchsten Sulfatgabe von 0.026mM Sulfat die größte Zunahme aufwies.

Die Algen in dem zweiten Kulturansatz mit 0.0026 mM Sulfat wuchsen langsamer als mit der 10-fachen Menge an Sulfat. Noch geringer war die Zunahme der Kulturdichte in dem ersten Ansatz mit nur Sulfonsäure als Schwefelquelle, wobei aber am Ende des Versuches nach 22 Tagen nicht die stationäre Phase erreicht wurde. Dieses zeigt deutlich, daß die Algen mit Sulfonsäure als alleinige Schwefelquelle wachsen können; das Wachstum ließ sich durch die Zugabe von Sulfat noch steigern.

Die Wachstumsraten der Algen über den Zeitraum nach Zugabe der Schwefelquellen waren:

1. $\mu = 0.220$ pro Tag für den Ansatz 0.21 mM 1-NS + 0.026mM Sulfat
2. $\mu = 0.156$ pro Tag für den mit 0.21 mM 1-NS + 0.0026mM Sulfat
3. $\mu = 0.107$ pro Tag für den mit nur 0.21 mM 1-NS

Vergleicht man die Wachstumsraten der Algen mit denen im Kap. 3.1.1 und Kap. 3.1.2., so sind diese deutlich geringer als die Wachstumsraten der Algen, denen permanent Schwefel in Form von 1-NS und Sulfat zur Verfügung standen.

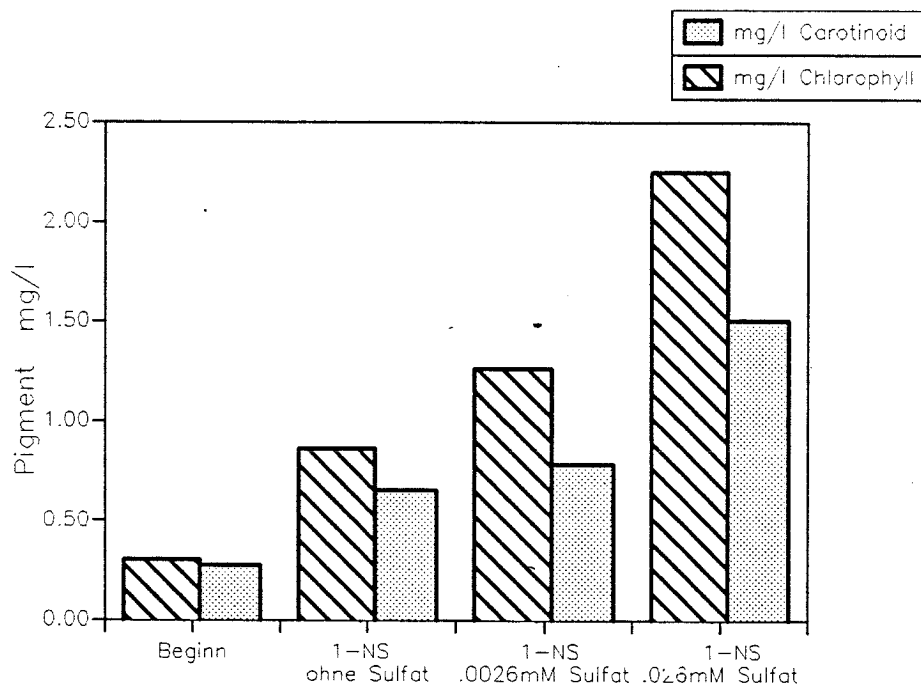


Abb. 22. Zunahme der Pigmentkonzentration von *Sc. obliquus* nach Zugabe von Schwefelquellen (Batchversuch):
Doppelbestimmung der Proben

Die Pigmentkonzentration der Algen nahm nach Zugabe der Schwefelquellen ebenso zu wie die Biomasse. Zu Beginn des Versuches wurde in allen drei Ansätzen eine Chlorophyllkonzentration von 0.27mg/l und eine Carotinoidkonzentration von 0.26mg/l gemessen. Zu Versuchsende hatten die Algen in allen Ansätzen

mehr Chlorophyll und Carotinoid, wobei die Algen im dritten Ansatz fast doppelt soviele Pigmente besaßen als die mit der niedrigen Sulfatkonzentration (2.Ansatz).

Inkubationsansatz	% Chla	% Car	Chla : Car
Zu Beginn	0.3	0.3	1:1
1-NS	0.35	0.23	1:0.66
1-NS + 0.0026mM Sulfat	0.4	0.251	1:0.62
1-NS + 0.0260mM Sulfat	0.42	0.255	1:0.60

Tab.9: Pigmente in Prozent an der Biomasse und das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid bei Versuchsende nach 11 Tagen

Der prozentuale Pigmentgehalt stieg von 0.3% Chlorophyll und 0.3% Carotinoid zu Beginn des Versuches am 7. Tag an, wobei die Algen im dritten Ansatz den höchsten Pigmentgehalt von 0.42% Chlorophyll und 0.255% Carotinoid besaßen. Vergleicht man den Pigmentgehalt mit den Algen im Ansatz mit 0.0026 mM Sulfat (Kap.4.1.1.), so hatten die Algen hier nur 75% des Pigmentgehaltes. Noch deutlicher ist der Unterschied im Vergleich der Algen im 1. Ansatz mit denen, die permanent Sulfonsäure nutzen konnten. So hatten die Algen hier nur ein Drittel des Pigmentgehaltes.

Das Verhältnis von Chlorophyll : Carotinoid änderte sich mit zunehmender Sulfatkonzentration zugunsten des Chlorophyllgehaltes. War das Verhältnis zu Beginn 1 : 1 Chlorophyll : Carotinoid, so änderte sich dieses auf bis zu 1 : 0.60 bei den Algen im 3. Ansatz.

Dieses Experiment zeigt, daß *Scenedesmus obliquus* in der Lage ist, auch bei völliger Abwesenheit von Sulfat 1- Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle zu nutzen; desweiteren, daß eine schwefelfreie Vorinkubation zu einer Einschränkung der Vitalität und somit der Wachstumsgeschwindigkeit der Algen führt. Die Algen konnten sich innerhalb dieser Meßperiode nicht wieder von der schwefelfreien Vorinkubation in soweit erholen, daß die in Kap. 3.1.1 und 3.1.2 erzielten Wachstumsraten nicht erreicht werden konnten.

3.1.5 Wachstum von *Sc. obliquus* bei gleichzeitiger Gabe von 0.217mM 1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen

Da die Algen sowohl Sulfat wie Sulfonsäure in Abhängigkeit von der Konzentration nutzen können, sollte *Scenedesmus obliquus* Sulfat und Sulfonsäure gleichzeitig als Schwefelquelle angeboten werden. Es sollte festgestellt werden, ob die Wachstumsrate der Algen von $\mu=0.36$ pro Tag bei der 1-NS-Konzentration von 0.217mM durch die Zugabe von Sulfat gesteigert werden kann, und inwieweit die Aufnahme der Sulfonsäure und des Sulfates durch die gegenseitige Anwesenheit beeinflusst wird.

Es wurden die Sulfonsäure und Sulfat in folgenden Konzentrationen zugegeben:

1. 0.217 mM 1-Naphthalinsulfonsäure + 0.014 mM Sulfat
2. 0.217 mM 1-Naphthalinsulfonsäure + 0.026 mM Sulfat
3. 0.217 mM 1-Naphthalinsulfonsäure + 0.052 mM Sulfat
4. 0.217 mM 1-Naphthalinsulfonsäure + 0.140 mM Sulfat

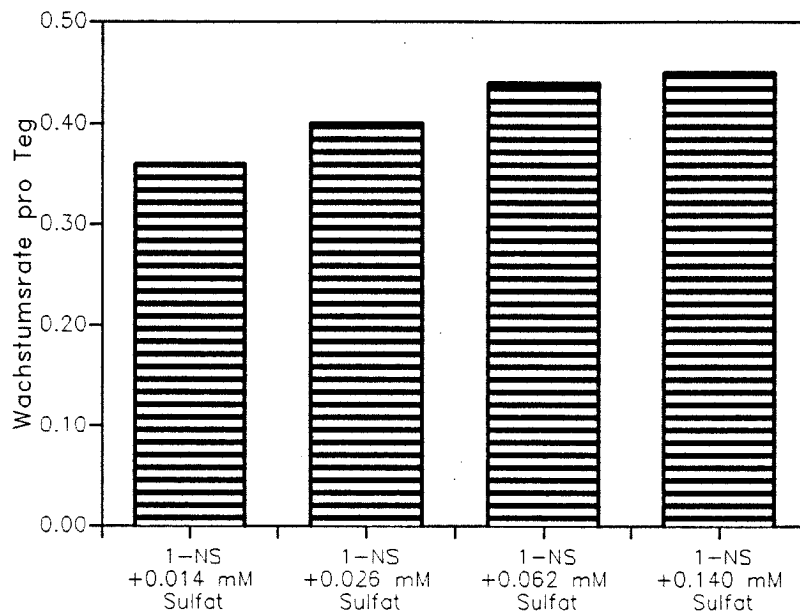


Abb. 23. Wachstumsraten von *Sc.obliquus* in Sulfonat- und Sulfatanfangskonzentration (Batchversuch):
Mittelwerte aus zwei Parallelansätzen
Inkubationsdauer: 4 Meßperioden

Die Wachstumsraten der Algen stiegen mit zunehmender Sulfatgabe von $\mu = 0.36$ pro Tag in dem ersten Ansatz auf $\mu = 0.485$ pro Tag im vierten Ansatz. Dieses bedeutet, daß das Wachstum von *Scenedesmus obliquus* von $\mu = 0.34$ pro Tag nur mit Sulfonsäure als einzige Schwefelquelle (siehe Kap 4.1.2.) durch Zugabe von Sulfat um bis zu 41% gesteigert werden konnte.

Berechnet man die maximale Wachstumsrate nach Lineweaver-Burk, so ist $\mu_{\max} = 0.5$ pro Tag ($r=0.98$, $n=4$). Dieses bedeutet, daß die maximale Wachstumsrate unter diesen Bedingungen deutlich höher ist als ausschließlich mit 1-NS ($\mu_{\max} = 0.434$ pro Tag), aber nur nicht die maximale Wachstumsrate der Algen von $\mu_{\max} = 0.55$ pro Tag in Sulfatmedium erreicht wurde. Die berechnete Substrataffinität zum Sulfat nahm aber durch die Anwesenheit der Sulfonsäure von $K_s = 0.0099\text{mM}$ auf $K_s = 0.0352$ ab.

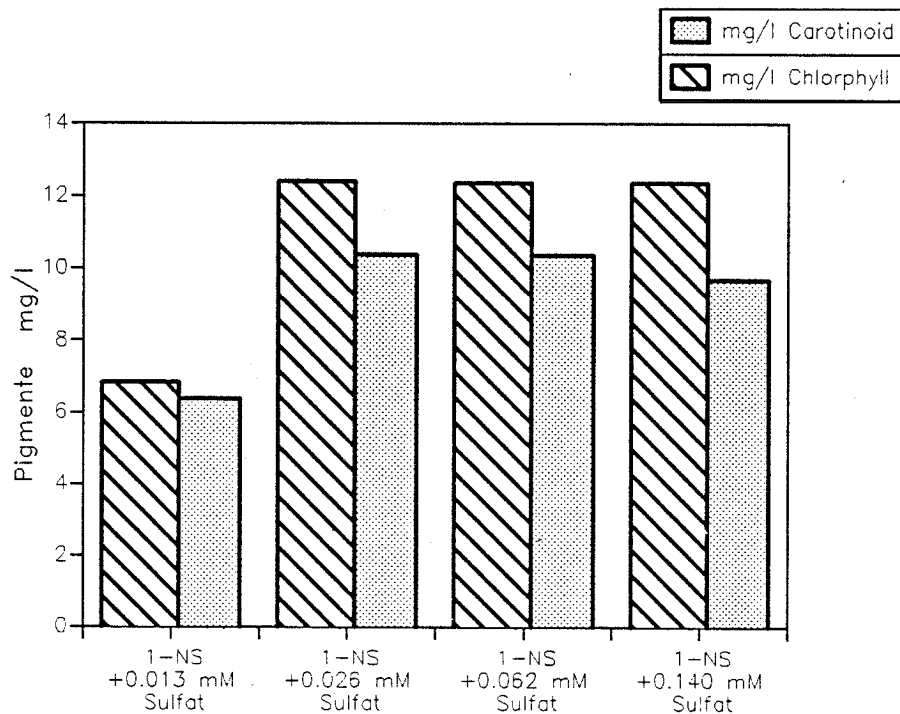


Abb. 24. Pigmentkonzentrationen von *Sc.obliquus* in Abhängigkeit von der Sulfat- und Sulfonatanfangskonzentration(Batchversuch):
Mittelwerte aus zwei Kulturansätzen (Doppelbestimmung)

Ebenso wie die Zunahme der Kulturdichte nahm der Pigmentgehalt in den Algen mit steigender Sulfatkonzentration zu. So wurde in den Algen des 1. Ansatz ein Chlorophyllgehalt von 6.83 mg/l und ein Carotinoidgehalt von 6.31 mg/l gemessen. In den anderen Ansätzen hatten die Algen ca. die doppelte Menge an Chlorophyll (12.5 mg/l) und einen Carotinoidgehalt von 10.5 mg/l. Die Konzentration an Chlorophyll bzw. Carotinoid scheint unter diesen Bedingungen das Maximum der Pigmentkonzentration zu sein, denn diese konnten nicht durch Erhöhung der Sulfatkonzentration weiter gesteigert werden (3. und 4. Ansatz).

Inkubationsansatz	% Chl a	% Car	Chl a : Car
mit 0.014 mM Sulfat	1.89	1.76	1:0.93
mit 0.026 mM Sulfat	3.26	2.73	1:0.84
mit 0.063 mM Sulfat	2.65	2.24	1:0.83
mit 0.140 mM Sulfat	2.42	1.83	1:0.76

**Tab.10: Pigmente in Prozent an der Biomasse und Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid
nach 4 Tagen Inkubationsdauer bei unterschiedlicher Sulfat- und Sulfonsäurekonzentration**

Errechnet man den prozentualen Anteil von Chlorophyll und Carotinoid an der Biomasse, so war dieser gegenüber der Inkubation in Sulfat oder in Sulfonsäure deutlich höher (Tab.9). Während die Algen mit Sulfat als Schwefelquelle maximal 2.33% Chlorophyll bzw mit Sulfonsäure 1.26% enthielten, erhöhte sich in diesem Versuch der Chlorophyllgehalt der Algen bis zu 3.26%. Ebenso wurde bis zu 2.73% Carotinoid an der Biomasse ermittelt; der Gehalt in den anderen Versuchsansätzen war mit 1.77% und 0.77% deutlich niedriger.

Interessant scheint auch, daß sich mit Ausnahme der Algen im Kulturansatz mit 0.014mM zusätzlicher Sulfatgabe in allen anderen Versuchsansätzen weitaus mehr Chlorophyll und Carotinoid in den Algen befand als in den mit Sulfat inkubierten. Dieser erhöhte Gehalt hatte sicherlich zur Folge, daß damit die Selbstbeschattung der Algen erhöht wurde, und somit die Wachstumsraten der Algen nicht so hoch sein konnten wie die in Sulfat erzielten.

Trotz der hohen Pigmentgehalte änderte sich das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid in den Algen mit zunehmender Sulfatkonzentration von 1:0.93 zu 1:0.76.

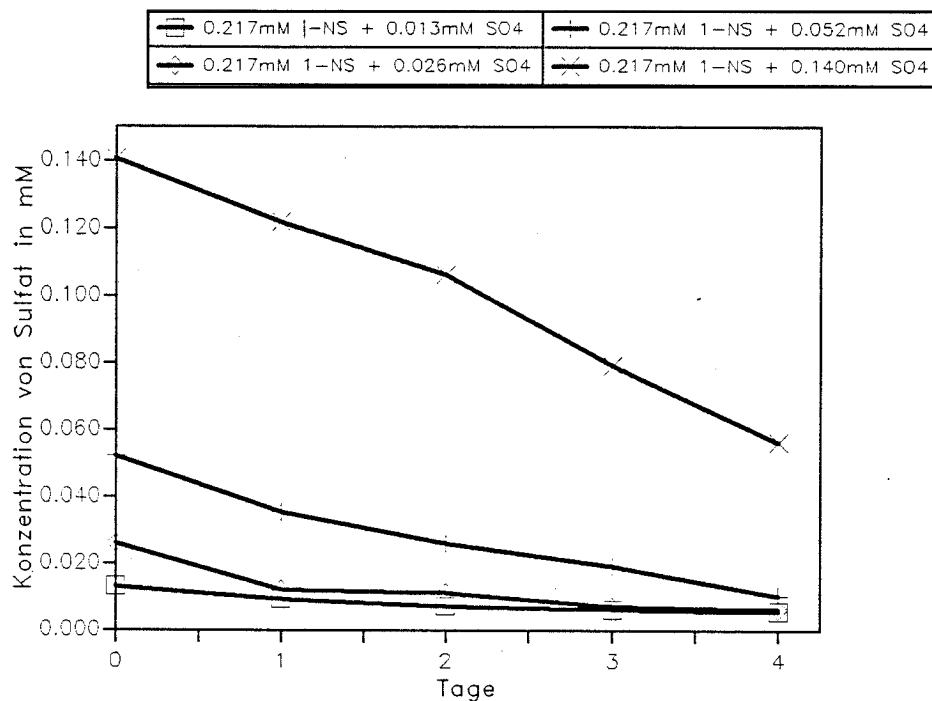


Abb. 25. Sulfatabnahme im Medium bei gleichzeitiger Sulfonatgabe (Batchversuch):
Mittelwerte aus Parallelansätzen (Doppelbestimmung)

Inkubationsansatz	Beginn	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	Summe
Sulfat	Sulfatkonzentration in mM					
0.014mM	0.014	0.0093	0.00625	0.006	0.006	0.008
0.026mM	0.026	0.012	0.011	0.006	0.006	0.02
0.052mM	0.052	0.048	0.041	0.023	0.010	0.042
0.140mM	0.140	0.121	0.106	0.079	0.056	0.084

Tab.11: Abnahme der Sulfatkonzentration im Medium bei gleichzeitiger Sulfonatgabe

Innerhalb des Meßzeitraumes nahm die Sulfatkonzentration im Medium ebenso wie bei der Inkubation mit ausschließlich Sulfat ab; am Anfang des Versuches mit stärker abnehmender Tendenz als gegen Ende des Versuches. Nach Erreichen der Schwellenwertkonzentration von 0.0063 mM konnten die Algen kein Sulfat mehr aufnehmen (Tab. 10: Ansatz mit 0.014 mM Sulfat).

Diese Abnahme des Sulfates kann wie folgt beschrieben werden:

$$C_{SO_4} = C_{o/so_4} e^{-0.0032485x} + 0.0063 \quad r=0.91, n=24 \quad (5)$$

C_{SO_4} = Sulfatkonzentration in mM zum Zeitpunkt t_x

C_{o/so_4} = eingesetzte Sulfatkonzentration in mM

x = Biomassekonzentration in mg TS/l zum Zeitpunkt t_x

Die Gleichung zeigt, daß die gemessene Konzentration an Sulfat zum Zeitpunkt t_x von der eingesetzten Sulfatkonzentration und der Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t_x ist.

Vergleicht man die Sulfatabnahme im Medium mit der im Kapitel 4.1.1, so zeigt sich, daß die Algen bei gleichzeitiger Gabe von Sulfat und Sulfonsäure weniger Sulfat aufnehmen. Diese Abnahme war im Durchschnitt 35% geringer. Dieses bedeutet, daß die Sulfataufnahme der Algen durch die Sulfonsäure beeinflusst wurde.

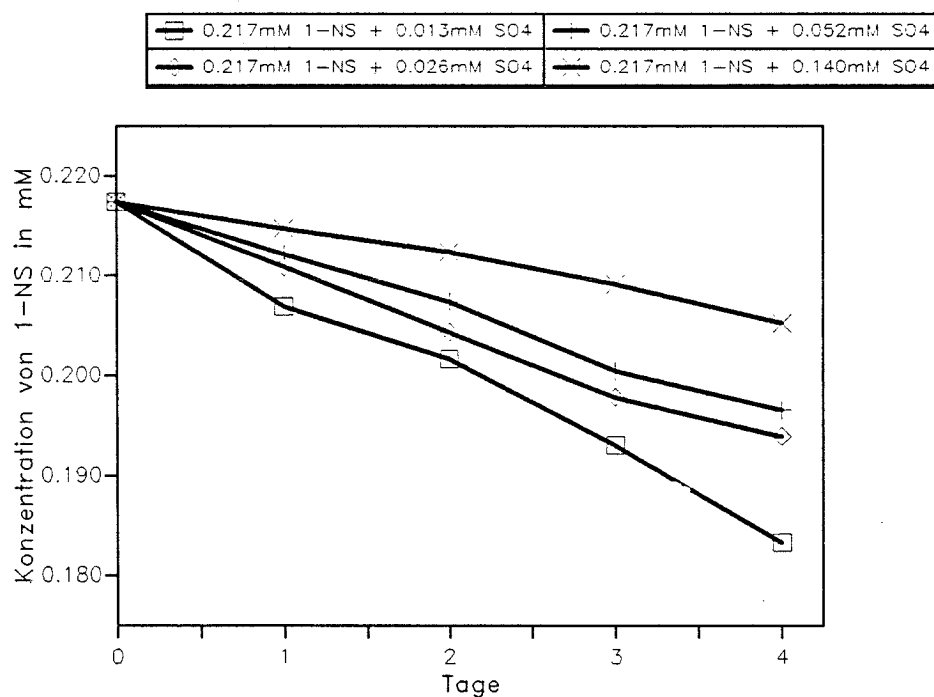


Abb. 26. Sulfonatabnahme im Medium bei gleichzeitiger Sulfatgabe (Batchversuch):

Mittelwerte aus Parallelansätzen (Doppelbestimmung)

Inkubationsansatz	Beginn	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	Summe
Sulfat	Sulfonsäurekonzentration in mM					
0.014mM	0.217	0.206	0.201	0.197	0.183	0.034
0.026mM	0.217	0.210	0.204	0.199	0.193	0.024
0.052mM	0.217	0.212	0.207	0.203	0.196	0.0204
0.140mM	0.217	0.214	0.210	0.209	0.205	0.012

Tab.12: Abnahme der Sulfonatkonzentration im Medium bei gleichzeitiger Sulfatgabe

Noch deutlicher als der Einfluß der Sulfonsäure auf die Sulfataufnahme der Algen ist der Sulfates auf die Sulfonsäureabnahme. Zu Beginn des Versuches verminderte sich die Sulfonatkonzentration nur langsam. Erst als die Sulfatkonzentration sich so weit verringert hatte, daß kein Sulfat mehr aufgenommen werden konnte, steigerten die Algen die Sulfonsäureaufnahme.

Vergleicht man die Desulfonierungsraten der Algen hier mit den des Versuches mit 0.217mM 1-NS in Kapitel 4.1.2 in dem gleichen Zeitraum über 4 Tage, so zeigte sich ein interessantes Ergebnis. Mit 1-NS als Schwefelquelle wurde in diesem Zeitraum 0.028mM 1-NS eliminiert. Während bei der Zugabe von mehr als 0.014mM Sulfat eine Reduzierung der Elimination gemessen wurde, die bis zu 42% betrug, konnte mit der Sulfatzugabe von 0.014mM die Desulfonierung noch um 21% gesteigert werden. Dieses macht deutlich, daß eine geringe Zugabe von Sulfat die Desulfonierung noch steigern konnte.

Korreliert man die Sulfonsäureabnahme mit der Biomasse, so kann folgende Funktion dafür aufgestellt werden:

$$C_{1-NS} = C_{o/1-NS} e^{-0.0018x} \quad r=0.93, n=24 \quad (6)$$

$$B = (0.14765 - 0.14029 \log a)$$

wobei a = eingesetzte Menge an Sulfat in mM

C_{1-NS} = Sulfonsäurekonzentration in mM zum Zeitpunkt t_x

$C_{o/1-NS}$ = eingesetzte Menge an 1 - Naphthalinsulfonsäure in mM

x = Biomassekonzentration in mg TS/l zum Zeitpunkt t_x

Deutlich zeigt die oben aufgeführte Korrelation, daß die Desulfonierungsrate von der dazugegebenen Sulfatmenge abhängt; um so mehr Sulfat dazugegeben wird, desto geringer wird die Desulfonierung, da genügend Sulfat zur Verfügung steht.

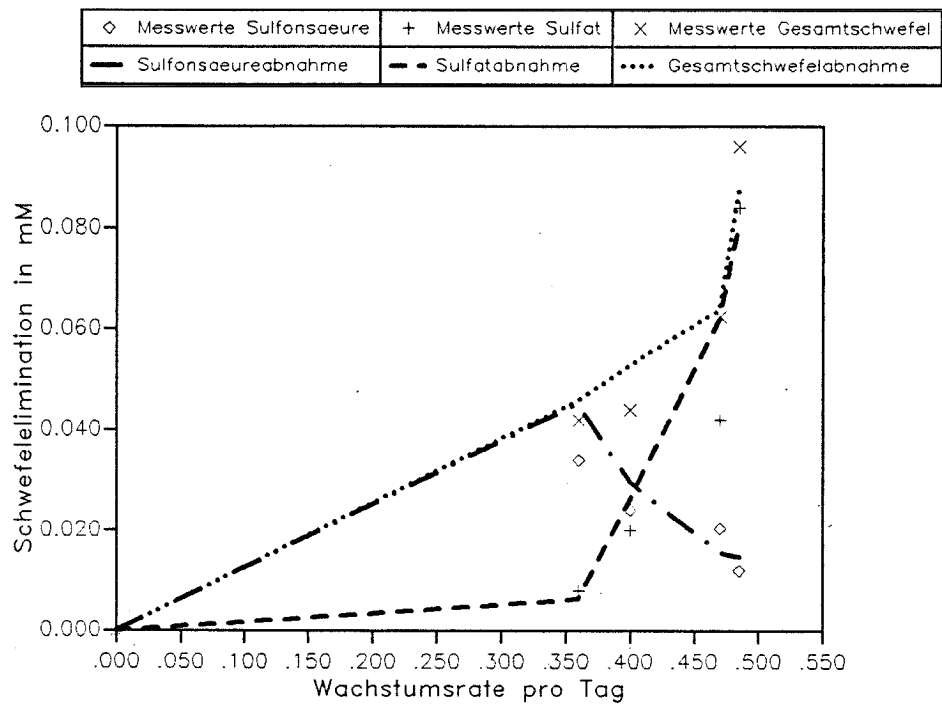


Abb. 27. Korrelation der Wachstumsraten mit der Gesamtschwefel-, Sulfat-, 1-NS-Sulfatelimination (Batchversuch):

Korrelation mit jeweils 5 Mittelwerten

Korreliert man die Gesamtabnahme des Schwefels aus dem System, d.h. Sulfat und Sulfonsäure mit der Wachstumsrate, so läßt sich folgende Funktion dafür aufstellen:

$$\Delta C = 0.124\mu^{0.820} \quad r = 0.99, n = 5 \quad (7)$$

ΔC = Gesamtabnahme des Schwefels

μ = Wachstumsrate pro Tag

wobei sich der Gesamtterm aus den zwei folgenden Einzeltermen zusammensetzt:

$$\Delta C = (41.73\mu^{8.61}) + (0.00271\mu^{-2.31}) \quad r = 0.97/0.92, n = 5 \quad (8)$$

μ = Wachstumsrate pro Tag

Der erste Term beschreibt das eliminierte Sulfat in diesem Zeitraum, der zweite beschreibt die eliminierte Sulfonsäure. Da das Sulfat mit zunehmender Konzentration stärker abnimmt, ist der Exponent positiv. Während der Exponent des

Terms der Sulfonsäureabnahme negativ wird, weil die Abnahme mit der zunehmenden Sulfatkonzentration abnimmt.

Inkubationsansatz	Sulfat	Sulfonsäure	Summe an Schwefel		Biomasse	Schwefelgehalt
	mM	mM	mM	mg/l	mg/l	% der Biomasse
Sulfat						
0.014mM	0.008	0.034	0.042	1.344	360	0.37
0.026mM	0.02	0.024	0.044	1.408	380	0.375
0.052mM	0.042	0.0204	0.0624	1.997	465	0.430
0.140mM	0.084	0.012	0.096	3.072	510	0.602

Tab. 13: Berechnung des prozentualen Schwefelgehaltes an der Biomasse

Tab. 12 zeigt, daß der prozentuale Schwefelgehalt der Algen zwischen 0.37 und 0.602% lag. Die Gehalte waren aber erst einmal direkt von der Konzentration des Sulfates abhängig. Die Konzentration der Sulfonsäure trug additiv zum höheren Schwefelgehalt der Biomasse bei, da die Schwefelgehalte der Algen, die mit Sulfat als einzigen Schwefelquelle wuchsen, zwischen 16% (0.14 mM Sulfat) und 79% (0.014 mM Sulfat) geringer waren als in diesem Versuch. Vergleicht man die S-Gehalte der Algen mit denen, die mit 1-Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle wuchsen, so waren diese nahezu gleich.

- Dieses bedeutet, daß die Algen weitaus höhere Schwefelgehalte haben können, als in der Literatur für die Inkubation mit Sulfat angegeben wird.

Der Versuch zeigt, daß *Scenedesmus obliquus* durch gleichzeitige Gabe von Sulfat und 1- Naphthalinsulfonsäure eine höhere Wachstumsrate erreicht, als wenn sie nur mit 1-NS inkubiert wird, wobei der Pigmentgehalt sich nahezu verdoppelt. Niedrige Zugabe von Sulfat vermag die Desulfonierungsrate der Algen zu steigern; höhere Sulfatgaben führten durch die wechselseitige Beeinflussung zur Erniedrigung der jeweiligen Schwefelaufnahme. In der Summe wurde aber mehr Schwefel aufgenommen.

3.2 Kontinuierliche Kulturen mit *Scenedesmus obliquus*

Um im Anschluß an die Batchversuche, bei denen sich Nährstoffangebot, Kulturdichte und physiologischer Zustand der Algen über weite Bereiche ändern, den Umsatz von Sulfat und/oder 1-NS streng definierten Bedingungen zu unterwerfen, wurde *Scenedesmus obliquus* im Turbidostaten bei 30°C mit 2 Liter Kulturvolumen und Dauerlicht ($200\mu\text{Em}^{-2}\text{sec}^{-1}$) kontinuierlich kultiviert. Das turbidostatische System ist dadurch gekennzeichnet, daß der Medienzuluß in das Kultursystem von der Biomassekonzentration abhängt, die permanent photometrisch erfaßt und durch die Regeltechnik bei Überschreiten des eingestellten Grenzwertes verdünnt wird. Somit ist die Durchflußrate gleich immer der maximalen Wachstumsrate der Algen bei der jeweils eingestellten Biomassekonzentration im Fermenter (Pirt, 1975).

Der Versuchsaufbau des weiterhin eingesetzten Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung war dem turbidostatischen Aufbau sehr ähnlich. Auch wenn permanent Medium in das Kultursystem gelangte, wurde die Biomassekonzentration durch die geregelte Filterung der Kultursuspension konstant gehalten. Damit konnte anhand des Auslaufes aus dem Kultursystem die Wachstumsrate der Algen bestimmt werden. Auch hier entsprach die gemessene Ablaufmenge der maximalen Wachstumsrate der Algen unter diesen Bedingungen.

Die Sulfatkonzentration im Medium wurde auf 0.140 mM eingestellt, wie sie für das N8-Medium angegeben wurde (Soeder et al., 1967), bei der die Algen optimal wachsen.

Die Konzentration der 1-Naphthalinsulfonsäure wurde bei 0.869 mM gehalten. Bei dieser Konzentration wuchsen die Algen in Batchkultur mit annähernd maximaler Wachstumsrate

Ebenso wie in den Batchversuchen wurden die Pigmente Chlorophyll und Carotinoid in den Algen sowie die Konzentrationen von Sulfat und Sulfonsäure im Medium gemessen. Darüberhinaus wurden die für kontinuierliche Versuche wichtigen Parameter Durchflußrate bzw. Filtrierrate bestimmt.

3.2.1 Wachstum von *Sc. obliquus* im Turbidostaten bei einer Sulfatkonzentration von 0.14 mM

Scenedesmus obliquus wurde mit Sulfat als Schwefelquelle im Turbidostaten kultiviert. Dabei wurde die Sulfatelimination der Algen in Abhängigkeit von der eingestellten Biomassekonzentration und der Durchflußrate untersucht.

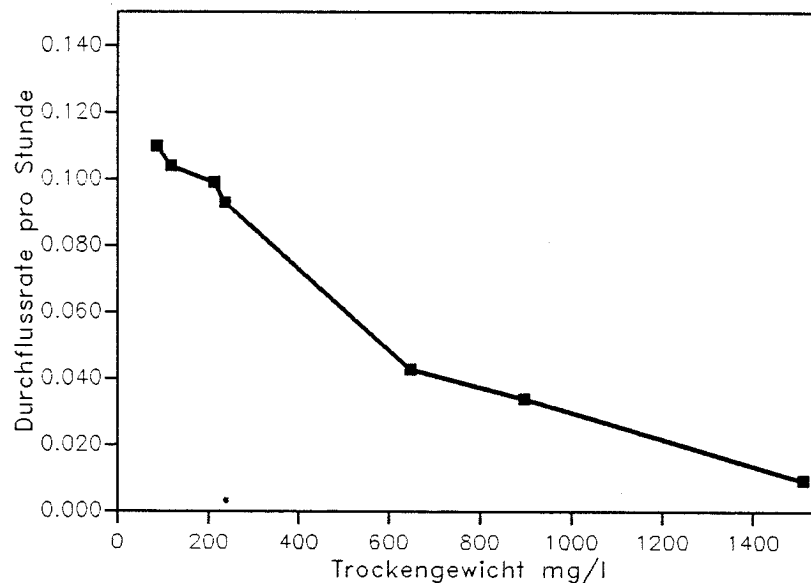


Abb. 28. Wachstumsrate von *Sc.obliquus* in Abhängigkeit von der eingestellten Biomassekonzentration mit Sulfat als S-Quelle

Bei dem Versuch zeigte es sich, daß die Algen bei der geringsten Biomassekonzentration, die eingestellt wurde, von 85 mg TS/l unter den gewählten Bedingungen die höchste Wachstumsrate von $D = 0.104 \text{ h}^{-1}$ aufwiesen, was einer Verdopplungsrate von 9.56 Stunden entsprach. Diese Wachstumsrate konnte auch nicht durch weitere Verringerung der Biomassekonzentration erhöht werden. So kann man davon ausgehen, daß *Scenedesmus obliquus* unter Dauerlichtbedingungen eine maximale Verdopplungsrate von ca. 9.5 Stunden hat. Wurde die Biomassekonzentration auf bis zu 650 mg TS/l erhöht, so nahm die Wachstumsrate etwa linear auf $D = 0.043 \text{ h}^{-1}$ ab. Ab der Biomassekonzentration von 650 mg TS/l verringerte sich die Wachstumsrate auf $D = 0.0099 \text{ h}^{-1}$ bei der Biomassekonzentration von 1500 mg TS/l.

tration von 1510 mg TS/l. Diese deutliche Verringerung ist zum einem auf die sich immer stärker auswirkende Selbstbeschattung der Algen zurückzuführen, zum anderen aber schon auf die Substratlimitierung des Mediums, die sich auch deutlich auf den Chlorophyllgehalt der Algen auswirkte (vgl. Tab. 13).

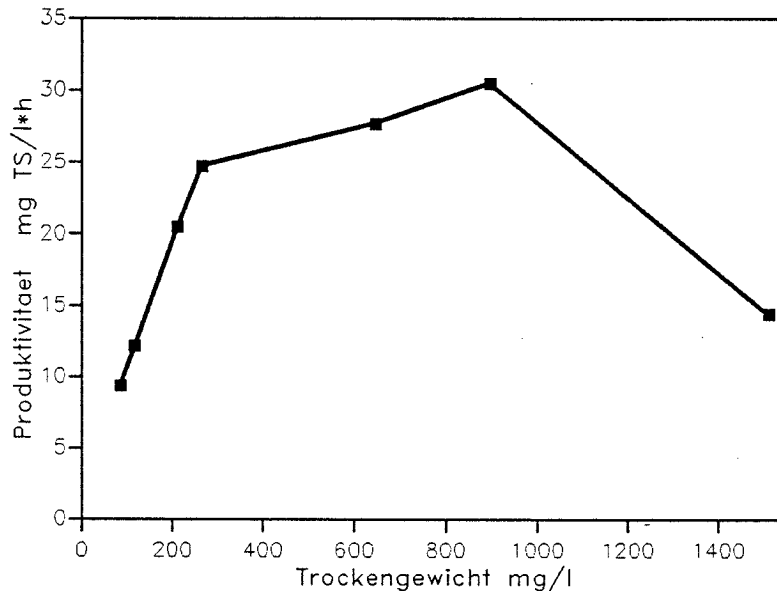


Abb. 29. Produktivität der Algen in Abhängigkeit von der eingestellten Biomassekonzentration mit Sulfat als S-Quelle

Berechnet man aus der Biomassekonzentration und der Durchflußrate die Produktivität der Algen unter den jeweiligen Bedingungen, so betrug diese bei 85mg TS/l trotz hoher Durchflußrate 8mg TS/l h. Mit zunehmender Biomassekonzentration stieg die Produktivität auf bis auf 30,7mg TS/l h bei 896 mg TS/l h an. Mit der weiteren Erhöhung der Biomassekonzentration nahm die Produktivität auf 14,3mg TS/l h ab.

Der Kohlenstoffgehalt der Algen blieb unter den jeweiligen Bedingungen immer konstant auf $45 \pm 4.07\%$ der Trockenmasse.

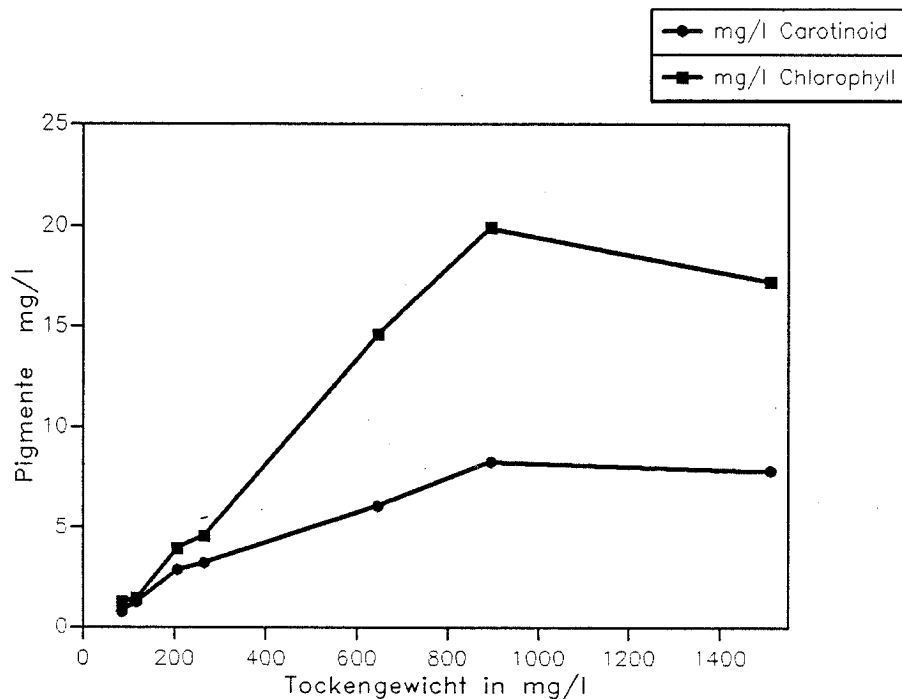


Abb. 30. Pigmentkonzentration von *Sc. obliquus* in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration mit Sulfat als S-Quelle

Mit zunehmender Biomassekonzentration nahm auch der Pigmentgehalt der Algen von 1.8 mg/l Chlorophyll und 0.76 mg/l Carotinoid bei 85 mg/l kontinuierlich auf 19.87 mg/l Chlorophyll bzw. 8.21 mg/l Carotinoid bei 896 mg TS/l zu. Danach ging der Chlorophyllgehalt auf 17.24 mg/l und der Carotinoidgehalt auf 7.81 mg TS/l zurück. Dieser Rückgang der Pigmente ging einher mit dem ebenso deutlichen Rückgang der Wachstumsrate bzw. Produktivität der Algen, was auf eine Limitierung durch Nährstoffe schließen läßt. Bezieht man die Menge an Chlorophyll und Carotinoid auf die Biomasse, so war der Chlorophyllgehalt bei 85 mg TS/l noch 1.48% und stieg dann bis auf 2.25% bei 896 mg TS/l an. Danach fiel der Gehalt wieder auf 1.14% zurück. Der Carotinoidgehalt dagegen stieg nur von 1.1% bei 85 mg TS/l auf 1.258% bei 212 mg TS/l, fiel aber dann stetig auf 0.517% bei 1510 mgTS/l ab.

Biomassekonzentration	% Chl a	% Car	Chla : Car
85 mg TS/l	1.48	1.100	1:0.74
117 mg TS/l	1.50	1.076	1:0.71
212 mg TS/l	1.82	1.258	1:0.68
266 mg TS/l	1.85	1.110	1:0.60
646 mg TS/l	2.25	0.938	1:0.41
896 mg TS/l	2.21	0.921	1:0.41
1510 mg TS/l	1.14	0.517	1:0.45

Tab.14: Pigmente in Prozent an der Biomasse und Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid mit Sulfat als Schwefelquelle in turbidostatischer Kultur

Setzt man den Chlorophyll- und Carotinoidgehalt ins Verhältnis zueinander, so nahm das Chlorophyll : Carotinoid Verhältnis von 1 : 0.74 bei 85 mg TS/l auf 1 : 0.417 bei 896 mg TS/l ab. Dieses ist damit zu erklären, daß die Algen bei niedriger Biomassekonzentration mehr Licht pro Algenzelle bekommen, so daß mehr Carotinoid als Beschattungspigment für das Chlorophyll vorhanden war (Tamiya, 1953). Mit zunehmender Biomassekonzentration erübrigte sich wahrscheinlich die Funktion des Carotinoids, da die Algen sich immer mehr selbst beschatteten, und so der Chlorophyllgehalt anstieg und das Verhältnis Chlorophyll : Carotinoid abnahm. Dieses Phänomen wurde auch von Luther und Grobbelaar (unveröffentlicht) für *Chlorella* ssp. gefunden, wobei sich dort das Verhältnis Chlorophyll : Carotinoid von 1 : 0.83 bei niedrigen Biomassekonzentrationen auf 1 : 0.5 bei hohen Konzentrationen verminderte. Bei der Biomassekonzentration von 1510 mg TS/l stieg das Verhältnis wieder leicht auf 1 : 0.453 an, was auf die Nährstofflimitierung zurückzuführen ist, welche zu einem starken Rückgang des Chlorophylls und des Carotinoids führte.

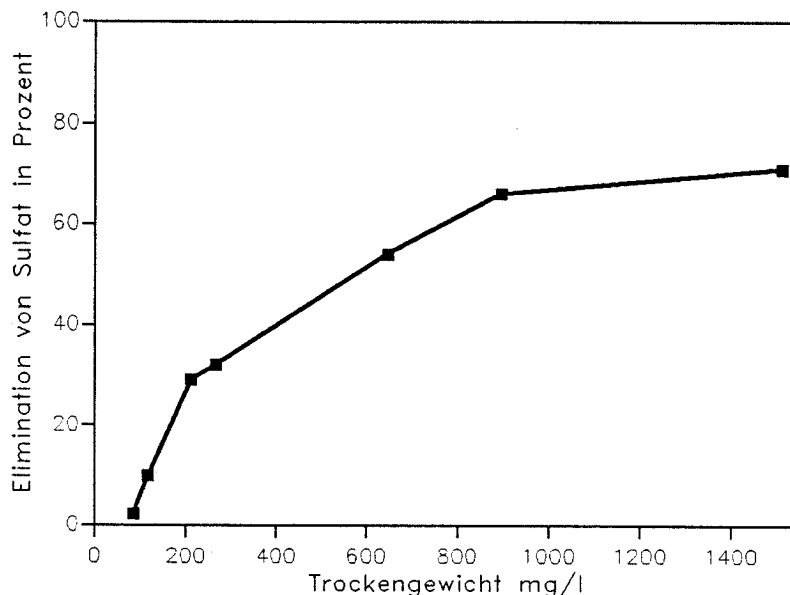


Abb. 31. Sulfateliminationsleistung der Algen in Abhängigkeit von der eingestellten Biomassekonzentration:

Absolutwerte: siehe Tab. 14

Die Sulfataufnahme der Algen aus dem Medium stieg mit der Biomassekonzentration an. War sie bei 85 mg TS/l 2.3% der eingesetzten Sulfatmenge, so erhöhte sie sich bei 1510 mg TS/l auf 70.93%. Dabei zeigte sich deutlich, daß ein Zusammenhang zwischen Eliminationsrate und der sich einstellenden Wachstumsrate bei eingestellter Biomassekonzentration bestehen muß. So nahm die Sulfatelimination zu, wenn sich die Wachstumsrate erniedrigte. Nur bei der Biomassekonzentration von 1510 mg TS/l war dieser Zusammenhang nicht mehr gegeben. Dieses bedeutet, daß die Elimination des Sulfates durch Nährstofflimitierung behindert gewesen sein mußte. Die höchste Elimination pro Stunde wurde nicht bei der höchsten Produktivität von 30.5 mg TS/l h bei der Biomassekonzentration von 896 mg TS/l erreicht, sondern bei der Produktivität von 20.5 mg TS/l h bei der Biomassekonzentration von 212 mg TS/l. So stieg die Elimination von 7.7×10^{-4} mM/l h bei 85 mg TS/l auf 9.08×10^{-3} mM/l h und fiel dann stetig auf 2.13×10^{-3} mM/l h ab. Entsprechend der auf Sulfat getroffenen Aussage ist davon auszugehen, daß der Schwefelgehalt der Algen in entsprechender Weise ab- bzw. zunahm, und bei 212 mg TS/l ein maximaler Schwefelge-

halt in den Algen von 1.41% vorlag, der um 28% höher lag als der Schwefelgehalt in den Batch-Kulturen mit 1.1% bei Versuchsanfang (vgl. Kap. 3.1.1).

Biomassekonzentration	Produktivität	Sulfat	Schwefel	Schwefelgehalt
	mg/l*h	mM/l*h	mg/l*h	% der Biomasse
85 mg TS/l	9.35	0.00077	0.0246	0.263
117 mg TS/l	12.16	0.00501	0.1605	1.31
212 mg TS/l	20.50	0.00908	0.290	1.41
266 mg TS/l	24.73	0.00904	0.289	1.11
646 mg TS/l	27.70	0.00601	0.192	0.693
896 mg TS/l	30.50	0.00705	0.225	0.737
1510 mg TS/l	14.30	0.00213	0.0681	0.476

Tab.15: Berechnung des prozentualen Schwefelgehaltes an der Biomasse mit Sulfat als Schwefelquelle in turbidostatischer Kultur

Vergleicht man das Maximum des prozentualen Schwefelgehaltes mit den Maxima der Pigmente Chlorophyll und Carotinoid, so wurde das Maximum des Carotinoidgehaltes auf bei 212 mg TS/l erreicht. Möglicherweise liegt ein Zusammenhang zwischen Carotinoidgehalt und Schwefelgehalt vor, wobei der Carotinoidgehalt bei hohem Schwefelgehalt steigt. Demgegenüber ist der Chlorophyllgehalt nur von der Lichtmenge pro Algenzelle anhängig, sinkt aber bei Nährstoffmangel ab.

Der Versuch zeigt, daß unter den beschriebenen Turbidostatbedingungen die Wachstumsrate von *Scenedesmus obliquus* vom Licht limitiert wird, wobei die Konzentration der Pigmente und die Elimination des Sulfates von der Biomassekonzentration im Fermenter abhingen. Bei der Berechnung der Produktivität und des prozentualen Schwefelgehaltes der Algen zeigte sich, daß beide von einander unabhängig sein dürften, da ihre Maxima bei verschiedenen Biomassekonzentration auftraten.

3.2.2 Wachstum von *Sc. obliquus* im Turbidostaten bei einer 1-NS-Konzentration von 0.869 mM

3.2.2.1 Die Einfahrphase

Scenedesmus obliquus wurde erst in N8 - Medium bis zu einer Biomassekonzentration von 200 mg TS / l angezogen, bevor die Kultur turbidostatisch betrieben wurde und nur noch mit 1-Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle versorgt wurde.

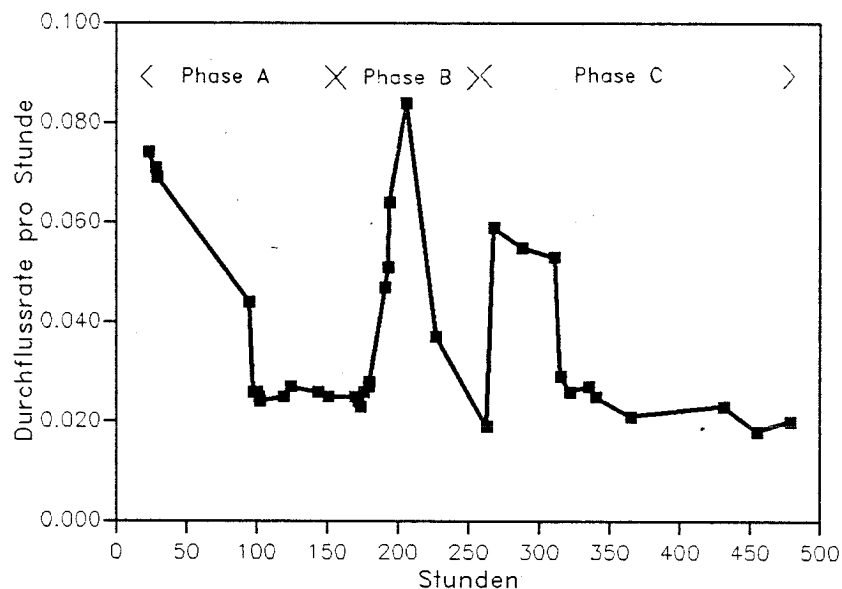


Abb. 32. Wachstumsrate von *Sc.obliquus* während der Einfahrphase bei Adaptation an 1-NS als Schwefelquelle:

Vorkultur in N8-Medium

Biomassekonzentration im Fermenter: 200 mg TS/l

Phase A: Adaptation an 1-NS als alleinige Schwefelquelle

Phase B: Einmalige Gabe von 0.14mM Sulfat in den Fermenter

Phase C: Einmalige Gabe von 0.014mM Sulfat in den Fermenter

In der ersten Phase (Phase A; 25 - 170 Stunden) kam es zu einer steilen Abnahme der Wachstumsrate der Algen (Abb. 32). Die Durchflußrate erniedrigte sich von

0.064 am Anfang auf 0.02 bei 170 Stunden. Deutlich schneller nahmen in diesem Zeitraum die Pigmente der Algen ab. So sank der Chlorophyllgehalt von 0.6 mg/l auf 0.18 mg/l und der Carotinoidgehalt von 1.4 mg/l auf 0.69 mg/l (Abb. 33). Nach 170 Stunden zeigten die Algen starke Chlorose, die visuell durch eine intensive Gelbfärbung, mikroskopisch durch große, runde Zellen zu erkennen war. Die Gelbfärbung entsprach der Änderung des Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid von 1:0.77 auf 1:1.15. Ebenso wie das Wachstum und der Pigmentgehalt der Algen verringerte sich auch die Desulfonierungsrate von 1 - Naphthalinsulfonsäure von 0.0082 mM/l h auf 0.0047 mM/l h. Diese Verringerung der Desulfonierungsrate war um so überraschender, als in diesem Zeitraum der im Reaktor befindliche Restsulfatgehalt (vgl. Kap. 3.1.5) sowohl durch die Aufnahme durch die Algen als auch durch das Ausspülen aus dem Reaktor verringert worden sein mußte.

In den Batch-Versuchen war die Desulfonierungsrate in Abwesenheit von Sulfat größer als mit Sulfat. Die Verringerung der Desulfonierungsrate könnte zwei Gründe haben:

1. Die Desulfonierungsrate ist abhängig von dem physiologischen Zustand der Algen, d.h. mit Verschlechterung der Wachstumsrate und der Vitalität der Algen verringert sich auch die Desulfonierungsrate von 1 - Naphthalinsulfonsäure.
2. Da sich durch die Verringerung der Durchflußrate die Abbauprodukte von 1-NS im Fermenter anhäufen - auch wenn 1 - Naphthol nicht quantitativ wiedergefunden werden konnte -, wirken die Abbauprodukte toxisch auf die Algen.

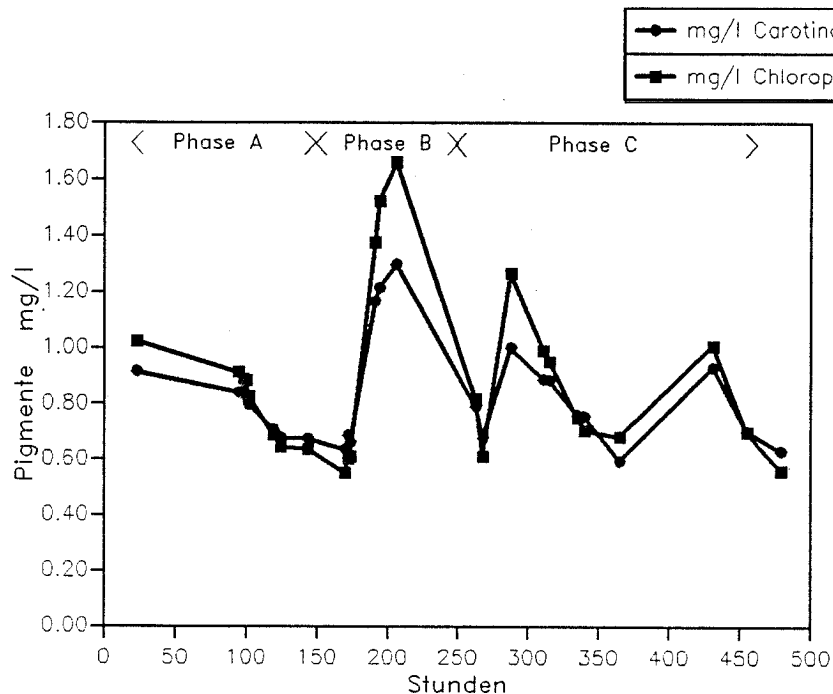


Abb. 33. Pigmentgehalte der Algen während der Einfahrphase:

Vorkultur in N8-Medium

Biomassekonzentration im Fermenter: 200 mg TS/l

Phase A: Adaptation an 1-NS als alleinige Schwefelquelle

Phase B: Einmalige Gabe von 0.14mM Sulfat in den Fermenter

Phase C: Einmalige Gabe von 0.014mM Sulfat in den Fermenter

Zur Klärung der Fragen wurden bei 170 Stunden 0.14 mM Sulfat als einmalige Zugabe dem Reaktor direkt über den Probennehmer zugeführt (Phase B).

Kurz nach der Zugabe nahmen als erstes die Pigmente in den Algen wieder zu, wobei die maximale Pigmentkonzentration nach 18 Stunden (= 180 Stunden) erreicht wurde. So stieg der Chlorophyllgehalt auf 1.6 mg/l, der Carotinoidgehalt auf 1.2 mg/l. Die Pigmentgehalte erreichten beinahe die Anfangswerte. Daß die Pigmente der Algen als erste anstiegen, kann dadurch erklärt werden, daß aufgrund des chlorotischen Zustandes der Algen erst eine Normalisierung des Stoffwechsel und eine Zunahme der Vitalität einsetzen mußte, bevor verstärktes Biomassewachstum einsetzte (vergleiche Kaptiel 3.1.4.). Zeitlich um 8 Stunden verzögert stieg die Durchflußrate an und erreichte bei 206 Stunden die maximale Durchflußrate von $D = 0.8 \text{ h}^{-1}$.

Gleichzeitig stieg die Desulfonierungsrate wieder auf 0.038 mM/l h.

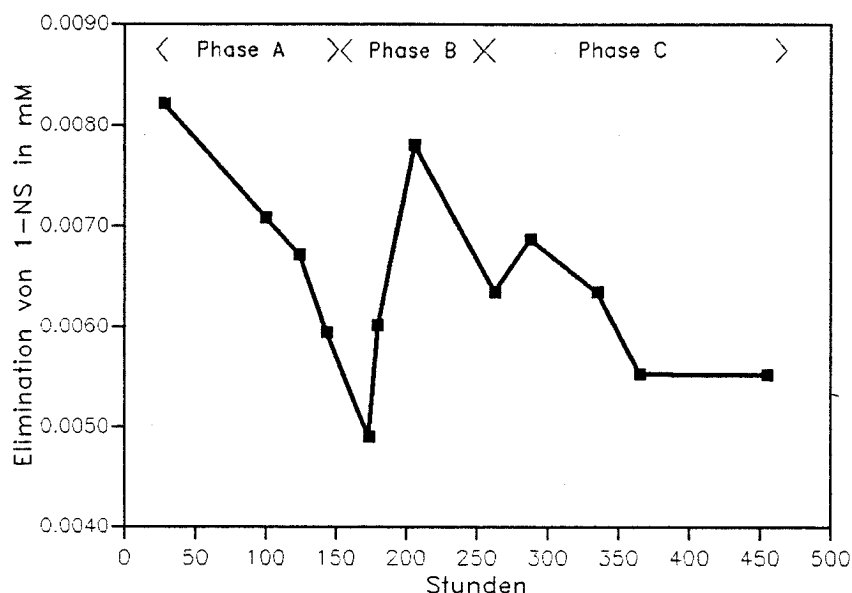


Abb. 34. Desulfonierungsraten der Algen während der Einfahrphase:

Vorkultur in N8-Medium

Biomassekonzentration im Fermenter: 200 mg TS/l

Phase A: Adaptation an 1-NS als alleinige Schwefelquelle

Phase B: Einmalige Gabe von 0.14mM Sulfat in den Fermenter

Phase C: Einmalige Gabe von 0.014mM Sulfat in den Fermenter

Da das Sulfat durch Aufnahme in die Biomasse und durch Ausgespültwerden aus dem Reaktor entfernt wurde, stellten sich die Meßparameter wieder auf die Werte wie bei 170 Stunden ein. Eine Ausnahme bildete die Desulfonierungsrate, die nur langsamer auf 0.025 mM/l h abnahm.

Die Zugabe von Sulfat zeigte die deutliche Abhängigkeit der Desulfonierungsrate von dem physiologischen Zustand der Algen. Denn trotz Sulfat im Reaktor erhöhte sich die Desulfonierungsrate von 1-Naphthalinsulfonsäure. Wären die Algen trotz Sulfatgabe nicht gewachsen, so läge die Vermutung nahe, daß die Akkumulation Abbauprodukte der 1-NS toxisch auf die Algen wirken mußten.

Nach 268 Stunden wurde der Algenkultur noch einmal 0.014 mM Sulfat direkt appliziert (Phase C). Wie ausführlich in Kapitel 3.1.1 und 3.1.5 geschildert, hatte

diese geringe Sulfatkonzentration als alleinige Schwefelquelle zum Schwefelmangel der Algen führen, aber zusammen mit 1-Naphthalinsulfonsäure zu einer Erholung der Vitalität führen müssen.

Wie bei der ersten Sulfatgabe nahmen als erstes wieder die Pigmentkonzentration der Algen zu und erreichten ihr Maximum nach 288 Stunden (Chlorophyll 1.26 mg/l; Carotinoid 1.0 mg/l). Die Durchflußrate erhöhte sich auf maximal $D = 0.63 \text{ h}^{-1}$ bei 298 Stunden und die Desulfonierungsrate auf 0.027 mM/l h.

Dieses Ergebnis zeigt, daß geringe Mengen an Sulfat die Vitalität der Algen und der damit verbundenen Desulfonierung steigern können. Da diese Zugabe nicht kontinuierlich sondern einmalig erfolgte, konnten diese Ergebnisse nur als Indizien für die unterstützende Wirkung des Sulfates bei der Desulfonierung gelten.

Im weiteren Verlauf des Versuches wurde nur noch 1 - Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle eingesetzt, um die Desulfonierungsraten bei verschiedenen Biomassekonzentrationen zu untersuchen.

3.2.2.2 Versuche bei konstanter Zugabe von 0.869 mM 1-NS

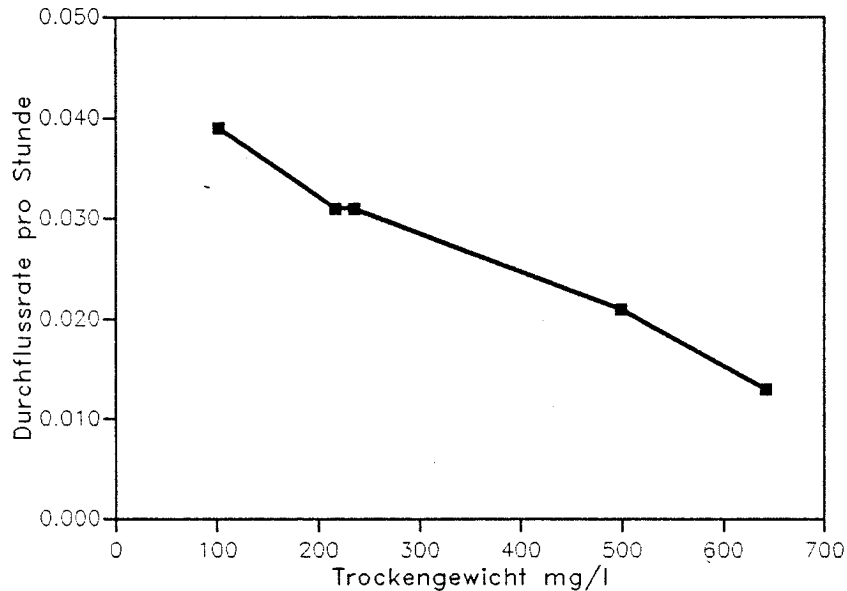


Abb. 35. Wachstumsrate von *Sc.obliquus* in Abhängigkeit von der eingestellten Biomassekonzentration mit 1-NS als S-Quelle

Wurde bei der Biomassekonzentration von 85 mg TS/l noch ein Wachstum der Algen von $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$ ermittelt (Abb.35), so erniedrigte sich die Wachstumsrate auf $D = 0.01 \text{ h}^{-1}$ bei 645 mg TS/l. Die Abnahme der Durchflußrate war nahezu linear. Der Versuch wurde bei der Biomassekonzentration von 650 mg TS/l abgebrochen, da die Aufenthaltszeit im Fermenter über 100 Stunden betrug, und somit nur noch ein Absinken der Durchflußrate auf 0 zu erwarten war.

Die Wachstumsraten der Algen in sulfonsäurehaltigem Medium waren bei 85 mg TS/l um 64% bei 645 mg TS/l bis zu 74% niedriger als in Sulfatmedium (vgl. Kap. 3.2.1.). Ursache dafür ist die unter günstigen Wachstumsbedingungen schlechte Verwertbarkeit von 1-NS als Schwefelquelle.

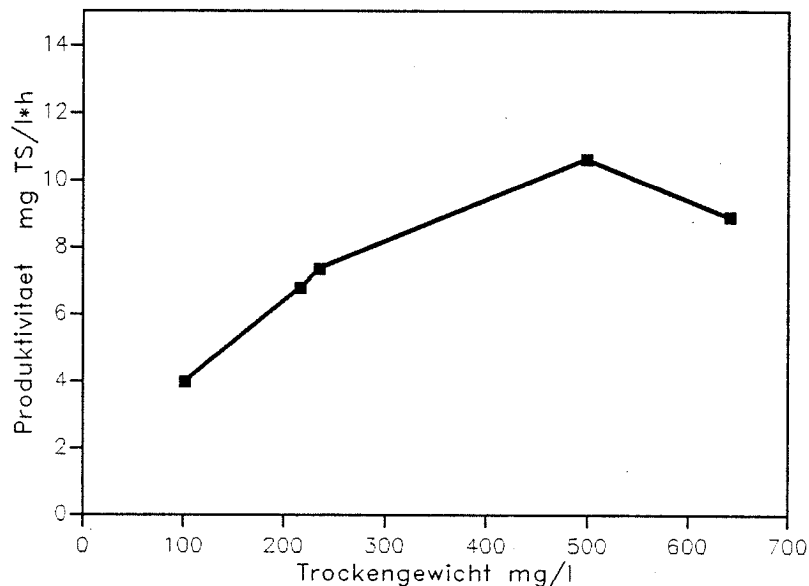


Abb. 36. Produktivität der Algen in Abhängigkeit der Biomassekonzentration mit 1-NS als S-Quelle

Aufgrund der niedrigen Wachstumsrate der Algen war auch ihre Produktivität deutlich geringer (Abb. 36). So erhöhte sich die Produktivität von 3.8 mg TS/l h bei der Biomassekonzentration von 85 mg TS/l auf 10.2 mg TS/l h bei 499 mg TS/l, fiel aber dann ab auf 8.2 mg TS/l bei der höchsten eingestellten Biomassekonzentration, was auf Nährstoffmangel bei der so niedrigen Durchflußrate zurückzuführen war. Insgesamt war die Produktivität der Algen in sulfonsäurehaltigem Medium nur ein Drittel so hoch wie mit Sulfat als Schwefelquelle.

Der Kohlenstoffgehalt der Algen blieb konstant auf $45.75 \pm 1.29\%$ der Trockenmasse, und wich damit nicht signifikant von dem im Sulfatmedium erhaltenen Gehalten ab (vgl. Kap. 3.2.1).

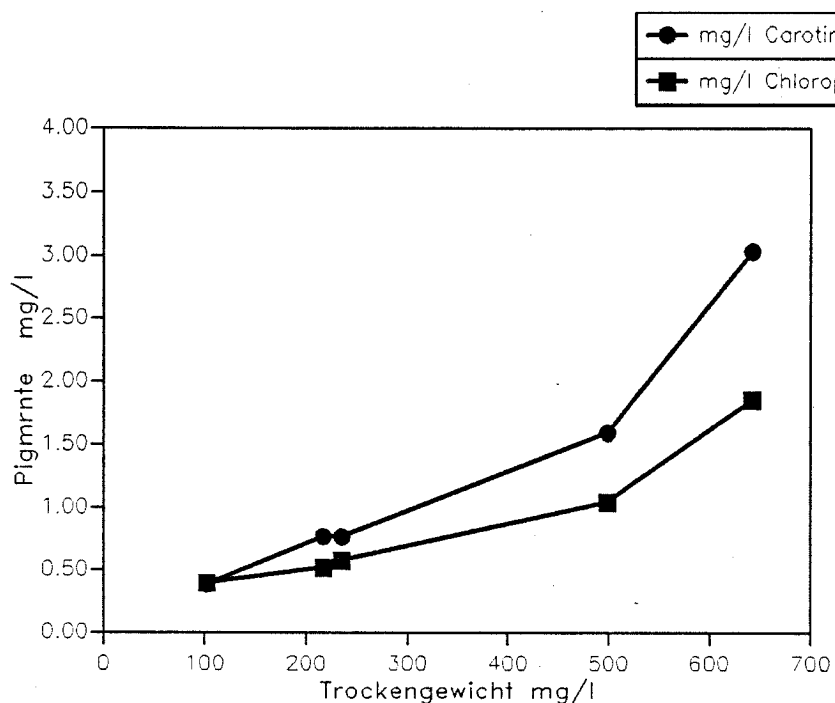


Abb. 37. Pigmentkonzentration von *Sc. obliquus* in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration mit 1-NS als S-Quelle

Der Chlorophyllgehalt war bei Versorgung mit 1-NS als S-Quelle extrem niedrig (Abb. 37). Bei der Biomassekonzentration von 85 mg TS/l wurde gerade noch 0.995 mg/l Chlorophyll gemessen, welches sich mit zunehmender Biomassekonzentration auf 1.85 mg/l erhöhte. Dieses bedeutet, daß die Chlorophyllkonzentration auf 30 - 10% des in sulfathaltigem Medium gemessen zurückgegangen war. Ebenso gering war die Carotinoidkonzentration (0.385 mg/l bis 3.03 mg/l), die aber deutlich höher zunahm als die des Chlorophylls.

Inkubationsansatz	% Chl a	% Car	Chla : Car
102 mg TS/l	0.385	0.377	1:0.97
217 mg TS/l	0.238	0.333	1:1.39
235 mg TS/l	0.234	0.324	1:1.44
499 mg TS/l	0.208	0.318	1:1.52
642 mg TS/l	0.288	0.471	1:1.63

Tab.16: Pigmente in Prozent an der Biomasse und Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid mit 1-NS als Schwefelquelle in turbidostatischer Kultur

Im Bereich der eingestellten Biomassekonzentrationen änderte sich das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid von 1:0.97 auf 1:1.63. Die prozentualen Pigmentgehalte und deren Verhältnis zueinander zeigen ganz deutlich, daß die Algen schwefellimitiert gewesen sein müssen, da das Verhältnis sich noch drastischer veränderte (vgl. Kap.3.1.1), als es in den Batchkulturen ermittelt wurde.

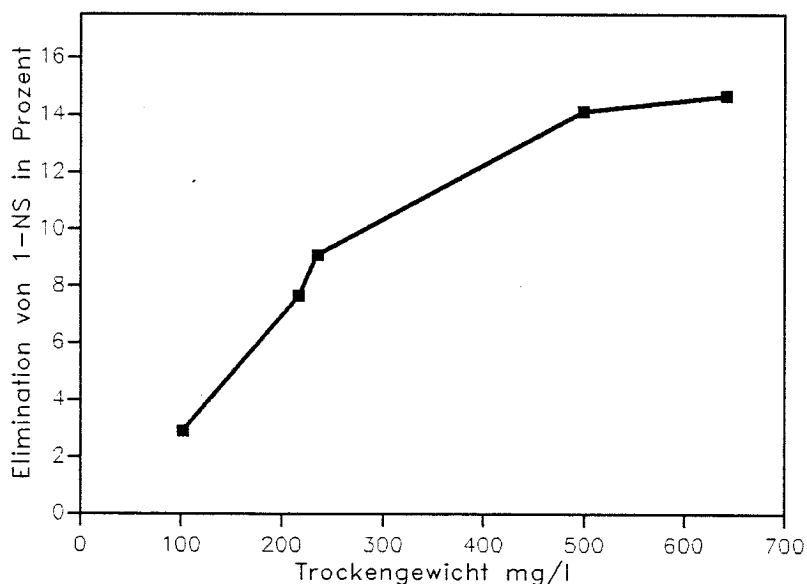


Abb. 38. Sulfonatelimination der Algen in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration:

Absolutwerte: siehe Tab. 16

Mit zunehmender Biomassekonzentration erhöhte sich auch die prozentuale Elimination von 1-Naphthalinsulfonsäure aus dem Medium (Abb. 38). Wurde bei niedriger Biomasse 2.5% der 1-NS aus dem Medium eliminiert, so erhöhte sich die Eliminationsrate nur auf 14.2%. Zu erkennen ist, daß sich die Elimination nahezu linear mit steigender Biomasse erhöht. Nur bei der Erhöhung der Biomassekonzentration von 499 mg TS/l auf 645 mg TS/l nahm sie nur noch geringfügig um 0.6% zu.

Biomassekonzentration	Produktivität	Sulfonsäure	Schwefel	Schwefelgehalt
	mg/l*h	mM/l*h	mg/l*h	% der Biomasse
102 mg TS/l	4.00	0.00050	0.0160	0.40
217 mg TS/l	6.79	0.00100	0.0320	0.47
235 mg TS/l	7.35	0.00120	0.0384	0.52
499 mg TS/l	10.62	0.00130	0.0418	0.39
642 mg TS/l	8.89	0.00100	0.0320	0.35

**Tab.17: Berechnung des prozentualen Schwefelgehaltes an der Biomasse
mit 1-NS als S-Quelle in turbidostatischer Kultur**

Die Elimination der Sulfonsäure zeigt den gleichen Verlauf wie die Produktivität der Algen (Tab. 16). Die höchste Elimination von 0.0013 mM/l h Sulfonsäure wurde bei der Biomassekonzentration von 499 mg TS/l erreicht, wo auch die Algen ihre höchste Produktivität hatten. Danach fielen sowohl die Elimination wie auch die Produktivität der Algen ab.

Berechnet man den Schwefelgehalt in Prozent an der Biomasse, so wurde der höchste Schwefelgehalt von 0.52% bei der Biomassekonzentration von 235 mg TS/l ermittelt. Die Gehalte lagen ca. 40% unter denen der Algen in sulfathaltigen Medium. Vergleicht man den Schwefelgehalt der Algen, so stellt man fest, daß die höchsten Schwefelgehalte (0.52% bzw. 1.41%) in den Algen bei nahezu gleichen Biomassekonzentrationen von 235 mg TS/l bzw. 212 mg TS/l ermittelt wurden. Es mußte also ein Zusammenhang bestehen zwischen der verfügbaren Schwefelquelle und der sich durch verfügbaren Lichtmenge einstellende Wachstumsraten der Algen.

Es zeigt sich hier, daß die Algen nur mit 1-Naphthalinsulfonsäure als alleiniger Schwefelquelle deutlich limitiert waren, wobei sie sehr geringe Wachstumsraten und Pigmentgehalte aufwiesen. Die Eliminationsleistung stieg mit der Biomassekonzentration, auch wenn sich der Schwefelgehalt in den Algen verringerte.

3.2.3 Wachstum von *Sc. obliquus* mit 0.869 mM 1 - NS in Gegenwart von verschiedenen Sulfatkonzentrationen

Nachdem in Kapitel 3.1.2 und 3.2.3 festgestellt wurde, daß bei Zugabe von Sulfat zum einen die Algen schneller wuchsen, zum anderen die Desulfonierungsrate von 1-Naphthalinsulfonsäure gesteigert werden konnte, wurde zusätzlich zu der 1-Naphthalinsulfonsäure Sulfat in verschiedenen Konzentrationen konstant zudosiert. Die Biomassekonzentration wurde konstant auf 300mg TS/l gehalten. Bei dieser Konzentration reagieren die Algen sehr rasch auf Änderungen der Milieubedingungen, da keine Substrat- und Lichtlimitierung auftreten konnten.

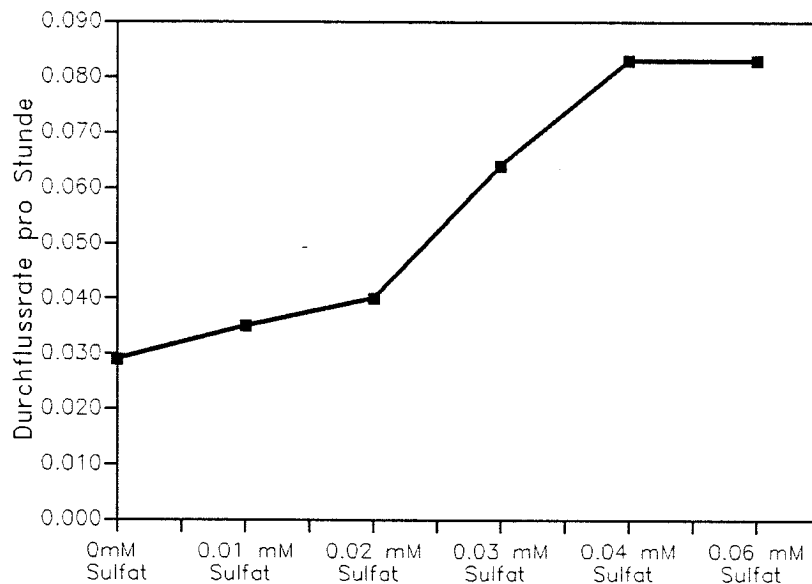


Abb. 39. Wachstumssrate von *Sc.obliquus* in Abhängigkeit von 0.869mM 1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen:

Biomassekonzentration im Fermenter: 300 mg TS/l

Mit steigender Sulfatkonzentration im Medium stieg die Wachstumsrate der Algen an (Abb. 39). Ohne Sulfat betrug die Wachstumsrate $D = 0.029 \text{ h}^{-1}$ und stieg erst linear auf $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$ mit steigender Sulfatkonzentration (0.02 mM) an. Bei der Erhöhung der Sulfatkonzentration von 0.02 mM auf 0.03 mM erhöhte sich die Wachstumsrate um 50% auf $D = 0.064 \text{ h}^{-1}$. Mit weiterer Erhöhung näherten sich die

Algen ihrer maximalen Wachstumsrate von $D=0.084 \text{ h}^{-1}$ an, die auch im Sulfatmedium erreicht wurde (Kap. 3.2.1). Trotz weiterer Erhöhung des Sulfatgehaltes im Medium auf 0.06 mM blieb die Wachstumsrate konstant.

Durch die Zugabe von Sulfat zur Sulfonsäure konnte die Wachstumsrate der Algen um das 2.9 fache gesteigert werden. Der Vergleich zur Einfahrphase (Kap.3.2.2.1) zeigt, daß nur 0.04 mM Sulfat der Algensuspension zugeführt werden mußte, um die unter diesen Steady-State-Bedingungen maximale Wachstumsrate zu erzielen, während in der Einfahrphase einmalig 0.14mM Sulfat appliziert wurde.

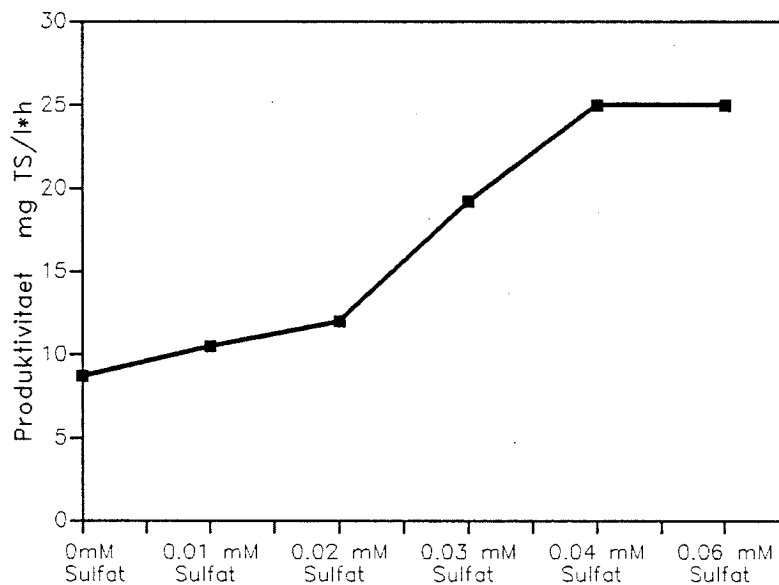


Abb. 40. Produktivität von *Sc.obliquus* in Abhängigkeit von 0.869mM 1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen:

Biomassekonzentration im Fermenter: 300 mg TS/l

Mit der Durchflußrate nahm die Produktivität der Algen zu (Abb. 40). Da die Biomassekonzentration im Fermenter konstant auf 300 mg TS/l gehalten wurde, zeigte die Zunahme der Produktivität den gleichen Kurvenverlauf wie die Durchflußrate. So erhöhte sich die Produktivität ebenso um das 2.9 fache von 8.7 mg TS/l h auf 25 mg TS/l h.

Der Kohlenstoffgehalt der Algen ergab keine Abweichung zum vorherigen Versuch, und blieb mit $45.88 \pm 1.08\%$ ($n=12$) konstant. Ebenso änderte der prozentuale Stickstoffgehalt sich nicht im Verlaufe des Versuches. Es wurde ein durchschnittlicher Stickstoffgehalt von $7.06 \pm 0.33\%$ ($n=12$) gemessen, so daß das Kohlenstoff-Stickstoffverhältnis 1:0.15 war.

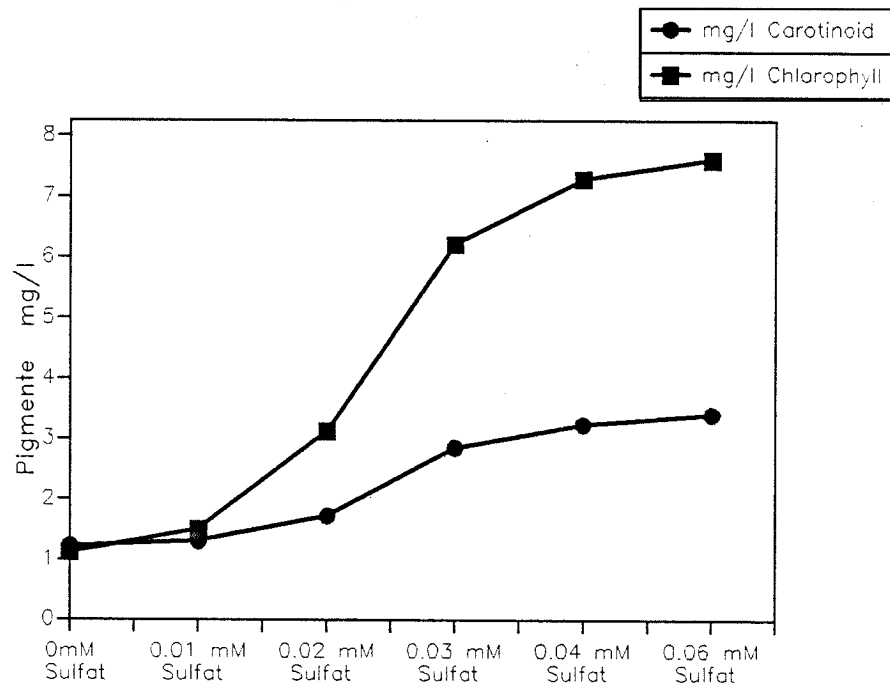


Abb. 41. Pigmentkonzentration von *Sc. obliquus* in Abhängigkeit von 0.869mM 1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen:

Biomassekonzentration im Fermenter: 300 mg TS/l

Weitaus höher war die Zunahme des Chlorophylls mit zunehmender Sulfatkonzentration im Fermenter (Abb. 41). So erhöhte sich die Chlorophyllkonzentration von 1.1 mg/l auf 7.28 mg/l. Dieser Gehalt war um 45% höher, als aus dem Versuch 3.2.1 erwartet wurde, (7.28mg/l gegenüber 5mg/l). Nimmt man die Chlorophyllkonzentration von 5mg/l der mit Sulfat als einzige S-Quelle inkubierten Algen als Maß für ausreichend mit Schwefel versorgten Algen, so kann man die Algen mit niedrigeren Chlorophyllgehalten als chlorotisch d.h. untersorgt bezeichnen (bis zu dem Steady-State mit 0.02 mM Sulfat). Ebenso wie hier wurde in den Batchversuchen (Kap.3.1.5) gezeigt, daß durch gleichzeitige Sulfat- und

1-NS-Gabe weitaus höhere Chlorophyllgehalte in den Algen zu finden war, als wenn Sulfat oder Sulfonsäure als alleinige Schwefelquelle zur Verfügung standen. Ebenso stieg der Carotinoidgehalt in den Algen von 1.22 mg/l auf 3.23 mg/l. Diese Steigerung auf das 2,64-fache der Ausgangskonzentration war jedoch geringer als die Chlorophyllzunahme. Interessant ist, daß die Zunahme des Carotinoids in den Algen fast so hoch ist wie die Steigerung der Wachstumsrate bzw. der Produktivität der Algen.

Inkubationsansatz	% Chl a	% Car	Chla : Car
mit 0.869mM 1-NS			
+ 0 mM SO ₄	0.396	0.435	1:1.10
+ 0.01 mM SO ₄	0.535	0.464	1:0.867
+ 0.02 mM SO ₄	1.110	0.614	1:0.553
+ 0.03 mM SO ₄	2.220	1.010	1:0.454
+ 0.04 mM SO ₄	2.600	1.150	1:0.442
+ 0.06 mM SO ₄	2.600	1.160	1:0.446

Tab.18: Pigmente in Prozent an der Biomasse und Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid mit 1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen in turbidostatischer Kultur

Der prozentuale Gehalt an Chlorophyll stieg von 0.396% auf 2.6%, der Carotinoidgehalt von 0.435% auf 1.160%. Das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid veränderte sich von 1:1.10 zu 1:0.466, woraus zu erkennen ist, daß die Algen sich von ihrem chlorotischen Zustand erholt hatten.

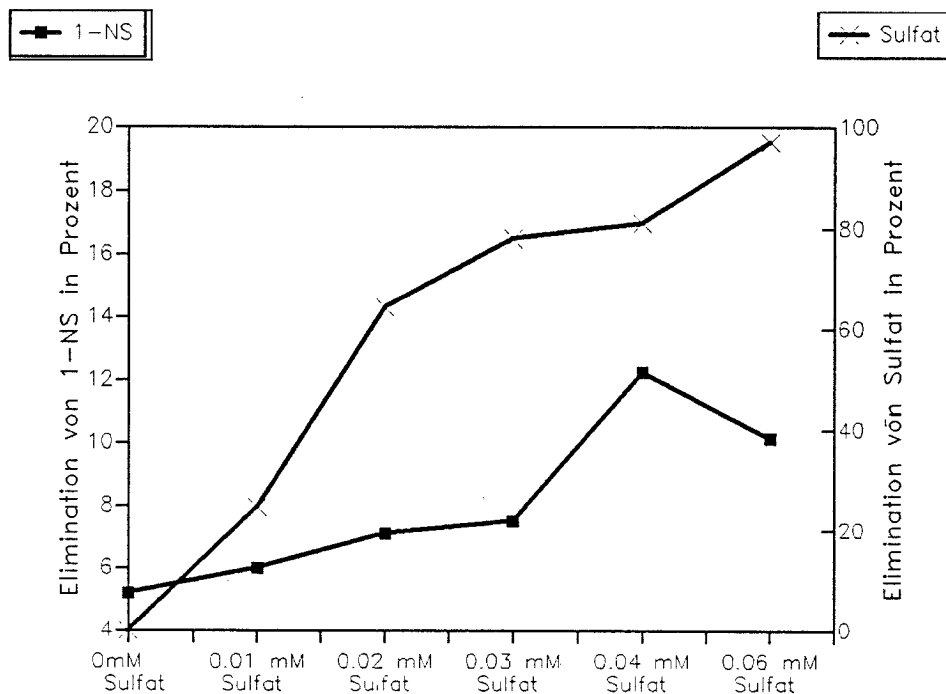


Abb. 42. Sulfonsäure- und Sulfatelimination der Algen in Abhängigkeit von verschiedenen Sulfatkonzentrationen:

Biomassekonzentration im Fermenter: 300 mg TS/l

Alsolutwerte: siehe Tab. 18.

Trotz steigender Sulfatkonzentration im Medium stieg die Eliminationsrate der Sulfonsäure von 5.2% (0 mM Sulfat) auf 12.25% (0.04 mM Sulfat) (Abb. 42). Dieses bedeutete eine Erhöhung der Eliminationsrate um das 2.35 fache des Anfangswertes. Bei weiterer Zugabe von Sulfat auf 0.06 mM sank die Eliminationsrate auf 10.14%, was auf einen Überschuß an Sulfat zurückzuführen ist, da anscheinend Sulfat bevorzugt aufgenommen wird. Es zeigt aber auch deutlich, daß die Eliminationsleistung von der Vitalität der Algen abhängt, die in deren Wachstumsraten und Pigmentgehalten zum Ausdruck kommt.

Die Elimination des Sulfates stieg mit ihrer Zugabe ins Medium von 24.6% auf 92%. Daß das Sulfat nicht vollständig aus dem Medium eliminiert wurde, hängt damit zusammen, daß hier ebenso wie in den Batchkulturen immer eine Restsulfatkonzentration von 0.0063 mM Sulfat gemessen wurde. Die Schwellenwertkonzentration machte aber bei niedrigen Sulfatkonzentrationen, die "unge-

nutzt“ aus dem Fermenter ausgespült wurden, einen nicht ganz unerheblichen Anteil aus.

Inkubationsansatz mit 0.869mM 1-NS	Produktivität mg/l*h	Sulfonsäure mM/l*h	Sulfat mM/l*h	Schwefel mg/l*h	Schwefelgehalt % der Biomasse
+ 0 mM SO ₄	8.7	0.0013	0	0.041	0.48
+ 0.01 mM SO ₄	10.5	0.0018	0.000070	0.059	0.57
+ 0.02 mM SO ₄	12.0	0.0024	0.000430	0.090	0.75
+ 0.03 mM SO ₄	19.2	0.0041	0.001630	0.182	0.95
+ 0.04 mM SO ₄	25.0	0.0087	0.002350	0.353	1.41
+ 0.06 mM SO ₄	25.0	0.0072	0.003750	0.353	1.41

Tab.19: Berechnung des prozentualen Schwefelgehaltes an der Biomasse mit 1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen in turbidostatischer Kultur

Der Anteil der Elimination der Sulfonsäure an der Gesamtelimination verringerte sich wegen des weiteren Anstieges der Sulfatelimination von 100% auf 65%.

Der aus dem Gesamt-S-Verbrauch ermittelte Schwefelgehalt stieg mit zunehmender Sulfatgabe von 0.48% auf 1.41% zu (Tab. 18). Dieser Wert wurde auch für Algen errechnet, die mit Sulfat als Schwefelquelle wuchsen (Kap.3.2.1).

Die Zugabe von Sulfat zur Sulfonsäure im Medium bewirkte bei den Algen eine Steigerung ihres Wachstums und eine Erhöhung ihres Schwefel- und Pigmentgehaltes. Dabei wurde die Sulfonsäure weitaus besser eliminiert als ohne Sulfat. Wurde die Sulfatkonzentration weiter erhöht, so verminderte sich die Elimination der Sulfonsäure.

3.2.4 Zur pH-Abhängigkeit des Sulfat- und Sulfonat- limitierten Wachstums von *Sc.obliquus*

Es ist durch Kurzzeitinkubationen (Inkubationsdauer: bis zu 90 Minuten) bekannt, daß Sulfat (Ullrich-Eberius, 1976) und Ethylensulfonat (Biedlingmaier u. Schmidt, 1987) bei dem pH-Wert 7.5 optimal aufgenommen wurden. Es sollte nun untersucht werden, inwieweit die dort gewonnenen Ergebnisse für Sulfat wie für Sulfonsäure auch für kontinuierliche Langzeitversuche gelten, und ob die Sulfonsäureelimination durch die Änderung des pH-Wertes, der automatisch durch Säure- und Laugezusatz eingestellt wurde (s. Kap.2.3.2), gesteigert werden konnte.

Der pH-Wert der vorangegangenen Versuche betrug durch den starken Phosphatpuffer $\text{pH } 6.5 \pm 0.3$.

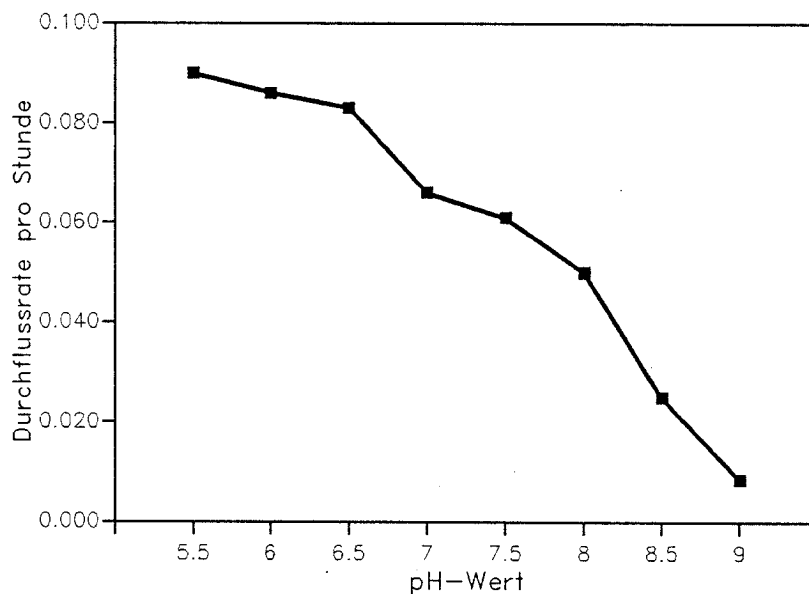


Abb. 43. Wachstumsrate von *Sc.obliquus* in turbidostatischer Kultur in Abhängigkeit vom pH-Wert:

Biomassekonzentration im Fermenter: 300 mg TS/l

Das Wachstum der Algen verringerte sich mit steigendem pH-Wert (Abb. 43). Zu Beginn beim pH-Wert von 5.5 wuchsen die Algen mit einer Wachstumsrate von

$D = 0.09 \text{ h}^{-1}$. Bis zu dem pH-Wert von 6.5 verringerte sich die Wachstumsrate langsam auf $D = 0.083 \text{ h}^{-1}$. Ab pH-Wert 7.0 nahm die Wachstumsrate der Algen schneller ab, bis sie beim pH-Wert von 9.0 $D = 0.0084 \text{ h}^{-1}$ betrug, d.h. 10% der Wachstumsrate, die bei pH 5.5 gemessen wurde.

Die Wachstumsrate der Algen ist gekoppelt mit deren Aufnahmefähigkeit für anorganischen Kohlenstoff. *Scenedesmus obliquus* kann sowohl CO_2 als auch HCO_3^- -Ionen als Kohlenstoffquelle nutzen, wobei er aber hauptsächlich CO_2 aufnimmt. Das Vorhandensein des CO_2 bzw. HCO_3^- ist abhängig vom pH-Wert; CO_2 liegt bei niedrigen pH-Werten als Hauptkohlenstoffform vor, während das HCO_3^- -Maximum bei pH 8.0 liegt. Über dem pH-Wert von 8.5 bildet sich dann CO_3^{2-} . Da sich mit zunehmendem pH-Wert die Menge an gelösten CO_2 verringert, verminderte sich auch die Wachstumsrate der Algen geringfügig von $D = 0.09 \text{ h}^{-1}$ bei pH 5.5 auf $D = 0.083 \text{ h}^{-1}$ bei pH 6.5, da CO_2 wohl abnimmt, aber immer noch Hauptbestandteil der Kohlensäureform ist. Zwischen den pH-Werten 6.5 bis pH 8.5 verschiebt sich das Gleichgewicht zum HCO_3^- -Ionen, wobei der CO_2 -Anteil gegen Null geht. Ebenso nimmt die Wachstumsrate der Algen rapide von $D = 0.0066 \text{ h}^{-1}$ auf $D = 0.025 \text{ h}^{-1}$ ab. Bei dem pH-Wert von 8.0 ist kein CO_2 mehr gelöst im Medium; stattdessen nimmt der Anteil der CO_3^{2-} -Ionen zu und der HCO_3^- -Pool ab. Da *Scenedesmus obliquus* auch noch bei dem pH-Wert von 9.0 wachsen kann, denn es wurde eine Wachstumsrate von $D = 0.0084 \text{ h}^{-1}$ gemessen, kann die untersuchte Alge als HCO_3^- auch Kohlenstoffquelle nutzen.

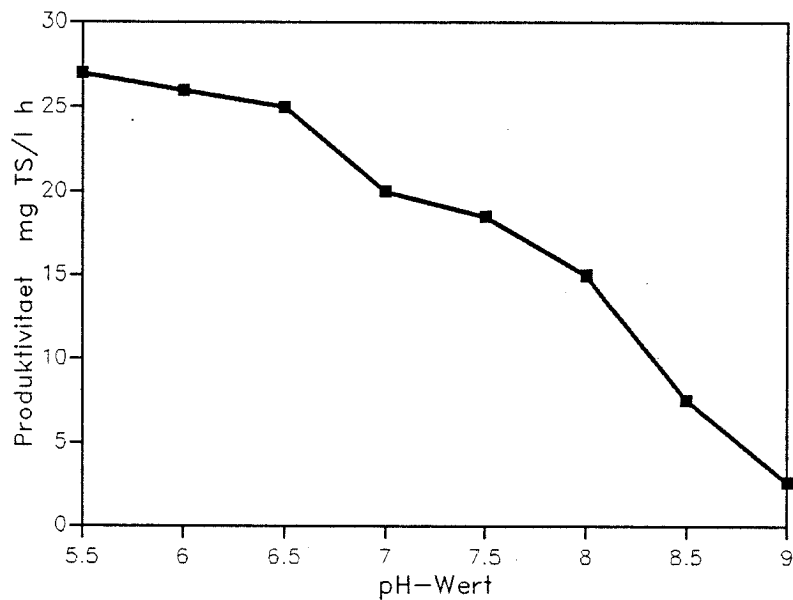


Abb. 44. Produktivität von *Sc.obliquus* in turbidostatischer Kultur in Abhängigkeit vom pH-Wert:

Biomassekonzentration im Fermenter: 300 mg/l

Da die Biomassekonzentration im Fermenter auf 300 mg TS/l konstant gehalten wurde, änderte sich die Produktivität der Algen mit der Abnahme der Wachstumsrate (Abb. 44). Bei dem pH-Wert von 5.5 lag die Produktivität bei 27 mg TS/lh und war somit um 8% höher als in den anderen Versuchen. Mit der Änderung des pH-Wertes hin zu alkalischen Milieubedingungen verringerte sich die Produktivität der Algen auf 2.6 mg TS/l h bei pH 9.0.

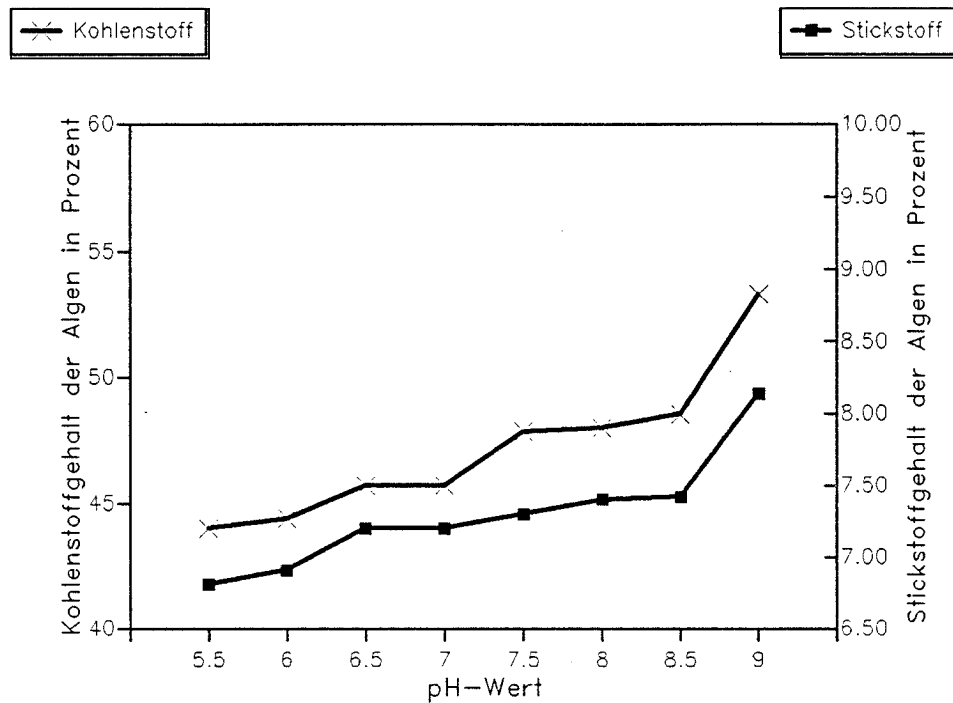


Abb. 45. Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt in den Algen in Abhängigkeit von den pH-Werten:

Biomassekonzentration im Fermenter: 300 mg TS/l

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in den anderen Versuchen zeigte sich, daß der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt der Algen sich mit der pH-Werterhöhung anstieg (Abb. 45). So nahm der Kohlenstoffgehalt von 44% auf 53.3% zu, während der Stickstoffgehalt sich von 6.81% auf 8.14% erhöhte. Trotz der Erhöhung blieb das C : N Verhältnis konstant auf 1:0.15.

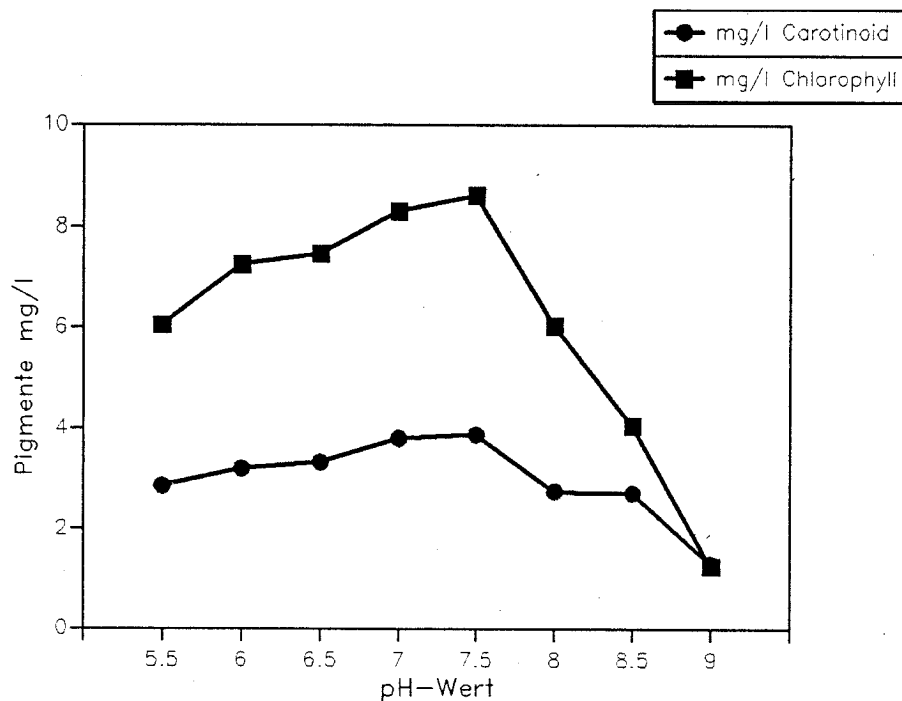


Abb. 46. Pigmentkonzentration von Sc. obliquus in Abhängigkeit vom pH-Wert:
Biomassekonzentration im Fermenter: 300 mg TS/l

Die gemessenen Pigmente Chlorophyll und Carotinoid hatten ihre höchsten Konzentrationen bei dem pH-Wert von 7.5 (Abb. 45). So nahm die Chlorophyllkonzentration von 6.05 mg/l bei pH 5.5 auf 8.61 mg/l bei pH 7.5 zu, fiel dann auf 1.2 mg/l bei pH 9.0. Ebenso stieg die Carotinoidkonzentration von 2.85 mg/l bei pH 5.5 auf 3.87 mg/l bei pH 7.5 und reduzierte sich auf 1.3 mg/l bei pH 9.0.

Inkubationsansatz	% Chl a	% Car	Chla : Car
bei pH 5.5	2.01	0.803	1:0.40
bei pH 6.0	2.40	1.139	1:0.47
bei pH 6.5	2.48	1.185	1:0.47
bei pH 7.0	2.76	1.357	1:0.48
bei pH 7.5	2.82	1.400	1:0.49
bei pH 8.0	2.01	0.980	1:0.48
bei pH 8.5	1.35	0.780	1:0.57
bei pH 9.0	0.43	0.464	1:1.08

Tab.20: Pigmente in Prozent an der Biomasse und Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid mit 1-NS und Sulfat als Schwefelquelle in Abhängigkeit vom pH-Wert

Wie sich die absoluten Pigmentkonzentrationen erhöhten, nahmen diese auch in den Algen als prozentuale Biomasseanteil zu. So wurde bei pH 7.5 2.82% Chlorophyll und 1.4% Carotinoid in der Biomasse errechnet. Das Verhältnis blieb über den pH-Wertsbereich von pH 6.0 bis pH 8.0 konstant mit $1:0.478 \pm 0.007$. Bei dem pH-Wert 5.5 lag das Verhältnis mit 1:0.4 deutlich niedriger, während es bei pH 8.5 und pH 9.0 auf 1:0.57 bzw. 1:1.084 anstieg.

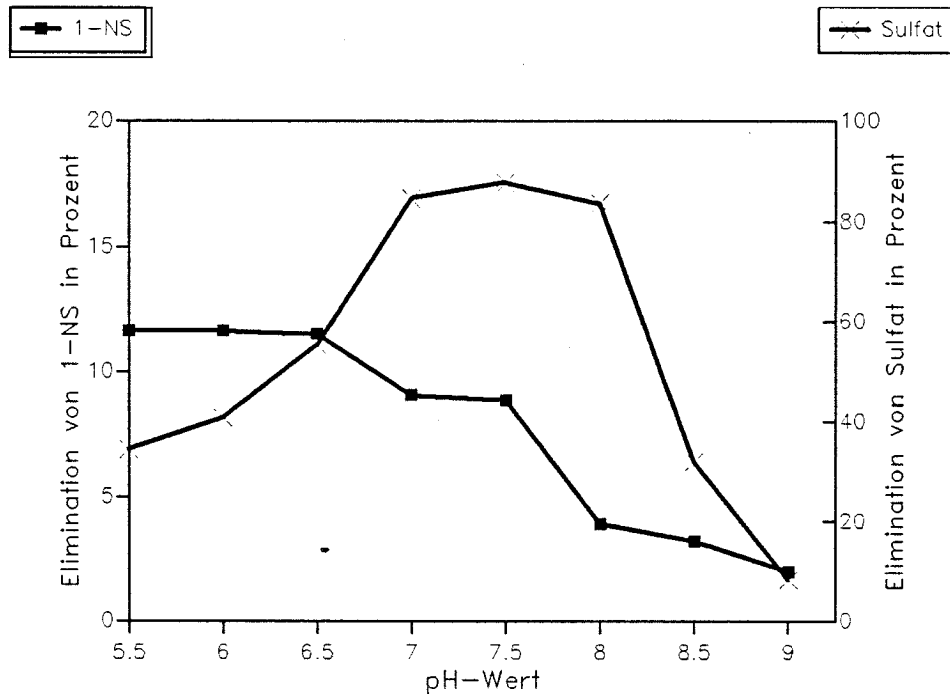


Abb. 47. Sulfonat- und Sulfatelimination der Algen in Abhängigkeit vom pH-Wert:
 Biomassekonzentration im Fermenter: 300 mg TS/l
 Absolutwerte: siehe Tab. 20

Steady state	Produktivität	Sulfonsäure	Sulfat	Schwefel	Schwefelgehalt
Ansatz	mg/l*h	mM/l*h	mM/l*h	mg/l*h	% der Biomasse
bei pH 5.5	27.0	0.0091	0.00186	0.351	1.30
bei pH 6.0	26.0	0.0087	0.00258	0.358	1.38
bei pH 6.5	25.0	0.0083	0.00271	0.352	1.41
bei pH 7.0	20.0	0.0052	0.00330	0.272	1.36
bei pH 7.5	18.5	0.0047	0.00316	0.251	1.36
bei pH 8.0	15.0	0.0017	0.00251	0.135	0.90
bei pH 8.5	7.6	0.0007	0.00048	0.038	0.50
bei pH 9.0	2.6	0.0005	0.00005	0.003	0.12

Tab.21: Berechnung des prozentualen Schwefelgehaltes an der Biomasse mit 1-NS und Sulfat als S-Quelle in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Elimination der Sulfonsäure nahm mit steigendem pH-Wert ab (Abb. 47). Während die Elimination in dem Bereich von pH 5.5 bis pH 6.5 nahezu konstant war (11.65%, pH 5.5; 11.51%, pH 6.5), nahm sie bei höheren pH-Werten rapide ab und zwar bis zu 2% bei pH 9.0. Da die Produktivität der Algen und die Elimination der Sulfonsäure einen nahezu gleichen Kurvenverlauf aufwiesen, scheint die Elimination der Sulfonsäure an die Produktivität der Algen gebunden zu sein.

Dagegen wurde das Sulfat bei pH 7.5 am meisten eliminiert. So stieg die Elimination bei pH 5.5 von 34% auf 87.7% bei pH 7.5; danach fiel die Elimination auf 8.3%. Da die Pigmentgehalte ebenso wie die Sulfatelimination ihr Maximum bei pH 7.5 haben, könnte ein Zusammenhang zwischen Sulfatelimination und Pigmentgehalt der Algen bestehen.

Die Elimination der Sulfonsäure und des Sulfates überlagerten sich in ihrer Abhängigkeit. Der höchste berechnete prozentuale Schwefelgehalt in den Algen fand sich pH 6.5, da additiv die größte Menge an Schwefel eliminiert wurde.

Der Versuch zeigt, daß die Algen mit zunehmenden pH-Wert schlechter wuchsen, wodurch die an die Produktivität gebundene Sulfonsäureelimination zurückging. Dagegen hatten die Pigmente in den Algen und die Sulfatelimination das Maximum bei pH 7.5. Der Schwefelgehalt der Algen war aufgrund der additiven Elimination von Sulfat und Sulfonsäure bei pH 6.5 am größten. Die Elimination der Sulfonsäure konnte durch die pH-Wertänderung nicht gesteigert werden.

3.2.5 Wachstum von *Sc. obliquus* im Chemostaten mit kontinuierlicher Biomasserückhaltung

Da in den vorangegangenen Versuchen nur eine Eliminationsleistung von maximal 11.61%, d.h. 0.091 mM/l h erreicht worden war, sollte durch den Versuchsaufbau mit kontrollierter Biomasserückführung versucht werden, die Eliminationsleistung noch weiter zu steigern.

Wie sich aus den vorherigen Versuchen schließen ließ, war die Desulfonierung von der Produktivität abhängig. Mit dem Turbidostaten oder einem Chemostaten ist es aber nicht möglich, die Produktivität zu steigern, da die Algen nur in Abhängigkeit von dem zufließenden Nährstoffangebot wachsen können. Um mehr Nährstoffe zur Verfügung zu stellen und gleichzeitig die Biomassekonzentration im Fermenter zu halten, bietet sich somit nur der Chemostat mit kontrollierter Biomasserückführung (s. Kap.2.3.3) an.

3.2.5.1 Wachstum von *Sc. obliquus* mit 0.0703 mM Sulfat und 0.869 mM 1-NS

Die Sulfatkonzentration wurde auf 0.0703 mM erhöht, um auch bei einer hohen Biomassekonzentration die Schwefellimitierung der Algen ausschließen zu können.

Durch die Vorgabe der Durchflußrate des Mediums waren folgende Parameter festgelegt, die tabellarisch aufgeführt sind:

Parameter	eingestellte Biomassekonzentration					
	1.4g TS/l		1.7g TS/l		2.4g TS/l	
eingestellter Durchfluß ml/h	57.84	82.3	60.01	82.2	63.26	79.6
Verweilzeit h	36.71	24.26	33.32	24.33	31.61	25.13
Durchflußrate 1/h	0.027	0.041	0.03	0.041	0.031	0.039
Σ S im Zul. $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$	54.35	77.34	56.39	77.24	59.44	74.807
Einlauf SO_4^{2-} in $\mu\text{M/l}\cdot\text{h}$	4.06	5.78	4.21	5.77	4.44	5.59
Einlauf 1-NS in $\mu\text{M/l}\cdot\text{h}$	50.31	71.56	52.18	71.47	55.00	69.21

Tab. 22: Eingestellte Parameter des Chemostaten mit kontinuierlicher Biomasserückführung

Die Produktivität der Algen stieg mit der Erhöhung der Biomassekonzentration im Fermenter von 21 mg TS/l h bei 1.4 g TS/l auf 38 mg TS/l h bei der Biomassekonzentration von 1.7 g TS/l und einem Durchfluß von 60 ml/h (Abb. 48 und Tab. 22). Bei weiterer Erhöhung der Biomassekonzentration fiel die Produktivität auf 36 mg TS/l h ab. Ein ähnlicher Kurvenverlauf wurde bei höherem Durchfluß von 80 ml/h festgestellt, und zwar eine Steigerung von 37 mg TS/l h auf 49 mg TS/l h, gefolgt von einem Abfall auf 46 mg TS/l h (Abb. 48 und Tab. 22).

Vergleicht man die Produktivitäten bei gleicher Biomassekonzentration, so war bei höherem Durchfluß die Produktivität höher, aber mit zunehmender Konzentration verringerte sich die Differenz. So war zu Anfang die Produktivität bei 80ml/h Durchfluß um 76% höher und nahm bis zu 27% ab.

Dieses deutet daraufhin, daß bei niedriger Biomassekonzentration und bei niedrigem Durchfluß die Algen nährstofflimitiert gewesen sein mußten, da bei hohem Durchfluß eine so deutliche Steigerung der Produktivität möglich war. Mit Erhöhung der Biomassekonzentration setzte dann die Lichtlimitierung durch die Selbstbeschattung der Algen und auch die Substratlimitierung ein, die zu der Annäherung und letztlich zur Reduktion der Produktivität führte.

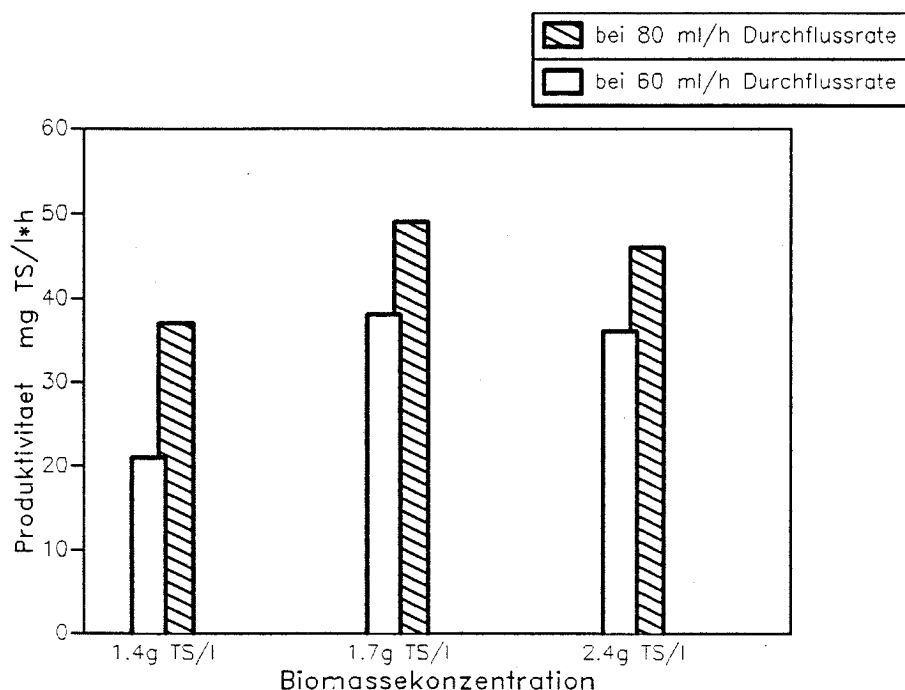


Abb. 48. Produktivität der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückhaltung:

Einstellung von Biomassekonzentrationen von 1.4g TS/l bis 2.4g TS/l und Durchfluß von 60 und 80 ml/h

Gemessene Parameter	Biomassekonzentration					
	1.4g TS/l		1.7g TS/l		2.4g TS/l	
Biom. im Auslauf mg/l h	21	37	38	49	36	46
Filtrat ml/h	41.82	60.30	37.15	53.32	48.26	59.75
Auslauf ml/h	15.66	22.00	22.51	28.88	15.00	19.40

Tab. 23: Produktivität der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückhaltung bei Biomassekonzentrationen von 1.4g TS/l bis 2.4g TS/l und Durchfluß von 60 und 80 ml/h

Mit der Zunahme der Biomassekonzentration im Fermenter stieg auch die Pigmentkonzentration an (Abb. 49). So erhöhte sich die Chlorophyllkonzentration von 14.4 mg/l (60ml/h) bzw. 17.0 mg/l (80ml/h) bei der Biomassekonzentration von 1.4 g TS/l auf 61.31 mg/l bzw. 62.13 mg/l bei 2.4 g TS/l an. Betrug die Differenz bei 1.4 g TS/l noch 18%, so war sie bei 2.4 g TS/l nur noch 1.4%.

Ebenso stieg die Carotinoidkonzentration von 6.95 mg/l (60ml/h) bzw. 7.8 mg/l (80ml/h) bei die niedrigen Biomasse auf 24.84 mg/l bzw. 24.28 mg/l an. Bei der hohen Biomassekonzentration war die Carotinoidkonzentration faktisch gleich.

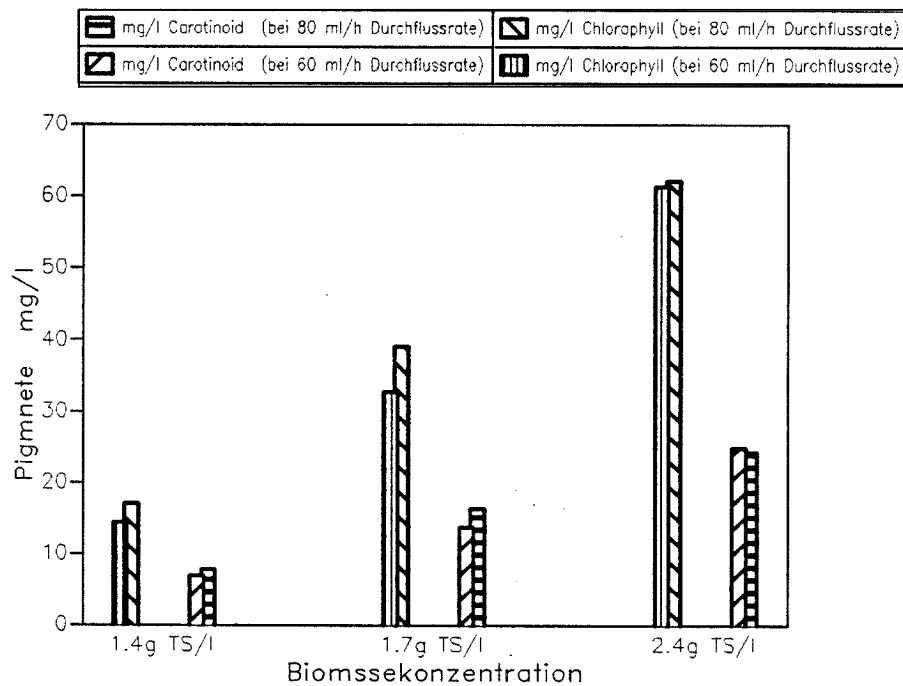


Abb. 49. Chlorophyll- und Carotinoidgehalt der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomassenrückführung:

Einstellung von Biomassekonzentrationen von 1.4g TS/l bis 2.4g TS/l und Durchfluß von 60 und 80 ml/h

Gemessene Parameter	Biomassekonzentration					
	1.4g TS/l		1.7g TS/l		2.4g TS/l	
Chlorophyll %	1.02	1.17	1.89	2.24	2.52	2.58
Carotinoide %	0.496	0.538	0.789	0.934	1.02	1.05
Chla./Car.	1:0.48	1:0.46	1:0.41	1:0.41	1:0.41	1:0.41

Tab. 24: Prozentualer Pigmentgehalt der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung

Wie in den Experimenten im Turbidostaten erhöhte sich der prozentuale Pigmentgehalt zunächst mit steigender Biomassekonzentration (Tab. 23). So stieg der Chlorophyllgehalt von 1.05% (60ml/h) bzw. 1.17% (80ml/h) auf 2.52% bzw. 2.58% an. Diese Erhöhung um das 2.5 fache ist auf die verringerte Lichtmenge

pro Alge zurückzuführen, worauf die Alge mit der Erhöhung an Chlorophyll reagiert entsprechend der Befunde von Tamiya (1953) für *Chlorella ellepoidea*. Deutlich geringer war die prozentuale Carotinoidzunahme, die nämlich von 0.496% (60ml/h) bzw. 0.538% (80ml/h) auf 1.02% bzw. 1.05% zunahm. Aufgrund der relativ stärkeren Chlorophyllzunahme nahm das Chlorophyll : Carotinoid- Verhältnis ab, das bei dem niedrigeren Durchfluß höher war als bei 80ml/h (Tab. 23).

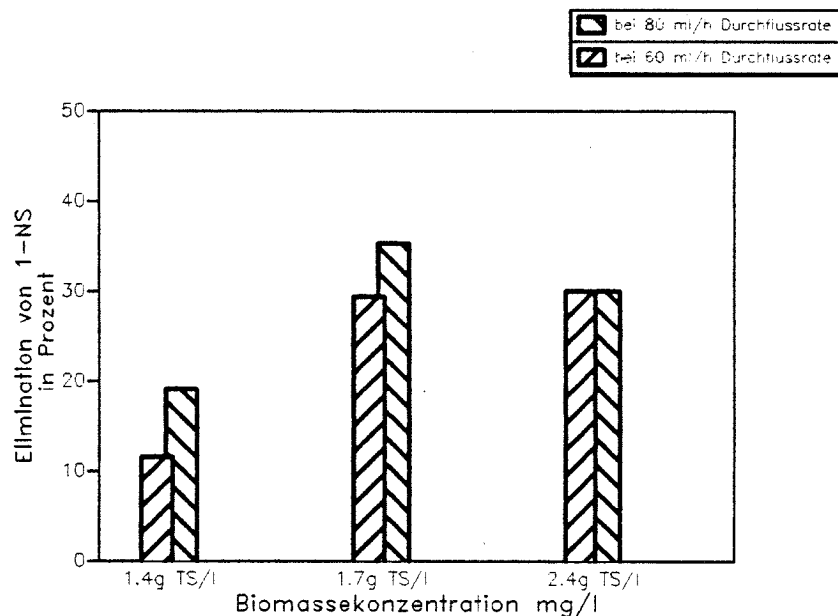


Abb. 50. Elimination von 1-Naphthalinsulfonsäure im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung:
Einstellung von Biomassekonzentrationen von 1.4g TS/l bis 2.4g TS/l und Durchfluß von 60 und 80 ml/h

Gemessene Parameter	Biomassekonzentration					
	1.4g TS/l		1.7g TS/l		2.4g TS/l	
Auslauf SO_4^{2-} in $\mu\text{M/l}\cdot\text{h}$	0.375	0.520	0.378	0.52	0.398	0.501
Abbau von SO_4^{2-} in %	90.88	91.00	91.02	90.98	91.03	91.03
Auslauf 1-NS $\mu\text{M/l}\cdot\text{h}$	44.46	57.92	36.87	46.25	38.50	48.44
Abbau 1-NS %	11.59	19.05	29.33	35.28	30.0	30.0
S-Aufn. in % des TS	1.5	1.6	1.6	1.9	1.9	2.0

Tab. 25: Restgehalt der Schwefelquelle im Medium und prozentuale Elimination bei Biomassekonzentrationen von 1.4g TS/l bis 2.4g TS/l und Durchfluß von 60 und 80 ml/h

Die Elimination der 1-Naphthalinsulfonsäure war ebenso von dem Durchfluß als auch von der Biomassekonzentration abhängig (Abb. 50 u. Tab. 24). Während die Elimination bei 60 ml/l von 11.59% ($5.83\mu\text{M/l h}$) erst auf 29.33% ($15.3\mu\text{M/l h}$) und zuletzt auf 30.0% ($16.5\mu\text{M/l h}$) stieg, erhöhte sich diese bei 80 ml/h Durchfluß erst von 19.09% ($13\mu\text{M/l h}$) auf 35.28% ($25.21\mu\text{M/l h}$), fiel aber dann auf 30% ($20\mu\text{M/l h}$) ab. Es konnte also, ebenso wie bei der Biomasseproduktivität (Abb. 50) keine weitere Steigerung der Eliminationsleistung gegenüber dem niedrigeren Durchfluß erzielt werden.

Das Sulfat wurde in allen Steady-States bis zur Schwellenwertkonzentration (s. Kap. 3.1.1) eliminiert, so daß weniger als 10% der eingesetzten Sulfatmenge im Auslauf vorlag.

Die Unterschiede der Eliminationsleistung bei den verschiedenen Durchflußgeschwindigkeiten sind vielleicht dadurch zu erklären, daß den Algen bei hohem Durchfluß sowohl mehr Sulfat und Sulfonsäure als auch andere Nährstoffe zur Verfügung stand, welches auch genutzt wurde. Durch die Erhöhung der Biomassekonzentration auf 2.4 g TS/l wurden die Algen wieder schwefellimitiert, so daß die Desulfonierung abnahm. Desweiteren ist auch die Desulfonierung von der Produktivität der Algen abhängig, die bei 2.4 g TS/l niedriger war.

Der prozentuale Schwefelgehalt der Algen stieg dagegen mit zunehmender Biomassekonzentration an. So erhöhte er sich von 1.5% auf 1.9% bei 60 ml/h und von 1.6% auf 2.0% bei 80 ml/h Durchflußrate (Tab. 24).

Der Versuch zeigt, daß die Eliminationsleistung der Algen durch höhere Biomassekonzentration und Sulfatkonzentration bis auf $25.21\mu\text{M/l h}$ gesteigert werden konnte, wobei die 1-NS-Elimination von der Produktivität der Algen und der Sulfatelimination qualitativ korreliert war.

3.2.5.2 Wachstum von *Sc. obliquus* mit 0.112 mM Sulfat und 0.869 mM 1-NS

Da sich auch in den vorangegangenen Versuch gezeigt hat, daß sich die Desulfonierungsleistung bei der Biomassekonzentration von 2.4 gTS/l reduzierte, was auf einen Sulfatmangel zurückgeführt wurde, sollte mit der Erhöhung der Sulfatkonzentration auf 0.112 mM und höheren Biomassekonzentration versucht werden, die Eliminationsleistung noch weiter zu steigern. Dabei mußte auf die höhere Durchflußrate verzichtet werden, weil die Filtrierleistung mit zunehmender Biomassekonzentration abnahm.

Im folgenden sind die eingestellten Parameter aufgelistet:

Parameter	Biomassekonzentration				
	2.3g TS/l	2.6g TS/l	3.6g TS/l	4.3g TS/l	5.3g TS/l
eingestellter					
Durchfluß ml/h	63.79	62.36	53.35	56.85	55.15
Verweilzeit h	31.35	32.07	37.49	35.18	36.26
Durchflußrate 1/h	0.0319	0.0312	0.027	0.028	0.028
ΣS im Zul. $\mu\text{mol/h}$	62.60	61.20	52.36	55.79	54.12
Einlauf SO_4^{2-} $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$	7.144	6.98	5.97	6.36	6.17
Einlauf 1-NS $\mu\text{M/l}\cdot\text{h}$	55.46	54.22	46.39	49.43	47.95

Tab.26: Eingestellte Parameter des Chemostaten mit kontinuierlicher Biomasserückführung

Mit zunehmender Biomassekonzentration im Fermenter erniedrigte sich die Produktivität der Algen (Abb. 51). So wurde anfangs eine Produktivität von 42 mg TS/lh bei einer Biomassenkonzentration von 2.3 g TS/l ermittelt, die deutlich höher lag als in dem vorherigen Versuch, was zeigt, daß die Erhöhung der Sulfatkonzentration noch zu einer weiteren Produktivitätssteigerung führte. Mit der weiteren Erhöhung der Biomassekonzentration auf 4.3 g TS/l nahm die Produktivität langsam auf 35.8 mg TS/l ab. Bei der weiteren Erhöhung reduzierte sich diese deutlich auf 10.5 mg TS/l, was eindeutig auf Lichtlimitierung zurückzuführen ist, da die Nährstoffe weiterhin in gleicher Konzentration und Menge in den Fermenter gepumpt wurden.

Die Biomasse konnte nicht weiter aufkonzentriert werden, da die Cross-Flow-Filtration in ihrer Effizienz durch die hohe Biomassekonzentration immer mehr eingeschränkt war.

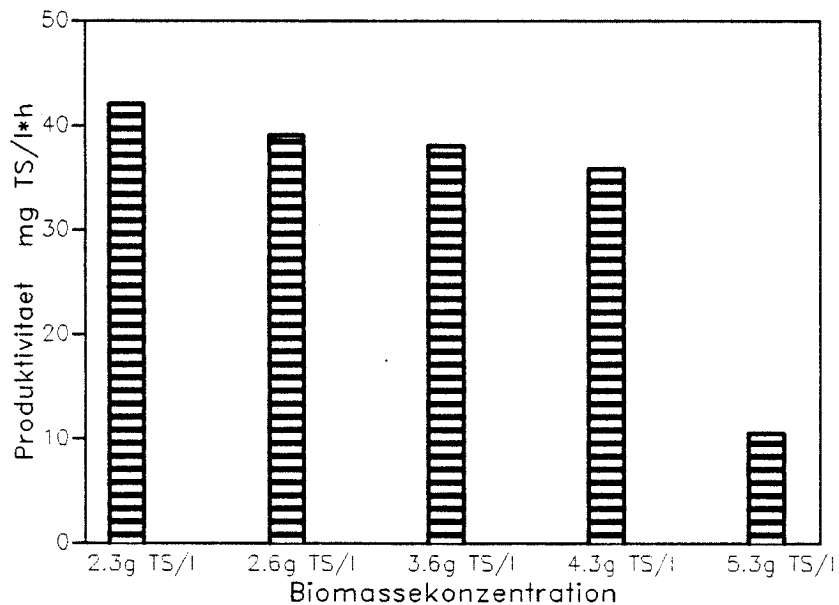


Abb. 51. Produktivität der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung:
Einstellung der Biomassekonzentration von 2.3g TS/l bis 5.3g TS/l und einem Durchfluß von 80ml/h

gemessene Parameter	Biomassekonzentration				
	2.3g TS/l	2.6g TS/l	3.6g TS/l	4.3g TS/l	5.3g TS/l
Biom. im Auslauf mg/l*h	42	39	38	35.8	10.5
Filtrat ml/h	45.54	47.26	42.93	48.55	53.14
Auslauf ml/h	18.25	15.1	10.42	8.3	2.01

Tab. 27: Produktivität der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung bei eingestellten Biomassekonzentrationen von 2.3g TS/l bis 5.3g TS/l und einem Durchfluß von 80ml/h

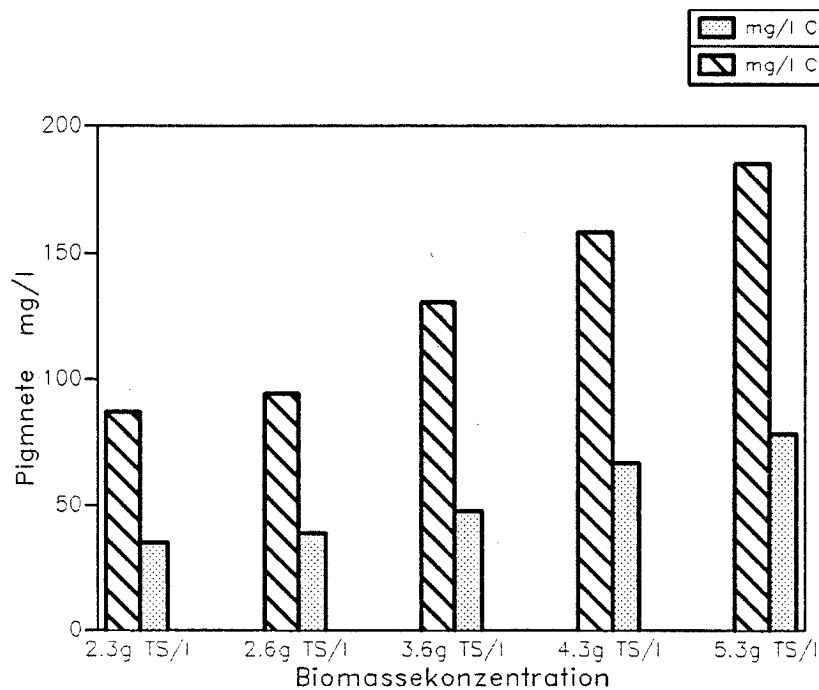


Abb. 52. Chlorophyll- und Carotinoidgehalt der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung:

Einstellung der Biomassekonzentration von 2.3g TS/l bis 5.3g TS/l
und einem Durchfluß von 80ml/h

Die Erhöhung der Biomassekonzentration führte auch zu einem weiteren Anstieg der Pigmentkonzentration. Dabei nahmen Chlorophyll und Carotinoid im gleichen Maße zu (Abb. 52). So erhöhte sich die Chlorophyllkonzentration um das 2.14 fache von 86.81 mg/l auf 184.94 mg/l, und die Carotinoidkonzentration um das 2.24 fache von 34.72 mg/l auf 77.95 mg/l.

gemessene Parameter	Biomassekonzentration				
	2.3g TS/l	2.6g TS/l	3.6g TS/l	4.3g TS/l	5.3g TS/l
Chlorophyll in % von der TS	3.76	3.60	3.61	3.66	3.51
Carotinoide in % von der TS	1.50	1.48	1.32	1.54	1.48
Chl./Carot.	0.40	0.41	0.41	0.42	0.42

Tab. 28: Prozentualer Pigmentgehalt der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung bei eingestellten Biomassekonzentrationen von 2.3g TS/l bis 5.3g TS/l und einem Durchfluß von 80ml/h

Bei der höheren Sulfatkonzentration war auch bei der Biomassekonzentration von 2.3 mg TS/l der prozentuale Chlorophyllgehalt in den Algen deutlich höher als im vorherigen Versuch (Tab. 27). So betrug der Chlorophyllgehalt $3.76 \pm 0.2\%$ gegenüber 2.52% . Der Carotinoidgehalt blieb ebenfalls konstant auf $1.46 \pm 0.075\%$. Durch die Erniedrigung des Chlorophyllgehaltes nahm auch das Chlorophyll : Carotinoidverhältnis wieder zu, von 1:0.40 auf 1:0.42.

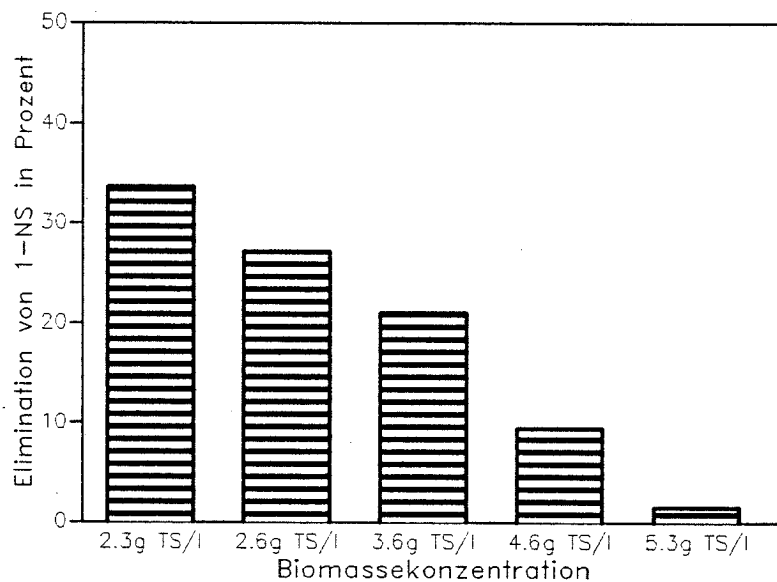


Abb. 53. Elimination von 1-Naphthalinsulfonsäure im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung:

Einstellung der Biomassekonzentration von 2.3g TS/l bis 5.3g TS/l und dem Durchfluß von 80ml/h

gemessene Parameter	Biomassekonzentration				
	2.3g TS/l	2.6g TS/l	3.6g TS/l	4.3g TS/l	5.3g TS/l
Σ S im Abl. $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$	37.67	39.92	36.93	43.26	50.45
Auslauf SO_4^{2-} $\mu\text{mol/l}\cdot\text{h}$	0.401	0.402	0.72	1.5	3.22
Abbau von SO_4^{2-} in %	94.38	94.24	87.93	76.41	47.81
Auslauf 1-NS $\mu\text{M/l}\cdot\text{h}$	37.26	39.52	41.70	44.76	47.83
Abbau 1-NS %	33.0	27.1	21.00	9.44	1.5
S Aufnahme % des TS	1.90	1.74	1.3	1.2	1.12

Tab. 29: Restgehalt der Schwefelquelle im Medium und prozentuale Elimination bei eingestellten Biomassekonzentrationen von 2.3g TS/l bis 5.3g TS/l und einem Durchfluß von 80ml/h

Mit dem Rückgang der Produktivität der Algen nahm auch die Elimination der Schwefelquellen ab. Dieses war nicht allein beschränkt auf die Sulfonsäure, die, wie in Kap. 3.2.4 gezeigt werden konnte, eng mit der Produktivität gekoppelt ist, sondern auch auf das Sulfat. So war die Sulfonsäureelimination bei der Biomassekonzentration von 2.3 g TS/l um 3% höher als im Versuch davor (33% zu 30%), was auf die höhere Sulfatkonzentration im Medium zurückzuführen war, die wiederum bis zur Schwellenwertkonzentration von den Algen aufgenommen wurde. Mit der Zunahme der Biomassekonzentration nahm auch die Eliminationsleistung der Algen von 33% auf 1.5% ab. Ebenso reduzierte sich die Sulfatelimination von 94.38% auf 47.81%.

Dadurch, daß sich die Elimination der Schwefelquellen reduzierte, nahm auch der prozentuale Schwefelgehalt an der Biomasse ab (Tab. 28). So war er bei niedriger Biomasse noch 1.9%, was auch im vorherigen Versuch ermittelt wurde. Mit zunehmender Biomassekonzentration erniedrigte sich der Gehalt bis zu 1.12%. Dieser Wert von 1.12% zeigt aber, daß die Algen noch nicht schwefellimitiert gewesen sein konnten, da dieser deutlich höher lag als in den Versuchen in Kap. 3.2.3, wo die Nährstofflimitierung zu Schwefelgehalten von 0.476% bzw. 0.52% führte.

Der Versuch zeigt, daß die Algen trotz guter Nährstoffversorgung nur noch durch die Lichtlimitierung in ihrem Wachstum eingeschränkt wurden, wodurch sich sowohl die Elimination von 1-Naphthalinsulfonsäure wie Sulfat reduzierte. Wiederum ergab sich eine Übereinstimmung mit den Änderungen der Produktivität (vgl. Abb. 51).

3.3 Versuche mit radioaktiv - markiertem Substanzen

3.3.1 Langzeitversuche mit radioaktiven Substanzen

Um abzusichern, daß die Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure und des Sulfates nicht darauf beruht, daß die Substanzen nicht biotisch oder abiotisch zu anderen Substanzen transformiert werden, sondern als Schwefelquelle genutzt werden, wurden 1-Naphthalinsulfonsäure und Sulfat als markierte Substanzen den Algen als Schwefelquelle angeboten, und die Radioaktivität in den Algen bestimmt.

Durch Vorkultivierung der Algen in Medien mit Sulfat wie Sulfonsäure sollte zum einen festgestellt werden, ob die Algen ohne Voradaptation 1-Naphthalinsulfonsäure nutzen können, zum anderen, ob Sulfat den Einbau des ^{35}S -Schwefels der Sulfonsäure hemmt.

Ebenso wurde ^{14}C -markierte 1-Naphthalinsulfonsäure eingesetzt, um zu untersuchen, inwieweit der Kohlenstoff des Aromaten in die Algenbiomasse eingebaut wird.

3.3.1.1 Wachstum von *Sc. obliquus* mit inhomogen geträgerter 1-Naphthalinsulfonsäure (S-markiert)

Da bei der Synthese der 1-Naphthalinsulfonsäure 16% 2-Naphthalinsulfonsäure entsteht, wurde dieses Gemisch mit reiner inaktiven 1-Naphthalinsulfonsäure geträgert, so daß 99.8% des Gemisches aus 1-Naphthalinsulfonsäure bestand (inhomogen geträgert).

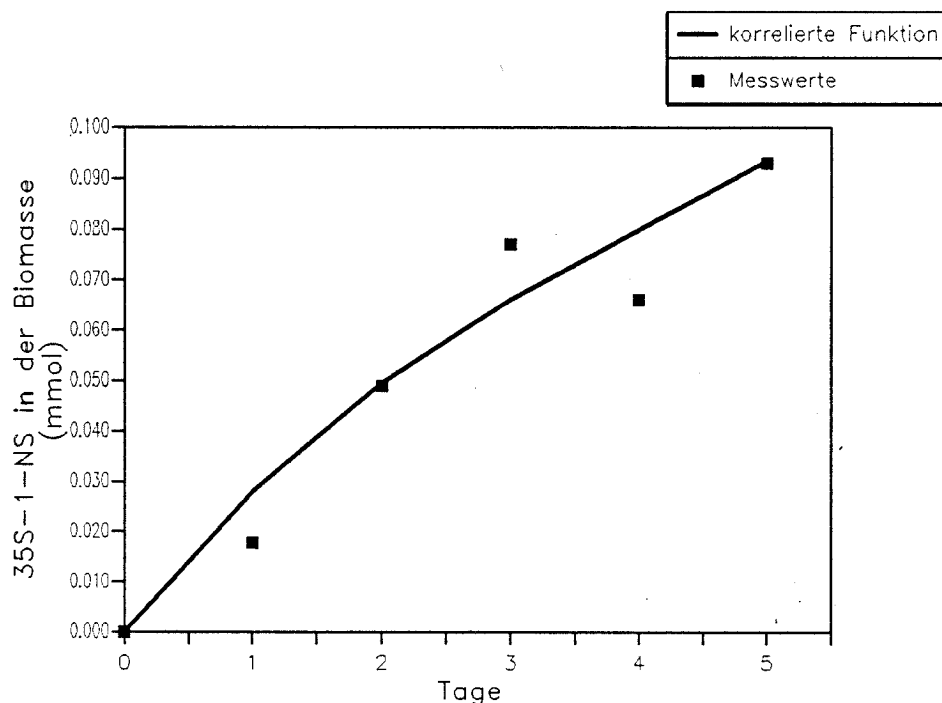


Abb. 54. Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (inhomogen):

Vorkultur in N8-Medium

inhomogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure(99.2% 1-NS, 0.8% 2-NS)

Mittelwerte aus Parallelansätzen

korrelierte Funktion: $y = (-0.246) + 0.0617 \log x$ $r = 0.925$, $n = 6$

Nach dem Überimpfen der Algen aus dem sulfathaltigem N8-Medium wurde bereits am 1. Tag 1-Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle genutzt (Abb. 54). War die Aufnahme am ersten Tag noch mit 0.017 mM ^{35}S -1-NS gering, so stieg die Konzentration im Laufe der Zeit deutlicher an und erreichte am 5.Tag eine Konzentration von 0.093 mM ^{35}S -1-NS. Die geringe Aufnahme zu Beginn des Versuches ist darauf zurückzuführen, daß durch das Überimpfen von dem sulfathaltigen Medium in das 1-NS-Medium Sulfat aus der Vorkultur mitüberimpft wurde, so daß die Algen bevorzugt noch das Sulfat nutzten, gleichzeitig aber auch den Schwefel der 1-Naphthalinsulfonsäure aufnehmen. Dieses wird auch im Vergleich zum nächsten Versuchsansatz (vgl. S.126) deutlich, bei dem zu Beginn weitaus höhere Mengen an ^{35}S -1-NS aufgenommen wurden.

Dieses Ergebnis gibt auch Aufschluß zur Adaptation der Algen von der Nutzung des Sulfates zu der 1-NS (Kap.3.1.2). Die Algen müssen also nicht in dem Sinne adaptieren, daß entsprechende Enzyme gebildet werden, sondern die Adaptation und die darauf resultierende Abnahme der Wachstumsrate ist alleinig auf die sich verringerte Menge des anwesenden Sulfates zurückzuführen.

Tag	Biomasse (mg TS/l)	Zählrate dpm/l	1-NS (mg)	1-NS (mMol)	Schwefel (mg)	S in der Biomasse (%)
0	50	0	0	0	0	0
1	85	2541790	4,245	0,018	0,576	0,68
2	121	6707690	11,203	0,049	1,568	1,30
3	151	10625480	17,746	0,077	2,464	1,63
4	184	9038100	15,095	0,066	2,112	1,15
5	233	12862850	21,482	0,093	2,976	1,28

Tab. 30: Meßergebnisse der ³⁵S-markierten Sulfonsäure in die Biomasse

Vorkultur in N8-Medium

inhomogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure

Berechnet man den prozentualen Schwefelgehalt in der Biomasse, so nahm der Gehalt von 0.68% am 1.Tag auf 1.30% am 2.Tag zu, fiel aber auf 1.28% am 5.Tag ab. Vergleicht man diese Gehalte mit dem Versuchsansatz auf Seite 126, so muß man davon ausgehen, daß durch die Aufnahme des Restsulfates niedrigere ³⁵S-1-NS-Werte gemessen wurden.

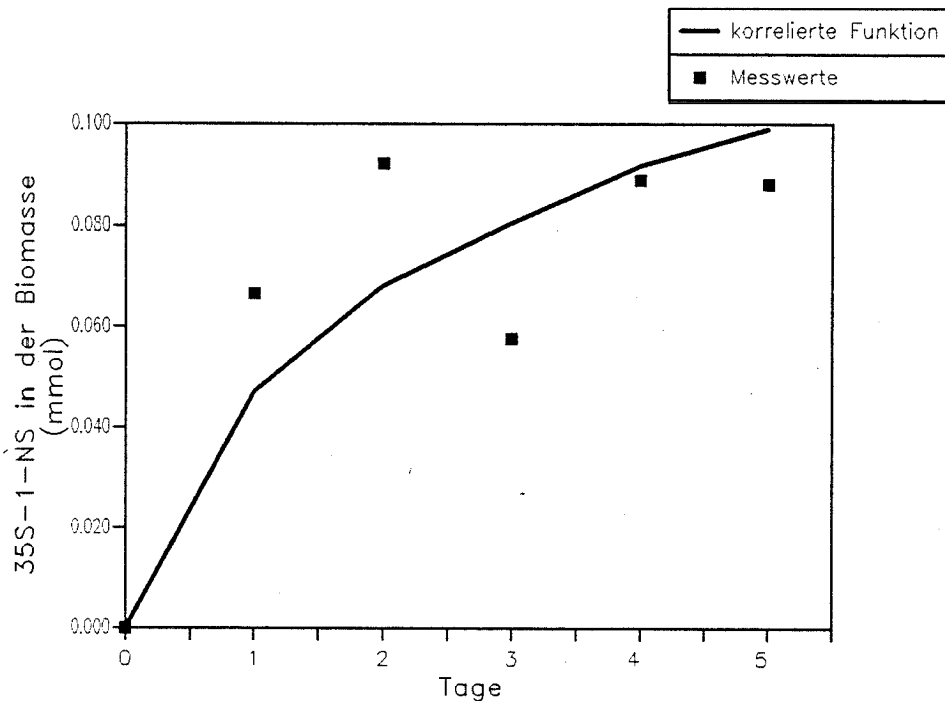


Abb. 55. Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (inhomogen):

Vorkultur in 1-NS-Medium

inhomogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure (99.2% 1-NS, 0.8% 2-NS)

Mittelwerte aus zwei Ansätzen

korrelierte Funktion: $y = (-0.182) + 0.0515 \log x$ $r = 0.895$, $n = 6$

Wurden die Algen von einem sulfonsäurehaltigen Medium in das gleiche Medium überimpft, so nahmen die Algen im Gegensatz zum vorherigen Versuchsabsatz sofort eine größere Menge 1-Naphthalinsulfonsäure in ihre Biomasse auf (Abb. 55). Am Versuchsende wurde eine Konzentration von 0.088 mM ^{35}S -1-Naphthalinsulfonsäure in den Algen gemessen. Betrachtet man diese Endkonzentration an ^{35}S -1-NS in den Algen, so fällt auf, daß unabhängig von der Vorkultur - Sulfat- oder 1-NS- haltiges Medium - die gleiche Menge an ^{35}S -1-NS nachgewiesen werden konnte. Dieses bedeutet, daß die Restsulfatkonzentration die Aufnahme an 1-NS nicht gehemmt hat.

Tag	Biomasse (mg TS/l)	Zählrate dpm/l	1-NS (mg)	1-NS (mMol)	Schwefel (mg)	S in der Biomasse (%)
0	50	0	0	0	0	0
1	85	9167120	15,310	0,067	2,130	2,50
2	121	12697240	21,206	0,092	2,950	2,44
3	151	7931760	13,247	0,058	1,843	1,22
4	184	12248090	20,456	0,089	2,846	1,55
5	233	12141430	20,278	0,088	2,821	1,21

Tab. 31: Meßergebnisse der ³⁵S-markierten Sulfonsäure in die Biomasse

Vorkultur in 1-NS-Medium

inhomogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure

Der prozentuale Schwefelgehalt in den Algen nahm auch im Verlauf des Versuches von 2.5% auf 1.21% ab, was bedeutet, daß die Algen zu Beginn bei niedriger Biomassekonzentration zum Verhältnis zur Biomasse mehr Sulfonsäure aufnahmen als gegen Versuchsende, so daß man davon ausgehen kann, daß die Aufnahme der Sulfonsäure konzentrationsabhängig ist. Dieses Ergebnis bestätigt auch den Befund aus dem Versuch 3.1.2 .

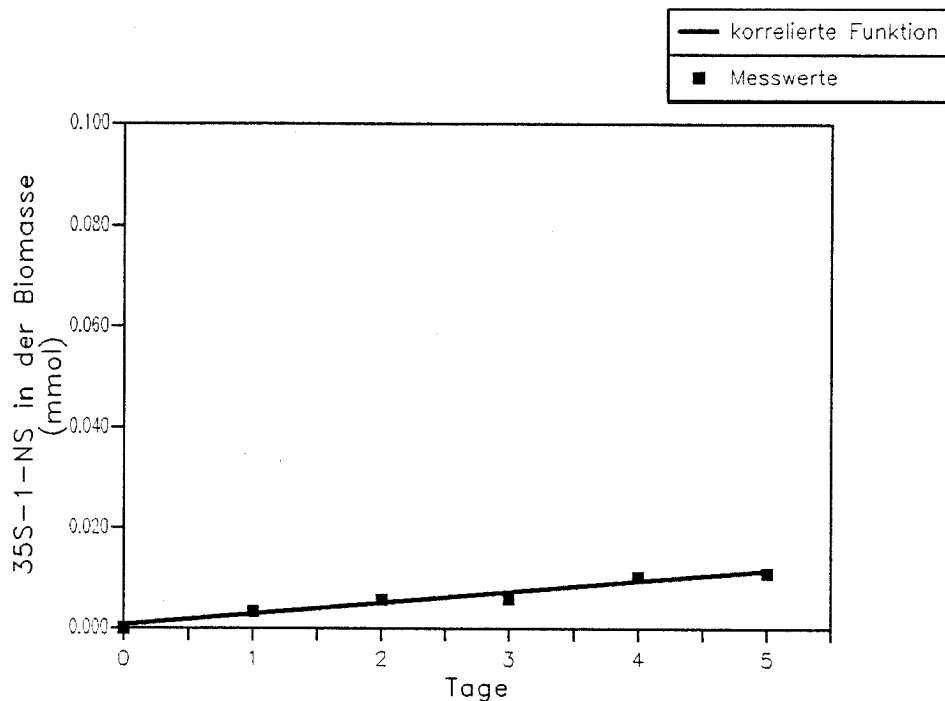


Abb. 56. Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (inhomogen):

Vorkultur in 0.217 mM 1-NS- und 0.14 mM Sulfat-Medium

inhomogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure (99.2% 1-NS, 0.2% 2-NS)

Mittelwerte aus zwei Ansätzen

korrelierte Funktion: $y = (6.7 \times 10^{-6}) + 3.85 \times 10^{-5}x$ $r = 0.93$, $n = 6$

Stellte man den Algen sowohl Sulfat (inaktives) und 1-Naphthalinsulfonsäure (aktives) als Schwefelquelle zur Verfügung, so zeigt sich, daß die Aufnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure durch das Sulfat deutlich eingeschränkt wird (Abb. 56). So wurde im gesamten Versuchszeitraum nur 0.011 mM ^{35}S -1-Naphthalinsulfonsäure aufgenommen. Dieses entsprach nur 12.5% der Menge an Sulfonsäure, die bei Abwesenheit von Sulfat von den Algen aufgenommen wurde. Anhand der Regression zeigt sich auch, daß die Aufnahme nicht wie in den anderen Versuchen logarithmisch aufgenommen wird, sondern eher linear zunahm. Dieses bedeutet, daß kontinuierlich im gleichem Maße 1-Naphthalinsulfonsäure bei Anwesenheit von Sulfat aufgenommen wurde, es aber nicht zu einer Hemmung der Aufnahme der Sulfonsäure kam.

Tag	Biomasse (mg TS/l)	Zählrate dpm/l	1-NS (mg)	1-NS (mMol)	Schwefel (mg)	S in der Biomasse (%)
0	50	0	0	0	0	0
1	90	465440	0,777	0,003	0,108	0,12
2	134	797340	1,332	0,006	0,185	0,14
3	179	798320	1,333	0,006	0,186	0,10
4	244	1410130	2,355	0,010	0,328	0,13
5	297	1533400	2,561	0,011	0,356	0,12

Tab. 32: Meßergebnisse der ³⁵S-markierten Sulfonsäure

Vorkultur in 1-NS und Sulfat-Medium

inhomogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure

Dadurch daß die Zunahme linear war, war auch keine tendenzielle Änderung des Schwefelgehaltes in der Biomasse zu erkennen (Abb. 56). Da in der gleichen Zeit auch Sulfat aufgenommen wurde, spiegelt der errechnete Schwefelgehalt nur den Anteil der 1-Naphthalinsulfonsäure wieder und nicht den gesamten Schwefelgehalt. So wurde ein durchschnittlicher Gehalt von $0.122 \pm 0.013\%$ ermittelt, der durch die Inkubation der ³⁵S - 1-Naphthalinsulfonsäure zustande gekommen war.

Der Versuch zeigt, daß die Algen sofort ohne Adaptation 1-Naphthalinsulfonsäure aufnehmen können, wobei die gleichzeitige Anwesenheit von Sulfat die Aufnahme der Sulfonsäure reduziert wurde. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde aus den Versuchen in Kap. 3.1.2 und 3.1.5. Dieses bedeutet aber auch, daß es durch die gute Nachweismethode von inaktiven 1-NS durch Ionenpaarchromatographie möglich ist, die Desulfonierungsraten bzw. den Einbau des Schwefels ohne aufwendige radioaktive Messungen bestimmen zu können.

3.3.1.2 Wachstum von *Sc. obliquus* mit homogen geträgerter 1-Naphthalinsulfonsäure (S-markiert)

Ebenso wurde das radioaktive Naphthalinsulfonsäuregemisch mit dem gleichen Gemisch von 84% 1-Naphthalinsulfonsäure und 16% 2-Naphthalinsulfonsäure geträgert (homogen), um die Aufnahme eines solchen Gemisches zu untersuchen.

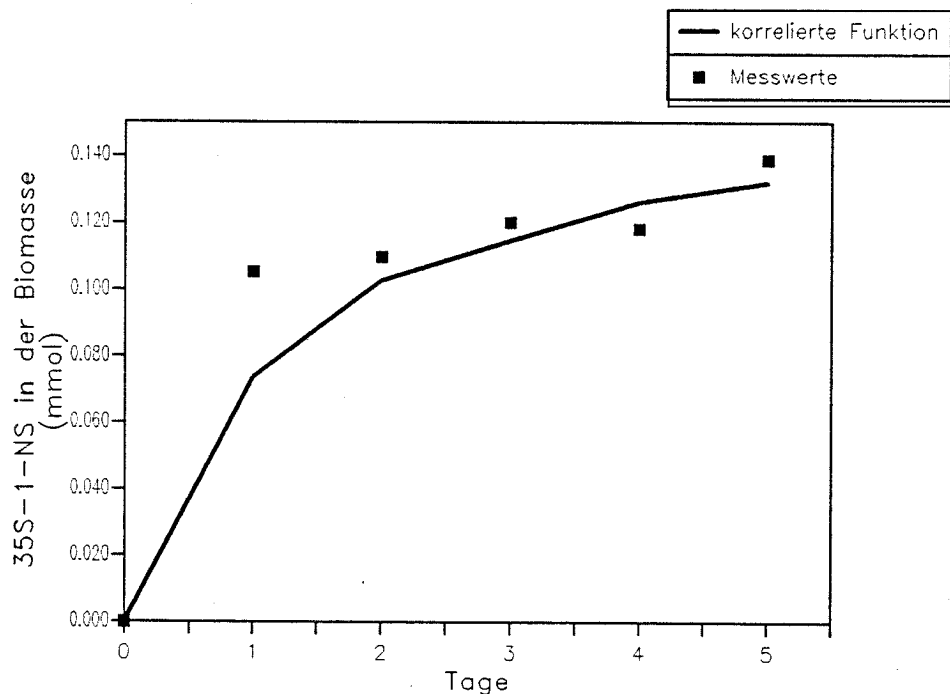


Abb. 57: Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (homogen):

Vorkultur in 1-NS-Medium

homogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure (86% 1-NS, 16% 2-NS)

Mittelwerte aus Doppelansatz

korrelierte Funktion: $y = (-0.302) + 0.0826x$ $r = 0.915$, $n = 6$

Nach dem Überimpfen der Algen von einer Vorkultur mit 1-Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle in das gleiche Medium, nahmen die Algen sofort große Mengen an Sulfonsäure auf (Abb. 57). Bei Versuchsende wurden 0.139 mM ^{35}S -1-Naphthalinsulfonsäure aufgenommen. Vergleicht man die Aufnahme der inhomogen geträgerten 1-Naphthalinsulfonsäure mit der homogen geträgerten, so wurde bei

der homogen geträgerten 1-Naphthalinsulfonsäure 57% mehr ^{35}S in die Algenbiomasse aufgenommen.

Tag	Biomasse (mg TS/l)	Zählrate dpm/l	1-NS (mg)	1-NS (mMol)	Schwefel (mg)	S in der Biomasse (%)
0	50	0	0	0	0	0
1	94	23388010	24,213	0,105	3,369	3,58
2	134	24377110	25,237	0,110	3,511	2,62
3	155	26669980	27,611	0,120	3,841	2,48
4	190	26263540	27,190	0,118	3,783	1,99
5	235	30858390	31,947	0,139	4,445	1,89

Tab. 33: Meßergebnisse der ^{35}S -markierten Sulfonsäure

Vorkultur in 1-NS-Medium

homogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure (84% 1-NS, 16% 2-NS)

Dadurch daß mehr ^{35}S in die Algen eingebaut wurde, stieg auch der prozentuale Schwefelgehalt in den Algen (Tab. 32). Der Verlauf des Schwefelgehaltes nahm aber von Versuchstag zu Versuchstag ab, wie es auch im vorherigen Versuch gezeigt wurde, so daß zu Beginn ein Schwefelgehalt von 3.58% gemessen wurde, am Ende nur 1.89%. Diese Einbauraten sind somit weitaus höher als mit inhomogen geträgerter 1-NS.

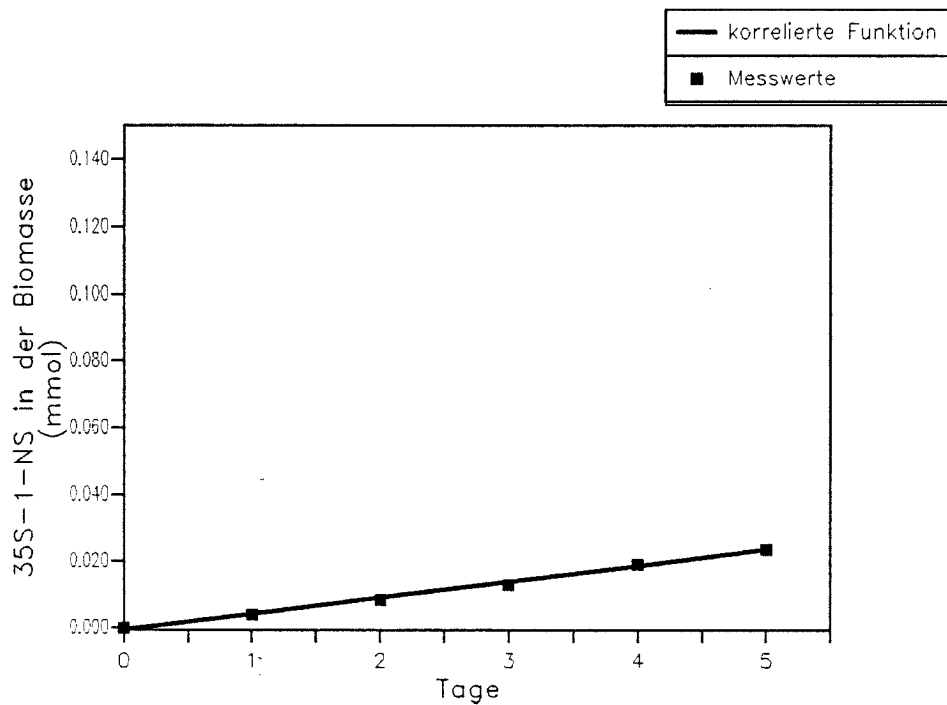


Abb. 58. Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (homogen):

Vorkultur in 0.217 mM 1-NS und 0.14 mM Sulfat-Medium

homogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure (84% 1-NS, 16% 2-NS)

Mittelwerte aus zwei Ansätzen

korrelierte Funktion: $y = (-3.89 \times 10^{-3}) + 8.38 \times 10^{-5}x$ $r = 0.95$, $n = 6$

Ein gleicher Kurvenverlauf wie bei der inhomogen geträgerten 1-Naphthalinsulfonsäure zeigte sich, wenn die homogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure zusammen mit Sulfat als Schwefelquelle den Algen angeboten wurde (Abb. 58). So nahm die Aufnahme der Sulfonsäure linear zu.

Tag	Biomasse (mg TS/l)	Zählrate dpm/l	1-NS (mg)	1-NS (mMol)	Schwefel (mg)	S in der Biomasse (%)
0	50	0	0	0	0	0
1	91	846600	0,876	0,004	0,122	0,13
2	142	1891310	1,958	0,009	0,272	0,19
3	202	2888830	2,991	0,013	0,416	0,21
4	279	4226950	4,376	0,019	0,609	0,22
5	325	5245070	5,430	0,024	0,755	0,23

Tab. 34: Meßergebnisse der ³⁵S-markierten Sulfonsäure

Vorkultur in 1-NS und Sulfat-Medium

homogen geträgerte 1-Naphthalinsulfonsäure (84% 1-NS, 16% 2-NS)

Ebenso blieb auch der Schwefelgehalt durch die lineare Schwefelaufnahme konstant auf $0.206\% \pm 0.012\%$.

Der Versuch zeigt, daß mit der homogen geträgerten 1-Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle in den Algen wesentlich mehr Schwefel gemessen wurde als mit inhomogen geträgerter 1-Naphthalinsulfonsäure. Der Verlauf der Aufnahme und der prozentuale Schwefelgehalt in der Biomasse entsprach dem vorherigen Versuchsansatz.

3.3.1.3 Wachstum von *Sc. obliquus* mit Sulfat (S-markiert)

Ebenso wie bei der 1-Naphthalinsulfonsäure sollte durch radioaktiv-markiertem ^{35}S -Sulfat nachgewiesen werden, daß die Menge an Sulfat, die aus dem Medium eliminiert wurde, sich auch tatsächlich als eingebauter Schwefel wiederfindet.

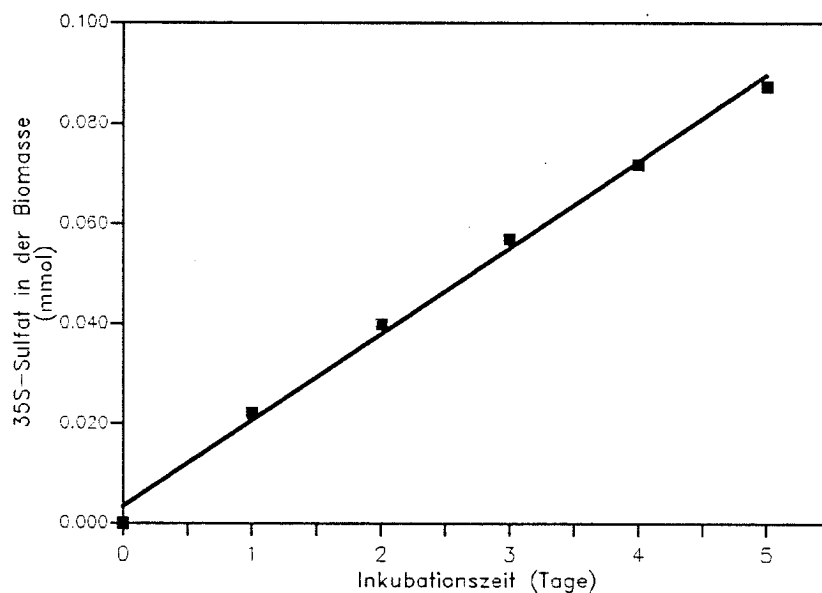


Abb. 59. Einbau von schwefel-markiertem Sulfat:

Vorkultur in N8-Medium

Mittelwerte aus Parallelansätzen

korrelierte Funktion: $y = (-0.0646) + 0.016 \log x$ $r = 0.96$, $n = 6$

Im Versuchsverlauf nahm die Konzentration von ^{35}S -Sulfat in der Biomasse zu (Abb. 59). Ebenso wie in den vorherigen Versuchen nahmen die Algen proportional zu ihrer Biomasse am Anfang mehr Sulfat auf als gegen Ende, was bedeutet, daß die Aufnahme von Sulfat konzentrationsabhängig ist.

Tag	Biomasse (mg TS/l)	Zählrate dpm/l	Sulfat (mg)	Sulfat (mMol)	Schwefel (mg)	S in der Biomasse (%)
0	50	0	0	0	0	0
1	112	1035400	2,366	0,025	0,810	0,75
2	208	1855000	4,240	0,044	1,413	0,68
3	293	2495800	5,706	0,059	1,902	0,65
4	368	3110800	7,112	0,074	2,371	0,64
5	450	3670000	8,386	0,087	2,795	0,62

Tab. 35: Einbau von ³⁵S-markiertem Sulfat in die Algenbiomasse
Vorkultur in N8-Medium

Berechnet man den prozentualen Schwefelgehalt der Algen, so zeigt es sich, daß die Algen am 1.Tag einen Schwefelgehalt von 0.75% hatten, der sich im Verlaufe des Versuches auf 0.62% erniedrigte.

Die Inkubation mit Sulfat als Schwefelquelle zeigt, daß die Geschwindigkeit ihrer Aufnahme von der Mediumskonzentration abhängig ist, wie es auch in dem Versuch 3.1.1 gezeigt wurde und somit die Befunde mit inaktivem Sulfat bestätigen.

3.3.1.4 Wachstum von *Sc. obliquus* mit C-markierter-1-Naphthalinsulfonsäure

Da bei der Desulfonierung von 1 - Naphthalinsulfonsäure das Abbauprodukt 1 - Naphthol wie auch die Sekundärmetabolite Tetralon und Naphthochinon nicht gegen die Abnahme der Sulfonsäure bilanziert werden konnte, sollte durch Einsatz von kohlenstoffmarkierter Naphthalinsulfonsäure gezeigt werden, ob der Kohlenstoffring in die Biomasse eingebaut oder an die Biomasse adsorbiert wird.

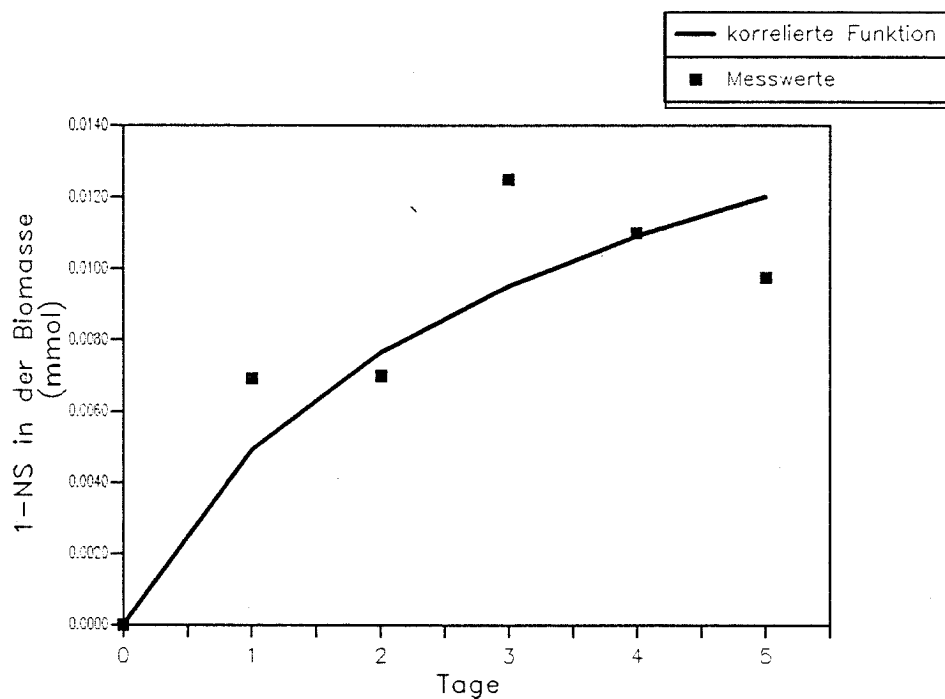


Abb. 60. Einbau von kohlenstoffmarkierter 1-NS in die Algenbiomasse:

Vorkultur in 1-NS-Medium

Mittelwerte aus zwei Ansätzen

korrelierte Funktion: $-0.0173 + (0.00487 \log x)$ ($r=0.91$, $n=6$)

Die Abbildung 60 zeigt, daß zu Beginn des Versuches der Gehalt an ^{14}C -1- Naphthalinsulfonsäure in der Biomasse sehr schnell (1. + 2. Tag) auf $7 \mu\text{M}$ Anstieg. Bis zu Ende des Versuches stieg der Gehalt langsamer auf ca. $10 \mu\text{M}$ 1 - Naphthalinsulfonsäure an. Die Zunahme des Gehaltes stimmt gut mit der Korrelation überein.

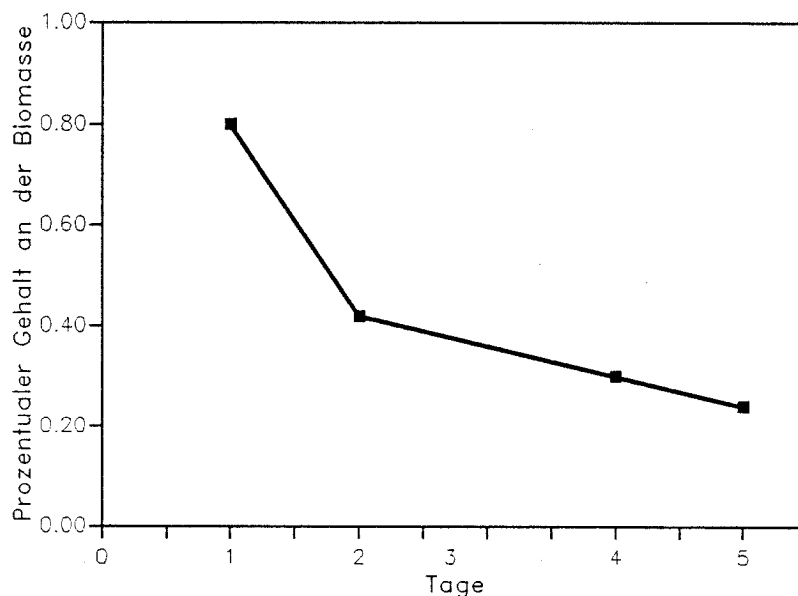


Abb. 61. Prozentualer Einbau der kohlenstoffmarkierten 1 - Naphthalinsulfonsäure in die Biomasse:

Vorkultur in 1-NS-Medium

Mittelwerte aus Parallelversuchen

korrelierte Funktion: $y = (-0.173) + 4.87 \times 10^{-3}x$ $r=0.98$, $n=6$

Tag	Biomasse (mg TS/l)	Zählrate /l	1-NS (mg)	1-NS (mMol)	Ring-C (mg)	C in der Biomasse (%)
0	41	0	0	0	0	0
1	96	3710400	1,587	0,007	0,083	0,09
2	167	3747200	1,603	0,007	0,084	0,05
3	249	6721200	2,875	0,012	0,150	0,06
4	330	5920600	2,532	0,011	0,132	0,04
5	420	5260600	2,250	0,010	0,117	0,03

Tab. 36: Meßergebnisse der ^{14}C -markierten Sulfonsäure

Vorkultur in 1-NS-Medium

Berechnet man den prozentualen Gehalt der 1 - Naphthalinsulfonsäure an der Biomasse, so zeigt sich, daß der Gehalt am Anfang 0.09% und am Ende 0.03% betrug. Dieses ist dadurch zu erklären, daß die Algen sehr viel mehr Sulfonsäure

bei niedriger Biomassekonzentration aufnahmen als bei hoher Biomasse. Dieses wurde auch durch die Versuche in Kapitel 3.1.2 und 3.3.1 bestätigt, bei der die Abnahme der 1 - Naphthalinsulfonsäure aus dem Medium bzw. die Zunahme der ^{35}S - Konzentration in der Biomasse zu Beginn deutlich höher war als gegen Ende des Versuches.

Diese Auftragung zeigt außerdem, daß keine 1 - Naphthalinsulfonsäure bzw. dessen Metabolite unspezifisch an die Biomasse adsorbiert wurde. Wäre dieses der Fall, so müßte der prozentuale Gehalt konstant sein oder zunehmen.

Bezieht man die am Ende in den Algen gefundene ^{14}C - Konzentration auf die in Kapitel 3.3.1.1 gefundene Abnahme der 1 - Naphthalinsulfonsäurekonzentration, so wurde ca. 15% der Sulfonsäure in der Biomasse zu Versuchsende gemessen.

3.3.2 Kurzzeitversuche mit radioaktiven Substanzen

Durch Kurzzeitversuche über 90 Minuten sollte die Aufnahme von 1-Naphthalinsulfonsäure und Sulfat und deren Beeinflußung durch Änderungen der Milieubedingungen untersucht werden.

Das Inoculum wurde aus dem Turbidostaten entnommen, wo den Algen zu dieser Zeit Sulfat und Sulfonsäure als Schwefelquellen zur Verfügung stand. Nach Zentrifugation und Resuspendieren in S-freiem Medium wurden die Algen 30 Minuten lang an die geänderten Milieubedingungen adaptiert, bevor die radioaktiven Substanzen zugegeben wurden.

3.3.2.1 Aufnahmekinetik für Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure

Um die Aufnahmegeschwindigkeit von Sulfat und 1- Naphthalinsulfonsäure durch die Algen festzustellen, wurden beide ^{35}S -Tracertests über einen Zeitraum von 90 Minuten durchgeführt.

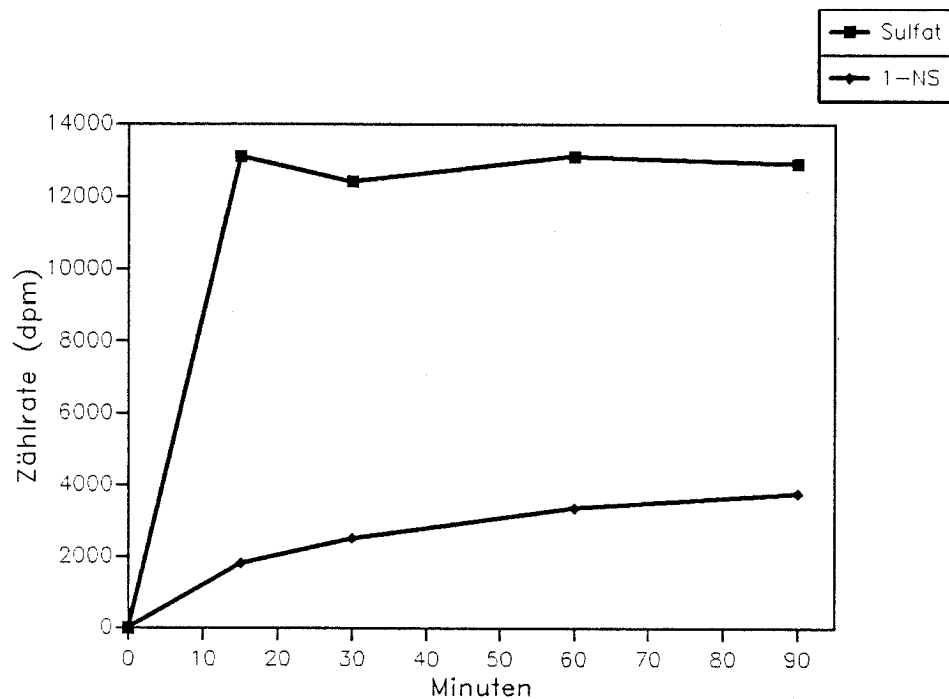


Abb. 62. Aufnahme von Sulfat und Sulfonat in Abhängigkeit von der Zeit:

Inkubationszeit für Sulfat: 90 Minuten

Inkubationszeit für Sulfonsäure: 90 Minuten

Unter den gegebenen Bedingungen erfolgte in den ersten Minuten eine intensive Sulfataufnahme bis zu einem Wert, der im Rahmen der Fehlerbreite während der restlichen Inkubationszeit konstant blieb.

Dagegen wurde die 1 - Naphthalinsulfonsäure deutlich langsamer aufgenommen als das Sulfat. In den ersten 10 Minuten wurde 1 - NS relativ schnell aufgenommen; dann aber wurde die Aufnahme geringer und näherte sich am Ende des Versuches dem Equilibrium an.

Da die Aufnahme des Sulfates und der Sulfonsäure nach 90 Minuten equilibriert war, kann man aus den vorhandenen Daten die Anreicherung der Substanzen in den Algenzellen errechnen. Eine höhere Konzentration der Substanzen in den Algen als im Medium kann nur durch Aufbringen von Energie bewerkstelligt werden.

Die Anreicherung wurde wie folgt berechnet:

Resultate

$$\text{Anreicherung im Medium} = C_0 \mu M \frac{(A_{in} \times V_{ex})}{(A_{ex} \times V_{in})}$$

C_0 = Eingesetzte Konzentration

A_{in} = Aktivität in DPM in den Algen

A_{ex} = Aktivität in DPM im Medium

V_{in} = Zellvolumen der Algen

V_{ex} = Inkubationsvolumen

Das Zellvolumen wurde nach Senger (1970) berechnet, der für *Scenedesmus obliquus* bei einer Biomasse von 150 mg TS /l ein Packed Cell Volume (PCV) von 750 μ l ermittelte. Da der Ansatz 2 mg TS Algen enthielt, ergab sich ein PCV von 1 μ l . Der Gesamtansatz war 10 ml. Als Gesamtaktivität im Ansatz waren im SO_4 - Medium 466963 DPM und im 1 - Naphthalinsulfonsäure - Medium 236992 DPM enthalten.

So wurde 41.84 mM Sulfat und 68 mM 1-Naphthalinsulfonsäure innerhalb des Zeitraumes in den Algen angereichert.

Ebenso konnten Biedlingmeier und Schmidt (1987) die Energieaufnahme von Ethensulfonat bei *Chlorella fusca* nachweisen, wobei sie die Aufnahme durch die Inhibitoren CCCP und 2,4 DNP hemmten.

Durch die Kurzzeitinkubation konnte gezeigt werden, daß die Algen unter den gegebenen Bedingungen Sulfat wesentlich schneller aufnahmen als die 1-Naphthalinsulfonsäure, und daß diese Aufnahme durch die hohe Anreicherung der Substanzen in der Zelle energieabhängig sein muß.

3.3.2.2 Zur pH-Abhängigkeit der Aufnahme von Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure

Sulfat und 1 - Naphthalinsulfonsäure wurden bei verschiedenen pH - Werten inkubiert, um festzustellen, bei welchem pH - Wert Sulfat wie Sulfonsäure maximal aufgenommen wird.

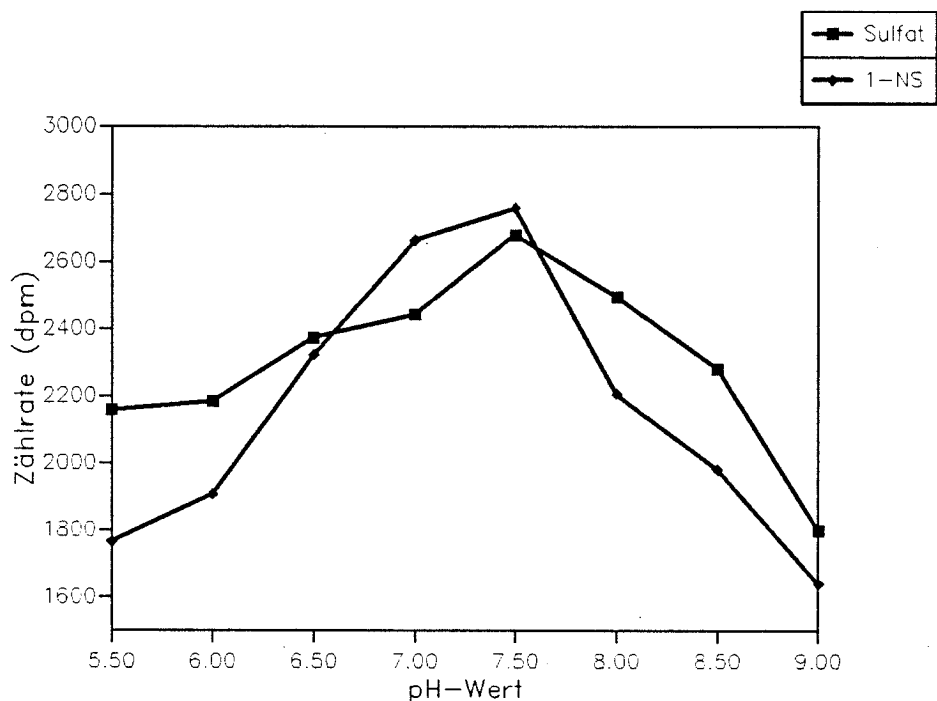


Abb. 63. pH-abhängige Aufnahme von Sulfat und Sulfonsäure:

Inkubationszeit für Sulfat: 2 Minuten
 Inkubationszeit für 1-Naphthalinsulfonsäure: 10 Minuten

Die Abbildung zeigt, daß die Sulfataufnahme der Algen nach 2 Minuten Inkubationsdauer bei pH 7.5 am höchsten war, wobei die Aufnahme zwischen pH 5.5 bis pH 7.5 nicht stetig anstieg. Denn zwischen pH 6.5 und pH 7.5 flachte der Kurvenverlauf der Abnahme ab. Dieser Verlauf der Aufnahme der Sulfataufnahme wurde auch für *Anstostodemus braunii* von Ullrich - Eberius (1975) beschrieben. Die verminderte Aufnahme zwischen pH 6.5 und 7.0 wurde dort darauf zurückgeführt, daß es zwei Aufnahmesysteme mit unterschiedlichen pH - Optima geben muß. Dieses könnte auch für *Scenedesmus obliquus* zutreffen.

Ebenso wie Sulfat nahmen die Algen 1-Naphthalinsulfonsäure bei dem pH 7.5 mit der höchsten Rate auf. Aus dem Verlauf der Aufnahme war eine stetige Steigerung und Minderung der Aufnahme zu erkennen. Wie es bei der Sulfataufnahme gemessen wurde, war die Aufnahme bei pH 9.0 geringer als bei pH 5.5. Dieser Kurvenverlauf induziert, daß die Sulfonsäure nur von dem einem Aufnahmesystem aufgenommen worden sein könnte. Ebenso konnten Biedlingmaier und Schmidt

(1987) bei der Inkubation von Ethensulfonat bei *Chlorella fusca* eine pH - Wert abhängige Aufnahme mit Maxima um pH 7.8 feststellen.

Die Aufnahme von Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure erwies sich als abhängig vom pH-Wert. Das Aufnahmeoptimum für beide Substanzen lag bei pH 7.5.

3.3.2.3 Aufnahme von Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure in Na- und K-freiem Medium

Da der Transport eines Anions in die Algenzelle häufig an einen gleichzeitigen Cotransport eines Kations gebunden ist (Lehninger, 1979), sollte eine deutlich geringere Aufnahme rate des Sulfates in Na⁺ bzw. K⁺ freien Medium zu verzeichnen sein, wenn eines der beiden Ionen, das zum Cotransport benutzt wird, fehlt.

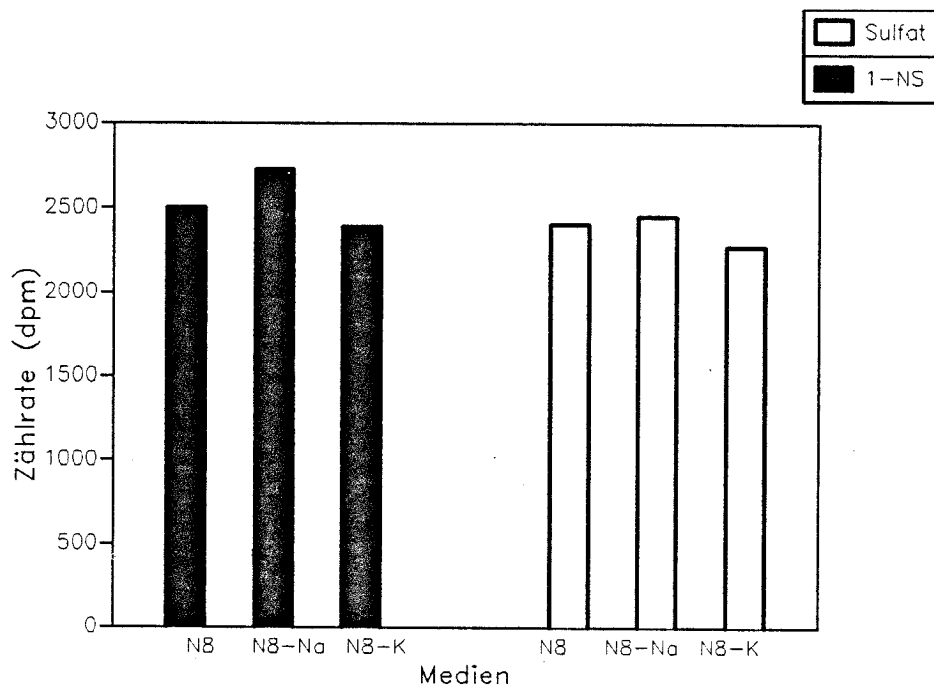


Abb. 64. Sulfat- und Sulfonsäureaufnahme in Na bzw. K-freiem Medium:

Inkubationszeit für Sulfat: 2 Minuten

Inkubationszeit für 1-Naphthalinsulfonsäure: 10 Minuten

Die Abwesenheit von Na^+ bzw. K^+ -Ionen verursacht weder bei der Sulfat-, noch bei der Sulfonsäureaufnahme signifikante Unterschiede. So nahm bei Na-freiem Medium die Sulfataufnahme um 2% und die Sulfonsäureaufnahme um 8% zu, während die Sulfataufnahme sich bei K-freiem Medium um 5% und die Sulfonsäureaufnahme um 4% reduzierte.

Dies läßt den Schluß zu, daß beide Kationen bei der Aufnahme von Sulfat bzw. 1-Naphthalinsulfonsäure unter diesen Versuchsbedingungen keinen wesentlichen Einfluß ausüben, so daß diese zum Cotransport in die Zelle nicht nötig sind.

3.3.2.4 Aufnahme von Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure in Anwesenheit von Valinomycin

Das Antibiotikum Valinomycin ist ein Ionophor (Lehninger, 1979), welches aufgrund seines geringen Molekulargewichtes und seines hydrophoben Äußeren leicht in die Zellmembran eingebaut wird, und eine sehr große Affinität zu K^+ Ionen besitzt. Bei Einbau in die Zellmembran bewirkt das Antibiotikum bei Anwesenheit von K^+ Ionen im Medium den Zusammenbruch des Membranpotentials durch den Ladungsausgleich, während bei K^+ -freiem Medium das Potential erhöht wird, weil die K^+ -Ionen aus der Zelle ausgeschleust werden.

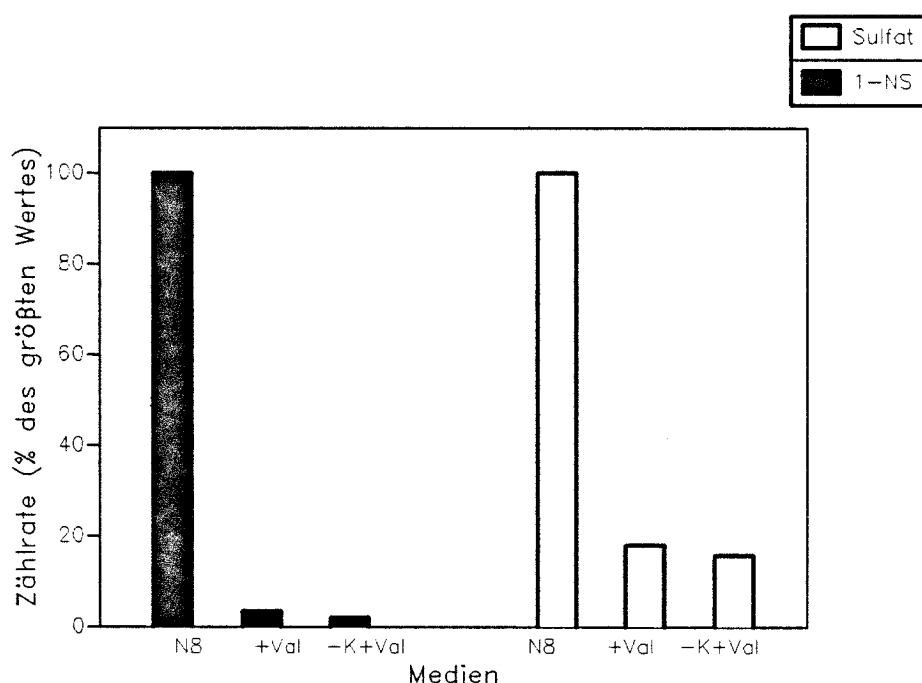


Abb. 65. Sulfat- und Sulfonsäureaufnahme in valinomycinhaltigem Medium:

Inkubationszeit für Sulfat: 2 Minuten
 Inkubationszeit für 1-Naphthalinsulfonsäure: 10 Minuten

In Anwesenheit von Valinomycin zum Medium wurde sowohl die Aufnahme von Sulfat als auch von Sulfonsäure extrem eingeschränkt (Abb. 65), wobei ein stärkerer Effekt auf die Sulfonsäureaufnahme beobachtet wurde. So wurde bei Zellmembranpotentialerniedrigung nur noch 18% Sulfat und 3.4% 1-Naphthalinsulfonsäure aufgenommen, während die Potentialerhöhung noch zu

einer weiteren Reduktion auf 15.6% bei Sulfat und 2% bei der 1-Naphthalinsulfonsäure führte.

Der Versuch zeigt, daß die Aufnahme von Sulfat und Sulfonsäure an das Membranpotential gebunden ist, da sich durch Verschieben des Potentials die Aufnahme hemmen läßt.

3.4 Versuche mit Zellrohextrakt

Durch die Versuche mit Zellrohextrakt sollte die enzymatische Desulfonierung der 1-Naphthalinsulfonsäure im in-vitro-System untersucht werden.

Dabei sollte zum einen die Haltbarkeit, Temperaturoptimum des Zellrohextraktes und der Einfluß der Cofaktoren bestimmt werden, zum anderen die Kinetiken der Desulfonierung.

Da in den vorherigen Versuchen (Kap. 3.3.1) gezeigt werden konnte, daß die Algen ohne Adaptation die 1-Naphthalinsulfonsäure desulfonieren können, wurden zur Durchführung dieser Versuche die Algen in Batchkulturen mit Sulfat als Schwefelquelle angezogen. Bei Erreichen der Kulturdichte, bei der Limitierungen der Nährstoffe eintreten konnten, wurden die Algen abgeerntet und wie in Kap. 2.11 beschrieben aufgearbeitet.

3.4.1 Haltbarkeit des Zellrohextraktes

Da eine sehr wichtige Frage die Haltbarkeit des Zellrohextraktes ist, wurde der Zellrohextrakt bei Kühltemperatur (7 °C) und im Gefrierschrank (-4°C) aufbewahrt und jeden Tag dessen Aktivität (Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure in 10 Minuten) überprüft.

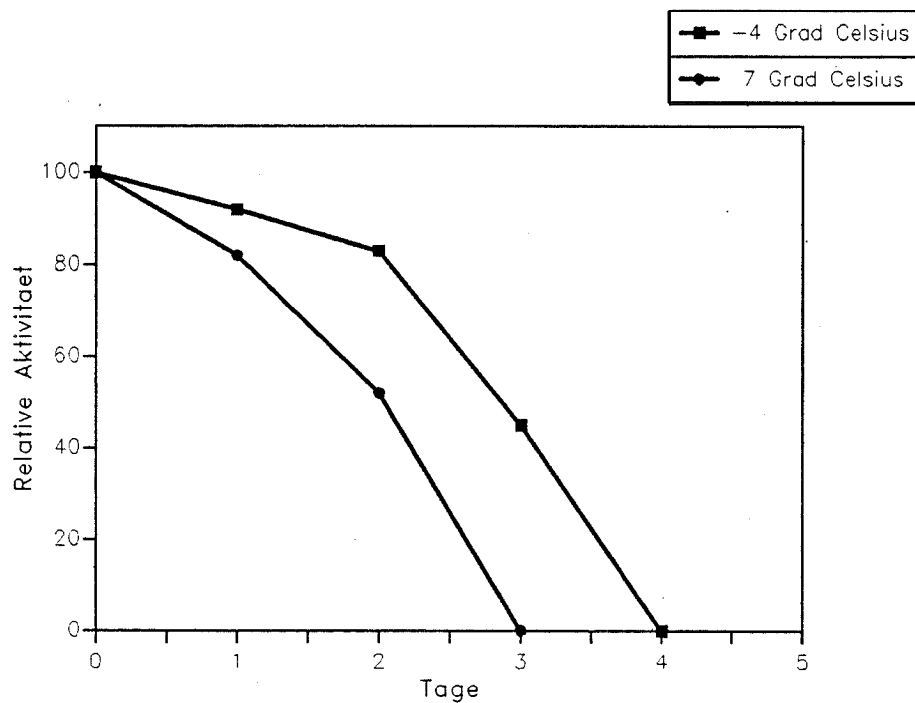


Abb. 66. Haltbarkeit des Rohextraktes bei verschiedenen Temperaturen:

Inkubationsdauer: 10 Minuten

Inkubationstemperatur: 30°C

Meßung der Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure

Die Abbildung zeigt, daß mit zunehmender Aufbewahrungsdauer der Zellrohextrakt an Aktivität verlor. So konnte bei Raumtemperatur (7°C) nach 3 Tagen keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Bei Einfrieren des Zellextraktes blieb die Aktivität einen Tag länger erhalten.

3.4.2 Reinigung des Zellrohextraktes

Durch die Reinigung des Zellrohextraktes bis zur Ausschlußchromatographie sollte gezeigt werden, daß die Aktivität im Zellextrakt nicht unspezifisch durch Adsorption an die Zellwandbestandteile oder durch Oligopeptide katalysiert werden, sondern durch Enzyme mit einem Molekulargewicht über 5000 Dalton.

Es wurden folgende Schritte zur Reinigung vorgenommen:

1. Zellaufschluß
2. Zentrifugation bei 10000g (30 min)
Abtrennung der Zellwandtrümmer
3. Zentrifugation bei 100000g (60 min)
Abtrennung der Zellorganellen
4. Fraktioniertes Aussalzen der Proteine mit Ammoniumsulfat (30%, 60%, 90%)
5. Ausschlußchromatographie (MG > 5000)

Nach jedem Schritt wurde die Aktivität (entstandenes Sulfat in mM) gemessen und der Proteingehalt bestimmt, so daß die spezifische Aktivität, d.h. die Aktivität pro mg/l Protein und Minuten, errechnet werden konnte.

Reinigungsschritte	Proteingehalt	mM Sulfat	spez. Aktivität	% spez.Aktivität
1. nach Zellaufschluß	251 mg/l	0.06	2.39×10^{-5}	1.00
2. nach 1.Zentrifugation	71 mg/l	0.065	9.15×10^{-5}	3.82
3. nach 2.Zentrifugation	10 mg/l	0.035	3.50×10^{-4}	14.64
4. nach Aussalzung (60%)	35 mg/l	0.205	5.85×10^{-4}	24.47
5. nach Ausschlußchromatographie	10 mg/l	0.035	3.50×10^{-3}	50.62

Tab. 37: Aktivität des Zellrohextraktes nach der Reinigung des Zellextraktes

In den ersten 3 Schritten nahm der Proteingehalt deutlich ab, was darauf zurückzuführen war, daß sich die Zellwandtrümmer und die Zellorganellen durch diese Färbung auch angefärbt wurden, aber keinen Einfluß auf die Desulfonierung hatten, da nach der Abtrennung der Bestandteile die spezifische Aktivität von 2.39

$\times 10^{-5}$ mM Sulfat auf 3.5×10^{-4} mM anstieg. Nach dem fraktioniertem Aussalzen der Proteine wurde in der 60% Fraktion die höchste Aktivität gefunden (Abb. 67).

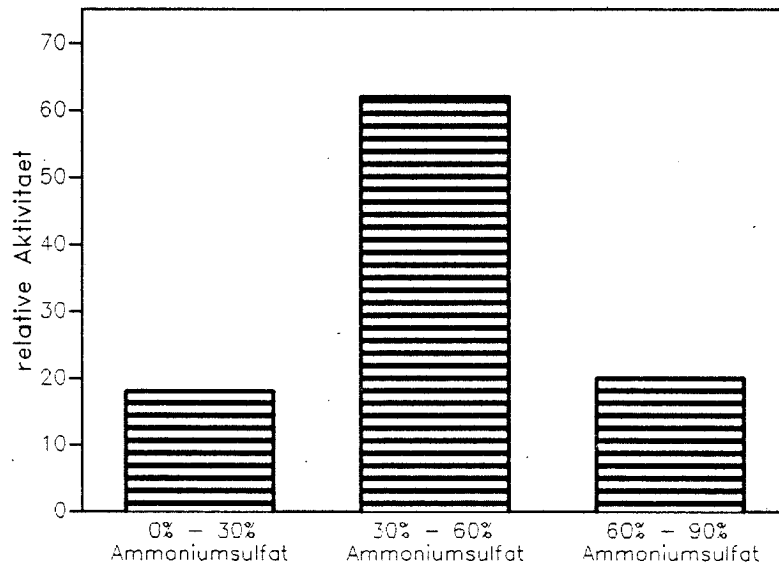


Abb. 67. Aktivitätsverteilung in den ausgesalzten Proteinfractionen

Gab man diese 60% Fraktion auf die Ausschlußchromatographiesäule, die Moleküle über 5000 MG ausschloß, zeigte sich, daß die spez. Aktivität weiter zunahm. Dadurch, daß man Moleküle unterhalb von 5000 MG durch die Chromatographie in der Säule zurückgehalten hatte, kann man davon ausgehen, daß nicht die Oligopeptide die Reaktion katalysieren, sondern Enzyme.

Durch die Reinigung des Zellextraktes konnte festgestellt werden, daß weder Zellwandbestandteile noch Oligopeptide die Desulfonierung von 1-Naphthalinsulfonsäure katalysieren, sondern Enzyme, wobei die spezifische Aktivität mit jedem Reinigungsschritt zunahm.

3.4.3 Temperaturabhängigkeit der Desulfonierung

Der Rohextrakt wurde bei verschiedenen Temperaturen von 5°C bis 40°C inkubiert, um das Temperaturoptimum der Aktivität des Rohextraktes festzustellen.

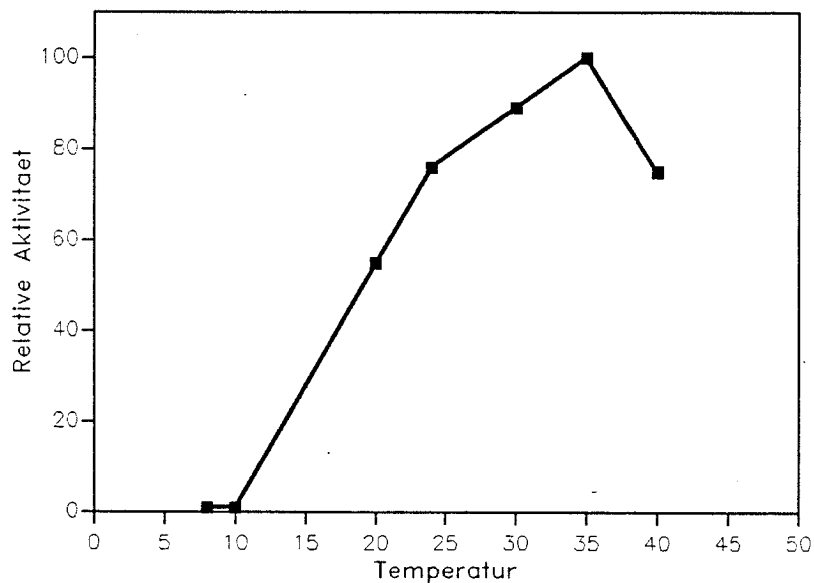


Abb. 68. Temperaturabhängigkeit der Desulfonierung:

Inkubationsdauer: 10 Minuten

Meßung der Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure

Unter diesen Bedingungen lag das Temperaturoptimum bei 35°C (Abb. 68). Während bei Temperaturen unterhalb von 10°C kaum Aktivität gefunden wurde, stieg die Aktivität mit zunehmender Temperatur, bis sie bei 35°C ihr Optimum erreichte. Oberhalb von 35°C nahm die Aktivität wieder ab, was auf die Inaktivierung bzw. Denaturierung der Komponenten des Rohextraktes schließen läßt.

Vergleicht man das Temperaturoptimum des Rohextraktes mit dem Temperaturoptimum für das Wachstum von *Scenedesmus obliquus* (Hegewald, 1982), ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung.

3.4.4 Einfluß der 1-NS-Konzentration und des Proteingehaltes auf die enzymatische Desulfonierung

Durch Variieren der 1-Naphthalinsulfonsäurekonzentration und des Proteingehaltes sollte deren Einfluß auf die Desulfonierung untersucht werden.

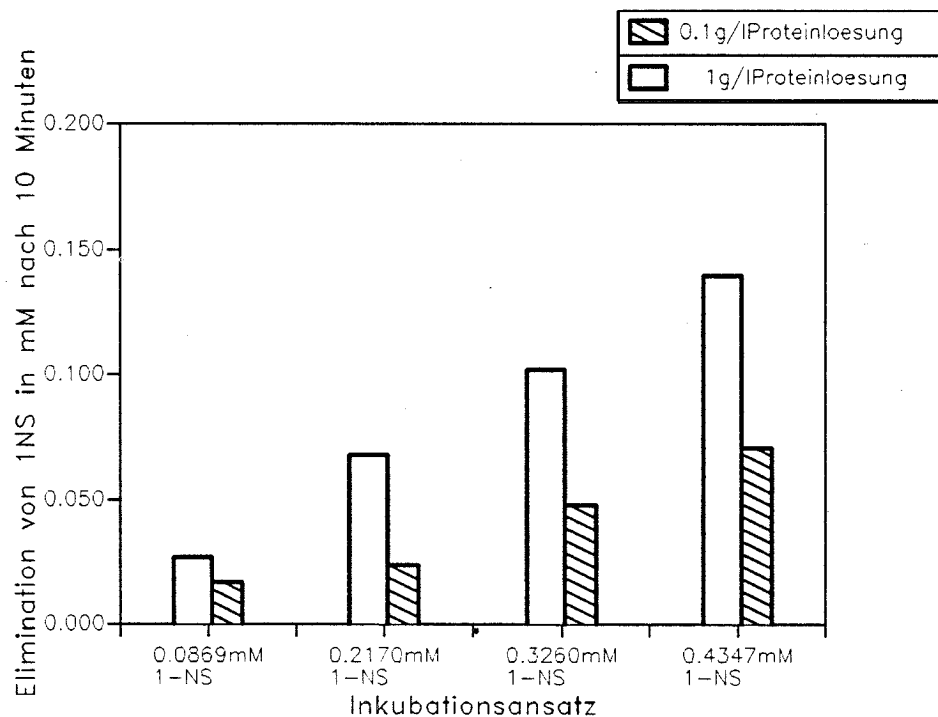


Abb. 69. Einfluß des 1-NS-Konzentration und des Proteingehaltes auf die Desulfonierung:

Inkubationsdauer: 10 Minuten

Inkubationstemperatur: 30°C

Meßung der 1-Naphthalinsulfonsäurekonzentration

Mit zunehmender 1-Naphthalinsulfonsäurekonzentration im Ansatz erhöhte sich auch die Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure (Abb. 69). Ebenso führte die Erhöhung des Proteingehaltes zu einer deutlichen Steigerung. So erhöhte sich in den Ansätzen mit 0.1 g/l Protein die Sulfonsäureelimination von 0.0198 mM 1-NS auf 0.0706 mM mit steigender Sulfonsäurekonzentration. Während in den Ansätzen mit 1 g/l Protein bei 0.0869 mM 1-NS mit 0.0205 mM nahezu gleiche Abnahmen gemessen wurden, nahm die Elimination der Sulfonsäure mit steigender Konzen-

tration deutlicher zu als mit 0.1 g/l Protein und erreichte bei 0.434 mM 1-NS mit 0.139 mM fast eine Verdopplung der Abnahme.

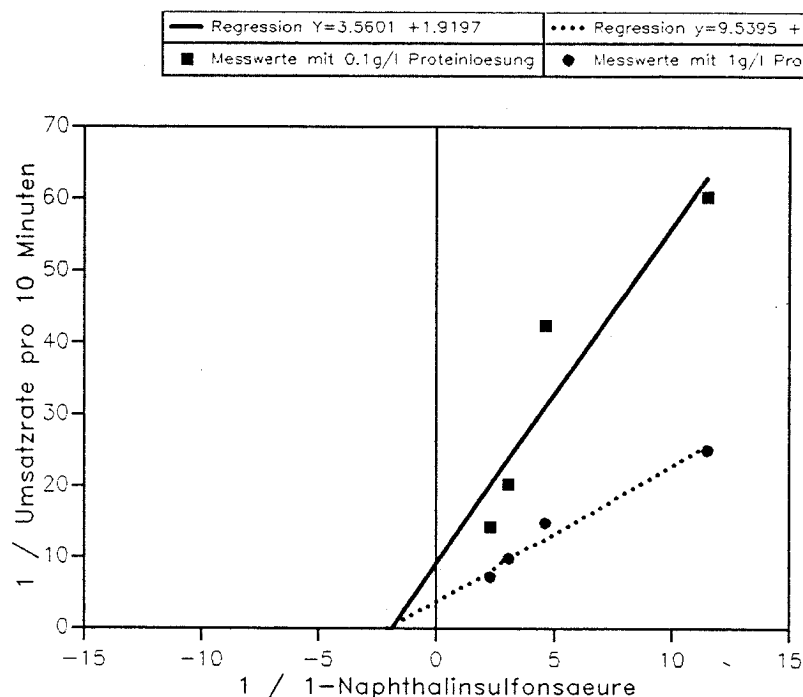


Abb. 70. Lineweaver-Burk-Auftragung zur Bestimmung von K_m und V_{max} :

Inkubationsdauer: 10 Minuten

Inkubationstemperatur: 30°C

Proteingehalt : 0.1g/l

Berechnet man aus den Ansätzen nach Lineweaver-Burk den K_m -Wert und die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion V_{max} , so wurde in beiden Ansatzreihen ein K_m -Wert von 0.51 mM ermittelt (Abb. 70). Bei der Umsatzgeschwindigkeit zeigte sich, daß mit einem höheren Proteingehalt auch ein schnellerer Umsatz erzielt wurde, der aber nur 1.8-fach höher war bei 10-fach höherem Proteingehalt.

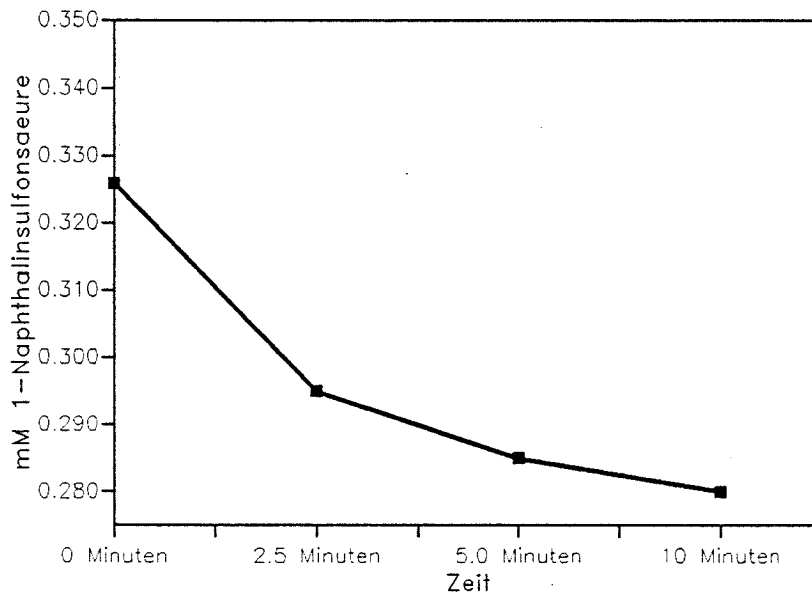


Abb. 71. Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäurekonzentration bei 0.326 mM 1-Naphthalinsulfonsäure:

Inkubationsdauer: 10 Minuten

Inkubationstemperatur: 30°C

Proteingehalt : 0.1g/l

Mißt man über den Inkubationszeitraum von 10 Minuten die Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure, so nahm diese in den ersten 2.5 Minuten am stärksten von 0.326 mM auf 0.295 mM ab (Abb. 71). In den weiteren 7.5 Minuten verlangsamte sich die Abnahme, so daß zu Versuchsende eine Restkonzentration von 0.281 mM gemessen wurde. Insgesamt war die Gesamtabnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure 0.045 mM, was 38% der eingesetzten Menge entsprach.

Die Versuchsansätze zeigen, daß die enzymatische Desulfonierung der 1-Naphthalinsulfonsäure von ihrer Konzentration und des Proteingehaltes abhing.

3.4.5 Sulfitbildung aus der enzymatischen Desulfonierung

Da aus der Desulfonierungsreaktion von 1-NS 1-Naphthol entsteht (Soeder et al., 1987), lag die Vermutung nahe, daß als schwefelhaltiges Produkt Sulfit entstehen mußte, wie es von Endo et al. (1977) als Reaktionsprodukt bei Abbau von Benzoesulfonat nachweisen konnten.

Der Nachweis von Sulfit wurde sowohl mit der colorimetrischen Methode nach Grant (1942), als auch durch Austreiben und Meßung von radioaktiven Sulfit bei Inkubation von ^{35}S -markierter 1-Naphthalinsulfonsäure nach Schwenn und Schriek (1987) durchgeführt.

Mit beiden Methoden konnte Sulfit als Produkt der Desulfonierungsreaktion nachgewiesen werden.

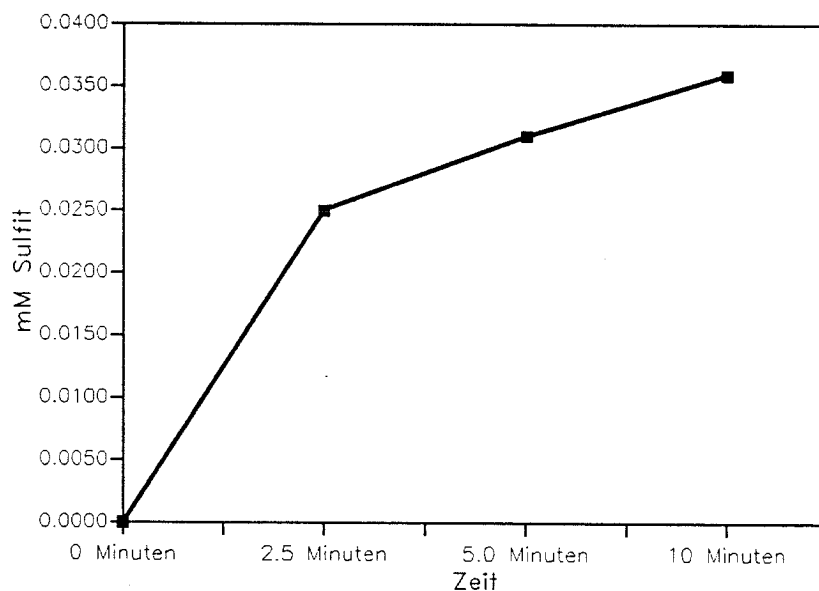


Abb. 72. Sulfitbildung aus der Desulfonierung:

Inkubationsdauer: 10 Minuten

Inkubationstemperatur: 30°C

Proteingehalt : 0.1g/l

Konzentration an 1-NS : 0.326 mM

Inkubiert man die 1-Naphthalinsulfonsäure mit dem Zellextrakt 10 Minuten lang, so wurde am Anfang eine deutliche Sulfitkonzentrationszunahme von 0 auf 0.025 mM Sulfit nachgewiesen, welche sich in den nächsten 7.5 Minuten nur noch auf 0.0359 mM erhöhte.

Vergleicht man die Zunahme an Sulfit mit der Abnahme an 1-Naphthalinsulfonsäure, so verhalten sich diese reziprok, d.h., es wurde anfangs sehr schnell Sulfit gebildet wie 1-NS abnahm. Zu Versuchsende verlangsamte sich die Reaktion.

Neben 1-Naphthol wurde Sulfit als zweites Abbauprodukt bei der Desulfonierung gefunden, der Verlauf der Sulfitbildung verhielt sich reziprok zur 1-Naphthalinsulfonsäureabnahme.

3.4.6 Einfluß von Cofaktoren auf die enzymatische Desulfonierung

Es wurden verschiedene Cofaktoren dem Rohextrakt zugefügt, um festzustellen, inwieweit diese die enzymatische Desulfonierung steigern konnten. Unter diesen befanden sich Wasserstoffdonatoren wie -akzeptoren, die bei Anabolismus wie Katabolismus eine bedeutende Rolle spielen.

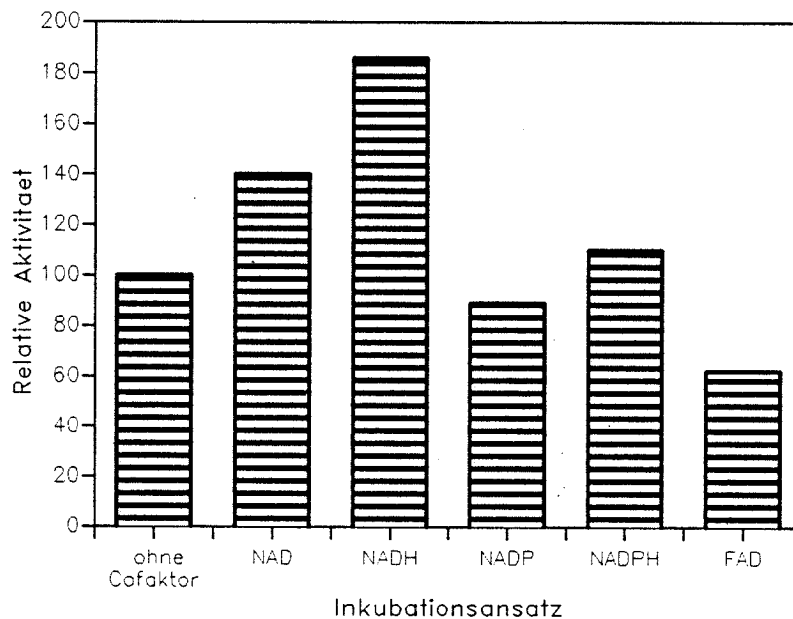


Abb. 73. Einfluß der Cofaktoren auf die Desulfonierung:

Inkubationsdauer: 10 Minuten
 Inkubationstemperatur: 30°C
 Konzentration an Cofaktoren: 1mM
 Proteingehalt : 0.1g/l
 Konzentration an 1-NS: 0.326 mM

Die Zugaben der Cofaktoren zeigen unterschiedliche Einflüsse auf die Reaktion der Desulfonierung, wobei der Ansatz ohne Cofaktor als Standard gleich 100% gesetzt wurde (Abb. 73). Die Zugabe von NAD und NADH zeigten deutliche Steigerungen bei der Umsetzung des 1-NS, wobei NADH mit 185% noch höher lag als NAD mit 138%. Dagegen hatten NADP und NADPH keinen Einfluß auf die Reaktion, da mit NADP nur 93% und mit NADPH nur 110% gemessen wurde, was keinen signifikanten Unterschied zum Standard ohne Cofaktoren war. FAD dagegen hemmte offensichtlich die enzymatische Reaktion, da nur noch 70% der Ausgangsaktivität gemessen wurde.

Durch die Addition verschiedener Cofaktoren wird deutlich, daß NADH der Cofaktor ist, der die enzymatische Reaktion unterstützt, wenn nicht sogar notwen-

dig ist, wenn bei weiterer Aufreinigung des Rohextraktes NADH sich nicht mehr in der Enzymfraktion befindet.

3.4.7 Sulfatbildung als Sekundärmetabolit der Desulfonierung

Da die Inkubation der Desulfonierung mit Zellrohexrakt in offenen Gefäßen stattfand, wodurch ausreichend Sauerstoff in der wässrigen Phase gelöst wurde bzw. durch Schütteln zusätzlich eingebracht wurde, sollte die Bildung des Sulfates als Sekundärprodukt aus dem Sulfit aufgezeichnet werden. Da die Sulfatbildung anhängt von der Konzentration des sich im Medium gelösten Sulfits, wurden auch zwei Ansätzen NAD bzw. NADH zugefügt.

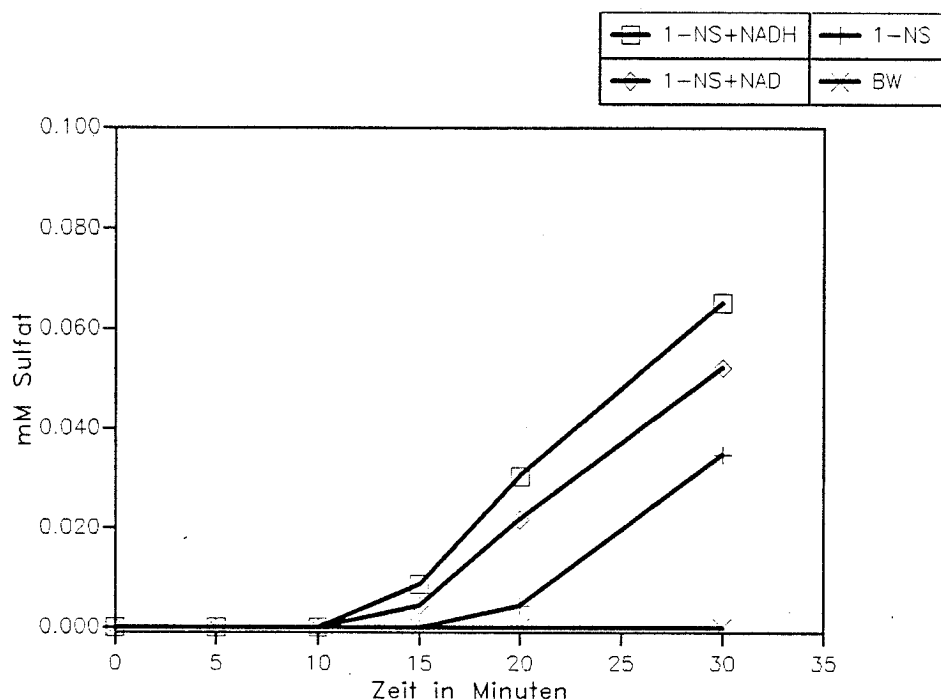


Abb. 74. Sulfatbildung aus der Desulfonierung:

Inkubationsdauer: 10 Minuten

Inkubationstemperatur: 30°C

Konzentration der Cofaktoren: 1 mM

Proteingehalt : 0.1g/l

Konzentration an 1-NS: 0.326 mM

Die Abbildung zeigt, daß in den ersten 10 Minuten der Inkubation kein Sulfat gebildet wurde. Dannach stieg die Sulfatkonzentration, so daß am Ende nach 30 Minuten 0.0330 mM Sulfat in dem Ansatz ohne Cofaktoren (Ansatz: 1-NS) gemessen wurde. Da durch die Cofaktoren die Desulfonierung gesteigert wurde (siehe Kap. 3.4.6) und somit auch mehr Sulfit entstehen mußte, konnte in den zwei anderen Ansätzen mit NAD und NADH auch mehr Sulfat gefunden werden. Das Mehr an Sulfat von 40% für den Ansatz mit NAD und 70% für den Ansatz mit NADH entsprach dem, was als Steigerung durch die Cofaktoren gemessen wurde. (siehe Kap. 3.4.6). Da beim Blindwert, d.h. Rohextrakt mit H₂O, kein Sulfat gemessen wurde, kann man ausschließen, daß Sulfat nicht als direktes Produkt der Desulfonierung entstanden sein konnte.

3.5 Abbauprodukte von 1-Naphthalinsulfonsäure

In der Veröffentlichung Soeder et al. (1987) wurde 1-Naphthol als eines der Abbauprodukte aus der Desulfonierung der 1-Naphthalinsulfonsäure bei in-vivo-Kultivierung gefunden. Da die Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure nicht gegen die Zunahme des 1-Naphthols bilanziert werden konnte, gab es zwei Überlegungen für die weitere Identifizierung weiterer Abbauprodukte:

1. 1-Naphthol wird weiter oxidiert zu anderen Produkten, wie es von Lamberton u. Claeys (1968) beschrieben wurde. Ebenso konnten Luther u. Soeder (1987) nachweisen, daß 1-Naphthol bei der Inkubation in H₂O und N8-Medium nach 5 Tagen nur noch zu 50% bzw. 18% wiedergefunden wurde.
2. Es gibt neben 1-Naphthol noch andere Produkte aus einem anderen Abbauweg. Knackmuss und Mitarbeiter (Brilon et. al., 1983) fanden als Desulfonierungsprodukt 1,2-cis-dihydroxynaphthalindiol bei Abbau von 1- bzw. 2-Naphthalinsulfonsäure durch das Bakterium *Pseudomonas ssp.*. Cerniglia (1980) zeigte, daß Eukaryonten wie Mikroalgen Naphthalin zu 1,2-trans-dihydroxynaphthalindiol oxidieren können.

Das Problem beim Auffinden solcher Substanzen war, daß Algen verschiedenste organische Substanzen exkretieren, die als gelöste organische Substanzen (DOC) in hoher Konzentration gemessen werden können (Goebel, 1987; Fingerhut, 1985). Die folgenden beiden Diagramme verdeutlichen diese Problematik:

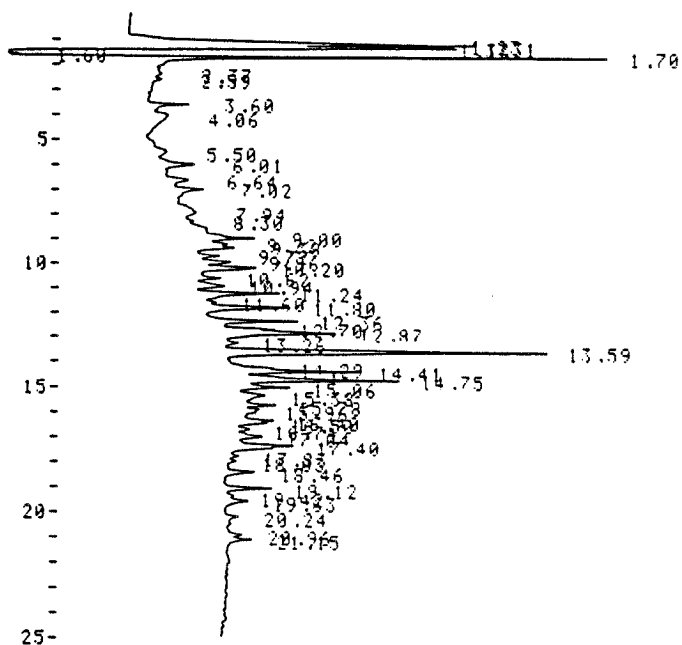


Abb. 75. HPLC-Diagramm der niedermolekularen gelösten organischen Substanzen einer Kultursuspension aus dem Turbidostaten:

Porengröße des Filters: 0.2µm

Wellenlänge: 254nm

Biomassekonzentration im Fermenter: 262mg TS/l

Schwefelquelle: Sulfat

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

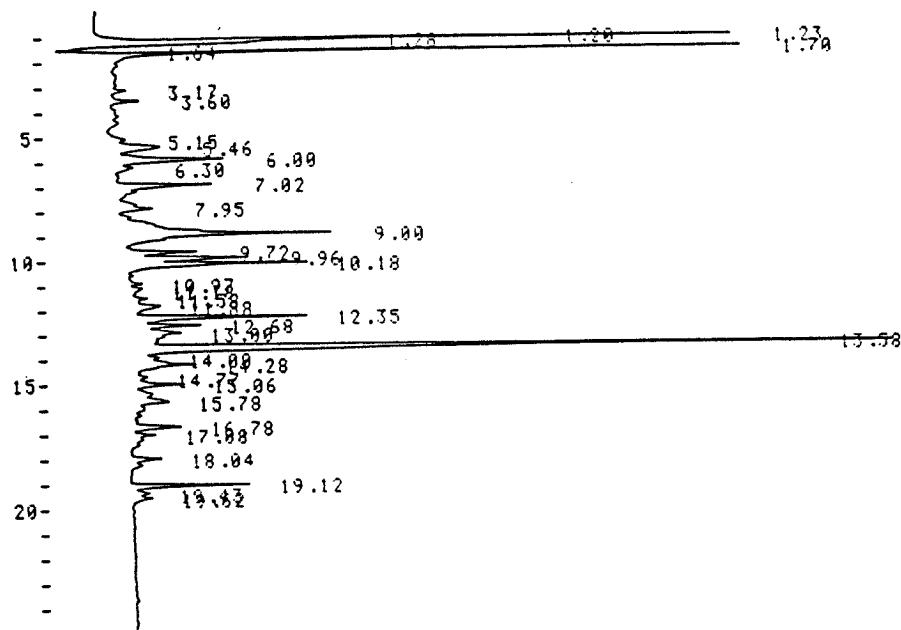


Abb. 76. HPLC-Diagramm der niedermolekularen gelösten organischen Substanzen einer Kultursuspension aus dem Turbidostaten:

Porengröße des Filters: 0.2 μm

Wellenlänge: 280nm

Biomassekonzentration im Fermenter: 262mg TS/l

Schwefelquelle: Sulfat

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

Aus dem Diagramm ist zu sehen, daß sich in der Kultursuspension eine Vielzahl von Substanzen befanden, die bei den Wellenlängenbereichen 254nm und 280nm detektiert werden konnten. Bei diesen Wellenlängen werden aufgrund ihrer guten Lichtabsorptionsfähigkeit aromatische Verbindungen detektiert.

Deshalb wurden für die Aufklärung der weiteren Abbauprodukte Referenzsubstanzen eingesetzt, anhand deren die Identifikation aufgrund der dann bekannten Retentionszeiten und Spektren möglich wurde.

3.5.1 Referenzsubstanzen

Von den Referenzsubstanzen war einzig 1-Naphthol käuflich erwerbbar. Die Substanzen 1,2-cis-dihydroxynaphthalindiol, 1,2- trans-dihydroxynaphthalindiol, 1-Hydroxy-4-Tertalon wurde von Herrn Prof. Cerniglia zur Verfügung gestellt. 1-Naphthalinsulfonsäure und 1,4- Naphthochinon wurden von Herrn Prof. Kneifel synthetisiert.

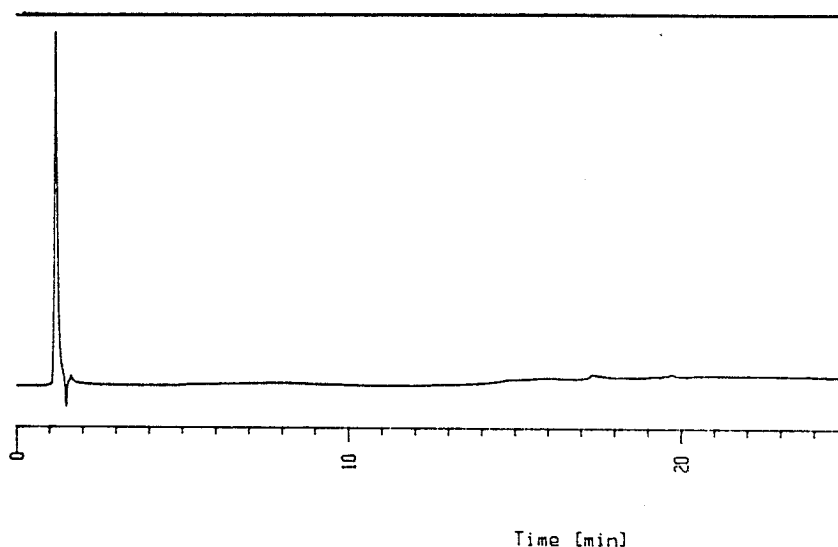


Abb. 77. HPLC-Diagramm von 1-Naphthalinsulfonsäure:

Wellenlänge: 254nm

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser
bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate
von 1ml/min

1-Naphthalinsulfonsäure hat unter den eingestellten Bedingungen eine Retentionszeit von ca. 1.1 Minuten und ein $\frac{h_{254nm}}{h_{280nm}}$ -Verhältnis von 0.407.

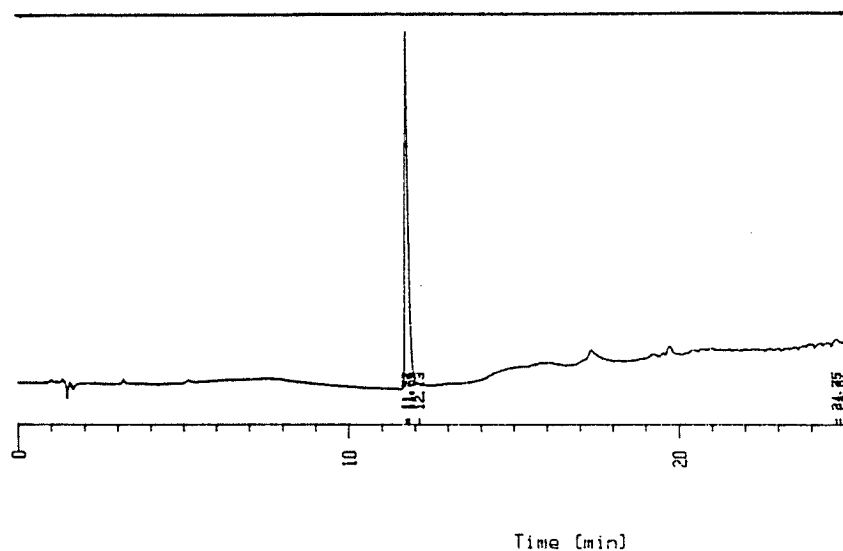


Abb. 78. HPLC-Diagramm von 1-Naphthol:

Wellenlänge: 254nm

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

Die Retentionszeit von 1-Naphthol wurde bei ca. 11.30 Minuten ermittelt und das $\frac{h_{254nm}}{h_{280nm}}$ -Verhältnis betrug 0.317.

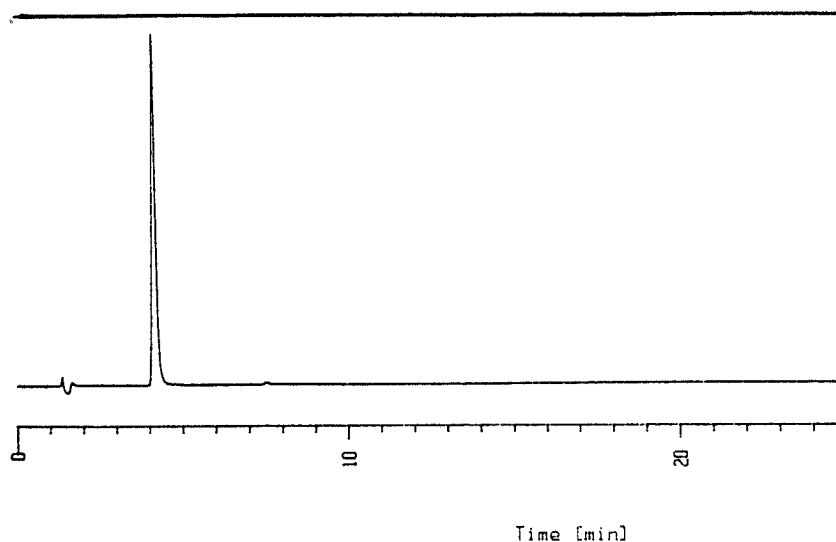


Abb. 79. HPLC-Diagramm von 1-Hydroxy-4-Tetralon:

Wellenlänge: 254nm

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

1-Hydroxy-4-Tetralon konnte bei ca. 4.10 Minuten detektiert werden und sein $\frac{h_{254nm}}{h_{280nm}}$ -Verhältnis war 8.30.

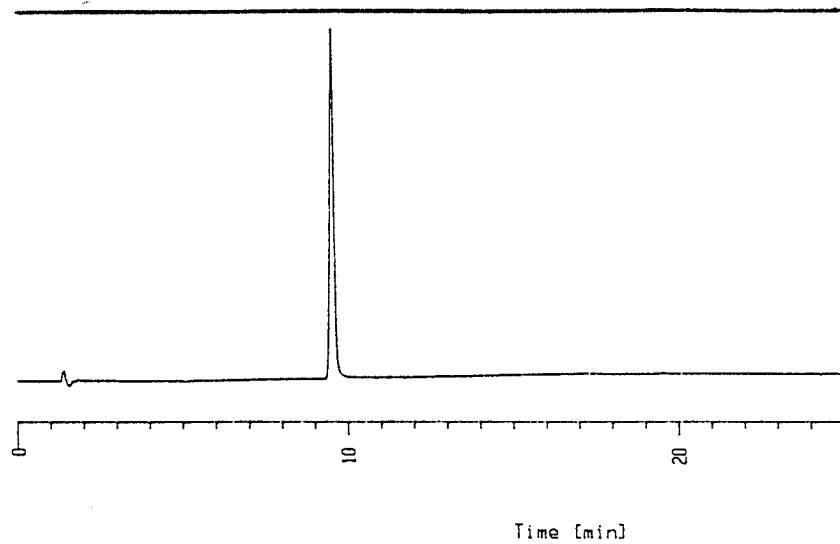


Abb. 80. HPLC-Diagramm von 1,4-Naphthochinon:

Wellenlänge: 254nm

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

1,4-Naphthochinon hat eine Retentionszeit von ca. 9.5 Minuten und ein $\frac{h_{254nm}}{h_{280nm}}$ -Verhältnis von 74. Dieses hohe Verhältnis bedeutet, daß 1,4 Naphthochinon bei sehr niedriger Konzentration nur die der Wellenlänge 254nm detektiert werden kann.

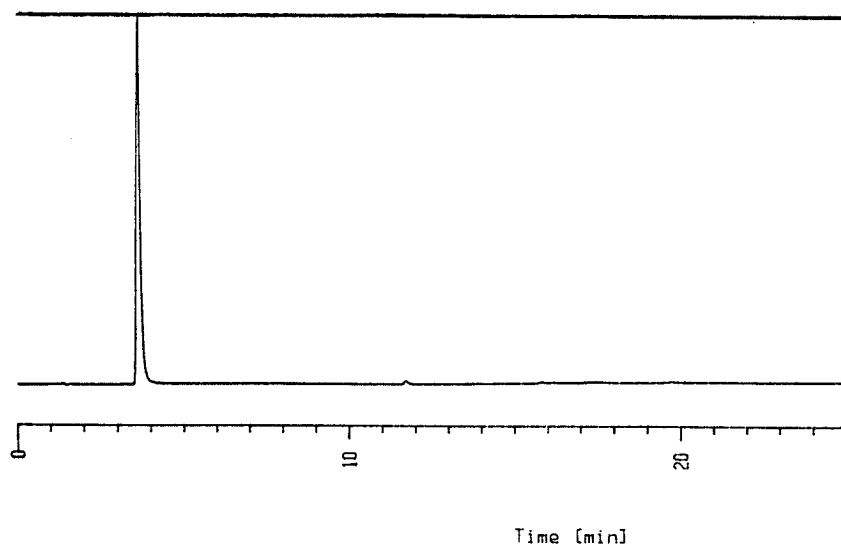


Abb. 81. HPLC-Diagramm von 1,2-cis-dihydroxynaphthalindiol:

Wellenlänge: 254nm

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

Die Retentionszeit von 1,2-cis-dihydroxynaphthalindiol wurde bei ca. 3.60 Minuten und ein $\frac{h_{254nm}}{h_{280nm}}$ -Verhältnis von 1.82 ermittelt.

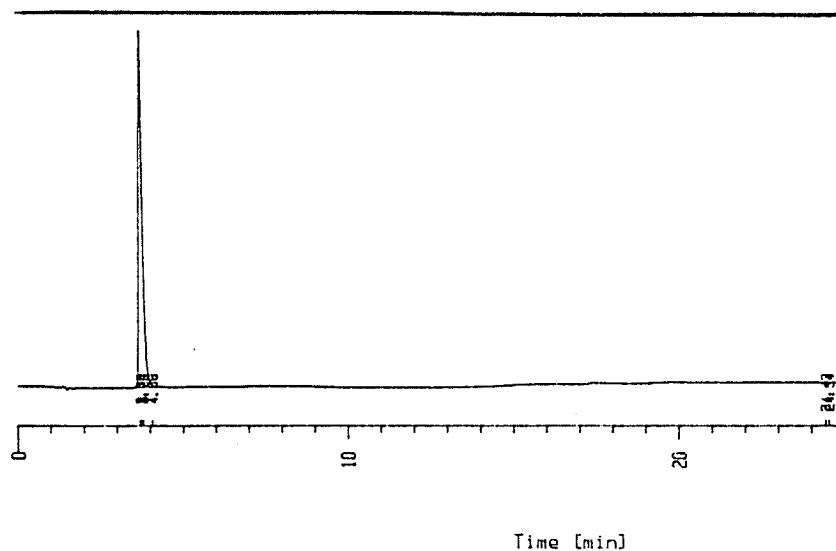


Abb. 82. HPLC-Diagramm von 1,2-trans-dihydroxynaphthalindiol:

Wellenlänge: 254nm

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

Da 1,2-trans-dihydroxynaphthalindiol ein Isomer des 1,2-cisdihydroxynaphthalindiols ist, folgte diese kurz dahinter mit einer Retentionszeit mit 3.75 Minuten. Das $\frac{h_{254nm}}{h_{280nm}}$ -Verhältnis war mit 1.62 geringer.

Da die Referenzsubstanzen als Einzelsubstanzen auf die Säule gegeben wurden, konnte es bei Anwesenheit eines Substanzgemisches zu geringfügigen Verschiebungen der Retentionszeit kommen. Da aber das $\frac{h_{254nm}}{h_{280nm}}$ -Verhältnis bekannt war, konnte eine Zuordnung der Peaks vorgenommen werden.

Die Referenzsubstanzen wurden in dem Chromatogramm der Kultursuspension, bei der die Algen in Sulfat kultiviert wurden, nicht gefunden. Deshalb konnte man davon ausgehen, daß in den Ansätzen mit 1-Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle diese als mögliche Abbauprodukte gefunden werden konnten.

3.5.2 Identifikation der Abbauprodukte

In Folgenden wurden Proben aus den Überständen der Batchansätze, aus der kontinuierlichen Kultur und eines Versuches mit Zellrohextrakt auf die Abbauprodukte hin untersucht.

3.5.2.1 Proben aus dem Batchversuch

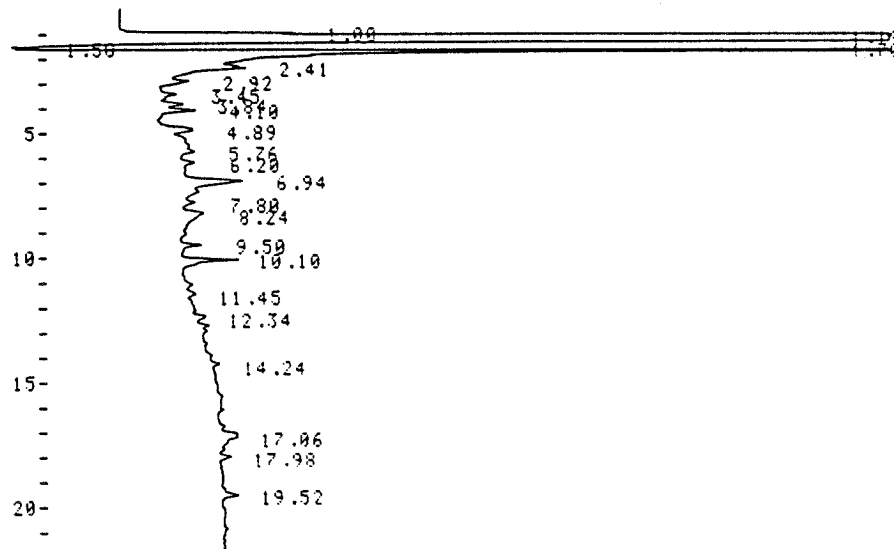


Abb. 83. HPLC-Diagramm der Kultursuspension aus dem Batchversuch (1.Meßtag):

Wellenlänge: 254nm

Konzentration von 1-NS zu Beginn des Versuches: 0.434mM

Biomassekonzentration zur Zeit der Probennahme: 110 mg TS/l

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

Am 1.Meßtag der Batchversuche wies das Diagramm sehr wenige Peaks auf. Bei der Retentionzeit von 4.10 Minuten wurde 1-Hydroxy-4-Tetralon identifiziert, bei 9.5 Minuten 1,4-Naphthochinon und bei 11.45 Minuten 1-Naphthol. Diese traten aber in sehr geringen Konzentrationen auf.

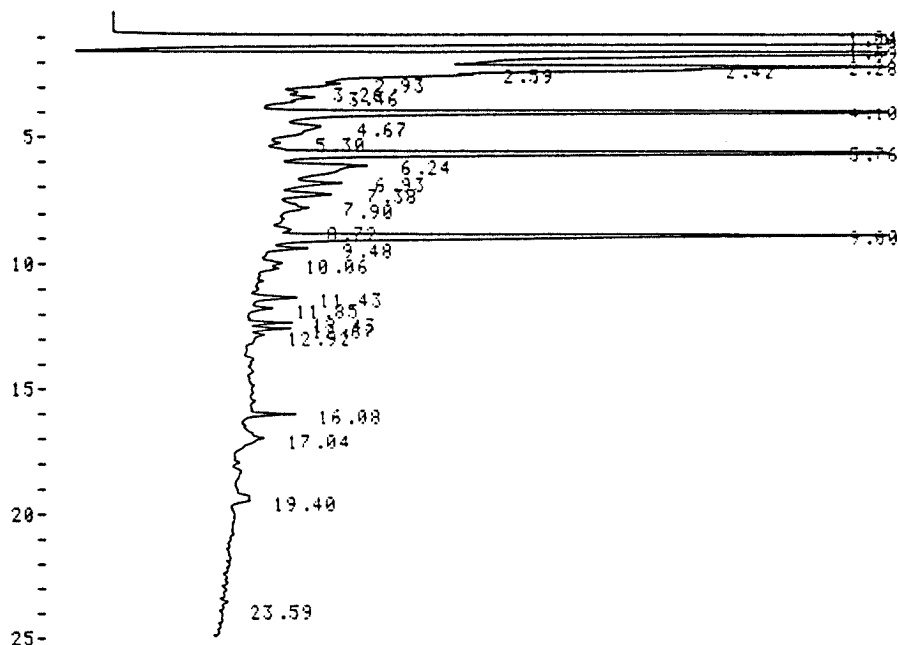


Abb. 84. HPLC-Diagramm der Kultursuspension aus dem Batchversuch (5.Meßtag):

Wellenlänge: 254nm

Konzentration von 1-NS zu Beginn des Versuches: 0.434mM

Biomassekonzentration zur Zeit der Probennahme: 435 mg TS/l

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

Die Probennahme am Ende des Versuches zeigt eine höhere Anzahl an Peaks. Während 1-Naphthol (11.43 Minuten) und 1,4-Naphthochinon (9.48 Minuten) ebenso wie zu Beginn des Versuches in geringer Konzentration vorlagen, nahm die Konzentration an 1-Hydroxy-4-Tetralon deutlich zu.

Sowohl 1,2-cis-dihydroxynaphthalindiol als auch 1,2-trans-dihydroxynaphthalindiol konnten nicht nachgewiesen werden.

3.5.2.2 Probe aus einer kontinuierlichen Kultur

Da in kontinuierlicher Kultur zum einen die Kultursuspension mit einem Luft /CO₂ Gemisch begast wird, zum anderen permanent neues Medium in das System hineinfließt, waren die Milieubedingungen für die Algen von denen in den Batchversuchen verschieden.

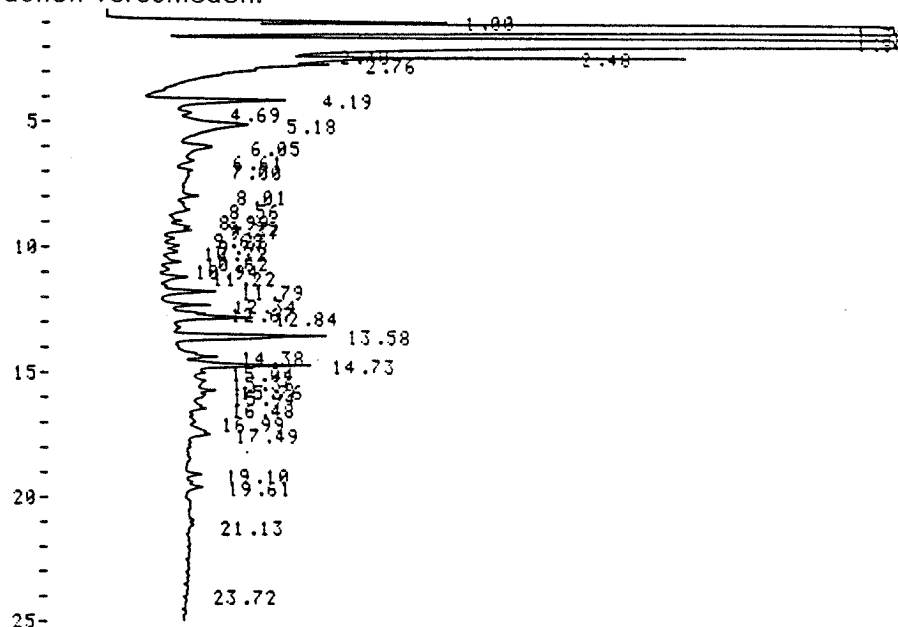


Abb. 85. HPLC-Diagramm der Kultursuspension aus dem kontinuierlichen Versuch:

Wellenlänge: 254nm

Konzentration von 1-NS im Medium: 0.869mM

Biomassekonzentration im Fermenter: 499 mg TS/l

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

Gut konnte 1-Hydroxy-4-Tetralon bei 4.19 Minuten identifiziert werden. 1-Naphthol bei 11.26 Minuten und 1,4-Naphthochinon bei 9.68 Minuten waren nur in sehr geringer Konzentration vorhanden.

Ebenso wie in den Batchversuchen wurde kein 1,2- cis-dihydroxynaphthalindiol und 1,2-trans-dihydroxynaphthalindiol gefunden.

3.5.2.3 Probe aus dem Versuch mit Zellrohexrakt

Da auch mit Zellrohexrakt Versuche zur Desulfonierung unternommen wurden, wurde nach Versuchsende eine Probe auf die Abbauprodukte hin untersucht.

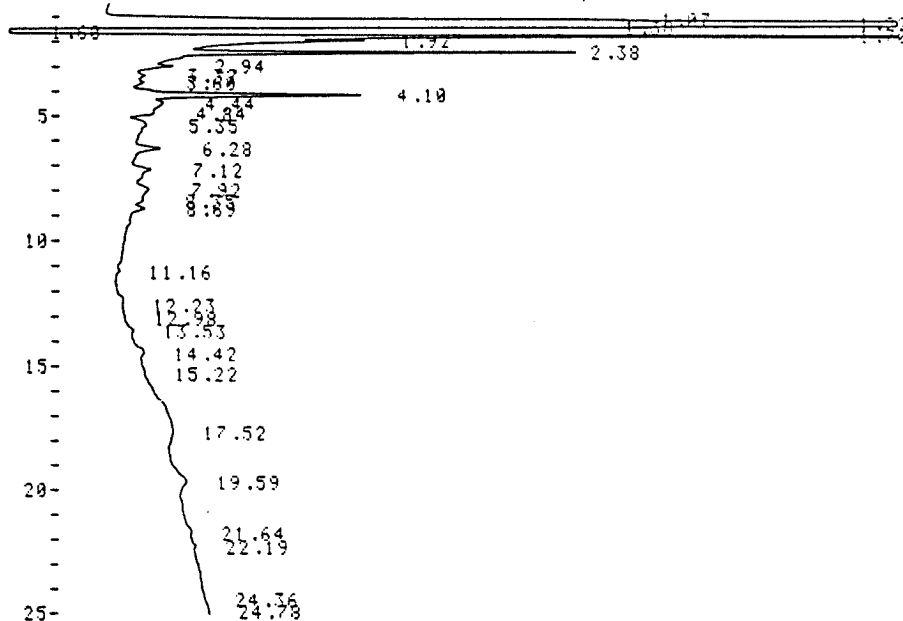


Abb. 86. HPLC-Diagramm der Probe aus dem Versuch mit Zellrohexrakt:

Wellenlänge: 254nm

Konzentration von 1-NS im Ansatz: 0.1 mM

Proteinkonzentration: 0.1 mg

Elutionsbedingungen: Gradientenelution von 20% Acetonitril/ 80% Wasser bis zu 80% Acetonitril/ 20% Wasser über eine Stunde mit einer Pumprate von 1ml/min

Auch hier wurde 1-Hydroxy-4-Tetralon (4.10 Minuten) und 1-Naphthol (11.16 Minuten) gefunden, nicht aber 1,4-Naphthochinon. Auch hier konnte kein Peak als 1,2-cis-dihydroxynaphthalindiol oder 1,2- trans-dihydroxynaphthalindiol identifiziert werden.

Die Diagramme verdeutlichen, daß in den einzelnen Ansätzen 1-Hydroxy-4-Tetralon, 1,4 Naphthochinon und 1-Naphthol wiedergefunden wurden. Da 1-Hydroxy-4-Tetralon und 1,4-Naphthochinon Sekundärprodukte aus dem 1-Naphthol sind, ist 1-Naphthol das aus der Desulfonierung entstehende Primärprodukt. Da von Lamberton u. Claeys (1968) und Luther u. Soeder (1987) schon

gezeigt werden konnte, daß zum einen 1-Naphthol nach kurzer Inkubation in wässrigem Milieu nicht mehr nachweisbar war, weil es sich zu Sekundärprodukten umwandelt, zum anderen sich bei Luther (1984) messbare Kolloide aus der Inkubation des 1-Naphthols bilden, kann man davon ausgehen, daß diese Substanzen in ihrer oxidierten Form untereinander reagieren können und somit Polymere entstehen. Dies könnte auch erklären, warum keine Anhäufung der Abbauprodukte gefunden wurden.

Da kein 1,2-cis-dihydroxynaphthalindiol und kein 1,2- trans-hydroxynaphthalindiol in den Suspensionen gefunden wurden, ist es ausgeschlossen, daß es noch einen anderen Abbauweg als über einen dieser beiden Substanzen gibt.

4.0 Diskussion

Für zahllose Algenstämme, die man bislang isoliert und in Reinkulturen untersucht hat, ist Sulfat eindeutig die am besten geeignete Schwefelquelle (Schlößer, 1986; Schäfer u. Hegewald, 1985). Dieses wird in Gewässern so sein, wobei man dort Sulfatgehalte von wenigen Milligramm bis zu mehreren Gramm pro Liter finden kann (Raven, 1981; Hölle, 1983). Neben Sulfat findet man aber auch in der Natur organische Schwefelverbindungen, die auch von Algen als Schwefelquelle genutzt werden können. Diese können sowohl aus dem biologischen Metabolismus stammen, wie die Aminosäuren Cystein und Methionin (O'Kelly, 1974), als auch anthropogener Herkunft sein wie z.B. Waschmitteltenside.

4.1 Batchkulturen

Das hier verwandte Kultursystem für die Batchkulturen der Algen wird als einfaches und gut handhabbares Testsystem oft eingesetzt und auch für Chemikaliertestungen von der OECD (1983) als Standardtest vorgeschrieben. Dabei wird aber nur das Wachstum der Algen gemessen, die unter den Bedingungen nur relativ niedrige Wachstumsraten erreichen. Deswegen wurde in diesen Untersuchungen versucht, die Testalgen auch weiter zu untersuchen, und auch die Abnahme des eingesetzten Sulfates und der 1- Naphthalinsulfonsäure zu messen. Durch die Charakterisierung war es dann möglich, den physiologischen Zustand der Algen in dem Testsystem und ihre Abhängigkeit zu den eingesetzten Testsubstanzen beschreiben zu können.

In den Kulturansätzen mit Sulfat und 1- Naphthalinsulfonsäure erwies sich das Wachstum von *Scenedesmus obliquus* als von der externen Schwefelkonzentration nach Art einer Sättigungskinetik abhängig. Dabei erreichen die Algen mit 1-NS nur 80% der Wachstumsrate ($\mu = 0.425$ pro Tag), die im Sulfatmedium gemessen wurde ($\mu = 0.55$ pro Tag). Diese Differenz ist unabhängig von den Lichtverhältnissen und des Kultursystems. So wurde *Scenedesmus obliquus* von mir in meiner Diplomarbeit (1984) im gleichen Kultursystem, aber in Wechsellicht gehalten. Ebenso wurde von Soeder et al. (1987) die gleiche Grünalge in einem begasten System mit Wechsellicht kultiviert. Unter allen drei verschiedenen Kultivierungsbedingungen wurden jeweils verschiedene Wachstumsraten ermit-

telt; dennoch war immer die maximale Wachstumsrate der Algen mit 1- Naphthalinsulfonsäure 80% geringer als mit der äquivalenten Menge an Sulfat.

Eine bedeutende Rolle spielt das im Medium enthaltene Restsulfat beim Wachstum in 1-NS. Denn trotz der hohen Reinheit der 1-NS wurde eine Sulfatkonzentration von 0.0083mM mittels Ionenchromatographie nachgewiesen; diese gelangte durch Verunreinigungen der anderen Nährstoffe in das Medium. Da aber auch schon eine geringe Sulfatmenge von den Algen aufgenommen werden kann, war zu befürchten, daß sich die eigentliche Abhängigkeit des Wachstums von 1-NS wegen dieses Restsulfatgehaltes nicht eindeutig erfassen ließ. So konnte auch nachgewiesen werden, daß zu Versuchsbeginn 0.0019mM Sulfat aufgenommen wurden, gleichzeitig aber auch 0.004mM 1-NS. Um auszuschließen, daß das Sulfat die Aufnahme von 1-NS beeinflussen könnte, wurden die Algen zuerst in Medium überimpft, welches außer des Restsulfates keine Schwefelquelle mehr beinhaltete. Nach minimaler Biomassezunahme, was der Verwertung des Restsulfates zugeschrieben wurde, konnten die Algen nicht weiter an Biomasse zunehmen. Nach Zugabe der S-Quellen nahm das Wachstum wieder zu, war aber deutlich geringer, wodurch nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die Algen durch diese Art der Vorinkubation geschädigt worden waren. Es war also in dieser Art von Versuchssystem nicht möglich, den Einfluß des Restsulfates auf die Algen eindeutig zu klären. Die Ergebnisse lassen sich vielleicht dadurch relativieren, wenn man den Vergleich zu den kontinuierlichen Kulturen zieht, wo gezeigt werden konnte, daß das Wachstum der Algen mit 1- Naphthalinsulfonsäure deutlich gegenüber dem bei optimalen Sulfatangebot zurückging. Dieses bedeutet, daß die Wachstumsraten der Algen nach 'S-freier'-Vorinkubation der Situation ohne Restsulfat am nächsten kommt.

Li.B man *Sc. obliquus* mit Gemischen von Sulfat und Sulfonsäure wachsen, so erhöhen sich wohl die Wachstumsraten gegenüber der in 1-NS-kultivierten um bis zu 41%. Dennoch wurde nicht ganz die Wachstumsrate von $\mu=0.55$ pro Tag erreicht, auch wenn die gleiche Sulfatkonzentration von 0.14 mM vorhanden war wie in dem Sulfatmedium. Bei Kultivierung derselben Testalge mit 1-NS als S-Quelle, jedoch unter Hochleistungsbedingungen, erzielten auch Soeder et al. (1987) durch die Zugabe von Sulfat bis 5mg/l verstärktes Wachstum, ohne die Wachstumsleistung optimal mit Sulfat versorgten Kontrollkulturen zu erreichen. Dieses könnte daran liegen, daß die Gesamtschwefelkonzentration zu hoch war, was zu einer Erniedrigung des Wachstums führt.

Ebenso wie die Wachstumsraten von *Sc. obliquus* wurden die Pigmentgehalte von Art und Konzentration der S-Quellen beeinflusst. So verminderten sich die Gehalte an Chlorophyll und Carotinoid mit abnehmender Schwefelkonzentration, wobei Chlorophyll wesentlich mehr reduziert wurde als Carotinoid. Da diese Pigmente keine Schwefelverbindungen im Molekül aufweisen, kann dieses nur auf die allgemeine Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese zurückgeführt werden, wodurch eben auch die Pigmente nicht mehr gebildet werden können. Zudem könnte noch dazu kommen, daß Chlorophyll durch die intensive Beleuchtung autoxydiert wird und sich hierdurch das Verhältnis von Chlorophyll zu Carotinoid verschiebt. Bei den Ansätzen mit 1-NS konnte dieser Effekt nicht so deutlich nachgewiesen werden, was auf das Restsulfat im Medium zurückgeführt wurde.

Betrachtet man die maximal gemessene Konzentration an Chlorophyll und Carotinoid in den Ansätzen mit Sulfat und Sulfonsäure, so hatten die Algen im 1-NS-Medium einen um 65% niedrigeren Chlorophyllgehalt und ein um 71% niedrigeren Carotinoidgehalt. Solch eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes wurde auch von Biedlingmaier u. Schmidt (1983, 1986, 1987) beschrieben, die den Chlorophyllgehalt als Maß für das Biomassewachstum nahmen. Analog zu meinen Befunden wurde dort auch ein geringerer Chlorophyllgehalt gemessen, wenn die Alge *Chlorella fusca* organische Schwefelverbindungen als Schwefelquelle nutzte.

Vergleicht man die Algen in dem Ansatz mit 0.036 mM Sulfat, die eine Wachstumsrate von $\mu = 0.41$ pro Tag aufwiesen, mit denen im Ansatz mit 0.869 mM Sulfonsäure (Wachstumsrate $\mu = 0.41$ pro Tag), so ist der Chlorophyllgehalt der Algen nahezu gleich (5.8mg/l; 5.2mg/l); der Carotinoidgehalt ist dagegen im Sulfatansatz doppelt so hoch wie in dem mit 1-NS (6mg/l; 3.1mg/l). Damit kann der Chlorophyllgehalt nicht alleine als geeignetes Maß für das Biomassewachstum gelten. Betrachtet man den Versuch mit 'S-freier'-Vorinkubation, so wurde dort ein wesentlich geringerer Pigmentgehalt gemessen als in den anderen Versuchsanständen. Die extrem geringen prozentualen Gehalte der Pigmente an der Biomasse waren denen der Algen in kontinuierlicher Kultur ähnlich.

Bei Kultivierung mit Sulfat und Sulfonsäure im Medium wurden aber noch höhere Pigmentkonzentrationen gemessen als nur in Sulfat- oder Sulfonsäuremedium. Gegenüber den Algen in Sulfatmedium war der prozentuale Pigmentgehalt um bis zu 40% höher, der Carotinoidgehalt bis zu 54%. Da diese am Ende des Meßzeitraumes gemessen wurde, können die hohen Pigmentgehalte nur damit erklärt werden, daß im Gegensatz zu der anderen Inkubation zu diesem Zeitpunkt

noch genügend Schwefel zur Verfügung stand, so daß noch weiter Pigmente gebildet werden konnten. Dieses zeigt auch das Chlorophyll : Carotinoidverhältnis, welches nicht auf eine Schwefellimitierung hinweist.

Die hohen Pigmentgehalte führten aber wahrscheinlich zu einer höheren Selbstbeschattung der Algen. Dieses könnte auch der Grund dafür sein, warum die Algen in diesem Medium geringere Wachstumsraten aufwiesen als in Sulfatmedium. Dieses bedeutet aber auch, daß zur exakten Terminierung des Wachstums der Algen unter solchen Bedingungen es nicht ausreicht, entweder nur das Wachstum oder nur den Pigmentgehalt der Algen zu bestimmen. Durch die wechselseitige Beeinflussung ist es nötig, beide Parameter zu bestimmen. Damit wäre es erst gewährleistet, die Beeinflussung bestimmter Testsubstanzen auf das Wachstum der Algen erklären zu können.

Die Elimination aus dem Medium ist um so intensiver, je höher die Konzentration der Schwefelkomponenten im Medium ist. Diese hängt damit zusammen, daß der Schwefelinflux in die Zelle wie bei allen Sorbtionsprozessen von der externen Konzentration der S-Quelle abhängt, wobei die interne Schwefelkonzentration der Algen durch die externe reguliert wird. Dieses wurde von Wedding u. Black (1960) und Utkilen et al. (1976) in Kurzzeitversuchen nachgewiesen, und ist auch in den Langzeitversuchen hier verifiziert worden, da zu Versuchbeginn, wo eine niedrige Biomassekonzentration und eine hohe S-Konzentration vorlag, eine höherer S-Gehalt in den Algen berechnet werden konnte als bei Versuchsende. Bei den einzelnen Experimenten über die gesamten 5 Tage nahm die Sulfat- wie Sulfonsäurekonzentration exponentiell ab. Betrachtet man die Sulfatabnahme genauer, so kann man einen biphasischen Verlauf feststellen (Abb.10). Steht genügend Sulfat zur Verfügung wie in den Ansätzen mit 0.14 mM, 0.075 mM und 0.048 mM Sulfat, so ist anfangs eine starke lineare Abnahme zu beobachten, die sich im Falle von 0.14 mM über 4 Tage, von 0.075 mM über 2 Tage und bei 0.048 mM über einen Tag erstreckt. Danach reduziert sich die Abnahme wie in den Ansätzen 0.036 mM und 0.014 mM Sulfat. Der errechnete K_s -Wert für die Aufnahme von Sulfat war mit $K_{sub s} = 6.3 \mu M$ relativ hoch, lag aber im Bereich dessen, was für andere Algen ermittelt wurde ($0.75 \mu M$ für *Anacystis* (Utkilen et al., 1976) bis $32 \mu M$ für *Monochrysis* (Deare u. O'Brien, 1975)). Vergleicht man diesen K_s -Wert mit denen für andere Nährstoffe wie Nitrat und Phosphat, die wesentlich geringer sind, so könnte in der Natur eher Sulfat der wachstumslimitierende Faktor sein als die anderen Nährstoffe.

In den Ansätzen mit 0.036mM und 0.014mM Sulfatanfangskonzentration konnte immer ein Restsulfatgehalt von 0.0063 mM Sulfat nachgewiesen werden. Dieses ist die Schwellenwertkonzentration, ab deren Unterschreitung kein Sulfat mehr von den Algen aufgenommen werden kann. Ebenso wurde bei der Elimination von 1- Naphthalinsulfonsäure eine Schwellenwertkonzentration von 0.038 mM festgestellt; diese liegt aber ca. 6 fach höher als die des Sulfates.

Die Rate, mit der *Sc. obliquus* die Sulfonsäure eliminierte, ist aber auch deutlich geringer als die des Sulfates. Ein nicht zu unterschätzender Faktor ist auch hier das Restsulfat im Medium. So wird diese geringe Menge an Sulfat (0.0019mM) bevorzugt in den ersten 2 Stunden des Versuches bis zu Erreichen der Schwellenwertkonzentration aufgenommen, auch wenn die 1-NS in einer wesentlich höheren Konzentration im Medium vorliegt. Hierbei zeigte sich außerdem, daß, ohne daß die Biomasse zunahm, gleichzeitig mit der Abnahme des Sulfates um 0.017 mM auch 0.004 mM 1- Naphthalinsulfonsäure aufgenommen wurde. Diese Aufnahme des Sulfat hat offenbar zur Folge, daß die Vitalität der Algen zunimmt, so daß die Aufnahme der 1-NS begünstigt wird.

Der Einfluß des Sulfates auf die Elimination der 1- Naphthalinsulfonsäure nahm aber andererseits zu, wenn die Sulfatkonzentration erhöht wurde. Mit der Erhöhung der Sulfatkonzentration nahm die Elimination der 1-NS in einer solchen Weise ab, daß daraus eine gegenseitige Abhängigkeit für die Aufnahme von Sulfat und Sulfonsäure abgeleitet werden konnte.

Ausnahme bildete nur der Ansatz mit der geringeren Zugabe von 0.014mM Sulfat. Dort nahmen die Algen, nachdem sie erst verstärkt das Sulfat bis zur Schwellenwertkonzentration aufgenommen hatten, mehr 1-NS auf, als wenn ihnen nur 1-NS als S-Quelle plus dem Restsulfat zur Verfügung stand. So konnte eindeutig gezeigt werden, daß durch geringe Zugaben von Sulfat von 0.0083mM bis 0.014mM die Desulfonierung von 1-NS gesteigert werden konnte.

Aber auch die Sulfataufnahme wurde durch die 1- Naphthalinsulfonsäure beeinflusst. Denn dessen Elimination war deutlich geringer als in den Versuchen nur mit Sulfat.

Betrachtet man die experimentell gewonnenen Daten, speziell die des Ansatzes mit 0.434 mM 1- Naphthalinsulfonsäure, mit der in meiner Diplomarbeit (1984) berechneten Desulfonierungsrate, so wurde die damals aufgestellte Hypothese bestätigt. In dieser Arbeit wurde folgende Formel für die Desulfonierung der verschiedenen Sulfonsäuren angenommen:

$$f(x) = 0.3059e^{8.713\mu}$$

$f(x)$ = Desulfonierungsrate in 10 Tagen

μ = Wachstumsrate pro Tag der Algen mit den verschiedenen Sulfonsäuren als Schwefelquelle

Hieraus wurde eine theoretische Desulfonierungsrate von 0.142 mM 1-NS in 10 Tagen bzw. 0.071 mM 1-NS in 5 Tagen errechnet. Vergleicht man diesen Wert mit dem hier gewonnenen Wert von 0.069 mM 1-NS, so weicht der hypothetische Wert um 2% von den experimentellen ab. Nur bei den sehr niedrigen und hohen Wachstumsraten ist die Abweichung bis zu 15%. Dieses bedeutet, daß es möglich ist, mit den jeweiligen Wachstumsraten der Algen und den Schwefelgehalten in den Algen ein Modell aufzustellen und vorherzusagen, wie hoch die Schwefelaufnahme bzw. die Desulfonierungsrate sein müßte.

Wichtig wäre es aber in diesem Zusammenhang, ob solche Modellierung generell für die Verwertung anderer Nährstoffe aufgestellt werden kann, wie z.B. Nitrat und organische Stickstoffverbindungen.

Die Berechnung des prozentualen Schwefelgehaltes in der Algenbiomasse zeigt, daß die S-Gehalte der Algen extrem schwanken können. So ist die Variationsbreite von 0.075% (Ansatz mit 0.014 mM Sulfat) bis zu 0.962% (Ansatz mit 2.17 mM 1-NS). Dieses wird auch in der Literatur angegeben. So geben Soeder et al. (1987) für *Scenedesmus obliquus* Schwefelgehalte von 0.14% bis 0.7% an, Raven (1981) für *Chlorella* von 0.38% bis 0.768%, für *Euglena* von 0.38% bis 1.92%. Daß sich diese interne Schwefelkonzentration durch die externe Mediumskonzentration variieren läßt, zeigte Utkilen (1976) anhand von *Anacystis*, deren innere Konzentration von 85 μ M auf 590 μ M erhöhte, wenn die externe Konzentration von 0.1 μ M auf 10 μ M geändert wurde. Daß aber auch noch höhere Schwefelgehalte möglich sind, zeigt sich, wenn man nicht zu Versuchsende, sondern für jeden Tag die Parameter verrechnet. Dann kann sich der S-Gehalt auf über 1.5% erhöhen.

Zur Überprüfung obiger Aussagen wurden die Algen mit ^{35}S -markierter 1-Naphthalinsulfonsäure und -Sulfat inkubiert. Durch die Synthese bedingt lag nur ein Gemisch aus 84% 1-Naphthalinsulfonsäure und 16% 2-Naphthalinsulfonsäure vor, die homogen und inhomogen geträgert wurden. Dieses bedeutet, daß das homogene Gemisch aus 84% 1-Naphthalinsulfonsäure und 16% 2-Naphthalin-

sulfonsäure bestand, während das inhomogene Gemisch aus 99.2% 1-NS und 0.8% 2-NS bestand. Als Vergleich zu obigen Versuchen war aber nur das inhomogene Gemisch von Bedeutung, da dieses Mischungsverhältnis mehr der oben genannten 1-NS-Konzentration entsprach. Wurden die Algen von dem sulfathaltigem N8-Medium in 1-NS-Medium überimpft, so wurde 1-NS sofort aufgenommen. Eingeschränkt wurde die Aufnahme zu Beginn nur dadurch, daß durch das Überimpfen Sulfat mit in das neue Medium gelangte und von den Algen bevorzugt aufgenommen wurde, so daß die Aufnahme der Sulfonsäure geringer war. Am Versuchsende war aber die Aufnahme der Sulfonsäure genauso hoch, wie wenn die Algen aus dem 1-NS-Medium überimpft wurden. Diese könnte auch bedeuten, daß die "Adaptation" der Algen an die Sulfonsäure als Schwefelquelle nur durch das "Restsulfat" bedingt ist.

Wie auch für die obigen Versuche berechnet wurde, war der Schwefelgehalt in den Algen zu Versuchsbeginn deutlich höher als gegen Ende des Versuches, was auf einen verstärkten Einbau des Schwefels bei hoher S-Konzentration und niedriger Biomasse hinweist. Vielleicht befinden sich die Algen bei 5 Tage Inkubationsdauer auch schon in Schwefelmangelbedingungen, daß sie nach Inkubation in frisches Medium so viel Schwefel aufnehmen. Dieses würde sich decken mit den Untersuchungen von Biedlingmaier u. Schmidt (1986, 1987), die nachwiesen, daß Algen bei vorherigem Schwefelmangel mehr Schwefel aufnehmen, als wenn sie dann "gut versorgt" sind. Diese hohe Aufnahme wurde auch bei der Inkubation der Algen mit Sulfat als Schwefelquelle gefunden. Da es eine gute Übereinstimmung der Schwefelgehalte in der Biomasse mit der Abnahme des Sulfates bzw. der Sulfonsäure gibt, ist die Abnahme im Medium direkt proportional der Aufnahme in die Algenzelle. Aufgrund dieser Beziehung kann ausgeschlossen werden, daß Sulfat sowie Sulfonsäure biotisch nur umgebaut wird, und somit als eigentliche Substanzen nicht mehr meßbar sind.

Stellt man die Meßergebnisse der mit homogen und inhomogen geträgerten 1-Naphthalinsulfonsäure gegenüber, so sind die erzielten Werte mit homogen geträgerter 1-Naphthalinsulfonsäure wesentlich höher als die der inhomogen geträgerten. Da aber in beiden Ansätzen die Zusammensetzung der radioaktiv-markierten 1-Naphthalinsulfonsäure und der 2-Naphthalinsulfonsäure gleich war, wird im folgenden durch eine Grenzwertberechnung untersucht, ob beide Substanzen gleich gut aufgenommen werden.

Die arithmetischen Mittelwerte der für beide Gemische gemessenen Standards waren:

1-NS inhomogen: 224535 dpm

1-NS homogen : 362222 dpm

Hieraus errechnet sich das folgende Verhältnis:

$$\frac{inhomogen}{homogen} = \frac{224535}{362222} = 0.620$$

Berechnet man aus den Wägeergebnissen für die Trägerung das zu erwartende Verhältnis, kommt man zu folgendem Ergebnis:

Annahme: 1 mg Syntheseprodukt besitzt eine Aktivität von 1 AE (Aktivitätseinheit).

dann ist die spezifische Aktivität ($a = \frac{A}{m}$) der inhomogenen 1-NS:

$$a_{inhomog.} = \frac{13.4 \text{ AE}}{342.54 \text{ mg}} = 0.039 \frac{\text{AE}}{\text{mg}}$$

und die spezifische Aktivität der homogenen 1-NS:

$$a_{homog.} = \frac{14.51 \text{ AE}}{344.03 \text{ mg}} = 0.042 \frac{\text{AE}}{\text{mg}}$$

Das zu erwartende Verhältnis der Messwerte der Standards ist also:

$$\frac{a_{inhomog.}}{a_{homog.}} = \frac{0.039}{0.042} = 0.929$$

Hieraus folgt, daß das erhaltene Syntheseprodukt, obwohl es aus einer Lösung ausgefallen ist, bezüglich des mitausgefällten Sulfates inhomogen zusammengesetzt war. Da das Sulfat nach der Auftrennung des Produktes in zwei Teile durch Fällung mit BaCl_2 entfernt wurde, war dann die tatsächliche Sulfonsäureaktivität in den beiden Chargen anders, als es aufgrund der Einwaage zu erwarten gewesen wäre.

Setzt man voraus, daß die Zusammensetzung des Syntheseproduktes konstant war, führt dies zu folgendem Ergebnis:

Gesamtmasse des Syntheseproduktes: 27.91 mg

davon sind: 1-NS : 10.03 mg (36.0 %)

2-NS : 1.97 mg (7.1 %)

Sulfat: 15.92 mg (57.0 %)

Unter der Voraussetzung, daß das Syntheseprodukt bezüglich der beiden NS-Isomeren homogen zusammengesetzt war, kann man die genaue Zusammensetzung der beiden Chargen nach der Trägerung und der Sulfatfällung aufgrund der Ergebnisse aus der Messung der Standards für die jeweilige Charge ausrechnen.

Gesamtmasse an NS nach der Synthese (ohne Sulfat): 12.0 mg

Gesamtaktivität (Summe beider Standards): 586757 dpm

Die Meßung des *inhomogenen* Standards ergab 224535 dpm, d. h. die inhomogen geträgerte 1-NS enthielt 4.592 mg Syntheseprodukt, also 3.839 mg aktive 1-NS und 0.753 mg aktive 2-NS.

Die Meßung der *homogenen* Standards ergab 362222 dpm, d. h. die homogen geträgerte 1-NS enthielt 7.408 mg Syntheseprodukt, also 6.193 mg aktive 1-NS und 1.215 mg aktive 2-NS.

Aus den vorhandenen Daten lassen sich nunmehr die jeweiligen spezifischen Aktivitäten ($a = \frac{A}{m}$) für 1-NS und 2-NS im homogenen und inhomogenen Gemisch nach erfolgtem Trägerzusatz errechnen.

Voraussetzung: 1 mg Syntheseprodukt (ohne Sulfat) = 1 AE (Aktivitätseinheit)

Homogenes Gemisch

$$a_{1-NS} = \frac{6.193 \text{ AE}}{283 \text{ mg}} = 0.022 \frac{\text{AE}}{\text{mg}}$$

$$a_{2-NS} = \frac{1.215 \text{ AE}}{53.0 \text{ mg}} = 0.022 \frac{\text{AE}}{\text{mg}}$$

$$a_{\text{homog.}} = \frac{7.408 \text{ AE}}{336.9 \text{ mg}} = 0.022 \frac{\text{AE}}{\text{mg}}$$

Inhomogenes Gemisch

$$a_{1\text{-NS}} = \frac{3.839 \text{ AE}}{333 \text{ mg}} = 0.012 \frac{\text{AE}}{\text{mg}}$$

$$a_{2\text{-NS}} = \frac{0.753 \text{ AE}}{0.753 \text{ mg}} = 1 \frac{\text{AE}}{\text{mg}}$$

$$a_{\text{inhomog.}} = \frac{4.592 \text{ AE}}{333.8 \text{ mg}} = 0.014 \frac{\text{AE}}{\text{mg}}$$

1. Grenzfall:

1-NS und 2-NS werden von den Algen gleich gut aufgenommen, dann ist die Massenverteilung von 1-NS und 2-NS in der Biomasse nach der Aufnahme von 1 g des *homogenen* Gemisches:

836 mg 1-NS

164 mg 2-NS

Die Gesamtaktivität in der Biomasse wäre dann:

$$A_{1\text{-NS}} = \frac{0.022 \text{ AE}}{\text{mg}} \cdot 836 \text{ mg} = 18.96 \text{ AE}$$

$$A_{2\text{-NS}} = \frac{0.022 \text{ AE}}{\text{mg}} \cdot 164 \text{ mg} = 3.61 \text{ AE}$$

$$A_{\text{gesamt}} = 22 \text{ AE}$$

Nach Aufnahme von 1 g des *inhomogenen* Gemisches ist die Massenverteilung in der Biomasse wie folgt:

997.74 mg 1-NS

2.26 mg 2-NS

Die Gesamtaktivität in der Biomasse wäre dann:

$$A_{1\text{-NS}} = \frac{0.012 \text{ AE}}{\text{mg}} \cdot 997.74 \text{ mg} = 11.97 \text{ AE}$$

$$A_{2\text{-NS}} = \frac{1 \text{ AE}}{\text{mg}} \cdot 2.26 \text{ mg} = 2.26 \text{ AE}$$

$$A_{\text{gesamt}} = 14.23 \text{ AE}$$

Dividiert man die errechnete Gesamtaktivität der inhomogenen 1-NS durch den aus dem Verhältnis der Meßwerte der Standardproben erhaltenen Faktor von 0.62, so erhält man eine direkte Proportionalität der Aktivitäts- und der Massenwerte.

$$\frac{14.23 \text{ AE}}{0.62} = 22.93$$

Hieraus läßt sich ableiten, daß bei gleich guter Aufnahme von 1-NS und 2-NS bei Inkubation mit der inhomogenen 1-NS geringfügig höhere Massenwerte als mit der homogenen hätten erhalten werden müssen.

2. Grenzfall:

2-NS wird überhaupt nicht von den Algen aufgenommen.

1000 mg 1-NS

0 mg 2-NS

Die Gesamtaktivität in der Biomasse wäre dann:

$$A_{1\text{-NS}} = \frac{0.022 \text{ AE}}{\text{mg}} \cdot 1000 \text{ mg} = 22.00 \text{ AE}$$

$$A_{2\text{-NS}} = \frac{0.022 \text{ AE}}{\text{mg}} \cdot 0 \text{ mg} = 0.00 \text{ AE}$$

$$A_{\text{gesamt}} = 22 \text{ AE}$$

Nach Aufnahme von 1 g des *inhomogenen* Gemisches ist die Massenverteilung in der Biomasse wie folgt:

1000 mg 1-NS

0 mg 2-NS

Die Gesamtaktivität in der Biomasse wäre dann:

$$A_{1\text{-NS}} = \frac{0.012 \text{ AE}}{\text{mg}} \cdot 1000 \text{ mg} = 12.00 \text{ AE}$$

$$A_{2\text{-NS}} = \frac{1\text{AE}}{\text{mg}} \cdot 0 \text{ mg} = 0.00 \text{ AE}$$

$$A_{\text{gesamt}} = 12.00 \text{ AE}$$

Dividiert man die errechnete Gesamtaktivität der inhomogenen 1-NS durch den aus dem Verhältnis der Meßwerte der Standardproben erhaltenen Faktor von 0,62, so erhält man eine direkte Proportionalität der Aktivitäts- und der Massenwerte.

$$\frac{12.00 \text{ AE}}{0.62} = 19.35 \text{ AE}$$

Hieraus läßt sich ableiten, daß bei Nichtverwertung von 2-NS bei Inkubation mit der homogenen 1-NS höhere Massenwerte erhalten werden müssen als mit der inhomogenen.

Da tatsächlich mit der homogenen 1-NS höhere Meßwerte erzielt wurden, wurde damit nachgewiesen, daß 2-NS wesentlich weniger gut von den Algen aufgenommen wird als 1-NS, zumindest dann, wenn beide Isomeren gleichzeitig in dem vorgegebenen Mischungsverhältnis zur Verfügung stehen.

Durch die Inkubation von ringmarkierter ^{14}C -1- Naphthalinsulfonsäure zeigte sich, daß diese von den Algen nicht als Kohlenstoffquelle genutzt wird. Vergleicht man den in die Biomasse eingebauten Schwefel mit dem sich in der Biomasse befindlichen Kohlenstoff, so kann man nur 2.3% des relativ zum eingebautem Schwefel zu erwartenden Quantums als kohlenstoffmarkierte Substanz wiederfinden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, daß Algen wie auch Bakterien aromatische Kohlenstoffverbindungen wie Benzole, Naphthalin Biphenyl entweder hydroxylieren oder den Substituenten des Ringes abspalten, den Ring selber aber nicht zum Biomasseaufbau nutzen können (Zürrer et al, 1987; Cook, 1986; Cook, 1981; Kulla et al, 1983; Hofmann, 1986; Cerniglia, 1984; Cerniglia, 1986; Cerniglia, 1982).

4.2 Kontinuierliche Kulturen

Im Gegensatz zu den Batchkulturen zeigten sich in kontinuierlicher Kultur extrem große Unterschiede im Wachstum der Algen und deren Pigmentgehalte, wenn diesen Sulfat oder Sulfonsäure als Schwefelquelle zur Verfügung standen.

So wurde mit Sulfat als Schwefelquelle annähernd die maximale Wachstumsrate von *Scenedesmus obliquus* von $D = 0.104\text{h}^{-1}$ erreicht. Diese Wachstumsrate entspricht einer Verdopplungszeit von 9.56 Stunden. Vergleicht man die hier gewonnene maximale Wachstumsrate mit der in Batch ermittelten, so ist diese fast 5-fach höher. Die beiden Kultursysteme lassen sich aber schwerlich miteinander vergleichen, da weder die Lichtintensität noch die CO_2 -Versorgung gleich sind. Nimmt man dagegen die von Soeder et al. (1987) unter ähnlichen Bedingungen (begaste Kultur, gleiche Lichtintensität; aber: 16:8 Std. Hell-Dunkel-Zyklus) ermittelte 'Growth Intensity' von $GI = 14.1$ pro 24 Stunden und rechnet sie auf Wachstumsraten um, so erhält man eine durchschnittliche Wachstumsrate von $\mu = 2.64$ pro Tag, was einer Wachstumsrate von $\mu = 0.110$ pro Stunde entspricht. Dieses verdeutlicht, daß unter fast gleichen Kulturbedingungen in Batch- wie in kontinuierlichen Kulturen die gleiche maximale Wachstumsrate erzielt werden kann.

Unter diesen hier gewählten Kulturbedingungen erreichte *Scenedesmus obliquus* bei 900 mg TS/l im Fermenter eine maximale Produktivität von 30.7 mg TS/l h. Diese hohe Produktivität der Algen ist nur unter Laborbedingungen möglich, wenn ausreichend Licht, CO_2 und Nährstoffe zur Verfügung stehen. So fand Fingerhut (1985) für *Scenedesmus falcatus* ein ähnlich hohes Produktivitätsmaximum von ca. 28 mg TS/l h bei einer Biomassekonzentration von 600 mg TS/l im Fermenter. Dagegen werden in halbtechnischen Anlagen wie dem HRAP (High Rate Algae Pond) unter optimalen Bedingungen höchstens 10 mg TS/l h als maximale Produktivität erreicht (Groeneweg, 1986; Hartig, 1986; Grobbelaar, 1984), so daß sich die Wachstumsraten der Algen in den Schüttelkolben doch mehr denen unter realistischen Bedingungen gefundenen Wachstumsraten annähern.

Ebenso wie die Produktivität stieg auch die Pigmentkonzentration im Fermenter, wobei sich das Verhältnis Chlorophyll zu Carotinoid zugunsten des Chlorophylls verschob. Aufgrund der steigenden Biomassekonzentration verringerte sich das Lichtangebot für jede einzelne Algenzelle, so daß in den Algen vermehrt Chlorophyll gebildet wird. Dieses konnte auch von Tamiya et al. (1953) und von Luther u. Grobbelaar (unveröffentl.) nachgewiesen werden. Oberhalb von der

Biomassekonzentration von 900 mg TS/l nahm der Pigmentgehalt wieder ab, was nur mit Nährstofflimitierung zusammenhängen kann.

Die Elimination des Sulfates aus dem Medium nahm ebenfalls mit steigender Biomassekonzentration bzw. Produktivität zu. Interessant ist, daß der prozentuale Schwefelgehalt nicht beim Produktivitätsmaximum am größten war, sondern bei der Biomassekonzentration von 212 mg TS/l. Auch nahm die Elimination nicht konstant zu, sondern näherte sich exponentiell einem Grenzwert von ca. 75% (0.0213mM/l h). Dieses kann nur so gedeutet werden, daß sich durch die verminderte Durchflußrate die externe Schwefelkonzentration im Fermenter erniedrigte, und, da die Aufnahmeraten des Sulfates von dieser Konzentration abhängen, immer geringere Mengen an Sulfat von den Algen aufgenommen werden konnten. Dazu kommt noch, daß bei hohen Biomassekonzentrationen auch Nährstofflimitierungen anderer Elemente auftreten, die die Sulfataufnahme behindert haben könnten.

Dagegen wuchsen die Algen mit 1- Naphthalinsulfonsäure eindeutig schwefellimitiert und zeigten Chlorose, wobei das Restsulfat des Mediums keinen Einfluß auf das Wachstum der Algen nahm. So konnte aber schon in der Einfahrphase gezeigt werden, daß Applikationen von kleinen Mengen an Sulfat die Chlorose der Algen beseitigten. Hier zeigt sich aber, daß die Pigmente Chlorophyll und Carotinoid wesentlich sensibler auf die Zufuhr von Sulfat reagieren als das Wachstum der Algen. So nahm die Pigmentkonzentration 10 Stunden früher zu als das Wachstum. Dieses ist auch verständlich, da zur Zellteilung viel Energie benötigt wird, welche durch die Photosynthese bereitgestellt wird. Ebenso zeigte die Elimination von 1- Naphthalinsulfonsäure aus dem Medium, daß diese bei Zugabe von Sulfat gesteigert werden kann.

Um diese Resultate mit denen des Sulfatversuches vergleichen zu können, wurde der Versuch dann nur noch mit 1- Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle weiterbetrieben. Das Wachstum der Algen reduzierte sich mit zunehmender Biomassekonzentration im Fermenter und war um bis zu 74% geringer als das mit Sulfat erzielte, wodurch sich auch die Produktivität im gleichen Umfang (maximale Produktivität bei der Biomassekonzentration von 500 mg TS/l) verminderte. Der geringe prozentuale Gehalt der Pigmente an der Biomasse entsprach größenordnungsmäßig dem, was in den Batchkulturen in dem Versuch mit 'S-freier'-Vorinkubation ermittelt wurde, wobei mehr Carotinoid als Chlorophyll in den Algen gemessen wurde. Diese chlorotischen Verhältnisse und die dadurch

gegebene Reduktion der Photosyntheseleistung war sicherlich auch der Grund für die eingeschränkte Wachstumsleistung der Algen. Die Elimination der Sulfonsäure aus dem Medium zeigte den gleichen Kurvenverlauf wie die Elimination des Sulfates. Mit zunehmender Biomassekonzentration nahm die Elimination zu. Es wurde aber nicht mehr als 15% der zugegebenen 1-NS (0.001mM/l h) eliminiert.

4.3 Die Optimierung der Desulfonierung von 1-Naphthalinsulfonsäure

In der Einfahrphase der Turbidostatversuche konnte gezeigt werden, daß die Desulfonierung unter kontinuierlichen Bedingungen durch die Addition von Sulfat gesteigert wurde. Daraufhin wurde versucht, diesen Effekt zu optimieren.

So nahmen mit zunehmender Sulfatkonzentration die Vitalität der Algen deutlich zu, was dadurch gekennzeichnet war, daß die Wachstumsrate und somit die Produktivität der Algen wieder die Werte erreichte, die bei der Inkubation mit Sulfat als Schwefelquelle gemessen wurde. Wie in den Batchkulturen wurden in den Algen höhere Pigmentkonzentrationen gemessen. Durch diese Zunahme der Vitalität nahm auch die Desulfonierungsrate von 1- Naphthalinsulfonsäure von 5.2% (0.0013mM/l h) auf 12.25% (0.0087mM/l h) zu, was einer Erhöhung auf das 2,35 fache entspricht. Über die Konzentration von 0.04 mM Sulfat im Medium hinaus nahm die Eliminationsleistung auf 9.5% (0.0072mM/l h) wieder ab. Da das Sulfat von den Algen nur bis zur Schwellenwertkonzentration aufgenommen wurde, konnte das Sulfat nicht vollständig eliminiert werden. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen in Batch gewonnenen, so sind die in den Batchkulturen gewonnenen nur vergleichbar mit den Ergebnissen von 0.04 mM und 0.06 mM Sulfat. Die Sulfatzugabe von 0.04mM Sulfat zu 0.217mM 1-NS in den Batchkulturen hätte aber dann dieselbe Wirkung, als ob in kontinuierlicher Kultur 0.04 mM Sulfat im Medium enthalten ist. In beiden Ansätzen führt diese Sulfatkonzentration zur maximalen Elimination der Sulfonsäure.

Bei der Inkubation der Algen bei verschiedenen pH-Werten zeigte sich dann, daß die Elimination der 1- Naphthalinsulfonsäure an das Wachstum bzw. an die Produktivität der Algen gebunden ist. So reduzierte sich das Wachstum der Algen wie auch die Pigmentkonzentration bei pH 9.0 auf 10% des bei pH 5.5 gemessenen

Wertes. In gleicher Weise wurde die 1- Naphthalinsulfonsäure aus dem Medium eliminiert. So wurde bei pH 5.5 11.51% (0.091mM/l h) der Sulfonsäure von den Algen eliminiert, bei pH 9.0 nur noch 2% (0.0005mM/l h). Im Gegensatz zeigt die Sulfataufnahme der Algen eine eindeutige Übereinstimmung mit dem, was in der Literatur als pH-Aufnahmemaximum für die Algen in Kurzzeitmessungen ermittelt wurde (Ullrich-Eberius, 1976), und auch von mir für *Scenedesmus obliquus* gefunden wurde. Die Sulfataufnahme ist bei pH 7.5 am höchsten (0.00316mM/l h).

Aufgrund des Ergebnisses, das die Elimination der 1-NS von dem Wachstum abhängt, wurden dann die Algen in einem Chemostaten mit kontrollierter Biomassenrückführung kultiviert, mit dem Ziel, die Produktivität zu steigern. In einem solchen System ist es möglich, unabhängig von dem Biomassewachstum Medium in das Kulturgefäß zu geben, und dadurch die Nährstofflimitierung aufzuheben. Dieses System wurde in der Theorie schon 1961 von Herbert postuliert und von Pirt (1970) an Hefen experimentell nachgewiesen. Pirt sprach sich damals dafür aus, ein System zu konstruieren, bei dem - wie in diesem Versuchsaufbau - ein organismenfreier Mediumsauslauf sein sollte, wodurch nicht unkontrolliert Biomasse aus dem System entfernt wird.

Da die Biomassekonzentration im Fermenter gegenüber den vorherigen Versuchen deutlich erhöht wurde, wurde die Sulfatkonzentration im Medium auf 0.0703 mM erhöht. Bei der Biomassekonzentration von 1.7 g TS/l wurden bei den zwei verschiedenen Durchflußraten Produktivitäten von 38 mg TS/l h (60 ml/h Durchflußrate) bzw. 49 mg TS/l h (80ml/h Durchflußrate) erreicht. Die Pigmentkonzentration stieg bei weiterer Biomasseerhöhung noch weiter an. Die Elimination der 1- Naphthalinsulfonsäure folgte der Produktivität der Algen. So zeigte bei 80 ml/h Durchflußrate die Elimination der Sulfonsäure ein Maximum von 32.28% (0.025mM/l h), bei 1.7 g TS/l Biomassekonzentration, während bei 60 ml/h Durchflußrate die Elimination mit 30% (0.016mM/l h) nahezu konstant blieb. Die zurückgehende Eliminationsleistung bei 2.4 g TS/l Biomasse wurde darauf zurückgeführt, daß die Algen sulfatlimitiert waren und sich somit wieder im suboptimalen Bereich der Desulfonierung befanden (vgl. Kap. 3.2.3).

So wurde die Sulfatkonzentration noch einmal auf 0.102 mM Sulfat im Medium erhöht. Leider konnte die hohe Durchflußrate (80ml/h) nicht mehr aufrecht erhalten werden, da der Filter sich zusetzte, und so nur noch die niedrige Durchflußrate von 60 ml/h zuließ. Die Produktivität konnte bei niedriger Biomassekonzentration von 2.3 g TS/l noch um 16% auf 42 mg TS/l h gesteigert werden, nahm aber dann mit zunehmender Biomassekonzentration bis auf 10.5 mg TS/l h ab. Den gleichen

Verlauf nahm die Elimination der Sulfonsäure, wobei die Eliminationleistung von 33% (0.0185mM/l h) auf 1.5% (0.000015mM/l h) zurückging. Vergleicht man die Ergebnisse des Turbidostatversuches mit Sulfat als S-Quelle und ohne Biomasserückführung mit diesen hier gewonnenen, so wird in diesem System eine Produktivitätssteigerung von über 60% erreicht (30mg TS/l h gegenüber 49 mg TS/l h), wobei die Algen auch noch bei sehr hohen Biomassekonzentrationen wachsen konnten. Dieses wurde auch von Pirt u. Kurowski (1970) und Weisman und Benemann (1979) gezeigt. Weisman und Benemann konnten mit dem Cyanobakterium *Spirulina geitheri* in einem Chemostaten mit Biomasserückführung zeigen, daß bei hohen Biomassekonzentrationen das Licht der einzig limitierende Faktor ist, wie es auch hier der Fall gewesen war.

4.4 Transport von Sulfat und 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenzelle

In Kurzzeitversuchen konnte gezeigt werden, daß Sulfat wesentlich schneller von *Scenedesmus obliquus* aufgenommen wird als die 1-Naphthalinsulfonsäure. Während mit Sulfat die Algen nach 10 Minuten schon equilibriert waren, dauerte es mit der Sulfonsäure nahezu 90 Minuten. Während für die Aufnahmegeschwindigkeit des Sulfates genügend Literatur vorhanden ist, wo für verschiedene Algen eine entsprechende Aufnahme rate beschrieben wurde (z.B. Utkilen et al, 1976: *Anacystis nidulans*; Wedding u. Black, 1960: *Chlorella*), gibt es für die Aufnahme organischer Schwefelverbindungen nur vereinzelt Literatur (Biedlingmaier u. Schmidt, 1986, 1987). Dadurch daß Sulfat so schnell aufgenommen wird, wird auch klar, daß die Alge bei einem Sulfat-Sulfonsäure-Gemisch bevorzugt Sulfat aufnimmt. Da aber auch die Sulfonsäure im Medium ist, wird diese trotz höherer Konzentration im Medium gleichzeitig, aber langsamer aufgenommen. Anhand der Berechnung der Anreicherung des Sulfates und der Sulfonsäure in den Algenzellen kann man davon ausgehen, daß die Aufnahme energieabhängig ist, da eine höhere Konzentration in den Algen errechnet wurde als sich im Medium befand. Sowohl für Sulfat wurde die aktive Aufnahme für verschiedene Algen nachgewiesen (Wedding u. Black, 1976: *Chlorella*; Kylin, 1964: *Scenedesmus*; Ramus u. Graves, 1974: *Porphyridium*; Deare u. O'Brien, 1975 *Monocystis*; Utkilen et al., 1976: *Anacystis*), als auch für organische Schwefelverbindungen wie

Ethensulfonat (Biedlingmaier u. Schmidt, 1987). Ebenso zeigte sich, daß die Aufnahme von Sulfat wie Sulfonsäure bei pH 7.5 am höchsten war, was eben von den o.g. Autoren auch angegeben wird. Da bei Na^+ und K^+ keine signifikante Reduktion der Aufnahme festgestellt wurde, kann ein Cotransport ausgeschlossen werden. Dagegen bewirkt eine Erniedrigung oder Erhöhung des Membranpotentials durch Zugabe von Valinomycin eine extreme Hemmung der Aufnahme des Sulfates wie der Sulfonsäure.

Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, daß sowohl für Sulfat wie für Sulfonsäure eine "Permease" in der Zelle vorhanden sein muß. Dieses wird auch von Biedlingmaier u. Schmidt (1987) für den Transport von Taurin und Ethensulfonat postuliert. So könnte man erklären, warum in den Versuchen mit Sulfat-Sulfonsäure-Gemisch die Algen bevorzugt Sulfat aufnehmen, aber auch gleichzeitig Sulfonsäure.

So könnte man sich folgenden Mechanismus vorstellen:

Auch wenn Sulfat bevorzugt in die Zelle transportiert wird, wird auch Sulfonsäure in die Zelle transportiert, aber wesentlich langsamer. Da der Transport abhängig ist vom Bedarf der Alge an Schwefel, werden beide durch die interne Schwefelkonzentration reguliert. So wäre auch zu verstehen, daß bei der Inkubation in den Sulfat-Sulfonsäuremedien beide Substanzen weniger aufgenommen werden. Da weder die eine noch die andere Schwefelart den Transport des anderen unterbinden kann, kann man eine Hemmung ausschließen.

4.5 Enzymatische Desulfonierung

Durch die Reinigung des Zellrohextraktes bis zur Ausschlußchromatographie, bei der Moleküle mit einem Molekulargewicht größer als 5000 von niedermolekularen Substanzen getrennt werden können, konnte nachgewiesen werden, daß die Desulfonierung nicht durch Zellwandbestandteile oder Oligopeptide, sondern durch ein oder mehrere Enzyme katalysiert wird. Mittels der gleichen Reinigung konnte Endo et al. (1977) nachweisen, daß Benzoesulfonat im Bakterienzellextrakt durch Enzyme degradiert wird. Dagegen konnte Zürrer (pers. Mitteilung) keine Enzymaktivität feststellen, wenn er die Bakterien, die mit Naphthalinsulfonsäuren

als Schwefelquellen wuchsen, aufbrach. Die Haltbarkeit des Algenrohextraktes war mit 3 Tagen bei 7°C relativ lang, konnte aber bei -4°C noch einen Tag länger erhalten werden. Inkubiert man den Zellextrakt bei verschiedenen Temperaturen, so findet man die höchste Aktivität bei 35 °C. Dieses Optimum wurde auch für das Wachstum von *Scenedesmus obliquus* ermittelt (Hegewald, 1982). Da in kontinuierlichen Kulturen nachgewiesen wurde, daß die Elimination von 1- Naphthalinsulfonsäure an die Biomasseproduktion der Algen gebunden ist, ist es verständlich, daß die enzymatische Desulfonierung das gleiche Temperaturoptimum haben muß wie das Wachstum der Algen.

Die Desulfonierungsrate des Algenrohextraktes ist naturgemäß abhängig von der 1-Naphthalinsulfonsäurekonzentration (Michaelis-Menten-Beziehung). So wurde für die Desulfonierung ein K_m -Wert von 0.511 mM ermittelt; die Umsatzgeschwindigkeit war vom Proteingehalt abhängig (1g/l Proteinlg.: $V_{max} = 0.96$ mM; 0.1g/l Proteinlg.: $V_{max} = 0.35$ mM).

Nachdem von Soeder et al. (1987) schon 1-Naphthol aus dieser Reaktion gefunden wurde, wurde als weiteres Abbauprodukt Sulfit gefunden. Die Geschwindigkeit der Zunahme des Sulfits war reziprok der Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure. Als Summe an Sulfit wurden 0.035 mM gemessen gegenüber einer Abnahme von 0.045 mM 1- Naphthalinsulfonsäure. Die höhere Abnahme der Sulfonsäure kann nur dadurch erklärt werden, daß bei der Proteinfällung ein Teil der Sulfonsäure mitausgefällt wurde.

Die entstandenen Abbauprodukte deuten daraufhin, daß 1- Naphthalinsulfonsäure durch eine Monooxygenase katabolisiert wird. wobei die Desulfonierung durch die Zugabe des Cofaktor NADH noch gesteigert werden. Die Problematik des Sulfits ist, daß es in Anwesenheit von Sauerstoff schnell zu Sulfat oxidiert wird. Ebenso kann durch Sulfatmeßung bewiesen werden, daß NADH die Reaktion deutlich steigern kann. Da nur geringe Mengen an Sauerstoff benötigt werden, war es auch nicht möglich, die Abnahme des gelösten Sauerstoffes im Medium zu messen. Als Möglichkeit, den Einbau des Sauerstoffes zu verfolgen, bliebe nur die ^{18}O -Methode.

4.6 Abbauprodukte des Desulfonierung

Da die Menge an abgebauter 1- Naphthalinsulfonsäure nicht gegen die Zunahme des gebildeten 1-Naphthols bilanziert werden konnte, wurde zum einen nach weiteren Abbauprodukten des 1-Naphthols gesucht, zum anderen, ob vielleicht noch ein anderer Abbauweg existiert, der durch eine Dioxygenase katalysiert wird und als Produkt 1,2-cis (oder -trans)-Dihydroxynaphthalindiol entsteht.

Es wurden als Folgeprodukte von 1-Naphthol nur 1-Hydroxy-4-Tertralon und 1,4-Naphthochinon gefunden. Diese bilden sich abiotisch aufgrund des gelösten Sauerstoffs, wie dieses auch von Lamberton u. Claeys (1970) gefunden wurde. Diese waren aber quantitativ ebenso im geringen Maße vorhanden, so daß man davon ausgehen muß, daß diese weiter polymerisieren. Dieses wurde von mir in meiner Diplomarbeit (1984) auch gezeigt, wo die Inkubation von 1-Naphthol zu Kolloiden führte, die bei einer Wellenlänge von 570nm meßbar waren.

Daß der andere mögliche Abbauweg über das 1,2-cis (oder -trans)-Dihydroxydiol nicht nachgewiesen werden konnte, ist nicht überraschend, denn es ist unwahrscheinlich, daß ein Organismus für den Abbau von Xenobiotica zwei verschiedene Abbauwege besitzt.

Faßt man die Ergebnisse der beiden vorherigen Abschnitte zusammen, so kann man folgendes Schema des Abbaues der 1- Naphthalinsulfonsäure aufstellen, wie es in Abb. 87 dargestellt ist. Da die Reaktion von einer Monooxygenase katalysiert wird, muß man davon ausgehen, daß als erstes Produkt das Naphthalinsulfonsäureepoxid entstehen muß (NIH-shift, siehe dazu: Dealey et al., 1972). Die nachfolgenden Reaktionen entstehen dann spontan, wobei die Milieubedingungen diese Reaktionen begünstigen (Lamberton u. Claeys, 1970).

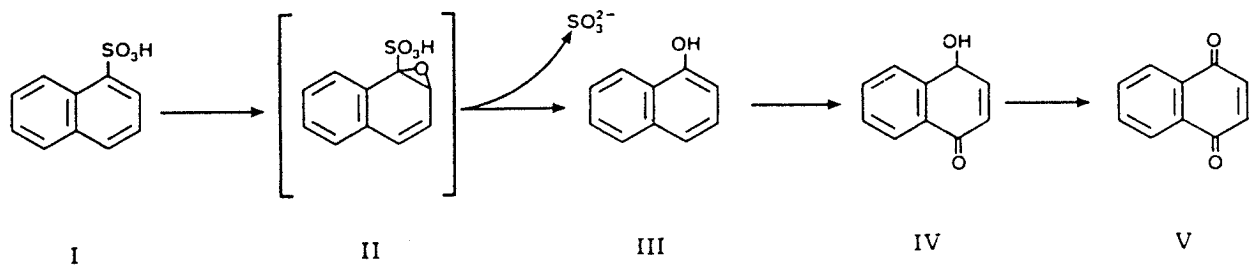


Abb. 87. Schema des Abbauweges der 1-Naphthalinsulfonsäure:

- I = 1-Naphthalinsulfonsäure
- II = 1-Naphthalinsulfonsäureepoxid (nicht identifiziert)
- III = 1-Naphthol
- IV = 1-Hydroxy-4-Tetralon
- V = 1,2-Naphthochinin

4.7 Einordnung der Desulfonierung in den biologischen Zusammenhang

Sulfonsäuren allgemeiner Art sind Inhaltsstoffe zahlreicher Organismen. So findet man in tierischen Zellen Taurin (Ethanolaminsulfonsäure) (Howell u. Frievitsch, 1968) oder Isothionsäure (Davidson, 1956), in Pflanzenzellen Methansulfonsäure (Bersin, 1956) und Zuckersulfonsäuren (Richard, 1965, Benson, 1963). Diese Zuckersulfonsäuren sind an Fettsäuren gebunden und werden somit Sulfolipide genannt, die bis zu 5% der Chloroplastenmembran bei Grünalgen ausmachen können (Hoppe u. Schwenn, 1981). Ihre physiologische Bedeutung speziell des SQDG (1,2-diacyl-[6-sulf- α -D-quinovo-pyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-sn-glycerol) besteht in der Interaktion mit den Chlorophyllmolekülen (Trosper u. Sauer, 1968). Bei heterotropher Ernährung von *Chlorella pyrenoidosa* wurde kein Sulfolipid gefunden, auch wenn Chlorophyll vorhanden war; die Photosynthese brach weitestgehend zusammen. Heinz u. Harwood (1977) vermuteten durch radioaktive Einbauversuche, daß Sulfolipide auch eine Rolle im S-Metabolismus spielen müßten. Über den Aufbau solcher Sulfolipide ist einiges bekannt (Harwood, 1980), dagegen nichts über den Abbau. Man weiß nur, daß in den Algen ^{35}S -markierte Sulfonlipide bei Schwefelmangel abgebaut werden müssen, da sich dieser Gehalt verringert (Sandmann u. Böger, 1982; Busby u. Benson, 1973).

Die Möglichkeit der Algen, ohne Adaptation Sulfonsäuren wie Naphthalinsulfonsäuren, Ethensulfonat, LAS als Schwefelquelle zu nutzen, d.h. diese Substanzen zu desulfonieren, könnte im Zusammenhang stehen mit der Metabolisierung von Sulfonlipiden oder Methansulfonat. Da bei diesen Substanzen die Sulfogruppe direkt an das Kohlenstoffmolekül substituiert ist, wäre es nicht unwahrscheinlich, wenn diese durch ein und dasselbe Enzym desulfoniert werden. Die Geschwindigkeit des Abbaues wäre aber dann nicht nur bestimmt durch die Enzymaktivität, sondern durch den Transport solcher Substanzen in die Algenzellen. Zur Beantwortung beider Fragestellungen müßten aber noch weitere Forschungen betrieben werden, wie z.B. Enzymisolation, Aufklärung des Transportsystems.

4.8 Ausblick für die Abwasserreinigung

Naphthalinsulfonsäuren wie auch andere Waschmitteltenside stellen für den Abbau in Kläranlagen große Probleme dar, da sie entweder nur partiell oder gar nicht abgebaut werden können (Quentin, 1978; Zahn u. Wellens, 1980; Grobler u. Miess, 1987). Bakterien, die diese Substanzen total abbauen können, müssen aber vorher speziell selektioniert werden (Brilon et al., 1983; Zürrer, pers. Mitteilung), wobei sie auch in Gegenwart von anderen Kohlenstoff- bzw. Schwefelquellen diese Aktivität verlieren. Grünalgen wie *Scenedesmus obliquus* dagegen sind in der Lage, solche Substanzen zu desulfonieren und somit dem bakteriellen Abbau zugänglich zu machen. Dabei unterstützt Sulfat, welches bei der Synthese der Sulfonsäuren auch als Abfallprodukt anfällt, bis zu einem gewissen Grad die Desulfonierung.

Speziell Naphthalinsulfonsäuren fallen als Abfallprodukt bei der Synthese von Farbstoffen an (Schweitzer, 1964; Ullmann, 1979) und geraten somit ins Abwasser. Es wäre interessant, ein Abwassersystem aus Algen und Bakterien zu konstruieren, um solche Prozeßabwässer abzubauen. Dabei ist wichtig, das System so zu optimieren, daß die Algen möglichst wenig organische Substanzen exkretieren, so daß die Bakterien gezwungen sind, die Abbauprodukte aus der Desulfonierung als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Denn betrachtet man den Kohlenstofffluß in einem Algen-Bakterien-Mischsystem, so können Algen einen signifikant großen Teil des bei der Photosynthese fixierten Kohlenstoffes als gelösten Kohlenstoff in Medium abgeben, was von den Bakterien genutzt werden kann (Fingerhut, 1985).

Wie aus den Versuchen mit den radioaktiven Substanzen zu ersehen war, wurde die 1- Naphthalinsulfonsäure besser von den Algen aufgenommen als die 2- Naphthalinsulfonsäure. Da in Prozeßabwässern mehrere Sulfonsäuren in unterschiedlichster Konzentration enthalten sind, müßte man untersuchen, ob die verschiedenen Sulfonsäuren gleichzeitig oder nacheinander desulfoniert werden.

Darüberhinaus müßten im Freiland auch Untersuchungen stattfinden, um zu untersuchen, ob die Desulfonierungsfähigkeit der Algen auch unter solchen Bedingungen erhalten bleibt.

Wünschenswert wäre es, da die Desulfonierung mit dem Biomassenzuwachs einhergeht, diese Aktivität von der Produktivität abkoppeln zu können. Dann wäre es möglich, die Algen zu immobilisieren und eine zusätzliche Biomasseproduktion zu verhindern. Mir scheint dieses aber nur möglich, indem man sich der Gentechnologie bedient.

5.0 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nutzung von Sulfat und 1- Naphthalinsulfonsäure als Schwefelquelle für die Grünalge *Scenedesmus obliquus* untersucht.

In den Batchversuchen zeigten die Algen eine Abhängigkeit von der eingesetzten Anfangskonzentration der Schwefelquellen. Diese Abhängigkeit äußerte sich in den Wachstumsraten, den Pigmentgehalten der Algen und ihrer Eliminationsleistung. Mit 1-NS als Schwefelquelle wiesen die Algen nur 80% der Wachstumsraten auf, als mit Sulfat als S-Quelle.

Nicht eindeutig konnte der Einfluß des durch andere Chemikalien eingetragenen Restsulfates auf das Wachstum der Algen und auf die Desulfonierung der 1-NS geklärt werden. In den ersten 2 Stunden des Versuches wurde 0.0083mM Sulfat aus dem Medium eliminiert, gleichzeitig aber auch 0.004mM 1-NS.

Für Sulfat wie Sulfonsäure wurden die Halbsättigungskonstanten K_s ermittelt. Sie betrug für Sulfat $K_s = 0.0063\text{mM}$ und für 1-NS $K_s = 0.038\text{mM}$. Dabei konnten immer Schwellenwertkonzentrationen nachgewiesen werden, ab denen die Algen nicht in der Lage waren, diese Substanzen aufzunehmen (Für Sulfat = 0.0063mM ; für 1-NS = 0.038mM).

Bei gleichzeitiger Gabe von Sulfat und Sulfonsäure konnte das Wachstum von *Scenedesmus obliquus* gegenüber nur mit 1-NS als S-Quelle gesteigert werden, erreichte aufgrund des deutlich höheren Pigmentgehaltes aber nicht die in sulfathaltigem Medium ermittelten Wachstumsraten. Die Elimination von Sulfat und Sulfonsäure wurde durch die Anwesenheit der anderen jeweils anderen Schwefelquelle vermindert.

Die Überprüfung der Aufnahme von Sulfat und Sulfonsäure durch Tracerexperimente zeigte eine gute Übereinstimmung der Abnahmerate aus dem Medium zu den Einbauraten des ^{35}S in die Algenzellen. Der Kohlenstoffring selbst wurde nicht in die Biomasse eingebaut.

In den Turbidostatversuchen wuchs *Scenedesmus obliquus* unter den gewählten Bedingungen mit Sulfat als S-Quelle mit der höchsten Wachstumsrate von $D = 0.104\text{ h}^{-1}$. Da die Algen lichtlimitiert wuchsen, nahm mit zunehmender Biomassekonzentration im Fermenter die Wachstumsrate ab. Die Pigmentgehalt der

Algen dagegen erhöhte sich. Ebenso wurde bis zu 70% der eingesetzten Menge an Sulfat eliminiert.

Mit 1-NS als Schwefelquelle zeigten die Algen starke Chlorosen, die auf die schlechte Verwertbarkeit von 1-NS unter diesen Bedingungen zurückgeführt wurde. So wurde nur noch eine Wachstumsrate von $D = 0.04 \text{ h}^{-1}$ ermittelt, wobei der Pigmentgehalt der Algen sich extrem verringerte, und nur noch eine 1-NS-Elimination 14% (0.001 mM/l h) der eingesetzten Menge erreicht wurde.

Stellte man sowohl Sulfat als auch 1-NS den Algen zur Verfügung, so erreichten die Algen wieder die nur mit Sulfat als S-Quelle ermittelten Wachstumsraten, wobei die Desulfonierung auf das 2.35-fache (0.0087 mM/l h) gesteigert werden konnte.

Bei Inkubation bei verschiedenen pH-Werten von 5.5 bis 9.0 zeigte sich deutlich, daß die Algen CO_2 als Hauptkohlenstoffquelle nutzen. Bei Verschiebung des pH-Werte in alkalische Milieu nahm der CO_2 -Pool und somit die Wachstumsrate der Algen ab. Während die Desulfonierung von 1-NS an die Produktivität der Algen gekoppelt war, war hingegen die Sulfataufnahme vom pH-Wert abhängig und wurde bei pH 7.5 am meisten aufgenommen.

In einem neuartig konstruierten Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung, wodurch die Nährstoffversorgung von dem Biomassewachstum abgekoppelt wurde, konnte aufgrund der hohen Produktivität der Algen die Desulfonierungsrate auf 35.28% (0.0251 mM/l h) gesteigert werden. Bei Biomassenkonzentrationen über 2.3 g TS/l im Fermenter nahm die Produktivität der Algen aufgrund der Lichtlimitierung deutlich ab, wodurch die Desulfonierung sich im gleichen Maße verminderte.

Durch Kurzzeitversuche mit radioaktiv markierter ^{35}S -1-NS und ^{35}S -Sulfat konnte gezeigt werden, daß die Sulfonsäure deutlich langsamer aufgenommen wurde als das Sulfat.

Der Transport in die Algenzellen war energieabhängig und bei pH 7.5 optimal. Während die Kationen Na^+ und K^+ nicht zum Cotransport bei der Aufnahme von Sulfat bzw. 1-NS benötigt werden, wurde die Aufnahme durch Membranpotentialerhöhung und -Erniedrigung deutlich eingeschränkt.

In den Versuchen mit Zellrohextrakt konnte nachgewiesen werden, daß die Desulfonierung durch Enzyme katalysiert wurde, deren Haltbarkeit je nach Lagerung

3 bis 4 Tage betrug und ihr Aktivitätsoptimum bei 35°C hatten. Die Enzymaktivität konnte durch den Cofaktor NADH deutlich gesteigert werden.

Als Abbauprodukt wurde Sulfit nachgewiesen, dessen Freisetzung ins Medium der Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäure entsprach. Als Sekundärmetabolit des Sulfits trat zeitlich verzögert Sulfat auf.

Durch den Nachweis von 1-Hydroxy-4-Tetralon und 1,4-Naphthochinon konnte auch Sekundärmetabolite des 1-Naphthols identifiziert werden, die aufgrund der Milieubedingungen entstehen.

Durch die Identifikation der beiden Primärprodukte wurde postuliert, daß die Desulfonierung von 1-Naphthalinsulfonsäure durch eine Monooxygenase katalysiert sein muß.

6.0 Literaturverzeichnis

Beale, S.I. u. Appleman, D. :

Chlorophyll synthesis in *Chlorella*: regulation by degree of light limitation of growth

Plant Physiol., 47, S.230-235, 1971

Benson, A.A. :

The plant sulfolipid

Adv. Lip. Res., 1, S.387-392, 1963

Biedlingmaier, S. u. Schmidt, A. :

Arylsulfonic acids as some s-containing detergents as sulfur sources for *Chlorella fusca*

Arch. Microbiol., 136, S.124-130, 1983

Biedlingmaier, S. u. Schmidt, A. :

Characterization of the non-constitutive ethensulfonate uptake in *Chlorella fusca*

Biochim. et Biophys. Acta, 861, S.95-104, 1986

Biedlingmaier, S. u. Schmidt, A. :

Utilization of sulfonic acids as the only sulfur sources for growth of photosynthetic organisms

Planta, 169, S.62-68, 1986

Biedlingmaier, S. u. Schmidt, A. :

Depression of arylsulfonate activity by sulfate depression

Z. Naturforsch., 42c, S.330-336, 1987

Biedlingmaier, S. u. Schmidt, A. :

Uptake and metabolism of taurine in the green alga *Chlorella fusca*

Physiol. Plantarum Copenhagen, 70, S.688-696, 1987

Bolze, A. :

Über das Auftreten extracellulärer organischer Substanz in Synchronkulturen der Grünalge *Scenedesmus acutus*

GSF-Bericht AF 35, Mai 1976

Bradford, M. M.:

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding

Ana. Biochem., 72, S.248-254, 1976

Briedlingmeyer, B.A. :

Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases

J. Chrom. Science, 103, S.311- , 1975

Brilon, C., Beckmann, W., Knackmuss, H.-J. :

Enrichment and isolation of naphthalene-sulfonic-acid-utilizing *Pseudomonas*

Appl. Environm Microbiol., 42, S.39-43, 1981

Brilon, C., Beckmann, W., Knackmuss, H.-J. :

Catabolism of naphthalenic acids by *Pseudomonas* sp.A3 and

Pseudomonas sp. C22

Appl. Environm Microbiol, 42, S.44-49, 1981

Brinkmann, G. u. Kühn, R.:

Quantitative Bestimmung der biologischen Schadwirkung herbizider

Phenylharnstoffderivate gegen Algen

Gwf Wasser/Abwasser, 115(8), S. 364-381, 1974

Brinkmann, G. u. Kühn, R.:

Grenzwerte der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Bakterien und Grünalgen im Zellvermehrungstest,

Z. f. Wasser- und Abwasserforsch., 10(3), S.87-97, 1977

Bursby, W.F. u. Benson, A.A. :

Sulfonic acid metabolism in the diatom

Plant and Cell Physiol., 14, S. 1123-1132, 1973

Button, D.K. :

Kinetics of nutrient-limited transport and microbial growth

Microbiol. Reviews, S.270-297, 1985

Cerniglia, C.E. :

Aromatic Hydrocarbons:

Metabolism of bacteria, fungi and algae

In: Reviews in Biochemical Toxicology, E. Hodgen et al (eds.)

Elsevier, 5, S.321-348, 1980

Cerniglia, C.E. :

Oxidation of biphenyl by the cyanobacterium *Oscillatoria* ssp.strain JCM.

Arch Microbiol., 125, S.203-207, 1980

Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., v. Baalen :

Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae

J. Gen. Microbiol., 116, S.495-500, 1980

Cerniglia, C.E., Miller, D.W., Yang, S.K., Freeman, J.P. :

Effect of a fluoro substituent on the fungal metabolism of 1-fluoronaphthalene

Appl. Environm Microbiol, 48(2), S.294-300, 1984

Cook, A.M., Hütter, R. :

Ametryne, prometryne and methylsulfonic acid as sulfur sources for bacteria

Experientia, S.1231-1232, 1981

Cook, A.M., Schmuckle, A., Leisinger, T. :

Microbial desulfonation of multisubstituted naphthalenesulfonic acids

Experientia, 42, S.95-96, 1986

Czgan, F.-Ch. :

Untersuchungen über die Nitratreduktion der Grünalge *Ankistrodesmus braunii*
in vivo und in vitro

Planta, 60, S.225-240, 1963

Davidson, A.N. :

Amino acid decarboxylases in rat brain and liver

Biochim.Biophys. Acta, 19, S.72-80, 1956

Deare, E.M., O'Brien, R.W. :

Uptake of sulfate, taurine, cysteine and methionin by symbiotic and free-living
dinoflagellates

Arch. Microbiol., 105, S.295-301, 1975

Endo, K., Kondo, H., Ishimoto, M. :

Degradation of bezenesulfonate to sulfite in bakterial extrakt

J. Biochem, 82, S.1397-1402, 1977

Ensley, B.D., Gibson, D.T., Laborda, A.I. :

Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from

Pseudomonas sp. strain NCID 9816

J. Bacteriol., 149, S.948-954, 1982

Ferri, C. :

Reaktionen der chemischen Synthese

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.165-166, 1978

Fingerhut, U. :

Wachstum und Zusammenwirken von *Scenedesmus falcatus* und

Pseudomonas aeruginosa bei chemostatischer Kultur in acetathaltigem

Modellabwasser

KFA-Jülich, Jül-1999, 1985

Galassi, S. u. Vighi, M.

Testing toxicity of volatile substances with algae

Chemosphere, 10, S.1113-1121, 1981

Gesetz über die Umweltverträglichkeit von Wasch- und Reinigungsmittel

(Waschmittelgesetz)

BGBL I S.2255 (20.August 1973)

Fassung vom Dezember 1986, S.2615

Goebel, A. :

Über das Wachstum und die Konzentration extrazelluläre organischen

Substanz in Synchronkulturen der Grünalge *Scenedesmus obliquus* (Stamm 276-3a)

Diplomarbeit, RUB-Bochum, 1987

Goßler, K. u. Miess, R. :

Verhalten von linearen Alkylbezolsulfonaten aus Haushaltwassermitteln bei der

Abwasserbehandlung - Literaturstudie -

Landesgewerbeanstalt Bayern, Heft 5, 1987

Grant, W.M. :

Colorimetric determination of sulfur dioxide

Ana. Chem., S345-346, 1947

Grobbelaar, J.U., Soeder, C.J., Stengel, E. :

Modelling algae productivity and oxygen production in large outdoor cultures

Jül.-Spez. 282, 1984

Groeneweg, J. u. Soeder, C.J. :

An improved culture tube for axenic cultures of microalgae

Br. Phycol. J., 13, S.337-340, 1978

Groeneweg, J. :

Untersuchung zur Behandlung von Schweineflüssigmist in Algengräben

Diss Uni Essen GHS, 1986

Haberer, K. :

Physikalische und chemische Eigenschaften des Wassers

Handbuch d. Lebensmittelchemie, 8.Aufl., S.1-50, 1970

Hartig, P. :

Modellversuche zur O₂ und Biomasseproduktivität in unbelüfteten

oxystatisch betriebenen Abwasserteichen: Untersuchungen an einem

neuartigen Bio-Reaktor

Diplomarbeit, RUB-Bochum, 1986

Harwood, J.L.

Sulfolipids

In: Biochemistry of Plants, P.K. Stumpf u. E.E. Conn (eds.)

vol. IV, S.301-320, 1980

Hegewald, E.:

Taxonomisch-morphologische Untersuchungen von *Scenedesmus*-Isolaten aus

Stammsammlungen

Arch. Hydrobiol/Suppl., 60 S.375-389, 1982

- Heinz, E. u. Harwood, J.L. :
Incorporation of carbon dioxide, acetate and sulfate into the glycerolipids of
Vicia faba leaves
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 358, S.897-908, 1977
- Hellebrust, J.A. u. Craigie, J.S. :
Handbook of phycological methods
Cambridge University Press, S.64-70, 1978
- Herbert, D. :
A theoretical analysis of continuous culture systems
In: Continuous Culture, Monograph no. 12.,
Society of Chemistry and Industry, London,
S.21-53, 1961
- Hoffmann, N.E., und Liao, J.C.
Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with
nonpolar stationary phases
Anal. Chromatogr., 142, S.2231- , 1977
- Hoffmann, K.H.
Oxidation of naphthalene by *Saccharomyces cerevisiae* and
Candida utilis
J. Basic Microbiol., 26, S.109-111, 1986
- Höll, A. :
Wasser
6.Aufl., de Gruyter, Berlin, 1979
- Hodson, R.C., Schiff, J.A., Mather, J.P. :
Studies of sulfate utilization by algae
Plant Physiol., 47, S.306-311, 1971
- Hoppe, W., Schwenn, J.D. :
In vitro biosynthesis of the plant sulfolipid: on the origin of the
sulfonate group
Z. Naturforsch., 36c, S.820-826, 1981
- Hovarth, C., Melander, W., Molnar, I. :

Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases

J. Chromatogr., 125, S.129- , 1976

Hovarth, C., Melander, W., Molnar, I. :

Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases

Ana. Chem., 49, S.2295-2303, 1977

Howell, L.G. u. Friovitch, I. :

Sulfite: cytochrome c oxidoreductase

J. Biol. Chem., 243, S.5941-5954, 1968

Jacobson, S.N., Alexander, M. :

Enhancement of the microbial dehalogenation of a model chlorinated compound

Appl. Environ. Microbiol., 42, S.1062-1066, 1981

Jentsch, Ch. :

Chemische Zusätze in Motorölen

Chemie in unserer Zeit, 12, S.57-62, 1978

Kissinger, P.T. :

Comments on reverse-phase ion-pair partition chromatography

Ana. Chem., 49, S.883, 1977

Knackmuss, H.-J., Beckmann, W., Dorn, E., Reinecke, W. :

Zum Mechanismus der biologischen Persistenz von halogenierten und sulfonierten Kohlenwasserstoffen

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Org., B 162, S.127-137, 1976

Kondo, H., Ishimoto, M. :

Enzymatic formation of sulfite and acetate from sulfoacetaldehyde, a degradation product of taurine

J. Biochem., 72, S.477-484, 1972

Krauss, F. u. Schmidt, A. :

Sulfur sources of growth of *Chlorella fusca* and their influences on
key enzymes of sulfur metabolism

J. Gen. Microbiol., 133, S.1209-1219, 1987

Kulla, H.G., Klausener, F., Meyer, U., Lüdecke, B., Leisinger, T. :

Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the
azo dyes orange I and orange II

Arch Microbiol., 135, S.1-7, 1983

Kylin, A. :

The influence of phosphate nutrition on growth and sulfur metabolism
of *Scenedesmus*

Physi. Plantarum, 17, S.384-402, 1964

Lamberton, J.G. u. Claeys, R.R. :

Degradation of 1-naphthol in sea water

J. Agr. Food Chem., 18, S.92-94, 1970

Lange, B. u. Vedelek, Z.J. :

Photometrische Analysen

Verlag Chemie, S.388-389, 1980

Langowska, I. u. Zawadzki, Z. :

The effect of the illumination of growth of *Scenedesmus obliquus* (Sc.449)

Polskie Archiwum Hydrobiologii, 26(3), S.257-266, 1979

Lehninger

Biochemie

Verlag-Chemie, 1979

Luther, M. und Grobbelaar, J.U. unveröffentlicht

Luther, M., Soeder, C.J. :

Some naphthalenesulfonic acids as sulfur sources for the green microalgae,
Scenedesmus obliquus

Chemosphere, 16(7), S.1565-1578, 1987

Luther, M. :

Die Desulfonierung von Naphthalinsulfonsäuren durch die Grünalge
Scenedesmus obliquus Gött. 376-3a
Diplomarbeit, RUB-Bochum, 1984

Malle, K.-E. :
Wie schmutzig ist der Rhein?
Chemie in unserer Zeit, 12, S.111-118, 1978

Nusch, E.A. :
Comparision of different methods for chlorophyll and phaeophytin determination
Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol., 14 S.14-36, 1980

OECD
Guidelines for testing substances
1983

O'Kelley, J.C. :
Inorganic Nurients
In: algae physiology and biochemistry, Stewart, W.D.P. (eds.)
Blackwell Scientific Publications, Oxford, S.610-635, 1974

Payer, H.D. u. Trültzsch, U.
Beitrag zur Versorgung dichter Kulturen von Grünalgen mit Mangan, Vanadium
und anderen Spurenelementen
Arch. Microbiol., 84, S.43-59, 1972

Pirt, S.J. u. Kurowski, W.M. :
An extention of the theory of the chemostat with feedback of organisms.
It's experimental realization with a yeast culture
J. Gen. Microbiol., 63, S.357-366, 1970

Pirt, S.J. :
Principles of microbe and cell cultivation
Blackwell Sci. Publ., 1975

Quentin, K.E. :

Anforderung an Einleitungen aus der Sicht der Gewässernutzung:

In: Sicherung der Wasserversorgung durch Gewässerschutz, Wasseraufbereitung
und -Verbund

Gewässerschutz-Wasser-Abwasser

GVGW-Fachveranstaltung, Bd. 29, Aachen, 1978

Ramus, J. and Groves, S.T. :

Precursor-product relationships during sulfate incorporation into *Porphyridium*
capsular polysaccharide

Plant Physiol. Lancaster, 53, S.434-439, 1974

Raven, J.A. :

Transport in algal cells

In: Encyclopedia of Plant Physiology, Lüttge u. Pitman (eds.)

Springer-Verlag, Berlin, 1971

Reinecke, W. Knackmus. H.-J. :

Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds

Biochim. et Biophys. Acta, 542, S.412-423, 1978

Reinecke, W. Knackmus. H.-J. :

Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds

Biochim. et Biophys. Acta, 542, S.424-429, 1978

Richard, J. :

Les sulfatides

Biol. Med. (Paris), 54, S.540-565, 1965

Sandmann, G. u. Böger, P. :

Formation and degradation of photosynthetic membranes determined by

³⁵S-labeled sulfonlipid

Plant Sci. Lett., 24, S. 347-352, 1982

Satory, D.P. :

Spectrophotometric analysis of chlorophyll a in freshwater phytoplankton

Technical Report TRMS, Department of Environmental Affairs,

Hydrological Research Institute, Pretoria, R.S.A., 1982

Schäfer, V. u. Hegewald, E. :

Verzeichnis der Algensammlung des Institutes für Biotechnologie der
KFA Jülich

Jül - 2018, KFA-Jülich, 1985

Schegel :

Allgemeine Mikrobiologie

Georg Thieme Verlag, 5. Aufl., S.414-419, 1981

Schlösser, U.G. :

Sammlung von Algenkulturen.

Ber. Deutsch. Bot. Ges., Bd 95, S.181-216, 1982

Schlüter, M. :

Kontinuierliche Massenkultur des planktischen Rotators *Brachionus rubens*

KFA-Jülich, Jül-1959, 1984

Schweitzer, H.R. :

Künstliche Farbstoffe und ihre Zwischenprodukte

Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1964

Schwenn u. Schrieck

PAPS-reductase of *E.coli*:

Characterisation of the enzyme as probe of thioredoxin

Z. Naturforsch., 42C, S.93-103, 1987

Senger, H. :

Charakterisierung einer Synchronkultur von *Scedesmus obliquus*, ihrer
potentiellen Photosyntheseleistung und des Photosynthese-Quotienten während
des Entwicklungszyklus

Planta, 90, S.243-266, 1970

Senger, H., Pfau, J., Werthmüller, K. :

Homocontinuous and synchronized microalgae culture

In: Methods in Cell Physiology, Vol. 5, S. 310-323

Academic Press, N.Y., 1972

Sinensky, M. :

Specific deficient in the synthesis of 6-sulfoquinosyldiglyceride in *Chlorella pyrenoidosa*

J. Bakteriolog., 129, S.516-524, 1977

Smith, R.V. u. Davis, P.J. :

Induction of xenobiotic monooxygenase

Drug Dynamics Institute, Univ. of Texas at Austin, S.61-100, 1979

Soeder, C.J., Schulze, G., Thiele, D. :

Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf das Wachstum in Synchronkulturen von *Chlorella fusca* S.H. et Kr.

Arch. Hydrobiol./Suppl. 23, S.127-171, 1967

Soeder, C.J. :

Mikroalgen im technischen Maßstab

Biologie in unserer Zeit, 5, S.133-164, 1971

Soeder, C.J., Hegewald, E., Kneifel, H. :

Green microalgae can use naphthalenesulfonic acids as sources of sulfur

Arch. Microbiol., 148, S.260-263, 1987

Solscheid, P. :

Der Abbau von radioaktiv markierter 1-Naphthalinsulfonsäure durch die Grünalge *Scenedesmus obliquus*

Diplomarbeit, FHS-Aachen, Abt. Jülich, 1987

Steber, J. :

Forschungsbericht über das BMFT-Projekt "Abbaupotential von Mikroalgen" (Förderungskennzeichen 037278)

Henkel KGaA, Hauptabt. Ökologie, 1985

Straßburger :

Lehrbuch der Botanik

Springer-Verlag, Berlin, 1978

- Tamiya, H., Iwamura, T., Shibata, K. Hihei, T. :
 Corelation between photosynthesis and light-indepentent metabolism in
 the growth of *Chlorella*
 Biochim. et Biophys. Acta., 12, S.23-40, 1953
- Trosper, T. u. Sauer, K. :
 Chlorophyll a interactions with chloroplast lipid in vitro
 Biochim. Biophys. Acta., 162, S.97-107, 1968
- Truhant, R., Feracrel, J.F., Jouciny, J.M.:
 Cadmium IC_{50} dermination on *Chlorella vulgaris* involving
 different parameter
 Ecotoxicology and Environmental Safety, 4, S.215-223, 1980
- Uherkovich, G.
 Die *Scenedesmus*-Arten Ungarn
 Akademica Kiado, Budapest
 Verlag Adademie, 1966
- Ullmann
 Technische Chemie, Bd.12, S.593-597, 1960
 Verlag Chemie
- Ullmann
 Technische Chemie, Bd.17, S.115-119, 1979
 Verlag Chemie
- Ullrich-Eberius, C.I. :
 Die Abhängigkeit der Aufnahme von H_2 , PO_4^- , SO_4^{2-} ,
 Na^+ und K^+ und ihre gegenseitige Beeinflußung
 bei *Ankistrodesmus braunii*
 Planta, 109, S.161-176, 1973
- Utkilen, H.C., Heldal, M., Knutsen, S. :
 Characterization of sulfate uptake in *Anacystis nidulans*
 Physiol. Plant, 38, S.217-220, 1976

Vallee u. Jeanjean :

Le System de transport de SO_4^{2-} chez *Chlorella pyrenoidosa*
et su regulation

Biochim. et Biophys. Acta, 150, S.599-606, 1968

Wedding, R.T. u. Black, M.K. :

Uptake and metabolism of sulfate by *Chlorella*

Plant Physiol. Lancaster, 35, S.72-80, 1960

Weiß, J. :

Handbuch der Ionenchromatographie

Dionex, S.37-68, 1985

Weissmann, J.C. u. Benemann, J.R. :

Biomass recycling and spezies competition in continous cultures

Biotechn. and Bioeng., 21, S.627-648, 1979

Zahn, R. u. Wellens, H. :

Prüfung der biologischen Abbaubarkeit im Standversuch - weitere Erfahrungen
und Einsatzmöglichkeiten

Z. Wasser-Abwasser-Forsch., 13(1), S.1-10, 1980

Zürrer, D., Cook, A.M., Leisinger, T. :

Microbial desulfonation of substituted naphthalenesulfonic acids and
benzoiesulfonic acids

Appl. Environm. Microbiol., 53(7), S.267-274, 1987

Zürrer, D. :

Persönliche Mitteilung, 1987

7.0 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1. Wachstum von <i>Sc.obliquus</i> in verschiedenen Naphthalinsulfonsäuren als Schwefelquelle	4
Abb. 2. Aufbau des Turbidostaten mit pH - Mess - und Regeleinheit	15
Abb. 3. Schema des Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung .	18
Abb. 4. Adsorptionsspektrum eines Ethanolextraktes von <i>Sc. obliquus</i>	23
Abb. 5. Chromatogramm der detektierbaren Anionen	28
Abb. 6. Chromatogramm von 1 - NS und 1 - Naphthol	31
Abb. 7. Zunahme der Kulturdichte von <i>Sc.obliquus</i> in Abhängigkeit von der Sulfatanfangskonzentration (Batchversuche)	44
Abb. 8. Wachstumsraten von <i>Sc. obliquus</i> in Abhängigkeit von der Anfangssulfatkonzentration (Batchversuch)	45
Abb. 9. Lineweaver - Burk - Kinetik des Algenwachstums mit Sulfat als Schwefelquelle (Batchversuch)	46
Abb. 10. Pigmentkonzentration von <i>Sc. obliquus</i> nach 5 Tagen in Abhängigkeit von der Sulfatanfangskonzentration (Batchversuch)	47
Abb. 11. Abnahme der Sulfatkonzentration im Medium (Batchversuch)	49
Abb. 12. Korrelation der Wachstumsraten mit der Sulfatelimination im Medium (Batchversuch)	51
Abb. 13. Adaptation der Algen von Sulfat zum Sulfonat als Schwefel-Quelle (Batchversuch)	53
Abb. 14. Biomassezunahme von <i>Sc. obliquus</i> in Abhängigkeit von der Sulfonatkonzentration (Batchversuch)	54
Abb. 15. Wachstumsraten von <i>Sc. obliquus</i> in Abhängigkeit von der Sulfonatanfangskonzentration (Batchversuch)	55
Abb. 16. Pigmentkonzentration von <i>Sc. obliquus</i> nach 5 Tagen in Abhängigkeit von der Sulfonatanfangskonzentration(Batchversuch)	56
Abb. 17. Abnahme der Sulfonatkonzentration im Medium (Batchversuch) ...	58
Abb. 18. Korrelation der Wachstumsraten mit der Sulfonatelimination im Medium (Batchversuch)	60
Abb. 19. Abnahme der Restsulfatkonzentration im Medium in den ersten 4 Stunden in Gegenwart von 0.217mM 1-NS (Batchversuch)	62
Abb. 20. Abnahme der Sulfonatkonzentration in den ersten 4 Stunden (Batchversuch)	63
Abb. 21. Biomassezunahme von <i>Sc. obliquus</i> nach S - freier Inkubation (Batchversuch)	65

Abb. 22. Zunahme der Pigmentkonzentration von <i>Sc. obliquus</i> nach Zugabe von Schwefelquellen (Batchversuch)	66
Abb. 23. Wachstumsraten von <i>Sc.obliquus</i> in Sulfonat- und Sulfatanfangskonzentration (Batchversuch)	69
Abb. 24. Pigmentkonzentrationen von <i>Sc.obliquus</i> in Abhängigkeit von der Sulfat- und Sulfonatanfangskonzentration(Batchversuch)	70
Abb. 25. Sulfatabnahme im Medium bei gleichzeitiger Sulfonatgabe (Batchversuch)	72
Abb. 26. Sulfonatabnahme im Medium bei gleichzeitiger Sulfatgabe (Batchversuch)	73
Abb. 27. Korrelation der Wachstumsraten mit der Gesamtschwefel-, Sulfat-, 1-NS-Sulfatelimination (Batchversuch)	75
Abb. 28. Wachstumsrate von <i>Sc.obliquus</i> in Abhängigkeit von der eingestellten Biomassekonzentration mit Sulfat als S-Quelle	78
Abb. 29. Produktivität der Algen in Abhängigkeit von der eingestellten Biomassekonzentration mit Sulfat als S-Quelle	79
Abb. 30. Pigmentkonzentration von <i>Sc. obliquus</i> in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration mit Sulfat als S-Quelle	80
Abb. 31. Sulfateliminationleistung der Algen in Abhängigkeit von der eingestellten Biomassekonzentration	82
Abb. 32. Wachstumsrate von <i>Sc.obliquus</i> während der Einfahrphase bei Adaptation an 1-NS als Schwefelquelle	84
Abb. 33. Pigmentgehalte der Algen während der Einfahrphase	86
Abb. 34. Desulfonierungsraten der Algen während der Einfahrphase	87
Abb. 35. Wachstumsrate von <i>Sc.obliquus</i> in Abhängigkeit von der eingestellten Biomassekonzentration mit 1-NS als S-Quelle	89
Abb. 36. Produktivität der Algen in Abhängigkeit der Biomassekonzentration mit 1-NS als S-Quelle	90
Abb. 37. Pigmentkonzentration von <i>Sc. obliquus</i> in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration mit 1-NS als S-Quelle	91
Abb. 38. Sulfonatelimation der Algen in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration	92
Abb. 39. Wachstumssrate von <i>Sc.obliquus</i> in Abhängigkeit von 0.869mM 1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen	94
Abb. 40. Produktivität von <i>Sc.obliquus</i> in Abhängigkeit von 0.869mM 1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen	95
Abb. 41. Pigmentkonzentration von <i>Sc. obliquus</i> in Abhängigkeit von 0.869mM	

1-NS und verschiedenen Sulfatkonzentrationen	96
Abb. 42. Sulfonsäure- und Sulfatelimination der Algen in Abhängigkeit von verschiedenen Sulfatkonzentrationen	98
Abb. 43. Wachstumsrate von <i>Sc.obliquus</i> in turbidostatischer Kultur in Ab- hängigkeit vom pH-Wert	100
Abb. 44. Produktivität von <i>Sc.obliquus</i> in turbidostatischer Kultur in Abhän- gigkeit vom pH-Wert	102
Abb. 45. Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt in den Algen in Abhängigkeit von den pH-Werten	103
Abb. 46. Pigmentkonzentration von <i>Sc. obliquus</i> in Abhängigkeit vom pH-Wert	104
Abb. 47. Sulfonat- und Sulfatelimination der Algen in Abhängigkeit vom pH-Wert	105
Abb. 48. Produktivität der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückhaltung	109
Abb. 49. Chlorophyll- und Carotinoidgehalt der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomassenrückführung	110
Abb. 50. Elimination von 1-Naphthalinsulfonsäure im Chemostaten mit kon- trollierter Biomasserückführung	111
Abb. 51. Produktivität der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung	114
Abb. 52. Chlorophyll- und Carotinoidgehalt der Algen im Chemostaten mit kontrollierter Biomasserückführung	115
Abb. 53. Elimination von 1-Naphthalinsulfonsäure im Chemostaten mit kon- trollierter Biomasserückführung	116
Abb. 54. Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (inhomogen)	119
Abb. 55. Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (inhomogen)	121
Abb. 56. Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (inhomogen)	123
Abb. 57. Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (homogen)	125
Abb. 58. Einbau von schwefel-markierter 1-Naphthalinsulfonsäure in die Algenbiomasse (homogen)	127
Abb. 59. Einbau von schwefel-markiertem Sulfat	129
Abb. 60. Einbau von kohlenstoffmarkierter 1-NS in die Algenbiomasse	131
Abb. 61. Prozentualer Einbau der kohlenstoffmarkierten 1 -	

Naphthalinsulfonsäure in die Biomasse	132
Abb. 62. Aufnahme von Sulfat und Sulfonat in Abhängigkeit von der Zeit ...	134
Abb. 63. pH-abhängige Aufnahme von Sulfat und Sulfonsäure	136
Abb. 64. Sulfat- und Sulfonsäureaufnahme in Na bzw. K-freiem Medium	138
Abb. 65. Sulfat- und Sulfonsäureaufnahme in valinomycinhaltigem Medium	139
Abb. 66. Haltbarkeit des Rohextraktes bei verschiedenen Temperaturen ...	141
Abb. 67. Aktivitätsverteilung in den ausgesalzten Proteinfractionen	143
Abb. 68. Temperaturabhängigkeit der Desulfonierung	144
Abb. 69. Einfluß des 1-NS-Konzentration und des Proteingehaltes auf die Desulfonierung	145
Abb. 70. Lineweaver-Burk-Auftragung zur Bestimmung von	146
Abb. 71. Abnahme der 1-Naphthalinsulfonsäurekonzentration bei 0.326 mM 1-Naphthalinsulfonsäure	147
Abb. 72. Sulfitbildung aus der Desulfonierung	148
Abb. 73. Einfluß der Cofaktoren auf die Desulfonierung	150
Abb. 74. Sulfatbildung aus der Desulfonierung	152
Abb. 75. HPLC-Diagramm der niedermolekularen gelösten organischen Sub- stanzen einer Kultursuspension aus dem Turbidostaten	154
Abb. 76. HPLC-Diagramm der niedermolekularen gelösten organischen Sub- stanzen einer Kultursuspension aus dem Turbidostaten	155
Abb. 77. HPLC-Diagramm von 1-Naphthalinsulfonsäure	156
Abb. 78. HPLC-Diagramm von 1-Naphthol	157
Abb. 79. HPLC-Diagramm von 1-Hydroxy-4-Tetralon	158
Abb. 80. HPLC-Diagramm von 1,4-Naphthochinon	159
Abb. 81. HPLC-Diagramm von 1,2-cis-dihydroxynaphthalindiol	160
Abb. 82. HPLC-Diagramm von 1,2-trans-dihydroxynaphthalindiol	161
Abb. 83. HPLC-Diagramm der Kultursuspension aus dem Batchversuch (1.Meßtag)	162
Abb. 84. HPLC-Diagramm der Kultursuspension aus dem Batchversuch (5.Meßtag)	163
Abb. 85. HPLC-Diagramm der Kultursuspension aus dem kontinuierlichen Versuch	164
Abb. 86. HPLC-Diagramm der Probe aus dem Versuch mit Zellrohextrakt ...	165
Abb. 87. Schema des Abbaufweges der 1-Naphthalinsulfonsäure	187

8.0 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kreuzaler für die Übernahme dieser Arbeit

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Soeder für die Bereitstellung von Thema, Sachmitteln und Arbeitsplatz an seinem Institut, sowie für seine wissenschaftliche Unterstützung mit vielen Ratschlägen bedanken.

Desweiteren möchte ich mich herzlichst bei folgenden Personen bedanken:

Herrn Prof. Dr. Kneifel für die Analytik der Abbauprodukte

Herrn Prof. Dr. Cernigla für die Überlassung der Referenzsubstanzen

Herrn Dr. Groeneweg für die vielen ergiebigen Diskussionen und seinen Ratschlägen bei der Durchführung von Experimenten

Den Herren Dr. Fingerhut und Dr. Schlüter für anregenden Diskussionen

Herrn Dr. Schwenn für die Unterstützung der Messung des radioaktiven Sulfites

Herrn Dipl.Ing. Solscheid für die Synthese der 1-Naphthalinsulfonsäure und der Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung

Frau Groehn für die Hilfe bei den Durchführung der vielen Bestimmungen

Der Infrastruktur des IBT's, besonders der Werkstatt, der Elektronikwerkstatt und dem Photolabor

Den Mitarbeitern des ZAM, besonders Frau Baumann, für die Beseitigung von Fehlern beim Schreiben der Arbeit

Allen übrigen Mitarbeitern des IBT-3 für die freundliche Aufnahme im Institut

