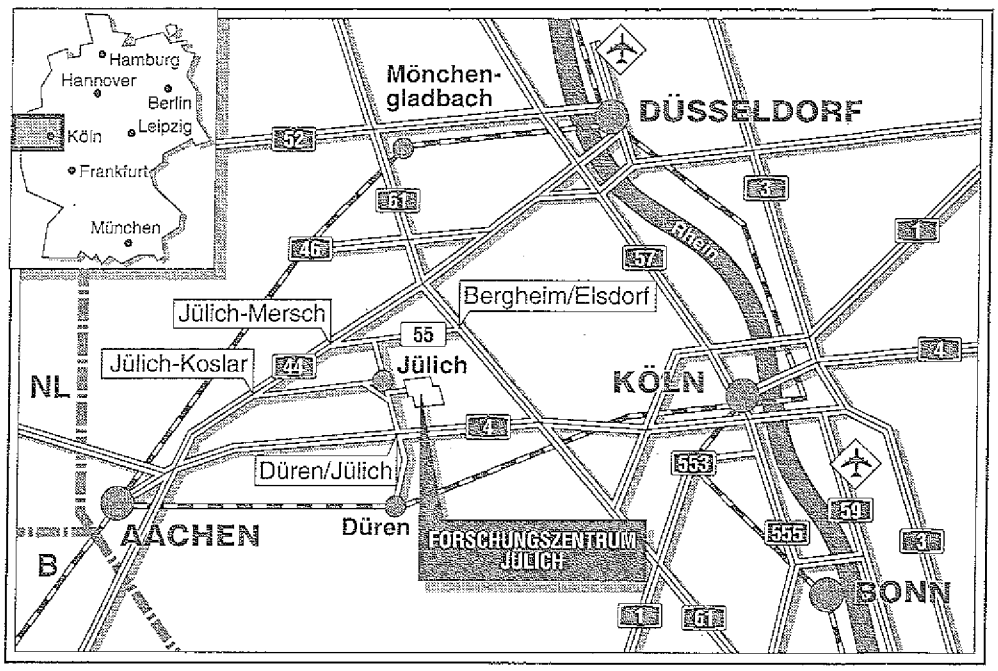
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH KFA

Institut für Biotechnologie

UNTERSUCHUNGEN ZUM MIKROBIELLEN PROTEINABBAU BEI DER ZWEISTUFIGEN ANAEROBEN ABWASSERREINIGUNG

Ralf Winterberg



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2634
ISSN 0366-0885
Institut für Biotechnologie Jül-2634
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

UNTERSUCHUNGEN ZUM MIKROBIELLEN PROTEINABBAU BEI DER ZWEISTUFIGEN ANAEROBEN ABWASSERREINIGUNG

Ralf Winterberg

INHALT

ABKÜRZUNGEN

D	Durchflußrate
D_{max}	maximale Durchflußrate
D_{krit}	kritische Durchflußrate
θ_H	Flüssigkeitsverweilzeit
B_{CSB}	CSB-Raumbelastung
B_{Prot}	Protein-Raumbelastung
c	Substratgleichgewichtskonzentration im Chemostaten
R_V	Volumenspezifische Umsatzrate
R_{BP}, R_{BPakt}	Aktuelle Substratumsatzrate, bezogen auf die bakterielle Proteinmasse
R_{BPpot}	Potentielle Substratumsatzrate, bezogen auf die bakterielle Proteinmasse
μ_{max}	Maximale Wachstumsrate
k_s	Organismenspezifische Substratkonzentration bei halbmaximaler Wachstumsrate
k_m	Enzymspezifische Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzrate
η	Abbaugrad
T	Temperatur
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
C_2	Essigsäure
C_3	Propionsäure
C_4	Buttersäure
C_5	Valeriansäure
Lac	Milchsäure
Eth	Ethanol
Gel	Gelatine
Glc	Glucose
V	Versäuerungsreaktor
M	Methanreaktor
G	Gesamtanlage

1. EINLEITUNG

In vielen Bereichen der Lebensmittelindustrie, der pharmazeutischen und chemischen Industrie, der Papierindustrie, sowie der Verarbeitung landwirtschaftlicher Produkte fallen organisch hoch belastete Abwässer an (Pfeiffer et al., 1986). In diesen Industriezweigen ist es in den letzten Jahren zum vermehrten Einsatz anaerober biologischer Verfahren zur Abwasserreinigung gekommen, so z.B. in der Zucker- und Stärkefabrikation, in der Brauerei- und der kartoffelverarbeitenden Industrie (Temper et. al., 1986). Bei der Reinigung organisch stark belasteter Abwässer bieten anaerobe Techniken gegenüber aeroben Verfahren wesentliche Vorteile:

1. Der energieaufwendige Sauerstoffeintrag und die Geschwindigkeitslimitierung der Stoffumsetzung durch Sauerstoff entfällt. Wesentlich höhere Raten des Abbaus organischer Verbindungen sind möglich.
2. Die Umsetzungen führen zur Bildung des Methans, das zur Energiegewinnung eingesetzt werden kann.
3. Die Überschußschlammproduktion ist wesentlich geringer, da bei aeroben Prozessen ca. 50% des Substratkohlenstoffs in Biomasse inkorporiert wird, bei anaeroben Verfahren dagegen nur ca. 5% (Sahm, 1984).
4. Anaerobe Kulturen wachsen wegen des geringeren Zellertrages bei niedrigeren Nährsalzkonzentrationen, als aerobe Bakterien (Lettinga et al., 1984).

Für die vollständige anaerobe Umsetzung organischen Materials zu Methan und Kohlendioxid sind acidogene, acetogene und methanogene Bakterien notwendig (Schoberth, 1980; Gottschalk, 1986). Der Substratumsatz zu den Endprodukten CO_2 und CH_4 erfolgt in einer Nahrungskette (Abb. 1.1).

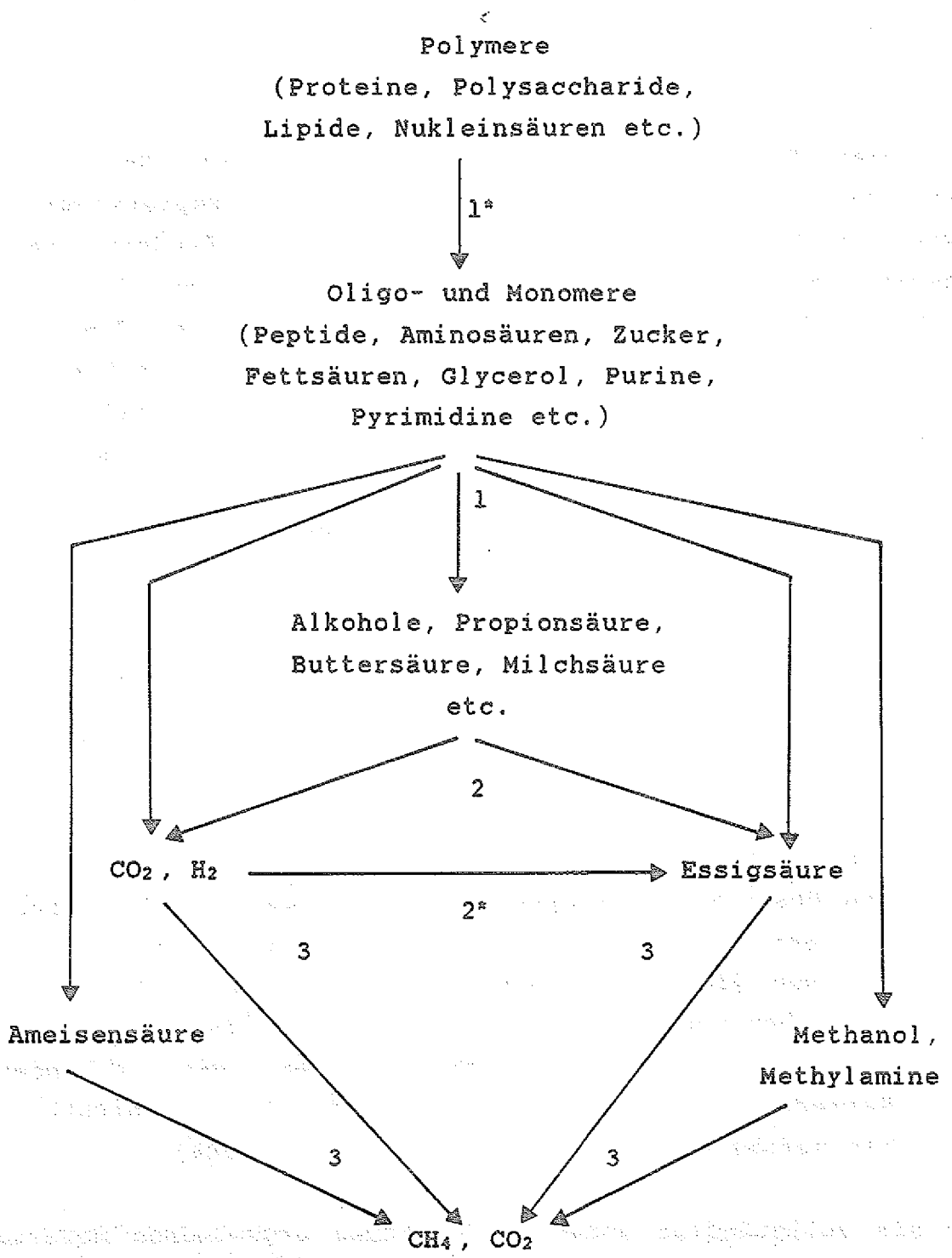


Abb. 1.1. Vereinfachtes Schema der anaeroben Nahrungskette (nach Gottschalk, 1986; verändert)

1 Acidogene Bakterien
1* Acidogene Bakterien mit hydrolytischer Aktivität
2 Acetogene Bakterien
2* Homoacetogene Bakterien
3 Methanogene Bakterien

Acidogene Bakterien hydrolysieren durch extrazelluläre Enzyme Polymere zu Oligo- und Monomeren. Die Hydrolyseprodukte werden in die Zelle aufgenommen und zu Alkoholen, kurzkettigen Fettsäuren, CO_2 und H_2 vergoren.

Acetogene Bakterien setzen Monocarbonsäuren mit mehr als zwei Kohlenstoffatomen und Alkohole unter Freisetzung von Wasserstoff zu Essigsäure um. Diese Reaktionen sind unter physiologischen Bedingungen endergon und verlaufen nur bei sehr niedrigen Wasserstoffpartialdrücken. So ist z. B. für die exergone acetogene Umsetzung von Propionat ein Wasserstoffpartialdruck von weniger als etwa 10^{-4} atm notwendig (Zehnder u. Stumm, 1988). Die Anwesenheit wasserstoffverwertender Sulfatreduzierer oder Methanbakterien ist für diese acetogenen Bakterien essentiell, sie werden daher auch als obligat synthrophe Bakterien bezeichnet. (Thauer et al., 1977; Dolfing, 1988).

Der letzte Schritt in der anaeroben Nahrungskette wird von methanogenen Bakterien durchgeführt. Methanbakterien können CO_2 in Anwesenheit von H_2 zu CH_4 reduzieren. Andere Substrate, die verwertet werden, sind Methanol, Formiat, Methylamine und Acetat (Thauer u. Fuchs, 1979). Neuere Untersuchungen zeigen, daß auch Alkohole (Ethanol, 2-Propanol) als Elektronendonatoren genutzt werden können (Widdel, 1988).

Industrieabwässer setzen sich meist aus zahlreichen Substanzen zusammen, die als bakterielle Substrate verwertbar sind. Die wesentlichen organischen Komponenten in Abwässern aus Fermentationsprozessen und der Lebensmittelherstellung sowie der Verarbeitung landwirtschaftlicher Produkte sind Kohlenhydrate und Proteine. Zur Umsetzung von Kohlenhydraten sind im Hinblick auf den Einsatz anaerober Abwasserreinigungsanlagen systematische Untersuchungen durchgeführt worden (Cohen, 1982; Zoetemeyer, 1982). Es konnte z. B. gezeigt werden, daß die Umsetzung mono- und oligomerer Zucker sowie α-glycosidisch verknüpfter Polymere nicht geschwindigkeitsbestimmend für die anaerobe Umsetzung zum Methan sind. Dagegen gilt die Hydrolyse β-glycosidisch verknüpfter Kohlenhydrate (Cellulose) als geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtumsetzung (Noike et

al., 1985). Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Acidogenese von Kohlenhydraten führten zur Anwendung eines zweistufigen anaeroben Prozesses zur Umsetzung kohlenhydrathaltiger Abwässer. Ein solches Verfahren war schon von Ghosh et al. (1975) und Ghosh u. Klass (1977) zur anaeroben Behandlung von Klärschlämmen angewendet worden. In der 1. Stufe, dem Versäuerungsreaktor, werden Kohlenhydrate durch acidogene Bakterien zu Gärungsprodukten umgesetzt, die in der nachgeschalteten Methanstufe als Substrate der acetogenen und methanogenen Bakterien dienen. Als Vorteile des zweistufigen Verfahrens gelten (Ghosh u. Klass, 1977; Verstraete et al., 1981; Sahm, 1984; Aivasidis, 1989):

1. die erhöhte Umsatzleistung der beteiligten Bakterien, deren physiologische Optima (z. B. bezüglich des pH-Wertes) in getrennten Stufen separat eingestellt werden können
2. die Pufferwirkung des Versäuerungsreaktors, der hydraulische Stoßbelastungen und Konzentrationsschwankungen ausgleicht
3. die Möglichkeit der pH-Korrektur nach der Acidogenese und vor der Umsetzung der Produkte der acidogenen Bakterien durch acetogene und methanogene Kulturen

Trotz der großen Bedeutung der Proteine als Bestandteile zahlreicher Abwässer blieb bei der Entwicklung zweistufiger Anlagen zur anaeroben Abwasserreinigung der Umsatz dieser Verbindungen lange unberücksichtigt.

Für proteinverwertende Bakterien ist die extrazelluläre Proteolyse essentiell, da nur Aminosäuren und Oligopeptide in die Zelle aufgenommen werden können. Die maximale Zahl der Aminosäurereste eines Substratpeptids soll bei Milchsäurebakterien 4 bis 7 betragen (Law, 1980; Law u. Kolstadt, 1983; Thomas u. Pritchard, 1987). Alves et al. (1985) nennen für *Escherichia coli* als Peptidausschlußgrenze ein Molekulargewicht von etwa 650 Dalton. Extrazelluläre Proteinasen werden von zahlreichen Bakterien gebildet. Gut untersucht ist die proteolytische Aktivität der *Bacillus*-Stämme (Priest, 1977)

und der Gruppe der Milchsäurebakterien (Law u. Kolstad, 1983; Thomas u. Pritchard, 1987) auf Grund ihrer biotechnologischen Bedeutung. Aber auch bei Bakterien anderer systematischer Gruppen, z. B. der Gattungen *Clostridium* (Allison u. MacFarlane, 1989, 1990) und *Bacteroides* (van Steenbergen u. de Graaff, 1986; Gibson u. McFarlane, 1988) wurden Exoproteinasen nachgewiesen. Die Regulation der Verwertung organischer Stickstoffquellen wurde bisher bei Bakterien untersucht, die als Energie- und Kohlenstoffquelle Kohlenhydrate verwenden können und die in der Lage sind, Proteine als Stickstoffquellen zu nutzen. Unberücksichtigt blieben bislang obligat proteolytische Bakterien. Die Bildung von Proteinasen kann durch Endprodukte, also Peptide (Priest, 1977), Aminosäuren (Law, 1980; Votruba et al., 1987) oder Ammonium (Kleiner, 1991) reprimiert werden. Andererseits ist auch die Induktion durch Aminosäuren beobachtet worden (Law, 1980). Auch leicht verwertbare Kohlenstoffquellen (z. B. monomere Zucker) können zur Repression der Proteinasesynthese führen (Law, 1980; Whooley et al., 1983; Frankena et al., 1985; Allison u. McFarlane, 1990). Die molekularen Regulationsmechanismen der Proteinasebildung sind noch weitgehend unbekannt (Kleiner, 1991). Gut untersucht ist der intrazelluläre Stickstoff-Katabolismus der Enterobakterien (Merrick, 1988). Auf Transkriptionsebene wird die Verwertung der bevorzugten N-Quelle durch das komplexe ntr-System bei gleichzeitiger Repression des Abbaus der anderen Stickstoffquellen reguliert. Es wird vermutet, daß bei Bakterien anderer Familien ähnliche Systeme für die Regulation der Synthese von Proteinasen verantwortlich sind (Kleiner, 1991). Bei *Streptococcus lactis* wurde eine direkte Korrelation der Konzentration eines Proteinase-Transkriptionsinhibitors und der intrazellulären Aminosäurekonzentration angenommen (Law, 1980). Ein weiteres Regulationssystem für Milchsäurebakterien wird auf Translationsebene postuliert, da die Proteinasesynthese auch in Anwesenheit des Transkriptionsinhibitors Rifamycin induziert werden kann (Thomas u. Pritchard, 1987). Durch Versuche mit Chemostaten konnte gezeigt werden, daß auch die Wachstumsrate die proteolytische Aktivität zahlreicher Bakterien beeinflußt. Niedrige Wachstumsraten führen zur Proteinasebildung

(Wouters u. Buysman, 1977; Frankena et al., 1985; Allison u. McFarlane, 1990). Die Proteinasebildung kann bei *Bacillus licheniformis* sowohl unter Stickstoff- als auch unter Kohlenstofflimitation bewirkt werden (Wouters u. Buysman, 1977; Frankena et al., 1985). Wouters u. Buysman (1977) vermuteten, daß bei niedrigen Wachstumsraten unter Stickstofflimitation die Konzentration eines stickstoffhaltigen Metaboliten (Aminosäure oder Ammonium), der als Repressor der Proteinasesynthese wirkt, abnimmt. Die Hemmung der Proteinasebildung in *Bacillus licheniformis* durch Glucose ist offenbar nicht auf eine niedrige cAMP-Konzentration zurückzuführen, da in diesem Organismus weder cAMP, noch die zur Bildung dieses Nukleotides notwendige Adenylatcyclase nachgewiesen werden konnten (Frankena et al., 1985). In *Clostridium sporogenes* führte der Zusatz von cAMP zum Kulturmedium nicht zur Aufhebung der durch Aminosäuren bewirkten Hemmung der Proteinasebildung (Allison u. McFarlane, 1990). Aus der Hemmung der Proteinasebildung durch ATP und ADP leiteten die Autoren die Vermutung ab, daß der Energiezustand der Zelle über ein noch nicht identifiziertes Intermediärprodukt des Energiestoffwechsels die Proteinasesynthese reguliert.

Der Umsatz proteinhaltiger Industrieabwässer wurde nur in wenigen Veröffentlichungen beschrieben (Häusler u. Malcher, 1972; Trösch et al., 1983; Wildenauer u. Winter, 1985; Seyfried et al., 1985; Nanninga u. Gottschal, 1986; Breure u. van Andel, 1987; Keusen, 1989; Keim, 1990). Die veröffentlichten Ergebnisse zeigen, daß der Proteinabbau im Gegensatz zum Kohlenhydratumsatz oft unvollständig blieb. So erreichten z. B. Breure u. van Andel beim Umsatz von Molkepulver bei pH 7 Proteinhydrolysegrade von nur 42 bis 70 % (in Abhängigkeit von der Durchflußrate), während der Lactoseumsatz nahezu vollständig war. Keim (1990) erzielte bei der Behandlung eines Abwassers der Backhefeherstellung bei pH 6,4 Kohlenhydratabbaugrade von 80 bis 90 % (in Abhängigkeit von der Durchflußrate), jedoch Proteinabbaugrade von nur 35 bis 60 %. Trösch et al. (1983) beobachteten bei der Versäuerung eines Abwassers bei pH 4,2 keinen Umsatz der organischen Stickstoffverbindungen.

Die einzige systematische Untersuchung des Proteinabbaus in anaeroben Abwasserreinigungsanlagen wurde von Breure u. van Andel (1984) und Breure et al. (1985, 1986 a, 1986 b) in Modellreaktoren mit dem Substrat Gelatine durchgeführt. Die Autoren wiesen neben einer deutlichen Abhängigkeit der Proteolysegrade vom pH-Wert (optimaler Proteinabbau bei pH-Werten um 7) eine Hemmung des Proteinumsatzes durch Kohlenhydrate nach. Die Autoren nahmen als Ursache der Hemmung eine Katabolitrepression der Organismen an, die für den Gelatineabbau in An- und Abwesenheit von Kohlenhydraten verantwortlich sind (Breure et al., 1986). Eine Isolation und Charakterisierung der für den Proteinabbau verantwortlichen Bakterien wurde jedoch nicht vorgenommen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung der Ursachen des häufig unvollständigen Proteinabbaus bei der anaeroben Reinigung proteinhaltiger Industrieabwässer. Wegen der geringen Zahl der Daten zum Proteinabbau in industriellen Abwasserreinigungsanlagen und der eingeschränkten Vergleichbarkeit dieser Daten sollte zunächst der Proteinabbau bei der Behandlung verschiedener industrieller Abwässer untersucht werden. Modelluntersuchungen mit Misch- und Reinkulturen sollten Einflüsse der Kultivierungsbedingungen auf den Proteinabbau zeigen. Durch Isolation und Charakterisierung sollten dann die Eigenschaften der Bakterien, die im Modellsystem für den Proteinabbau verantwortlich waren, ermittelt werden. Ziel war es, aus den Modelluntersuchungen schließlich eine optimale Verfahrensweise für den anaeroben Abbau proteinhaltiger Abwässer abzuleiten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Entnahme von Proben aus Industrieabwasser-Reinigungsanlagen

Flüssigproben aus Industrieabwasser-Reinigungsanlagen wurden luftblasenfrei in Polyethylenflaschen gefüllt, in Eis transportiert und sofort oder nach Tieffrieren (-18 °C) analysiert. Faulschlamm wurde aus der kommunalen Kläranlage Alsdorf-Bettendorf entnommen, ohne Kühlung transportiert, bei 37 °C gelagert und am Entnahmetag verarbeitet. Der Transport von Gasproben aus Industrieabwasser-Reinigungsanlagen erfolgte in Gasmäusen aus Glas, die mit einem Butylgummistopfen verschlossen waren. H_2S wurde vor Ort mit einem Gasmeßröhrchen H_2S 0,2 % A CH 28101 (Dräger, Lübeck) bestimmt.

2.2. Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien von Fluka (Neu-Ulm) und Merck (Darmstadt) verwendet. Agar Agar, Gelatine und Pepton aus Gelatine stammten von Merck.

Für die Bilanzierung der Umsätze wurde der Wassergehalt der Gelatine bestimmt. Der Gewichtsverlust der Gelatine durch Trocknen (105 °C, 24 h) betrug 11,1 %, der CSB der Gelatine lag bei 1,06 $g \cdot g\ TS^{-1}$ (bezogen auf nicht getrocknete Gelatine). Die Gewichtsanteile der Elemente Stickstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff betrugen 16,3 %, 43,4 % und 6,76 % (bezogen auf nicht getrocknete Gelatine). Als weitere Inhaltsstoffe wurden von Merck Ca (0,027 %), Zn (0,0023 %), Mg (0,004 %), Cu (0,0018 %), Fe (0,0005 %) und Na (0,25 %) angegeben. Die Aminosäurezusammensetzung der Gelatine wurde durch saure Hydrolyse (s. Kap. 2.7.1.) bestimmt und mit Literaturdaten sowie Angaben der Fa. Merck verglichen (Tab. 2.1).

Tab. 2.1. Experimentell ermittelte Aminosäurezusammensetzung der Gelatine (Merck, Darmstadt) im Vergleich mit Literaturdaten und Angaben der Fa. Merck. Relativer Anteil bezogen auf Gelatine im Lieferzustand (nicht getrocknet).

Aminosäure	Gewichts-%		
	Experiment	Merck	Eastoe u.Leach (1977)[1]
Gly	26,4	27,0	27,6
Pro	13,6	16,2	16,5
Hyp	12,6	13,8	14,4
Ala	11,9	10,7	11,3
Glu	11,2	11,3	11,4
Arg	9,0	8,8	8,9
Asp	4,5	6,7	6,6
Lys	4,1	4,3	4,7
Ser[2]	3,2	4,2	4,2
Leu	2,9	3,3	3,4
Val	2,6	2,6	2,6
Phe	0,6	2,4	2,3
Thr[2]	1,8	2,2	2,3
Ile	1,3	1,5	1,7
His	1,7	1,0	0,8
Met	0,9	0,8	0,8
Tyr	2,3	0,3	0,2
Hyl	nb	nb	1,0
Summe[3]	111	117	121

[1] Gelatine aus Ochsenhufen
[2] wird bei der sauren Hydrolyse teilweise zersetzt
[3] die Summe der Prozentwerte liegt durch das Hydrolysewasser über 100 %.

Azocoll stammte von Sigma (Deisenhofen), Kollagenase von Boehringer (Mannheim). Die Proteinaseinhibitoren wurden von Boehringer, Serva (Heidelberg) und Sigma bezogen. Definierte Peptide wurden von Bachem (Heidelberg) und Sigma geliefert.

2.3. Nährmedien

Nährmedien für statische Kulturen. Die Nährmedien wurden von einer Nährlösung nach Evans et al. (1970) abgeleitet. Die Zusammensetzung der Nährmedien ist Tab. 2.2 zu entnehmen.

Der pH-Wert der Nährmedien wurde mit 2 N HCl auf 7,0 eingestellt. Acidogene Kulturen wurden unter einer Gasphase aus N_2/CO_2 (80/20 Vol.-%), methanogene H_2-Verwerter unter H_2/CO_2 (80/20 Vol.-%) kultiviert. Die Nährmedien der wasserstoffverwertenden Methanbakterien enthielten neben CO_2 keine weitere Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung aerober Kulturen erfolgte mit dem gleichen Medium, jedoch entfielen Na_2S, Na-Dithionit, Resazurin und $NaHCO_3$.

Die Herstellung der Nährböden für anaerobe Bakterien erfolgte mit einer modifizierten Rollröhrchen-Methode nach Hungate (1969). Nährlösungen wurden nach einer ebenfalls modifizierten Serumflaschen-Methode nach Miller u. Wolin (1974) und Latham u. Wolin (1978) hergestellt. Die Nährmedien wurde in einem Dispenser 30 min mit N_2/CO_2 (80/20 Vol.-%) begast, bevor die Reduktionsmittelzugabe erfolgte und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt wurde. Mit dem ständig mit Schutzgas durchströmten Dispenser wurden Röhrchen oder Flaschen (Bellco Glass, Vineland) befüllt, die ebenfalls mit N_2/CO_2 (acidogene Kulturen) oder H_2/CO_2 (80/20 Vol.-%; methanogene H_2-Verwerter) begast wurden. Nach dem Füllen der Gefäße wurden diese weitere 5 min mit Gas durchströmt und dann mit einem Butylgummistopfen geschlossen. Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte durch Dampfsterilisation (121 °C, 15 min). Hitzelabile Substrate wurden als konzentrierte Stammlösungen angesetzt, 30 min mit N_2/CO_2 begast und nach dem Autoklavieren des substratfreien Nährmediums durch ein 0,2 µm-Sterilfilter (Schleicher u. Schüll, Dassel) mittels einer Injektionsspritze zugesetzt. Nährmedien für aerobe Organismen wurden in Petrischalen angesetzt oder in Reagenzröhrchen hergestellt, die mit einem Wattestopfen verschlossen waren.

Nährlösung für die kontinuierliche Kultur. Für die kontinuierliche Kultur wurde eine vereinfachte Nährlösung (Tab. 2.3) verwendet.

Tab. 2.2. Zusammensetzung anaerober Nährmedien für statische Kulturen

Substanz/Lösung	Konzentration im beimpften Ansatz	
Substrat	5 bzw. 10	$g \cdot l^{-1}$
NH_4Cl	30	$mmol \cdot l^{-1}$
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	3,0	$mmol \cdot l^{-1}$
Na_2SO_4	0,60	$mmol \cdot l^{-1}$
KCl	3,0	$mmol \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,37	$mmol \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,30	$mmol \cdot l^{-1}$
Spurenelementlösung	1,5	$ml \cdot l^{-1}$
MoNiSeWo-Lösung	1,0	$ml \cdot l^{-1}$
Vitaminlösung	4,0	$ml \cdot l^{-1}$
EDTA-Lösung	0,10	$ml \cdot l^{-1}$
$NaHCO_3$	1,8	$g \cdot l^{-1}$
Na-Dithionit	0,26	$mmol \cdot l^{-1}$
$Na_2S \cdot \approx 9\ H_2O$	0,45	$g \cdot l^{-1}$
Resazurin-Lösung (0,1 %)	0,9	$ml \cdot l^{-1}$
Reaktorüberstand[1] (optional)[2]	100	$ml \cdot l^{-1}$
Hefeextrakt (optional)[2]	0,18	$g \cdot l^{-1}$
Agar Agar (optional)[3]	20	$g \cdot l^{-1}$
Spurenelementlösung (Evans et al., 1970)		
$ZnCl_2$	7,53	$\mu mol \cdot l^{-1}$
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	30,0	$\mu mol \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	15,0	$\mu mol \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1,50	$\mu mol \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	3,00	$\mu mol \cdot l^{-1}$
H_3BO_4	1,50	$\mu mol \cdot l^{-1}$
MoNiSeWo-Lösung (Konzentrationen nach Widdel, 1980)		
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,10	$\mu mol \cdot l^{-1}$
$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,010	$\mu mol \cdot l^{-1}$
$Na_2SeO_3 \cdot 5\ H_2O$	0,010	$\mu mol \cdot l^{-1}$
$Na_2WoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,03	$\mu mol \cdot l^{-1}$
Vitaminlösung (Wolin et al., 1963)		
Thiamin-HCl	50	$\mu g \cdot l^{-1}$
Ca-D-Pantothenat	50	$\mu g \cdot l^{-1}$
Riboflavin	50	$\mu g \cdot l^{-1}$
Pyridoxin-HCl	100	$\mu g \cdot l^{-1}$
Biotin	20	$\mu g \cdot l^{-1}$
Folsäure	20	$\mu g \cdot l^{-1}$
Vitamin B_{12}	1	$\mu g \cdot l^{-1}$
Nikotinsäure	50	$\mu g \cdot l^{-1}$
α-Liponsäure	50	$\mu g \cdot l^{-1}$
p-Aminobenzoesäure	50	$\mu g \cdot l^{-1}$
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Di-Na-Salz, "Titriplex III")	0,10	$mmol \cdot l^{-1}$

[1] zentrifugierte Flüssigkeit des Reaktors, aus dem die kultivierten Bakterien stammten
[2] bei Methanbakterien und einigen acidogenen Bakterien (s. Text)
[3] nur in Nährböden

Tab. 2.3. Zusammensetzung der Nährlösung für die kontinuierliche Kultur

Substanz/Lösung	Konzentration im beimpften Ansatz	
Substrat	5 o. 10	$g \cdot l^{-1}$
NH_4Cl	30	$mmol \cdot l^{-1}$
$NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$	3,0	$mmol \cdot l^{-1}$
Na_2SO_4	0,60	$mmol \cdot l^{-1}$
KCl	3,0	$mmol \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,37	$mmol \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,30	$mmol \cdot l^{-1}$
Spurenelementlösung	1,5	$ml \cdot l^{-1}$
MoNiSeWo-Lösung	1,0	$ml \cdot l^{-1}$
Citronensäure	0,67	$mmol \cdot l^{-1}$

Spurenelementlösung: s. Tab. 2.2

MoNiSeWo-Lösung: s. Tab. 2.2

Nährlösungen für die kontinuierliche Kultur wurden aerob in 20 l-Duran-Glasflaschen (Schott, Mainz) hergestellt. Wegen der langen Aufheiz- und Abkühldauer wurden die Kohlenstoffquelle und die Mineralsalzlösung getrennt autoklaviert (121 °C, 15 min) und nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C steril zusammengegeben. Durch den niedrigen pH-Wert des Mediums (4,5) wurde die Ausfällung von $MgNH_4PO_3$ verhindert. Eine abiotische Gelatinehydrolyse fand bei einer Lagerungsdauer von bis zu 3 Wochen nicht statt.

2.4. Kultivierung der Mikroorganismen

Kultivierung auf Nährböden. Die Beimpfung von Kulturrörchen mit Nährboden (Rollröhrchen) erfolgte nach Hungate (1969). Nach dem Autoklavieren wurden die Rörchen im Wasserbad auf 48 °C abgekühlt und mit 1 ml Kultursuspension verschiedener Verdünnungsstufen versetzt. Dann wurde der Röhrcheninhalt mit einem Schüttelgerät durchmischt und das Röhrchen in einem Rolltube-Spinner (Bellco Glass, Vineland) unter Abkühlung mit Eis schnell um die Längsachse gerollt, so daß der Agar als Film an der Röhrchenwand erstarrte. Die Lagerung erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Für jede Verdünnungsstufe wurden

3 Parallelansätze gefertigt. Bakterienkolonien wurden mit einer Stereolupe (Zeiss, Oberkochen) bei 10-40-facher Vergrößerung gezählt. Auch die Isolation einzelner Kolonien erfolgte unter der Stereolupe. Dazu wurde das Röhrchen steril geöffnet und mit N_2/CO_2 begast. Mit einer unten abgewinkelten, mit Schutzgas anaerobisierten Pasteurpipette wurden Kolonien ausgestochen und steril in ebenfalls begaste Röhrchen mit Nährlösung überführt. Die Kultivierung aerober Bakterien erfolgte durch Übertragung von 100 µl Kulturflüssigkeit aus den beschriebenen Verdünnungsröhrchen auf eine mit Nährboden gefüllte Petrischale. Die Flüssigkeit wurde mit einem Dreieckspatel verteilt, die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Die Auszählung oder Isolation von Kolonien wurde unter einer Stereolupe vorgenommen.

Statische Kultur und Stammhaltung. Die Beimpfung von Flüssigkulturen mit einer Kultursuspension erfolgte nach der von Miller u. Wolin (1974) und Latham u. Wolin (1978) beschriebenen Methode, indem die Kulturflüssigkeit anaerob mit Injektionsspritzen übertragen wurden. Zur Isolation von Reinkulturen wurden die mit einer Pasteurpipette ausgestochenen Kolonien unter Begasung mit N_2/CO_2 in 2 ml Kulturflüssigkeit suspendiert. Nach dem Verschließen des Röhrchens erfolgte die Inkubation bei 37 °C auf einem Schüttelgerät. Die weitere Kultivierung wurde nach der für Flüssigkulturen beschriebenen Methode durchgeführt.

Zur Stammhaltung wurden die Kulturen in Röhrchen mit Nährlösung bei 25 °C gelagert. In 7-14-tägigem Abstand wurden die Kulturen in frisches Nährmedium überführt.

Kontinuierliche Kultur. Als Reakor für die kontinuierliche Kultivierung diente ein 0,5 l-Glasreaktor (KFA-Glasbläserei, Jülich), der mit einem Magnetrührer homogen durchmischt wurde. Das sterilisierte Nährmedium wurde aus 20 l-Duran-Flaschen (Schott, Mainz) durch eine Schlauchpumpe (Gilson Minipuls 2; Abimed, Langenfeld) dem Reaktor zugeführt. Das Flüssigkeitsniveau im Reaktor wurde durch eine zweite Schlauchpumpe (Watson-Marlow 501 U; Verder, Düsseldorf) konstant gehalten,

die durch Kontaktstifte aus Edelstahl und ein Schaltrelais diskontinuierlich angesteuert wurde. Die Durchflußrate wurde durch die Wägung des Reaktorablaufes bestimmt. Der pH-Wert wurde mit einer Xerolyt-Elektrode (Ingold, Steinbach/Ts.) gemessen und über eine pH-Regeleinheit (Metrohm, Filderstadt) geregelt. Diese Einheit steuerte über eine Schlauchpumpe (Mini S; Ismatec, Zürich) die Zufuhr von 2 N NaOH. Die Gasabführung erfolgte über einen Blasenzähler, der den Eintritt von Raumluft in den Reaktorgasraum verhinderte. Probeentnahmestutzen des Reaktors und der Gasleitung ließen die Entnahme von Flüssigkeits- und Gasproben zu. Das Schema des Versuchsaufbaus ist in Abb. 2.1 dargestellt.

Die Chemostaten wurden mit Faulschlamm einer kommunalen Kläranlage beimpft. Versuchsreihen mit variierten Durchflußraten wurden mit der niedrigsten Durchflußrate begonnen, anschließend erfolgte eine schrittweise Erhöhung der Durchflußrate. Bei jeder Durchflußrate wurden die Messungen im Gleichgewichtszustand über einen Zeitraum von mindestens 20 Verweilzeiten durchgeführt.

2.5. Charakterisierung der Reinkulturen

Die Untersuchungen zur Charakterisierung der Reinkulturen wurden nach Holdeman et al. (1977) durchgeführt. Für die Untersuchung der obligat proteolytischen Isolate wurde statt Glucose Gelatine als Substrat verwendet. L-Alanin-Aminopeptidase-Aktivität wurde mit dem Bactident-Aminopeptidase-System (Merck, Darmstadt) nachgewiesen. Die Untersuchung auf Zell-Lyse durch KOH erfolgte nach Gregersen (1978). Die Analysen der zellulären Fettsäuren und der Elementarzusammensetzung der Zellen (CHN-Analyse) erfolgte mit lyophilisierten Zellen.

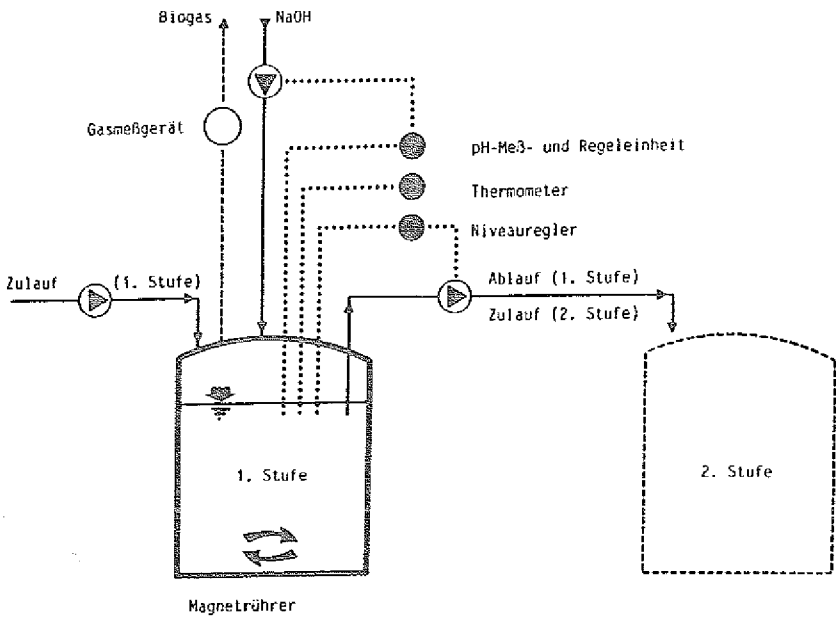


Abb. 2.1. Schema des kontinuierlich betriebenen Modell-Versäuerungsreaktors

2.6. Chemische Analytik

2.6.1. Chemischer Sauerstoffbedarf und Elementanalysen

Chemischer Sauerstoffbedarf. Der chemische Sauerstoffbedarf wurde mit dem Küvettensystem CSB 1500 (Macherey u. Nagel, Düren) durchgeführt. Organische Substanzen bilden dabei mit Kaliumdichromat in stark schwefelsaurer Lösung einen Farbkomplex. Die Bestimmung erfolgt duch Photometrie bei 620 nm.

Gesamt-Stickstoff wurde nach der Kjeldahl-Methode gemäß DEV (1988) bestimmt. Durch Erhitzung der Probe in konzentrierter Schwefelsäure wird die Probe verascht. Das entstandene Ammoniumsulfat wird durch konzentrierte Natronlauge als NH_3 aus der Lösung freigesetzt, in saurer Lösung aufgefangen und seine Konzentration durch Titration mit NaOH bestimmt. Die Bestimmungen wurden im Zentralinstitut für chemische Analysen (ZCH) des Forschungszentrums Jülich durchgeführt.

CHN-Analyse. Die Konzentrationen der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff wurden im Zentralinstitut für chemische Analysen (ZCH) des Forschungszentrums Jülich gemeinsam in einer Multielementanalyse (Rapid N-A/CHN 240 B) bestimmt.

2.6.2. Anorganische Ionen

Ammonium-, Nitrat- und Nitrit-Ionen wurden ionenchromatografisch im Zentralinstitut für chemische Analysen des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Ammonium wurde zusätzlich photometrisch mit dem Spectroquant-Verfahren (Merck, Darmstadt) analysiert. Bei diesem Verfahren wird Ammonium in mehreren Reaktionsschritten zu 2,2'-Isopropyl-5,5'-methylindophenol umgesetzt, dessen Extinktion bei 690 nm gemessen wird. Kontrollversuche zeigten, daß die Reaktion durch Proteine (Gelatine, Rinderserumalbumin) nicht, durch Aminosäuren (Glutamat, Prolin) nur schwach gestört wurde. Die ionenchromatografische und die photometrische Methode lieferten gut übereinstimmende Ergebnisse.

2.6.3. Organische Substanzen

Protein. Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Industrieabwässern wurde die Gesamt-Stickstoffkonzentration (Kap. 2.6.1.), die Konzentration der stickstoffhaltigen Ionen (Kap. 2.6.2.) und der Aminosäuren ermittelt. Aus der Differenz des nicht proteingebundenen Stickstoffs und des Gesamtstickstoffs wurde der Proteinstickstoff berechnet. Dieser Wert wurde mit dem empirischen Faktor 6,25 (Buswell u. Neave, 1930) multipliziert, um die Proteinkonzentration zu erhalten.

In Gelatine-umsetzenden Laborkulturen wurde die Gelatinekonzentration in Abwesenheit von Kohlenhydraten mit der Biuret-Methode nach Herbert et al. (1971) bestimmt. In Anwesenheit

von Kohlenhydraten diente die Konzentration freigesetzter Aminosäuren und des gebildeten Ammoniums zur Berechnung der Proteinkonzentration.

Kohlenhydrate wurden mit der Phenol-Schwefelsäure-Methode nach Herbert et al. (1971) analysiert. Die Extinktion des Farbkomplexes wurde bei 488 nm bestimmt. Die sehr empfindliche Methode läßt auch Messungen bei niedrigen Konzentrationen zu (bis zu ca. 50 $\mu mol \cdot l^{-1}$).

Aminosäuren wurden mit dem Aminosäureanalysator LC 2000 (Biotronik, Maintal) bestimmt. Die Aminosäuren wurden nach dem Kationenaustauscher-Prinzip getrennt und mit Ninhydrin zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, dessen Extinktion photometrisch bestimmt wurde. Nach geeigneter Probenverdünnung mit H_2O erfolgte die für Industrie-und Modellabwässer unterschiedliche Probenaufbereitung: Industrieabwasserproben wurden mit 20 Vol-% einer 10 %igen Sulphosalicylsäure (Endkonzentration 2 %) versetzt, um Protein zu fällen. Der Fällungsansatz wurde 30 min bei +4 °C inkubiert. Nach der Proteinabtrennung durch Zentrifugation wurde der Ansatz für die Aminosäureanalyse gemäß Tab. 2.4 hergestellt. In gelatinehaltigen Modellabwässern wurde die Proteinfällung durch Zugabe von 67 Vol.-% absolutem Ethanol erreicht. Der Fällungsansatz wurde 1 h bei einer Temperatur von -18 °C gelagert (s. auch Kap. 2.7). Die Abtrennung des gefällten Proteins erfolgte durch Zentrifugation, die weitere Probenaufbereitung nach Tab. 2.4. Zur Herstellung des Probenverdünnungspuffers wurden 19,6 g Tri-Na-Citrat·H_2O, 1,92 g Phenol und 20 ml Thiodiethanol zu H_2O (ad 1000 ml) gegeben. Die Trennbedingungen sind Tab. 2.5 zu entnehmen.

Tab. 2.4. Zusammensetzung der Ansätze für die Analyse von Aminosäuren in Industrie- und Modellabwässern

Zusatz	Volumen (µl)			
	Industrieabwasser		Modellabwasser	
	Standard	Probe	Standard	Probe
Probe	-	100	-	300
Aminosäurestandard Benson Type H[1]	40	-	40	-
Prolinstandard (50 mM)	40	-	40	-
Hydroxyprolin-standard (50 mM)	40	-	40	-
Ornithinstandard (5 mM)[2]	40	40	40	40
Probenverdünnungspuffer	600	600	600	600
Ethanol 99,8 %	-	-	200	-
H_2O dest.	240	260	40	60

[1] (Biotronik, Maintal)
[2] Interner Standard

Tab. 2.5. Trennbedingungen für die Aminosäureanalyse

Trennsäule	0,6 x 35 cm
Trennharz	Durrum DC-6A
Probevolumen	100 µl
Probenkonzentration	max. 30 nmol/100 µl Probe je Aminosäure
Puffer	Na-Citrat/Na-Chlorid
Durchflußrate	32 ml/min

Prolin und Hydroxyprolin wurden bei 440 nm erfaßt, die anderen Aminosäuren bei 570 nm.

Die Aminosäurezusammensetzung der Gelatine wurde durch saure Hydrolyse des Proteins und anschließende Aminosäureanalyse bestimmt. Dazu wurden 0,456 ml rauchende HCl (37 %) mit 0,544 ml der gelatinehaltigen Probe gemischt und unter N_2 in einem Glasröhrchen 18 h auf 110 °C erhitzt. Danach wurde die Probe lyophilisiert, zweimal in Wasser aufgenommen und jeweils anschließend wieder lyophilisiert. Für die Aminosäureanalyse wurde die Probe erneut in Wasser aufgenommen und wie oben beschrieben bearbeitet.

Flüchtige Fettsäuren und Alkohole wurden gaschromatografisch analysiert. Nach Zentrifugation (Heraeus Biofuge A, 10000 rpm,

10 min) wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit 0,2 N HCl verdünnt. Die Messungen erfolgten mit externem Standard. Tab. 2.6 zeigt die Analysenbedingungen.

Tab. 2.6. Bedingungen für die gaschromatografische Analyse flüchtiger Fettsäuren und Alkohole

Chromatograph	Hewlett-Packard 5790 A mit FID und Probengeber 7673
Säule	Glas, 1 m x 2 mm ID
Packungsmaterial	Porapak QS 80-100 mesh
Säulentemperatur	190 °C
Injektortemperatur	250 °C
Detektortemperatur	250 °C
Trägergas	N_2
Trägergas-Flußgeschwindigkeit	30 $ml \cdot min^{-1}$
Injektionsvolumen	1 µl

Nichtflüchtige Fettsäuren wurden vor der gaschromatografischen Analyse nach Laanbroek (1983) methyliert. 1 ml der zentrifugierten Kulturflüssigkeit wurde mit 2 ml Methanol sowie 0,4 ml einer 50 %igen H_2SO_4 versetzt und 30 min bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1 ml H_2O dest. und 0,5 ml Chloroform zugesetzt. Durch Ausschütteln wurden die Methylester in die Chloroformphase überführt. Die Analyse fand unter den in Tab. 2.7 genannten Bedingungen statt.

Tab. 2.7. Bedingungen für die gaschromatografische Analyse nichtflüchtiger Fettsäuren

Chromatograph	Varian 3700 mit FID
Packungsmaterial	Chromosorb WAW 10 % P1000/ 3 % H_3PO_4
Säulentemperatur	120 °C
Injektortemperatur	210 °C
Detektortemperatur	250 °C
Trägergas	N_2
Trägergas-Flußgeschwindigkeit	30 $ml \cdot min^{-1}$
Injektionsvolumen	1 µl

Ameisensäure wurde photometrisch nach Lang u. Lang (1972) analysiert. Die Methode war von den Autoren zum qualitativen Nachweis der Säure entwickelt worden. Die Eignung der Methode für den quantitativen Ameisensäurenachweis zeigten Sleat u. Mah (1984). In Gegenwart von Essigsäureanhydrid, i-Propanol und Acetamid reagiert Citronensäure mit Ameisensäure zu einem roten Farbstoff, dessen Extinktion bei 515 nm proportional zur Ameisensäurekonzentration zunimmt. Ameisensäure kann mit dieser Methode noch in Konzentrationen von 0,5 $mmol \cdot l^{-1}$ problemlos nachgewiesen werden.

2.6.4. Gase

Biogaszusammensetzung. Der Methangehalt des Biogases wurde gaschromatografisch bestimmt (Tab. 2.8)

Tab. 2.8. Bedingungen für die gaschromatografische Methanalyse

Chromatograph	Packard 428/603 mit FID
Säule	Glas, 1 m x 2 mm ID
Packungsmaterial	Porapak QS 80-100 mesh
Säulentemperatur	145 °C
Injektortemperatur	130 °C
Detektortemperatur	160 °C
Trägergas	N_2
Trägergas-Flußgeschwindigkeit	30 $ml \cdot min^{-1}$
Injektionsvolumen	10 µl

Die Eichung erfolgte mit Methan eines Reinheitsgrades von >99,5 %. Für die gemeinsame Erfassung mehrerer Biogaskomponenten (CH_4, CO_2, N_2, H_2 und H_2S) wurde die in Tab. 2.9 dargestellte Methode verwendet. Die Verwendung von Helium als Trägergas ermöglichte die Erfassung sehr niedriger Wasserstoffkonzentrationen (≥5 ppm). Das Injektionsvolumen betrug 1 ml. Als Analysensäule diente die Molsieve-Säule, die Poraplot-Säule war Referenzsäule. Die Eichung erfolgte mit käuflichen Gasgemischen (Stimotron, Garmisch-Partenkirchen). Außerdem war unter den genannten Bedingungen die Analyse von N_2 möglich. Zur gleichzeitigen Analyse von CH_4, CO_2, H_2S und

Tab. 2.9. Bedingungen für die gaschromatografische Biogasanalyse

Chromatograph	Packard 438 A mit Micro-TCD
Säulen	Poraplot Q FS 25 m x 0,32 mm ID
	Molsieve 5 Å 25 m x 0,32 mm ID
Säulentemperatur	30 °C
Injektortemperatur	25 °C
Detektortemperatur	120 °C
Filamenttemperatur	200 °C
Trägergas	N_2 (40 $ml \cdot min^{-1}$, split 1:2,5)
	He (10 $ml \cdot min^{-1}$, split 1:10)

H_2 wurde Stickstoff als Trägergas verwendet. Hier diente die Poraplot-Säule als Analysensäule, die Polarität des Detektors wurde umgeschaltet. Das Injektionsvolumen betrug 250 µl. Geeicht wurde mit Reingasen (Messer Griesheim).

Biogasvolumen. In statischen Ansätzen wurde das gebildete oder verbrauchte Gasvolumen nach Abkühlen der Reaktionsgefäße von 37 °C auf Raumtemperatur nach Latham u. Wolin (1978) bestimmt. Mit einer zur Hälfte mit Schutzgas gefüllten Glasspritze wurde der Butylgummistopfen durchstochen und die Volumendifferenz abgelesen. Bei Versuchen mit Chemostaten diente zur Messung der Gasbildung bis 500 $ml \cdot h^{-1}$ eine Gasbürette, die mit einer Sperrflüssigkeit (800 ml H_2O, 40 ml konz. H_2SO_4 und 200 g Na_2SO_4) nach D'Ans u. Lax (1967) gefüllt war. Überstiegen die Gasbildungsraten 500 $ml \cdot h^{-1}$, wurde eine 0,5 l-Gasuhr verwendet (Ritter, Bochum). Gasvolumenangaben beziehen sich auf 25 °C und 1013 mbar.

2.6.5. Biomasse

Trübung. Die Trübung (optische Dichte, O.D.) einer Kultursuspension wurde bei 660 nm bestimmt. Die Trübungsmessung in offenen Küvetten wurde bei dieser Wellenlänge nicht durch die Extinktion des Redoxindikators (Resorufin, Reduktionsprodukt des Resazurins und Oxidationsprodukt des Dihydroresorufins) gestört.

Bakterienprotein. Nach dreimaligem Waschen der durch Zentrifugation abgetrennten Zellen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung wurde ein basischer Zellaufschluß (Herbert et al, 1971) und die Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode durchgeführt (Herbert et al., 1971). Die Eichung erfolgte mit Rinderserumalbumin.

Zelltrockengewicht. Als Gefäße für die Trockengewichtsbestimmung dienten bei 105 °C getrocknete, im Exsikkator abgekühlte und gewogene Aluminiumschalen. Die durch Zentrifugation abgetrennten Zellen wurden zweimal in 0,9 %iger NaCl-Lösung, einmal in H_2O dest. bei 4 °C gewaschen, in H_2O dest. aufgenommen und dann in die Schalen überführt. Trocknung bis zur Gewichtskonstanz und Wägung erfolgte wie für die Schalen beschrieben.

2.7. Proteinaseaktivitätsbestimmungen

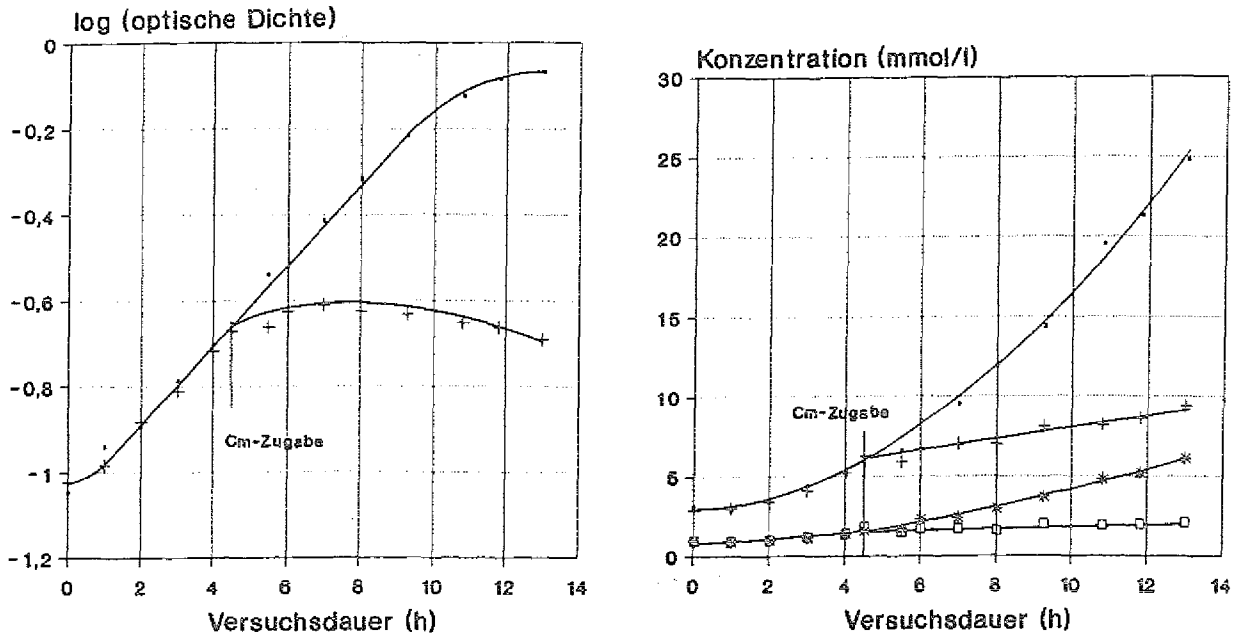
2.7.1. Gelatine-Methode

Für die Messung der Gelatinaseaktivität bakterieller Kulturen ist die Verwendung des Substrates Gelatine optimal, da eine starke Abhängigkeit der gemessenen Proteinaseaktivität vom verwendeten Substrat beschrieben worden ist (Mahadevan et al., 1980; Wallace u. Kopecny, 1983; Wallace et al., 1987; Gibson u. McFarlane, 1988). Daher wurde eine Methode entwickelt, die auf der Messung der Gelatine-Hydrolyserate beruht. Durch

Optimierungsuntersuchungen zur Wahl des Puffers, der Konzentrationen des Inokulums und des Substrates, des Fällungsmittels, der Fällungsmittelkonzentration sowie der Fällungstemperatur und -dauer wurde die im folgenden beschriebene Methode erarbeitet.

Gelatinelösung (1 ml; 25 $g \cdot l^{-1}$) und Pufferlösung (1 ml eines McIlvaine-Citrat/Phosphat-Puffers nach Dawson et al., 1986) wurden in 10 ml-Flaschen, die mit einem Butylgummistopfen verschlossen waren, 15 min mit Argon begast. Dann wurde die Temperatur der Lösung im Wasserbad auf 37 °C gebracht und das Inokulum (0,5 ml Kultursuspension) anaerob mit einer Kunststoffspritze (B. Braun, Melsungen) zugegeben. Die Substrat-Endkonzentration betrug damit 10 $g \cdot l^{-1}$, der Volumenanteil des Inokulums lag bei 20 %. Die Konzentration der Pufferkomponenten (0,1 M Citronensäure und 0,2 M Na_2HPO_4) hingen vom pH-Wert ab, der sich mit diesem Puffer von 2,6 bis 7,6 variieren ließ. Um bakterielles Wachstum während der Reaktionsphase zu unterbinden, wurde den Ansätzen Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 100 $mg \cdot l^{-1}$ zugeführt. Die Wirkung des Antibiotikums wurde mit einer Gelatine-umsetzenden Chemostatenkultur (pH 7, 37 °C, D=0,146 h^{-1}, Substratkonzentration 4,45 $g \cdot l^{-1}$) überprüft. Das Wachstum der Kultur wurde durch die Chloramphenicol-Zugabe vollständig unterbunden, die Gärungsreaktionen weitgehend gehemmt (Abb. 2.2).

Der Enzymansatz wurde dann bei 37 °C im Schüttelwasserbad (190 Schüttelbewegungen$\cdot min^{-1}$) inkubiert. Kontrollansätze ohne Inokulum (abiotische Hydrolyse) und ohne Substrat (Eigenextinktion des Inokulums) wurden mitgeführt. Die Inkubationsdauer betrug je nach proteolytischer Aktivität der Kultursuspension 0,5 bis 2 h (Bereich konstanter Reaktionsrate). Die Hydrolysereaktion wurde durch den Einsatz des Fällungsmittels Ethanol (5 ml, 99,8 %) beendet. Der Fällungsansatz wurde 1 h bei einer Temperatur von -18 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen war Gelatine zu 93 %, Pepton aus Gelatine nicht fällbar. Dann wurde die nicht fällbare Peptidfraktion von der gefällten Proteinfraktion durch Zentrifugation getrennt (Heraeus Biofuge A, 10000 rpm). Die



a b

Abb. 2.2. Hemmung einer anaeroben gelatineverwertenden Chemostatenkultur durch Chloramphenicol (pH 7, 37 °C, D=0,146 h^{-1}, Gelatinekonzentration 4,45 $g \cdot l^{-1}$, Chloramphenicolkonzentration 100 $mg \cdot l^{-1}$). a: Wachstum in An- (+) und Abwesenheit (•) von Cm; b: Bildung von Essigsäure in An- (+) und Abwesenheit (•) von Cm sowie Bildung von Propionsäure in An- (□) und Abwesenheit (*) von Cm

mit Ethanol gefällte Gelatine wurde nach einmaligem Waschen mit absolutem Ethanol und anschließender Lyophilisierung in 3 N NaOH bei 37 °C gelöst. Die spezifische Peptidfreisetzungsrate wurde durch Bestimmung der Konzentration der Peptid- oder Proteinfraktion ermittelt (Biuret-Methode).

2.7.2. Azocoll-Methode

Die Azocoll-Methode wurde zur Ermittlung der Kollagenaseaktivität gelatineabbauender Chemostatenkulturen eingesetzt. Das Substrat ist diazotiertes, wasserunlösliches Kollagen. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 2.10 dargestellt.

Tab. 2.10. Ansatz für die Bestimmung der Collagenaseaktivität

Volumen	Lösung/Suspension	Endkonzentration
1,0 ml	McIlvaine-Citrat/Phosphat-Puffer[1]	
1,0 ml	Azocoll	10 $g \cdot l^{-1}$
0,5 ml	Bakteriensuspension	20 Vol.-%

Gasphase: Argon
Chloramphenicol: 100 $mg \cdot l^{-1}$
[1] nach Dawson et al., 1986

Der anaerobe Ansatz erfolgte, wie für die Gelatine-Methode beschrieben, in gasdicht verschlossenen Flaschen, die bei 37 °C geschüttelt wurden. Die Hydrolysereaktion wurde durch Filtration beendet (als Filter diente eine mit Watte gestopfte Pipettenspitze; eine Extinktionsverringerung durch Adsorption der diazotierten Spaltprodukte trat nicht auf). Das durch die Bakteriensuspension trübe Filtrat wurde anschließend zentrifugiert (Heraeus Biofuge A, 10000 rpm, 15 min) und die Extinktion des Überstandes bei 520 nm bestimmt. Die Eichung erfolgte durch Azocoll, das durch Kollagenase vollständig hydrolysiert worden war. Die hydrolytische Reaktion der untersuchten Bakterienkulturen war über einen Zeitraum von 60 min linear. Der Zusammenhang zwischen der Konzentration des Inokulums und der Hydrolyserate war in einem Bereich von 0-20 Vol.-% linear.

2.8. Mikroskopie

Lichtmikroskopie. Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurde das Phasenkontrast-Fotomikroskop III (Carl Zeiss, Oberkochen) verwendet, das mit dem Fluoreszenz-Auflichtkondenor III RS ausgerüstet war. Die Anregungswellenlänge lag bei 390-440 nm.

Rasterelektronenmikroskop (REM). Für Untersuchungen mit dem REM wurde die Bakteriensuspension auf ein Polycarbonat-Membranfilter (Nucleopore, Tübingen) mit dem Porendurchmesser 2 µm aufgetropft und an der Luft getrocknet. Nach der Fixierung in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd wurde die Probe mit H_2O dest. gewaschen, in Aceton/Ethanol-Gemische mit steigender

Acetonkonzentration überführt und in flüssigem Kohlendioxid gefriergetrocknet (Kritische Punkt-Trocknung). Nach der Beschichtung mit Gold wurde die Probe in einem Leitz AMX-REM betrachtet und fotografiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Herrn Els (Institut für Reaktorwerkstoffe, Forschungszentrum Jülich) angefertigt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Abbau von protein- und kohlenhydrathaltigen Industrieabwässern in anaeroben Abwasserreinigungs-Anlagen

Der Abbau proteinhaltiger Industrieabwässer wurde in 9 vorwiegend zweistufigen Abwasserreinigungs-Anlagen verschiedener verfahrenstechnischer Auslegung untersucht, der Schwerpunkt lag auf den Reaktionen in der Versäuerungsstufe. Die Untersuchung deckt Umsetzungen im pH-Bereich zwischen 3,3 und 7,2 und CSB-Raumbelastungen zwischen 1,4 und 31 $kg \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}$ ab. Die Proteinbelastungen der Reaktoren lagen zwischen 0,12 und 7,1 $kg \cdot m^{3} \cdot d^{-1}$. Die Industrieprozesse, aus denen die Abwässer stammten, und die Reaktortypen der zur Reinigung verwendeten Anlagen sind in Tab. 3.1. zusammengestellt.

Tab. 3.1. Abwasser- und Reaktortypen der untersuchten Abwasserreinigungs-Anlagen. Die Anlagen 1 bis 7 sind zweistufig, die Anlagen 8 und 9 einstufig.

Anlage-Nr.	Industrieprodukt	Reaktortyp	
		Versäuerungs-reaktor (1. Stufe)	Methanreaktor (2. Stufe)
1	Weizenstärke	TR	AFR[1]
2	Kartoffelstärke	CSTR	AFR[2]
3	Glucose aus Weizenmehl	CSTR[1]	UASBR/CSTR[1]
4	Branntwein	CSTR[2]	AFR
5	Bier	CSTR	AFR
6	Kartoffelstärke	CSTR[1]	AFR[2]
7	Kartoffelchips	CSTR[1]	UASBR/CSTR[1]
8	Pommes frites	UASBR[1]	
9	Pharmazeutika	UASBR	

Abkürzungen: TR nicht durchmischter Tankreaktor; CSTR durchmischter Tankreaktor; AFR Filter (Festbett)-Reaktor; UASBR Schlammbettreaktor

[1] mit Biomasse-Rückführung
[2] mit Biomasse-Abscheidung

Alle Abwässer waren vorwiegend durch gelöste Abwasserinhaltsstoffe belastet, so daß die Untersuchung nur auf die gelösten

Abwasserinhaltsstoffe bezogen wurde. Die Abwasserzusammensetzung ist in Tab. 3.2 dargestellt.

Tab. 3.2. Zusammensetzung 9 verschiedener Industrieabwässer

Anlage-Nr.	CSB ($g \cdot l^{-1}$)		Anteil der Stickstoffverbindungen und Kohlenhydrate am CSB (%)		
	gesamt	gelöst	Protein	Aminosäuren	Kohlenhydrate
1	46,7	39,3	15,1	0,67	72,3
2	37,4	27,9	36,0	1,7	24,4
3	17,1	10,6	22,3	0,26	53,5
4	19,4	18,5	10,3	1,1	7,8
5	1,16	1,14	16,4	nn	38,9
6	13,2	9,50	56,0	24,6	11,4
7	5,52	5,32	27,7	6,4	9,9
8	6,67	4,90	14,9	5,2	33,1
9	57,6	48,4	9,8	1,7	3,2

nn: nicht nachweisbar

Die Tabelle zeigt, daß sowohl Proteine als auch Kohlenhydrate bedeutende Inhaltsstoffe der untersuchten Abwässer der Lebensmittel- und Pharmaindustrie waren. Mit Konzentrationen von 0,125 bis 6,69 $g \cdot l^{-1}$ trugen Proteine zu 9,8 bis 56 % zum CSB der Abwässer bei. Die Konzentrationen der Kohlenhydrate lagen zwischen 0,443 und 28,4 $g \cdot l^{-1}$. Ihr Anteil am CSB reichte von 3,2 % bis 72 %. Aminosäuren spielten als Inhaltsstoffe mit einer Ausnahme (Anlage 6) eine unbedeutende Rolle. Proteingebundener Stickstoff machte 53 bis 95 % des Gesamt-Stickstoffs aus.

Die Betriebsdaten und die Abbauleistungen der Anlagen sind in Tab. 3.3 zusammengestellt.

Tab. 3.3. Betriebsparameter und Abbauleistungen 9 verschiedener Anlagen zur Reinigung von Industrieabwässern

Anlage		pH	T (°C)	Θ_H		B_{CSB} ($g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	B_{Prot}	Abbaugrad (%) CSB	Protein	Kohlenhydrat
1	V	3,3	27	30	h	31	3,2	23	3,7	81
	M	7,3	30	7,1	d	4,3	0,41			
	G							91	91	100
2	V	4,1	38	34	h	20	4,8	27	0	93
	M	6,9	38	41	h	12	3,2			
3	V	4,5	40	40	h	6,4	0,95	0	22	89
	M	7,2	35	6,3	d	1,7	0,082			
	G							91	80	99
4	V	4,8	37	24	h	19	1,3	0	18	72
	M	6,6	37	5	h	100	5,1			
	G							77	60	96
5	V	4,9	40	26	h	1,4	0,12	0	0	96
	M	7,0	35	48	h	0,75[1]	0,047*			
6	V	5,8	41	12	h	19	7,1	0	47	89
	M	7,2	38	17	h	16	2,0			
7	V	6,7	34	50	h	2,6	0,47	72	86	98
	M	7,2	34	8,3	d	0,18	0,011			
	G							97	91	99
8		7,0	31	35	h	3,4	0,33	97	96	99
9		7,2	37	3,8	d	12,7	0,83	82	3,8	95

Abkürzungen: V, Versäuerungsreaktor; M, Methanreaktor; G, Gesamtanlage (Versäuerungs- und Methanreaktor); T, Temperatur; Θ_H, Flüssigkeitsverweilzeit; B_{CSB}, CSB-Raumbelastung; B_{Prot}, Protein-Raumbelastung

* starke Konzentrationsschwankungen der Abwasser-Inhaltsstoffe (Gesamt-Stickstoff-Konzentration im Methanreaktor deutlich niedriger, als im Versäuerungsreaktor)

Für die Anlagen 2 und 6 entfällt die Auswertung der Leistung der Gesamtanlage auf Grund einer Betriebsstörung, für die Anlage 5 wegen starker Konzentrationsschwankungen der Abwasser-Inhaltsstoffe

Die ersten Stufen der Anlagen 1 bis 6 wurden als reine Versäuerungsreaktoren betrieben, eine CSB-Reduktion durch Methanbildung spielte keine oder eine untergeordnete Rolle. Dagegen fand im Versäuerungsreaktor der Anlage 7 eine CSB-Reduktion um

72 % statt, die im wesentlichen auf methanogene Reaktionen zurückzuführen war. Die Betriebsweise dieses Reaktors ist also zwischen denen der reinen Versäuerungsreaktoren und denen der einstufigen Anlagen einzuordnen. Die Methanbildung in den Reaktoren 8 und 9 sowie in der Versäuerungsstufe der Anlage 7 wurde ermöglicht durch das Zusammenspiel niedriger Kohlenhydrat-Konzentrationen, ausreichend langer Flüssigkeitsverweilzeiten und verfahrenstechnischer Maßnahmen zur Biomasserückhaltung. Eine deutliche Korrelation ist zwischen der Kohlenhydrat-Konzentration im Abwasser und dem pH-Wert im Versäuerungsreaktor bei den Anlagen 1 bis 6 zu sehen. Bei kurzen Flüssigkeitsverweilzeiten wurden in den Reaktoren, die ohne Einrichtungen zur Biomasse-Rückführung betrieben wurden, acetogene und methanogene Bakterien ausgewaschen, die aus Kohlenhydraten gebildeten Säuren akkumulierten und bestimmten den pH-Wert im Reaktor.

Der Proteinabbaugrad in den Versäuerungsstufen der Anlagen 1 bis 7 und in den einstufigen Anlagen 8 und 9 wurde sowohl vom pH-Wert im Reaktor als auch von der CSB-Raumbelastung beeinflußt: Proteinabbaugrade von mehr als 90 % wurden nur bei pH-Werten erreicht, die im Neutralbereich lagen. Bei pH-Werten unterhalb von 4,5 fand kein nennenswerter Proteinumsatz statt. Weniger deutlich ist der Zusammenhang zwischen der CSB-Raumbelastung der Reaktoren und dem Proteinabbaugrad. Hier ist mit zunehmender CSB-Raumbelastung ein Abfall des Proteinabbaugrades erkennbar. Im Gegensatz dazu blieb der Kohlenhydratabbaugrad im gesamten untersuchten pH- und CSB-Raumbelastungsbereich deutlich über 90 %. Die Zusammenhänge sind in Abb. 3.1 dargestellt.

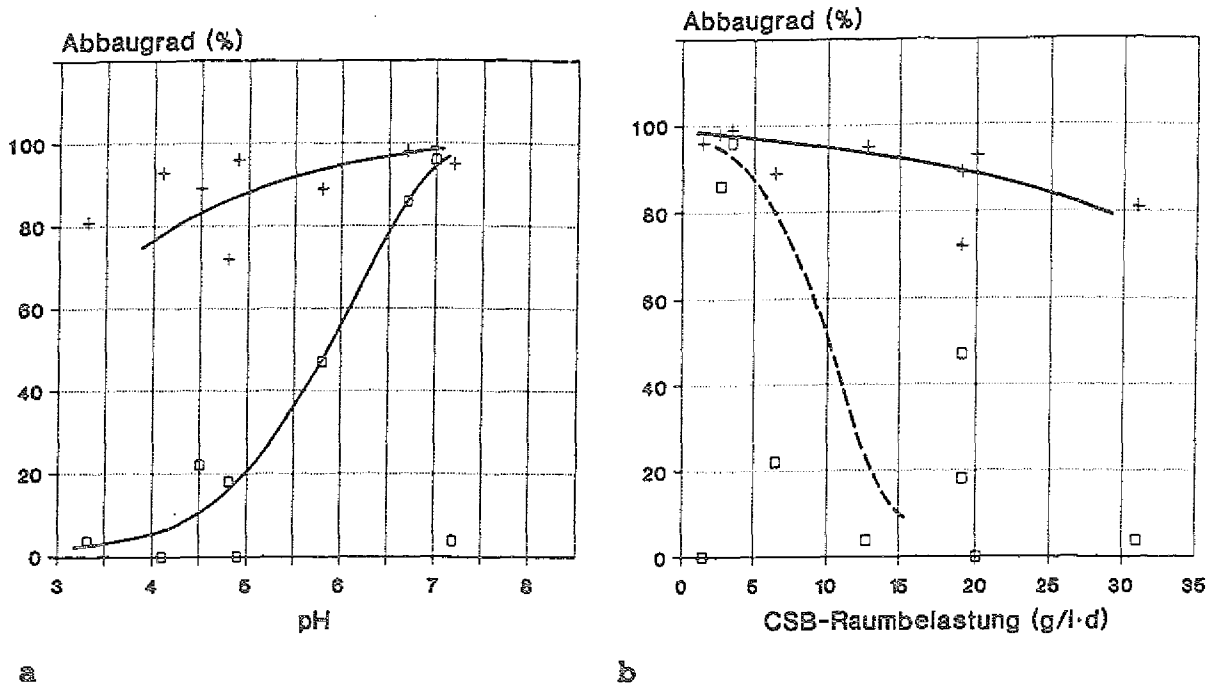


Abb. 3.1. Abhängigkeit der Protein- und Kohlenhydrat-Abbaugrade von pH-Wert (a) und CSB-Raumbelastung (b) in 9 verschiedenen Industrieabwasser-Reaktoren. Dargestellt sind die Daten für die Versäuerungsstufen der zweistufigen Anlagen 1-7 und der einstufigen Anlagen 8 und 9. (□) Proteinabbaugrad; (+) Abbaugrad der Kohlenhydrate

Aminosäuren konnten in den Versäuerungsreaktoren der zweistufigen Anlagen nicht in nennenswerten Konzentrationen nachgewiesen werden. Der Anteil der Aminosäuren am CSB des Reaktorinhaltes überstieg 3,7 % (Versäuerungsreaktor der Anlage 2) nicht. In den Versäuerungsstufen der Anlagen 5 und 7, in den einstufigen Anlagen 8 und 9 und in den Methanreaktoren der zweistufigen Anlagen waren Aminosäuren nicht nachweisbar.

In Versäuerungsreaktoren, die mit einem niedrigen pH-Wert betrieben wurden, fand keine Selektion von Bakterien statt, deren Proteolyse-Optimum im Bereich niedriger pH-Werte lag. Zwei Reaktoren, die bei den pH-Werten 4,5 und 4,8 betrieben wurden (Versäuerungsreaktoren der Anlagen 3 und 4), zeigten ein deutliches Proteolyse-Optimum im pH-Neutralbereich (Abb. 3.2).

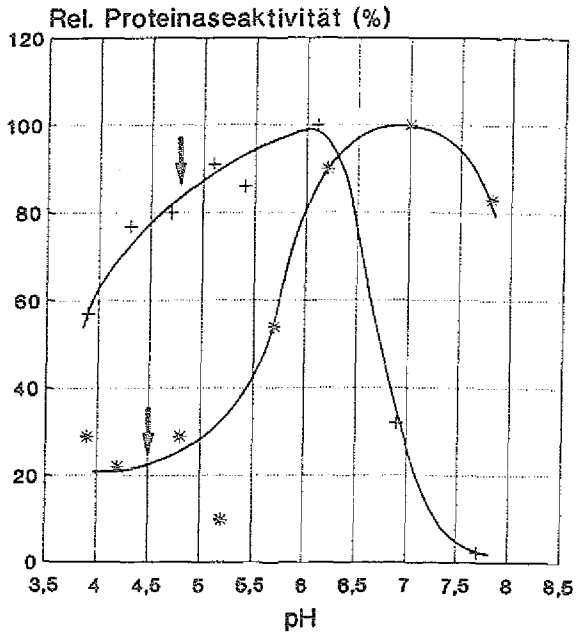


Abb. 3.2. Relative Proteinaseaktivitäten der Kulturen aus Versäuerungsreaktoren der Anlagen 3 (*) und 4 (+). Pfeile kennzeichnen den pH-Wert im Reaktor. Das Substrat für die Aktivitätsmessung war Azocollagen, gelöst in Citrat/Phosphat-Puffer nach Mc Ilvaine u. Whiting (Dawson et al., 1986).

Die Zellzahl proteolytischer Bakterien wurde in der Reaktorflüssigkeit des Versäuerungsreaktors der Anlage 4 untersucht. Ihr Anteil an der Gesamtzellzahl war trotz des niedrigen pH-Wertes (4,8) mit 30 % der Gesamtpopulation hoch (Tab. 3.4).

Tab. 3.4. Populationszusammensetzung der Versäuerungskultur der Industrieabwasseranlage 4. Der pH-Wert im Reaktor betrug 4,8.

Substrat	Zellzahl (ml^{-1})	Relative Zellzahl (%)
AC-Vollmedium	$15 \cdot 10^6$	100
Kohlenhydrat-Gemisch*	$6{,}5 \cdot 10^6$	43
Pepton aus Gelatine	$10 \cdot 10^6$	67
Gelatine	$4{,}5 \cdot 10^6$	30

* Glucose, Maltose, Saccharose, Maltose, Stärke (je 2 $g \cdot l^{-1}$)

Die Ursache für den niedrigen Abbaugrad der Proteine war also nicht in der Abwesenheit proteolytischer Bakterien zu suchen, sondern in einer Hemmung ihrer proteolytischen Aktivität.

Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen mehrerer Autoren, daß im Gegensatz zum Kohlenhydratabbau der Proteinabbau als problematisch eingestuft werden muß (Seyfried et al., 1985; Wildenauer u. Winter, 1985; Breure u. van Andel, 1987; Keim, 1990). Es zeigt sich ein deutlicher Widerspruch zwischen der Proteinabbauleistung der meisten der untersuchten Versäuerungsreaktoren und der klassischen Vorstellung von einem zweistufigen Abbauprozeß (Ghosh u. Klass, 1977; Cohen et al, 1979; Verstraete et al., 1981; Aivasidis, 1989), nach der hydrolytische und acidogene Reaktionen möglichst vollständig in der 1. Stufe eines Zweistufen-Prozesses ablaufen sollen.

Um unter definierten Bedingungen die mikrobiologischen Grundlagen der Proteolyse in Versäuerungsreaktoren und die Ursachen für den oft unvollständigen Proteinabbau aufklären zu können, wurden weitergehende Untersuchungen mit Modellabwässern definierter Zusammensetzung in Laborreaktoren durchgeführt.

3.2. Kontinuierliche Umsetzung gelatinehaltiger Modellabwässer in Labor-Versäuerungsreaktoren

Die Untersuchungen der Umsetzung von Industrieabwässern in Versäuerungsreaktoren hatten gezeigt, daß die Proteinhydrolyse bei niedrigen pH-Werten unvollständig blieb. Eine Adaptation der Population an niedrige pH-Werte bezüglich des pH-Optimums der Proteolyse war nach diesen Untersuchungen nicht zu erwarten. Zudem haben Breure u. van Andel (1984) ein Optimum bei pH 7 für die anaerobe Gelatineversäuerung beschrieben. Weitergehende Untersuchungen zur Beeinflussung des Proteinabbaus durch die Kulturbedingungen und zu den Eigenschaften der proteolytische Misch- und Reinkulturen wurden daher im pH-Neutralbereich, bei pH 7,0, durchgeführt. Zunächst wurde der Einfluß der Durchflußrate auf den Umsatz von Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) in Chemostaten untersucht. Durch die Wahl hoher Durchflußraten (0,036 h^{-1} bis 0,498 h^{-1}) sollte die Methanogenese weitgehend unterbunden werden. So war die Einstellung von Kulturbedingungen gewährleistet, die in Versäuerungsreaktoren zweistufiger Abwasserreinigungs-Anlagen vorherrschen.

Die Gelatinehydrolyse war bei Durchflußraten von 0,211 h^{-1} bis 0,036 h^{-1} nahezu vollständig. Bei hohen Durchflußraten nahm der Hydrolysegrad ab, lag aber bei der höchsten untersuchten Durchflußrate (0,498 h^{-1}) noch bei 69,8 % (Tab. 3.5). Als maximale, auf das Reaktorvolumen bezogene, hydrolytische Aktivität wurde ein Wert von 36,7 $g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ bestimmt. Die Hauptprodukte der Gelatineumsetzung waren im gesamten Bereich der untersuchten Durchflußraten flüchtige Fettsäuren, vor allem Essig-, Propion- und n-Valeriansäure. 55 bis 63 % des verwerteten Gelatine-Kohlenstoffs wurden zu Fettsäuren umgesetzt (Tab. 3.6). Das Fettsäurespektrum änderte sich mit zunehmenden Durchflußraten nur geringfügig. Aminosäuren ließen sich bei allen untersuchten Durchflußraten nur in Konzentrationen von weniger als 1 $mmol \cdot l^{-1}$ nachweisen. Zwar stieg der Kohlenstoffanteil des Methans mit abnehmender Durchflußrate an, jedoch betrug er maximal 9,0 %. Die Chemostaten stellten damit im untersuchten Durchflußraten-Bereich nahezu reine

Tab. 3.5. Gelatineabbau in Labor-Versäuerungsreaktoren bei einer Substratkonzentration von 4,45 $g \cdot l^{-1}$ in Abhängigkeit von der Durchflußrate.

Meßgröße		Meßwert					
D	(h^{-1})	0,036	0,069	0,146	0,211	0,313	0,498
θ_h	(h)	27,8	14,5	6,85	4,74	3,19	2,01
B_{CSB}	($g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	5,2	9,9	21	30	45	71
c_{Gel}	($mg \cdot l^{-1}$)	47	7	25	25	221	1330
η_{Gel}	(%)	98,9	99,9	99,4	99,4	95,0	70,1
$R_{V\ Gel}$	($g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	3,77	7,29	15,3	22,2	31,5	36,8
R_{BPGakt}	($g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)	12,5	24,9	45,3	74,0	119	192
R_{BPGpot}	($g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)	583	672	629	398	269	182
c_{BP}	($mg \cdot l^{-1}$)	302	293	338	300	265	192
<u>Produkte der Flüssigphase</u>							
C_2	($mmol \cdot l^{-1}$)	20,9	23,1	28,9	27,9	27,4	16,9
C_3	($mmol \cdot l^{-1}$)	10,3	9,2	5,9	5,8	4,0	4,0
nC_4	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,67	0,61	1,7	1,7	1,3	1,3
iC_4	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,81	0,78	0,73	0,69	0,69	0,64
nC_5	($mmol \cdot l^{-1}$)	1,9	2,5	3,5	3,6	5,0	3,5
iC_5	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,97	1,1	1,1	1,0	1,0	0,97
<u>Biogas</u>							
R_{BG}	($l \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	0,329	0,842	0,490	0,564	0,784	0,376
CH_4	(%)	69,0	76,8	74,2	75,5	74,8	77,3
CO_2	(%)	nb	20,0	13,8	12,4	12,5	5,5
N_2	(%)	nb	2,5	9,7	9,9	9,6	nb
H_2S	(%)	nb	0,68	0,36	0,22	0,11	0,046

Gelatinekonzentration: 4,45 $g \cdot l^{-1}$. Die Verdünnung durch das Titrationsmittel wurde berücksichtigt.

Abkürzungen: θ_h: Flüssigkeitsverweilzeit; B_{CSB}: CSB-Raumbelastung; c_{Gel}: Gelatinekonzentration; η_{Gel}: Gelatineabbaugrad; $R_{V\ Gel}$: volumenspezifische Gelatine-Umsatzrate; R_{BPGakt}: aktuelle Gelatineumsatzrate, bezogen auf Bakterienprotein; R_{BPGpot}: potentielle Gelatineumsatzrate, bezogen auf Bakterienprotein; c_{BP}: Bakterienprotein-Konzentration; R_{BG}: volumenspezifische Biogasbildungsrate; weitere Abkürzungen: s. Abkürzungsverzeichnis)

Tab. 3.6. Kohlenstoff-Bilanz des Gelatineabbaus in Labor-Versäuerungsreaktoren bei einer Substratkonzentration von 4,45 $g \cdot l^{-1}$ in Abhängigkeit von der Durchflußrate.

Meßgröße		Meßwert				
D	(h^{-1})	0,069	0,146	0,211	0,313	0,498
Restgelatine	(%)	0,1	0,6	0,6	5,0	29,9
C_2	(%)	25,8	32,5	31,3	30,7	19,1
C_3	(%)	15,4	9,9	9,8	6,7	7,6
C_4	(%)	3,1	5,5	5,4	4,5	4,5
C_5	(%)	10,1	12,9	12,9	16,8	12,4
CH_4	(%)	9,0	2,7	1,9	1,8	0,6
CO_2	(%)	16,1	10,0	8,9	9,0	3,9
Biomasse	(%)	7,3	8,5	7,5	6,6	4,8
Summe	(%)	86,9	82,6	78,3	81,1	82,8

Konzentration des Substrat-Kohlenstoffs: 2,165 $g \cdot l^{-1}$. Die Anteile sind bezogen auf den zugeführten Kohlenstoff.

Versäuerungsreaktoren dar. Die Überführung der Mischkultur aus dem Chemostaten (D=0,146 h^{-1}) in eine statische Kultur gestattete die Bestimmung der potentiellen Methanbildungsraten aus Essigsäure, Ameisensäure (je 10 $mmol \cdot l^{-1}$) und H_2/CO_2 (0,8 bzw. $0,2 \cdot 10^5$ Pa). Die Methanbildungsrate betrug bei der Umsetzung von Ameisensäure 24 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ und bei der Methanogenese aus H_2/CO_2 57 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$. Essigsäure wurde innerhalb der 2-stündigen Inkubationszeit nicht zu Methan umgesetzt. Die Methanbildung erfolgte demnach nur aus Ameisensäure und bzw. oder H_2/CO_2. Die potentielle Methanbildungsrate aus H_2/CO_2 lag dabei um den Faktor 2,4 über der Methanbildungrate aus Formiat. Die potentiellen Methanbildungsraten waren deutlich höher, als die im Reaktor gemessene aktuelle Methanbildungsrate (14,7 $mmol \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$), das methanogene System war nicht gesättigt. Für den vollständigen Gelatineumsatz im untersuchten Modellsystem waren also die acetogenen Umsetzungen und die Methanogenese aus Essigsäure limitierend. Die Biomassekonzentration blieb mit zunehmender Durchflußrate bis zu einem Wert von 0,313 h^{-1} nahezu konstant und fiel erst bei einer Durchflußrate von 0,498 h^{-1} deutlich ab. Für die Fermentation mit

einer Durchflußrate von 0,146 h^{-1} wurde die Elementarzusammensetzung der Biomasse mit 44,4 % C, 12,6 % N und 6,35 % H bestimmt. Der Proteinanteil an der Zelltrockenmasse wurde bei dieser Durchflußrate mit 83 % ermittelt. Wird diese Zusammensetzung vereinfachend der gesamten Fermentationsreihe zugrunde gelegt, lag der in Biomasse umgesetzte Kohlenstoffanteil zwischen 6,9 und 8,5 %. Als maximale, auf die bakterielle Proteinmasse bezogene, spezifische proteolytische Aktivität wurde ein Wert von 192 $g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$ bestimmt. Die potentielle proteolytische Aktivität (Proteinaseaktivität) der Kultur stieg mit abnehmender Durchflußrate stark an und erreichte bei 0,069 h^{-1} mit 672 $g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$ ein Maximum. Der Vergleich mit der aktuellen proteolytischen Aktivität (Gelatine-Umsatzrate) zeigte einen mit abnehmender Durchflußrate ansteigenden Aktivitätsüberschuß. Bei einer Durchflußrate von 0,036 h^{-1} war die potentielle Aktivität gegenüber der aktuellen Aktivität 47-fach erhöht (Abb. 3.3).

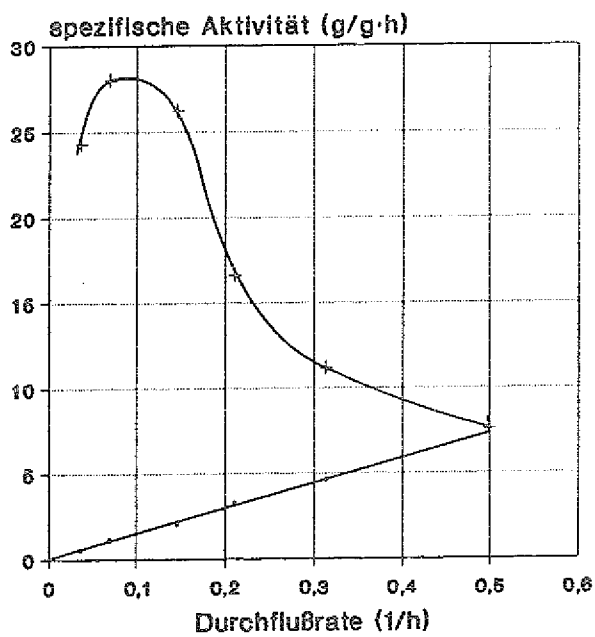


Abb. 3.3. Aktuelle (▪) und potentielle (+) proteolytische Aktivität bakterieller Mischkulturen beim Wachstum im Chemostaten mit Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) in Abhängigkeit von der Durchflußrate.

Im Hinblick auf den Vergleich des Umsatzes von Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) als alleiniger C-Quelle und von Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) in Gegenwart von Glucose (4,54 $g \cdot l^{-1}$) war die

Untersuchung des Einflusses der Substrat- und damit auch der Produktkonzentration auf den Abbaugrad notwendig, da die bei der anaeroben Gelatineumsetzung gebildeten kurzkettigen Fettsäuren gegenüber Bakterien eine toxische Wirkung haben (McCarty, 1964; Salmond et al., 1984; Woolford, 1984). Der Versuch wurde im Chemostaten bei pH 7,0 mit verdoppelter Gelatinekonzentration (8,9 $g \cdot l^{-1}$) im Durchflußratenbereich von 0,079 h^{-1} bis 0,47 h^{-1} durchgeführt. Der Gelatineumsatz war bis zur Durchflußrate D=0,280 h^{-1} mit Abbaugraden von über 96 % nahezu vollständig und fiel erst bei der höchsten Durchflußrate (0,472 h^{-1}) auf 82 % ab (Tab. 3.7). Das Produktspektrum war dem der Fermentationsreihe mit 4,45 $g \cdot l^{-1}$ Gelatine sehr ähnlich, die Konzentrationen der Produkte lagen entsprechend der höheren Substratkonzentration jedoch höher (Tab. 3.7 und 3.8).

Nach Monod läßt sich der Zusammenhang zwischen Durchflußrate und Restsubstratkonzentration im Chemostaten nach der Gleichung

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot c}{k_s + c}$$

für μ : Wachstumsrate
μ_{max} : maximale Wachstumsrate
c : Substratgleichgewichtskonzentration
k_s : Substratkonzentration bei halbmaximaler Wachstumsrate

beschreiben (Howell, 1983). Die Gleichung ist für den Umsatz eines definierten Substrat-Monomers durch eine bakterielle Reinkultur entwickelt worden. Der Graph läßt sich durch Umformung nach Hanes linearisieren (Bisswanger, 1979). Für den

Tab. 3.7. Gelatineabbau in Labor-Versäuerungsreaktoren bei einer Substratkonzentration von 8,90 $g \cdot l^{-1}$ in Abhängigkeit von der Durchflußrate.

Meßgröße		Meßwert			
D	(h^{-1})	0,079	0,143	0,280	0,472
Θ_h	(h)	12,7	6,99	3,57	2,12
B_{CSB}	($g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	22,6	41,0	80,2	135,3
c_{Gel}	($mg \cdot l^{-1}$)	35	97	352	1590
η_{Gel}	(%)	99,6	98,9	96,0	82,0
$R_{V\ Gel}$	($g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	16,5	29,7	56,8	81,9
R_{BPGakt}	($g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)	26,8	46,0	92,9	157,7
c_{BP}	($mg \cdot l^{-1}$)	0,617	0,647	0,612	0,519
<u>Produkte der Flüssigphase</u>					
C_2	($mmol \cdot l^{-1}$)	53,6	55,3	47,0	33,2
C_3	($mmol \cdot l^{-1}$)	8,6	3,9	3,4	5,0
nC_4	($mmol \cdot l^{-1}$)	2,0	3,9	4,3	2,2
iC_4	($mmol \cdot l^{-1}$)	1,8	1,7	1,4	1,5
nC_5	($mmol \cdot l^{-1}$)	13,0	10,0	6,8	4,6
iC_5	($mmol \cdot l^{-1}$)	2,2	2,3	2,2	1,9
<u>Biogas</u>					
R_{BG}	($l \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	0,517	1,33	1,89	1,20
CH_4	(%)	59,1	63,9	67,1	73,8
CO_2	(%)	33,6	31,8	28,1	23,0
N_2	(%)	5,5	4,1	4,2	nb
H_2S	(%)	0,95	0,47	0,41	nb

Gelatinekonzentration: 8,90 $g \cdot l^{-1}$. Die Verdünnung durch das Titrationsmittel wurde berücksichtigt.

Abkürzungen: Θ_h: Flüssigkeitsverweilzeit; B_{CSB}: CSB-Raumbelastung; c_{Gel}: Gelatinekonzentration; η_{Gel}: Gelatineabbaugrad; $R_{V\ Gel}$: volumenspezifische Gelatine-Umsatzrate; R_{BPGakt}: aktuelle Gelatineumsatzrate, bezogen auf Bakterienprotein; R_{BPGpot}: potentielle Gelatineumsatzrate, bezogen auf Bakterienprotein; c_{BP}: Bakterienprotein-Konzentration; R_{BG}: volumenspezifische Biogasbildungsrate; weitere Abkürzungen: s. Abkürzungsverzeichnis)

Tab. 3.8. Kohlenstoff-Bilanz des Gelatineabbaus in Labor-Versäuerungsreaktoren bei einer Substratkonzentration von 8,90 $g \cdot l^{-1}$ in Abhängigkeit von der Durchflußrate.

Meßgröße		Meßwert			
D	(h^{-1})	0,079	0,143	0,280	0,472
Gelatine	(%)	0,4	1,1	4,0	18,0
C_2	(%)	30,2	31,1	26,3	18,6
C_3	(%)	7,3	3,3	2,9	4,2
C_4	(%)	4,3	6,3	6,4	4,1
C_5	(%)	21,4	17,3	12,6	9,1
CH_4	(%)	1,9	2,8	2,2	0,9
CO_2	(%)	13,7	13,4	11,4	8,8
Biomasse	(%)	7,8	8,1	7,6	6,5
Summe	(%)	87,0	83,4	73,4	70,2

Konzentration des Substrat-Kohlenstoffs: 4,330 $g \cdot l^{-1}$. Die Anteile sind bezogen auf den zugeführten Kohlenstoff

speziellen Fall des Proteinumsatzes durch eine Mischkultur liegt keine Berechnungsgrundlage für kinetische Daten vor. Die vereinfachende Anwendung der Monod-Gleichung auf diesen Fall zeigte bei linearer Regression der Meßwerte der Hanes-Auftragung jedoch einen sehr guten Korrelationskoeffizienten (r^2=0,997), so daß die Monod-Gleichung zur Berechnung der kinetischen Größen D_{max} und D_{krit} der Gelatine (4,45 und 8,90 $g \cdot l^{-1}$) umsetzenden Chemostaten-Mischkulturen herangezogen wurde. Die gemessenen und durch Regression der Hanes-Auftragung berechneten Restkonzentrationen wurden in den Gelatine-Abbaugrad umgerechnet und gegen die Durchflußrate aufgetragen (Abb. 3.4).

Der bei der Umsetzung von Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) bei einer Durchflußrate von 0,036 h^{-1} erhaltene Meßwert wich bei linearer Auftragung nach Hanes deutlich von der berechneten Ausgleichsgeraden ab und wurden daher bei der Ermittlung der kinetischen Daten nicht berücksichtigt. Die Abweichung wird auf einen deutlich erhöhten Anteil des Erhaltungsstoffwechsels bei niedrigen Durchflußraten zurückgeführt (Tempest u.

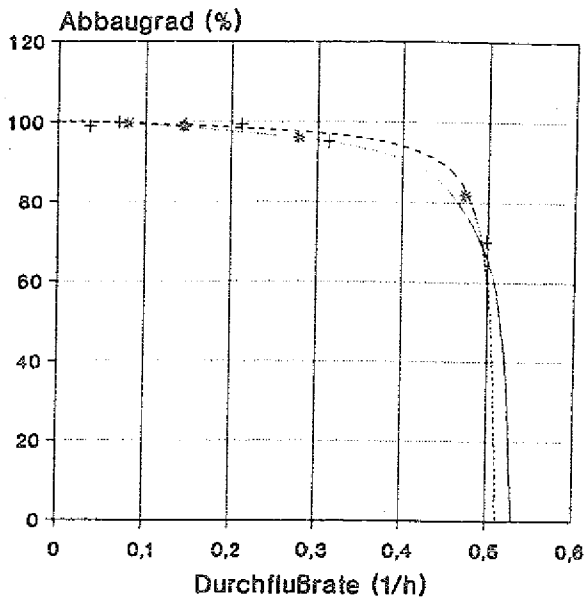


Abb. 3.4. Abhängigkeit des Gelatine-Abbaugrades von der Durchflußrate im Chemostaten. Die Gelatinekonzentrationen betrugen 4,45 $g \cdot l^{-1}$ (+ gemessen, --- berechnet) und 8,90 $g \cdot l^{-1}$ (* gemessen, ···· berechnet)

Neijssel, 1984). Als kritische Durchflußrate wurde beim Umsatz der Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) ein Wert von 0,512 h^{-1} bestimmt, die maximale Durchflußrate lag bei 0,520 h^{-1}. Als minimale Generationszeit der Mischkultur ergibt sich daraus ein Wert von 1,9 h. Für den Umsatz der höher konzentrierten Gelatinelösung (8,90 $g \cdot l^{-1}$) wurde als maximale Durchflußrate ein Wert von 0,546 h^{-1}, als kritische Durchflußrate 0,530 h^{-1} ermittelt. Die minimale Generationszeit der Mischkultur lag bei 1,8 h. Der Vergleich der Fermentationsreihen mit 4,45 und 8,9 $g \cdot l^{-1}$ Gelatine zeigte damit eine gute Übereinstimmung der kinetischen Konstanten D_{max} und D_{krit}. Der Befund wurde durch die mikroskopische Untersuchung bestätigt. In beiden Kulturen dominierten unbewegliche Langstäbchen. Die Gelatine-Restkonzentration lag bei Zufuhr der höherkonzentrierten Gelatinelösung nur geringfügig höher, als bei der Vergleichskultur. Dieser Effekt kann auf die höheren Produktkonzentrationen, vor allem auf die erhöhte Ammoniumkonzentration, zurückgeführt werden.

3.3. Kontinuierliche Umsetzung gelatine- und glucosehaltiger Modellabwässer in Labor-Versäuerungsreaktoren

Durch die in Kap. 3.3 beschriebenen Versuche konnte gezeigt werden, daß Gelatine im Chemostaten bei Durchflußraten bis zu 0,5 h^{-1} mit hohen spezifischen Umsatzraten hydrolysiert und zu Fettsäuren umgesetzt werden kann. Da die meisten proteinhaltigen Industrieabwässer auch Kohlenhydrate enthalten, sollte unter vergleichbaren Versuchsbedingungen der Einfluß von Glucose auf den Umsatz der Gelatine untersucht werden. Die Versuche wurden bei pH 7,0 und variierten Durchflußraten durchgeführt. Als Substrate dienten Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) und Glucose (4,54 $g \cdot l^{-1}$).

Im gesamten untersuchten Durchflußratenbereich von 0,100 h^{-1} bis 0,943 h^{-1} war der Glucoseumsatz mit mehr als 98% nahezu vollständig. Dennoch ist deutlich eine Zunahme der Glucose-Restkonzentration mit steigender Durchflußrate erkennbar (Tab. 3.9). Der Gelatineumsatzgrad war bei allen untersuchten Durchflußraten signifikant niedriger, als bei der Vergleichsfermentation mit Gelatine als alleiniger Kohlenstoffquelle. Bei D= 0,379 h^{-1} sank der Hydrolysegrad auf 71 %, bei einer Durchflußrate von 0,538 h^{-1} wurde nur 50,4 % der Gelatine hydrolysiert.

Tab. 3.9. Gelatine- und Glucoseabbau in Labor-Versäuerungsreaktoren in Abhängigkeit von der Durchflußrate.

Meßgröße		Meßwert					
D	(h^{-1})	0,100	0,180	0,279	0,379	0,538	0,943
Θ_h	(h)	10,0	5,56	3,58	2,64	1,86	1,06
B_{CSB}	($g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	25,2	45,3	70,0	95,1	135	238
c_{Gel}	($mg \cdot l^{-1}$)	121	382	609	1250	2140	4240
η_{Gel}	(%)	97,3	91,5	86,3	71,9	51,9	4,7
c_{Glc}	($mg \cdot l^{-1}$)	nn	2	3	5	10	74
η_{Glc}	(%)	100	100	99,9	99,9	99,8	98,3
$R_{V\ Gel}$	($g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	10,1	17,0	24,8	27,8	28,1	2,46
$R_{V\ Glc}$	($g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	10,6	19,1	29,4	40,0	56,7	98,7
R_{BPGel}	($g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)	15,0	21,7	32,8	43,0	47,7	6,37
R_{BPGlc}	($g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$)	15,8	24,4	38,8	61,8	96,3	256
c_{BP}	($mg \cdot l^{-1}$)	673	783	757	647	589	386
<u>Produkte der Flüssigphase</u>							
C_2	($mmol \cdot l^{-1}$)	37,2	33,1	32,4	29,7	28,8	7,9
C_3	($mmol \cdot l^{-1}$)	7,4	5,0	5,1	4,1	8,0	4,7
nC_4	($mmol \cdot l^{-1}$)	10,5	9,6	8,9	7,4	5,1	2,6
iC_4	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,61	0,98	1,1	0,87	0,87	0,53
nC_5	($mmol \cdot l^{-1}$)	2,4	3,1	4,3	3,7	2,1	3,7
iC_5	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,69	0,80	0,13	0,75	nn	nn
Eth	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,51	3,1	3,9	6,4	8,8	1,2
Lac	($mmol \cdot l^{-1}$)	nn	nn	nn	nn	2,4	24,2
Pro	($mmol \cdot l^{-1}$)	4,5	3,8	1,7	2,7	5,1	1,1
Gly	($mmol \cdot l^{-1}$)	1,9	1,1	2,1	1,5	1,9	0,70
Ala	($mmol \cdot l^{-1}$)	sp	0,28	0,43	0,52	0,92	0,63
Glu	($mmol \cdot l^{-1}$)	sp	0,20	0,24	0,27	0,12	sp
<u>Biogas</u>							
R_{BG}	($l \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$)	1,33	1,88	2,10	2,67	1,90	0,299
CH_4	(%)	66,7	69,7	78,7	79,6	72,9	78,8
CO_2	(%)	29,9	27,4	15,5	15,2	16,5	4,7
N_2	(%)	2,0	2,6	5,1	4,4	8,5	13,8
H_2	(%)	nn	nn	0,57	0,62	1,0	nn
H_2S	(%)	0,66	0,16	0,21	0,16	0,04	nn

Gelatinekonzentration 4,45 $g \cdot l^{-1}$, Glucosekonzentration 4,54 $g \cdot l^{-1}$. Die Verdünnung durch das Titrationsmittel wurde berücksichtigt.

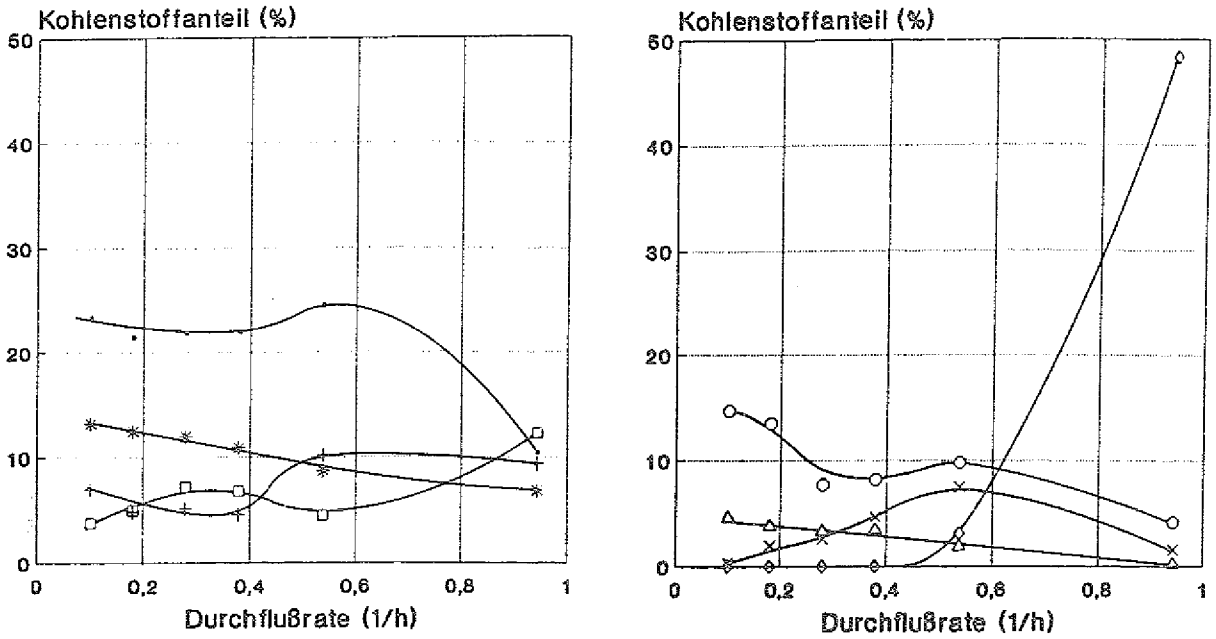
Abkürzungen: Θ_h: Flüssigkeitsverweilzeit; B_{CSB}: CSB-Raumbelastung; c_{Gel}, c_{Glc}: Gelatinekonzentration, Glucosekonzentration; η_{Gel}, η_{Glc}: Gelatineabbaugrad, Glucoseabbaugrad; $R_{V\ Gel}$, $R_{V\ Glc}$: volumenspezifische Gelatine- bzw. Glucoseumsatzrate; R_{BPGel}, R_{BPGlc}: aktuelle Gelatine- bzw Glucoseumsatzrate, bezogen auf Bakterienprotein; c_{BP}: Bakterienprotein-Konzentration; R_{BG}: volumenspezifische Biogasbildungsrate; nn, nicht nachweisbar; sp, in Spuren; weitere Abkürzungen: s. Abkürzungsverzeichnis)

Tab. 3.10. Kohlenstoff-Bilanz des Gelatine- und Glucoseabbaus in Labor-Versäuerungsreaktoren in Abhängigkeit von der Durchflußrate.

Meßgröße		Meßwert					
D	(h^{-1})	0,100	0,180	0,279	0,379	0,538	0,943
Gelatine	(%)	1,5	4,8	7,7	15,8	27,0	53,0
Glucose	(%)	0	0,02	0,03	0,05	0,10	0,76
C_2	(%)	23,1	20,5	20,2	18,5	17,9	4,9
C_3	(%)	6,9	4,7	4,8	3,8	7,5	4,3
C_4	(%)	13,8	13,3	12,2	10,3	7,0	3,2
C_5	(%)	4,8	6,0	6,9	6,9	3,3	5,7
Eth	(%)	0,32	1,9	2,4	4,0	5,5	0,74
Lac	(%)	0	0	0	0	2,2	22,4
Pro	(%)	7,0	5,9	2,6	4,2	7,9	0,85
Gly	(%)	1,2	0,68	1,3	0,93	1,2	0,22
Ala	(%)	0	0,26	0,40	0,48	0,86	0,29
Glu	(%)	0	0,31	0,37	0,42	0,19	0
CH_4	(%)	4,7	3,7	3,1	3,0	1,4	0,13
CO_2	(%)	14,5	12,8	7,1	6,9	7,2	2,0
Biomasse	(%)	12,9	15,0	14,5	12,4	11,3	7,3
Summe	(%)	90,6	89,9	83,6	87,7	100	106

Konzentration des Substrat-Kohlenstoffs: 3,986 $g \cdot l^{-1}$. Die Verdünnung durch das Titrationsmittel wurde berücksichtigt. Die Anteile sind bezogen auf den zugeführten Kohlenstoff.

Das Gärungsspektrum änderte sich im Durchflußratenbereich von 0,100 bis 0,538 h^{-1} nicht wesentlich. Als Hauptprodukte traten Essig-, Propion-, n-Butter- und n-Valeriansäure auf (Tab. 3.10, Abb. 3.5).



a b

Abb. 3.5. Produktspektrum der Umsetzung von Gelatine und Glucose im Chemostaten in Abhängigkeit von der Durchflußrate. Relative Werte bezeichnen den Kohlenstoffanteil des Produktes am umgesetzten Substrat-Kohlenstoff. a: Essigsäure (▫), Propionsäure (+), n-Buttersäure (*) und n-Valeriansäure (□); b: Ethanol (x), Milchsäure (◇), CH_4 (△) und CO_2 (O).

Eine drastische Veränderung der Produktverteilung trat bei D=0,943 h^{-1} auf. Der Anteil der Essigsäure am Gärungsprodukt-Kohlenstoff sank von 20-25 % auf 10,5 %, der Anteil des Ethanols von 7,5 auf 1,6 % und der Anteil des CO_2 von 9,8 auf 4,2 %. Als Hauptprodukt der Umsetzungen wurde Milchsäure mit 48,3 % des Gärungsprodukt-Kohlenstoffs nachgewiesen. Methan spielte als Gärungsprodukt im Modellversäuerungsreaktor eine untergeordnete Rolle. Bis zu einer Durchflußrate von 0,538 h^{-1} lag der Gärungsprodukt-Kohlenstoffanteil des Methans zwischen 1,9 und 4,7 %, mikroskopisch waren im Reaktor fluoreszierende Stäbchen zu sehen. Bei der höchsten untersuchten Durchflußrate war kein signifikanter Anteil des Methans mehr meßbar. Als Zwischenprodukte traten Aminosäuren in nennenswerten Konzentrationen auf. Prolin machte bis zu 14,6 %, Glycin bis zu 2,4 %, Alanin bis zu 1,6 % und Glutaminsäure bis zu 0,77 % des zugeführten Gelatine-Kohlenstoffs aus. Die Konzentrationen der Aminosäuren blieben im gesamten Durchflußratenbereich weitgehend konstant, ihr Anteil am umgesetzten Gelatine-

Kohlenstoff nahm aber mit zunehmender Durchflußrate und abnehmendem Gelatine-Hydrolysegrad zu.

Bei einer Durchflußrate von 0,18 h^{-1} wurde eine Elementarzusammensetzung der Mischkultur von 43,0 % C, 9,21 % N und 6,24 % H ermittelt. Der Wachstumsertrag zeigte in Abhängigkeit von der Durchflußrate bei D=0,38 h^{-1} mit 16 % ein Maximum.

Die kinetische Auswertung des Glucoseumsatzes erfolgte analog dem bereits beschriebenen Modell nach Monod. Als zusätzliche vereinfachende Annahme mußte vorausgesetzt werden, daß der Glucoseumsatz durch die Gelatineverwertung nicht beeinflußt wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 3.6 dargestellt.

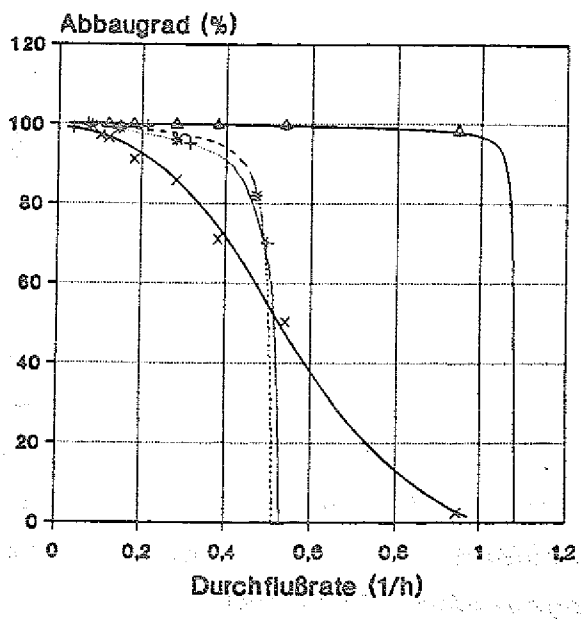


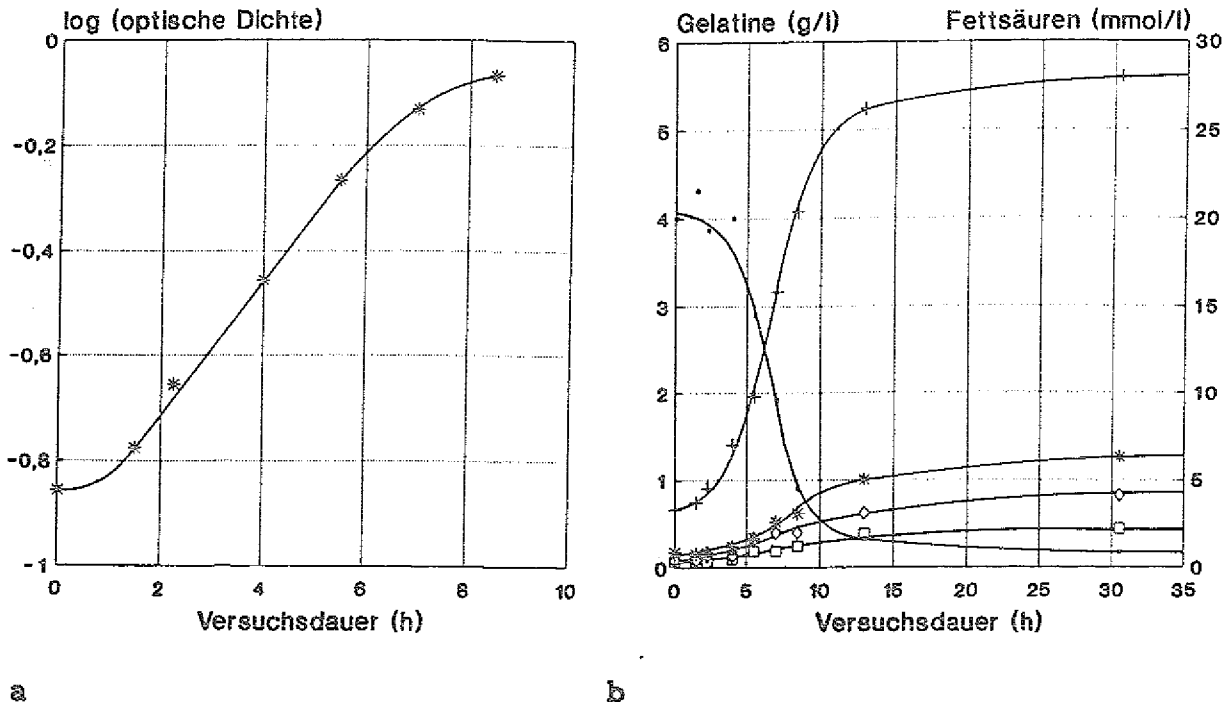
Abb. 3.6. Abhängigkeit des Abbaugrades von Gelatine (x) und Glucose ( ) von der Duchflußrate im Chemostaten. Zum Vergleich sind die Werte für den Umsatz von Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$ (*) und 8,90 $g \cdot l^{-1}$ (+)) als alleiniger Kohlenstoffquelle angegeben.

Für den Glucoseumsatz ergab sich eine maximale Durchflußrate von 1,085 h^{-1} (Generationszeit 0,92 h), eine kritische Durchflußrate von 1,082 h^{-1} und ein k_s-Wert von 0,0109 $g \cdot l^{-1}$ (61 $\mu mol \cdot l^{-1}$). Der Gelatineumsatz war in Anwesenheit der Glucose signifikant gehemmt und läßt sich daher mit dem Modell nach Monod nicht beschreiben.

3.4. Charakterisierung der gelatineverwertenden Mischkultur

Detaillierte Untersuchungen der gelatineumsetzenden Mischkultur sollten Aussagen zu ihrer Populationszusammensetzung, zur Art der Proteinasen und zu den Einflüssen verschiedener Medieninhaltsstoffe ermöglichen. Dazu wurde eine Gelatinekonzentration von 4,45 $g \cdot l^{-1}$ und eine mittlere Durchflußrate im Chemostaten von 0,15 h^{-1} gewählt. Bei dieser Durchflußrate betrug die CSB-Raumbelastung 20,6 $g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$. Sie entsprach damit mittleren Belastungen industrieller Versäuerungsreaktoren (Kap. 3.1).

Einfluß von Kohlenhydraten und anderen Nährlösungsinhaltsstoffen auf den Abbau von Gelatine in statischer Kultur. Gelatine (4,0 $g \cdot l^{-1}$) wurde durch die auf Gelatine im Chemostaten (D=0,15 h^{-1}) adaptierte Mischpopulation in statischer Kultur mit einer Generationszeit von 2,5 h umgesetzt (Abb. 3.7). Als Hauptprodukt trat Essigsäure (28,0 $mmol \cdot l^{-1}$) auf. Daneben wurden Propion-, Butter- und Valeriansäure nachgewiesen. Das Produktspektrum entsprach weitgehend dem des Umsatzes von Gelatine im Chemostaten bei einer Durchflußrate von 0,15 h^{-1}. In statischer Kultur wurde der Einfluß von Substanzen untersucht, die als Inhaltsstoffe industrieller Abwässer bedeutend sind oder die bei der anaeroben Umsetzung organisch belasteter Abwässer entstehen. Dazu wurde das Wachstum der mit Gelatine im Chemostaten (D=0,15 h^{-1}) angereicherten Mischkultur im statischen Ansatz mit Gelatine unter Zusatz der verschiedenen Substanzen verfolgt. Es wurden sowohl toxisch wirkende Substanzen (Ammonium, kurzkettige Fettsäuren) als auch solche Substanzen untersucht, die zu einer Repression der bakteriellen proteolytischen Aktivität führen können (Kohlenhydrate, Aminosäuren). Da beim Wachstum mit Proteinen durch die Vergärung von Aminosäuren molekularer Wasserstoff freigesetzt werden kann (Nagase u. Matsuo, 1982; Nanninga u. Gottschal, 1986), wurde auch die Wirkung eines hohen Wasserstoffpartialdruckes untersucht. Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 3.11 und Abb. 3.8 dargestellt.



a b

Abb. 3.7. Umsatz von Gelatine (4,0 $g \cdot l^{-1}$) in statischer Kultur durch die gelatineumsetzende Mischkultur aus einem Chemostaten (D=0,15 h^{-1}). a: optische Dichte; b: Konzentrationen der Gelatine (▪), Essigsäure (+), Propionsäure (*), n-Buttersäure (□) und n-Valeriansäure (◇).

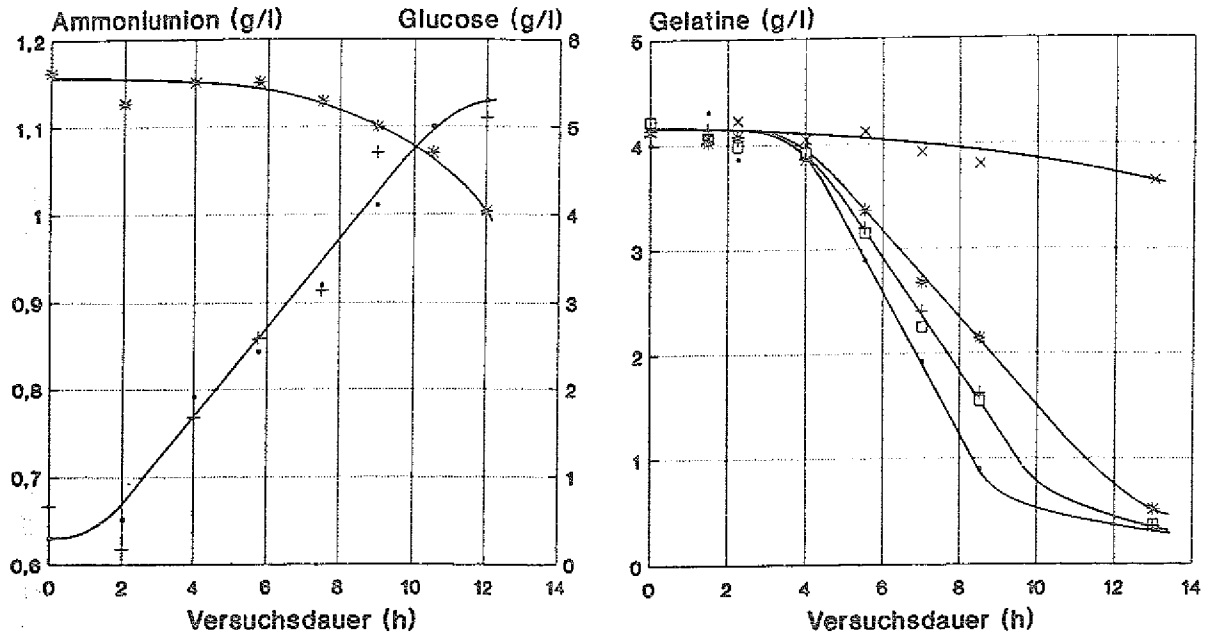
Tab. 3.11. Beeinflussung der Wachstumsrate der Mischkultur aus einem Chemostaten in statischer Kultur mit dem Substrat Gelatine durch verschiedene Substanzen.

Substanz	Konzentration	Relative Wachstumsrate (%)
NH_4Cl	200 $mmol \cdot l^{-1}$	84
Aminosäuren[1]	3,95 $g \cdot l^{-1}$	103
Kohlenhydrate[2]	4 $g \cdot l^{-1}$	97-104
Na-Acetat	50 $mmol \cdot l^{-1}$	107
Na-Propionat	30 $mmol \cdot l^{-1}$	62
Na-n-Butyrat	30 $mmol \cdot l^{-1}$	103
H_2	$0,8 \cdot 10^5$ Pa	85
O_2	$0,2 \cdot 10^5$ Pa	9,6

Substrat des Chemostaten: Gelatine, 4,45 $g \cdot l^{-1}$, Durchflußrate 0,15 $g \cdot l^{-1}$); Substratkonzentration im statischen Ansatz: 4,0 $g \cdot l^{-1}$.

[1] Mischung der 5 wesentlichen Aminosäuren der Gelatine (Gly, Pro, Hyp, Ala, Glu) im Verhältnis ihres Vorkommens in diesem Protein. Gesamtkonzentration 3,95 $g \cdot l^{-1}$.

[2] Einzeluntersuchungen mit Glucose, Fructose, Maltose, Saccharose, Lactose, Xylose, Stärke



a b

Abb. 3.8. Beeinflussung der Wachstumsrate der Mischkultur aus einem Chemostaten in statischer Kultur mit dem Substrat Gelatine durch verschiedene Substanzen. a: Freisetzung von Ammonium aus Gelatine durch eine an Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) adaptierte Mischkultur (D=0,15 h^{-1}) in statischer Kultur in An- (+) und Abwesenheit (•) von Glucose (*); b: Einfluß von Ammonium (+), Propionsäure (*), H_2 (□) und O_2 (x) auf den Gelatineabbau durch die Mischkultur.

Das Wachstum der Mischkultur und der Gelatineabbau wurden durch Glucose und andere Kohlenhydrate nicht beeinflußt. Der Abbau der Kohlenhydrate setzte erst nach einer mehrstündigen Verzögerungsphase gegen Ende der Gelatineverwertung ein. Ebenfalls ohne hemmenden Einfluß waren Aminosäuren, Essig- und n-Buttersäure. Dagegen führten Propionsäure und das Ammoniumion zu einer schwachen Hemmung des Wachstums und des Gelatineabbaus. Die toxische Wirkung beider Substanzen ist bekannt (McCarty, 1964, Iannotti u. Fischer, 1984). Eine nahezu vollständige Hemmung wurde durch O_2 ($0{,}2 \cdot 10^5$ Pa) bewirkt, eine schwache Hemmung des Wachstums mit Gelatine trat in Anwesenheit von H_2 ($0{,}8 \cdot 10^5$ Pa) auf.

Aus den Ergebnissen wird geschlossen, daß für den Gelatineumsatz strikt anaerobe Organismen verantwortlich waren, die einer Repression durch andere Kohlenstoff-Quellen nicht unter-

lagen und die als Produkt der Gelatineverwertung Wasserstoff freisetzten.

Einfluß des Wasserstoffs auf den Gelatineabbau im Chemostaten. In statischer Kultur konnte ein wachstumshemmender Einfluß des Wasserstoffs auf die proteolytischen Organismen nachgewiesen werden. Ob dieser hemmende Einfluß zu einer deutlichen Verringerung des Proteinabbaugrades im Chemostaten führen kann, wurde bei einer Durchflußrate von 0,15 h^{-1} untersucht. Der Chemostat (Gelatine-Abbaugrad 99 %) bildete im Gleichgewicht Biogas mit einem Wasserstoffgehalt von 70 ppm. Um in der Flüssigphase einen erhöhten H_2-Partialdruck zu erreichen, wurde dem Reaktor im Gleichgewichtszustand pulsartig Bromethansulfonsäure (BES) in einer Konzentration von 10 $mmol \cdot l^{-1}$ zugesetzt. BES gilt als spezifischer Inhibitor der Methanbildung, da es als Coenzym M-Analogon wirkt (Sparling und Daniels, 1987). Es sollte eine Umsetzung des bei acidogenen Reaktionen gebildeten Wasserstoffs zu Methan verhindern. Der Zusatz der BES führte innerhalb von 47 h zu einem deutlichen Anstieg der H_2-Konzentration in der Gasphase von 70 ppm auf 95000 ppm (9,5 %; Abb. 3.9).

Der drastische Anstieg des Wasserstoffpartialdruckes führte zu einer Erhöhung der Gelatine-Restkonzentration von etwa 50 auf 130 $mg \cdot l^{-1}$. Der Abbaugrad sank damit nur unwesentlich von 99 auf 97 %. Der Versuch beweist, daß H_2 auch in hoher Konzentration keine nennenswerte Verringerung des Gelatineabbaugrades im Chemostaten verursachte.

Einfluß von Metallionen und anderen Nährlösungsinhaltsstoffen auf die Proteinaseaktivität der Mischkultur. Der Einfluß verschiedener Nährmedieninhaltsstoffe auf die Proteinaseaktivität wurde mit dem Substrat Azocoll ermittelt. Da Kollagenasen und Gelatinasen als Metallproteinasen beschrieben wurden (Mandl, 1961; Peterkovsky, 1982; Sopata u. Dancewicz, 1974), wurde auch der Einfluß verschiedener zweiwertiger Metallionen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.12 zusammengestellt.

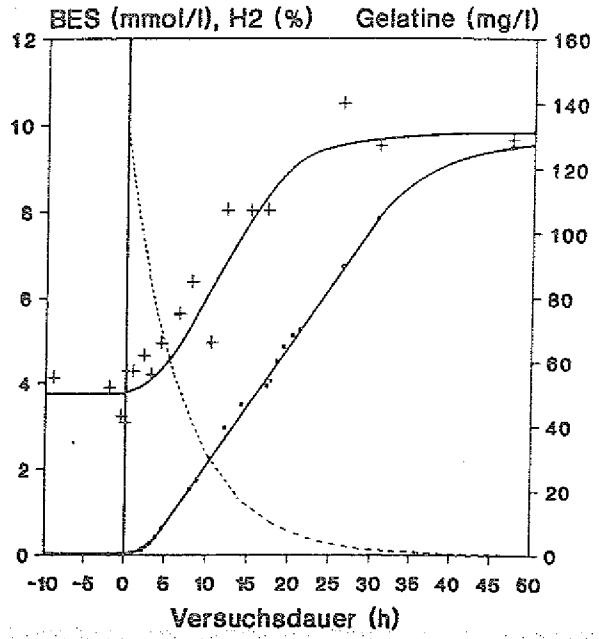


Abb. 3.9. Einfluß eines durch Zugabe des Methanogenese-Inhibitors BES erhöhten Wasserstoffpartialdruckes auf den Gelatineabbau im Chemostaten. (▪) Konzentration des Wasserstoffs in der Gasphase; (+) Gelatine-Restkonzentration; (---) Konzentration der Bromethansulfonsäure (BES, berechnet). Zugabe von BES (10 $mmol \cdot l^{-1}$) zum gelatineumsetzenden Chemostaten (D=0,15 h^{-1}) zum Zeitpunkt t=0 h.

Tab. 3.12. Beeinflussung der proteolytischen Aktivität der Mischkultur aus einem Chemostaten durch Metallionen und andere Nährlösungsinhaltsstoffe.

Substanz	Konzentration	Relative Proteinaseaktivität(%)
Pepton[1]	4,0 $g \cdot l^{-1}$	124
NH_4Cl	200 $mmol \cdot l^{-1}$	103
Aminosäuren[2]	50 $mmol \cdot l^{-1}$	100-114
Glucose	4,0 $g \cdot l^{-1}$	100
Na-Acetat	50 $mmol \cdot l^{-1}$	104
Na-Propionat	30 $mmol \cdot l^{-1}$	104
O_2	$0,2 \cdot 10^5$ Pa	23
$CaCl_2$	1 $mmol \cdot l^{-1}$	196
$ZnCl_2$	1 $mmol \cdot l^{-1}$	145
$MnCl_2$	1 $mmol \cdot l^{-1}$	165
$MgCl_2$	1 $mmol \cdot l^{-1}$	107

Substrat des Chemostaten: Gelatine, 4,45 $g \cdot l^{-1}$, Durchflußrate 0,15 $g \cdot l^{-1}$); Substrat für den Proteinasetest: Azocoll, 10 $g \cdot l^{-1}$)

[1] Pepton aus Gelatine

[2] Glycin u. Prolin, je 50 $mmol \cdot l^{-1}$

Die Gelatine-Hydrolyseprodukte hatten keinen hemmenden Einfluß auf die Proteinaseaktivität der Mischkultur. Auch die Gärungsprodukte und Glucose blieben ohne Einfluß. Ein deutlicher Aktivitätsanstieg wurde durch die Metallionen Ca^{2+}, Zn^{2+} und Mn^{2+} bewirkt. Eine unter Luftatmosphäre durchgeführte Bestimmung zeigte eine deutliche Hemmung der Proteinaseaktivität.

Zusammensetzung der Mischkultur. Auf dem mikroskopischen Bild war eine heterogene Population verschiedener morphologischer Bakterientypen zu sehen. Zahlenmäßig dominant waren unbewegliche Stäbchen mit einer Länge von ca. 5 µm und einem Durchmesser von 0,6 µm (Abb. 3.10).

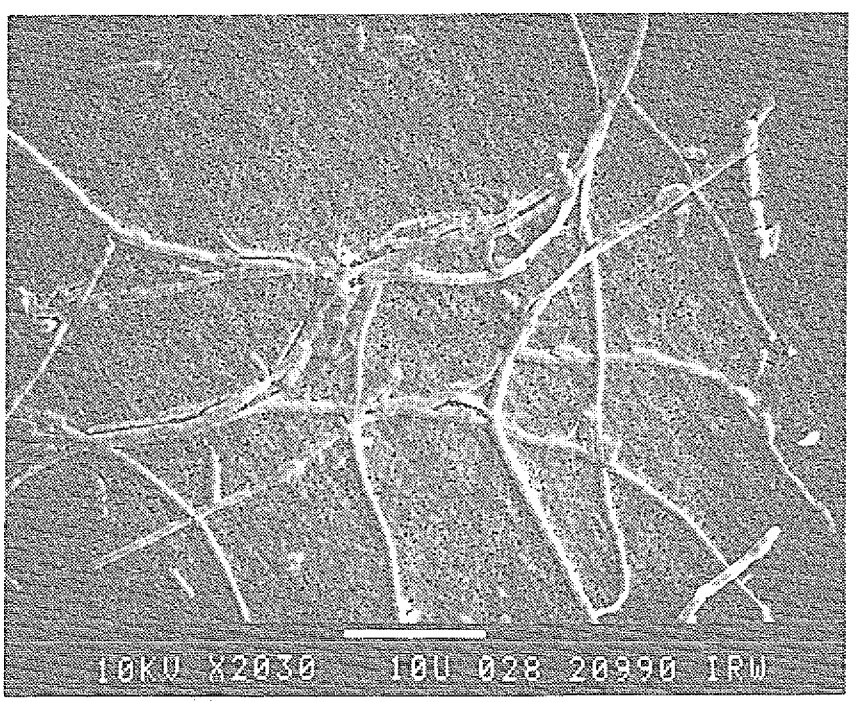


Abb. 3.10. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit Gelatine wachsenden Mischkultur (Chemostat, D=0,15 h^{-1}). Die Länge des Balkens entspricht 10 µm.

Durch Fluoreszenz-Mikroskopie konnten als methanogene Bakterien stark fluoreszierende, kurze Stäbchen und schwach fluoreszierende, lange Stäbchen identifiziert werden.

Die Analyse der Lebendzellzahl (Tab. 3.13) zeigt den hohen Anteil proteolytischer Bakterien (87 %).

Tab. 3.13. Lebendzellzahlen der mit Gelatine im Chemostaten angereicherten Mischkultur in verschiedenen Nährböden.

Substrat	Zellzahl absolut (ml^{-1})	Zellzahl relativ (%)
AC-Vollmedium	$5,8 \cdot 10^8$	100
AC-Vollmedium, aerob	$0,44 \cdot 10^8$	7,5
Gelatine/Glucose	$4,8 \cdot 10^8$	83
Gelatine	$5,0 \cdot 10^8$	87
Glucose	$0,46 \cdot 10^8$	7,9

Substrat des Chemostaten: Gelatine, 4,45 $g \cdot l^{-1}$, Durchflußrate 0,15 h^{-1}

Die Zahl der glucoseverwertenden Zellen lag bei 7,9 %, nahezu identisch waren die Zellzahlen der Bakterien in Fructose-, Maltose-, Saccharose-, Lactose- und Stärke-Nährböden. Lediglich im Xylose-Nährboden wurde mit nur 0,5 % der Gesamtzellzahl ein deutlich niedrigerer Wert ermittelt. Die Zellzahlen, die mit den Substraten H_2/CO_2, Milchsäure und Bernsteinsäure ermittelt wurden, betrugen 3,7 %, 2,6 % und 0,5 % der Gesamtkeimzahl. Mit 7,5 % lag Anteil der aerob wachsenden Keime auf dem Niveau des Anteils der glucoseverwertenden Zellen. Die Daten zeigen, daß die zahlenmäßig dominanten proteolytischen Organismen strikt anaerobe, nicht zur Verwertung anderer Substrate befähigte Spezialisten waren. Die Bestimmung der Lebendzellzahl bestätigt daher die Ergebnisse der Untersuchungen des Gelatineumsatzes in statischer Kultur, die gezeigt hatten, daß die Gelatineverwertung durch die Mischkultur durch Kohlenhydrate und andere Substrate nicht gehemmt wurde und daß Sauerstoff zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Gelatineumsetzung führte.

3.5. Charakterisierung der gelatine- und glucoseverwertenden Mischkultur

In Anwesenheit von Glucose war der Gelatineabbaugrad in Chemostaten gegenüber dem Abbau von Gelatine als einziger Kohlenstoffquelle deutlich verringert (Kap. 3.2 u. 3.3). Die proteolytische Aktivität der Gelatine als einzige C-Quelle abbauenden Mischkultur wurde durch Glucose jedoch nicht gehemmt (Kap. 3.4), so daß angenommen werden mußte, daß der Gelatineabbau in Chemostaten in Gegenwart von Glucose durch proteolytische Bakterien erfolgte, die von den Organismen der gelatineabbauenden Kultur verschieden waren. Zusammensetzung und Eigenschaften der das Gelatine/Glucose-Substrat verwertenden Mischkultur wurden bei einer mittleren Durchflußrate des Chemostaten ($D=0,18\ h^{-1}$) untersucht. Flüssigkeitsverweilzeit (5,6 h) und CSB-Raumbelastung ($45,3\ g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$) waren bei dieser Durchflußrate vergleichbar mit den Daten industrieller Versäuerungsreaktoren (Kap. 3.1), in denen protein- und kohlenhydrathaltige Abwässer gereinigt werden. Die gewählte Durchflußrate läßt den Vergleich mit den in Kap. 3.4 beschriebenen Ergebnissen (gelatineabbauende Mischkultur, $D=0,15\ h^{-1}$) zu. Die untersuchte Population ging durch Umstellung des Substrates aus einer Kultur hervor, die Gelatine als einzige Kohlenstoffquelle verwertete (Substratkonzentration $4,45\ g \cdot l^{-1}$, $D=0,18\ h^{-1}$). Im Gleichgewicht setzte die untersuchte Mischkultur Glucose zu mehr als 99 % und Gelatine mit einem Abbaugrad von 82 % zu den Hauptprodukten Essig-, Propion- und n-Buttersäure um.

Der zeitliche Verlauf der Umstellung des Substrates von Gelatine auf das Gelatine/Glucose-Gemisch bei einer Durchflußrate von $0,15\ h^{-1}$ ist in Abb. 3.11 dargestellt.

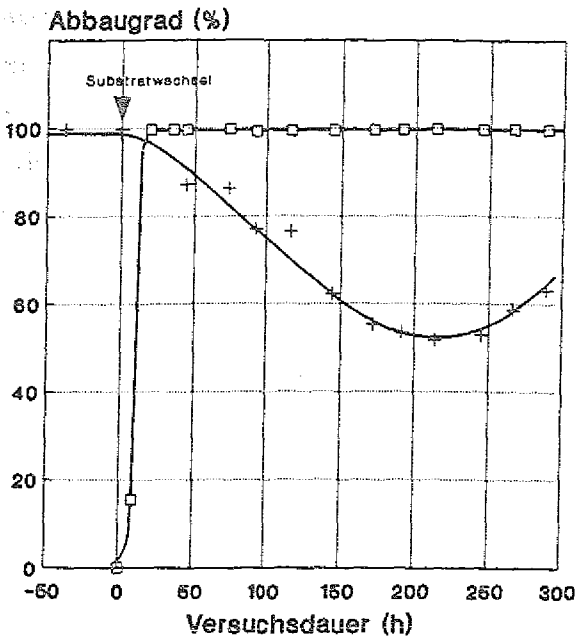


Abb. 3.11. Verhalten des Chemostaten bei Umstellung des Substrates von Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) auf ein Gelatine/Glucose-Gemisch (4,45 $g \cdot l^{-1}$ bzw. 4,54 $g \cdot l^{-1}$) bei einer Durchflußrate von 0,15 h^{-1}. (+) Gelatineabbaugrad, (□) Glucoseabbaugrad

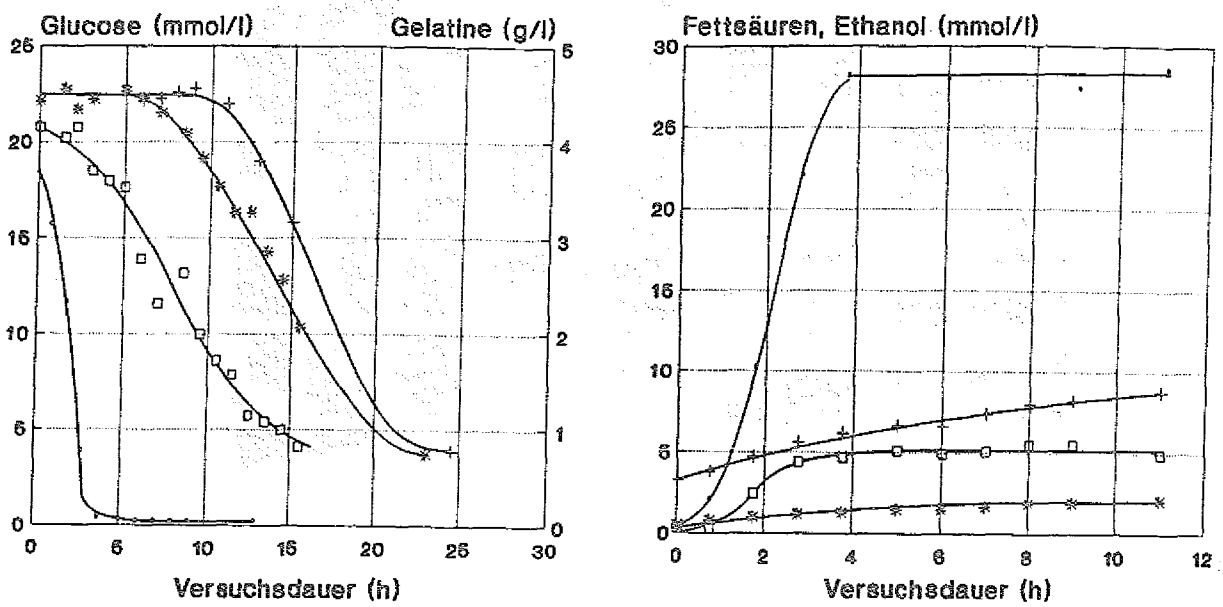
Der Glucoseabbaugrad lag bereits 20 h nach Substratumstellung bei über 99 %. Mit sehr deutlich ausgeprägter zeitlicher Verzögerung sank der Proteinabbaugrad und erreichte nach 214 h (3l Verweilzeiten) mit 52 % ein Minimum. Aminosäuren machten während der Umstellungsphase maximal 4,9 % des zugeführten Gelatine-Kohlenstoffs aus.

Obwohl beim Umsatz von Gelatine als einziger Kohlenstoffquelle proteolytische Bakterien zahlenmäßig dominierten, die nicht zur Kohlenhydratverwertung befähigt waren und obwohl der Gelatineumsatz durch die an Gelatine adaptierte Mischkultur im statischen Ansatz durch Glucose nicht gehemmt wurde, kam es nach der Umstellung des Substrates zu einer signifikanten Reduzierung des Gelatineabbaugrades. Da auch erhöhte Gärungsprodukt-Konzentrationen als Ursache eines starken Rückganges der Gelatineabbaugrades ausgeschlossen werden konnten, kann der beobachtete Effekt nur mit einem Populationswechsel der für den Gelatineabbau verantwortlichen Bakterien erklärt werden.

Umsatz von Gelatine und Glucose in statischer Kultur. Untersuchungen des Umsatzes von Gelatine in An- und Abwesenheit von Glucose im Chemostaten hatten eine signifikante Beeinflussung der Abhängigkeit der Gelatine-Abbaugrade von der Durchflußrate gezeigt (Kap. 3.4). Die Form des Graphen wies deutlich auf eine Verringerung der Abbaugrade infolge einer Hemmung des Gelatine-Umsatzes durch Glucose hin (Yoon et al., 1977). Dieser Einfluß wurde auch in statischer Kultur unter Konstanthaltung des pH-Wertes untersucht. Als Inokula wurden Mischkulturen aus den Chemostaten eingesetzt, die Gelatine (4,45 $g \cdot l^{-1}$) bzw. ein Gelatine/Glucose-Gemisch (4,45 und 4,54 $g \cdot l^{-1}$) bei den Durchflußraten 0,15 h^{-1} (Gelatine) bzw. 0,18 h^{-1} (Gelatine/Glucose) verwerteten. Für die Gelatineumsetzende Mischkultur ist bereits gezeigt worden, daß die Gelatine-Verwertung durch Glucose in statischer Kultur nicht gehemmt wurde (Kap. 3.4). Im Vergleich zu dieser Kultur begann der Umsatz von Gelatine durch die an das Substratgemisch adaptierte Kultur mit 5-stündiger Verzögerung. Außerdem wurde der Gelatineabbau durch die an das Mischsubstrat adaptierte Kultur in Anwesenheit von Glucose um die Dauer der Glucoseverwertung verzögert (Abb. 3.12).

Die Generationszeit der glucoseverwertenden Kultur lag bei 1,0 h (bestimmt über die Zunahme der OD_{660}). Als Hauptprodukt des Glucoseumsatzes trat Milchsäure (28 $mmol \cdot l^{-1}$) auf. Daneben wurde auch Ethanol (5,7 $mmol \cdot l^{-1}$) gebildet.

Um ausschließen zu können, daß der Gelatineumsatz auf das Wachstum nicht glucoseverwertender proteolytischer Spezialisten zurückzuführen war, wurde die ausgewachsene Kultur unmittelbar nach Versuchsabschluß (27 h) als Inokulum für einen zweiten Abbauversuch des Mischsubstrates in statischer Kultur verwendet. Dieser wiederholte Abbauversuch führte zu Ergebnissen, die mit den Daten des ersten Abbauversuches nahezu identisch waren. Der Versuch zeigt deutlich, daß der Gelatineumsatz durch die an das Mischsubstrat adaptierte Mischkultur in Anwesenheit von Glucose gehemmt wurde. Daraus wird geschlossen, daß der Gelatineumsatz im wesentlichen durch den dominanten glucoseverwertenden Organismus bewirkt wurde.



a b

Abb. 3.12. Umsatz eines Gelatine/Glucose-Mischsubstrates durch eine Mischpopulation in statischer Kultur. Gelatinekonzentration 4,45 $g \cdot l^{-1}$, Glucosekonzentration 18,5 $mmol \cdot l^{-1}$. Das Inokulum stammte aus dem Chemostaten, in dem das Mischsubstrat bei D=0,18 h^{-1} umgesetzt wurde. a: Gelatine- (+) und Glucose- (▪) Konzentration; zum Vergleich ist der Umsatz von Gelatine als alleiniger Kohlenstoffquelle durch dieselbe Kultur (*) und durch die Mischkultur aus einem Chemostaten, der Gelatine als alleinige Kohlenstoffquelle bei D=0,15 h^{-1} umsetzte (□, Kap. 3.2), angegeben. b: Produktkonzentration während des Glucoseabbaus. Essigsäure (+), Propionsäure (+), Milchsäure (▪) und Ethanol (□).

Zusammensetzung der Mischkultur. Die mikroskopische Untersuchung zeigte als morphologisch deutlich dominanten Typ kokkenförmige, oft als Diplo- oder Streptokokken vorliegende Bakterien. Ferner traten häufig bewegliche Kurzstäbchen und einige unbewegliche Langstäbchen auf. Daneben waren zahlreiche andere morphologische Formen in geringerer Zahl vertreten (Abb. 3.13).

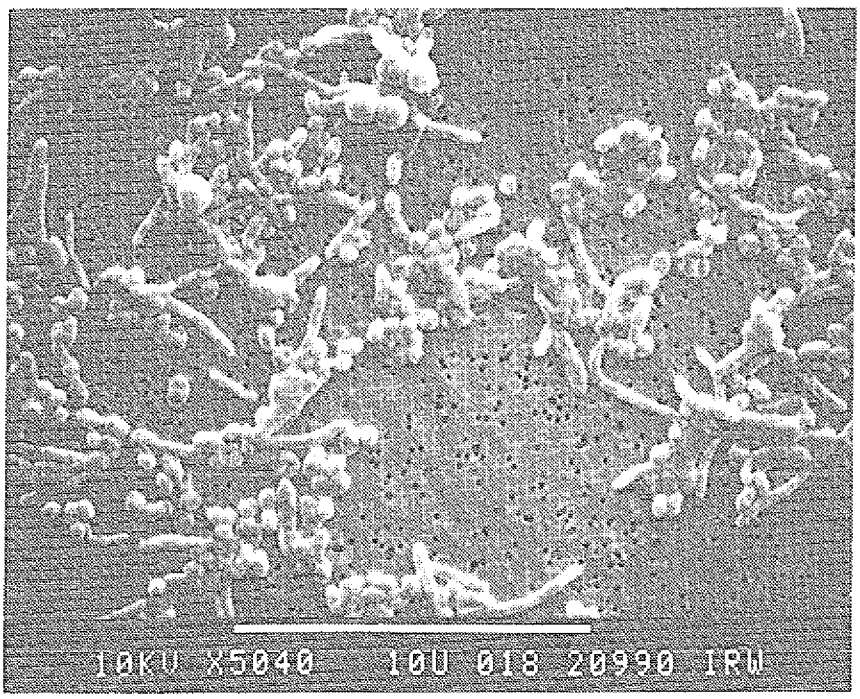


Abb. 3.13. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mit einem Gelatine/Glucose-Mischsubstrat wachsenden Mischkultur (Chemostat, D=0,18 h^{-1}). Die Länge des Balkens entspricht 10 µm.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl ergab mit einer Gesamtzellzahl von $1{,}65 \cdot 10^9$ Zellen einen Wert, der mehr als das Doppelte der mit Gelatine als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsenden Chemostatenkultur betrug (Tab. 3.14).

Tab. 3.14. Lebendzellzahlen der Mischkultur eines Chemostaten in verschiedenen Nährböden.

Substrat	Zellzahl absolut (ml^{-1})	Zellzahl relativ (%)
AC-Vollmedium, anaerob	$1{,}65 \cdot 10^9$	100
AC-Vollmedium, aerob	$1{,}93 \cdot 10^9$	117
Gelatine/Glucose	$1{,}19 \cdot 10^9$	72
Gelatine	$0{,}95 \cdot 10^9$	58
Glucose	$1{,}15 \cdot 10^9$	70

Substrat Gelatine/Glucose, Durchflußrate 0,18 h^1

Im Gegensatz zur Gelatine-verwertenden Mischkultur dominierten in der Kultur, die das Substratgemisch umsetzte, fakultativ

anaerobe Mikroorganismen. Sowohl der Anteil der Glucoseverwerter, als auch der Gelatineverwerter lag den Erwartungen entsprechend mit 70 % bzw. 58 % der Gesamtkeimzahl hoch.

3.6. Isolierung und Charakterisierung proteolytischer Reinkulturen aus der gelatineverwertenden Mischkultur

3.6.1. Isolierung und Charakterisierung des obligat proteolytischen Stammes AP 11

Die Untersuchung der gelatineverwertenden Chemostatenkultur ($D=0,15\ h^{-1}$) hatte gezeigt, daß 87 % der auf einem Vollmedium wachsenden Zellen zum Wachstum auf Gelatine-Nährböden befähigt waren. Die Eigenschaften der Mischkultur wiesen deutlich auf die Dominanz strikt anaerober, proteolytischer Spezialisten hin, die Kohlenhydrate nicht verwerteten und deren proteolytische Aktivität daher durch Kohlenhydrate nicht gehemmt wurde (Kap. 3.4). Um die dominanten proteolytischen Bakterien der untersuchten Chemostatenkultur ($D=0,15\ h^{-1}$) charakterisieren und identifizieren zu können, wurden aus der gelatineverwertenden Mischkultur 40 proteolytische Kulturen isoliert (Substrat Gelatine, 8,9 $g \cdot l^{-1}$, Inkubationsdauer 14 d). Nach Zellmorphologie und Gärungsspektrum waren 36 der 40 Isolate identisch. Dieses zahlenmäßig eindeutig dominante Bakterium der gelatineumsetzenden Mischkultur wird im folgenden als Stamm AP 11 bezeichnet.

Morphologie, Cytologie und taxonomische Zuordnung. Licht- und rasterelektronenmikroskopische Bilder zeigten AP 11 als ein unbewegliches Langstäbchen, das in Gelatine während der exponentiellen Wachstumsphase 4-10 µm lang war und einen Durchmesser von etwa 0,6 µm aufwies (Abb. 3.14).

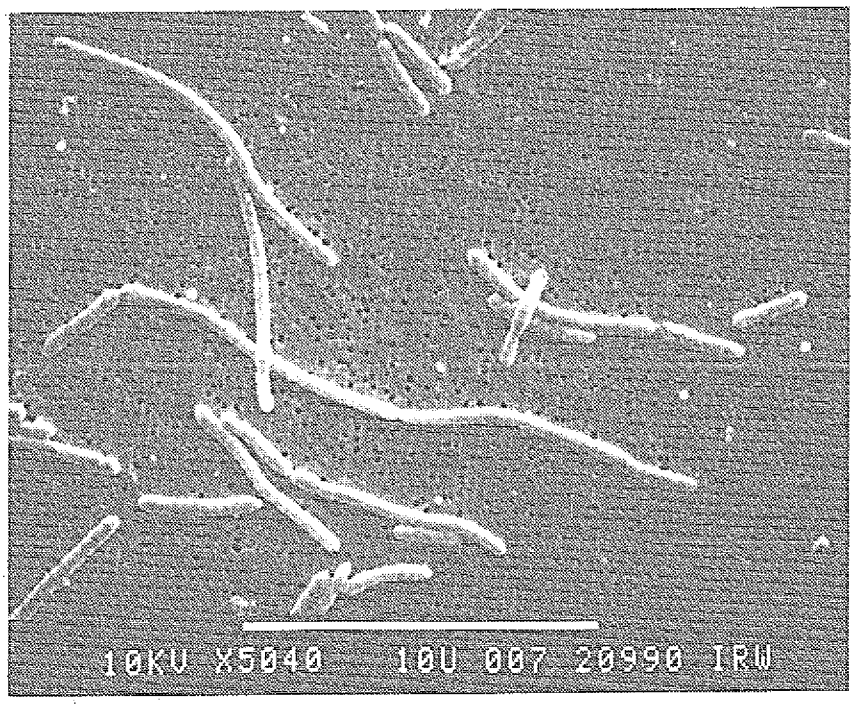


Abb. 3.14. Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Reinkultur AP 11 während der exponentiellen Wachstumsphase. Die Balkenlänge entspricht 10 µm.

Die Gram-Färbung wies AP 11 als Gram-negatives Bakterium aus. Übereinstimmend damit verlief die KOH-Lyse positiv. L-Alanin-Aminopeptidase-Aktivität, die meist bei Gram-negativen Bakterien nachweisbar ist, konnte jedoch nicht festgestellt werden. Der Zusatz von Tween 80 (0,2 $g \cdot l^{-1}$), das das Wachstum bestimmter Gram-negativer Bakterien fördern kann, führte zur vollständigen Wachstumshemmung in Gelatine-Nährlösung. Das galt auch für den Zusatz von Chloramphenicol (100 $mg \cdot l^{-1}$), das vor allem gegen Gram-negative Bakterien wirkt. Sporen wurden in Gelatine-Nährlösung nicht gebildet. Nach einer 10-minütigen Erhitzung einer AP 11-Kultur auf 80 °C konnte kein Wachstum der Kultur nachgewiesen werden. Auch in Egg Yolk-Medium und Chopped Meat-Medium (Holdeman et al., 1977) wurden keine Sporen gebildet. Beim Wachstum in PYG- und MEC-Medium wurde neben Spuren von Ameisensäure (< 1 $mmol \cdot l^{-1}$) als einziges Produkt der Flüssigphase Essigsäure (9,9 bzw. 6,4 $mmol \cdot l^{-1}$) gebildet. Weder in Gelatine-Nährlösung, noch in komplexen Medien war Phenylessigsäure als Produkt nachweisbar. Kohlen-

hydrate wurden von AP 11 nicht verwertet. Die ermittelten Eigenschaften führen zur Einordnung des Stammes AP 11 in die Familie *Bacteroidaceae* (Holdeman et al., 1977).

Die Bestimmung weiterer Eigenschaften sollte die Zuordnung der Gattung und Art ermöglichen. Kolonien auf Nähröden waren grundsätzlich weiß, auch in Anwesenheit von Hämin. AP 11 bildete kein Indol, hydrolysierte Esculin nicht und reduzierte weder Nitrat noch Sulfat. Desulfoviridin war in den Zellen nicht nachweisbar. Das Wachstumsverhalten von Bakterien der Gattung *Bacteroides* bei Zusatz von Ochsengalle zur Nährlösung stellt ein wichtiges Differenzierungskriterium dar (Holdeman et al., 1984). Ochsengalle (20 $g \cdot l^{-1}$) bewirkte eine deutliche Verzögerung des Wachstum des Stammes AP 11 in einer Gelatine-Nährlösung, nicht aber eine Verringerung des Zellertrages.

Die Bestimmung des Trockengewichtes und des Zellproteingehaltes einer gewaschenen Kultur der frühen stationären Phase ergab einen Proteingehalt der Zelle von 85 %. Ein ähnlich hoher Wert wurde von Chen u. Russel (1988) für einen peptid- und aminosäureverwertenden Peptostreptococcus aus dem Pansen beschrieben. Der hohe Proteingehalt der Zelle deckt sich mit dem Proteingehalt der Zellen der gelatineumsetzenden Mischkultur (83 %). Die Messung der Elementarzusammensetzung eines Zell-Lyophilisates der exponentiellen Wachstumsphase ergab einen Kohlenstoffanteil von 42,5 %, einen Stickstoffanteil von 11,8 % und einen Wasserstoffanteil von 6,31 %.

Als Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin an der DNA wurde mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (Dr. Jahnke, DSM Braunschweig) ein Wert von 32,9 % ermittelt. Die gaschromatografische und gaschromatografisch-massenspektrometrische Untersuchung der zellulären Fettsäuren wurde von Dr. Neuß (Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich) und Dr. Rullkötter (Institut für Chemie 5 des Forschungszentrums Jülich) durchgeführt. Die Analyse zeigte die Dominanz der unverzweigten gesättigten C_{16}-, C_{18}-, C_{14}- und C_{20}-Fettsäuren sowie einen bedeutenden Anteil der einfach ungesättigten C_{18}-Fettsäure. Daneben konnte eine Reihe weiterer

zellulärer Fettsäuren nachgewiesen werden (Abb. 3.15).

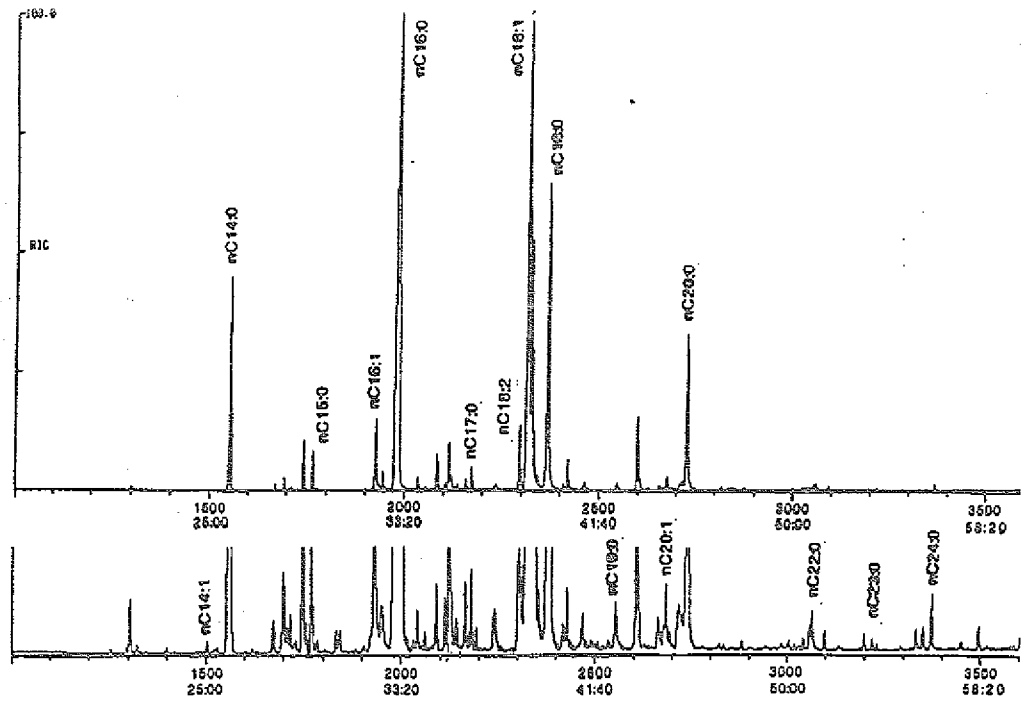


Abb. 3.15. Gaschromatografische Auftrennung der zellulären Fettsäuren des Stammes AP 11 (GC/MS). Oben: Injektionsvol. 1 µl, Split 1:10; unten: Injektionsvol. 5 µl, ohne Split. Oberer Abszissenwert: Scan-Nr., unterer Abszissenwert: Retentionszeit (min). Ordinate: relative Signalintensität.

Die beschriebenen Eigenschaften des Isolates AP 11 machen die Zuordnung zu einer beschriebenen Gattung der Familie *Bacteroidaceae* nicht möglich (Holdeman et al., 1984; Shah u. Collins, 1989). AP 11 ist daher als Art einer bisher nicht beschriebenen Gattung dieser Familie einzuordnen.

Substratspektrum. Stamm AP 11 erwies sich bei der Untersuchung des Substratspektrums als obligat proteolytisches Bakterium, das auf Kollagen und Kollagenderivate spezialisiert ist (Tab. 3.15). Das wasserunlösliche Substrat Kollagen wurde vollständig gelöst und weitgehend zu Essigsäure umgesetzt. Neben Kollagen, Gelatine und Pepton aus Gelatine wurden, allerdings in deutlich geringerem Maße, nur Peptone einiger anderer Proteine verwertet. Das $(Gly\text{-}Pro\text{-}Ala)_n$-Polymer wurde nicht umgesetzt. Definierte Oligopeptide, auch solche aus der Aminosäuresequenz der Gelatine, wurden nicht verwertet. Das

galt auch für eine Mischung der Aminosäuren Glycin, Prolin, Hydroxyprolin und Alanin, die dem Organismus entsprechend ihrer Konzentrationsverhältnisse in der Gelatine angeboten wurden. Da auch Casaminoacids nicht umgesetzt wurden, kann geschlossen werden, daß AP 11 zur Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle nicht fähig ist. AP 11 verwertete weder Kohlenhydrate, noch andere von zahlreichen Bakterien nutzbare Substrate.

Gelatineumsatz. Im statischen Ansatz wurde Gelatine durch AP 11 zu den Hauptprodukten Essigsäure, Prolin und Alanin umgesetzt. Als Gase entstanden Kohlendioxid und Wasserstoff (Tab. 3.16).

Mit einer Kohlenstoff-Bilanz von 102 % und einer Stickstoff-Bilanz von 98 % konnten die Produkte des Gelatineumsatzes vollständig identifiziert werden. Die Kohlenstoffbilanzierung zeigt, daß 24 % des Gelatine-Kohlenstoffs als Restgelatine vorlagen, 30 % zu Gärungsprodukten umgesetzt wurden, 44 % des Kohlenstoffs in Form der Aminosäuren freigesetzt und 3,3 % in Zellmasse inkorporiert wurden. Bezogen auf den zu Gärungsprodukten umgewandelten Kohlenstoffanteil betrug der Zellmasseertrag damit 11 %. Der Gelatineumsatz war mit einem Abbaugrad von 76 % unvollständig. Um sicherzustellen, daß dafür kein Nährstoffmangel verantwortlich war, wurde der Gelatineumsatz bei gleichbleibenden Nährstoffkonzentrationen, aber variierten Gelatinekonzentrationen, im statischen Ansatz untersucht. Im gesamten untersuchten Gelatine-Konzentrationsbereich von 1,0 bis 8,0 $g \cdot l^{-1}$ war der Gelatineabbaugrad

Tab. 3.15. Substratspektrum der Reinkultur AP 11

Substrat	Wachstum (OD_{660})	gebildete Essigsäure ($mmol \cdot l^{-1}$)
Proteine, Peptide und Aminosäuren		
Gelatine	+	19,4
Pepton aus Gelatine	+	16,3
Kollagen	+	17,9
$(Gly\text{-}Pro\text{-}Ala)_n$-Polymer ($n \approx 60$)	-	0,2
Oligopeptide[1]	-	-
Aminosäuren[2]	-	0,1
Elastin	-	0
Keratin	-	0,8
Casein	-	0
Pepton aus Casein	-	1,0
Casaminoacids	-	0,9
Fleischextrakt	(+)	4,3
Pepton aus Fleisch	(+)	6,1
Lactalbumin	-	0,2
Lactalbuminhydrolysat	(+)	2,1
Ovalbumin*	-	0,4
Ovalbuminhydrolysat	(+)	3,8
Rinderserumalbumin*	-	0,4
Proteosepepton	+	9,1
Kohlenhydrate[3]	-	-
Sonstige[4]	-	-

Inkubationsdauer 5 d. Substratkonzentration 4,5 $g \cdot l^{-1}$ (mit Hydratwasser). Sterilisation durch Autoklavieren (10 min, 115 °C) mit Ausnahme der mit * gekennzeichneten Substrate, die durch Filtration (Membranfilter 0,2 µm) sterilisiert wurden. Die durch das Inokulum eingetragene Essigsäurekonzentration (2,1 $mmol \cdot l^{-1}$) wurde vom Meßwert subtrahiert.

1 $(Gly)_2$, $(Gly)_3$, $(Gly)_4$, $(Gly)_5$, $(Gly)_6$, Gly-Ala, Gly-Pro, Hyp-Gly, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Hyp, Ala-Gly, Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Hyp, Gly-Hyp-Pro, Gly-Ala-Hyp, Gly-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (alle Peptide sterilfiltriert)

2 Mischung der Aminosäuren Glycin, Prolin, Hydroxyprolin, Alanin und Glutaminsäure entsprechend ihrer Konzentrationsverhältnisse in der Gelatine

3 Glucose, Fructose, Maltose, Saccharose, Lactose, Stärke, Xylose

4 Na-Lactat*, Na-Pyruvat*, Na-Succinat*, Na-Fumarat*, Ethanol H_2/CO_2

Tab. 3.16. Kohlenstoff- und Stickstoffbilanz des Gelatineumsatzes durch die Reinkultur AP 11.

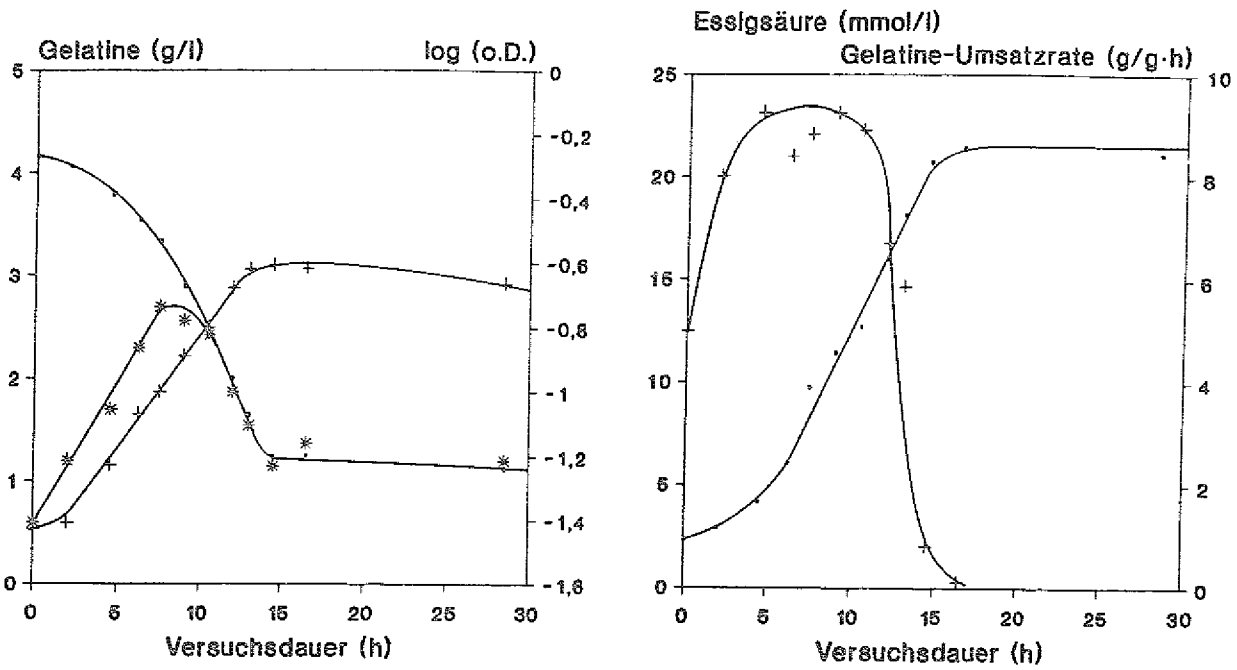
Substanz	Substanzkonzentration		Elementkonzentration ($mg \cdot l^{-1}$)	
			C	N
Substrat (Gelatine)	4,0	$g \cdot l^{-1}$	1950	734
<u>Produkte</u>				
Restgelatine	0,96	$g \cdot l^{-1}$	469	176
Ameisensäure	1,6	$mmol \cdot l^{-1}$	19,2	0
Essigsäure	20,9	$mmol \cdot l^{-1}$	502	0
Pro	8,2	$mmol \cdot l^{-1}$	492	115
Ala	3,9	$mmol \cdot l^{-1}$	140	54.6
Asp	0,17	$mmol \cdot l^{-1}$	8,2	2,4
Lys	0,72	$mmol \cdot l^{-1}$	51,8	20,2
Leu	0,62	$mmol \cdot l^{-1}$	44,6	8,7
Val	0,66	$mmol \cdot l^{-1}$	39,6	9,2
Ile	0,29	$mmol \cdot l^{-1}$	20,9	4,1
His	0,34	$mmol \cdot l^{-1}$	24,5	14,3
Meth	0,11	$mmol \cdot l^{-1}$	6,6	1,5
Tyr	0,26	$mmol \cdot l^{-1}$	28,1	3,6
NH_3	21,2		0	297
CO_2	5,7	$mmol \cdot l^{-1}$	68,4	0
H_2	13,8	$mmol \cdot l^{-1}$	0	0
CH_4	23	$\mu mol \cdot l^{-1}$	1,0	0
Biomasse	0,151	$g \cdot l^{-1}$	65,0	9,0
Summe	-		1980	716

Der Kohlenstoff- und Stickstoffeintrag durch das Inokulum (10 Vol.-%) und die Elementkonzentrationen des unbeimpften Nährmediums wurden von den Meßwerten subtrahiert.

konstant. Der Zusammenhang zwischen Gelatinekonzentration und Produkt- bzw. Biomassekonzentration war linear. Der unvollständige Gelatineumsatz ist somit auf die Spezifität der Proteinasen zurückzuführen.

Stamm AP 11 wuchs während des Gelatineumsatzes in statischer Kultur mit einer maximalen Generationszeit von 2,7 h und erreichte während der exponentiellen Wachstumsphase spezifische Gelatine-Umsatzraten von maximal 9,3 $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ (bezogen

auf Zelltrockenmasse). Der zeitliche Verlauf des Gelatineabbaus ist in Abb. 3.16 dargestellt.



a b

Abb. 3.16. Gelatineumsatz durch die Reinkultur AP 11 im statischen Ansatz. Gelatinekonzentration 4,0 $g \cdot l^{-1}$.
a: (▪) Gelatine; (*) Durch Ethanol nicht fällbare Gelatinefraktion (Pepton); (+) optische Dichte (660 nm, logarithmische Auftragung);
b: (▪) Essigsäure; (+) spezifische proteolytische Aktivität (bezogen auf Zellmasse-Trockengewicht)

Durch die Ethanolfällung des nicht verwerteten Substratanteils (vgl. Kap. 2.7.1.) konnte nachgewiesen werden, daß es zu einer sehr schnellen Hydrolyse des Substratmoleküls durch extrazelluläre Proteinasen kam. Bereits nach 8 h, also in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase, lag das Substrat nahezu vollständig in einer nicht mehr durch Ethanol fällbaren Form (Pepton) vor.

Die Bilanzierung der Aminosäureverwertung (Tab. 3.17) zeigt deutlich, daß nur die Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure, Arginin, Asparaginsäure, Serin und Threonin verwertet wurden. Prolin, Alanin und die die übrigen Aminosäuren der Gelatine lagen entweder frei oder an die Restgelatine gebunden im

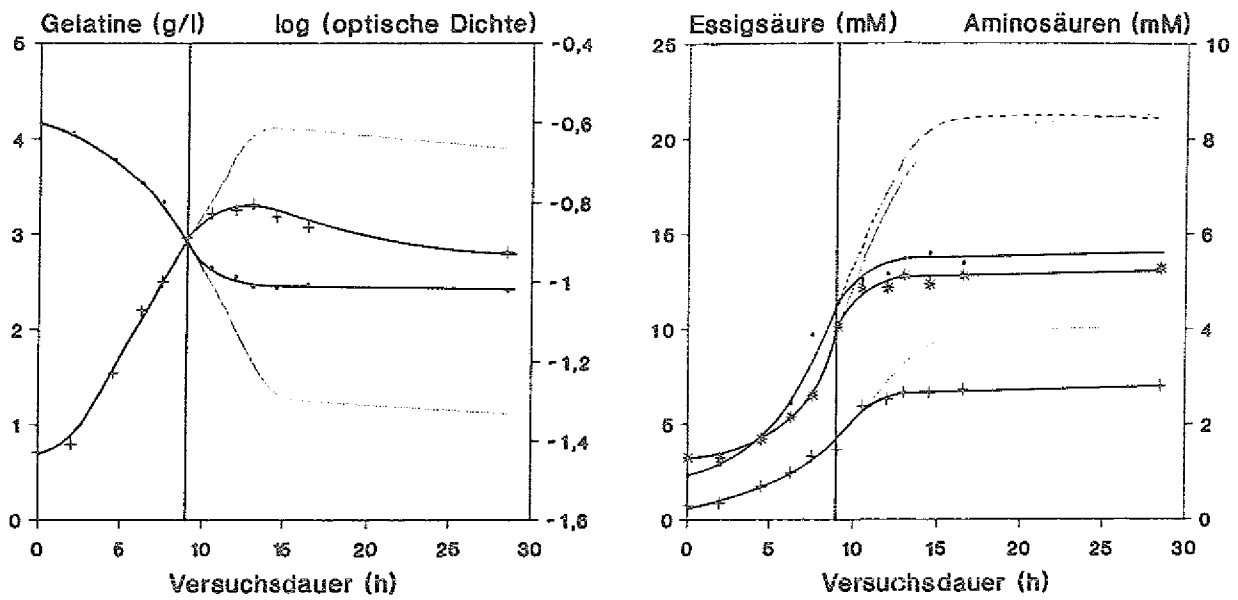
Tab. 3.17. Aminosäurebilanz des Gelatineumsatzes durch die Reinkultur AP 11.

Aminosäure	Konzentration ($mmol \cdot l^{-1}$) im Substrat (Gelatine)	Produkt freie Aminosäuren	Produkt gesamte Aminosäuren
Gly	17,6	0	1,3
Pro	5,9 } 10,7	10,3	10,2
Hyp	4,8 }	0	0
Ala	6,7	4,9	5,5
Glu	3,8	0,04	0,41
Arg	2,6	0	0,12
Asp	1,7	0,21	0,86
Lys	1,4	0,9	1,3
Ser*	1,5	0	0,20
Leu	1,1	0,78	1,1
Val	1,1	0,83	1,0
Phe	0,18	0,08	0,18
Thr*	0,77	0	0,06
Ile	0,50	0,36	0,46
His	0,56	0,43	0,54
Met	0,29	0,14	0,32
Tyr	0,63	0,32	0,59

Substratkonzentration 4,45 $g \cdot l^{-1}$. Aufschluß der Substratgelatine und der unverwerteten Restgelatine durch saure Hydrolyse.
* wird bei der sauren Hydrolyse teilweise zersetzt

Medium vor. Hydroxyprolin wurde vollständig zu Prolin umgewandelt. Daß Hydroxyprolin mikrobiell und nicht chemisch umgesetzt wurde, zeigte ein Kontrollversuch. Die freien Aminosäuren konnten entweder durch zellinterne Peptidhydrolyse oder durch die Aktivitäten extrazellulärer Exopeptidasen freigesetzt werden. Während der exponentiellen Wachstumsphase war keine Proteinase- und Exopeptidaseaktivität des zellfreien Kulturüberstandes nachweisbar. Die Proteinasen des Stammes AP 11 lagen also während des exponentiellen Wachstums zellgebunden vor. Um festzustellen, ob die Freisetzung der Aminosäuren extra- oder intrazellulär erfolgte, wurden daher die Hemmstoffe Chloramphenicol (Inhibibierung der Proteinbiosynthese) und Carbonyl-cyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP; Ionophor) verwendet. Durch den Hemmstoffzusatz sollte das Wachstum der Kultur unterbunden und der Ablauf energiever-

brauchender Reaktionen (z. B. der Export von Aminosäuren) verhindert werden. Eine Aminosäurefreisetzung aus Gelatine sollte unter diesen Bedingungen nur durch extrazelluläre Enzyme erfolgen können. Die Hemmstoffe wurden einer mit Gelatine wachsenden AP 11-Kultur in der exponentiellen Phase zugesetzt (Abb. 3.17).



a b

Abb. 3.17. Wachstumshemmung der Reinkultur AP 11 durch Chloramphenicol (100 mg·l⁻¹) und CCCP (100 µmol·l⁻¹). Hemmstoffzusatz nach 9 h. Gepunktete Linien: Kontrolle ohne Hemmstoffzusatz. a: (•) Gelatinekonzentration; (+) optische Dichte (660 nm, logarithmische Auftragung. b: (•) Essigsäurekonzentration; (+) Alaninkonzentration; (*) Prolinkonzentration

Das Wachstum, die Gelatineverwertung, die Essigsäurebildung und die Freisetzung der von AP 11 nicht verwerteten Aminosäuren (dargestellt am Beispiel Prolin und Alanin) wurden durch den Hemmstoffzusatz nach einer kurzen Verzögerungsphase nahezu vollständig unterbunden. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß die Aminosäurefreisetzung nicht auf die Aktivität von Exoenzymen zurückzuführen war, sondern daß die freien Aminosäuren aus intrazellulär hydrolysierten Peptiden stammen mußten.

Proteinasecharakterisierung. Der Einfluß verschiedener Proteinase-Inhibitoren auf die proteolytische Aktivität der Reinkultur AP 11 und der Mischkultur, aus der AP 11 isoliert worden war, ist in Tab. 3.18 vergleichend dargestellt.

Tab. 3.18. Vergleich der Wirkung verschiedener Proteinaseinhibitoren auf die Proteinaseaktivität der Reinkultur AP 11 und der Mischkultur, aus der AP 11 isoliert wurde. Aktivitätsangabe bezogen auf die Aktivität der nicht gehemmten Referenzkultur. Substrat Gelatine.

Proteinaseinhibitor	Konzentration		Relative Proteinaseaktivität (%) Mischkultur	AP 11
Pepstatin A	200	$\mu g \cdot l^{-1}$	112	113
Jodacetat	4	$mmol \cdot l^{-1}$	92	97
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	1	$mmol \cdot l^{-1}$	100	98
4-Bromphenacylbromid	1	$mmol \cdot l^{-1}$	81	77
Phosphoramidon	0,2	$mmol \cdot l^{-1}$	101	101
EDTA (Titriplex III)	4	$mmol \cdot l^{-1}$	6,5	28
EDTA (Titriplex III)	10	$mmol \cdot l^{-1}$	0	7,0
Dithiothreitol (DTT)	2	$mmol \cdot l^{-1}$	73	56
Cystein-HCl	2	$mmol \cdot l^{-1}$	98	82
$CuSO_4$	1	$mmol \cdot l^{-1}$	47	125

Die Hemmstoffe Pepstatin A (Säureproteinase-Inhibitor), Jodacetat (Thioproteinaseinhibitor), PMSF (Serinproteinase-Inhibitor) und Phosphoramidon (Inhibitor von Neutral-Proteinasen) hatten keinen signifikant hemmenden Einfluß auf die proteolytische Aktivität der Kulturen. Dagegen zeigten die Inhibitoren EDTA, DTT, Cystein-HCl (Metallproteinaseinhibitoren) und $CuSO_4$ (Inhibitor von Metall- und Thiolproteinasen) einen deutlich hemmenden Einfluß. Dabei lag das Ausmaß der Hemmung der Reinkultur und der Mischkultur mit Ausnahme des Kupfersulfats in der gleichen Größenordnung. Die Inhibitorstudie bestätigt die dominante Rolle des Stammes AP 11 in der Chemostaten-Mischkultur. Gleichzeitig zeigt die deutlich hemmende Wirkung der Inhibitoren EDTA, DTT und Cystein-HCl, daß für die Gelatinehydrolyse Metallproteinasen verantwortlich waren. Damit wird die fördernde Wirkung

zweiwertiger Metallionen gegenüber der proteolytischen Aktivität der Mischkultur (Kap. 3.4) bestätigt.

Temperatur- und pH-Optimum des Gelatineumsatzes. Das in statischer Kultur ermittelte Temperaturoptimum der Reinkultur AP 11 für den Gelatineumsatz liegt bei 35 °C. Bei 45 °C erfolgte kein Wachstum (Abb. 3.18).

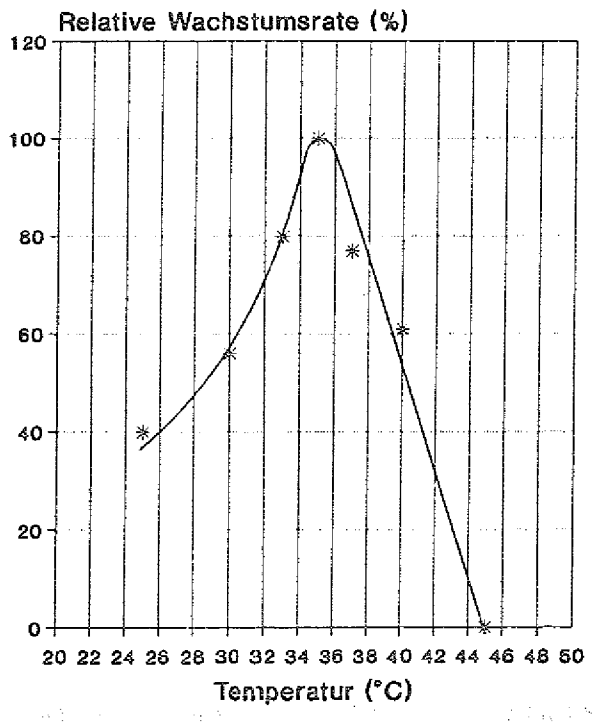


Abb. 3.18. Wachstum der Reinkultur AP 11 mit Gelatine in Abhängigkeit von der Temperatur. Maximale Wachstumsrate 3,3 h^{-1}.

Der für den Gelatineumsatz optimale pH-Wert betrug 6,9. Bei den pH-Werten 5,2 und 8,6 erfolgte kein Wachstum (Abb. 3.19).

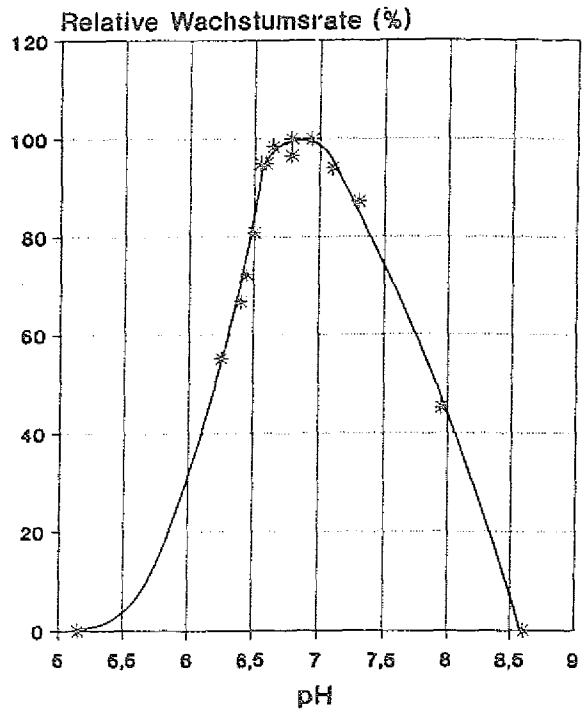


Abb. 3.19. Wachstum der Reinkultur AP 11 mit Gelatine in Abhängigkeit vom pH-Wert. Maximale Wachstumsrate 2,7 h^{-1}.

Einfluß von H_2, O_2 und Glucose auf den Gelatineumsatz. Untersuchungen zum Einfluß von Wasserstoff auf das Wachstum der gelatineumsetzenden Mischkultur (Kap. 3.2.3) hatten eine hemmende Wirkung hoher Wasserstoff-Konzentrationen gezeigt. Wasserstoff ($0{,}8 \cdot 10^5$ Pa) hemmte auch das Wachstum der Reinkultur AP 11 in statischer Kultur. Die Wachstumsrate verringerte sich auf 74 % der Wachstumsrate der Referenzkultur, der Gelatine-Abbaugrad und die Produktkonzentrationen blieben jedoch unverändert. Sauerstoff ($0{,}2 \cdot 10^5$ Pa) führte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Mischkultur-Charakterisierung (Kap. 4.2.2.) zur vollständigen Hemmung des Wachstums der Kultur AP 11. Glucose hatte, wie das Substratspektrum erwarten läßt, keinen Einfluß auf Wachstum und Gelatineverwertung.

3.6.2. Isolierung und Charakterisierung des obligat proteolytischen Stammes AP 23

Neben dem zahlenmäßig dominanten Isolat AP 11 wurde aus der gelatineverwertenden Mischkultur ein weiteres Bakterium isoliert, das als Stamm AP 23 bezeichnet wurde. Zwei der insgesamt 40 von Gelatine-Nährböden isolierten Kulturen entsprachen nach Zellmorphologie und Gärungsspektrum diesem Isolat. AP 23 war das einzige isolierte Bakterium, das aus Gelatine Propionsäure bildete und das damit eine Erklärung für das Auftreten dieser Säure beim Gelatineumsatz durch die Mischkultur lieferte.

Das unbewegliche, stäbchenförmige Isolat AP 23 war in Gelatine während der exponentiellen Wachstumsphase 6-10 µm lang und hatte einen Durchmesser von etwa 0,4-0,5 µm. In PYG-Nährlösung (Holdeman et al., 1977) betrug die Länge dagegen 4-6 µm, der Durchmesser lag bei 0,6 µm. AP 23 verhielt sich Gram-negativ, die KOH-Lyse verlief positiv und L-Alanin-Aminopeptidase-Aktivität war nachweisbar. In Anwesenheit von Sauerstoff war das Wachstum vollständig gehemmt. Sporen wurden in Gelatine-Nährlösung nicht gebildet. In PYG-Nährlösung wurden Essigsäure, Ethanol, n-Buttersäure und n-Valeriansäure als Hauptprodukte gebildet, daneben traten i-Valeriansäure und Ameisensäure in geringen Konzentrationen auf. In PYG-Medium wurde auch Wasserstoff freigesetzt. Das Substratspektrum der Reinkultur AP 23 unterschied sich deutlich von dem des Stammes AP 11 (Tab. 3.19).

Stamm AP 23 ist, im Gegensatz zum Stamm AP 11, nicht auf die Verwertung von Kollagen und Kollagenderivaten spezialisiert, sondern setzte generell Peptone deutlich besser um, als Proteine. Der Stamm scheint also eine nur schwach ausgeprägte proteolytische Aktivität zu besitzen und lebte in der Mischkultur vermutlich von Hydrolyseprodukten, die durch die proteolytische Aktivität anderer Bakterien freigesetzt werden. Wie AP 11 ist der Stamm AP 23 ein obligat protein- bzw. peptonverwertendes Bakterium, Kohlenhydrate und Aminosäuren

Tab. 3.19. Substratspektrum der Reinkultur AP 23.

Substrat	Wachstum (OD_{660})	gebildete Essigsäure ($mmol \cdot l^{-1}$)
Proteine, Peptide und Aminosäuren		
Gelatine	+	3,1
Pepton aus Gelatine	+	6,8
Kollagen	(+)	1,3
Oligopeptide[1]	-	-
Aminosäuren[2]	-	0,1
Elastin	-	0
Keratin	-	0,1
Casein	-	0
Pepton aus Casein	+	1,5
Casaminoacids	-	0
Fleischextrakt	+	6,4
Pepton aus Fleisch	+	7,1
Lactalbumin	-	0,1
Lactalbuminhydrolysat	+	3,0
Ovalbumin*	+	2,4
Ovalbuminhydrolysat	+	4,6
Rinderserumalbumin*	+	3,8
Proteosepepton	+	9,7
Kohlenhydrate[3]	-	-
Sonstige[4]	-	-

Inkubationsdauer 5 d. Substratkonzentration 4,5 $g \cdot l^{-1}$ (mit Hydratwasser). Sterilisation durch Autoklavieren (10 min, 115 °C) mit Ausnahme der mit *gekennzeichneten Substrate, die durch Filtration (Membranfilter 0,2 µm) sterilisiert wurden. Die durch das Inokulum eingetragenen Substanzkonzentrationen wurden vom Meßwert subtrahiert.

[1] $(Gly)_2$, $(Gly)_3$, $(Gly)_4$, $(Gly)_5$, $(Gly)_6$, Gly-Ala, Hyp-Gly, Pro-Ala, Pro-Gly, Ala-Gly, Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Hyp, Gly-Hyp-Pro (alle Peptide sterilfiltriert)

[2] Mischung der Aminosäuren Glycin, Prolin, Hydroxyprolin, Alanin und Glutaminsäure entsprechend ihrer Konzentrationsverhältnisse in der Gelatine

[3] Glucose, Fructose, Maltose, Saccharose, Lactose, Stärke, Xylose

[4] Na-Lactat*, Na-Pyruvat*, Na-Succinat*, Na-Fumarat*, Ethanol H_2/CO_2

wurden nicht umgesetzt. Die beschriebenen Eigenschaften führen zur Einordnung des Isolates AP 23 in die Familie *Bacteroidaceae* und machen die Zugehörigkeit zur Gattung *Bacteroides* wahrscheinlich (Holdeman et al., 1977). AP 23 bildete kein schwarzes Pigment, bildete kein Indol, hydrolysierte Esculin nicht, konnte Stärke und Fructose nicht verwerten und reduzierte weder Nitrat noch Sulfat. Diese Eigenschaften, die Fähigkeit, Gelatine zu verwerten und die in PYG-Medium gebildeten Produkte machen AP 23 der Art *Bacteroides nodosus* sehr ähnlich (Holdeman et al., 1977 u. 1984), doch unterscheidet sich AP 23 von *B. nodosus* z. B. durch die Bildung von Wasserstoff und das Fehlen von Propionsäure beim Wachstum in PYG-Medium.

AP 23 setzte Gelatine unvollständig mit einem Abbaugrad von 36 % zu einem Gemisch von kurzkettigen Fettsäuren und H_2 um. Daneben wurden als Produkte Aminosäuren freigesetzt (Tab. 3.20).

Das Hauptgärungsprodukt der Flüssigphase war Essigsäure. Daneben wurde Wasserstoff mit einer Konzentration von 3,3 $mmol \cdot l^{-1}$ gebildet. Ein wesentliches Merkmal der Gelatineumsetzung durch AP 23 ist die Vielfalt des Produktspektrums. Insgesamt konnten 8 verschiedene Säuren als Gärungsprodukte nachgewiesen werden. Als freie Aminosäuren traten nur Glycin, Glutaminsäure und Alanin auf. Prolin und Hydroxyprolin waren nicht nachweisbar, andere Aminosäuren traten in Konzentrationen auf, die unterhalb von 0,01 $mmol \cdot l^{-1}$ lagen. AP 23 verwertet also im Gegensatz zum Stamm AP 11 Prolin und Hydroxyprolin, nicht aber Glycin. Glucose (4,0 $g \cdot l^{-1}$) und Wasserstoff ($0,8 \cdot 10^5$ Pa) hatten keinen hemmenden Einfluß auf den Gelatineumsatz durch AP 23 in statischer Kultur.

Tab. 3.20. Kohlenstoffbilanz des Gelatineumsatzes durch die Reinkultur AP 23.

Substanz	Substanz-konzentration	Kohlenstoff-konzentration $g \cdot l^{-1}$
Substrat (Gelatine)	4,00 $g \cdot l^{-1}$	1,95
Produkte		
Restgelatine	2,58 $g \cdot l^{-1}$	1,26
Ameisensäure	0,7 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0084
Essigsäure	5,9 $mmol \cdot l^{-1}$	0,142
Propionsäure	1,4 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0504
n-Buttersäure	0,4 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0192
i-Buttersäure	0,5 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0240
i-Valeriansäure	0,4 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0240
Phenylessigsäure	0,4 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0384
Bernsteinsäure	0,3 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0144
Gly	3,6 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0864
Glu	0,2 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0120
Ala	1,8 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0648
CO_2	0,2 $mmol \cdot l^{-1}$	0,0024
Biomasse	0,066 $g \cdot l^{-1}$	0,0291
Summe		1,77

Der Kohlenstoffeintrag durch das Inokulum (10 Vol.-%) und die Elementkonzentrationen des unbeimpften Nährmediums wurden von den Meßwerten subtrahiert.

3.6.3. Gelatineumsatz durch definierte Mischkulturen.

Die Stämme AP 11 und AP 23 machten zusammen 94 % der proteolytischen Bakterien der Mischkultur aus. Daher wurde der Gelatineumsatz durch eine Mischkultur aus diesen beiden Stämmen untersucht. Da Wasserstoff einen hemmenden Einfluß auf den Stamm AP 11 gezeigt hatte, wurde in einem weiteren Versuch den proteolytischen Bakterien AP 11 und AP 23 das wasserstoffverwertende *Methanobacterium bryantii* zugesetzt. Der Versuch zeigt, daß durch das Zusammenwirken der beiden proteolytischen Bakterien die Konzentration der freigesetzten Aminosäuren

signifikant gesenkt wurden (Tab. 3.21). Da beide proteolytischen Reinkulturen zur Verwertung von freien Aminosäuren nicht in der Lage waren, ist dieser Effekt auf die erhöhte Verfügbarkeit des Substrates durch synergistisches Zusammenwirken der Proteinasen der Stämme AP 11 und AP 23 zurückzuführen. Der Effekt wurde signifikant verstärkt durch die Anwesenheit des wasserstoffverwertenden Methanbakteriums. Die Aminosäuren Glycin, Valin, Isoleucin und Leucin waren in der Mischkultur mit Methanbakterium nicht mehr nachweisbar, Alanin wurde in deutlich niedrigeren Konzentrationen ausgeschieden. Gleichzeitig war der Gelatineabbaugrad in Anwesenheit des Methanbakteriums leicht erhöht.

Tab. 3.21. Gelatineumsatz durch die Reinkulturen AP 11 und AP 23 sowie durch die definierten Mischkulturen AP 11 + AP 23 und AP 11 + AP 23 + *Methanobacterium bryantii*.

Produkt		Kultur: AP 11	AP 23	AP 11 +AP 23	AP 11 +AP 23 +*M. bryantii*
		Kohlenstoffkonzentration ($g \cdot l^{-1}$) bzw. Produktkonzentration ($mmol \cdot l^{-1}$)			
Restgelatine	($g \cdot l^{-1}$)	0,358	1,31	0,154	0,130
Aminosäuren	($g \cdot l^{-1}$)	0,818	0,149	0,759	0,600
Gärungsprodukte	($g \cdot l^{-1}$)	0,501	0,262	0,710	0,851
H_2	($mmol \cdot l^{-1}$)	7,1	1,4	9,4	nn
CH_4	($mmol \cdot l^{-1}$)	sp	nn	sp	2,0
Gly*	($mmol \cdot l^{-1}$)	nn	3,3	nn	nn
Pro	($mmol \cdot l^{-1}$)	7,5	nn	7,7	7,7
Ala*	($mmol \cdot l^{-1}$)	4,0	1,5	4,1	2,7
Lys*	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,34	0,05	0,44	nn
Ser	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,06	0,06	0,06	0,06
Leu*	($mmol \cdot l^{-1}$)	1,0	nn	0,30	nn
Val*	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,77	nn	0,38	nn
Thr	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,20	0,20	0,20	0,20
Ile*	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,37	nn	0,41	nn
His	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,43	sp	0,38	0,41
Met*	($mmol \cdot l^{-1}$)	0,15	sp	0,08	sp

Substratkonzentration 4,0 $g \cdot l^{-1}$ (1,95 $g \cdot C \cdot l^{-1}$).
Schüttelkultur, Inkubationsdauer 48 h.
* Aminosäuren, deren Konzentration durch die Zusammensetzung der Kultur beeinflußt wurde

nn: nicht nachweisbar
sp: in Spuren (< 0,05 $mmol \cdot l^{-1}$)

Die Aminosäuren Hydroxyprolin, Glutaminsäure, Arginin und Phenylalanin waren in keinem der Ansätze nachweisbar. Asparaginsäure trat nur in Spuren auf.

3.7. Isolierung und Charakterisierung proteolytischer Reinkulturen aus der gelatine- und glucoseverwertenden Mischkultur.

Die Umsetzung eines Gelatine/Glucose-Mischsubstrates in Chemostaten und die Untersuchung der bakteriellen Mischkultur dieser Reaktoren hatten deutliche Hinweise dafür erbracht, daß im Gegensatz zur Umsetzung eines reinen Gelatine-Substrates fakultativ anaerobe, mixotrophe Bakterien für den Gelatineabbau verantwortlich sind (Kap. 3.4 und 3.6). Um die Dominanz dieser proteolytischen Bakterien nachzuweisen und um ihre Eigenschaften charakterisieren zu können, wurde die Mischkultur aus dem ein Gelatine/Glucose-Mischsubstrat umsetzenden Chemostaten ($D=0,180\ h^{-1}$) in Gelatine- und Glucose-Nährböden gebracht. 50 Kolonien wurden von Gelatine-Nährböden isoliert und in Gelatine-Nährlösung überführt, die Fermenterflüssigkeit und Hefeextrakt enthielt. Nur 3 Kulturen (6 % der isolierten proteolytischen Kolonien) wuchsen in der Nährlösung. Durch die weitergehende Charakterisierung konnten diese Isolate als die obligat proteolytischen Stämme AP 11 (1 Isolat) und AP 23 (2 Isolate) identifiziert werden.

Weitere 30 Kolonien wurden von Gelatine-Nährböden in glucosehaltiges Nährmedium (mit Hefeextrakt und Fermenterflüssigkeit) überführt. In 29 der Röhrchen mit Glucose-Nährlösung (97 % der mit proteolytischen Bakterien beimpften Röhrchen) erfolgte das Wachstum von kokkenförmigen Bakterien, die vorwiegend in Paaren oder Ketten vorlagen. Auch nach dem Substrat- und Produktspektrum waren die 29 isolierten Kulturen identisch. Die Bedeutung dieses kokkenförmigen Bakteriums mit einem Durchmesser von ca. 0,6 µm (Abb. 3.20) wird durch die in Kap. 3.5 beschriebene mikroskopische Analyse der Mischkultur bestätigt.

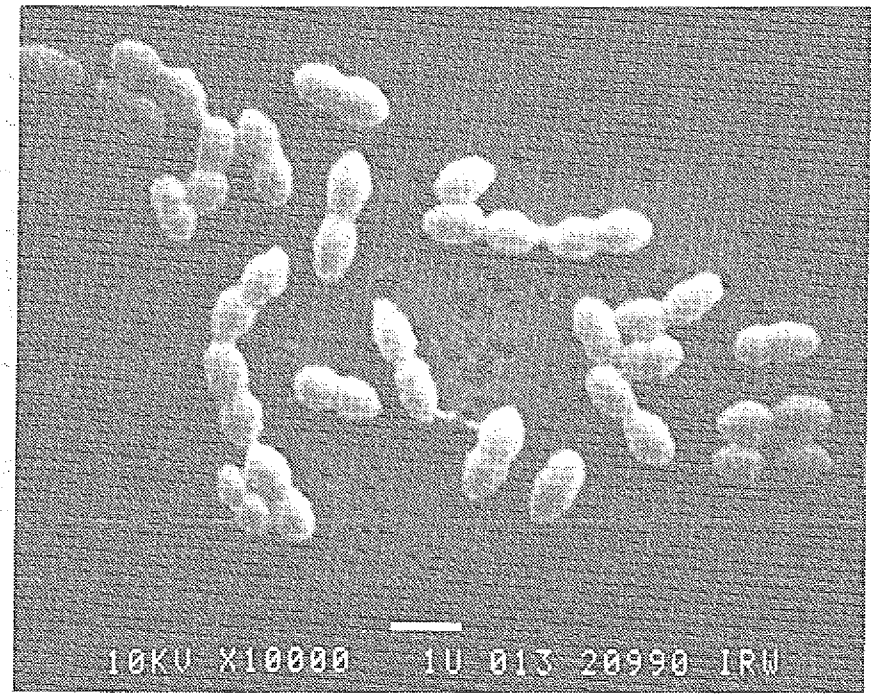


Abb. 3.20. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Reinkultur *Streptococcus bovis* BG 61. Die Zellen wurden während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Länge des Balkens entspricht 1 µm.

Das Bakterium wurde als Stamm BG 61 weiter bearbeitet. Der Stamm ließ sich in Glucose nur zuverlässig kultivieren, wenn Fermenterflüssigkeit und Hefeextrakt zugegeben wurden, es muß daher angenommen werden, daß sein Wachstum in der Mischkultur durch Stoffwechselprodukte anderer Bakterien gefördert wurde. In Vollmedium war die Kultivierung unproblematisch. In Gelatine-Flüssigmedium gelang die Haltung nicht, der Organismus bildete aber kleine Kolonien in Gelatine-Nährboden. BG 61 wuchs nicht in Flüssigmedien, die Aminosäuren oder Pepton aus Gelatine als einzige Kohlenstoffquelle enthielten, dagegen erfolgte schwaches Wachstum in einer Pepton-Hefeextrakt (PY)-Nährlösung (Holdeman et al., 1977). Aus Glucose bildete der Stamm BG 61 in statischer Kultur Milchsäure, die als Produkt sowohl bei hoher Durchflußrate im Chemostaten als auch in statischer Kultur bei der Umsetzung des Gelatine/Glucose-Mischsubstrates durch die Mischpopulation nachgewiesen werden konnte. Stamm BG 61 wurde charakterisiert und als *Streptococcus bovis* identifiziert (Durchführung durch Herrn Dr. Weiss, DSM, Braunschweig)

Von Glucose-Nährböden wurden 90 Kolonien in Glucose-Nährlösung überführt. In 20 dieser Röhrchen (22 % der glucoseverwertenden Bakterien) wurde ein bewegliches Stäbchen nachgewiesen, das aus Glucose ein Produktgemisch aus Essigsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure und Ethanol bildete. Dieses Stäbchen wuchs auch in Glucoselösung ohne Fermenterflüssigkeit und Hefeextrakt sehr gut. In Gelatine-Nährlösung fand kein Wachstum dieser Kultur statt, auf Gelatine-Nährböden wurden keine Kolonien gebildet, der Stamm wuchs jedoch deutlich in Pepton-Hefeextrakt (PY)-Nährlösung (Holdeman et al., 1977) und schwach in Nährlösung mit Pepton aus Gelatine als einziger C-Quelle. In statischer Kultur wurde dem Organismus bei konstant gehaltenem pH-Wert ein Mischsubstrat aus Glucose und Gelatine (je 4,0 $g \cdot l^{-1}$) angeboten. Glucose wurde innerhalb von 7,5 h vollständig zu den Hauptprodukten Ethanol (16,5 $mmol \cdot l^{-1}$) und Essigsäure (15 $mmol \cdot l^{-1}$) umgesetzt. Zusätzlich wurden Lactat (1,3 $mmol \cdot l^{-1}$) und Succinat (3,7 $mmol \cdot l^{-1}$) nachgewiesen. H_2 wurde als Gärungsprodukt qualitativ festgestellt. Das Wachstum mit Glucose erfolgte mit einer Generationszeit von 1,5 h. Gelatine wurde auch in diesem Versuch nicht umgesetzt. Das Isolat wurde charakterisiert und als *Enterobacter cloacae* identifiziert (Durchführung von Frau Dr. Verbarg, DSM, Braunschweig).

In 70 der 90 von Glucose-Nährboden beimpften Röhrchen mit Glucose-Nährlösung (78 % der glucoseverwertenden Bakterien) konnte *Streptococcus bovis* nachgewiesen werden.

Aus der Zusammensetzung der Mischpopulation (Kap. 3.5) und den Ergebnissen der Reinkulturisolationen läßt sich die Zusammensetzung der gelatine- und glucoseumsetzenden Mischkultur ableiten. Gelatineabbauende Bakterien haben einen Anteil von 58 % an der Gesamtkeimzahl, ca. 55 % entfallen auf *S. bovis*, etwa 3 % der Gesamtkeimzahl werden durch obligat proteolytische Spezialisten ausgemacht. Der Anteil der glucoseverwertende Bakterien wurde mit 70 % ermittelt. Neben *S. bovis* (ca. 55 %) konnte *Enterobacter cloacae* als zahlenmäßig bedeutendes Bakterium nachgewiesen werden. Sein Anteil an der Gesamtzellzahl lag bei ca. 15 %. Die Zusammensetzung der

Mischkultur ist in Abb. 3.21 dargestellt.

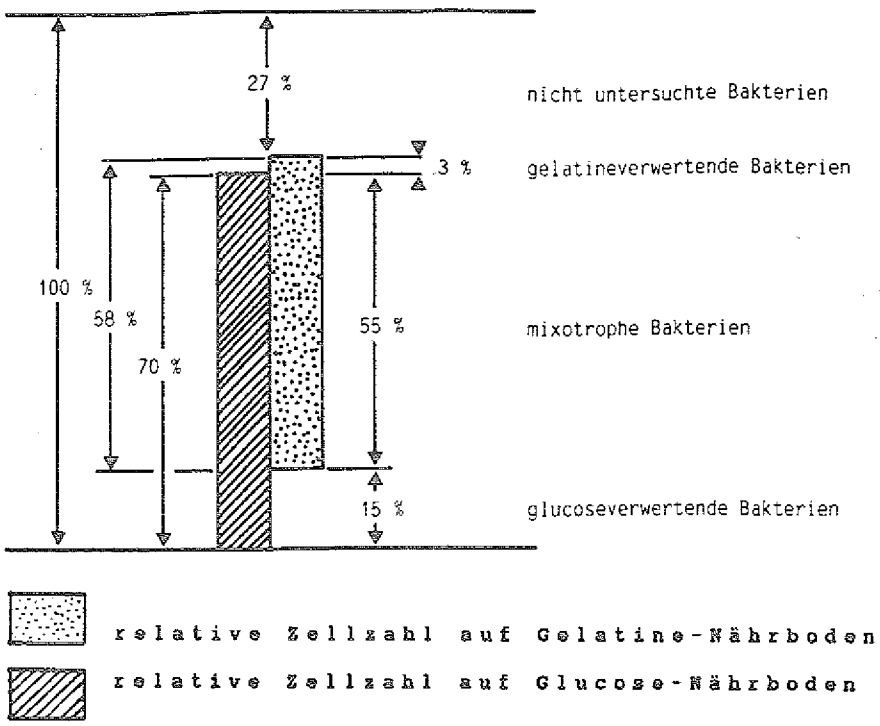


Abb. 3.21. Zusammensetzung der mit einem Gelatine/Glucose-Mischsubstrat im Chemostaten ($D=0,18\ h^{-1}$) wachsenden Mischkultur. Angegeben sind relative Zellzahlen.

In der Kultur konnten somit drei acidogene Bakterientypen nachgewiesen werden, das mixotrophe Bakterium (*Streptococcus bovis*), der Glucoseverwerter (*Enterobacter cloacae*) und das obligat proteolytische Bakterium (Stämme AP 11 und AP 23). *Streptococcus bovis* BG 61 war das zahlenmäßig dominante gelatineverwertende Bakterium der Mischkultur. Da es jedoch in Gelatine-Nährlösung nicht kultivierbar war, muß angenommen werden, daß Stamm BG 61 auf das synergistische Zusammenwirken mit anderen proteolytischen Bakterien angewiesen ist. Gleichzeitig zeigte das Auftreten von Milchsäure als Produkt der Glucoseumsetzung durch die Mischkultur, daß *S. bovis* auch wesentlich am Glucoseumsatz der Mischkultur beteiligt war. Durch die Isolation dieses Bakteriums konnte die Vermutung bestätigt werden, daß für den Gelatineabbau im Chemostaten in Gegenwart von Glucose bei einer Durchflußrate von $0,18\ h^{-1}$ ein mixotrophes Bakterium verantwortlich war, während der Gelatineabbau als einziger C-Quelle unter vergleichbaren Bedingungen durch ein obligat proteolytisches Bakterium

4. DISKUSSION

Trotz der großen Bedeutung von Proteinen als Inhaltsstoffe zahlreicher Abwässer liegen zum Abbau der Proteine bei der anaeroben Abwasserreinigung relativ wenige Untersuchungen vor. Mehrere Autoren haben den Proteinabbau als problematisch beschrieben (Lettinga et al., 1984; Vellinga et al., 1986; Keusen, 1989; Keim, 1990).

Kinetik des Proteinumsatzes und der limitierende Schritt der Umsetzung organischen Materials. Beim Abbau eines komplexen organischen Mischsubstrates, wie es zahlreiche Industrieabwässer darstellen, wird die maximale Rate des vollständigen Umsatzes durch den langsamsten Teilschritt bestimmt. Daher ist die Frage nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wiederholt diskutiert worden. Zwei Teilreaktionen wurden dabei als geschwindigkeitsbestimmend festgestellt: die Hydrolyse von Polymeren (Ghosh u. Klass, 1977; Noike et al., 1985) und die Methanogenese aus Essigsäure (Andrews u. Pearson, 1965; Ghosh et al., 1975; Jain u. Zeikus, 1989). Welche der beiden Teilreaktionen geschwindigkeitsbestimmend ist, hängt vor allem von der Art der Substratpolymere ab. Während z.B. die Hydrolyse von Cellulose als geschwindigkeitsbestimmend beschrieben wurde (Ghosh u. Klass, 1977; Noike et al., 1985), gilt beim Umsatz von Stärke (Zoetemeyer et al., 1981) oder Klärschlamm (Ghosh et al., 1975) die Methanogenese als geschwindigkeitsbestimmender Schritt. Die Umsatzgeschwindigkeit von Proteinen wurde mit ihrer Löslichkeit in Verbindung gebracht (Hungate, 1966). Gelatine wurde nach diesen Untersuchungen als gut abbaubar eingestuft. Untersuchungen in statischer Kultur (Jain u. Zeikus, 1989), in Rührkesselreaktoren (Breure u. van Andel, 1984; diese Arbeit), in einem UASB-Reaktor (Breure et al., 1985) und in einem Festbett-Umlaufreaktor (diese Arbeit, Daten nicht dargestellt) zeigten, daß der Umsatz von Gelatine nicht geschwindigkeitsbegrenzend ist. Die mit dem Substrat Gelatine gewonnenen Ergebnisse lassen sich jedoch nicht verallgemeinern, da die Umsatzrate wesentlich vom Proteintyp beeinflußt wird (Mahadevan et al., 1980; Wallace u. Kopecny, 1983;

Wallace et al., 1987; Gibson u. MacFarlane, 1988). So wurde z. B. in der mit einem Abwasser der pharmazeutischen Industrie betriebenen Anlage 9 (Kap. 3.1) bei nahezu vollständiger Acetogenese und Methanogenese Protein nur geringfügig abgebaut. Das mit dieser Anlage behandelte Abwasser war zur Rückgewinnung von Extraktionsmitteln einer Hitzebehandlung unterzogen worden, die eine Proteindenaturierung bewirken kann. Zudem können in Anwesenheit von Kohlenhydraten und Stickstoffverbindungen unter Hitzeeinwirkung Reaktionen ablaufen, die zur Bildung von Maillard-Produkten führen (Angrick u. Rewicki, 1980). Diese Produkte gelten als schwer abbaubar und können toxisch wirken (Young u. McCarty, 1981).

Eine kinetische Analyse des Proteinumsatzes ist nur bedingt möglich, da der k_s- und v_{max}- Wert des Organismus (bzw. der k_m- und v_{max}-Wert der Proteinasen) für das Substratmolekül nur durch den Einsatz definierter Oligopeptide bestimmt werden kann. Für Proteine wurden meist hohe k_s- und k_m-Werte ermittelt. Islam u. Blanshard (1973) bestimmten einen k_m-Wert von 3,8 $g \cdot l^{-1}$ für eine *Bacillus-cereus*-Proteinase und das Substrat Casein. Hazlewood u. Edwards (1981) geben für *Bacteroides ruminicola* und das Substrat Rinderserumalbumin einen k_s-Wert von 3,2 $g \cdot l^{-1}$ an. In dieser Arbeit wurde für die Gelatinehydrolyse durch eine auf dieses Substrat adaptierte Mischkultur ein k_s-Wert von 4,2 $g \cdot l^{-1}$ für den Umsatz von Gelatine bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die Ursachen für hohe k_s- bzw. k_m-Werte sind in Diffusionslimitierungen und sterischen Behinderungen des Proteinasezugriffs zu suchen, da für Peptide meist signifikant niedrigere Sättigungskonstanten bestimmt wurden (Morihara, 1974).

Abhängigkeit der Proteolyse vom pH-Wert. Die vorliegenden Untersuchungen zum anaeroben Abbau protein- und kohlenhydrathaltiger Industrieabwässer zeigten deutlich, daß ein weitgehender Proteinabbau nur im Bereich neutraler pH-Werte stattfand, während bei niedrigen pH-Werten der Proteinabbau unvollständig war. Dieser Befund wird bestätigt durch die zum Proteinabbau in Abwasserreinigungsanlagen vorliegenden Literaturdaten (Häusler u. Malcher, 1972; Trösch et al., 1983;

Wildenauer u. Winter, 1985; Seyfried et al., 1985; Nanninga u. Gottschal, 1986; Breure u. van Andel, 1987; Keusen, 1989; Keim, 1990) und durch Untersuchungen zum Abbau gelatinehaltiger Modellabwässer (Breure u. van Andel, 1984). Durch weitergehende Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine Adaptation bezüglich des Proteolyse-Optimums an niedrige pH-Werte auch in langfristig bei niedrigen pH-Werten betriebenen Reaktoren nicht eintritt (Breure u. van Andel, 1984; diese Arbeit). Für Bakterien, die aus Lebensräumen mit neutralem pH-Wert stammen, sind pH-Optima der Proteolyse im Neutralbereich nachgewiesen worden, so z.B. für *Bacteroides amylophilus* (neu klassifiziert als *Ruminobacter amylophilus* von Stackebrandt u. Hippe, 1986) aus dem Pansen (Blackburn, 1968), für *Bacteroides fragilis* aus dem Dickdarm verschiedener Säuger (Gibson u. McFarlane, 1988), für *Butyrovibrio fibrisolvens* aus dem Darm verschiedener Säuger (Cotta u. Hespell, 1986), für *Porphyromonas gingivalis* aus der Mundhöhle (Takahashi u. Schachtele, 1990) und für das Isolat AP 11 aus dem Faulschlamm einer kommunalen Kläranlage (Kap. 3.6.1). Das gilt auch für die Mischkulturen aus Pansen (Erfle et al., 1982), Darm (MacFarlane, Allison u. Gibson, 1988) und Faulschlamm (diese Arbeit, Ergebnisse nicht dargestellt). Zwar ist auch die Bildung bakterieller Proteinasen beschrieben worden, die das Aktivitätsmaximum bei niedrigen pH-Werten besitzen (de Giori et al., 1985), doch scheint auch in natürlichen Lebensräumen mit niedrigen pH-Werten das Optimum der Proteolyse im pH-Neutralbereich zu liegen. Dies wurde von Burgeff (1961) für Proben aus einem Hochmoor gezeigt. Die Ursachen des seltenen Vorkommens bakterieller Proteinasen mit einem Wirkungsoptimum im Bereich niedriger pH-Werte (Morihara, 1974; Ward, 1983) sind bisher nicht untersucht worden.

Einfluß von Stoffwechselprodukten auf die Proteolyse. Die mit dem Substrat Gelatine wachsende Mischkultur und die Reinkultur AP 11 wurden durch Ammonium, Propionsäure und Sauerstoff deutlich gehemmt. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen zur toxischen Wirkung des Ammoniums (McCarty, 1964; Ianotti u. Fischer, 1984) und der Propionsäure (Ianotti u. Fischer, 1984; Salmond et al., 1984; Woolford, 1984) gegenüber

anaeroben Bakterien. Die hemmende Wirkung des Sauerstoffs ist auf den strikt anaeroben Stoffwechsel der dominanten proteolytischen Bakterien der gelatineumsetzenden Mischkultur zurückzuführen. Das Wachstum der gelatineverwertenden Mischkultur und der Reinkultur AP 11 wurden auch durch Wasserstoff gehemmt. Eine definierte Mischkultur der proteolytischen Isolate AP 11 und AP 23 erreichte einen höheren Gelatineabbaugrad, wenn zusätzlich der Wasserstoffverwerter *Methanobacterium bryantii* anwesend war, gleichzeitig lagen die Konzentrationen ausgeschiedener Aminosäuren deutlich niedriger. Die den Aminosäure- und den Proteinabbau fördernde Wirkung niedriger Wasserstoffpartialdrücke wurde auch von anderen Autoren beobachtet (Nagase u. Matsuo, 1982; Nanninga u. Gottschal, 1985; Wildenauer u. Winter, 1986; Ollivier et al., 1986). Der Effekt läßt sich mit der Freisetzung von Wasserstoff bei der Aminosäurevergärung erklären, die, analog anderen wasserstofffreisetzenden Reaktionen, mit steigendem Wasserstoffpartialdruck energetisch zunehmend ungünstiger verläuft (Thauer et al., 1977; Schoberth, 1980; Nagase u. Matsuo, 1982; Sahm, 1984; Nanninga u. Gottschal, 1985).

Regulation der proteolytischen Aktivität. Stamm AP 11, der dominante proteolytische Organismus der gelatineumsetzenden Mischkultur, erwies sich als proteolytischer Spezialist, dessen proteolytische Aktivität nicht durch Kohlenhydrate, Aminosäuren oder andere Substrate reprimierbar war. Die proteolytische Aktivität wurde jedoch durch die Wachstumsrate beeinflußt, was im Chemostaten mit der Mischkultur bei verschiedenen Durchflußraten nachgewiesen werden konnte. Der Anstieg der spezifischen Enzymaktivität mit abnehmender Durchflußrate ist sowohl für Exoproteinasen (Wouters u. Buysman, 1977; Whooley et al., 1983; Frankena et al., 1985; Allison u. McFarlane, 1990) als auch für zahlreiche andere katabolische Enzyme (Kotzé u. Kistner, 1974; Wouters u. Buysman, 1977; Matin, 1981) beschrieben worden. Als Effektoren der Regulation der Exoproteinasebildung sind sowohl stickstoffhaltige Verbindungen wie Aminosäuren und Ammonium (Wouters u. Buysman, 1977) als auch Metaboliten des Energiestoffwechsels (Whooley et al., 1983; Allison u. McFarlane, 1990) diskutiert worden,

doch wurde die Identität der Effektoren in den zitierten Arbeiten nicht geklärt. Bei der niedrigsten untersuchten Durchflußrate fiel die spezifische proteolytische Aktivität des Stammes AP 11 gegenüber dem Maximum leicht ab. Dies ist mit dem bei niedrigen Wachstumsraten unter Nährstofflimitierung erhöhten Anteil des Erhaltungsstoffwechsels am Energiehaushalt zu erklären (Russell u. Baldwin, 1979b; Pirt, 1982; Stouthamer u. van Verseveld, 1985), der auch zu einem geringfügigen Rückgang der Zellausbeute und des Proteinabbaugrades führte. Im Gegensatz zum Isolat AP 11 wurde die proteolytische Aktivität der mit einem Gelatine/Glucose-Mischsubstrat angereicherten Mischkultur in statischen Ansätzen während der exponentiellen Wachstumsphase und in kontinuierlicher Kultur bei hohen Durchflußraten vollständig oder weitgehend gehemmt. Dieses Verhalten ist für mixotrophe Bakterien mit proteolytischer Aktivität mehrfach beschrieben worden, so z.B. für *Pseudomonas aeruginosa* (Whooley et al., 1983), *Bacillus licheniformis* (Frankena et al., 1985) und *Clostridium sporogenes* (Allison u. MacFarlane, 1990). Sowohl für *Pseudomonas aeruginosa* als auch für *Clostridium sporogenes* wird von den Autoren angenommen, daß Zwischenprodukte des Energiemetabolismus als Effektoren der Regulation der Proteinasesynthese wirken. Allison u. McFarlane (1990) konnten zeigen, daß die Hemmung der Proteinasebildung in *C. sporogenes* durch cAMP nicht aufgehoben wird. ATP, ADP und erhöhte Substrat (Glucose)-Konzentrationen führten zur Hemmung der proteolytischen Aktivität dieses Bakteriums. Zur Regulation der proteolytischen Aktivität der dominanten proteolytischen Art der ein Glucose/Gelatine-Mischsubstrat abbauenden Mischkultur, *Streptococcus bovis,* liegen keine Untersuchungen vor. Für *Streptococcus cremoris* wurde eine Hemmung der Proteinasebildung durch Aminosäuren und Peptide nachgewiesen (Exterkate, 1985).

Charakterisierung des dominanten proteinverwertenden Bakteriums der gelatineverwertenden Mischkultur (Stamm AP 11). Stamm AP 11 konnte als dominanter Organismus aus der mit Gelatine angereicherten Mischkultur isoliert werden. Der Organismus wuchs mit Gelatine als einziger Kohlenstoffquelle.

Die Untersuchung des Umsatzes verschiedener Proteine und Peptone zeigte die höchsten Produktkonzentrationen bei Kollagen und Kollagenderivaten (Gelatine, Pepton aus Gelatine). Die Fähigkeit des Stammes AP 11, in Wasser unlösliches Kollagen vollständig zu wasserlöslichen Produkten zu hydrolysieren, beweist, daß das Bakterium eine oder mehrere Kollagenasen bildet. Sowohl Kollagenasen (Mandl, 1961; Seifter u. Harper, 1971; Peterkovsky, 1982) als auch Gelatinasen (Harris u. Krane, 1972; Sopata u. Dancewicz, 1974) werden als Metallproteinasen beschrieben. Auch AP 11 bewirkte die Gelatinehydrolyse durch Enzyme, deren Eigenschaften (Aktivitätssteigerung durch zweiwertige Metallionen, Hemmung durch EDTA, Proteolyseoptimum im pH-Neutralbereich) zur Einordnung in die Gruppe der Metallproteinasen führt (Ward, 1983).

Die Aminosäuresequenz von Kollagen und Gelatine ist detailliert untersucht worden. Sie setzt sich vor allem aus hoch repetitiven Trimeren der Aminosäurefolge Gly-Pro-X zusammen, wobei X verschiedene Aminosäuren symbolisiert und Hydroxyprolin nicht mit dem Carboxylende des Glycins verknüpft ist (Eastoe u. Leach, 1977). Kollagenasen und Gelatinasen hydrolysieren das Substrat am aminoterminalen Ende des Glycins (Seifter u. Harper, 1971). Dabei werden durch die Kollagenaseaktivität Peptide, aber keine Aminosäuren frei (Mandl, 1961). Dieser Befund konnte für die proteolytische Aktivität des Stammes AP 11 durch Inhibitorversuche bestätigt werden. Auch Chen et al. (1987) beschreiben, daß mikrobielle Proteinasen im Pansen ausschließlich Peptide freisetzen, die dann direkt von Pansenbakterien aufgenommen werden. Bezüglich der Peptidverwertung können die Bakterien durch eine ausgeprägte Spezifität gekennzeichnet sein. So beschrieben Chen u. Russell (1988) eine *Peptostreptococcus*-Art aus dem Pansen, die Peptide aus Trypticase, nicht jedoch aus einem Gelatinehydrolysat verwertete. Stamm AP 11 konnte weder die ihm angebotenen Oligopeptide, darunter die Tripeptide Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Hyp und Gly-Ala-Hyp, noch das $(Gly\text{-}Pro\text{-}Ala)_n$-Polymer verwerten. Da das Bakterium auch zur Verwertung einzelner Aminosäuren oder eines Gemisches der in Gelatine vorkommenden Aminosäuren nicht

in der Lage war, müssen entweder als Substrate die auf dem Markt nicht erhältlichen Hexapeptide der Kollagen- und Gelatinesequenz vermutet werden, oder es muß das Fehlen essentieller Aminosäuren beim Einsatz der definierten Peptide angenommen werden.

Verschiedene Autoren halten die Aufnahme von Peptiden gegenüber der Aminosäureaufnahme für physiologisch vorteilhaft, da beim Transport von Peptiden die für den Transport eines Aminosäuremoleküls benötigte Energie vermutlich geringer ist (Payne, 1980; Chen u. Russell, 1988). Auch ökologisch erscheint die Aufnahme von Peptiden sinnvoll, da das Substrat so möglichst frühzeitig der Verwertung durch konkurrierende Bakterien entzogen wird. Die hohen Gelatineumsatzraten des Stammes AP 11 (9,3 $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$, bezogen auf Zelltrockenmasse) zeigen, daß der Transport des Substrates sehr schnell erfolgt. Auch andere Autoren berichten, daß die Peptidumsatzraten der von ihnen untersuchten Mischkulturen aus dem Pansen (Prins et al., 1979; Chen et al., 1987), *Peptostreptococcus*-Stämme (Chen u. Russell, 1988) und *Fusobacterium*-Stämme (Gharbia u. Shah, 1989) deutlich über den Umsatzraten von Aminosäuregemischen oder einzelner Aminosäuren liegen.

Durch eine Bilanzierung des Aminosäureumsatzes konnte gezeigt werden, daß AP 11 aus den aufgenommenen Peptiden nur die Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure, Arginin, Asparaginsäure, Serin und Threonin verwertet. Die nicht umgesetzten Aminosäuren wurden wieder ausgeschieden. Hydroxyprolin wurde zum Prolin reduziert. AP 11 verhält sich damit anders, als *Clostridium proteolyticum*, ein ansonsten sehr ähnliches Bakterium, das jedoch alle aus Gelatine freigesetzten Aminosäuren weitgehend verwertet (Jain u. Zeikus, 1988). Ähnlich verhält sich dagegen *Clostridium collagenovorans*, das beim Wachstum mit dem Substrat Gelatine Prolin nicht verwertet (Jain u. Zeikus, 1988) und vermutlich Hydroxyprolin zumindest teilweise zum Prolin umsetzt (Jain u. Zeikus, 1989). Versuche mit einer definierten Mischkultur (Kap. 3.6.3) haben allerdings gezeigt, daß das Spektrum der verwerteten Aminosäuren durch Synergismen deutlich erweitert werden kann. Die Aminosäuren Valin,

Isoleucin und Leucin, die als Wasserstoffdonatoren bei Stickland-Reaktionen bekannt sind (Gottschalk, 1986), wurden beim Gelatineumsatz durch eine Mischkultur der Stämme AP 11 und AP 23 in Anwesenheit des wasserstoffverwertenden *Methanobacterium bryantii* nicht ins Medium ausgeschieden, während sie in Abwesenheit des Methanbakteriums im Kulturüberstand nachweisbar waren. Ähnliche synergistische Effekte sind von Wallace (1985) für den Proteinumsatz durch Pansenbakterien und durch Gharbia et al. (1989) für den Peptidumsatz durch *Fusobacterium* sp. und *Porphyromonas gingivalis* beschrieben worden.

Zur systematischen Einordnung des Stammes AP 11 wurden eine große Zahl morphologischer, cytologischer und physiologischer Charakteristika ermittelt. Auf Grund des strikt anaeroben Stoffwechsels, der Zellform, des Gram-Färbungsverhaltens und des Fehlens von Sporen ist AP 11 nach Holdeman et al. (1984) in die Familie *Bacteroidaceae* einzuordnen. Nach den von Shah u. Collins (1983, 1989) erarbeiteten Kriterien gehört AP 11 jedoch nicht zur Gattung *Bacteroides*, da die Autoren fordern, daß *Bacteroides*-Arten Saccharose verwerten können und nur schwach proteolytisch aktiv sind. Der GC-Gehalt der DNA soll 39-48 mol-% betragen. Auch die Zuordnung zu den anderen zur Familie gehörenden Gattungen ist nicht möglich (Holdeman et al., 1984; weitere Zitatstellen s. Shah u. Collins, 1989). Stamm AP 11 ist somit eine Art einer bisher nicht beschriebenen Gattung der Familie *Bacteroidaceae*. Cytologisch ist AP 11 den ehemaligen *Bacteroides*-Arten *Anaerorhabdus furcosus* (Shah u. Collins, 1986) und *Sebaldella termitidis* (Collins u. Shah, 1986) sehr ähnlich, vor allem bezüglich der zellulären Fettsäuren und des GC-Gehaltes der DNA. Physiologisch sind einige proteolytische *Bacteroides*-Arten dem Stamm AP 11 sehr ähnlich, z. B. *Bacteroides nodosus* (Holdeman et al., 1984). Die physiologische Ähnlichkeit mit den Arten *Clostridium collagenovorans* und *Clostridium proteolyticum* (Jain u. Zeikus, 1988) ist so ausgeprägt, daß von einer analogen phylogenetischen Entwicklung der verglichenen Arten gesprochen werden kann. Beide *Clostridium*-Arten sind proteolytische Spezialisten, die Kollagen und Kollagenderivate mit

hohen Raten umsetzen, nicht aber die von den Autoren eingesetzten Oligopeptide.

Charakterisierung des dominanten proteinverwertenden Bakteriums der gelatine- und glucoseverwertenden Mischkultur (*Streptococcus bovis* Stamm BG61). Streptococcus bovis konnte als dominanter Organismus aus der Mischkultur isoliert werden, die ein Gelatine/Glucose-Mischsubstrat im Chemostaten umsetzte. *S. bovis* gilt als Pansenbakterium (Hungate, 1966), die Art kommt jedoch auch im Darm verschiedener Säugetiere einschließlich des Menschen vor (Hardie, 1986). Im Pansen spielt *S. bovis* zahlenmäßig eine untergeordnete Rolle, eine starke Vermehrung kann jedoch bei Verfütterung leicht verwertbarer Kohlenhydrate unter Milchsäurebildung und deutlichem Absinken des pH-Wertes erfolgen (Hungate, 1966). Im untersuchten Chemostaten war die Produktbildung abhängig von der Durchflußrate. Nur bei Durchflußraten oberhalb von 0,5 h^{-1} trat Milchsäure als Gärungsprodukt auf, gleichzeitig sank bei der höchsten untersuchten Durchflußrate (0,943 h^{-1}) die Bedeutung von Essigsäure und Ethanol als Gärungsprodukt. Für den Glucoseumsatz durch *S. bovis* ist der Produktwechsel von einem Essigsäure/Ethanol-Gemisch zur Milchsäure mit steigender Durchflußrate im Chemostaten auch von Russel u. Baldwin (1979 b) beschrieben worden. Der Gärungstyp-Wechsel wird erklärt mit der geringen Energieausbeute der Milchsäuregärung im Vergleich zur Essigsäuregärung (max. 2 Mol ATP/Mol Glucose bei der Milchsäuregärung, bis zu 4 Mol ATP/Mol Glucose bei der Essigsäuregärung). Der verzweigte Glucose-Abbauweg von *S. bovis* ermöglicht dem Bakterium die Anpassung des Katabolismus an die Wachstumsbedingungen. Bei niedriger Durchflußrate wird die Reaktion mit hoher thermodynamischer Effizienz (Essigsäuregärung) durchgeführt, bei hohen Durchflußraten wird ein Reaktionsweg mit geringer thermodynamischer Effizienz (Milchsäuregärung) bestritten, der aber einen hohen metabolischen Fluß zuläßt (Thauer et al., 1977, Cohen, 1982). Der Vergleich der Verwertung verschiedener Kohlenhydrate (Russell u. Baldwin, 1978; Russell et al., 1981) zeigte, daß Glucose das bevorzugte Substrat von *S. bovis* ist. Die Glucoseverwertung wurde durch andere Kohlenhydrate nicht

gehemmt, beim Wachstum mit Glucose wurde die kürzeste Generationszeit gemessen. Dagegen wurde die Verwertung anderer Kohlenhydrate (Maltose, Cellobiose) durch Glucose gehemmt. Die Autoren sahen deutliche Hinweise für eine Katabolit-Repression der Verwertung dieser Kohlenhydrate (Russel u. Baldwin, 1978). Russell u. Robinson (1984) wiesen nach, daß *S. bovis* beim Wachstum mit Glucose nicht auf Aminosäuren angewiesen ist, allgemein gelten *Streptococcus*-Arten bezüglich der Nährmedienzusammensetzung jedoch als anspruchsvoll (Hardie, 1986). *S. bovis* Stamm BG 61 konnte als Reinkultur nur in Anwesenheit von Fermenterflüssigkeit (aus dem Chemostaten) und Hefeextrakt kultiviert werden.

In dem mit einem Gelatine/Glucose-Mischsubstrat betriebenen Chemostaten konnte *S. bovis* bei einer Durchflußrate von 0,146 h^{-1} nicht nur für den Glucoseumsatz, sondern auch für den Gelatineabbau verantwortlich gemacht werden, da es bei der Kultivierung der Mischkultur in Gelatine-Nährböden zahlenmäßig eindeutig dominant war. Russell et al. (1981) stellten fest, daß *S. bovis* in Anwesenheit von Glucose Casein nicht nur als Stickstoffquelle, sondern auch als Energiequelle verwertet. Sie schlossen aus Isolationen proteinverwertender Pansenbakterien, daß *S. bovis* im Pansen eine für den mikrobiellen Proteinabbau bedeutende Rolle spielt. Dieser Befund wurde von Hazlewood et al. (1983) bestätigt, die eine weitgehende Hydrolyse von Casein und Fraktion 1-Protein durch *S. bovis* feststellen konnten. Chen et al. (1987) wiesen nach, daß *S. bovis* in Anwesenheit von Glucose Peptide als Stickstoffquelle verwertete. Zum Umsatz von Gelatine durch *S. bovis* sind keine Untersuchungen veröffentlicht worden, doch wird Gelatine im Pansen schnell hydrolysiert (Hungate, 1966). *S. bovis* zeigte als Reinkultur eine nur sehr schwach ausgeprägte Fähigkeit zur Verwertung von Gelatine, auch gegenüber dem Substrat Casein entwickelte die Art nur eine geringe proteolytische Aktivität (Wallace, 1985). Da *S. bovis* im Pansen eine bedeutende Rolle bei der Proteinumsetzung gegeben wird (Russell et al., 1981; Hazlewood et al., 1983), muß diese Art synergistisch mit anderen Bakterien zusammenwirken. Der Nachweis gelang Wallace (1985) durch Co-Kultivierung von *S. bovis* mit anderen proteo

lytischen Pansenbakterien in einer Glucose/Casein-Nährlösung. Diese Untersuchung zeigte z.B., daß die Co-Kultivierung der nur schwach proteolytischen Arten *S. bovis* und *Selenomonas ruminantium* zu einem gegenüber den Reinkulturen deutlich beschleunigten Wachstum führte. Der Autor konnte nachweisen, daß synergistische Effekte bezüglich der Proteolyse durch Pansenbakterien sowohl auf Nährstoffbildung durch die beteiligten Bakterien als auch auf eine den Proteinabbau fördernde gegenseitige oder einseitige Ergänzung der proteolytischen Aktivität zurückzuführen war.

Konkurrenz um die Kohlenstoffquellen. Mit dem Isolat AP 11 und *S. bovis* Stamm BG 61 sind aus Chemostaten, die mit Gelatine bzw. mit einem Gelatine/Glucose-Mischsubstrat betrieben wurden, zwei verschiedene Bakterientypen isoliert worden. AP 11 ist ein hoch spezialisierter, strikt anaerober Verwerter von Kollagen und Kollagenderivaten. Der Stamm setzt diese Substrate mit hohen Raten und Abbaugraden um, die Verwertung ist durch Kohlenhydrate, Aminosäuren oder andere Substrate nicht hemmbar. Demgegenüber ist *S. bovis* ein leistungsfähiger mixotropher Kohlenhydrat-Verwerter, dessen proteolytische Aktivität in Anwesenheit von Glucose während der logarithmischen Wachstumsphase in statischer Kultur und bei hohen Durchflußraten in kontinuierlicher Kultur gehemmt wird. Auf AP 11 und *S. bovis* kann die Unterscheidung zwischen einem "Spezialisten" und einem "Generalisten" (Gottschal, 1986) übertragen werden. Für die Konkurrenz zweier Bakterien um zwei Substrate sind mathematische Modelle entwickelt worden, die auf einer Erweiterung des Wachstumsmodelles nach Monod beruhen (Taylor u. Williams, 1975; Yoon et al., 1977; Gottschal u. Thingstad, 1982). Die Modelle machen deutlich, daß im Gegensatz zur Konkurrenz um ein Substrat beim Wettbewerb um zwei Substrate neben den k_s- und v_{max}-Werten für beide Substrate auch die Zellerträge der konkurrierenden Organismen die Populationszusammensetzung beeinflussen. Das Modell von Gottschal u. Thingstad (1982) beschreibt die Konkurrenz eines mixotrophen und eines autotrophen bzw. eines mixotrophen und eines heterotrophen Bakteriums um die Substrate Essigsäure und Thiosulfat. Laanbroek et al. (1979) und Nanninga et al. (1986)

beobachteten vergleichbare Zusammenhänge bei der Konkurrenz von Spezialisten und Generalisten um Aminosäuren in An- und Abwesenheit von Kohlenhydraten. Gottschal (1985, 1986) übertrug daher das Modell auf die allgemeine Konkurrenz zwischen einem Generalisten und einem Spezialisten um zwei Substrate. Aus dem Modell läßt sich ableiten, daß die Frage, ob bei der Umsetzung eines aus 2 Kohlenstoff- und Energiequellen zusammengesetzten Mischsubstrates ein Generalist dominiert oder ob ein Generalist und ein Spezialist koexistieren, von der Durchflußrate, dem Verhältnis der Substratkonzentrationen und den Wachstumsparametern der konkurrierenden Bakterien entschieden wird (Gottschal u. Thingstad, 1982; Darstellung des Modelles im Anhang). Im Chemostaten, der mit einem Gelatine/Glucose-Mischsubstrat betrieben wird, wird nach diesem Modell der Anteil des proteolytischen Spezialisten (AP 11) an der Mischkultur durch eine erhöhte Glucoseausgangskonzentration bzw. eine verringerte Gelatineausgangskonzentration und durch eine erhöhte Durchflußrate reduziert, auch wenn der Spezialist bezüglich der Wachstumsparameter für die Gelatineverwertung dem Generalisten überlegen ist. Neben den untersuchten Kultivierungsbedingungen im Chemostaten, unter denen Stamm AP 11 oder *Streptococcus bovis* dominierten, sind also auch Bedingungen einstellbar, unter denen eine Koexistenz beider Arten zu erwarten ist (verringerte Glucosekonzentration oder erhöhte Gelatinekonzentration, niedrigere Durchflußrate).

Die Versuchsergebnisse zur Konkurrenz acidogener Bakterien um die Substrate Gelatine und Glucose machen eine Änderung der von Breure et al. (1986 b) entwickelten Vorstellung von der Umsetzung eines reinen Proteinsubstrates durch bakterielle Mischkulturen notwendig. Die Autoren betrieben einen Chemostaten mit einem Gelatinesubstrat (5 $g \cdot l^{-1}$) bei pH 7 und einer Durchflußrate von 0,2 h^{-1}. Der durch die proteolytische Mischpopulation erreichte Abbaugrad lag bei über 80 %. Die Umstellung auf ein Substrat, das zusätzlich 10 $g \cdot l^{-1}$ Glucose enthielt, führte zu einem drastische Absinken des Proteinabbaugrades, der aber erst nach einer Dauer von etwa 40 Verweilzeiten mit etwa 20 % sein Minimum erreichte (Breure et al., 1986 b). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit

unter ähnlichen Bedingungen bestätigt werden. In einem weiteren Experiment hatten Breure et al. (1986 a) keinen hemmenden Einfluß von Glucose (2 $g \cdot l^{-1}$) auf den Abbau von Gelatine (7 $g \cdot l^{-1}$) im Chemostaten bei Durchflußraten von 0,12 h^{-1} und 0,20 h^{-1} beobachten können. Die Autoren schlossen aus ihren Experimenten, daß der Umsatz von Gelatine als alleiniger Kohlenstoffquelle durch mixotrophe Bakterien bewirkt wird, die einer Katabolitrepression durch Kohlenhydrate unterliegen. Es wurde angenommen, daß die Ausprägung dieser Repression mit steigender Kohlenhydrat-Konzentration zunimmt. Wesentlich wahrscheinlicher ist, daß die deutliche Verringerung des Gelatineabbaugrades nach Zusatz der Glucose (Breure et al., 1986 b) auch in den Chemostaten dieser Autoren durch einen Populationswechsel bewirkt wurde.

Betriebsstrategie für die anaerobe Behandlung protein- und kohlenhydrathaltiger Abwässer. Zur Entwicklung des anaeroben Zweistufen-Verfahrens trug neben verfahrestechnischen Überlegungen (Kap. 1) die Auffassung bei, daß hydrolytische und acidogene Bakterien einerseits und acetogene und methanogene Kulturen andererseits durch unterschiedliche physiologische Optima, vor allem bezüglich des pH-Wertes, gekennzeichnet sind. Dieser Auffassung lagen Untersuchungen zur Vergärung von Kohlenhydraten zugrunde (Ghosh et al., 1975; Ghosh u. Klass, 1977; Cohen et al., 1980; Zoetemeyer et al., 1981). Durch systematische Untersuchungen konnten Breure u. van Andel (1984) und Breure et al. (1986 a,b) nachweisen, daß der Proteinabbau in Versäuerungsreaktoren durch Kohlenhydrate drastisch gehemmt werden kann. Die Autoren schlugen daher die Anwendung eines dreistufigen Prozesses vor. In der ersten Stufe sollte die Kohlenhydratumsetzung, in der zweiten Stufe die Proteinumsetzung stattfinden. Die dritte Stufe, in der Acetogenese und Methanogenese ablaufen sollten, entsprach der zweiten Stufe des klassischen Zweistufenverfahrens. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, daß ein dreistufiges Verfahren nicht notwendig ist. Stattdessen wird ein zweistufiger Prozeß vorgeschlagen, der sich vom klassischen Zweistufenverfahren durch die Verlagerung der Proteolyse von der ersten Stufe in die zweite Stufe unterscheidet. Ein

solcher Prozeß hat die folgenden Vorteile:

1. Proteolytische, acetogene und methanogene Kulturen haben ihr pH-Optimum bei neutralen pH-Werten (Breure und Van Andel, 1984; Mah u. Smith, 1981; Boone u. Xun, 1987; Kap. 3 u. 4). Dagegen liegt das pH-Optimum für den Kohlenhydratumsatz im Bereich niedrigerer pH-Werte (Zoetemeyer, 1982).

2. Die Methanbildung ist ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt der anaeroben Umsetzung organischer Substrate (Andrews u. Pearson, 1965; Ghosh et al., 1975; Noike et al., 1985) Die aus diesem Grund notwendigen relativ langen Flüssigkeitsverweilzeiten im Methanreaktor können zu einer deutlich erhöhten proteolytischen Aktivität führen.

3. Da Kohlenhydrate in der ersten Stufe nahezu vollständig abgebaut werden, wird eine Katabolitrepression der Proteinverwertung in der zweiten Stufe vermieden. Zudem kann bei Abwesenheit von Kohlenhydraten mit der Anreicherung proteolytischer Spezialisten gerechnet werden, deren proteolytische Aktivität auch im Fall der Zufuhr nicht vergorener Kohlenhydrate in den Methanreaktor nicht gehemmt wird. Das kommt besonders in Reaktoren mit Biomasserückhaltung zum Tragen, da die Spezialisten hier nicht kurzfristig von Generalisten verdrängt werden können. Die Anreicherung proteolytischer Spezialisten durch einen hohen Proteingehalt und eine niedrige Kohlenhydratkonzentration des Zulaufes der zweiten Stufe bzw. durch eine relativ niedrige Durchflußrate kann auch aus dem oben erläuterten Modell für die Konkurrenz proteolytischer Spezialisten und Generalisten geschlossen werden.

4. In der 2. Stufe ist aufgrund der Anwesenheit methanogener und sulfidogener Bakterien der H_2-Partialdruck niedrig, so daß eine Hemmung des Wachstums proteolytischer Bakterien nicht auftritt

Die Versäuerungsstufe kann nach den Ergebnissen der Untersuchung der mit Industrieabwässern betriebenen Anlagen mit einer hohen CSB-Raumbelastung betrieben werden. Die Bildung von Milchsäure sollte jedoch möglichst vermieden werden, da dieses Zwischenprodukt in der zweiten Stufe zur Akkumulation der nur langsam abbaubaren und zudem toxisch wirkenden Propionsäure führen kann (Cohen, 1982). Die CSB-Raumbelastung der zweiten Stufe wird auch bei leicht verwertbaren Proteinen und einem effizienten System zur Biomasserückhaltung deutlich unter der Belastung der ersten Stufe liegen, da in ihr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Methanbildung aus Essigsäure abläuft.

Wegen der großen Vorteile anaerober Techniken zur Behandlung organisch hochbelasteter Abwässer kann in Zukunft mit dem vermehrten Einsatz anaerober Verfahren gerechnet werden. Die systematischen Untersuchungen zum Proteinabbau haben deutlich gemacht, daß grundlegende mikrobiologische Untersuchungen zum anaeroben Proteinabbau für das Verständnis biotechnologischer Verfahren zur Abwasserreinigung essentiell sind. Sie stellen die Voraussetzung sowohl für gezielte Schritte zur Optimierung dieser Techniken als auch für einen stabilen Betrieb der Anlage dar.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl die Bedeutung anaerober Verfahren zur Abwasserreinigung in den letzten Jahren stark zugenommen hat, liegen bisher nur wenige Untersuchungen zum anaeroben mikrobiellen Abbau der Proteine bei der Behandlung proteinhaltiger Abwässer vor.

Durch die Untersuchung von Abwasserreaktoren, in denen proteinhaltige industrielle Abwässer anaerob behandelt wurden, konnte gezeigt werden, daß der Proteinabbau im Gegensatz zum Abbau der Kohlenhydrate häufig unvollständig verläuft. In 6 von 7 untersuchten Versäuerungsreaktoren zweistufiger Anlagen und in 1 von 2 einstufigen Anlagen lag der Proteinabbaugrad unterhalb von 50 %, während der Kohlenhydratabbaugrad mit einer Ausnahme mehr als 80 % betrug. Eine Voraussetzung für einen vollständigen Proteinabbau war ein neutraler pH-Wert. In Versäuerungsreaktoren, die bei pH-Werten unterhalb von 5 betrieben wurden, fand ein signifikanter Proteinabbau nicht statt. Da das pH-Optimum der Proteinaseaktivität von Mischkulturen aus Reaktoren, die bei niedrigen pH-Werten betrieben wurden, im Neutralbereich lag, konnte geschlossen werden, daß eine Adaptation der anaeroben Mischkulturen bezüglich des Proteolyse-Optimums an niedrige pH-Werte nicht erfolgte.

Neben dem pH-Wert beeinflußten Kohlenhydrate den Proteinabbau deutlich. Kohlenhydrate waren wesentliche Bestandteile der untersuchten Industrieabwässer, ihr CSB-Anteil betrug bis zu 72 %. Der Vergleich der Umsetzung von Gelatine in An- und Abwesenheit von Glucose in Chemostaten, die als Versäuerungsreaktoren bei pH 7 betrieben wurden, zeigte, daß in Anwesenheit des Kohlenhydrates signifikant niedrigere Gelatineabbaugrade erreicht wurden. Während der Gelatineabbaugrad bei einer Durchflußrate von 0,31 h^{-1} beim Umsatz von Gelatine als einziger Kohlenstoffquelle 95 % betrug und eine Gelatineumsatzrate von 36,8 $g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$ erreicht wurde, lag der Abbaugrad in Anwesenheit von Glucose bei einer Durchflußrate von 0,28 h^{-1} nur bei 86 % und bei einer Durchflußrate von 0,38 h^{-1} nur noch bei 72 %. Die Gelatineumsatzrate erreichte maximal 28,1 $g \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$.

In Abwesenheit von Kohlenhydraten wurde Gelatine bei pH 7 im Modell-Versäuerungsreaktor durch eine anaerobe Mischkultur bei Durchflußraten bis zu 0,50 h^{-1} mit Umsatzraten von maximal 192 $g \cdot g^{-1} \cdot d^{-1}$ (bezogen auf bakterielle Proteinmasse) und Abbaugraden von 70 bis 99 % umgesetzt. Die Produkte des Umsatzes waren vorwiegend kurzkettige Carbonsäuren. Die proteolytische Aktivität der Versäuerungskultur stieg im Chemostaten mit abnehmender Durchflußrate stark an und erreichte bei D=0,036 h^{-1} den 47-fachen Wert der Gelatine-Umsatzrate.

Der Anteil der proteolytischen Bakterien der mit Gelatine als einziger Kohlenstoffquelle wachsenden Mischkultur lag bei einer Durchflußrate von 0,15 h^{-1} bei 87 %, der Anteil der glucoseverwertenden Bakterien bei nur 8 %. Der Gelatineumsatz dieser Mischkultur wurde durch Kohlenhydrate nicht gehemmt. Als dominanter proteolytischer Organismus konnte der strikt anaerobe, obligat proteolytische Stamm AP 11 isoliert werden. Das Bakterium setzte Gelatine bei einer Generationszeit von 2,7 h mit Umsatzraten von 9,3 $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ (bezogen auf Zelltrockenmasse) mit Metallproteinasen um. AP 11 verwertete aus der Gelatine nur die Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure, Arginin, Asparaginsäure, Serin und Threonin und bildete aus ihnen Essigsäure, CO_2 und H_2. Die übrigen Aminosäuren wurden wieder ins Medium ausgeschieden. Das Bakterium ist aufgrund seiner morphologischen, cytologischen und physiologischen Eigenschaften einer bisher nicht beschriebenen Gattung der Familie *Bacteroidaceae* zuzuordnen.

Im Chemostaten, der bei pH 7 und und einer Durchflußrate von 0,18 h^{-1} mit einem Gelatine/Glucose-Mischsubstrat betrieben wurde, reicherte sich eine acidogene Mischkultur an, die einen Anteil gelatineverwertender Zellen von 58 % und einen Anteil von 70 % glucoseverwertender Bakterien enthielt. Der Gelatineumsatz durch diese Mischkultur wurde durch Glucose bei hohen Wachstumsraten weitgehend gehemmt. Bei niedrigen Wachstumsraten im Chemostaten (Durchflußraten kleiner als 0,2 h^{-1}) wurden Gelatine und Glucose simultan verwertet, so daß Gela-

tineabbaugrade von über 90 % erreicht wurden. Als zahlenmäßig dominanter glycolytischer und proteolytischer Organismus konnte *Streptococcus bovis* BG 61 identifiziert werden, nur 6 % der gelatineverwertenden Isolate waren obligat proteolytisch.

Aus den Ergebnissen läßt sich als optimales Verfahren zur anaeroben Umsetzung von Industrieabwässern, die neben Proteinen auch Kohlenhydrate enthalten, ein zweistufiges Verfahren ableiten. In der ersten Stufe findet die Hydrolyse und Vergärung der Kohlenhydrate, in der zweiten Stufe die Hydrolyse und Vergärung der Proteine, die Acetogenese und die Methanogenese statt.

6. LITERATUR

Aivasidis A, Wandrey C, Hilla E (1989) Studies on reaction techniques concerning reactor design for the anaerobic degradation of complex substrates with the example of the methanation of effluents in the fermentation industry. Bioproc Engineering 4:63-74

Aivasidis A (1989) Ergebnisbericht über Versuche zur anaeroben Behandlung von Hefefabrikabwasser in Wirbelschichtreaktoren. Forschungszentrum Jülich

Allison C, MacFarlane, GT (1989) Protease productiopn by *Clostridium perfringens* in batch and continuous culture. Lett Appl Microbiol 9:45-48

Allison C, MacFarlane, GT (1990) Regulation of protease production in *Clostridium sporogenes*. Appl Environm Microbiol 56/11:3485-3490

Alves RA, Gleaves JT, Payne JW (1985) The role of outer membrane proteins in peptide uptake by *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 27:333-338

Andrews JF, Pearson EA (1965) Kinetics and characteristics of volatile acid production in anaerobic fermentation processes. Int J Air Wat Pollut 9:439-461

Angrick M, Rewicki D (1980) Die Maillard-Reaktion. Chemie in unserer Zeit 14/5:149-157

Atlas RM (1986) Applicability of general ecological principles to microbial ecology. In: Bacteria in nature, vol 2, Poindexter JS, Leadbetter ER (eds), Plenum Press, New York

Barker HA (1981) Amino acid degradation by anaerobic bacteria. Ann Rev Biochem 50:23-40

Bisswanger H (1979) Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Verlag Chemie, Weinheim

Blackburn TH (1968) Protease production by *Bacteroides amylophilus* strain H 18. J Gen Microbiol 53:27-36

Boone DR, Xun L (1987) Effects of pH, temperature, and nutrients on propionate degradation by a methanogenic enrichment culture. Appl Environm Microbiol 53/7:1589-1592

Breure AM, van Andel JG (1984) Hydrolysis and acidogenic fermentation of a protein, gelatin, in an anaerobic continuous culture. Appl Microbiol Biotechnol 20:40-45

Breure AM, van Andel JG, Burger-Wiersma T, Guijt J, Verkuijlen J (1985) Hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin under anaerobic conditions in a laboratory scale upflow reactor. Appl Microbiol Biotechnol 21:50-54

Breure AM, Beeftink HH, Verkuijlen J, van Andel JG (1986 a) Acidogenic fermentation of protein/carbohydrate mixtures by bacterial populations adapted to one of the substrates in anaerobic chemostat cultures. Appl Microbiol Biotechnol 23:245-249

Breure AM, Mooijman KA, van Andel JG (1986 b) Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. Appl Microbiol Biotechnol 24:426-431

Breure AM, van Andel JG (1987) Afbraakwegen in de anaerobe zuivering van koolhydraat-, vet-, en eiwithoudend afvalwater. Publikatie van het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Bilthoven

Burgeff H (1961) Mikrobiologie des Hochmoores. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Buswell AM, Neave SL (1930) Laboratory studies of sludge digestion. State of Illinois, Department of Registration and Education, bulletin no. 30, Urbana

Chen G, Strobel HJ, Russell JB, Sniffen CJ (1987) Effect of hydrophobicity on utilization of peptides by ruminal bacteria in vitro. Appl Environm Microbiol 53/9:2021-2025

Chen G, Russell JB (1988) Fermentation of peptides and amino acids by a monensin-sensitive ruminal peptostreptococcus. Appl Environm Microbiol 54/11:2742-2749

Cohen A (1982) Optimization of anaerobic digestion of soluble carbohydrate containing wastewaters by phase separation. Dis, U Amsterdam

Collins MD, Shah, HN (1986) Reclssification of *Bacteroides termitidis* Sebald (Holdeman and Moore) in a new genus *Sebaldella termitidis* comb. nov. Int J Syst Bact 36/2:349-350

Cotta MA, Hespell RB (1986) Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. Appl Environm Microbiol 52/1:51-58

D'Ans L, Lax E (1967) Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Springer Verlag, Berlin

Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM (1986) Data for biochemical research. Clarendon Press, Oxford

de Giori GS, de Valdez GF, de Ruiz Holdalgo AP, Oliver G (1985) Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria. J Dairy Sci 68:2160-2164

DEV (1988) Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg), VCH Verlagsgemeinschaft, Weinheim

Dolfing J (1988) Acetogenesis. In: Biology of anaerobic microorganisms, Zehnder AJB (ed), John Wiley & Sons, New York

Eastoe JE, Leach AA (1977) Chemical constitution of gelatin. In: The science and technology of gelatin, Ward AG, Courts A (eds), Academic Press, London

Erfle JD, Boila RJ, Teather RM, Mahadevan S, Sauer FD (1982) Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. J Dairy Sci 65:1457-1464

Exterkate FA (1985) A dual-directed control of cell wall proteinase production in *Streptococcus cremoris* AM 1: A possible mechanism of regulation during growth in milk. J Dairy Sci 68, 562-571

Evans CGT, Herbert D, Tempest DW (1970) The continuous cultivation of microorganisms. 2. Consruction of a chemostat. In: Methods in microbiology, vol 2, Norris JR, Ribbons DW (eds), Academic Press, London

Frankena J, van Verseveld, HW, Stouthamer AH (1985) A continuous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. Appl Microbiol Biotechnol 22:169-176

Gharbia SE, Shah HN (1989) The uptake of amino acids from a chemically defined medium by *Fusobacterium* species. Curr Microbiol 18:189-193

Ghosh S, Conrad JR, Klass DL (1975) Anaerobic acidogenesis of wastewater sludge. J Wat Pollut Control Fed 47/1:30-45

Ghosh S, Klass DL (1977) Two-phase anaerobic digestion. Proc sympoium Clean fuels from biomass and wastes, Orlando (Florida)

Gibson SAW, MacFarlane GT (1988) Characterization of proteases formed by *Bacteroides fragilis*. J Gen Microbiol 134:2231-2240

Gottschal JC, Thingstad TF (1982) Mathematical description of competition between two and three bacterial species under dual substrate limitation in the chemostate: a comparison with experimental data. Biotechnol Bioeng 24:1403-1418

Gottschal JC (1985) Some reflections on microbial competitiveness among heterotrophic bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 51:473-494

Gottschal JC (1986) Mixed substrate utilization by mixed cultures. In: Bacteria in nature, vol 2, Poindexter JS, Leadbetter ER (eds), Plenum Press, New York

Gottschalk G (1986) Bacterial metabolism. Springer Verlag, New York

Gregersen T (1978) Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. Europ J Appl Microbiol Biotechnol 5:123-127

Hardie JM (1986) Genus *Streptococcus*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 2, Sneath PHA, Mair, NS, Sharpe ME, Holt JG (eds), Williams & Wilkins, Baltimore

Harris ED, Krane SM (1972) An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue cultures. Biochim Biophys Acta 258:566-576

Häusler J, Malcher J (1972) Unschädlichmachung der Abwässer durch bessere Ausnutzung des Rohstoffes bei der Kartoffelstärkeerzeugung. Die Stärke 24/7:229-235

Hazlewood HJ, Orpin CG, Greenwood Y, Black ME (1983) Isolation of proteolytic rumen bacteria by use of selective medium containing leaf fraction 1 protein. Appl Environm Microbiol 45/6:1780-1784

Herbert D, Phipps PJ, Strange RE (1971) Chemical analysis of microbial cells. In: Methods in Microbiology, Vol 5B, Norris JR, Ribbons DW (eds), Academic Press, London

Hermsdorf CL, Simmonds S (1980) Role of peptidases in utilization and transport of peptides by bacteria. In: Microorganisms and nitrogen sources, Payne JW (ed), John Wiley & Sons, Chichester

Holdeman LV, Cato ED, Moore WEC, eds (1977) Anaerobe laboratory manual, 4th ed, VPI Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University

Holdeman LV, Kelley RW, Moore WEC (1984) *Bacteroidaceae*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 1, Krieg NR, Holt JG (eds), Williams & Wilkins, Baltimore

Howell JA (1983) Mathematical models in microbiology: mathematical tool-kit. In: Mathematics in microbiology, Bazin M (ed), Academic Press, London

Hungate RE (1966) The rumen and its microbes. Academic Press, New York

Hungate RE (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology, Vol 3B, Norris JR, Ribbons DW (eds), Academic Press, London

Iannotti EL, Fischer JR (1984) Effects of ammonia, volatile acids, pH, and sodium on growth of bacteria isolated from a swinw manure digester. Proc 40th Gen Meeting Soc Industr Microbiol, Sarasota

Islam MA, Blanshard JMV (1973) Purification and properties of an extracellular proteolytic enzyme from *Bacillus cereus*. J Dairy Res 40:427-440

Jain MK, Zeikus JG (1988) Taxonomic distinction of two new protein specific, hydrolytic anaerobes: isolation and characterization of *Clostridium proteolyticum* sp. nov. and *Clostridium collagenovorans* sp. nov. System Appl Microbiol 10:134-141

Jain MK, Zeikus JG (1989) Bioconversion od gelatin to methane by a coculture of *Clostridium collagenovorans* and *Methanosarcina barkeri*. Appl Environm Microbiol 55/2:366-371

Keim P (1990) Wirbelschichtreaktoren für die anaerobe Abwasserreinigung mit porösem Sinterglas als Trägermaterial. Dis, U Bonn

Keusen HJ (1989) Chemische Charakterisierung und bakterienphysiologische Bedeutung von reduzierenden Schwefelverbindungen in flüssigen Rückständen der anaeroben Abwasserreinigung. Dis TH Aachen

Kistner A, Therion J, Kornelius JH, Hugo A (1979) Effect of pH on specific growth rates of rumen bacteria. Annales des recherches vétherinaires 10/2,3:268-270

Kleiner D (1991) Regulation des Stickstoff-Katabolismus bei Bakterien. Bioforum 14:60-63 u. 118-122

Kotzé JP, Kistner A (1974) Variations in enzyme activities of *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Ruminococcus albus* grown in continuous culture. Can J Microbiol 20:861-869

Laanbroek HJ, Smit AJ, Klein Nulend G, Veldkamp H (1979) Competition for L-glutamate between specialised and versatile *Clostridium* species. Arch Microbiol 120, 61-66

Laanbroek HJ, Geerlings HJ, Peijnenburg ACM, Siesling J (1983) Competition for L-lactate between *Desulfovibrio, Veillonella* and *Acetobacterium* species isolated from anaerobic intertidal sediments. Micobial Ecol 9: 341-354

Lang E, Lang H (1972) Spezifische Farbreaktion zum direkten Nachweis der Ameisensäure. Z Anal Chem 260: 8-10

Latham MJ, Wolin MJ (1978) Use of serum bottle technique to study interactions between strict anaerobes in mixed culture. In: Techniques for the study of mixed populations, Lovelock DW, Davies R (eds), Academic Press, London

Law BA (1980) Transport and utilization of proteins by bacteria. In: Microorganisms and nitrogen sources, Payne JW (ed), John Wiley & Sons, Chichester

Law BA, Kolstad J (1983) Proteolytic systems in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 49:225-245

Lettinga G, Hulshoff Pol LW, Koster IW, Wiegant WM De Zeeuw WJ Rinzema A, Grin PC, Roersma RE, Hobma SW (1984) High-rate anaerobic waste-water treatment using the UASB reactor under a wide range of temperature conditions. Biotechnol Genetic Engineering Rev, vol 2:253-284

MacFarlane GT, Allison C, Gibson GR (1988) Effect of pH on protease activities in the large intestine. Lett Appl Microbiol 7:161-164

Mah RA, Smith MR (1981) The methanogenic bacteria. In: The procaryotes, vol 1, Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (eds), Springer-Verlag, Berlin

Mahadevan S, Erfle JD, Sauer FD (1980) Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bacteroides amylophilus* protease and by rumen microorganisms. J Animal Sci 50/4: 723-728

Mandl I (1961) Collagenases and elastases. Adv Enzymol 23:163-264

Matin A (1981) Regulation of enzyme synthesis as studied in continuous culture. In: Continuous cultures of cells, vol 2, Calcott PH (ed), CRC Press, Boca Raton

McCarty PL (1964) Anaerobic waste treatment fundamentals, part 3: toxic materials and their control. Public works, November:91-94

McInerney MJ (1988) Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In: Biology of anaerobic microorganisms, Zehnder AJB (ed), John Wiley & Sons, New York

Merrick MJ (1988) Regulation of nitrogen assimilation in bacteria. In: The nitrogen and sulphur cycles, Cole JA, Ferguson SJ (eds), Cambridge University

Miller TL, Wolin MJ (1974) A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. Appl Microbiol 27/5:985-987

Morihara K (1974) Comparative specifity of microbial proteinases. Adv Enzymol 41:179-243

Nagase M, Matsuo T (1982) Interactions between amino-acid-degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. Biotechnol Bioeng 24:2227-2239

Nanninga HJ, Gottschal JC (1985) Amino acid fermentation and hydrogen transfer in mixed cultures. FEMS Microbiol Ecol 31:261-269

Nanninga HJ, Drent WJ, Gottschal JC (1986) Major differences between glutamate-fermenting species isolated from chemostat enrichments at different dilution rates. FEMS Microbiol Ecol 38: 321-329

Nanninga HJ, Gottschal JC (1986) Anaerobic purification of waste water from a potato-starch producing factory. Water Res 20/1:97-103

Noike T, Endo G, Chang J-E, Yaguchi J-I, Matsumoto J-I (1985) Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. Biotechnol Bioeng 27:1482-1489

Ollivier BM, Mah RA, Ferguson TJ, Boone DR, Garcia JL, Robinson R (1985) Emendation of the genus *Thermobacteroides*: *Thermobacteroides proteolyticus* sp. nov., a proteolytic acetogen from a methanogenic enrichment. Int J Syst Bact 35/4:425-428

Ollivier BM, Smiti N, Mah RA, Garcia J-L (1986) Thermophilic methanogenesis from gelatin by a mixed defined bacterial culture. Appl Microbiol Biotechnol 24:79-83

Payne JW (1980 a) Transport and utilization of peptides by bacteria. In: Microorganisms and nitrogen sources, Payne JW (ed), John Wiley & Sons, Chichester

Payne JW (1980 b) Energetics of peptide transport in bacteria. In: Microorganisms and nitrogen sources, Payne JW (ed), John Wiley & Sons, Chichester

Peterkofsky B (1982) Bacterial collagenase. Meth Enzymol 82:453-471

Pfeiffer W, Temper U, Steiner A, Carozzi A, von Mücke J (1986) Anaerobic waste water treatment-results of a literature review. Proc. Aquatech '86, Amsterdam

Pirt SJ (1975) Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford

Pirt SJ (1982) Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. Arch Microbiol 133: 300-302

Priest FG (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bact Rev 41/3:711-753

Prins RA, van Hal-van Gestel JC, Counotte GHM (1979) Degradation of amino acids and peptides by mixed rumen Micro-organisms. Z Tierphysiol Tierernährg Futtermittelkde 42:333-339

Russell JB, Baldwin RL (1978) Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. Appl Environm Microbiol 36/2:319-329

Russell JB, Baldwin RL (1979 b) Comparison of maintenance energy expenditures and growth yields among several rumen bacteria grown on continuous culture. Appl Environm Microbiol 37/3:537-543

Russell JB, Sharp WM, Baldwin RL (1979) The effect of pH on maximum bacterial growth rate and its possible role as a determinant of bacterial competition in the rumen. J Animal Sci 48/2:251-255

Russell JB, Bottje WG, Cotta, MA (1981) Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria: identifikation of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium. J Animal Sci 53/1:242-252

Russell JB, Robinson PH (1984) Compositions and characteristics of strains of *Streptococcus bovis*. J Dairy Sci 67:1525-1531

Sahm H (1984) Anaerobic wastewater treatment. Adv Biochem Eng/Biotechnol 29:83-115

Salmond CV, Kroll RG, Booth IR (1984) The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. J Gen Microbiol 130:2845-2850

Schoberth SM (1980) The microbiology of anaerobic digestion. In: Biomethane, production and uses, Turret-Wheatland, Rickmansworth

Seifter S, Harper E (1971) The collagenases. In: The enzymes, vol 3, 3 rd edition, Boyer PD (ed), Academic Press, New York

Seyfried C-F, Mudrack K, Kunst S, Saake M, Kröner H, Witt W (1985) Untersuchungen zur anaeroben Reinigung des Abwassers der Stärkeindustrie. Forschungsbericht BMFT-FB-T 85-026, Fachinformationszentrum, Karlsruhe

Shah HN, Collins MD (1983) Genus *Bacteroides*: a chemotaxonomical perspective. J Appl Bacteriol 55:403-416

Shah HN, Collins MD (1986) Reclassification of *Bacteroides furcosus* Veillon and Zuber (Hauduroy, Ehringer, Guillot and Magrou) in a new genus *Anaerorhabdus*, as *Anaerorhabdus furcosus* comb. nov. System Appl Microbiol 8:86-88

Shah HN, Collins MD (1989) Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. Int J Syst Bacteriol 39/1:85-87

Sleat R, Mah RA (1984) Quantitative method for colorimetric determination of formate in fermentation media. Appl Environm Microbiol 47/4:884-885

Smid EJ, Driessen AJM, Konings WN (1989) Mechanism and energetics od dipeptide transport in membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. J Bact 171/1:292-298

Sopata I, Dancewicz AM (1974) Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. Biochim Biophys Acta 370:510-523

Sparling R, Daniels L (1987) The specificity of growth inhibition of methanogenic bacteria by bromoethanesulfonate. Can J Microbiol 33:1132-1136

Stackebrandt E, Hippe H (1986) Transfer of *Bacteroides amylophilus* to a new genus *Ruminobacter* gen. nov., nom. rev. as *Ruminobacter amylophilus* comb. nov.. Syst Appl Microbiol 8:204-207

Stouthamer AH, van Verseveld HW (1985) Stoichiometry of microbial growth. In: Comprehensive Biotechnology, vol. 1, Moo-Young (ed), Pergamon Press, Elmsford, NY

Takahashi N, Schachtele CF (1990) Effect of pH on the growth and proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides intermedius*. J Dental Res 69/6:1266-1269

Taylor PA, Williams PJLeB (1975) Theoretical studies on the coexistence of competing species under continuous-flow conditions. Can J Microbiol 21:90-98

Temper U, Pfeiffer W, Bischofsberger W (1986) Stand und Entwicklungspotentiale der anaeroben Abwasserreinigung unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse in der Bundesrepublik Deutschland. Berichte aus Wassergütewirtschaft und Gesundheitsingenieurwesen, TU München

Tempest DW, Neijssel OM (1984) The status of Y_{ATP} and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. Ann Rev Microbiol 38:459-486

Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol Rev 41/1:100-180

Thauer RK, Fuchs G (1979) Methanogene Bakterien. Naturwissenschaften 66:89-94

Thomas TD, Pritchard GG (1987) Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. FEMS Microbiol Rev 46:245-268

Trösch W, Döhling T, Stephan E, Chmiel H (1983) Die mikrobielle Methangewinnung-Vergleich zwischen ein- und zweistufigen Verfahren mit gerührten Turmreaktoren. Chem Ing Tech 55/3: 236-237

van Boven A, Konings WN (1986) The uptake of peptides by microorganisms. Neth Milk Dairy J 40:117-127

van Steenbergen TJM, de Graaff J (1986) Proteolytic activity of black-pigmented *Bacteroides* strains. FEMS Microbiol Lett 33:219-222

Veldkamp H, van Gemerden H, Harder W, Laanbroek HJ (1984) Competition among bacteria: an overview. In: Current perspectives in microbial ecology, Klug MJ, Reddy, CA (eds), American Society for Microbiology, Washington DC

Vellinga SHJ, Hack PJFM, van der Vlugt, AJ (1986) New type of "high rate" anaerobic reactor. First experience on semi-technical scale with a revolutionary and high loaded anaerobic system. Proc. Aquatech '86, Amsterdam

Verstraete W, De Baere L, Rozzi A (1981) Phase separation in anaerobic digestion: motives and methods. Trib Cebedeau 453-454/34:367-375

Votruba J, Pazlarová J, Dvoráková M, Vanatalu K, Váchová L, Strnadová H, Chaloupka J (1987) External factors involved in the regulation of an extracellular proteinase sythesis in *Bacillus megaterium*. Appl Microbiol Biotechnol 26:373-377

Wallace RJ, Kopecny J (1983) Breakdown of diazotized proteins and synthetic substrates by rumen bacterial proteases. Appl Environm Microbiol 45/1:212-217

Wallace RJ (1985) Synergism between different species of proteolytic rumen bacteria. Current Microbiol 12:59-64

Wallace RJ, Broderick GA, Brammall ML (1987) Protein degradation by ruminal microorganisms from sheep fed dietary supplements of urea, casein, or albumin. Appl Environm Microbiol 53/4:751-753

Wallace RJ, McKain N (1989) Analysis of peptide metabolism by ruminal microorganisms. Appl Environm Microbiol 55/9:2372-2376

Ward OP (1983) Proteinases. In: Microbial enzymes and biotechnology, Fogarty WM (ed), Applied Science Publishers, London

Whooley MA, O'Callaghan JA, McLoughlin AJ (1983) Effect of substrate on the regulation of exoprotease production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. J Gen Microbiol 129:981-988

Widdel F (1988) Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. Appl Environm Microbiol 51/5:1056-1062

Wildenauer FX, Winter J (1985) Anaerobic digestion of high-strength acidic whey in a pH-controlled up-flow fixed film loop reactor. Appl Microbiol Biotechnol 22:367-372

Wildenauer FX, Winter J (1986) Fermentation of isoleucine and arginine by pure and syntrophic cultures of *Clostridium sporogenes*. FEMS Microbiol Ecol 38:373-379

Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS (1963) Formation of methane by bacterial extracts. J Biol Chem 238/8:2882-2886

Woolford MK (1984) The antimicrobial spectra of organic compounds with respect to their potential as hay preservatives. Grass Forage Sci 39:75-79

Wouters JTM, Buysman PJ (1977) Production of some exocellular enzymes by *Bacillus licheniformis* 749/C in chemostat cultures. FEMS Lett 1:109-112

Yoon H, Klinzing G, Blanch, HW (1977) Competition for mixed substrates by microbial populations. Biotechnol Bioeng 14:1193-1210

Young LY, McCarty PL (1981) Heat treatment of organic materials for increasing anaerobic biodegradability. In: Fuel gas production from biomass, vol 2, Wise DL (ed), CRC Press, Boca Raton

Zehnder AJB, Stumm W (1988) Geochemistry and biogeochemistry of anaerobic habitats. In: Biology of anaerobic microorganisms, Zehnder AJB (ed), John Wiley & Sons, New York

Zoetemeyer RJ, Matthijsen AJCM, van den Heuvel JC, Cohen A, Boelhouwer C (1981) Anaerobic acidification of glucose in an upflow reactor. Trib Cebedeau 455/34:443-450

Zoetemeyer RJ (1982) Acidogenesis of soluble carbohydrate-containing wastewaters. Dis U Amsterdam

7. ANHANG

Gottschal u. Thingstad (1982) entwickelten ein Modell für die Konkurrenz eines mixotrophen und eines autotrophen bzw. eines mixotrophen und eines heterotrophen Bakteriums um die Substrate Essigsäure und Thiosulfat. Gottschal (1985) übertrug das Modell auf die allgemeine Konkurrenz zwischen einem Generalisten und einem Spezialisten um zwei Substrate. Die Biomassekonzentrationen des Generalisten und des Spezialisten lassen sich berechnen nach:

$$X_G = Y_{aG} \cdot (1-\beta)^{-1} \cdot s_{ao}$$

und

$$X_S = Y_{bS} \cdot \left(s_{bo} - \frac{Y_{aG}}{Y_{bG}} \cdot \frac{\beta}{1-\beta}\right)$$

für

X_G : Zellmasse des Generalisten

X_S : Zellmasse des Spezialisten

Y_{aG} : Zellertrag des Generalisten durch Verwertung des nur von ihm umsetzbaren Substrates

Y_{bG} : Zellertrag des Generalisten durch Verwertung des gemeinsamen Substrates

Y_{bS} : Zellertrag des Spezialisten durch Verwertung des gemeinsamen Substrates

s_{ao} : Substrat-Zufuhrkonzentration des ausschließlich vom Generalisten umsetzbaren Substrates

s_{bo} : Substratkonzentration des gemeinsamen Substrates

$$\beta = \frac{(\mu_{max\ bG}/D) \cdot (k_{bS}/k_{bG})}{(\mu_{max\ bS}/D-1) + (k_{bS}/k_{bG})} \qquad (0 \leq \beta \leq 1)$$

für

$\mu_{max\ bG}$: maximale Wachstumsrate des Generalisten bei Verwertung des gemeinsamen Substrates

$\mu_{max\ bS}$: maximale Wachstumsrate des Spezialisten bei Verwertung des gemeinsamen Substrates

k_{bG} : ks-Wert des Generalisten für die Verwertung des gemeinsamen Substrates

k_{bS} : ks-Wert des Generalisten für die Verwertung des gemeinsamen Substrates

D : Durchflußrate des Chemostaten

Gottschal (1986) zog aus dem Modell die folgenden Schlüsse:

1. Der Wert von β wird bestimmt durch die Quotienten k_{bS}/k_{bG}, $\mu_{max\ bG}/D$ und $\mu_{max\ bS}/D$. Die Abhängigkeit des Wertes von β von der Durchflußrate ist in Abb. 7.1 dargestellt.

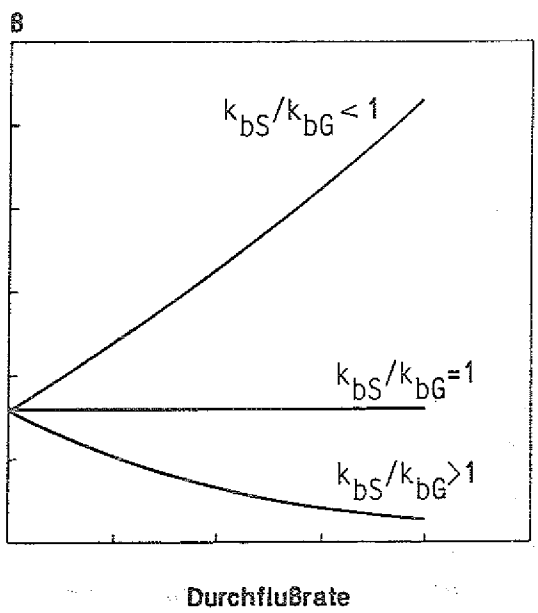


Abb. 7.1. Qualitativer Zusammenhang zwischen β und der Durchflußrate für verschiedene k_{bS}/k_{bG}-Verhältnisse (Nach Gottschal u. Thingstad, 1982; verändert)

2. Die Biomassekonzentrationen der konkurrierenden Organismen stehen in linearem Zusammenhang mit den eingesetzten Substratkonzentrationen (Abb. 7.2). Mit steigender Konzentration des nur vom mixotrophen Bakterium verwerteten

Substrates steigt auch seine Biomasse proportional an, die Biomassekonzentration des Spezialisten sinkt gleichzeitig ab.

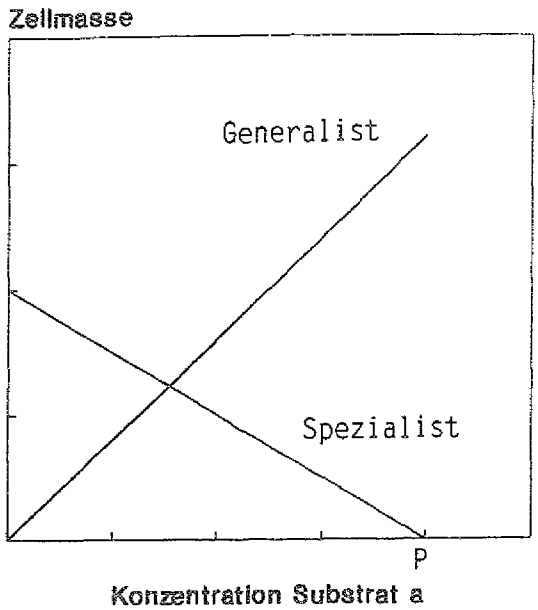


Abb. 7.2. Qualitativer Zusammenhang zwische der Zellmasse der konkurrierenden Bakterien und der Konzentration des nur vom Generalisten verwertbaren Substrates (Nach Gottschal u. Thingstad, 1982; verändert)

3. Ein Anstieg des Wertes von β führt zu einer Verschiebung des Punktes P in Abb. 7.2 nach links.
4. Je größer der Wert des Quotienten Y_{aG}/Y_{bG} ist, desto weiter links liegt der Punkt P auf der Abszisse der Abb. 7.2, desto niedriger ist also die Durchflußrate, bei der eine Verdrängung des Spezialisten durch den Generalisten erfolgt.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die großzügige Unterstützung der Arbeit, die stete Diskussionsbereitschaft und zahlreiche wertvolle Ratschläge.

Bei Herrn Prof. Dr. Ciriacy-Wantrup bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats zu dieser Dissertation.

Für die hilfreiche Betreuung der Arbeit, zahlreiche Diskussionen und die angenehme Zusammenarbeit danke ich Herrn Dr. Schoberth.

Mit engagierten Diskussionen und wichtigen Hinweisen hat Herr Dr. Neuß wesentlich zum Gelingen einiger Experimente beigetragen. Ich bedanke mich bei ihm sehr.

Für die tatkräftige und engagierte Unterstützung bei einigen Experimenten bedanke ich mich bei Frau Thiemann (Untersuchung industrieller Abwasserreinigungsanlagen), Frau Striegel (Analyse zellulärer Fettsäuren), Frau Krumbach (Aminosäureanalyse), Herrn Els (Rasterelektronenmikroskopie), Herrn Dr. Rullkötter (Auswertung von GC/MS-Analysen zellulärer Fettsäuren) und Frau Bellartz.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Institute für Biotechnologie, die durch ihre Hilfsbereitschaft das Gelingen der Arbeit unterstützt haben.

Für die Überlassung von bisher nicht publizierten Ergebnisberichten danke ich Herrn Dr. Aivasidis und Herrn Dr. Breure.

Den Industrieunternehmen, deren Abwasserreaktoren von mir analysiert wurden, bin ich für die Genehmigung der Untersuchung ihrer Reaktoren zu besonderem Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt auch der Siemens AG (Unternehmensbereich KWU, Offenbach/Main), die Teile dieser Arbeit durch finanzielle Mittel gefördert hat.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2634
Juni 1992
ISSN 0366-0885