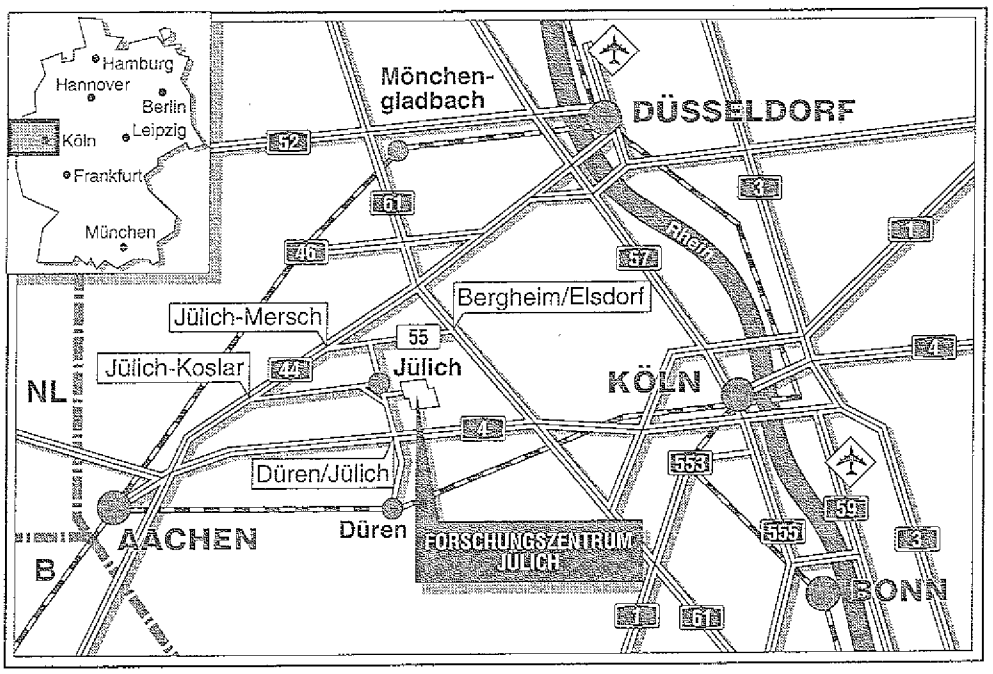
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Wachstum von Bakterienreinkulturen und von definierten Mischkulturen bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe unter besonderer Berücksichtigung der biomasse-spezifischen Nährstoffzufuhr

Wolfgang Tappe



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2677
ISSN 0366-0885
Institut für Biotechnologie Jül-2677
D 82 (Diss. RWTH Aachen)

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

Wachstum von Bakterienreinkulturen und von definierten Mischkulturen bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe unter besonderer Berücksichtigung der biomasse-spezifischen Nährstoffzufuhr

Wolfgang Tappe

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATV	Abwassertechnische Vereinigung
BSB_5	Biochemischer Sauerstoffbedarf, gemessen nach 5 Tagen
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
C	Kohlenstoff
cm	Zentimeter
D	Verdünnungsrate
D_b	Verdünnungsrate der Biomasse
D_{max}	maximale Verdünnungsrate
d	Tag
DEV	Deutsches Einheitsverfahren
disk	diskontinuierliche Substratzugabe
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
g	Fallbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
I.F.	Intermittent Feeding
IC	anorganischer Kohlenstoff
KBE	Koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
kont	kontininuierliche Substratzugabe
K_s	Sättigungskonstante (Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Wachstumsrate erreicht wird)
l	Liter
m	Koeffizient des Erhaltungsstoffwechsels maintenance coefficient
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µ	Wachstumsrate
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

μ_{max}	maximale Wachstumsrate
µMol	Mikromol
nm	Nanometer
nMol	Nanomol
O.D.	optische Dichte
P	Phosphor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PHB	Polyhydroxybuttersäure
POC	partikulärer organischer Kohlenstoff
ppm	part per million
R_{max}	Sauerstoffverbrauchsrate (Substratsättigung)
REM	Raster-Elektronenmikroskop
S	Substrat
s	Sekunde
sp	Spezies
S_R	steady-state Konzentration des Substrates im Reaktor
S_Z	Substratkonzentration im Zulauf
SZR	Substratzugaberate
ts	mittlere Verweilzeit der Biomasse
Tab	Tabelle
TC	Gesamtkohlenstoff
TRS	Trockenrückstand
TS	Trockensubstanz
UpM	Umdrehungen pro Minute
$\dot{V}_F$	Volumenstrom des Filtrats
$\dot{V}_K$	Volumenstrom der Rückführung
$\dot{V}_Z$	Zulaufvolumenstrom
$\dot{V}_a$	Volumenstrom des abgezogenen Überschußschlammes
V_r	Volumen des Reaktors
X	Biomassekonzentration
X_a	Biomassekonzentration im Ablauf
Y	Ertragskoeffizient
Y_M	theoretischer maximaler Ertragskoeffizient

1.0. Einleitung

1.1. Einführung und Problemstellung

Genaue Kenntnisse von biologischen und ökologischen Strukturen und Zusammenhängen komplexer Systeme sind immer besonders dann gefordert, wenn ein System aufgrund auftretender Störungen in seinem "Funktionieren" beeinträchtigt ist. Das "Funktionieren" einer biologischen Kläranlage beispielsweise beruht auf dem Zusammenwirken verschiedenster Mikroorganismen, die in der Summe ihrer Stoffwechselleistungen den gewünschten Reinigungseffekt bewirken.
Die Beeinträchtigung der von einem bestimmten Bakterientyp repräsentierten Stoffwechselleistung kann für das Gesamtsystem weitreichende Konsequenzen haben, wie folgende Beispiele zeigen:

- Eine vollständige Oxidation des Ammoniums zu Nitrat setzt das Zusammenwirken zweier phylogenetisch nicht näher verwandter Bakterientypen voraus (Bock et al. 1986):
  Die Ammoniumoxidanten (z.B. *Nitrosomonas ssp.*) oxidieren Ammonium zu Nitrit, welches dann durch Nitritoxidanten (z. B. *Nitrobacter ssp.*) weiter zu Nitrat oxidiert wird. Eine Hemmung der Ammoniumoxidanten bringt daher zwangsläufig die gesamte Nitrifikation zum Erliegen. Darüberhinaus ist eine den assimilatorischen Anteil übersteigende Stickstoffentfernung damit unmöglich geworden, weil denitrifizierenden Bakterien unter anoxischen Bedingungen kein Nitrat oder Nitrit als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht.

- Der Wirkungsgrad der vermehrten biologischen Phosphatelimination hängt entscheidend vom Umfang der Phosphatrücklösung unter anaeroben Bedingungen ab (Marais et al. 1983). Diese wiederum wird durch die Anwesenheit kurzkettiger organischer Säuren und/oder Alkohole maßgeblich gefördert (Deinema et al. 1985, Rensink et al. 1985), welche durch fakultativ anaerobe Bakterien (z.B. *Aeromonas punctata*) produziert werden. Brodisch (1985 a,b) konnte einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von *Aeromonas punctata* und dem Wirkungsgrad der biologischen Phosphatelimination nachweisen. Umstände, welche die Bildung von Gärungsprodukten vermindern oder verhindern, verringern also auch die vermehrte biologische Phosphatelimination.

Aber nicht nur die Hemmung, sondern auch die übermäßige Förderung des Wachstums bestimmter Bakterientypen kann nachteilige Folgen für den Reinigungsprozeß haben:

Nehmen fadenbildende Bakterien im Belebtschlamm auf Kosten flockenbildender Bakterien überhand, läßt sich dieser - dann "Blähschlamm" genannte - Belebtschlamm im Nachklärbecken nicht mehr vollständig vom gereinigten Abwasser abtrennen, und die Reinigungsleistung läßt nach oder bricht vollständig zusammen (Eikelboom 1975, Matsché 1977, Wagner 1985).

Anstrengungen zur Vermeidung des übermäßigen Wachstums fadenbildender Bakterien im Belebtschlamm reichten von der empirischen Bekämpfung der Fadenbildner durch Chemikalienzugabe (Jenkins et al. 1982, Schwarzer et al. 1980), über Untersuchungen an Kläranlagen und Laborkläranlagen (Chudoba et al. 1973 a,b, Verachtert et al. 1980, Houtmeyers 1978) und definierten Mischkulturen (Diekmann und Faby 1988, Richard et al. 1985, Shimizu 1985, Lau et al. 1984, Houtmeyers 1978) bis zu Experimenten mit Bakterienreinkulturen (Van den Eynde et al. 1983, Shimizu 1985, Lau et al. 1984, Houtmeyers 1978).

Versuche mit Reinkulturen bieten im Gegensatz zu Experimenten mit Belebtschlamm die Möglichkeit, die Stoffwechselleistungen definierter Mikroorganismen zu untersuchen und die Voraussetzung für den reibungslosen Ablauf bestimmter physiologischer Reaktionen systematisch zu ergründen.

Die Repräsentativität solcher modellhaften Untersuchungen mit Reinkulturen hängt entscheidend von der Zulässigkeit der gegenüber dem komplexen Bezugssystem (Kläranlage) gemachten Vereinfachungen ab. Welche Vereinfachungen "zulässig" sind und zu welchem Aspekt das Modell eine Aussage oder Vorhersage machen kann, wird leider überwiegend durch die Sachzwänge des technisch Machbaren bestimmt:

- Die Bakterien im Belebtschlamm einer Kläranlage wachsen unter Bedingungen, die in Untersuchungen mit Bakterienreinkulturen in den üblichen Batch- oder Chemostatexperimenten (bezüglich der Biomassekonzentration und der spezifischen Belastung mit Substrat) nicht simuliert werden können (Chesbro et al. 1990).
- Aus der Rückführung des Belebtschlammes aus dem Nachklärbecken einer Kläranlage zum Belebungsbecken resultiert eine so hohe Biomassekonzentration im Belebungsbecken, daß die Bakterien trotz ständiger Nährstoffzufuhr durch das Abwasser einer erheblichen Substratlimitierung ausgesetzt sind (Soeder 1987).

Entgegen verbreiteten Vorstellungen leben Bakterien in schwachbelasteten Kläranlagen also in einem nährstoffarmen Habitat, und viele werden sogar durch hohe Nährstoffkonzentrationen in ihrem Wachstum gehemmt (Kappesser 1990). Sie werden deshalb als obligat oligotroph (Kuznetsov 1979) bezeichnet.

Eine Größe zur Beschreibung des Ausmaßes der Substratlimitierung ist der in der Abwassertechnik gebräuchliche Begriff "Schlammbelastung". Die Schlammbelastung (B_{TS}) gibt an, wieviel verwertbares Substrat, ausgedrückt in kg BSB_5 (biochemischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen), einem Kilogramm Belebtschlamm (Trockenrückstand) pro Tag zur Verfügung steht. Mit abnehmender Schlammbelastung sind deshalb die Mikroorganismen zunehmend substratlimitiert. Bei der synonymen Verwendung der Begriffe "Schlammbelastung" und der für Laborkulturen von Mikroorganismen gebräuchliche Begriffe "spezifische Biomassebelastung" oder "food to microorganism ratio" (f/m ratio) ist zu beachten, daß der Trockenrückstand des in der klärtechnischen Praxis anfallenden Belebtschlammes einen mit dem Schlammalter zunehmenden anorganischen Massenanteil aufweist (Böhnke und Pinnekamp 1990). In Abb. 1 ist die Größenordnung für die Schlammbelastung zu den unterschiedlichen Reinigungszielen der Belebtschlammverfahren im Vergleich zu der einstellbaren spezifischen Biomassebelastung im Chemostat und im Reaktor mit Biomasserückführung dargestellt.

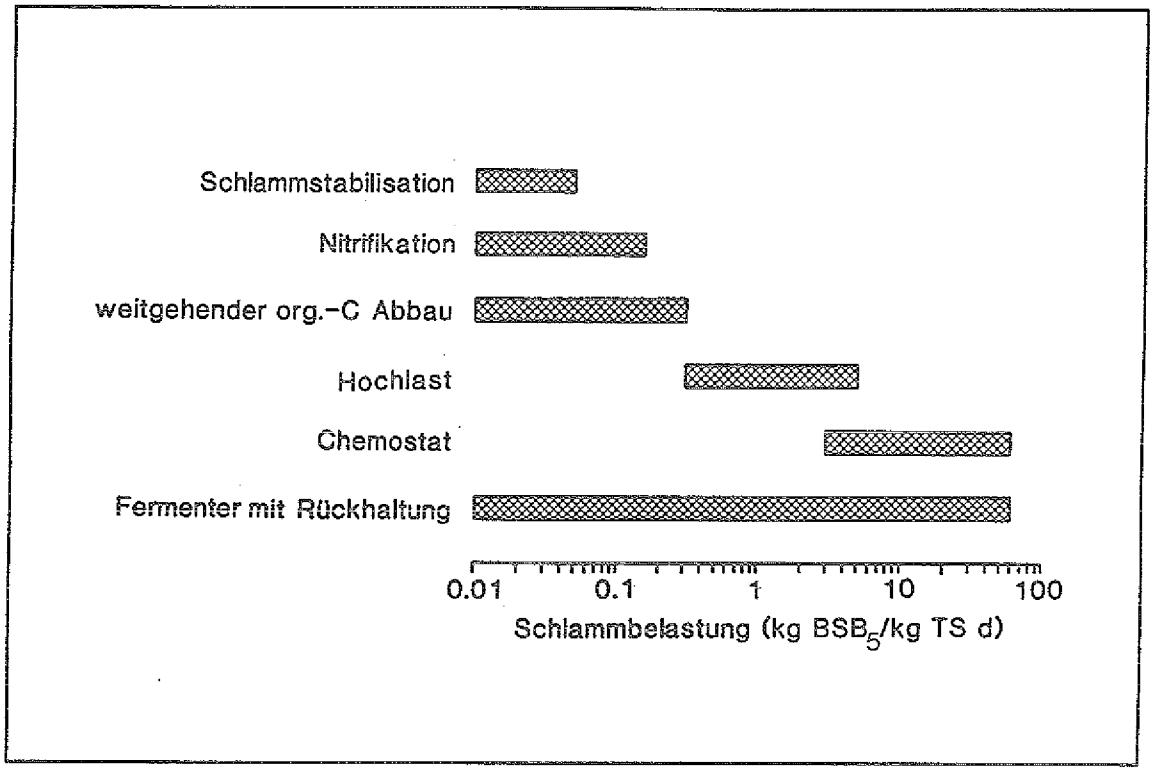


Abb. 1: Schlammbelastung zu unterschiedlichen Reinigungszielen der Belebtschlammverfahren im Vergleich zur spezifischen Biomassebelastung im Chemostat[1] und Fermenter mit Biomasserückhaltung

Sollen Versuche mit Bakterienreinkulturen unter vergleichsweise limitierenden Bedingungen durchgeführt werden, so kann das demnach nur in einem Reaktor mit Biomasserückführung erfolgen.
Über das Verhalten von Bakterien bei derartig niedrigen Wachstumsraten (0.002 - 0.01 h^{-1}), wie sie zumindest als mittlere Wachstumsraten in schwachbelasteten Kläranlagen aufgrund des Schlammalters (4 - 20 Tage) angenommen werden müssen, ist wenig bekannt. Pirt (1987) schreibt dazu:
"Systematic studies of the effect of specific growth rates have been concentrated on the upper range of growth rates, μ < 10 % of the maximum value, have been relatively neglected. ... The technical difficulty arises because slow growth rates impose heavier demands on apparatus performance and reliability."

---

1) angenommener Bereich für die Verdünnungsrate von D = 0.05 - 1.0 h^{-1} und gleichbleibenden Ertragskoeffizient von 0.5
Verdünnungsraten < 0.05 h^{-1} technisch möglich aber nicht sinnvoll, Kap. 4.2.

Da ich beabsichtigte, die Wachstumskinetik von Bakterienreinkulturen unter möglichst weitgehend simulierten Kläranlagenbedingungen zu untersuchen, bestand eine meiner Aufgaben in der Entwicklung eines solchen Kultursystems (Reaktor mit Biomasserückführung), welches die störungsfreie axenische Langzeitkultivierung (1 - 3 Monate) von Mikroorganismen ermöglicht. Damit sollten Generationszeiten und Biomassekonzentrationen erreicht werden, wie sie für Kläranlagen typisch sind.

Die Mikroorganismen sind in natürlichen Systemen, sowie in Kläranlagen, aufgrund zeitlicher oder räumlicher Inhomogenitäten aber stets sich ändernden Wachstumsbedingungen ausgesetzt (Daigger und Grady 1982). Die Ausbildung von Stoffgradienten (Nährstoffkonzentration und/oder Sauerstoffkonzentration) ist sogar eine notwendige Voraussetzung, Organismen unterschiedlichster Wachstumsansprüche die Koexistenz in einem System zu ermöglichen, wie z.B. Sommer (1985 a,b) für Phytoplanktonarten zeigen konnte. In Kläranlagen ist es aufgrund des hohen Schlammalters und der ständigen Schlammrückführung dabei unerheblich, ob es sich um einen zeitlichen oder räumlichen Gradienten handelt:
Chudoba (1973a,b, 1974) zeigte, daß Blähschlammbildung verhindert werden konnte, wenn statt eines volldurchmischten Belebungsbeckens mehrere hintereinander geschaltete Becken eine Pfropfenströmung und damit einen räumlichen Gradienten der Abwasserkonzentration bewirkten.

Der gleiche Effekt konnte aber auch im voll durchmischten Becken erzielt werden, wenn durch diskontinuierliche Abwasserzugabe ein zeitlicher Konzentrationsgradient erzeugt wurde (Houtmeyers et al. 1980, Van den Eynde et al. 1984, Zanders 1989).

Auf die gleiche Weise lassen sich die so verschiedenen Milieubedingungen, wie sie für die Nitrifikation und Denitrifikation erforderlich sind, in einem, statt in mehreren Belebungsbecken, durch eine zeitgebergesteuerte Belüftung einstellen. Durch die Kombination einer diskontinuierlichen Abwasserzugabe und intermittierender Belüftung kann so beim "Jülicher Abwasserreinigungsverfahren" (JARV) eine weitestgehende Stickstoffelimination in <u>einem</u> Reaktionsraum (Belebungsbecken) erreicht werden (Zanders 1989). Die minimalen Nitratkonzentrationen im Rücklaufschlamm aufgrund der fast vollständigen Stickstoffelimination bieten zudem beste Voraussetzungen zur Kom-

bination mit der biologischen Phosphatelimination im Nebenstromverfahren (Kap. 1.3.).

Die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten Experimente sollten einerseits Modellcharakter für das "Jülicher Abwasserreinigungsverfahren" besitzen und desweiteren durch Entwicklung eines geeigneten Versuchssystems die Voraussetzung zur Durchführung grundlagenorientierter Experimente mit Bakterienreinkulturen unter "kläranlagentypischer" Nährstofflimitierung ermöglichen.

Folgende Arbeits- und Untersuchungsziele waren Gegenstand der vorliegenden Arbeit:

- Entwicklung und Einsatz eines Reaktors mit Biomasserückführung, geeignet zur axenischen Langzeitkultivierung von Mikroorganismen bei niedrigen Wachstumsraten.

- Auswirkung kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe auf Wachstum und Aktivität von Bakterienreinkulturen.

- Konkurrenz zweier Bakterienstämme um die wachstumslimitierende Kohlenstoff- und Energiequelle in Abhängigkeit von der spezifischen Biomassebelastung, bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe.

- Beeinflussung der Phosphatrücklösung durch ein dazu befähigtes Bakterium in Cokultur mit einem denitrifizierenden Bakterium unter wechselweise aeroben und anoxischen Kulturbedingungen.

1.2. Vergleich: Chemostat, Kläranlage, Bioreaktor mit Biomasserückhaltung

Die im folgenden verwendeten Formeln wurden der Literatur entnommen (Mudrack und Kunst 1988, Jannasch 1963, Schlegel 1981, Uhlmann 1982) und die aufgeführten Größen zugunsten einer besseren Vergleichbarkeit gegenüber den Quellen zum Teil geändert und vereinheitlicht.

Chemostat:

Ein Chemostat ist ein von einem konstanten Flüssigkeitsstrom gleichbleibender Nährstoffkonzentration rückhaltefrei durchflossener, komplett durchmischter Reaktor.

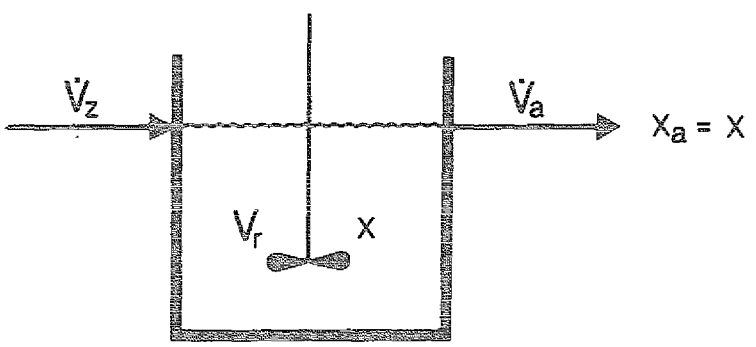


Abb. 2: Volumenströme und Biomassekonzentrationen in einem Durchflußreaktor (Chemostat)

Das Kulturgefäß mit dem Volumen V_r (l) wird vom Zulaufvolumenstrom $\dot{V}_z$ (l/h) durchflossen. Gleichzeitig fließt der Volumenstrom $\dot{V}_a$ mit der Biomassekonzentration x_a (g/l) ab. $\dot{V}_z/V_r$ ergibt die volumenspezifische Zulaufrate (Verdünnungsrate) D (h^{-1}). Eine nicht wachsende Kultur mit der Biomassekonzentration x wird mit der Auswaschrate

$$dx/dt = D * x \qquad (1)$$

ausgewaschen, d.h. sie nimmt exponentiell ab

$$x(t) = x_0 * e^{-Dt} \qquad (2)$$

Wachsen die Mikroorganismen jedoch mit der Wachstumsrate μ, erfolgt der Zuwachs ebenfalls exponentiell nach

$$dx/dt = \mu * x \qquad (3)$$

bzw.

$$x(t) = x_0 * e^{\mu t} \qquad (4)$$

Es resultiert eine Änderung der Bakterienkonzentration gemäß

$$dx/dt = \mu x - Dx \qquad (5)$$

Im Fließgleichgewicht ist die zeitliche Änderung der Biomassekonzentration Null, d.h. die Auswaschrate Dx wird durch die Zuwachsrate μx kompensiert

$$\mu x - Dx = dx/dt = 0 \qquad (6)$$

Wachstumsrate μ und Verdünnungsrate D sind gleich:

$$\mu = D \qquad (7)$$

In einer solchen kontinuierlichen Kultur ohne Biomasserückhaltung entspricht die Biomassekonzentration im Ablauf x_a der Biomassekonzentration im Reaktor x.

Es erscheint mir wichtig, an dieser Stelle den Aspekt der "spezifischen Biomassebelastung" ("food to microorganism ratio"), im Hinblick auf die zu vergleichenden Kultursysteme zu erörtern. Sie gibt an, welche Substratmenge einer gegebenen Bakterienmenge pro Zeiteinheit zur Verfügung steht.

Bei Experimenten mit Bakterienreinkulturen relativ wenig beachtet, kommt dem Parameter bei der biologischen Abwasserreinigung als "Schlammbelastung" (B_{TS} in kg BSB_5/kg TS * d) für die Auslegung und den Betrieb von Belebungsbecken biologischer Kläranlagen fundamentale Bedeutung zu.
Im Chemostat kann die spezifische Biomassebelastung bei einer gegebenen Verdünnungsrate ($< D_{krit}$) experimentell nicht variiert werden:

Es gilt

$$S_r = (D * K_s)/(\mu_{max} - D) \qquad (8) \qquad \text{(Bergter 1983)}$$

mit

S_r = steady-state-Konzentration des Substrates
K_s = Halbsättigungskonzentration
D = Verdünnungsrate
μ_{max} = maximale Wachstumsrate

S_r ist also nur von μ_{max}, K_s und D abhängig und unabhängig von der Konzentration des zulaufenden Substrates.

Die Konzentration des zulaufenden Substrates S_z und der Biomasse x verhalten sich nach Gleichung (8) annähernd proportional solange S_r sehr klein im Verhältnis zu S_z ist. Das ist im Chemostaten für große Bereiche von $D < D_{krit}$ in der Regel der Fall (Schlegel 1981, und Herbert et al. 1956). Deshalb bleibt auch bei einer Erhöhung der Substratkonzentration im Zulauf die spezifische Biomassebelastung gleich, da sich auch die Biomassekonzentration im steady state um denselben Faktor erhöht. Wegen der direkten Koppelung von μ und D kann die spezifische Biomassebelastung also nur durch die Veränderung der Verdünnungsrate variiert werden.

Kläranlage nach dem Belebtschlammverfahren

Beispiel:

Komplett durchmischter Reaktor (Belebungsbecken) mit externer Biomasserückführung nach Abtrennung der Biomasse vom gereinigten Abwasser mittels Schwerkraftfilter (Nachklärbecken)

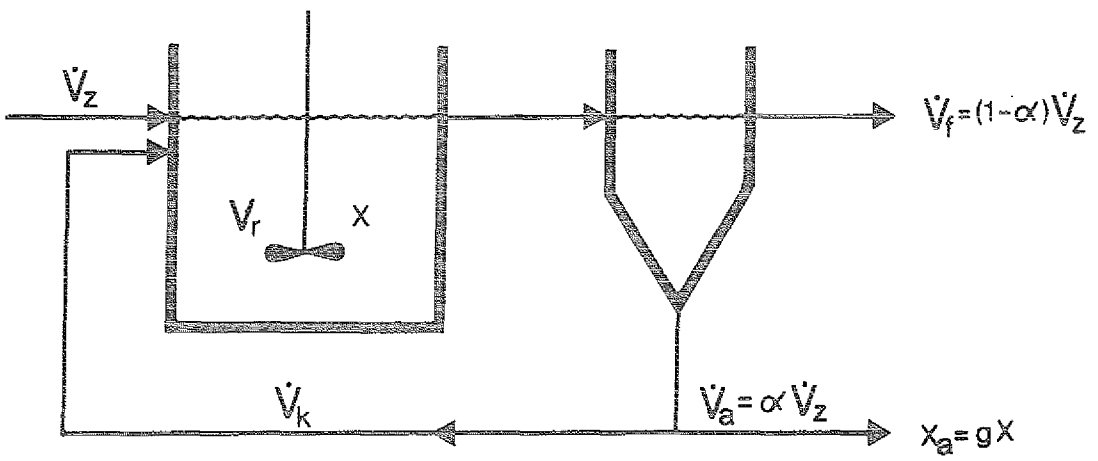


Abb. 3: Volumenströme und Biomassekonzentrationen in einer Kläranlage

Im stationären Zustand des Fließgleichgewichtes wird die Zuwachsrate der Biomasse (Belebtschlamm)

$$dx/dt = \mu x \qquad (9)$$

durch eine Austragsrate (Überschußschlammabzugsrate)

$$dx/dt = a * g * Dx \qquad (10)$$

kompensiert,

wobei

$$a = \dot{V}_a/\dot{V}_z$$

(Anteil des Überschußschlammvolumenstroms am Zulaufvolumenstrom)

und

$$g = (\dot{V}_k + \dot{V}_a + \dot{V}_f)/(\dot{V}_k + \dot{V}_a)$$

(Konzentrierungsfaktor am Rückhalteelememt)

mit

$\dot{V}_f$ = Volumenstrom des Filtrates
$\dot{V}_k$ = Volumenstrom der Rückführung
$\dot{V}_a$ = Volumenstrom des abgezogenen Überschußschlammes (ml/h)
$\dot{V}_z$ = Volumenstrom des Zulaufs

Aus Gleichung (9) und (10) folgt

$$\mu = a * g * D$$

Die Wachstumsrate μ ist also um den Faktor ag von der Verdünnungsrate D entkoppelt, d.h. infolge der Rückführung des Schlammes ist die mittlere Verweilzeit der Biomasse (= Schlammalter) $t_s = 1/\mu$ wesentlich höher als die mittlere Verweilzeit des zufließenden Substrates (Abwasser). Die spezifische Biomassebelastung nimmt danach bei gleicher Verdünnungsrate D mit zunehmendem Rückhaltegrad (Zunahme von x) ab. Im Gegensatz zum Chemostat kann sie also bei gleicher mittlerer Verweilzeit des Substrates (Abwasser) experimentell (verfahrenstechnisch) variiert werden.
Alle Herleitungen gelten für den Idealfall der vollständigen Biomasserückhaltung in der Nachklärung, die in der klärtechnischen Praxis allerdings nie erreicht wird.

Fermenter mit Biomasserückhaltung

Beispiel:

Komplett durchmischter Reaktor mit externer Biomasserückhaltung mittels Sterilfiltration

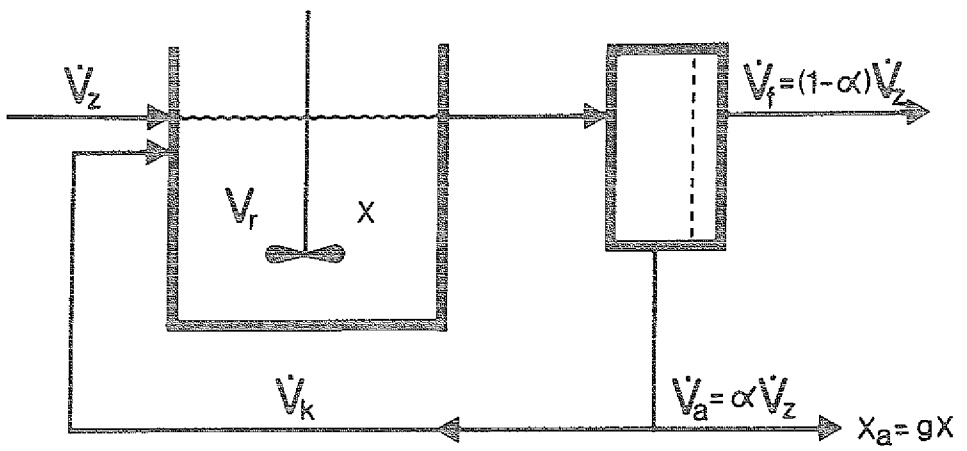


Abb. 4: Volumenströme und Biomassekonzentrationen in einem Fermenter mit Biomasserückhaltung

In einem solchen Kultursystem gelten prinzipiell für alle Größen die gleichen Beziehungen wie zuvor für die Kläranlage ausgeführt.

Für den Fall $\dot{V}_k >> \dot{V}_f$

wird

$$g = \frac{\dot{V}_k + \dot{V}_a + \dot{V}_f}{\dot{V}_k + \dot{V}_a} \approx 1$$

und

$$x_a = g * x \approx x$$

Somit vereinfacht sich

$$\mu = \alpha * g * D$$

zu

$$\mu = \alpha * D$$

Das heißt, wenn die Überströmrate des Filters $\dot{V}_k$ sehr viel größer ist als der Volumenstrom des Filtrates $\dot{V}_f$ geht der Aufkonzentrierungsfaktor g gegen 1 und die Wachstumsrate μ wird allein durch das Verhältnis

$$\mu = (\dot{V}_a/\dot{V}_z) * D$$

bestimmt.

1.3. Grundlagen der vermehrten biologischen Phosphorelimination

Erstmals berichteten Srinath et al. (1959) und Alarcon (1961) unabhängig voneinander über eine unerwartet hohe Phosphoreliminationsrate in biologischen Kläranlagen und erkannten einen Zusammenhang zwischen Schwankungen der Belüftungsraten und den wechselnden Phosphatablaufwerten der Anlagen. Levin und Shapiro (1965) deuteten die Fähigkeit des Belebtschlammes, unter aeroben Bedingungen vermehrt Phosphat aufzunehmen und unter anaeroben Bedingungen oder nach Erniedrigung des pH-Wertes wieder rücklösen zu können, als einen biochemischen Vorgang. Ihre Theorie vom "luxury uptake" wurde durch Versuche unterstützt, in denen die Phosphataufnahme durch Zugabe von 2.4.-Dinitrophenol gehemmt wurde. Dennoch postulierten Menar und Jenkins (1970) einen rein chemischen Fällungsmechanismus, mit dem die vermeintlich vermehrte biologische P-Elimination zu erklären sei. Wenngleich die Mehrzahl der seit Beginn der 70'er Jahre erschienenen Veröffentlichungen die Möglichkeit der biologischen Phosphatelimination durch phosphatakkumulierende Bakterien belegen, können chemische Fällungsvorgänge als eine zusätzliche Ursache für eine gute P-Eliminationsleistung von Kläranlagen nicht ausgeschlossen werden (Arvin 1983, Barnard 1983).
Fuhs und Chen (1975) isolierten aus Kläranlagen mit vermehrter P-Elimination einige Bakterienstämme der *Acinetobacter/Moraxella/Mima*-Gruppe, die in der Lage waren, Phosphat intrazellulär als Polyphosphat in Granula zu speichern.
Acinetobacter schien nach Nicholls und Osborn (1979) in den untersuchten Kläranlagen mit biologischer P-Elimination die dominierende Bakteriengattung zu sein. Auch Buchan (1983) konnte 66 % der Bakterien eines vermehrt Phosphat speichernden Belebtschlammes der Gattung *Acinetobacter* zuordnen.
Doch neben Stämmen der Gattung *Acinetobacter* sind offenbar auch Vertreter vieler anderer Bakteriengattungen in der Lage, vermehrt Phosphat zu akkumulieren:
Brodisch und Joyner (1983) konnten in einer Versuchsanlage mit vermehrter P-Elimination nur geringe Anteile von *Acinetobacter sp.* an der Belebtschlammflora nachweisen. Gersberg und Allen (1985) berichten von sehr hohen Phosphataufnahmeraten für *Klebsiella pneumoniae*. Suresh et al. (1985) fanden für *Pseudomonas vesicularis*, im Vergleich zu zwei ebenfalls selektiv auf das Vorhandensein von intrazellulärem Polyphos-

phat isolierten *Acinetobacter*-Stämmen, deutlich höhere Phosphat-aufnahmeraten und -rücklöseraten.

Obwohl bezüglich der beteiligten Organismen und deren physiologischen Ansprüchen noch viele Wissenslücken bestehen, sind die zur vermehrten biologischen P-Elimination erforderlichen Betriebs- und Verfahrensweisen für Kläranlagen in Grundzügen bekannt:

Der Belebtschlamm muß wechselweise anaeroben und aeroben Bedingungen ausgesetzt werden, wobei während der anaeroben Phase solche Substrate ausreichend vorhanden sein müssen, die den obligat aeroben "Bio-P-Organismen" auch das Wachstum unter aeroben Bedingungen ermöglichen. Dabei handelt es sich bevorzugt um kurzkettige Fettsäuren und Alkohole (Rensink et al. 1985, Arvin und Holm Kristensen 1985, Wentzel et al. 1985).

Durch die Fähigkeit zur Aufnahme und Speicherung des Substrates unter anaeroben Bedingungen haben die "Bio-P-Organismen" gegenüber den anderen obligaten Aerobiern im Belebtschlamm Selektionsvorteile, so daß sie bei einer solchen Verfahrensweise angereichert werden. Statt der für Belebtschlamm üblichen 1-2 % P-Gehalt im Trockenrückstand werden auf diese Weise bis zu 6 % P-Gehalt erreicht (Felber et al. 1990).
Basierend auf den Beobachtungen an Kläranlagen und den Ergebnissen aus Versuchen mit Laboranlagen und Bakterienreinkulturen wurden von vielen Arbeitsgruppen biochemische Modelle vorgeschlagen (Nicholls und Osborn 1979, Marais et al. 1983, Rensink 1984, Comeau et al. 1986, Wentzel et al. 1986). Die im wesentlichen in allen Modellen übereinstimmenden Stoffwechselreaktionen eines zur vermehrten biologischen P-Elimination befähigten Bakteriums sind in Abb. 5 schematisch zusammengefaßt.

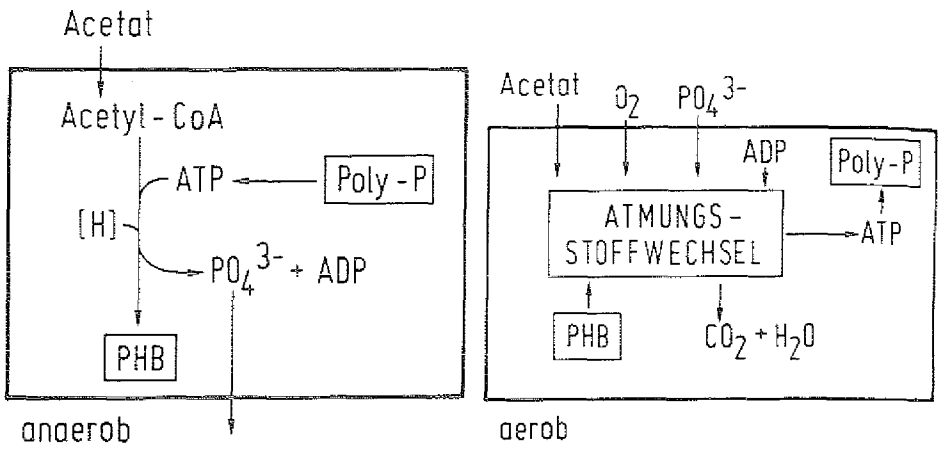


Abb. 5: Vereinfachtes Schema der anaeroben und aeroben Stoffwechselreaktionen in *Acinetobacter* mit Acetat als Substrat
(Aus: ATV-Arbeitsberichte 1989)

Kurzkettige organische Säuren können danach unter anaeroben Bedingungen von "Bio-P-Organismen" aufgenommen und als organische Reservestoffe (z.B. PHB = Polyhydroxybuttersäure) gespeichert werden. Die zu ihrer Synthese erforderliche Energie stammt aus der Hydrolyse gespeicherten Polyphosphates. Als Folge wird ortho-Phosphat aus den Zellen freigesetzt.

Unter aeroben Bedingungen dient PHB als Energie- und Kohlenstoffquelle. Der ATP-Gewinn aus der Veratmung dieses endogenen Speicherstoffes dient wiederum auch der Aufnahme von ortho-Phosphat und der Speicherung als Polyphosphat. Die aus einer solchen "Strategie" erwachsenden Selektionsvorteile der "Bio-P-Organismen" gegenüber anderen obligat aeroben Organismen sind offensichtlich.

Auch wenn dieses stark vereinfachte Modell die beobachteten Phänomene in Kläranlagen mit vermehrter P-Elimination beschreiben kann, so bedürfen viele notwendige Einzelreaktionen weiterer Untersuchungen. Es gilt bislang nicht einmal als erwiesen, daß diese Stoffwechselreaktionen (wie angenommen) tatsächlich in einem Organismus ablaufen (Wentzel et al. 1991).

Die verfahrenstechnische Umsetzung der oben genannten Anforderungen wird jedoch durch das Vorhandensein von Nitrat/Nitrit infolge Nitrifikation erschwert. Unter anoxischen Bedingungen (kein gelöstes O_2; NO_3^-/NO_2^- vorhanden) kann eine P-Aufnahme oder eine P-Rücklösung statt

finden (Schön und Streichan 1989), da es auch zur Denitrifikation befähigte *Acinetobacter*-Arten gibt (Wentzel et al. 1986). Desweiteren konkurrieren die "Bio-P-Organismen" unter diesen Bedingungen mit denitrifizierenden Organismen um das Substrat. Eine erfolgreiche biologische P-Elimination in nitrifizierenden Anlagen setzt also eine Denitrifizierung des entstehenden NO_3^-/NO_2^- durch eine entsprechende Verfahrensführung voraus.
Die Vielzahl technischer Verfahrensvarianten mit unterschiedlicher Anordnung und Gestaltung der Becken und Schlammströme (Übersicht z. B. in ATV-Arbeitsberichte 1989) läßt sich zwei Verfahren zuordnen:
Bei den Hauptstromverfahren findet die P-Entfernung in dem vom Hauptstrom des Abwassers durchflossenen Belebungsbecken durch biologische Anreicherung im Belebtschlamm und alleinigen Abzug mit dem Überschußschlamm statt.
Beim Nebenstromverfahren wird zusätzlich zur Entnahme mit dem Überschußschlamm aus einem Teilstrom des phosphorhaltigen Schlammes Phosphat unter anaeroben Bedingungen im P-Stripper in die flüssige Phase rückgelöst und durch chemische Fällung aus dem Überstand entfernt.

Alle Verfahren zur biologischen Phosphorentfernung können die geforderten P-Ablaufwerte nicht sicher einhalten (ATV-Arbeitsberichte 1989). Es besteht also noch ein erheblicher Forschungsbedarf bezüglich des Verständnisses der mikrobiologischen Zusammenhänge bei der biologischen Phosphorelimination. Dabei sollte beachtet werden, ob die Gründe für die bekannten Schwierigkeiten bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Laborexperimenten mit Reinkulturen auf die Kläranlagen nicht auch zu einem Teil in der Auswahl der falschen Experimentiersysteme zu suchen sind. Batch- und Chemostatexperimente sind sicher schlecht geeignet, die Wachstumsbedingungen für die Bakterien in einer Kläranlage zu simulieren. Die Auswirkungen sehr kleiner Wachstumsraten auf die Stoffwechselleistungen und die Aktivität in Bakterienreinkulturen sind wenig untersucht (Pirt 1987), und über die mögliche Beeinflussung des P-Stoffwechsels im Sinne des genannten Modells liegen bislang keine Veröffentlichungen vor.

2.0 Material und Methoden

Vorbemerkung: Die von mir modifizierten oder entwickelten Methoden und Techniken werden im folgenden ausführlich beschrieben. Bezüglich der allgemein üblichen Methoden wird lediglich auf entsprechende Literaturstellen verwiesen.

2.1. Testorganismen

2.1.1. Anforderungen und Auswahl

Die ausgewählten Bakterienstämme sollten auf dem verwendeten Mineralmedium mit Essigsäure als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen können. Sie sollten ferner nicht zu Flocken- oder Aggregatbildung neigen und kein Wandwachstum (= Anheftung an der Fermenterwand) zeigen. Insbesondere für Versuche mit definierten Mischkulturen war dies, zusammen mit der einwandfreien Unterscheidbarkeit der kultivierten Bakterien, die wichtigste Voraussetzung zur quantitativen Bestimmung ihrer Populationsanteile. Außerdem sollte eines der Bakterien eine vermehrte Phosphataufnahme und die Fähigkeit zur Phosphatrücklösung aufweisen, und ein anderes die angebotene C-Quelle auch unter Denitrifikationsbedingungen verwerten können.

Letzlich wählte ich nach zahlreichen Vorversuchen drei Bakterienspezies für die weiteren Experimente aus:

1. *Acinetobacter sp.*	Isolat aus Laborkläranlage
2. *Pseudomonas fluorescens*	Biotyp 2, kann denitrifizieren DSM* 50108
3. Isolat WD1	Isolat aus einer Anreicherungskultur zur Induktion vermehrter Phosphataufnahme/-rücklösung

* Deutsche Sammlung für Mikroorganismen

2.1.2. Physiologische Charakterisierung

Die Zellmorphologie der Bakterienstämme wurde im Phasenkontrast bei 500-facher Vergrößerung und bei 1250-facher Vergrößerung im Hellfeld mit Ölimmersion untersucht.
Die Koloniemorphologie konnte je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Organismen nach 2 Tagen (*Acinetobacter sp.*) bis frühestens nach 5 Tagen (WD1) Kultivierung auf Standard-I-Nähragar (22°C) beurteilt werden.
Die konventionellen biochemischen Merkmale aufgrund unterschiedlicher Stoffwechselleistungen wurden nach den gängigen Methoden durchgeführt (Reichardt 1978).
Die Gram-Reaktion wurde indirekt, durch die Bestimmung der L-Alanin-Aminopeptidase ermittelt. Der Test beruht auf der enzymatischen Freisetzung des gelben Farbstoffs p-Nitroanilin aus der farblosen Verbindung L-Alanin-p-Nitroanilid und wurde als Schnelltest (Merck 13301) oder Enzymnachweistest in Mikrotiterplatten durchgeführt. Alle bisher daraufhin untersuchten gram-negativen Organismen besitzen im Gegensatz zu gram-positiven Organismen die L-Ala-Aminopeptidase (Cerny 1978, Carlone et al. 1983).
Als ergänzende, indirekte Methode zur Bestimmung der Gram-Eigenschaften wurde der KOH-Test durchgeführt (Gregersen 1978). Eine in 3 %-iger KOH suspendierte Kolonie gram-negativer Bakterien bildet nach 10 - 20 s eine visköse Flüssigkeit, die beim Anheben der Impföse dünne Fäden ausbildet. Gram-positive Bakterien zeigen, bis auf wenige bekannte Ausnahmen (z.B. einige Bacillus-Stämme), diese Reaktion nicht.

Gram-Reaktion[1]	Arginindihydrolase
A-Ala-Aminopeptidase	Ornithindecarboxylase
KOH-Test	Lysindecarboxylase
Cytochrom-c-Oxidase	H_2S-Bildung
Katalase	Voges-Proskauer
Indol	Gelatineverflüssigung
Urease	Denitrifikation[2]

1) nach KOH-Test und Test auf L-Ala-Aminopeptidase
2) Gasbildung in Nitrat-Nährbouillon

Tab. 1: Konventionelle Tests

Zusätzlich wurde das Verwertungsspektrum 46 verschiedener Zucker und Zuckerverbindungen in Mikrotiterplatten bestimmt (Webb 1988):

Tetrose
1) Erythrose

Pentose
2) D-Xylose
3) D-Lyxose
4) L-Arabinose
5) D-Ribose
6) 2-Desoxyribose
7) Ribulose

Hexose
8) D-Glukose
9) D-Mannose
10) D-Galaktose
11) D-Talose
12) L-Rhamnose
13) D-Fucose
14) L-Fucose
15) Digitoxose
16) D-Tagatose
17) D-Fruktose
18) L-Sorbose
19) Glukuronsäure
20) Galakturonsäure
21) 6-Amino-6-Desoxy-D-Glukose
22) Methyl-α-D-Glucopyranosid
23) Methyl-β-D-Glucopyranosid
24) Methyl-α-D-Xylopyranosid
25) Methyl-β-D-Xylopyranosid
26) Methyl-β-D-Galactopyranosid
27) Methyl-α-D-Mannopyranosid
28) 3-O-Methyl-D-Glukose
29) 2-Desoxy-D-Glukose
30) 2-Desoxy-D-Galaktose

Disaccharide
31) Laktose
32) Melibiose
33) Maltose
34) Cellobiose
35) Saccharose
36) Turanose
37) Palatinose
38) Trehalose
39) α-Sophorose

Trisaccharide
40) Melezitose
41) Raffinose

Tetrasaccharide
42) Stachyose

Glukoside
43) Aeskulin
44) Arbutin
45) Salicin

Nuleosid
46) Adenosin

Tab. 2: Kohlenhydratverwertungstest

Die so durchgeführten Charakterisierungen erlaubten die Reinheitsüberprüfung der Arbeits- und Stammkulturen sowie die Reidentifizierung der eingesetzten Bakterienstämme im Fall von Fremdinfektionen.
Weitergehende Untersuchungen mit dem Ziel der Identifizierung des Isolates WD1 wurden freundlicherweise von Dr. Kämpfer am Fachbereich Umwelttechnik der TU Berlin mittels automatisierter Identifizierungsmethoden (Kämpfer 1988) durchgeführt.

2.2. Kulturtechnik

2.2.1. Kultursysteme

2.2.1.1. 2000 ml-Reaktor mit Registrier- und Regeltechnik

Zur Durchführung der Batch-Experimente und der Versuche mit kontinuierlichen Kulturen wurden zwei baugleiche 2 l-Fermenter von mir konzipiert und in den Werkstätten des Forschungszentrum Jülich angefertigt.

Aufbau

Als Kulturgefäß diente jeweils ein in der Glaswerkstatt des Forschungszentrum Jülich hergestelltes zylindrisches Weithals-Reaktionsgefäß mit Temperiermantel. Ein Edelstahldeckel diente als Abdeckung und gewährleistete über unterschiedliche Gewindestutzen den Zugang für Meßelektroden und Zu- und Ableitungen. Ein zentral angeordneter Konusstutzen (NS 29/32) nahm die Vakuummagnetkupplung auf, welche für gasdichten Kraftschluß zwischen dem Rührwerk (RW20, Fa. IKA) und der zweifach gelagerten Rührwelle im Fermenter sorgte. Auf der Rührwelle übernahmen zwei Scheibenrührer die Turbulenzerzeugung. Zur Turbulenzverstärkung waren zusätzlich zwei einander gegenüberliegende Schikanen am Deckel eingebracht. Der Deckel wurde durch einen Edelstahlschnellverschluß am Kulturgefäß und der Stativsäule befestigt, wobei eine Silikon-O-Ring-Dichtung zwischen Deckel und dem genuteten Planschliff des Gefäßes für einen dichten Sitz sorgte.
Die Gelöstsauerstoffkonzentration im Reaktor wurde mit einer autoklavierbaren Membransauerstoffelektrode (Typ PO_2, Fa. Ingold) gemessen. Die Elektroden zeigten selbst nach mehrmonatigem Einsatz keine Abweichungen vom eingeeichten Wert.
Zur pH-Messung wurde eine autoklavierbare Einstabmeßkette (Typ 456-35-90-K9, Fa. Ingold) verwendet. Für den außerhalb des Kulturgefäßes gelegenen Elektrodenteil wurde eine gasdicht anzubringende Messinghülse gefertigt, welche mittels einer Schlauchverbindung einen Druckausgleich zwischen der Gaszuleitung zum Reaktor und dem Gasraum über der Elektrolytlösung in der Elektrode gewährleistete. Auf diese Weise war am Diaphragma immer der hydrostatische Druck der über dem Niveau der Kulturflüssigkeit liegenden Elektrolytlösung wirksam. Die pH-Messung war somit unabhängig von Differenzen zwischen dem Gasdruck im Reaktor und dem äußeren Luftdruck. Dadurch wurde ein Eindringen von Kultur-

medium in die Elektrode sicher vermieden und eine hohe Langzeitstabilität (> 2 Monate) erreicht.
Die Schlauchverbindungen bestanden ausschließlich aus Silikonkautschuk, PTFE-Schläuchen, VA-Rohrmaterial und Verderprene-Pumpenschläuchen (Fa. Verder). Da alle Systemteile auch während des Betriebes ohne Infektionsgefahr austauschbar sein sollten, wurden die Einzelkomponenten (Nährlösungsflasche, Ablaufflasche, Pumpenschläuche, Probennehmer etc.) über eine Kombination von dickwandigen Silikonkautschukschläuchen (1.5 mm Iø, 6.0 mm Aø) und darin eingesteckten VA-Stahlröhrchen verbunden. So konnten sterile Verbindungen durch Einstecken des abgeflämmten, noch glühenden Stahlröhrchens in den Silikonschlauch rasch und sicher hergestellt werden. Die Gaszu- und Gasabführwege wurden nach außen durch PTFE-Sterilfilter (o.2 µm, Fa Millipore) gegen Kontamination geschützt.

An Dosiervorrichtungen für die Flüssigkeit wurden, je nach erforderlichen Fördervolumenströmen, Schlauchpumpen (Minipuls 2, Fa. Abimed; WM 502 S, Fa. Verder; Mini-S, Fa. Ismatek) bzw. Kolbenmembranpumpen mit autoklavierbarem Pumpenkopf (FE211, Fa. Braun Melsungen) eingesetzt. Die Gasvolumenströme wurden über Schwebekörperdurchflußmesser (Fa. Fischer und Porter) eingestellt. Die Nährlösung wurde oberhalb des Reaktors innerhalb einer Glashohlkugel ("Kontaminationsschranke") in den Zuluftgasstrom getropft und mit diesem direkt über dem Boden des Kulturgefäßes vor einer Schikane in die Kultursuspension eingeleitet. Eine kontinuierliche Wägung der Vorratsflasche für die Nährlösung ermöglichte eine präzise Bestimmung der Volumenströme ohne Eingriff in das System.

Sterilisation

Durch die Verwendung autoklavierbarer Elektroden mit Steckkopfanschlüssen und einer teilbaren Stativsäule waren die einzigen nicht autoklavierbaren Bauteile des Kultursystem (elektrische Bauteile wie Rührmotor und Meßverstärker) mit wenigen Handgriffen abgebaut. Alle anderen Komponenten, wie Pumpenschläuche, Pumpenkopf, Säureflasche, Abgaskondensflasche und Probennehmer, wurden/ blieben betriebsfertig eingebaut, wenn sie mit dem in die Stativhalterung eingespannten Kulturgefäß für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert wurden. Lediglich die Verbindungen zur Kulturmedienflasche und zur Ablaufflasche mußten nach dem Autoklavieren hergestellt werden. Dieses bedeutete eine

erhebliche Reduzierung der Kontaminationsgefahr gegenüber der "Anstechtechnik", wie sie bei in-situ-sterilisierbaren Fermentern gebräuchlich ist.

Registrierung und Regelung

Das Signal der elektronischen Waage, des O_2-Meßverstärkers und der pH-Wert wurden auf einem Rekorder mit Alarm- und Rechenfunktion ("Hybridrekorder" Modell 4001, Fa. Chessell) aufgezeichnet. Der pH-Wert wurde zusätzlich über eine Alarmfunktion geregelt und konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen auf pH 7.5 ± 0.02 (Titration von 0.25 mM H_2SO_4) konstant gehalten werden. Die Rechenfunktion des Rekorders erlaubte die kontinuierliche Berechnung der Zulaufrate der Nährlösung und durch Verrechnung mit dem Reaktorvolumen eine "on line"-Kontrolle der aktuellen Verdünnungsrate. Durch eine Reihenschaltung von drei Zeitrelais (Typ MFN, Fa. Schiele), die ihrerseits durch eine Zeitschaltuhr angesteuert wurden, konnten bei diskontinuierlicher Substratzugabe ("Intermittent Feeding") Einschaltintervalle und Pumpdauer der Substratpumpe gesteuert werden. Desweiteren wurde zur Simulation anaerober und aerober Phasen das entsprechende Magnetventil zum Wechsel zwischen Luft und N_2-Begasung darüber geschaltet.
Der Füllstand im Reaktor wurde durch einen bis zur max. Füllhöhe reichenden VA-Hohlstab kontrolliert, durch den die Kulturflüssigkeit mit konstanter Pumprate, die geringfügig über der Zulaufrate lag, abgezogen wurde. Eine konstante Temperatur wurde durch ein thermostatisiertes Wasserbad (FP40, Fa. Julabo) mit Umwälzung durch den Doppelmantel des Reaktors gewährleistet.

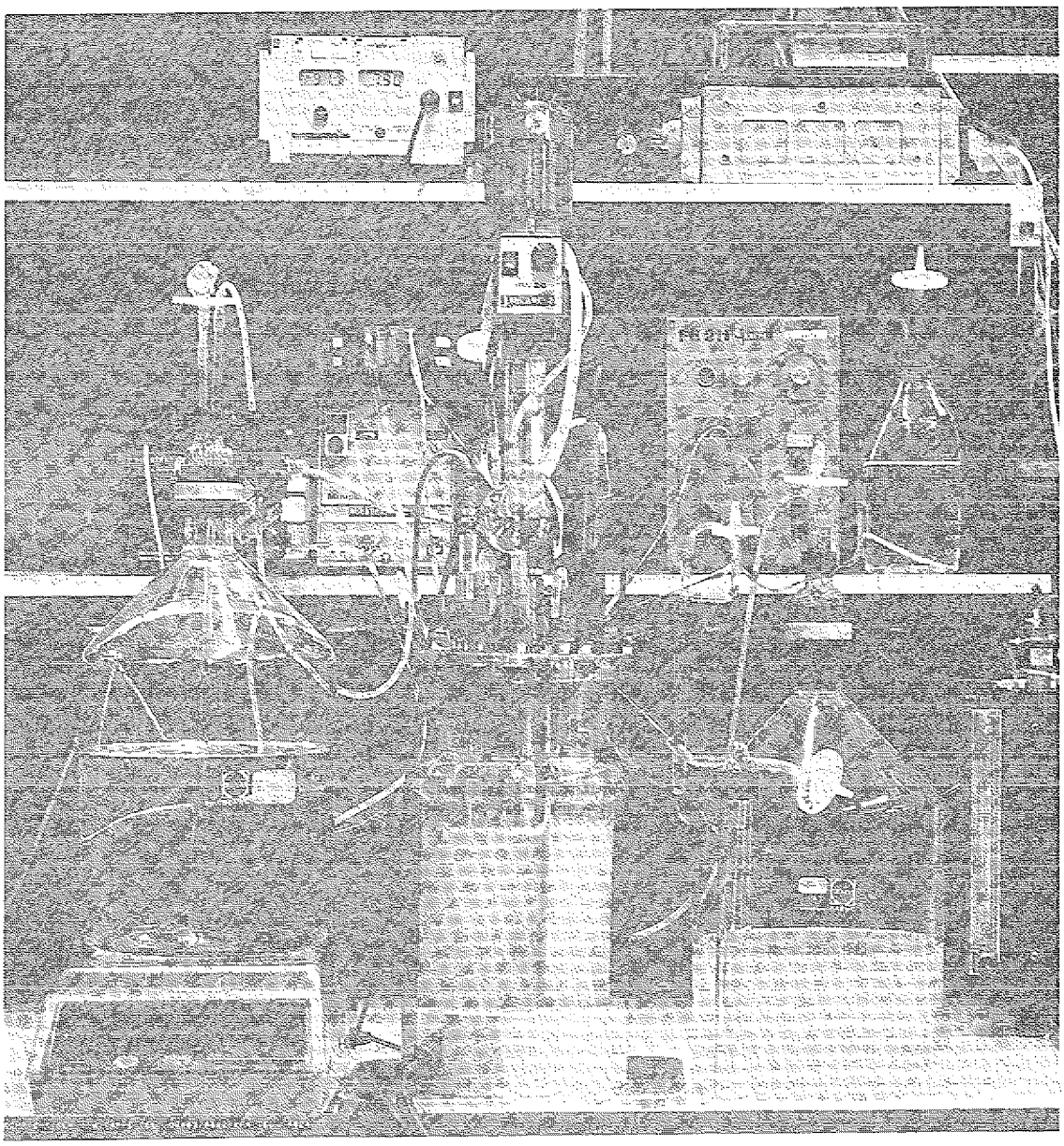


Abb. 6: Foto eines der zwei 2-l-Reaktoren

2.2.1.2. 1000 ml-Reaktor mit externer Biomasserückhaltung und Registrier- und Regeltechnik

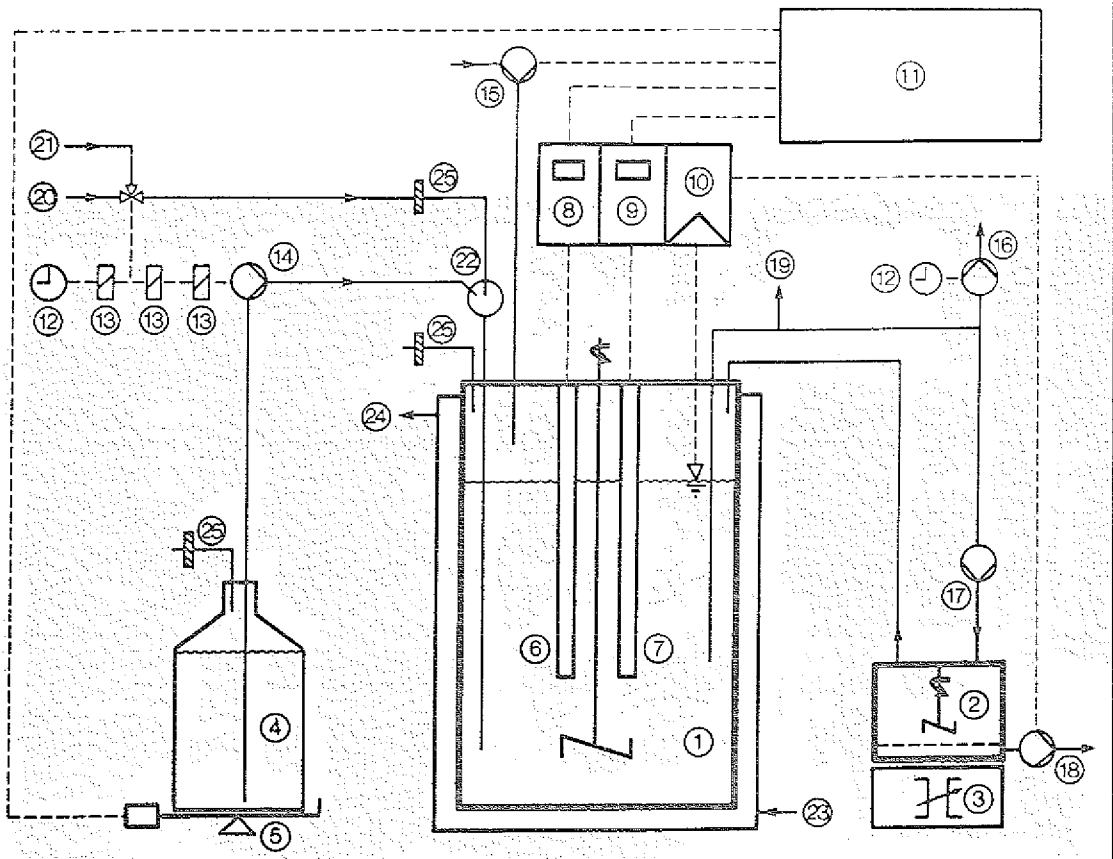
Zur Durchführung der Experimente unter "kläranlagentypischen" Kulturbedingungen konzipierte ich einen Kleinfermenter mit Biomasserückhaltung, der ebenfalls in den Werkstätten des Forschungszentrum Jülich angefertigt wurde.

Aufbau

Während die Forderung nach einer Rückhaltung der Biomasse im Kultursystem die Entwicklung bzw. Modifikation eines entsprechenden Rückhaltemoduls erforderte (Kap. 2.2.1.3.), konnte der 1 l-Reaktor nach dem Baumuster der 2 l-Reaktoren gefertigt werden. Mit Ausnahme der Reaktionsgefäße (Weithals Reaktionsgefäß nach DIN 12212 NW100, Fa. Schott) und der Deckel (NW100 statt NW150 bei 2 l-Reaktor) waren nahezu alle Bauteile kompatibel. Die kontinuierliche Durchströmung des Filtrationsmoduls mittels einer Schlauchpumpe (WM502 S, Fa. Verder) erforderte die Installation von zwei zusätzlichen Zugängen durch den vergleichsweise kleineren Deckel des 1l-Reaktors. Außerdem machte eine füllstandsabhängige Regelung des Filtratabzuges den Einbau einer Niveausonde notwendig. In allen übrigen Merkmalen und Funktionen bestand Übereinstimmung mit den beschriebenen 2 l-Fermentern.

Registrierung und Regelung

Die exakte Aufteilung des Ablaufs in zwei Teilströme (Filtrat, Biomassesuspension) bei konstanter Füllhöhe im Reaktor wurde durch einen füllstandsabhängigen Filtratabzug und einen pumpratengeregelten Abzug der Überschußbiomasse gewährleistet. Die Filtratpumpe (MINI-S, Fa. Ismatek) wurde über einen Niveauregler (FTW 420, Fa. Endress u. Hauser) angesteuert, wenn die Niveausonde (VA Rundstab mit Teflonisolation, Eigenbau) Kontakt mit der Kulturflüssigkeit hatte.
Für die anderen Registrier- und Regelgrößen gilt das unter Kap. 2.2.1.1. aufgeführte.



1. Kulturgefäß
2. Filtrationsmodul
3. Magnetrührer
4. Nährlösung
5. Waage
6. pH-Elektrode
7. O_2-Elektrode
8. pH-Meßverstärker
9. O_2-Meßverstärker
10. Niveauregler
11. Datenaufzeichnung und Regler
12. Zeitschaltuhr
13. Zeitrelais
14. Pumpe für Nährlösungszufuhr
15. Pumpe für Säurezufuhr
16. Pumpe für Überschuß-kulturflüssigkeit
17. Pumpe für Zulauf zum Filtrationsmodul
18. Pumpe für Filtratabzug
19. Probennahme
20. N_2-Zufuhr
21. Luftzufuhr
22. Kontaminationsschranke für Nährlösung
23. Zulauf Temperiermantel
24. Ablauf Temperiermantel
25. Sterilfilter

Abb. 7: Halbschematische Zeichnung des 1-l-Reaktors mit Biomasserückhaltung und Registrier- und Regeltechnik

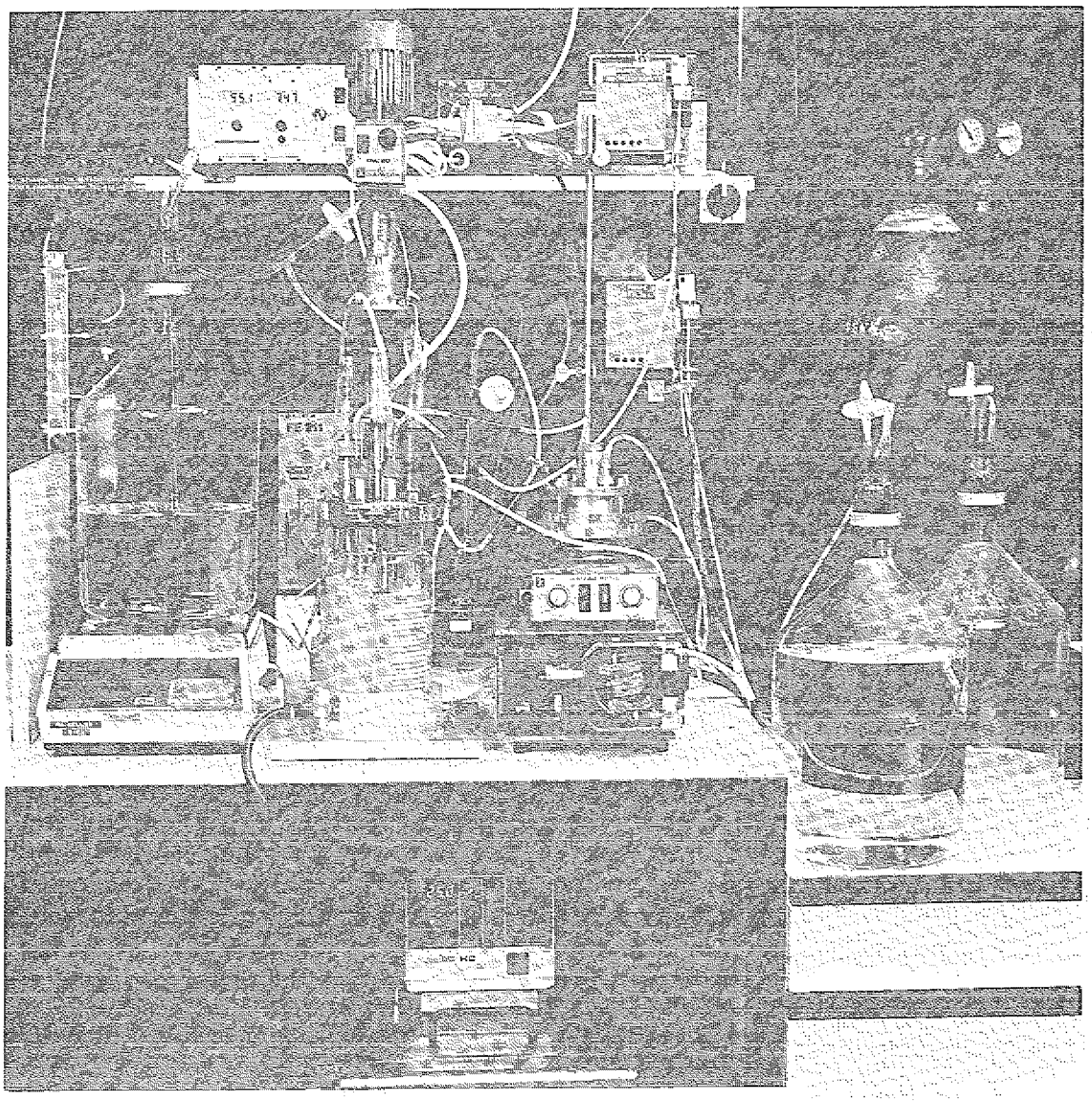


Abb. 8: Foto des 1-l-Reaktors mit Filtrationsmodul

2.2.1.3. Konstruktion und Einsatz des Filtrationsmoduls

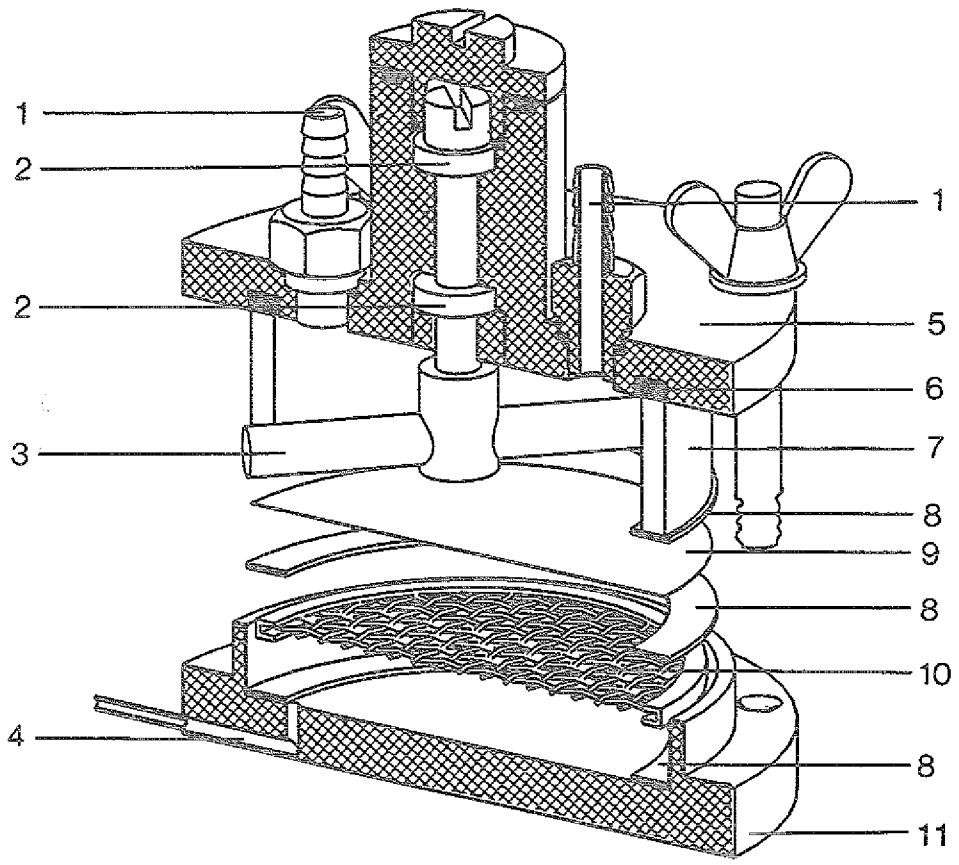
Von den unterschiedlichen Separationsmethoden zur Biomasserückhaltung, wie Immobilisierung, Sedimentation/Flockulation, Zentrifugation, Flotation und Filtration, ist die letztgenannte am ehesten geeignet, in Kombination mit einem Rührkesselfermenter die Simulation der Wachstumsbedingungen in einer Kläranlage (Belebtschlammverfahren) unter axenischen Bedingungen zu gewährleisten. Das Filtrationsmodul sollte folgenden Anforderungen genügen:

1. autoklavierbar
2. vollständige Abtrennung der Bakterien
3. lange Standzeit
4. ohne Kontaminationsgefahr während des Experimentes auswechselbar
5. Filtrationsleistung weitgehend unabhängig von der Durchströmungsgeschwindigkeit

Käufliche Cross-Flow-Hohlröhrenmodule müssen zur Vermeidung von Ablagerungen auf der Membran immer mit hoher Geschwindigkeit (mind. 20 - 30 cm/s) durchströmt und mehrfach innerhalb einer Stunde rückgespült werden. Ihre Verwendung konnte somit die an meine Experimente zu stellenden Anforderungen nicht erfüllen.
Außer mit solchen laminar durchströmten Hohlfasermembranen läßt sich das Prinzip der quer überströmten Filteroberfläche auch mit Rundfiltern verwirklichen, wenn durch einen Rührer über der Filteroberfläche eine Strömung quer zur Filtrationsrichtung erzeugt wird. Die an der Filteroberfläche wirksamen Scherkräfte sind dann unabhängig von der Überströmrate des Filtriergutes.

Ein nach diesem Prinzip betriebener Probennehmer zur kontinuierlichen, aseptischen Probennahme aus Fermentationsprozessen (baugleich mit BIOPEM, Fa. Braun Melsungen) diente als Basismodell für das entwickelte und eingesetzte Filtrationsmodul (Abb. 9).
Das Filtrationsmodul bestand im wesentlichen aus einem Edelstahldeckel mit der zweifach kugelgelagerten Aufhängung des Rührmagneten, einem Glasdistanzring und einer Edelstahlbodenplatte mit einem VA-Gitter als Auflagefläche für die Filtermembran. Zu- und Ableitung der Kultursuspension erfolgte durch zwei einander gegenüberliegende Schlauchstutzen im Deckel, und das Filtrat konnte durch eine Bohrung in der Bodenplatte unter dem Stützgitter abgepumpt werden. Als Filtermembran

fanden Rundfilter (ø 90 mm) der Porenweite 0.22 µm aus PVDF (Polyvenylidendifluorid) der Fa. Millipore Verwendung. Alle Flachdichtungen waren aus 1 mm Silikonplatten gestanzt und die am Deckel und Bodenplatte eingesetzten Runddichtungen bestanden aus Viton. Der Antrieb des PTFE-beschichteten Rührmagneten erfolgte durch einen unter der Bodenplatte angeordneten Magnetrührer (IKAMAG RET-G, Fa. IKA) mit vorzugsweise 900 UpM, wobei der Glasdistanzring eine ständige Funktionskontrolle des Rührmagneten erlaubte.
Es war nun möglich, das Filtrationsmodul in Kombination mit dem 1 l-Fermenter (Kap. 2.2.1.2.) in Kulturversuchen mit Reinkulturen quasi als "Nachklärung" einzusetzen und dabei die mittleren hydraulischen Verweilzeiten des Nährmediums ("Belüftungszeiten") und die mittleren Verweilzeiten der Bakterien ("Schlammalter") einzustellen, wie sie für die Kläranlagen typisch sind. Wegen der weitgehenden Entkopplung der Filtrationsleistung von der Überströmrate des Filters waren Aufenthaltszeiten der Biomasse im Filtrationsmodul und Aufkonzentrierungsfaktoren vergleichbar dem Nachklärbecken einer Kläranlage simulierbar.



1. Ein-/Auslaß Filtriergut
2. Kugellager
3. Magnetrührstab
4. Auslaß Filtrat
5. Deckel
6. Runddichtung
7. Glasdistanzring
8. Flachdichtung
9. Filtermembran
10. Stützgitter
11. Bodenplatte

Abb. 9: Schnittzeichnung des Filtrationsmoduls

2.2.1.4. Kultursysteme und Versuchsbedingungen

Substrat:	Na-Acetat + Mineralmedium
pH:	pH-statisch 7.5 ± 0.02
Temperatur:	25 ± 0.5 °C
Rührerdrehzahl:	800 UpM
Begasungsrate:	15 - 25 l/h

2000 ml-Reaktor	1000 ml-Reaktor mit Biomasserückhaltung
Arbeitsvolumen: 1670 ml	Arbeitsvolumen: Reaktor: 880 ml Filtermodul: 134 ml gesamt: 1023 ml
<u>Versuchsbedingungen:</u> 1. batchweiser Betrieb 2. Chemostat 3. kontinuierliche Kultur mit 20 h mittlerer Verweilzeit (μ=D=0.05 h^{-1}) a) kont. Substratzugabe Dauerbelüftung b) diskont. Substratzugabe stündlich innerh. 1 min α) Dauerbelüftung β) wechselweise 20 min. N_2-Begasung/ 40 min. Luft-Begasung Substratzugabe 5 min. nach Beginn der N_2-Belüftung 4. diverse Belüftungsmodi zu Phosphatrücklöseversuchen	<u>Versuchsbedingungen:</u> 1. kont. Kultur mit vollständiger Biomasserückhaltung 2. kont. Kultur mit Biomasserückhaltung (μ=α*D) mittlere Verweilzeiten: a) hydraulisch 20 h Biomasse 20 h (α=1) b) hydraulisch 20 h Biomasse 2 d (α=0,42) c) hydraulisch 20 h Biomasse 4 d (α=0.21) d) hydraulisch 20 h Biomasse 7 d (α=0.12) 3. wie 2., jedoch diskontinuierl. Substratzugabe (1 min/h) 4. diverse Belüftungsmodi zu Phosphatrücklöseversuchen

2.2.1.5. Kulturröhren für Vorkulturen

Für Vorversuche und zur Anzucht einiger Reinkulturen für Versuche mit definierten Mischkulturen wurden Glasröhren mit verjüngtem Boden und einem Fassungsvermögen von 300 ml eingesetzt (Groeneweg und Soeder 1978). Die Kulturen wurden über einen bis in die Bodenspitze reichenden Glashohlstab mit steriler Luft begast und dadurch gleichzeitig durchmischt. Umgekehrt konnte durch Anlegen von Druckluft an das Abluftfilter der Röhreninhalt nach dem Anwachsen der Kultur kontaminationsfrei in einen Fermenter überführt werden.

2.2.1.6. Probennehmersystem und Probennahme

Das Probennehmersystem bestand aus Gewindeglasröhrchen (SVL 15, SVL 30) mit einem Blasenzählereinsatz aus Glas und einem Sterilfilter auf der Gasauslaßseite (Fingerhut 1985). Je nach Einstellung der Gasdruckdifferenzen konnte eine Probe kontaminationsfrei aus dem Fermenter gezogen oder z. B. Animpfmaterial eingebracht werden. An einem Kulturgefäß waren zwei solcher Probennehmer mit jeweils einem Volumen von 10 bzw. 100 ml über Silikonschlauch/ VA-Rohrsteckverbindungen (Kap. 2.2.1.2.) angeschlossen. Aus Sicherheitsgründen wurde vor der Probennahme auf ein Freispülen der Zuleitungen in Richtung des Kultursystems verzichtet, und stattdessen eine erste Probe von 3 - 5 ml Volumen (Totvolumen der Zuleitung) verworfen.

2.2.1.7. Kontrolle auf Fremdinfektionen

Die Kontrolle auf mögliche Fremdinfektionen erfolgte zu Versuchsbeginn und anschließend in wöchentlichem Abstand. Die Kulturen wurden mikroskopisch im Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung auf Verunreinigungen durch Fremdbakterien oder Pilze untersucht. Zusätzlich wurde die Kultur auf Nähragar plattiert und nach drei und zehn Tagen Bebrütung (22°C) kontrolliert. Infektionen durch Fremdbakterien bedingten den Abbruch der Versuche.

2.2.2. Nährlösungen

Die Nährlösung enthielt Acetat als einzige organische C-Quelle, abgesehen von der im Spurenbereich zugesetzten EDTA.

Zusammensetzung der Nährlösung:

Na-Acetat (wasserfrei)	1282 mg
NH_4Cl	400 mg
$K_2HPO_4*3H_2O$	228 mg
$MgSO_4*7H_2O$	50 mg
$CaCl_2*2H_2O$	10 mg
Fe-EDTA-Stammlösung	1 ml
Spurenelementlösung (PAZ)	1 ml
entionisiertes H_2O	ad 1000 ml

Die Fe-EDTA-Stammlösung setzt sich zusammen aus: Titriplex III (9.30 g/l) und $FeSO_4$ (6.950 g/l)

Die Spurenelementlösung wurde, wie bei Payer und Trültzsch (1972) beschrieben, hergestellt.

Zusammensetzung der Spurenelementlösung

$MnCl_2*4H_2O$	99.00 mg/l
$ZnSO_4*7H_2O$	6.30 mg/l
$NiSO_4*6H_2O$	26.30 mg/l
$CoSO_4*7H_2O$	2.81 mg/l
$CuSO_4*5H_2O$	4.99 mg/l
$Al(SO_4)_3*18H_2O*4H_2O$	6.66 mg/l
$(NH_4)6Mo_7O_{24}$	1.76 mg/l
NH_4VO_3	2.91 mg/l
KJ	249.00 mg/l
KBr	238.00 mg/l
LiCl	8.48 mg/l
H_3BO_3	30.90 mg/l

Das Medium wurde im Autoklaven bei 121°C in 10 l-Glasflaschen sterilisiert. $CaCl_2$- und Fe-EDTA-Lösung wurden getrennt autoklaviert und anschließend dem abgekühlten Medium zugegeben.
Das CSB:N:P-Verhältnis betrug 100:10:3 und C:N:P-Verhältnis 100:28:9 bei einem CSB von 1000 mg O_2/l.

2.2.3. Stammkulturen

Die Stammkulturen wurden auf Standard-I-Schrägagarröhrchen und als Stichkulturen in einer Kühlkammer bei ca. 7°C aufbewahrt. Zusätzlich wurden Kulturproben der Stämme lyophilisiert und in verschmolzenen Glasröhrchen ebenfalls in der Kühlkammer aufbewahrt. Die Schrägagarkulturen wurden nach Zwischenkultivierung in Flüssigmedium und Überprüfung auf Reinheit alle 3 - 4 Monate überimpft.

2.2.4. Vorkulturen

Zu Beginn eines neuen Kulturversuches wurde ein Abstrich von der jeweiligen Stammkultur in Flüssigmedium mit der Zusammensetzung des Kulturmediums aufgenommen. Diese Vorkultur wurde in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler oder in Kulturröhren angezogen und konnte nach Erreichen der maximalen optischen Dichte über die Probennehmer bzw. Probennehmerzuleitung in die Fermenter eingebracht werden. Wenn keine definierten Startbedingungen gefordert waren, wurden die Fermenter auch direkt mit einem in 1/4-starker Ringerlösung suspendierten Abstrich von der Stammkultur beimpft. Allerdings waren dann unbestimmt längere lag-Phasen die Folge.

2.2.5. Anreicherungskultur zur Induktion vermehrter Phosphataufnahme/- rücklösung und Isolierung von Reinkulturen

Ein Fermenter ohne Biomasserückhaltung wurde mit einer mittleren hydraulischen Verweilzeit von 20 Stunden ($D = 0.05\ h^{-1} = \mu$) mit Ethanol/Essigsäure (je 1000 mg CSB/l) als C-Quelle pH-statisch betrieben. Durch alternierende N_2/Luftbegasung wurden jeweils 20 Minuten anaerobe und anschließend 40 Minuten aerobe Milieubedingungen eingestellt. Das Substrat wurde stündlich innerhalb einer Minute zu Beginn der anaeroben Phase zugegeben. Gestartet wurde mit einem Belebtschlammgemisch aus 3 Laborkläranlagen und einer Konzentration von 0.5 g/l TRS. Die Laborkläranlagen wurden nach dem "Jülicher Verfahren" bei unterschiedlichen Temperaturen und im 1-Stunden-Zyklus, eine Anlage im 2-Stunden-Beschickungszyklus betrieben. In allen Anlagen wurde sukzedan nitrifiziert und denitrifiziert. Eine vermehrte Phos-

phatspeicherung/-rücklösung konnte zum Zeitpunkt der Belebtschlammentnahme nicht festgestellt werden, obwohl dies sonst zeitweise der Fall gewesen war (Themel 1988). Nach der Inbetriebnahme der Anreicherungskultur wurden täglich ortho-Phosphat-Ganglinien über den Zeitraum mehrerer Dosierungstakte bestimmt.
Als die Meßwerte eine deutliche Abnahme während der aeroben Phase, gefolgt von einem Konzentrationsanstieg während der anaeroben Phase, anzeigten, wurden Belebtschlammproben zur Isolierung von Reinkulturen gewonnen. Die Proben wurden homogenisiert (Potter S, Fa. Braun Melsungen) und nach Verdünnung in Ringerlösung auf Standard-I-Nähragar ausplattiert. L-Ala-Aminopeptidase und KOH-positive Kolonien (gram-negative Organismen), die zusätzlich Oxidase-negativ reagierten, wurden in Flüssigmedium (Acetat und Mineralmedium) zwischenkultiviert und nach Verdünnung erneut auf Nähragar und Acetat-Agar ausplattiert.
Auf diese Weise wurden vier Reinkulturen gewonnen, von denen ein Isolat (WD1) den in 2.1.1. aufgeführten Kriterien genügte. Es wurde desweiteren auf die Fähigkeit zur Phosphatspeicherung/-rücklösung untersucht und für die Versuche mit definierten Mischkulturen eingesetzt.

2.3. Analysen

2.3.1. Acetatbestimmung

Der Acetatnachweis erfolgte nach einer von H. Kneifel (unveröff.) entwickelten Methode an einer Reverse-Phase-Säule mit Brechungsindex-Detektion. Diese Methode besitzt den Vorteil, daß die Analyse ohne größeren Aufwand durchgeführt werden kann. Salze stören wenig, da sie unmittelbar an der Lösungsmittelfront eluiert werden. Schließlich ist auch der Zeitaufwand gering, da Essigsäure relativ früh eluiert wird.

Bedingungen: Säule: Stahlsäule (250 * 4,6 mm) gefüllt mit RP-18 (endcapped; Merck) und versehen mit einer 1 cm Vorsäule gleicher Füllung. Elutionsmittel: 0,1 % Phosphorsäure in Wasser, entgast mit Helium. Fluß: 1 ml/min (Pumpe: 510, WATERS) bei Raumtemperatur. Detektor: ERC-7511 (Brechungsindexdetektor der Firma ERC). Datenverarbeitung: Integrator Merck D-2500. Die Proben wurden nach Filtrierung (0,45 µm) automatisch injiziert (SPARCK HOLLAND 125, 100 µl Injektionsschleife).
Essigsäure läßt sich bis zu einer Konzentration von 2 ppm erfassen, die Anwesenheit von 1 ppm ist noch erkennbar.

2.3.2. Kohlenstoff-Bestimmung

2.3.2.1. Gesamtkohlenstoff (TC) und anorganischer Kohlenstoff (IC)

Die Messungen des Kohlenstoffgehaltes wurden mit einem "Dohrmann Carbon Analyzer" der Firma Xertex durchgeführt. Der organische Kohlenstoff wird bei diesem Verfahren im sauren Milieu wahlweise durch UV-Oxidation (Aufschlußeinheit DC 80) oder thermisch bei 900°C (Verbrennungsofen DC 90) aufgeschlossen und das gebildete CO_2 zusammen mit dem CO_2 aus dem Anteil des anorganischen Kohlenstoffes (IC) der Probe in einem Separator mit synthetischer Luft ausgetrieben. Der CO_2-Gehalt des getrockneten Gasstroms wird schließlich in einem IR-Detektor bestimmt und das integrierte Signal als Meßergebnis in mg Gesamtkohlenstoff (TC) pro Liter ausgedruckt. Unter Umgehung des Verbrennungsrohres (DC 90) bzw. bei ausgeschalteter UV-Lampe (DC 80) und Direkteinspritzung in den Separator kann der Gehalt der Probe an anor-

ganischem Kohlenstoff (IC) direkt bestimmt werden. Aus der Differenz zum gemessenen TC ergibt sich so der organische C-Anteil am Gesamtkohlenstoff der Probe. Vor Meßbeginn wurde das Gerät mit einer Kaliumhydrogen-phthalatlösung als C-Standard geeicht. Die Meßgenauigkeit wurde mit ± 4 % Abweichung vom Sollwert ermittelt.
Die Bestimmung des Kohlenstoff-Gehaltes der biomassehaltigen Gesamtproben erwies sich nur im thermischen Aufschluß (DC 90) als sinnvoll, da die UV-Oxidation der Biomasse zu langsam und unvollständig verlief.

2.3.2.2. Partikulärer organischer Kohlenstoff (POC) und gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)

Vergleichende Messungen der TOC-Gehalte in 0.2 µm filtrierten Proben und den Überständen der mit 26500 g (30 Min.) zentrifugierten Gesamtproben ergaben gleiche Meßwerte, so daß der partikuläre organische Kohlenstoff (POC) als Differenz aus dem TOC der Gesamtprobe und dem TOC des Überstandes der zentrifugierten Probe bestimmt werden konnte.
Die Zentrifugation der Gesamtprobe unter diesen Bedingungen erbrachte demnach einen partikelfreien Überstand, der ohne einen weiteren Filtrationsschritt zur Bestimmung der gelösten Verbindungen verwendet werden konnte. Die Biomasse wurde quantitativ in das Pellet überführt, aus dem nach Trocknung der Trockenrückstandsgehalt der Gesamtprobe bestimmt wurde (Kap. 2.3.4).

2.3.3. Phosphatbestimmung

2.3.3.1. Molybdatreaktives Phosphat

Die ortho-Phosphatbestimmung erfolgte nach der Phosphormolybdänblau-Methode. Die Farbintensität des Phosphormolybdänblau-Komplexes war dem ortho-Phosphatgehalt der Meßlösung im Bereich von 10 - 400 µg PO_4-P/l proportional, bei einer Meßgenauigkeit von ± 2.5 % Abweichung vom Meßwert (1 cm Küvette bei 880 nm).
Neben ortho-Phosphat werden aber auch andere, in kolloider bzw. oligomerer Molekülgrößenfraktion vorliegende Phosphorspezies mit erfaßt, soweit sie von organischer Matrix abgespalten und reaktiv (= anfärbbar) werden (Hütter 1984; Meltzer und Steinberg, 1983).

2.3.3.2. Gesamtphosphatbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtphosphorgehaltes der Proben wurde weitestgehend gemäß DEV (1988 S12) durchgeführt. Anders als im DIN-Verfahren vorgesehen, wurden jedoch nicht Trockenrückstände sondern Biomassesuspension aufgeschlossen. Der Aufschluß erfolgte durch saure Hydrolyse (2 h, 100°C) mit Salzsäure/Salpetersäure (genaue Beschreibung bei Knappertsbusch 1990). Nach dem Aufschluß liegen die Phosphorverbindungen nahezu vollständig in löslicher Form als ortho-Phosphat vor, und ihr Gesamtgehalt kann als molybdatreaktives Phosphat bestimmt werden.
Der Phosphatgehalt der Biomasse wurde als Differenz aus dem Phosphatgehalt der Gesamtprobe und dem Phosphatgehalt des partikelfreien Überstandes nach Zentrifugation bestimmt.

2.3.4. Trockenrückstandsbestimmung

Alle Trockenrückstandsbestimmungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Dazu wurden 2 x 25 ml Bakteriensuspension in verschließbaren Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen in einer Zentrifuge bei 13000 UpM (27880 g) 30 Minuten (SORVALL RC-5B; Rotor HB-4) zentrifugiert. Jeweils etwa 2 x 15 ml Überstand wurden für weitere Analysen entnommen und eingefroren. Der restliche Überstand wurde verworfen und die Zentrifugenröhrchen mit den Pellets bei -20°C eingefroren und anschließend 20 h lyophilisiert. Nach Entnahme aus der Gefriertrocknungsanlage erfolgte eine 3 h Aufbewahrung im Exsikkator über trockenem Silikagel. Zur nachfolgenden Wägung konnten die so getrockneten Pellets vollständig aus den Zentrifugenröhrchen auf Wägepapier übertragen werden. Die Abweichungen der beiden Meßwerte vom Mittelwert waren immer < 2 %.
Verglichen mit anderen getesteten Methoden zur Bestimmung des Trockenrückstandsgehaltes, wie:

- Filtration durch 0.2 µm Filter mit anschließender Trocknung bei 105°C und Wägung des Filters mit und ohne Biomasse,
- Zentrifugation und Trocknung des Pellets bei 105°C im Trockenschrank
- Trocknung einer Gesamtprobe bei 105°C bis Gewichtskonstanz

erbrachte die oben beschriebene Methode die mit Abstand zuverlässigsten Ergebnisse.

Zudem gewährleistete die Abtrennung der Biomasse durch Zentrifugation mit 28000 g einen partikelfreien Überstand, der ohne einen Filtrationsschritt für weitere Analysen verwendet werden konnte (Kap. 2.3.2.2.).

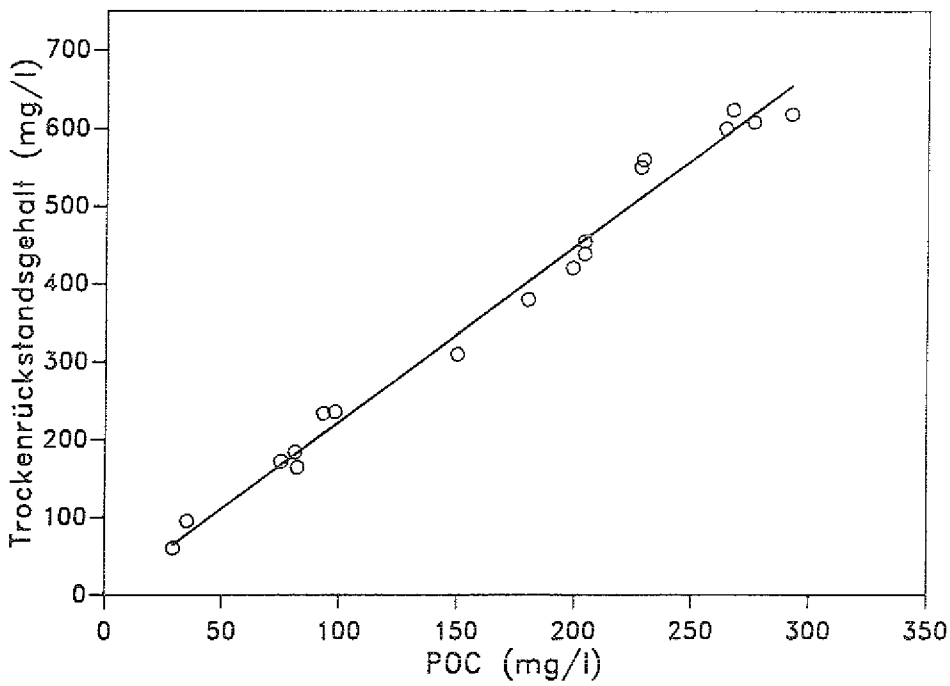


Abb. 10: Korrelation zwischen dem Trockenrückstandsgehalt und dem POC der untersuchten Proben.

Die gemeinsame Auftragung der Trockenrückstandsgehalte und des partikulären organischen Kohlenstoffs (POC) ergab die aus Abb. 10 ersichtliche Beziehung. Der mittlere C-Gehalt am TRS betrug 46 %.

2.3.5. Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte wurde im Zweistrahl-Spektralphotometer (Kontron, Uvikon 820) in planparallelen Küvetten (d = 1 cm) bei 630 nm gemessen. Gemäß DEV (1988 C1/C2)) liefert die Photometeranzeige das spektrale dekadische Absorptionsmaß und nach Division durch die Schichtdicke der Küvette den spektralen dekadischen Schwächungskoeffizienten. Dieser

ergibt sich aus der Summe des spektralen Streukoeffizienten und des spektralen Absorptionskoeffizienten. Da bei der gewählten Wellenlänge und Schichtdicke kein Extinktionsunterschied zwischen Nährlösung, Kulturfiltrat (0.2 µm) und destilliertem Wasser meßbar war, konnte der spektrale Absorptionskoeffizient als Größe für die Färbung vernachlässigt werden und die gemessene Extinktion war allein auf Lichtstreuung und Schwächung aufgrund der abfiltrierbaren Partikel (= Bakterien) zurückzuführen. Als optische Dichte wurden die angezeigten Extinktionswerte definiert. Sie verhielten sich bis $O.D._{630} \leq 0.3$ proportional zur Biomassekonzentration. Bei Werten > 0.3 wurden die Proben verdünnt.

2.3.6. Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsraten

2.3.6.1. Versuchsaufbau

Die Sauerstoffverbrauchsraten der Bakterienkulturproben wurden durch die Messung der Abnahmerate des gelösten Sauerstoffs der Suspension in einem geschlossenen, gasraumfreien System bestimmt (Reinhard u. Rüffer 1983, Chudoba et al. 1985, DEV (1988 S6). Die dazu nach meinen Angaben gefertigte Meßkammer bestand aus einer doppelwandigen, zylindrischen Plexiglasmeßzelle mit 70 ml Zellvolumen. Über einen seitlichen Stutzen wurde der Meßkopf einer Membran-Sauerstoffelektrode (6000 PPC, Firma Syland) im Meßraum plaziert und das analoge Meßsignal des zugehörigen Meßverstärkers mittels eines Linienschreibers aufgezeichnet.
Von oben wurde die Meßzelle durch einen mit einem vorstehenden, zentral durchbohrten Innenkonus versehenen Deckel verschlossen. Beim Aufsetzten des Deckels wurde so die überschüssige Kulturflüssigkeit samt Luftblasen durch die zentrale Bohrung verdrängt. Die dünne Bohrung ermöglichte außerdem die Substratzugabe. Der durch die Bohrung stattfindende Sauerstoffeintrag war vernachlässigbar.
Zur ausreichenden Durchmischung der Probe und zum Erreichen der Mindestanströmgeschwindigkeit (30 cm/s) für die O_2-Elektrode stand die ganze Meßkammer auf einem Magnetrührer, welcher einen in die Probe eingebrachten Rührmagneten mit 600 UpM antrieb. Eine konstante Temperatur von 25°C während der Messungen wurde durch ein thermostatisiertes Wasserbad mit Umwälzung durch den Doppelmantel der Meßzelle gewährleistet.

2.3.6.2. Durchführung und Auswertung

Vor Beginn der Respirationsmessungen wurden 80 ml Kulturprobe entnommen und temperaturkonstant (25°C) 30 Minuten lang belüftet. Die nach dem Verschließen der Meßzelle ermittelte konstante Abnahmerate der Gelöstsauerstoffkonzentration wurde als Grundatmungsrate definiert. Nach Zugabe von jeweils 1 ml Substrat in aufsteigenden Konzentrationen der C-Quelle wurden die zugehörigen Zehrungsraten graphisch ermittelt und ihre Differenz zur Grundatmungsrate als Substratatmungsrate der entsprechenden Substratendkonzentration in der Meßzelle definiert. Eine erneute Substratzugabe erfolgte immer erst nach Erreichen der Grundatmungsrate. Wenn die Gelöstsauerstoffkonzentration den Wert von 1 mg O_2/l unterschritt, wurde die Probe erneut für 30 Minuten im Wasserbad belüftet. Das zur Messung eingesetzte Substrat entsprach in der Zusammensetzung, mit Ausnahme der variierten Acetatkonzentration, der des Kulturmediums. Aus der Dosierung von 1 ml des unverdünnten Substrates resultierte die gleiche Endkonzentration Acetat in der Meßzelle, wie nach der Substratzugabe bei den Kulturversuchen mit diskontinuierlicher Substratzugabe. Die so ermittelten Substratsauerstoffverbrauchsraten R wurden in spezifische Raten umgerechnet (bezogen auf 1 mg Biomasse C) und gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen S in doppelt reziproker Auftragung (nach Lineweaver-Burk) geplottet. Aus den Schnittpunkten der Regressionsgerade mit der 1/R-Achse bzw. 1/[S] Achse wurden R_{max} (Sauerstoffverbrauchsrate bei Substratsättigung) und K_m (Substratkonzentration bei halbmaximaler Sauerstoffverbrauchsrate) bestimmt.

2.3.7. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)

Die Kulturproben wurden in steriler Ringer-Lösung auf eine geschätzte Endkonzentration von etwa 100 koloniebildenden Einkeiten (KBE) pro ml verdünnt. Davon wurde 1 ml auf eine Standard-I-Nähragarplatte (9 cm) pipettiert und nur durch Schwenken der Platte ohne die Verwendung eines Spatels gleichmäßig verteilt. Beste Resultate ergaben Platten, die 7 - 10 Tage zuvor gegossen worden waren, so daß der Feuchtegehalt des Agars es zuließ, die Probenmenge spätestens innerhalb von 1/2 Stunde vollständig aufzunehmen. Aus einer Probe und einem Verdünnungsschritt wurden so jeweils 5 Platten beimpft. Ausgewertet wurden später die Platten, mit mindestens 30 jedoch höchstens 500 KBE.

2.3.8. Quantitative Bestimmung der Populationsanteile in definierten Mischkulturen

Die zellmorphologischen Unterschiede der untersuchten Bakterienstämme reichten für eine differenzierte mikroskopische Auswertung der Populationsanteile nicht aus. Deshalb wurden die nach Ausplattieren auf Standard-I-Agar heranwachsenden Makrokolonien zur Auswertung herangezogen.
Während trotz ähnlicher Koloniemorphologie die Unterscheidung unterschiedlich schnell wachsender Stämme (*Pseudomonas fluorescens*/ Isolat WD1) einfach war, gestaltete sich die Bestimmung der Mischkulturanteile bei etwa gleich schnell wachsenden Organismen (*Pseudomonas fluorescens*/ *Acinetobacter sp.*) schwieriger. Es wurde daher in diesem Fall ein biochemisches-physiologisches Unterscheidungsmerkmal, das Vorhandensein der Cytochrom-c-Oxidase, zur Differenzierung herangezogen (Kap. 2.3.8.1.)

2.3.8.1. Modifizierter Oxidase-Test zur Unterscheidung der Makrokolonien

Papierrundfilter (MN 90 mm ø, Fa. Macherey und Nagel) wurden in eine Lösung aus 1 mg/l N,N-Dimethyl-1.4-Phenylendiammoniumchlorid und 10 mg/ 1Naphthol getaucht und anschließend unter dem Abzug getrocknet. Nach einem Abdruck von einer Agarplatte mit angewachsenen Makrokolonien (~2mm ø) einer Mischkultur Oxidase-positiver und Oxidase-negativer Bakterienstämme (hier: *P. fluorescens* (Ox^+) und *Acinetobacter sp.* (Ox^-), färbten sich nach etwa 20 - 60 Sekunden. die Kolonieabdrücke des Oxidase-positiven Stammes blau bis blauviolett. Die Anteile des Oxidase-negativen Stammes an der Gesamtkoloniezahl ergaben sich daher aus der Differenz der blaugefärbten Abdrücke zur Gesamtkoloniezahl.

2.3.8.2. Unterscheidung nach Wachstumsgeschwindigkeit/Koloniegröße

Die einfachste und genaueste Unterscheidungsmöglichkeit war durch die Unterschiede in der Wachstumsrate des Isolates WD1 einerseits und *Pseudomonas fluorescens* oder *Acinetobacter sp.* andererseits auf Standard-I-Agarplatten gegeben. Nach dem Ausplattieren einer Mischkultur-

suspension von *P. fluorescens* und dem Isolat WD1 konnten nach 2 Tagen (22°C) bereits die Kolonien des *Pseudomonas*-Stammes ausgezählt werden, bevor die Kolonien des Isolates erkennbar wurden.
Dadurch war es möglich, auch beliebig geringe Populationsanteile (z.B. ≤ 1 %) des *P. fluorescens* an einer Mischpopulation mit WD1 über unterschiedliche Verdünnungsstufen quantitativ zu erfassen. Umgekehrt war es so aber nicht möglich, einen Populationsanteil des Isolates WD1, der deutlich unter dem Anteil des *Pseudomonas* lag, hinreichend genau erfassen zu können.
Der Ermittlung der Wiederfindungsraten dienten Mischungsversuche mit Reinkulturen. In Flüssigkulturen von *P. fluorescens* und WD1 wurden die jeweiligen Organismenkonzentrationen in Form von koloniebildenden Einheiten pro ml bestimmt. Aliquots unterschiedlicher Mischungsverhältnisse der beiden Kulturen wurden ausplattiert und die ausgezählten Populationsanteile mit den theoretisch zu erwartenden Anteilen verglichen.

3.0. Ergebnisse

3.1. Mikrobiologie und Wachstumsphysiologie der Testorganismen

3.1.1. Isolat *Acinetobacter sp.*

3.1.1.1. Morphologische und physiologische Charakterisierung

Bei *Acinetobacter sp.* handelte es sich um ein gram-negatives, unbewegliches Bakterium von coccoider bis kurzstäbchenförmiger Gestalt, welches aus dem Belebtschlamm einer Laborkläranlage isoliert worden war (Garrido 1987). *Acinetobacter* unterscheidet sich von taxonomisch nahestehenden Gattungen innerhalb der Familie der *Neisseriaceae* (z.B. *Moraxella*, *Neisseria* u.a.) durch die negative Oxidase-Reaktion (Bergey's Manual 1983). Desweiteren ist *Acinetobacter* ein obligat aerobes Bakterium, was die Unterscheidung von den *Enterobacteriaceae* ermöglicht. Die meisten Stämme von *Acinetobacter* wachsen in Nährmedien, die nur eine einzige Kohlenstoff- und Energiequelle (z.B. Acetat) enthalten und sie können Ammonium oder Nitrat als N-Quelle nutzen; sie benötigen keine Vitamine oder Wachstumsfaktoren. D-Glukose ist die einzige Hexose, D-Ribose, D-Xylose und L-Arabinose die einzigen Pentosen, welche von einigen wenigen Stämmen verwertet werden können (Bergey's Manual 1983).
Bakterien der Gattung *Acinetobacter* wird die Hauptrolle bei der vermehrten biologischen Phosphorelimination in Kläranlagen zugeschrieben (siehe Kap. 1.3.).

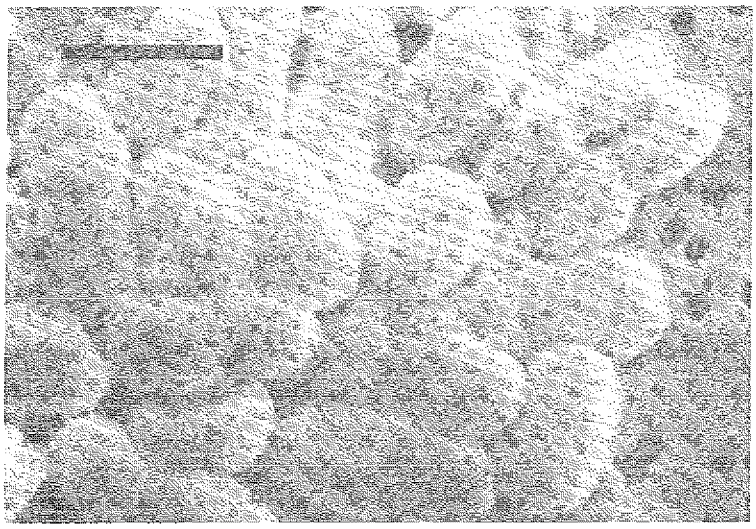


Abb. 11: REM-Aufnahme von *Acinetobacter sp.*
Markierung enspricht 1 µm

Die Bakterien bildeten auf Standard-I-Nähragar weiße, kreisförmige, konvex bis kugelförmige Kolonien, die radiär gefurcht waren.
Die koloniemorphologischen und zellmorphologischen Merkmale wurden zur Reinheitsüberprüfung der Kulturen während der Versuche herangezogen. Eine deutliche Ausprägung und Erkennung der Koloniemorphologie setzte einen Koloniedurchmesser von 2 - 3 mm voraus, und war deshalb nur auf Platten mit weniger als etwa 100 koloniebildenden Einheiten möglich. Zur Identifizierung und zur Überprüfung der Stammkulturen wurden zusätzlich die konventionellen biochemischen Merkmale aufgrund unterschiedlicher Stoffwechselleistungen bestimmt.

Gram-Reaktion[1)]	-	Arginindihydrolase	-
L-Ala-Aminopeptidase	+	Ornithindecarboxylase	-
KOH-Test	+	Lysindecarboxylase	-
Cytochrom-c-Oxidase	-	H_2S-Bildung	-
Katalase	+	Voges-Proskauer	-
Indol	-	Gelatineverflüssigung	-
Urease	-	Denitrifikation[2)]	-

1) nach KOH-Test und Test auf L-Ala-Aminopeptidase
2) Gasbildung in Nitrat-Nährbouillon

Tab. 3: Konventionelle biochemische Merkmale von *Acinetobacter sp.*

Im Kohlenhydratverwertungstest konnte *Acinetobacter sp.* keines der angebotenen 46 Kohlenhydrate (vgl. Tab. 2) vollständig verwerten. Dieser Befund wurde als zusätzliches Identifizierungsmerkmal und zur Überprüfung der Stammkulturen auf Reinheit herangezogen.

3.1.1.2. Wachstum in Batch-Kultur

Die Batch-Kultur (= statische Kultur) ist geeignet, die maximale Wachstumsrate μ_{max} des kultivierten Bakterienstammes unter den gewählten Milieufaktoren (z.B. pH, Temperatur, Durchmischung, Substrat, Substratkonzentrationen) zu bestimmen (Schlegel 1981). Das Wachstum in einer solchen Batch-Kultur ist u.a. gekennzeichnet durch eine drastische Abnahme der spezifischen Biomassebelastung während der exponentiellen Wachstumsphase, bei gleichzeitiger Anhäufung von Stoffwechselprodukten. Eine dennoch konstante maximale Teilungsrate ist für den Zeitabschnitt gegeben, der sich in logarithmischer Auftragung als lineare Zunahme der Bakteriendichte darstellt.
Die maximale Wachstumsrate μ_{max} für *Acinetobacter sp.* wurde unter den in 2.2.1.4. aufgeführten Versuchsbedingungen im pH-statisch betriebenen Reaktor ermittelt.

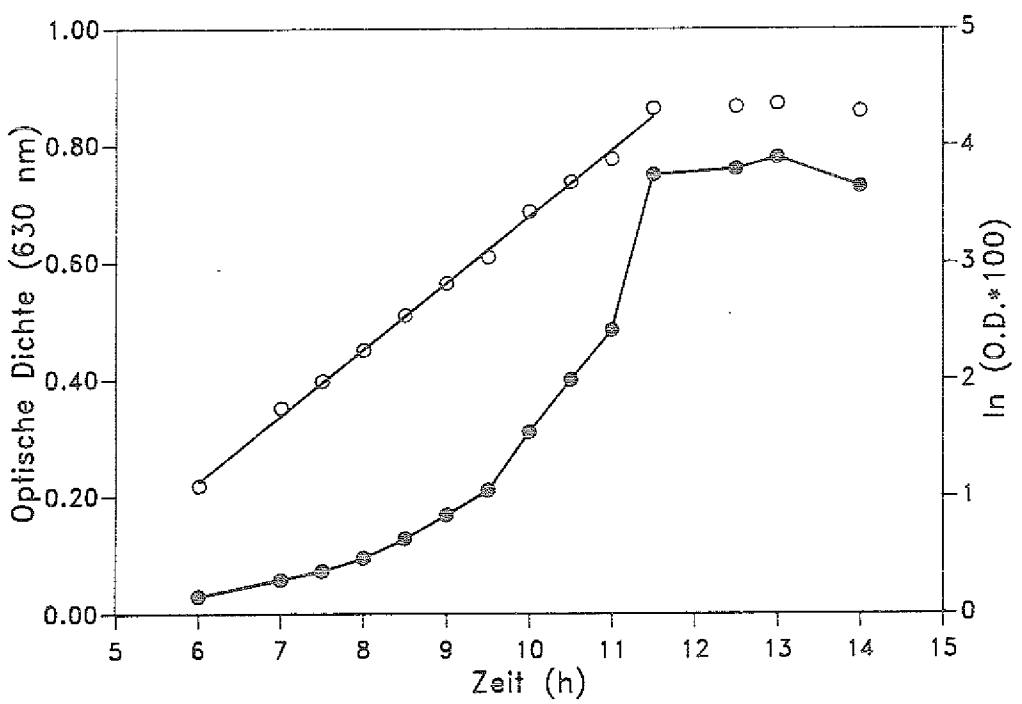


Abb. 12: *Wachstum von Acinetobacter sp.* in Batch-Kultur
lineare und log. Auftragung der $O.D._{630}$ gegen die Zeit.

Die so ermittelte maximale Wachstumsrate μ_{max} betrug

$$0.54\ h^{-1},$$

entsprechend einer Verdoppelungszeit von

$$t_d = \ln 2/\mu = 1.28\ h$$

3.1.1.3. Wachstum in kontinuierlicher Kultur

Die kontinuierliche Kultur (Chemostat) stellt im Gegensatz zur Batch-Kultur ein offenes System dar, in dem im Zustand des Fließgleichgewichtes für die Organismen zeitlich unabhängig weitestgehend konstante Milieubedingungen herrschen (Pirt 1975).
Da sich bei einer gegebenen Verdünnungsrate D des Kulturmediums im Fließgleichgewicht immer eine substratkontrollierte Wachstumsrate μ entsprechend $\mu = D$ einstellt, lassen sich die Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen, anders als in der Batch-Kultur, bei unterschiedlichen, konstanten Wachstumsraten untersuchen.
Acinetobacter sp. wurde im Chemostat unter den in 2.2.1.4. aufgeführten Versuchsbedingungen (2 l-Reaktor) kultiviert. Ferner wurden unterschiedliche Fließgleichgewichte von niedrigen zu höheren Verdünnungsraten D eingestellt.

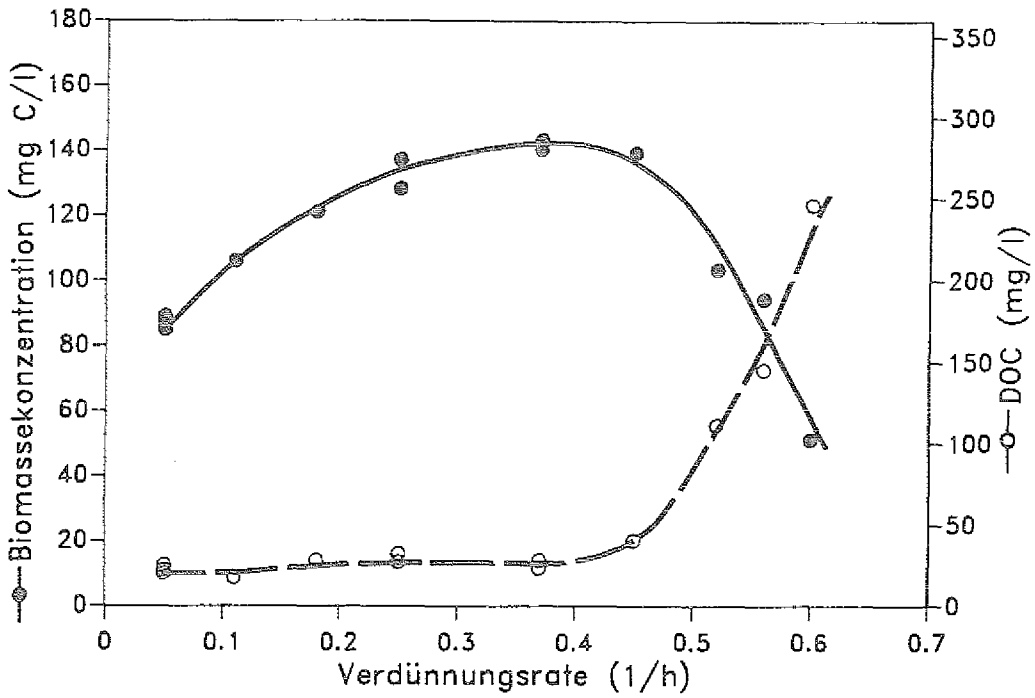


Abb. 13: ***Acinetobacter sp.*** **in kontinuierlicher Kultur**
Auftragung der Biomassekonzentration und der DOC-Konzentration gegen die Verdünnungsrate D

Die Biomassekonzentration nahm mit zunehmender Verdünnungsrate zu, erreichte bei D = 0.37 h^{-1} ein Maximum von 141 mg C/l und verringerte sich dann auf 51 mg C/l bei D = 0.6 h^{-1}. Bei D > 0.6 h^{-1} wurden die Bakterien ausgespült.

Der Ertragskoeffizient wurde aus dem Substratverbrauch und der daraus resultierenden Biomassekonzentration für die eingestellten Verdünnungsraten auf Kohlenstoffbasis bestimmt:

$$Y = \frac{\text{gebildete Biomasse (mg C)}}{\text{zugeführter Substratkohlenstoff (mg C) - verbliebener DOC}}$$

Y gibt also den Ausnutzungsgrad des Substrates zur Bildung von Zellsubstanz an.

Der Ertragskoeffizient wurde mit zunehmenden Verdünnungsraten größer und erreichte mit 0.4 ab einer Verdünnungsrate von D = 0.37 h^{-1} seinen höchsten Wert.

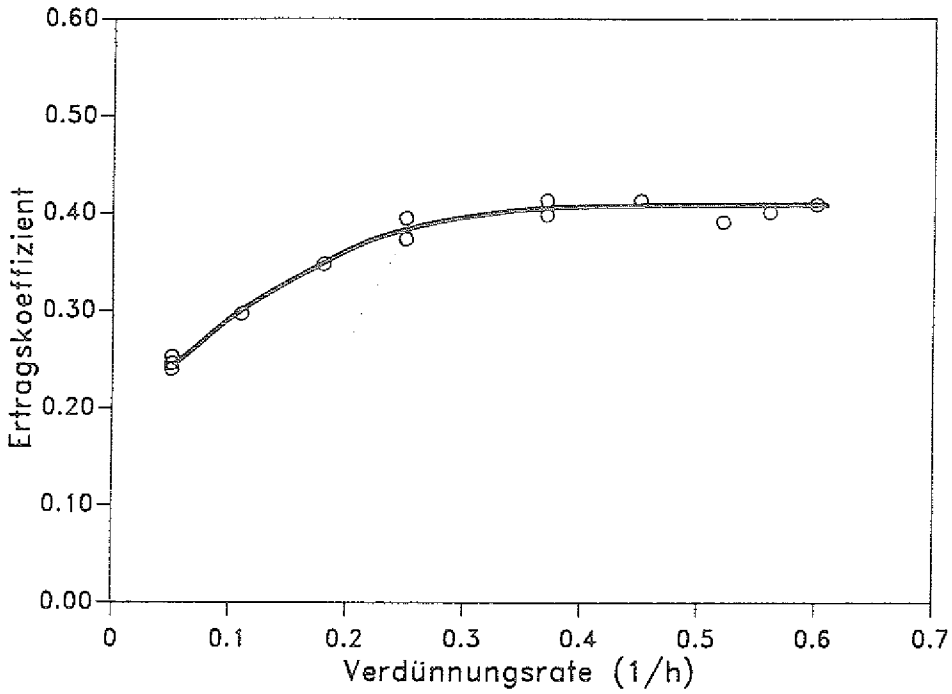


Abb. 14: Ertragskoeffizient von *Acinetobacter sp.* in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate

Die Abnahme des Ertragskoeffizienten mit abnehmenden Verdünnungsraten bedeutete, daß das Substrat immer weniger effektiv für das Wachstum verwendet wurde. Nach Pirt (1965) wird unabhängig von der Wachstumsrate immer ein Teil des Substrates für den Erhaltungsstoffwechsel verbraucht und steht deshalb nicht zur Bildung neuer Zellsubstanz zur Verfügung. Mit zunehmender Wachstumsrate wird der Anteil der für den Erhaltungsstoffwechsel benötigten Energie immer geringer, was die Zunahme des Ertragskoeffizienten mit Erhöhung der Verdünnungsraten erklärt.

Aus der Auftragung der Werte in Abb. 15 nach Pirt (1965) lassen sich der Koeffizient des Erhaltungsstoffwechsels und der theoretische maximale Ertragskoeffizient ermitteln:

$$1/Y = 1/Y_M + m\ 1/D$$

Y = gemessener Ertragskoeffizient

Y_M = theoretischer maximaler Ertragskoeffizient

m = Koeffizient des Erhaltungsstoffwechsels

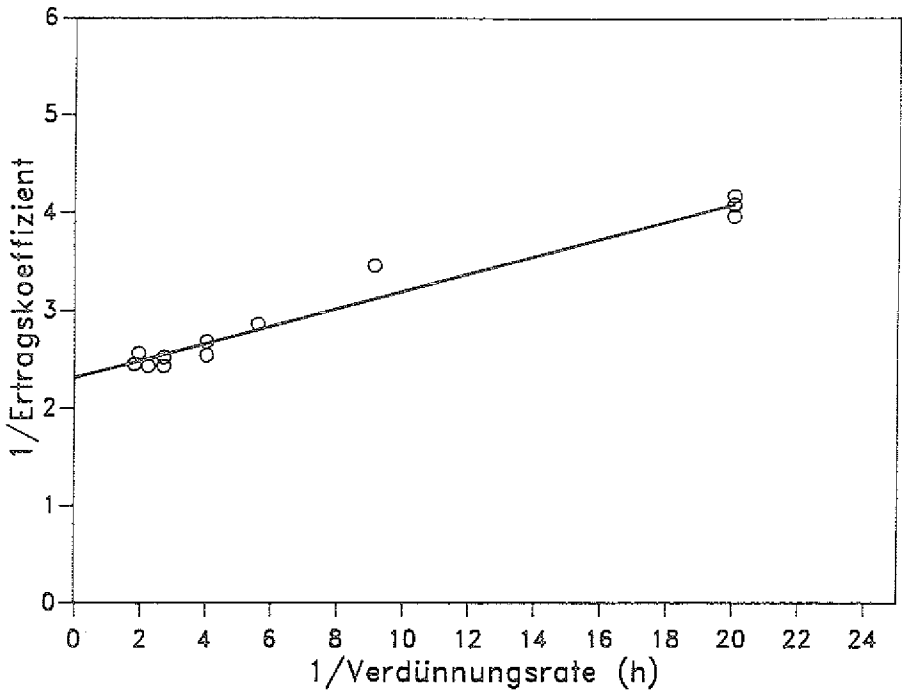


Abb. 15: Auftragung der Werte aus Abbildung 14 nach Pirt (1965)

Die linearisierte Auftragung nach Pirt liefert für $m = 0.09\ h^{-1}$ und für den theoretischen maximalen Ertragskoeffizienten $Y_M = 0.43$.

3.1.1.4. Kontinuierliche und diskontinuierlich Substratzugabe bei einer ausgewählten Verdünnungsrate

Zur Untersuchung der Auswirkungen diskontinuierlicher Substratzugabe auf Wachstum und Aktivität von *Acinetobacter sp.* wurden parallel zwei Chemostaten mit kontinuierlicher Substratzugabe betrieben. Nach Erreichen der Fließgleichgewichte wurde einer der Reaktoren auf diskontinuierliche Substratbeschickung umgestellt. Die mittlere Verweilzeit war mit 20 h für beide Kultursysteme gleich, wobei jedoch dem einen Reaktor nach der Umstellung die vorher in einer Stunde kontinuierlich zugeführte Substratmenge innerhalb einer Minute zugeführt wurde.

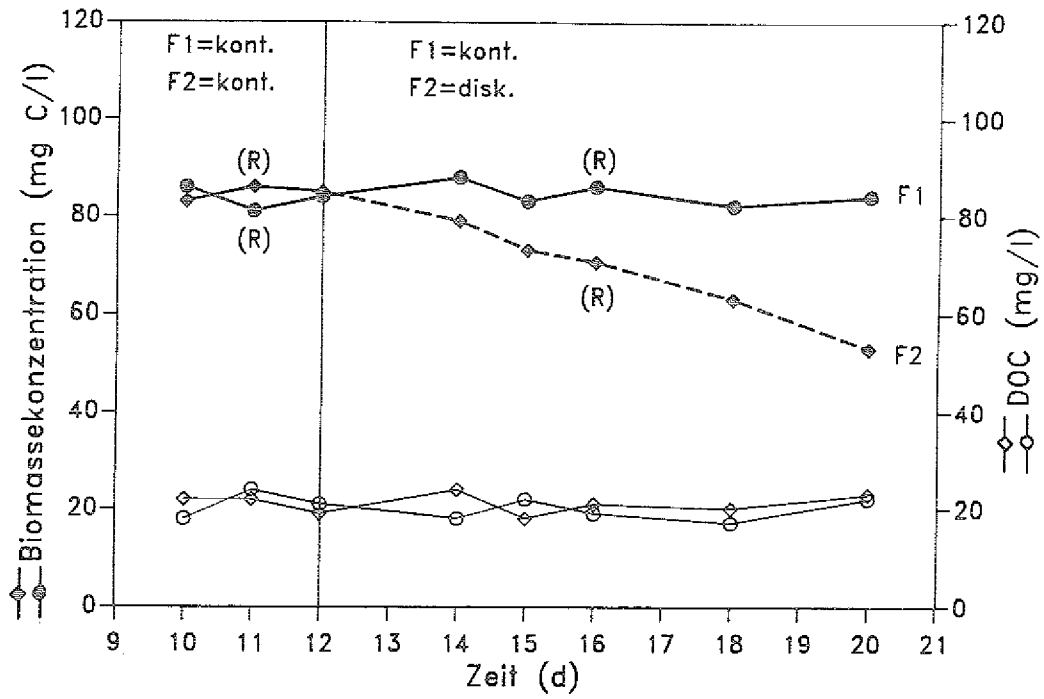


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der Biomassekonzentration und des DOC im Fermenter 1 mit kontinuierlicher Substratzugabe (F1=kont.) und im Fermenter 2 mit kontinuierlicher - (F2=kont.) und diskontinuierlicher Substratzugabe (F2=disk.)
(R) markiert die Zeitpunkte, zu denen Biomasse für die Respirationsmessungen entnommen wurde

In beiden unabhängig voneinander betriebenen Reaktoren stellte sich bei kontinuierlicher Substratzugabe die gleiche Biomassekonzentration ein (x = 86 mg C/l). Der Ertragskoeffizient betrug 0.25. Die gemessenen Abweichungen zwischen den beiden Kulturen waren dabei nicht größer als die Konzentrationsunterschiede der Biomasse in einem Kultursystem innerhalb des Fließgleichgewichtes.

Nach dem Umschalten des einen Fermenters auf intermittierende Substratzugabe (F2 = disk.) nahm die Konzentration an frei suspendierten Bakterien ab. Dabei kam es zu Schaumbildung, starkem Wandwachstum und zur Bildung von Zellaggregaten. Die gleichen Phänomene waren anschließend nach der Umstellung des Vergleichsreaktors auf diskontinuierliche Substratzugabe zu beobachten (in Abb. 16 nicht dargestellt).

Da ein Anteil der Bakterienmasse durch Wandwachstum und Schaumbildung von der hydraulischen Verweilzeit entkoppelt war, konnte der Ertrag der Bakterienverwertung unter diesen Bedingungen nicht bestimmt werden.

Als ein Maß für die Aktivität der Bakterien unter diesen Betriebsbedingungen wurden zu den in Abb. 16 angegebenen Zeitpunkten Bakterienproben entnommen und die Sauerstoffverbrauchsraten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt. (Abb. 17, Tab. 2).

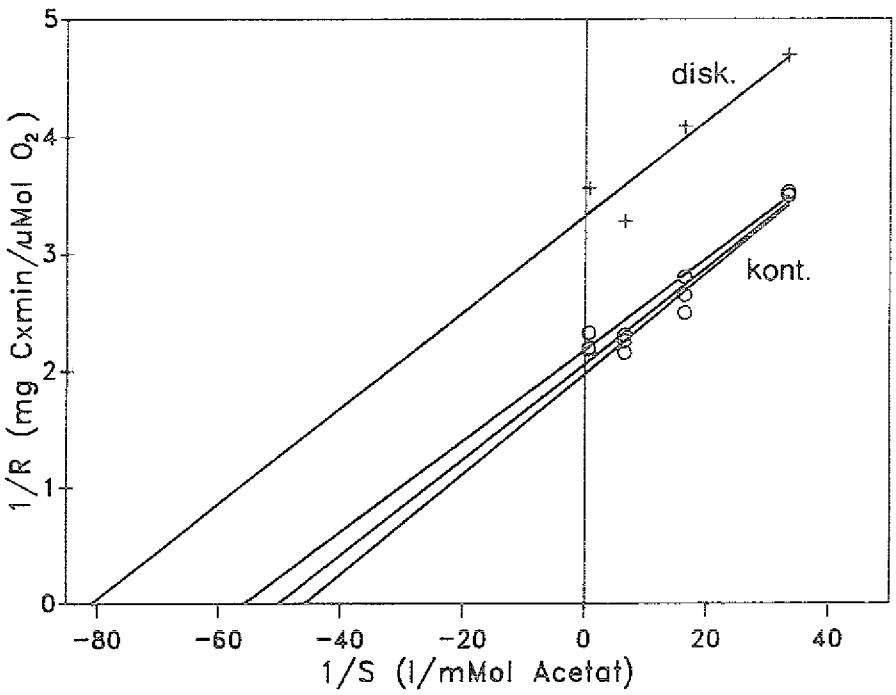


Abb. 17: Sauerstoffverbrauchsraten von *Acinetobacter sp.* in Abhängigkeit von der Acetatkonzentration
Auftragung nach Lineweaver-Burk

Fermenter 1			Fermenter 2		
	R_{max} 1)	K_m 2)		R_{max} 1)	K_m 2)
kont.	487	20	kont.	460	18
kont.	508	22	disk.	301	12

1) nMol Acetat/ mg Biomasse C * min.
2) µMol Acetat/l

Tab. 4: Maximale Respirationsraten und Halbsättigungskonzentrationen von *Acinetobacter sp.* für Acetat

Die für die Biomasse aus kontinuierlicher Kultur in unabhängigen Ansätzen ermittelten maximalen Respirationsraten R_{max} und Halbsättigungskonzentrationen K_m stimmten gut überein. Der mit durchschnittlich 20 µMol Acetat/l sehr niedrige K_m-Wert deckte sich mit dem Befund, daß in kontinuierlicher Kultur bis zu hohen Verdünnugsraten ($D < 0.4\ h^{-1}$) kein Acetat im Kulturfiltrat nachgewiesen wurde.
Die spezifischen Respirationsraten der Biomasse aus dem Fermenter mit diskontininuierlicher Substratzugabe waren bei allen Substratkonzentrationen deutlich kleiner als die Respirationsraten der Biomasse aus kontinuierlicher Kultur für gleiche Substratkonzentrationen. Als Ursache dafür kann die beobachtete Bildung von Zellaggregaten und ein daraus resultierendes ungünstigeres Oberflächen/Volumen-Verhältnis, verglichen mit suspendierten Einzelzellen, angenommen werden.
Die Bakterien waren nach Zugabe der höchsten Acetatkonzentration wahrscheinlich substratgehemmt (Abb. 17). Deshalb waren die K_m-Werte möglicherweise tatsächlich größer und die Unterschiede zwischen den für Bakterien aus Systemen mit kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe ermittelten K_m-Werte geringer als die berechneten K_m-Werte unter Einbeziehung der Respirationsraten nach Zugabe der höchsten Acetatkonzentration.
Diese Ergebnisse werden in Kap. 4.1., insbesondere im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Bakterienspezies weiter diskutiert werden.

3.1.1.5. Phosphataufnahme und -rücklösung

Die Fähigkeit zur vermehrten biologischen P-Elimination gemäß der eingangs beschriebenen Hypothese (Kap. 1.3.) wird insbesondere Bakterienstämmen der Gattung *Acinetobacter* zugeschrieben (Rensink et al. 1984, Wentzel et al. 1986). Unter aeroben Kulturbedingungen ohne Phosphatlimitierung sollten solche Stämme schon einen P-Gehalt aufweisen, der deutlich über dem P-Gehalt sonstiger Bakterienspecies liegt. Van Groenestijn (1988) konnte in Versuchen mit verschiedenen Stämmen von *Acinetobacter calcoaceticus* nur für diejenigen Stämme unter anaeroben Bedingungen eine ortho-Phosphatfreisetzung messen, die unter aeroben Wachstumsbedingungen einen überdurchschnittlich hohen P-Gehalt aufwiesen (bis zu 10 % am TRS).
Der von mir kultivierte Stamm von *Acinetobacter sp.* erreichte in kontinuierlicher Kultur lediglich einen mittleren Gehalt von 2.5 - 3 % am TRS.

Eine Abhängigkeit von der Wachstumsrate war nicht erkennbar.

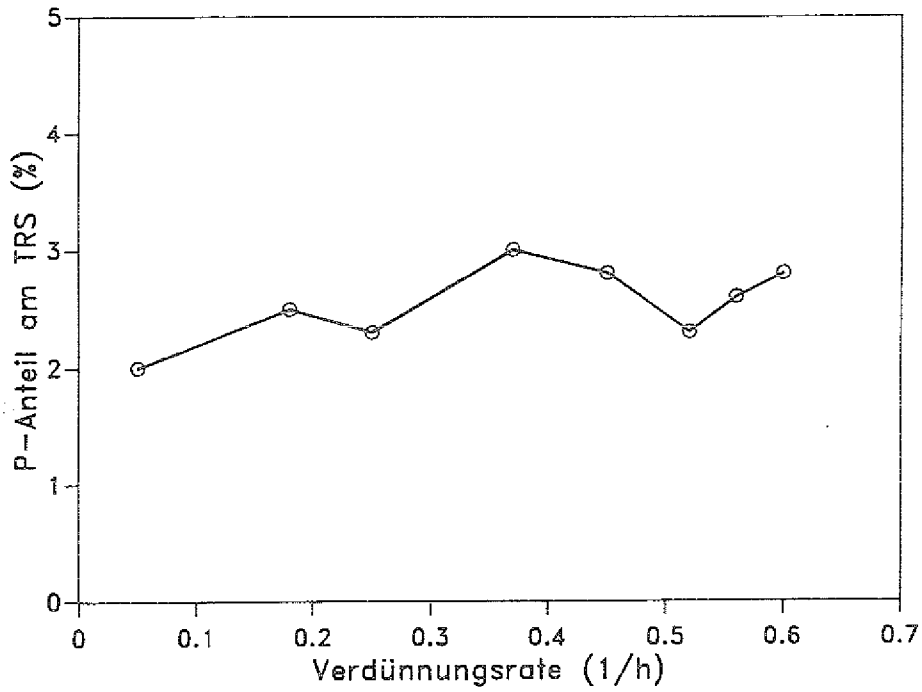


Abb. 18: % P-Gehalt des Trockenrückstandes von *Acinetobacter sp.* in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate im Chemostaten
Berechnet aus der ortho-Phosphatdifferenz zwischen Nährlösung und Kulturfiltrat

Obgleich die gemessenen relativ niedrigen Phosphatgehalte keine vermehrte Phosphataufnahme durch *Acinetobacter sp.* anzeigten, wurde weiter untersucht, ob unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit einer verwertbaren Kohlenstoffquelle (Acetat) eine ortho-Phosphatfreisetzung erfolgte:

Zum einen wurde in einer Batch-Kultur während der logarithmischen Wachstumsphase von Luft auf N_2-Begasung umgeschaltet, und im zweiten Fall wurde eine kontinuierliche Kultur bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.05\ h^{-1}$ von Luft auf N_2-Begasung umgestellt, wonach noch Kulturmedium bis zu einer resultierenden Endkonzentration von 20 mg/l Acetat-C zugegeben wurde. Die über einen Zeitraum von 6 Stunden nach Umstellung halbstündlich bestimmte ortho-Phosphatkonzentration im Kulturfiltrat erbrachte jedoch für beide Versuche keinen Hinweis auf eine Phosphatfreisetzung durch die Biomasse. Auf eine Darstellung der Meßergebnisse wird deshalb verzichtet.

Der Überlegung einer möglicherweise notwendigen Induktion der Ausprägung zur vermehrten P-Aufnahme und -Rücklösung wurde in einem abschließenden Versuch mit diskontinuierlicher Substratzugabe unter wechselweise anaeroben/aeroben Milieubedingungen Rechnung getragen (Kap. 2.2.1.4. 2 l-Fermenter 3.b.ß).
Nach einem Adaptionszeitraum von 3 Aufenthaltszeiten (2.5 Tage) wurde die anaerobe Phase auf 6 Stunden ausgedehnt und die ortho-Phosphatänderung im Kulturfiltrat bestimmt. Auch unter diesen Kulturbedingungen war keine Phosphatrücklösung meßbar.
Einer Verlängerung des Adaptionszeitraumes mit diskontinuierlicher Substratzugabe und intermittierender Belüftung schien wegen der zuvor genannten Reaktionen von *Acinetobacter sp.* auf diese Betriebsweise (Flockung, Wandwachstum, Schaumbildung) nicht sinnvoll.

3.1.2. Isolat WD1

Das als *Acinetobacter sp.* identifizierte Isolat aus einer Laborkläranlage war nach den oben aufgeführten Experimenten wegen der fehlenden Fähigkeit, vermehrt Phosphat zu speichern und rückzulösen und insbesondere wegen der Neigung zu starkem Wandwachstum und Aggregatbildung bei diskontinuierlicher Substratzugabe für die geplanten Versuche mit definierten Mischkulturen wenig geeignet.
Aus diesem Grunde wurde weiterhin versucht, in einer Anreicherungskultur eine vermehrte Phosphataufnahme und -rücklösung zu induzieren und daraus geeignete Isolate für die weiteren Experimente zu isolieren.
Die Kulturbedingungen und Isolationsschritte sind in Kapitel 2.2.5. beschrieben worden.

3.1.2.1. P-Ganglinien in Anreicherungskultur

Während zu Beginn der Kultivierung lediglich mit alternierender N_2- und Luftbegasung eine Abnahme der ortho-Phosphatkonzentration aufgrund des assimilatorischen Phosphatverbrauches meßbar war, konnte bereits nach 5 Tagen zusätzlich mit Beginn der anaeroben Phase eine Zunahme der ortho-Phosphatkonzentration im Kulturfiltrat gemessen werden. 12 Tage nach Kultivierungsbeginn wurde die in Abb. 19 dargestellte Ganglinie der ortho-Phosphatkonzentration im Reaktor erstellt.

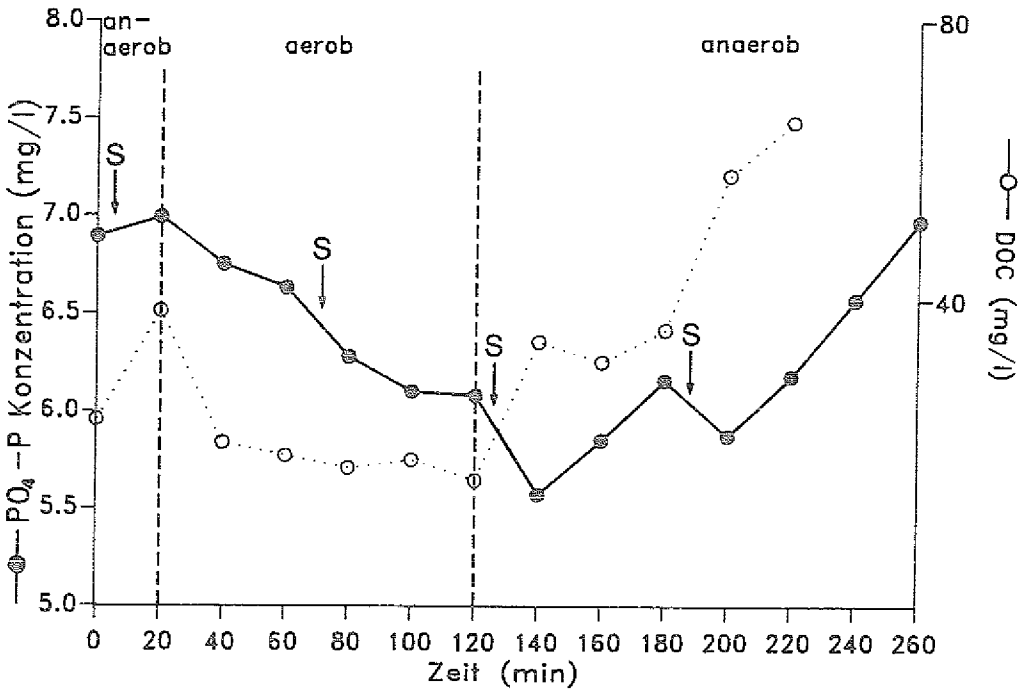


Abb. 19: Ortho-Phosphatkonzentration und DOC in einer Mischkultur unter alternierend aeroben und anaeroben Milieubedingungen
Zeitpunkte der Substratzugabe sind mit "S" gekennzeichnet

Bei gleichbleibenden Zeitintervallen für die Substratzugabe wurde die Dauer der aeroben und anaeroben Phase während des Meßzeitraumes, wie aus Abb. 19 ersichtlich, verlängert.
Die anfänglich rasche Abnahme der P-Konzentration nach Substratzugabe ist auf den Verdünnungseffekt durch die phosphatfreie Nährlösung (5 % des Reaktorvolumens pro Takt) zurückzuführen. Die Parallelbestimmungen des gelösten Kohlenstoffes (DOC) zeigen, daß die Zunahme der ortho-Phosphatkonzentration im Kulturfiltrat als Folge einer Phosphatfreisetzung aus oder von der Biomasse während der anaeroben Phase offenbar nicht von einer Aufnahme der angebotenen Kohlenstoffquelle begleitet war.

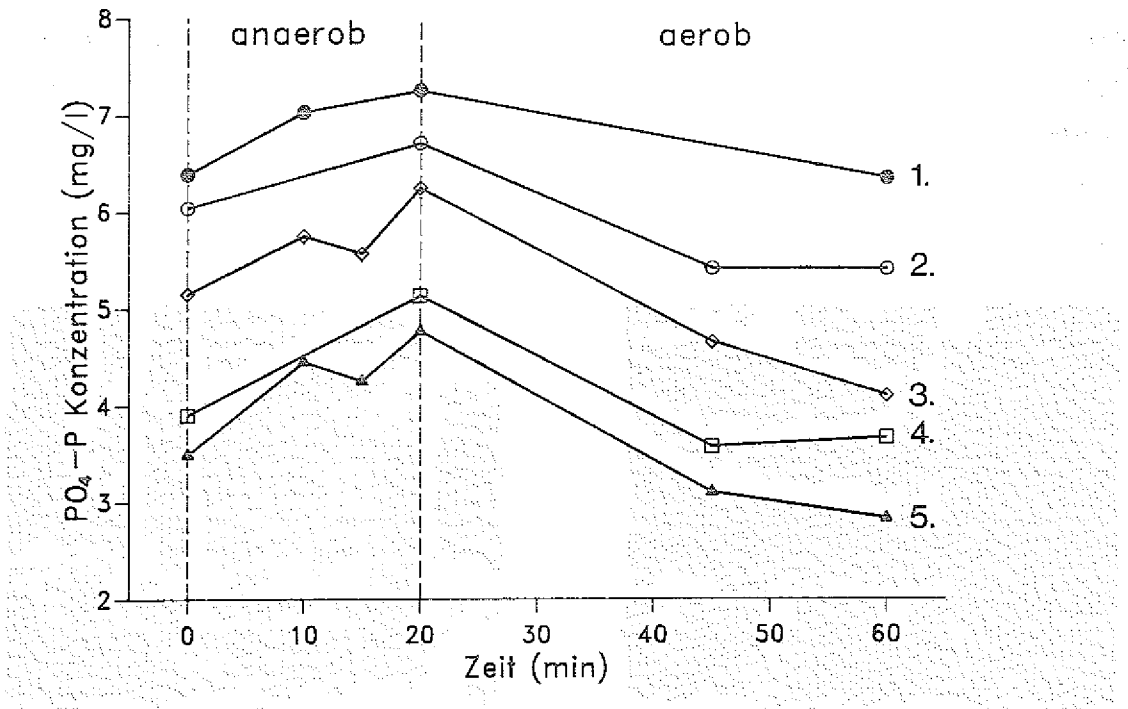
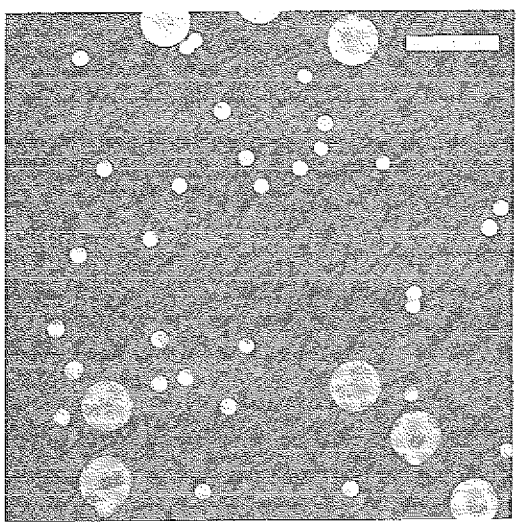


Abb. 20: Verlauf der ortho-Phosphatkonzentration im Fermenter während fünf aufeinander folgender Dosierungszyklen
(Kulturmedium ohne Phosphat)

Nach Homogenisierung, Verdünnung und Zwischenkultivierung (Kap. 2.2.5.) wurden aus der Mischkultur vier Reinkulturen gewonnen, die nach ihrem morphologischen Erscheinungsbild und physiologischen Verhalten vorbehaltlich der Gattung *Acinetobacter* zugeordnet werden konnten. Das im folgenden als WD1 bezeichnete Isolat wurde in Chemostat- und Batch-Experimenten weiter untersucht. Dabei zeigte sich, daß WD1 unter allen eingestellten Versuchsbedingungen ohne erkennbare Tendenz zu Flockenbildung oder Wandwachstum kultiviert werden konnte. Selbst nach vier Wochen kontinuierlicher Kultur war kein Bewuchs an Wandungen oder Einbauten des Fermenters erkennbar.

3.1.2.2. Morphologische und physiologische Charakterisierung

Die Zellen des Isolates WD1 waren unbeweglich, stäbchenförmig mit etwa 0.5 - 1 µm im Durchmesser, bei einer Länge von 1 - 1.5 µm. Die kreisrunden, glattrandigen Kolonien waren milchig-weiß gefärbt mit glattglänzender Oberfläche und visköser Konsistenz.



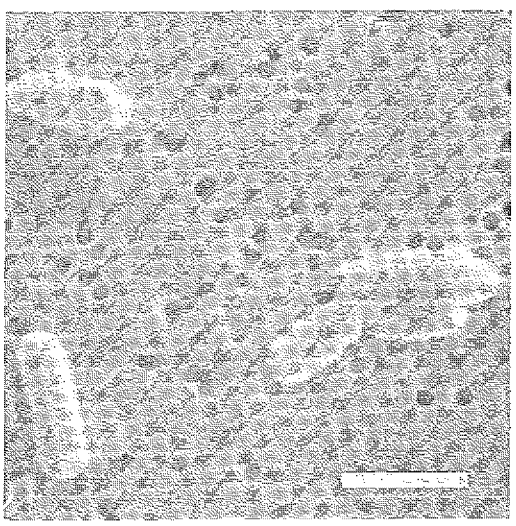


Abb. 21: Kolonien (kleine Kolonien) und REM-Aufnahme von WD1
Markierungen entsprechen 1 cm (Kolonie) bzw. 1 µm (REM)

Gram-Reaktion[1]	-	Arginindihydrolase	-
L-Ala-Aminopeptidase	+	Ornithindecarboxylase	-
KOH-Test	+	Lysindecarboxylase	-
Cytochrom-c-Oxidase	-	H_2S-Bildung	-
Katalase	+	Voges-Proskauer	-
Indol	-	Gelatineverflüssigung	+
Urease	-	Denitrifikation [2]	-

[1] nach KOH-Test und Test auf L-Ala-Aminopeptidase
[2] Gasbildung in Nitrat-Nährbouillon

Tab. 5: Konventionelle biochemische Merkmale von WD1

Zur weiteren Charakterisierung und der Möglichkeit WD1 jederzeit wieder sicher identifizieren zu können, wurde das Verwertungsspektrum von 46 verschiedenen Zuckern und Zuckerverbindungen in Mikrotiterplatten bestimmt.
Das Ergebnis des Verwertungstestes gibt Tabelle 6 wieder:

Tetrose	
1) Erythrose	-
Pentose	
2) D-Xylose	-
3) D-Lyxose	-
4) L-Arabinose	-
5) D-Ribose	-
6) 2-Desoxyribose	-
7) Ribulose	-
Hexose	
8) D-Glukose	±
9) D-Mannose	-
10) D-Galaktose	-
11) D-Talose	-
12) L-Rhamnose	-
13) D-Fucose	-
14) L-Fucose	-
15) Digitoxose	-
16) D-Tagatose	-
17) D-Fruktose	-
18) L-Sorbose	-
19) Glukuronsäure	+
20) Galakturonsäure	-
21) 6-Amino-6-Desoxy-D-Glukose	-
22) Methyl-α-D-Glucopyranosid	-
23) Methyl-β-D-Glucopyranosid	-
24) Methyl-α-D-Xylopyranosid	-
25) Methyl-β-D-Xylopyranosid	-
26) Methyl-β-D-Galactopyranosid	-
27) Methyl-α-D-Mannopyranosid	-
28) 3-O-Methyl-D-Glukose	-
29) 2-Desoxy-D-Glukose	-
30) 2-Desoxy-D-Galaktose	-
Disaccharide	
31) Laktose	-
32) Melibiose	-
33) Maltose	-
34) Cellobiose	-
35) Saccharose	+
36) Turanose	-
37) Palatinose	-
38) Trehalose	±
39) α-Sophorose	-
Trisaccharide	
40) Melezitose	-
41) Raffinose	-
Tetrasaccharide	
42) Stachyose	-
Glukoside	
43) Aeskulin	-
44) Arbutin	-
45) Salicin	-
Nucleosid	
46) Adenosin	-

Tab. 6: Ergebnis des Kohlenhydratverwertungstests mit WD1

Die Ergebnisse der weitergehenden Untersuchungen zur Identifizierung von WD1 sind im Anhang aufgeführt. Sie wurden freundlicherweise von Dr. Kämpfer am Fachbereich Umwelttechnik der TU Berlin durchgeführt.
Bezüglich der genauen taxonomischen Zuordnung des Isolates besteht jedoch nach wie vor Unsicherheit, insbesondere da die positive Reaktion bei der Gramfärbung nicht mit dem Vorhandensein des Enzyms L-Alanin-Aminopeptidase und dem positiven KOH-Test vereinbar ist. Für

einen gram-positiven Bakterienstamm führten die Identifizierungsmethoden nach Kämpfer zur Gattung *Mycobacterium*.

3.1.2.3. Wachstum in Batch-Kultur

Die Bestimmung der maximalen Wachstumsrate μ_{max} erfolgte in einem pH-statisch (pH 7.5) betriebenen Fermenter im Batch-Versuch auf Na-Acetat (Kap. 2.2.1.4.).

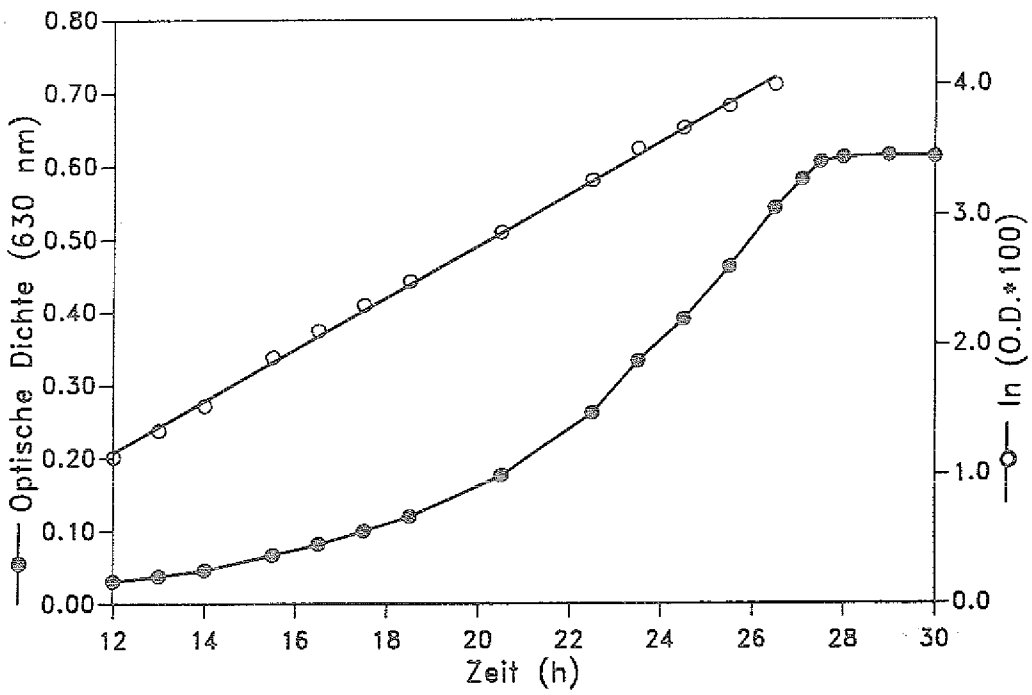


Abb. 22: Wachstum von WD1 in Batch-Kultur
Lineare und log. Auftragung der $O.D._{630}$ gegen die Zeit

Die unter diesen Bedingungen ermittelte maximale Wachstumsrate μ_{max} betrug 0.2 h^{-1}, was einer Verdoppelungszeit von 3.47 h entspricht. Der Ertragskoeffizient auf Kohlenstoffbasis Y betrug dabei 0.39.

3.1.2.4. Wachstum in kontinuierlicher Kultur

In kontinuierlicher Kultur unter den in 2.2.1.4. angegebenen Versuchsbedingungen (2 l-Reaktor, Chemostat) nahm die Biomassekonzentration von einer Verdünnungsrate D = 0.025 h^{-1} bis zu einer Verdünnungsrate von D = 0.05 h^{-1} zu. Im Kulturfiltrat war unter den entsprechenden Fließgleichgewichtsbedingungen kein Acetat nachweisbar (Nachweisgrenze 1 ppm), obwohl DOC-Konzentrationen zwischen 15 und 25 mg/l gemessen wurden.

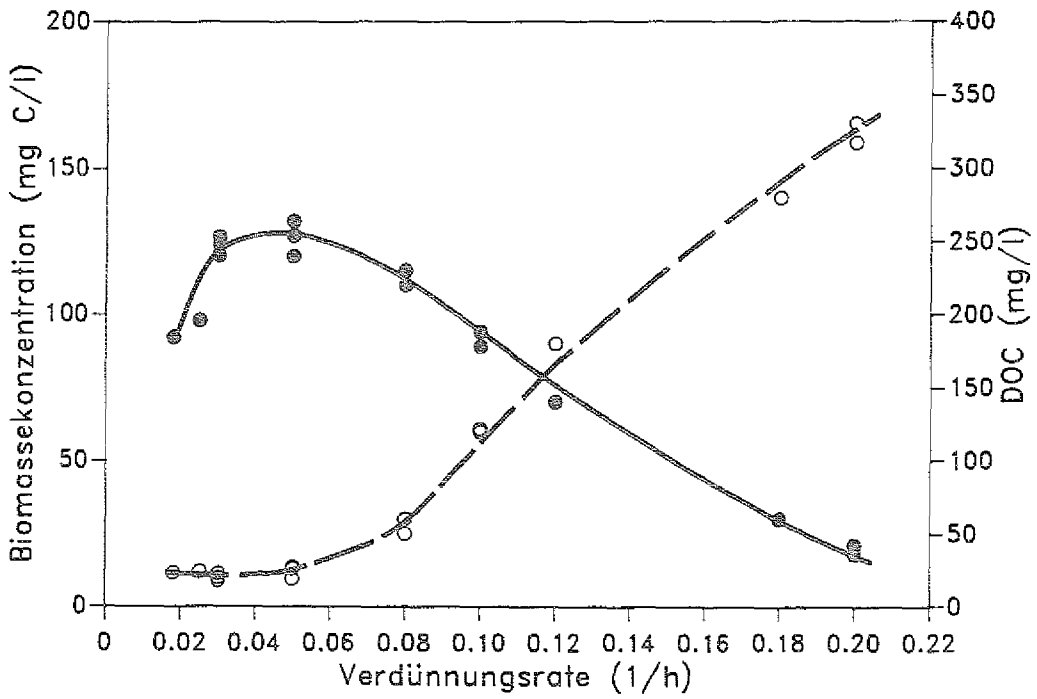


Abb. 23: WD1 in kontinuierlicher Kultur
Auftragung der Biomassekonzentration und der DOC-Konzentration gegen die Verdünnungsrate D

Die gleiche Beobachtung wurde schon bei der kontinuierlichen Kultivierung von *Acinetobacter sp.* (Kap. 3.1.1.3.) gemacht. Auch Fingerhut (1985) konnte in Chemostatversuchen mit *Pseudomonas aeruginosa* und Essigsäure als Substrat einen Rest-DOC von 23 mg l bestimmen, der nicht als äquivalente Acetatmenge identifiziert werden konnte. Es mußte sich demnach um bakterienbürtige Kohlenstoffverbindungen handeln, die in das Kulturmedium abgegeben wurden.

Eine Fraktionierung des Kulturfiltrats nach den Molekulargewichten der gelösten Inhaltstoffe mittels Gelfiltration zeigte, daß der überwiegende Anteil des verbliebenen DOC der Fraktion mit MG 300 - 600 D zuzuordnen war (Wiemeler 1991).

Bei Verdünnungsraten ≥ 0.08 h^{-1} nahm die Biomassekonzentration bei gleichzeitiger Zunahme des DOC im Fermenter wieder ab. Der DOC-Zunahme mit höheren Verdünnungsraten entsprach nun eine äquivalente Zunahme der Acetatkonzentration im Kulturfiltrat. Bei Verdünnungsraten > 0.2 h^{-1} stellte sich kein Fließgleichgewicht mehr ein, und im Reaktor wurde die gleiche Acetatkonzentration wie im Zulauf gemessen.

Wegen der ungewöhnlich frühen Abnahme der Biomassekonzentration mit Steigerung der Verdünnungsraten ab D = 0.05 h^{-1} wurde der Versuch zur besseren Absicherung der Ergebnisse wiederholt. Die Meßergebnisse zeigten eine gute Übereinstimmung und sind zusammen in Abb. 23 aufgetragen.

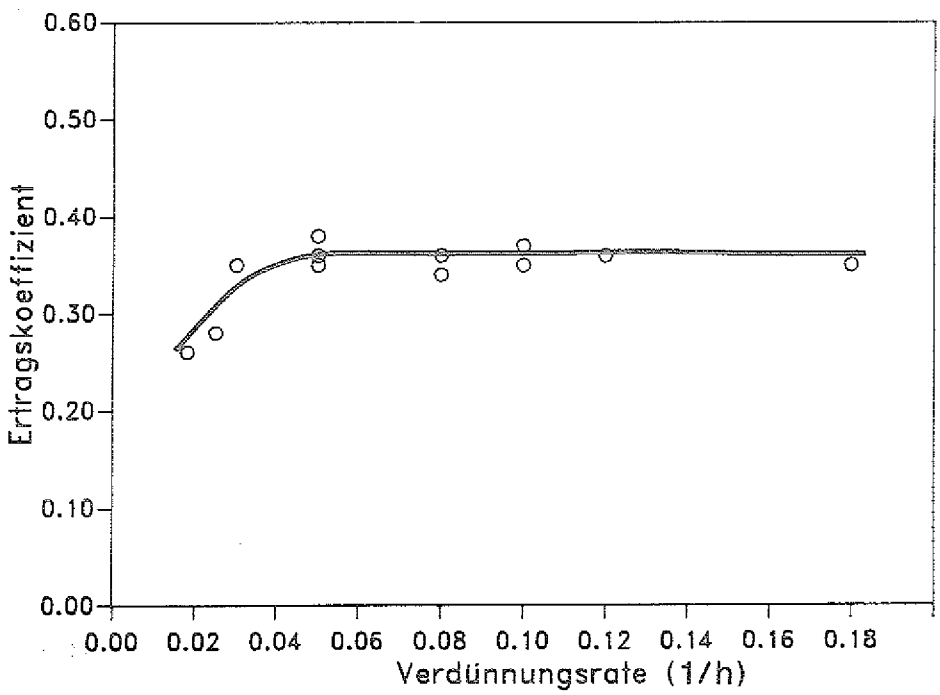


Abb. 24: Ertragskoeffizient von WD1 in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate

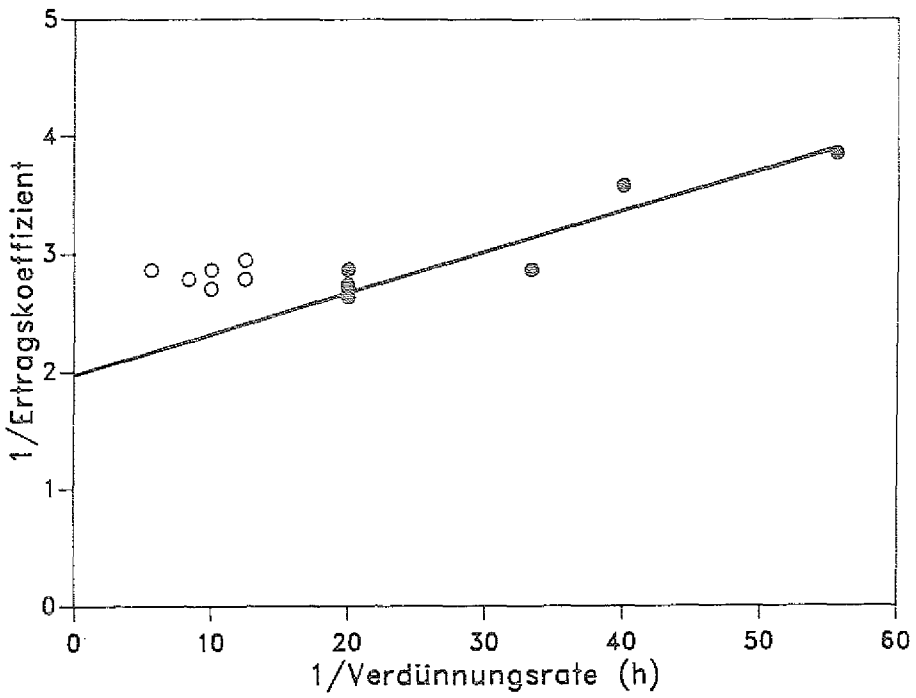


Abb. 25: Auftragung der Werte aus Abbildung 24 nach Pirt (1965)
Y für D > 0.05 h^{-1} in Regression nicht berücksichtigt

Die linearisierte Auftragung nach Pirt liefert für m = 0.034 h^{-1} und für den theoretischen maximalen Ertragskoeffizienten Y_M = 0.5.

3.1.2.5. Wachstum in kontinuierlicher Kultur mit Biomasserückhaltung

Durch die Kombination des 1 l-Fermenters mit dem Filtrationsmodul stand ein Versuchssystem zur Verfügung, in welchem die axenische Kultivierung von Mikroorganismen bei beliebigen Entkoppelungsgraden von mittlerer hydraulischer Verweilzeit und mittlerer Verweilzeit der Biomasse möglich sein sollte. Die Abb. 26 zeigt die Änderung der Biomassekonzentration und DOC-Konzentration von WD1 im Fermenter nach dem Anschluß des Filtrationsmoduls bei einer Verdünnungsrate von D = 0.05 h^{-1} und vollständiger Rückhaltung der Biomasse.

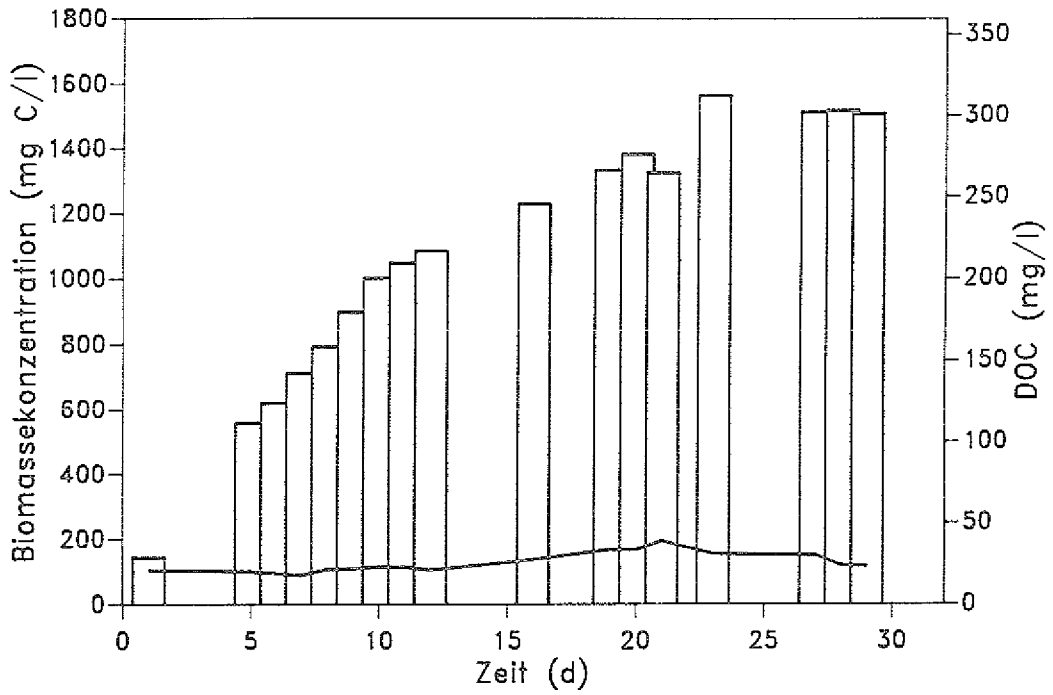


Abb. 26: Biomassekonzentration (Balken) und DOC (durchgezogene Linie) bei einer Verdünnungsrate von D = 0.05 h^{-1} und vollständiger Biomasserückhaltung

Die Entwicklung der Biomassekonzentration zeigte gemäß dem Verlauf einer Sättigungsfunktion eine Abnahme der Zuwachsrate, bis nach etwa 25 Tagen eine Biomassekonzentration von ca. 1500 mg/l POC (3.3 g/l TRS) erreicht war. Von diesem Zeitpunkt an wurde kein Zuwachs mehr festgestellt (Y = 0) und die kontinuierlich zugeführte Substratmenge 51 ml/h ermöglichte offenbar gerade die Aufrechterhaltung des Grundstoffwechsels der vorhandenen Biomasse. Der spezifische Substratbedarf für den Grundstoffwechsel betrug für WD1 demnach unter diesen Bedingungen

$$12.5\ \mu g\ C_{(Acetat)} / mg\ C_{(Biomasse)} * h$$

bzw.

$$510\ nMol\ Acetat / mg\ C_{(Biomasse)} * h$$

Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß immer ≈ 5 % des zugegebenen Acetat-C als "bakterienbürtiger" DOC (kein Acetat) im Kulturfiltrat nachweisbar waren.

Da durch die Filtration alle Partikel > 0.22 µm zurückgehalten wurden (keimfreies Filtrat als Ablauf), mußte eine gleichbleibende Biomassekonzentration bedeuten, daß das Substratverwertungspotential auch ohne Wachstum in der Summe konstant blieb.
Ein Vitalitätsverlust eines Teils der Population hätte zwangsläufig eine anteilige Zunahme der Biomassekonzentration im System zur Folge gehabt, sofern nicht inaktive Bakterien z.B. nach Zell-Lysis die Filtermembran hätten passieren können.
Wie dieser Versuch zeigte, wurde das Kultursystem den gestellten Anforderung in vollem Umfang gerecht, und ermöglichte damit die weitere Durchführung von Experimenten mit Reinkulturen bzw. definierten Mischkulturen mit beliebig einstellbarer Verweilzeit der Biomasse, unabhängig von der hydraulischen Verweilzeit des Kulturmediums.

3.1.2.6. Kontinuierliche und diskontinuierliche Substratzugabe bei einer ausgewählten Verdünnungsrate

Zur Untersuchung der Auswirkungen diskontinuierlicher Substratzugabe auf Wachstum und Aktivität von WD1 wurde ein Chemostat mit einer Verdünnungsrate von $D = 0.05\ h^{-1}$ (20 h mittlere Verweilzeit) betrieben. Nach Erreichen des Fließgleichgewichtes wurden Biomassekonzentration, DOC, Acetat und die konzentrationsabhängigen Substratatmungsraten bestimmt.
Die gleichen Parameter wurden anschließend nach Umstellung des Fermenters auf diskontinuierliche Substratzugabe ermittelt (Kap. 2.2.1.4. 2 l-Reaktor 3.b).
Die Ergebnisse des Respirometerversuches mit Aliquots von WD1 aus den Reaktoren mit kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe sind in Abbildung 27 dargestellt.

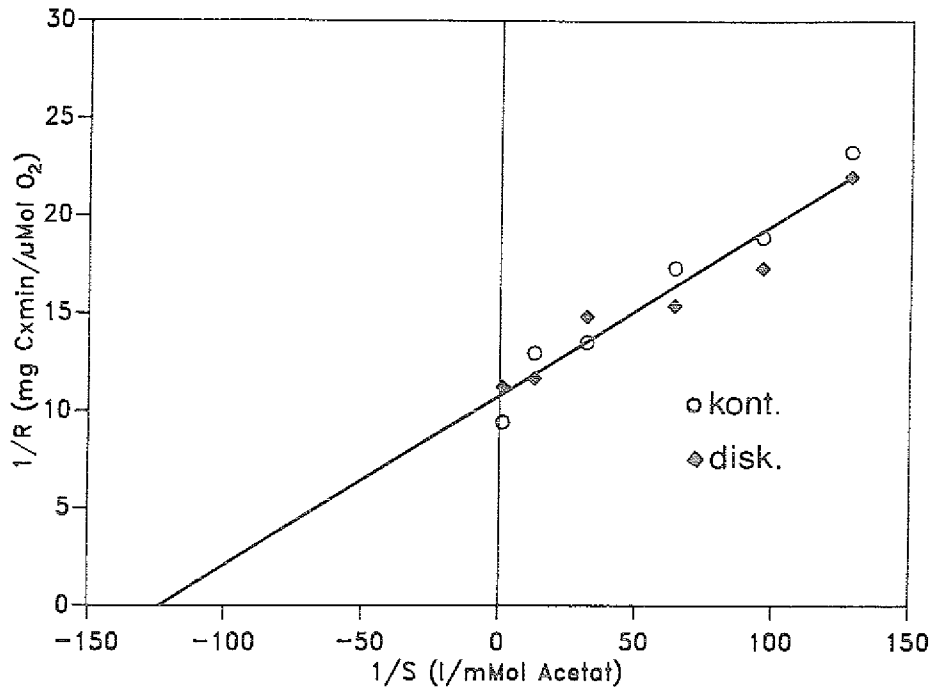


Abb. 27: Sauerstoffverbrauchsraten von WD1 in Abhängigkeit von der Acetatkonzentration
Auftragung nach Lineweaver-Burk

Die in Abbildung 27 aufgetragenen Meßpunkte sind Mittelwerte aus jeweils zwei unabhängigen Einzelmessungen im gleichen Fließgleichgewicht. Es war kein Unterschied bezüglich der Kurzzeitatmungsaktivität zwischen der an kontinuierliche und der an diskontinuierliche Substratzugabe adaptierten Biomasse feststellbar.
Die aus allen Meßwerten gemittelte maximale Respirationsrate R_{max} betrug für WD1

$$R_{max} = 93 \text{ nMol } O_2 \text{ / mg } C_{(Biomasse)} * \text{min}$$

bei einer Halbsättigungskonzentration

$$K_m = 8 \text{ µMol Acetat/l.}$$

Unter beiden Kultivierungsbedingungen erreichte WD1 die gleiche mittlere Biomassekonzentration von 135 mg C/l bei Abweichungen der 4 Einzelmessungen von < 8 % vom Mittelwert.

Der Rest DOC betrug 22 mg/l (kontinuierliche) bzw. 18 mg/l (diskontinuierliche Substratzugabe), wobei die Probennahme bei diskontinuierlicher Substratzugabe 10 Minuten vor erneuter Substratzugabe erfolgt war. Die Acetatkonzentration lag immer unter der Nachweisgrenze (1-2 mg Acetat/l).

3.1.2.7 Phosphataufnahme und -rücklösung

Durch nachfolgend beschriebene Versuche und Analysen sollte festgestellt werden, ob mit der Isolation von WD1 aus einer Bakterienmischpopulation ein zur vermehrten Phosphataufnahme und zur P-Rücklösung unter anaeroben Bedingungen befähigtes Bakterium gefunden worden war, welches auch in Reinkultur über diese Fähigkeit verfügte.
In kontinuierlicher Kultur wurde ein maximaler Phosphatgehalt von 4.2 % P am TRS bei einer Verdünnungsrate von D = 0.05 h^{-1} gemessen.

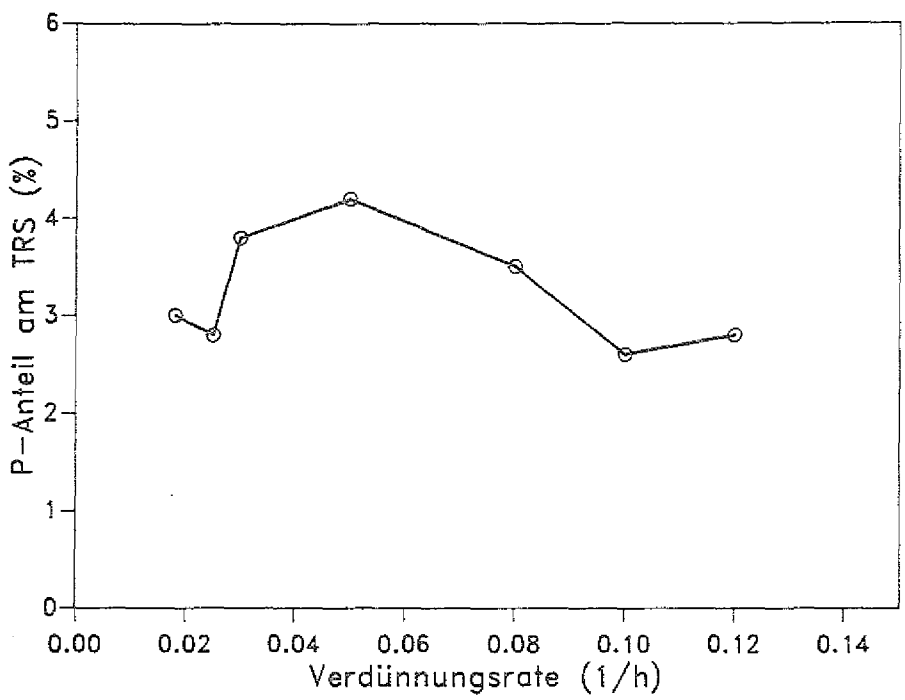


Abb. 28: % P-Gehalt des Trockenrückstandes von WD1 in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate im Chemostaten
Berechnet aus der ortho-Phosphatdifferenz zwischen Nährlösung und Kulturfiltrat

Die Fähigkeit zur P-Rücklösung bzw. die möglicherweise notwendige Induktion zur Ausprägung einer solchen potentiellen Fähigkeit wurde in zwei verschiedenen Ansätzen untersucht.

1. Kontinuierliche Kultur mit Dauerbelüftung bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.05\ h^{-1}$. Bestimmung der ortho-Phosphatkonzentration im Kulturfiltrat nach Umschalten von Luft auf N_2-Begasung (sechs Stunden) und einmaliger Substratzugabe (20 mg Acetat-C/l Endkonzentration).

2. Kultur mit teilweiser Biomasserückhaltung (20 h hydraulische Verweilzeit/ 2.5 d mittleres Biomassealter) und diskontinuierlicher Substratzugabe bei wechselweiser N_2/Luftbegasung.
   Bestimmung der ortho-Phosphatkonzentration während einer auf zwei Stunden verlängerten anaeroben Phase.

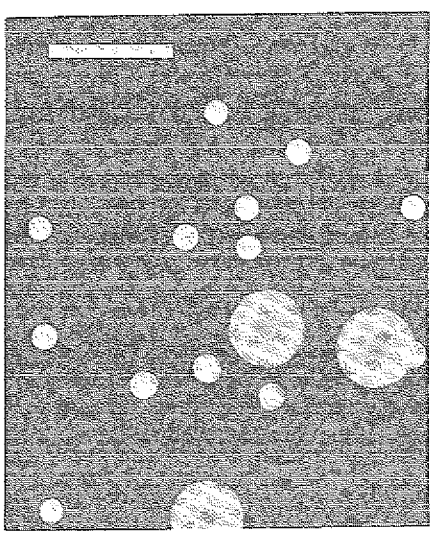
Eine Rücklösung von nur 10 % des durch die Biomasse festgelegten Phosphates im Untersuchungszeitraum hätte in Versuch 1 die ortho-Phosphatkonzentration im Kulturfiltrat rechnerisch um 1.2 mg/l erhöht (305 mg TRS/l mit 4 % P-Gehalt). In dem Experiment 2 mit teilweiser Biomasserückhaltung wäre die ortho-Phosphatkonzentration um ca. 2 mg/l angestiegen (590 mg TRS/l mit 3.5 % P-Gehalt).
Zur Erhöhung der Meßgenauigkeit war der Versuch 1 zusätzlich mit einer verminderten Phosphatkonzentration durch vorübergehende Zugabe phosphatfreien Kulturmediums wiederholt worden. Die relative Änderung wäre auf einer Basiskonzentration von dadurch 2 mg P/l entsprechend größer und exakter analysierbar gewesen.

Tatsächlich konnte in keinem der Versuche während der anaeroben Phase eine Zunahme der ortho-Phosphatkonzentration im Kulturfiltrat gemessen werden.
WD1 war demzufolge entweder nicht den Bakterien zuzuordnen, welche in der Anreicherungskultur (Kap. 3.1.2.1.) für die beobachtete P-Rücklösung verantwortlich waren, oder es war zumindest in der Reinkultur nicht mehr dazu befähigt.

3.1.3. *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50108)

3.1.3.1. Morphologische und physiologische Charakterisierung

Pseudomonas fluorescens (DSM 50108) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM) bezogen und als Testorganismus ausgewählt, da er befähigt ist, auch auf Acetat als einziger C-Quelle und einem Mineralmedium ohne Zusatz von Vitaminen zu wachsen. Desweiteren kann dieser Biotyp (Biotyp 2) von *P. fluorescens* auch unter Denitrifikationsbedingungen (NO_3^-/NO_2^- statt O_2 als Elektronenakzeptor) wachsen (Bergey's Manual 1983). Damit erfüllte er die an ihn gestellten Anforderungen als Testorganismen für die beabsichtigten Konkurrenzexperimente mit einem denitrifizierenden Bakterium in Cokultur mit einem "Bio-P-Bakterium" (siehe Einleitung 1.3.). *Pseudomonas fluorescens* ist ein gram-negatives, bewegliches Bakterium von stäbchenförmiger Gestalt mit etwa 0.8 µm Durchmesser bei einer Länge von ca. 1.8 µm. Die Bakterien bildeten auf Standard-I-Nähragar schwach beige-bräunliche, runde Kolonien. Bei hohem Feuchtegehalt der Agarplatten wurden gelegentlich diffuse seitliche "Ausbuchtungen" beobachtet, die wahrscheinlich durch schwärmende Zellen hervorgerufen wurden.



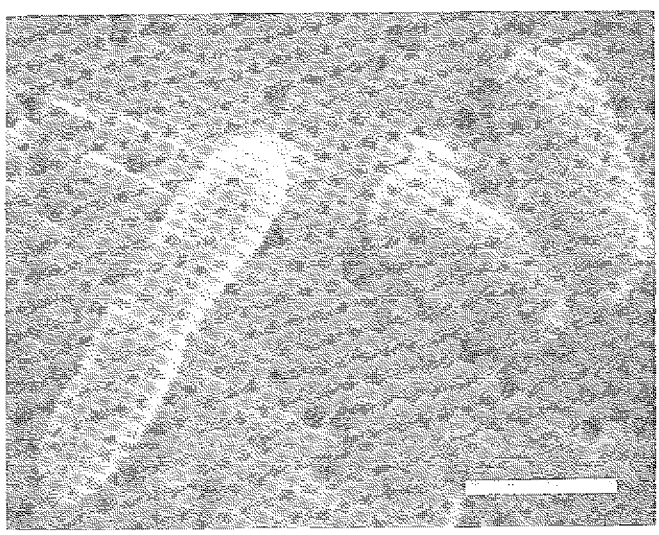


Abb. 29: Kolonien (große Kolonien) und REM-Aufnahme von *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50108)
Markierungen entsprechen 1 cm (Kolonien) bzw. 1 µm (REM)

Aufgrund der unterschiedlichen Koloniemorphologie und insbesondere wegen der höheren Wachstumsrate war eine sichere Unterscheidung von Kolonien des Isolates WD1 immer möglich. Eine sichere Unterscheidung von *Acinetobacter sp.* wäre mit Hilfe des modifizierten Oxidase-Tests (2.3.8.1.) möglich gewesen. Diese Notwendigkeit bestand jedoch nicht mehr, da *Acinetobacter sp.* aus den zuvor genannten Gründen für die Untersuchung in Mischkultur mit *P. fluorescens* ausschied.
Zur Identifizierung und zur Überprüfung der Stammkulturen wurden zusätzlich die konventionellen biochemischen Merkmale aufgrund unterschiedlicher Stoffwechselleistungen bestimmt und die Fähigkeit zur Verwertung von 46 verschiedenen Zuckern und Zuckerverbindungen getestet.

Gram-Reaktion[1)]	-	Arginindihydrolase	+
L-Ala-Aminopeptidase	+	Ornithindecarboxylase	-
KOH-Test	+	Lysindecarboxylase	-
Cytochrom-c-Oxidase	+	H_2S-Bildung	-
Katalase	+	Voges-Proskauer	-
Indol	-	Gelatineverflüssigung	-
Urease	-	Denitrifikation [2)]	+

1) nach KOH-Test und Test auf L-Ala-Aminopeptidase
2) Gasbildung in Nitrat-Nährbouillon unter Luftabschluß

Tab. 7. Konventionelle biochemische Merkmale von *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50108)

Tetrose	
1) Erythrose	-
Pentose	
2) D-Xylose	-
3) D-Lyxose	-
4) L-Arabinose	+
5) D-Ribose	+
6) 2-Desoxyribose	±
7) Ribulose	-
Hexose	
8) D-Glukose	+
9) D-Mannose	+
10) D-Galaktose	+
11) D-Talose	-
12) L-Rhamnose	-
13) D-Fucose	+
14) L-Fucose	-
15) Digitoxose	+
16) D-Tagatose	-
17) D-Fruktose	-
18) L-Sorbose	-
19) Glukuronsäure	±
20) Galakturonsäure	-
21) 6-Amino-6-Desoxy-D-Glukose	+
22) Methyl-α-D-Glucopyranosid	-
23) Methyl-β-D-Glucopyranosid	-
24) Methyl-α-D-Xylopyranosid	-
25) Methyl-β-D-Xylopyranosid	-
26) Methyl-β-D-Galactopyranosid	-
27) Methyl-α-D-Mannopyranosid	-
28) 3-O-Methyl-D-Glukose	-
29) 2-Desoxy-D-Glukose	+
30) 2-Desoxy-D-Galaktose	+
Disaccharide	
31) Laktose	-
32) Melibiose	-
33) Maltose	-
34) Cellobiose	-
35) Saccharose	-
36) Turanose	-
37) Palatinose	-
38) Trehalose	-
39) α-Sophorose	-
Trisaccharide	
40) Melezitose	-
41) Raffinose	-
Tetrasaccharide	
42) Stachyose	-
Glukoside	
43) Aesculin	-
44) Arbutin	-
45) Salicin	-
Nucleosid	
46) Adenosin	+

Tab. 8: Ergebnisse des Kohlenhydratverwertungstests mit P. *fluorescens*

3.1.3.2. Wachstum in Batch-Kultur

Die maximale Wachstumsrate μ_{max} für *P. fluorescens* wurde unter den in 2.2.1.4. aufgeführten Versuchsbedingungen im pH-statisch betriebenen Reaktor ermittelt.

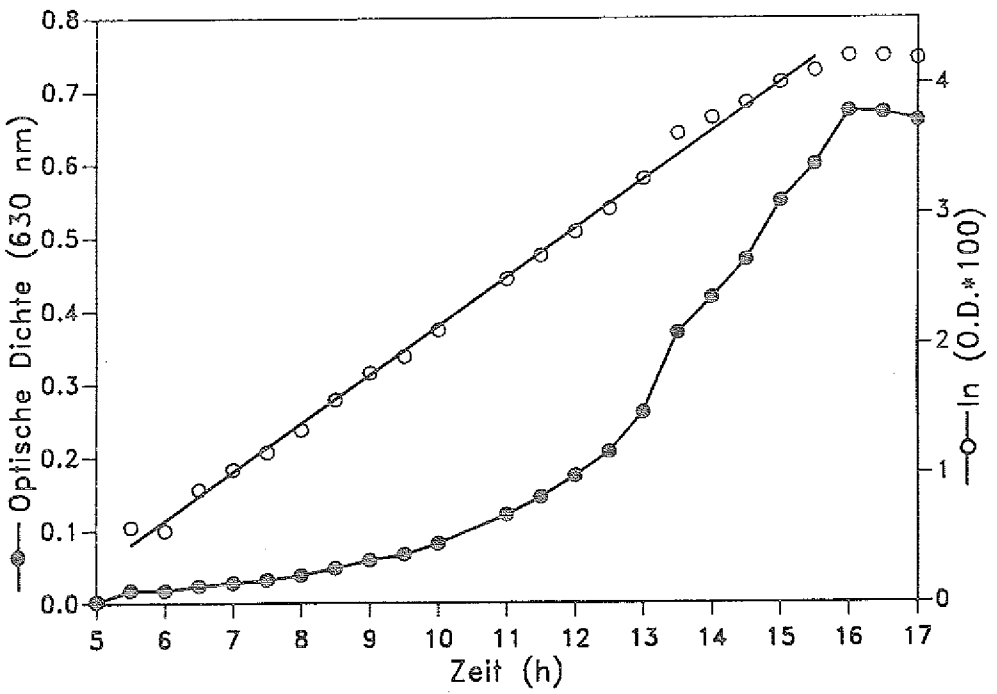


Abb. 30: Wachstum von *P. fluorescens* (DSM 50108) in Batch-Kultur
Lineare und log. Auftragung der $O.D._{630}$ gegen die Zeit.

Die so ermittellte maximale Wachstumskurve betrug

$$\mu_{max} = 0.38\ h^{-1}$$

entsprechend einer maximalen Verdoppelungszeit von

$$t_d = \ln 2/\mu_{max} = 1.92\ h$$

Der Ertragskoeffizient auf Kohlenstoffbasis betrug

$$Y = 0.35$$

3.1.3.3. Wachstum in kontinuierlicher Kultur

In kontinuierlicher Kultur nahm die Biomassekonzentration mit höheren Verdünnungsraten bis etwa D = 0.35 h^{-1} stetig zu.

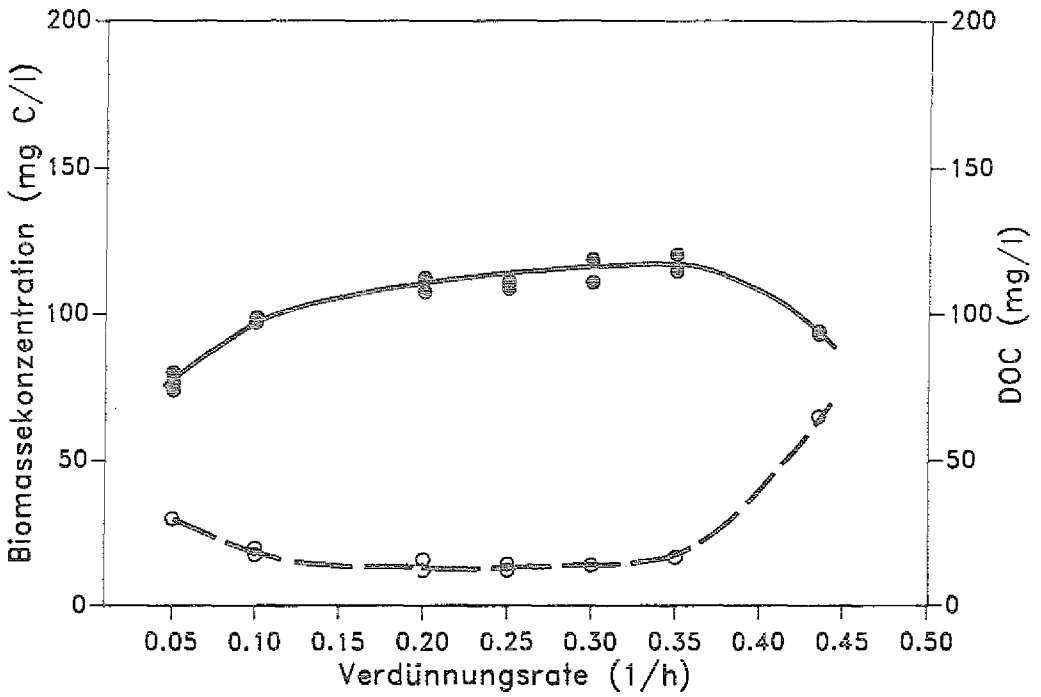


Abb. 31: ***P. fluorescens*** **in kontinuierlicher Kultur**
Auftragung der Biomassekonzentration und der DOC-Konzentration gegen die Verdünnungsrate

Bis D = 0.44 h^{-1} konnte *P. fluorescens* nicht ausgewaschen werden, doch zeigte die Abnahme der Biomassekonzentration und die Zunahme des DOC, daß das angebotene Substrat bei dieser Verdünnungsrate nicht mehr vollständig verwertet wurde. Die DOC-Erhöhung gegenüber den bei niedrigeren Verdünnungsraten gemessenen DOC-Konzentrationen konnte als äquivalente Acetatkonzentration analysiert werden.
Bei allen Verdünnungsraten < 0.3 h^{-1} war kein Acetat nachweisbar, so daß es sich auch hierbei, wie schon bei der kontinuierlichen Kultivierung von *Acinetobacter sp.*, WD1 und *Pseudomonas aeruginosa* (Fingerhut 1985) beobachtet, um bakterienbürtige gelöste Kohlenstoffverbindungen handeln mußte.
Bei D = 0.35 h^{-1} war eine Acetatkonzentration von ≈ 1 mg/l (Nachweisgrenze) meßbar.

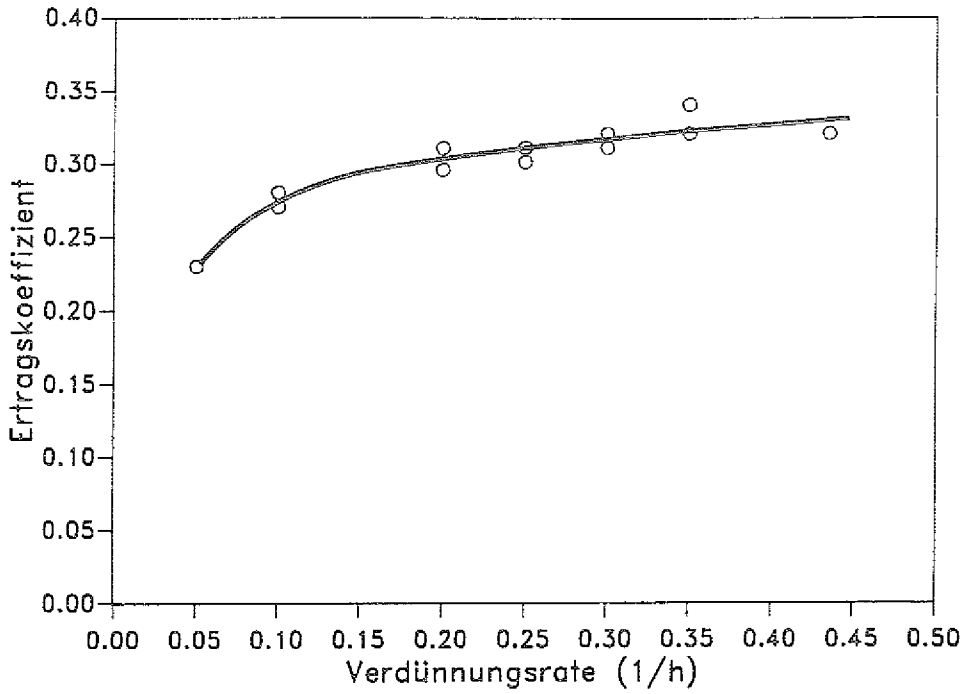


Abb. 32: Ertragskoeffizient von *Pseudomonas fluorescens* in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate

Entsprechend der mit höheren Verdünnungsraten zunehmenden Biomassekonzentration resultierte gleichermaßen eine Zunahme des Ertragskoeffizienten von einem Wert für $Y = 0.23$ bei $D = 0.05\ h^{-1}$ bis zu einem maximalen $Y = 0.33$ bei $D = 0.35\ h^{-1}$.

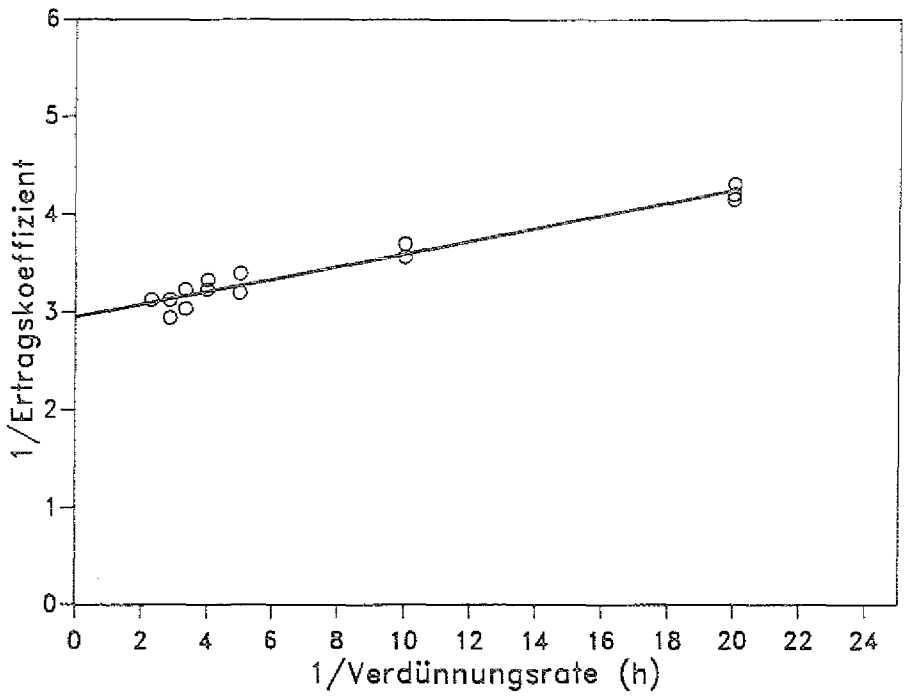


Abb. 33: Auftragung der Werte aus Abbildung 32 nach Pirt (1965)

Die linearisierte Auftragung nach Pirt liefert für $m = 0.06\ h^{-1}$ und für den theoretischen maximalen Ertragskoeffizienten $Y_M = 0.34$.

3.1.3.4. Kontinuierliche und diskontinuierliche Substratzugabe bei einer ausgewählten Verdünnungsrate

In Parallelversuchen wurde analog den Versuchen mit *Acinetobacter sp.* und WD1 bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.05\ h^{-1}$ von kontinuierlicher Substratzugabe auf diskontinuierliche Substratzugabe umgestellt. Nach Erreichen der jeweiligen Fließgleichgewichte wurden Proben aus den Kultursystemen entnommen und die Sauerstoffverbrauchsraten in Abhängigkeit von der zugegebenen Substratmenge ermittelt (Kap. 2.3.6.).

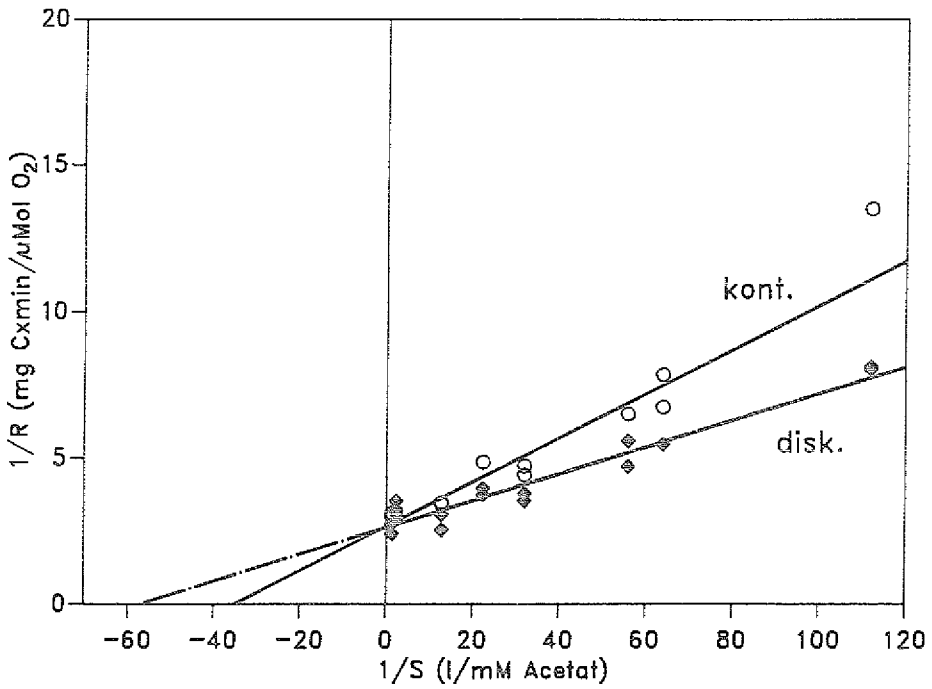


Abb. 34: Sauerstoffverbrauchsraten von *Pseudomonas fluorescens* in Abhängigkeit von der Acetatkonzentration
Auftragung nach Lineweaver-Burk

Die Betriebsweise (kontinuierliche oder diskontinuierliche Substratzugabe) hatte keinen meßbaren Einfluß auf die Biomassekonzentration und die DOC-Konzentration im Reaktor. Der Ertragskoeffizient betrug deshalb ebenfalls unabhängig von der Betriebsweise Y_M = 0.23. Bei gleichen maximalen Respirationsraten R_{max} (Substratsättigung) wurden jedoch signifikant unterschiedliche K_m-Werte ermittelt. Die Substratkonzentration, bei der mit der Biomasse aus der Kultur mit kontinuierlicher Substratzugabe die halbmaximale Respirationsrate gemessen wurde, betrug 28.5 µMo lNa-Acetat/l gegenüber 17.5 µMol Na-Acetat/l als Halbsättigungskonzentration für die Biomasse aus der Kultur mit diskontinuierlicher Substratzugabe. Die spezifische maximale Respirationsrate betrug im Mittel

385 nMol Acetat/mgC (Biomasse) * min.

Die Messungen wurden jeweils in einem Fließgleichgewicht doppelt bestimmt, wobei die zweite Messung die Aufenthaltszeiten nach der ersten Probenentnahme und Respirationsmessung erfolgte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt dargestellt.

		Meßwerte		
Betriebsweise	Parameter	Probe 1	Probe 2	Mittelwert
kontinuierlich	Biomasse-C mg/l	82	78	80
	DOC mg/l	18	24	21
	R_{max} 1)	375	415	395
	K_m 2)	25	32	28,5
diskontinuierl.	Biomasse-C mg/l	77	83	80
	DOC mg/l	22	26	24
	R_{max} 1)	352	398	375
	K_m 2)	13	22	17,5

1) nMol O2/mg C * min.
2) µMol Acetat/l

Tab. 9: Ergebnisse der Respirationsmessungen an *P. fluorescens* Biomasse aus Fermentern mit kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe

3.1.4. Versuche mit Mischkulturen aus Isolat WD1 und *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50108)

Nach zahlreichen Vorversuchen waren die drei Testorganismen gemäß den in 2.1.1. formulierten Anforderungen und Erwartungen für die weiteren Experimente ausgewählt worden. Die Ergebnisse aus den Kulturversuchen mit Reinkulturen jedes dieser Bakterien sind in den vorangestellten Kapiteln (3.1.1. - 3.1.3.) dargestellt.

Eines der ursprünglichen Ziele der Arbeit, nämlich die Untersuchung des Phosphatrücklöseverhaltens eines dazu befähigten Bakteriums unter Denitrifikationsbedingungen in Cokultur mit einem denitrifizierenden Bakterium, konnte mangels eines geeigneten Testorganismus weiterhin nicht berücksichtigt werden.

Zur Untersuchung des Konkurrenzverhaltens zweier Bakterien um eine limitierende Kohlenstoffquelle und der Auswirkungen kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe auf die Populationsentwicklung schienen *P. fluorescens* und WD1 geeignete Testorganismen zu sein:

1. Beide Bakterien wiesen deutliche Unterschiede in der maximalen Wachstumsrate (μ_{max} von *P. fluorescens* = 0.38 h^{-1}, μ_{max} von WD1 = 0.2 h^{-1}) und der Substrataffinität auf (gemessen als Halbsättigungskonzentration im Respirometer: 22 µMol Acetat/l für *P. fluorescens* und 8 µMol Acetat/l für WD1).
2. Beide Testorganismen kommen in Belebtschlammbiozönosen vor.
3. Beide Organismen wuchsen weitestgehend frei suspendiert, und ihre Populationsanteile waren auch in Mischkultur über die gut unterscheidbaren koloniebildenden Einheiten quantifizierbar (Tabelle 11).

Mischungsversuche mit Reinkulturen beider Bakterien in bekannten Konzentrationsverhältnissen (in KBE/ml) dienten der Bestimmung der Wiederfindungsraten nach dem Ausplattieren und der Abschätzung der möglichen Konzentrationsverhältnisse beider Organismen an der Mischkultur, welche noch eine sichere Quantifizierung der Einzelstämme zuließ.

Stamm	Verd. faktor	KBE/Platte	KBE pro ml
WD1	10^7	88.6 ± 6	88.6 * 10^7
Pf2	10^7	63.6 ± 9	63.6 * 10^7

Tab. 10: Bakterienausgangskonzentrationen in KBE/ml
(Mittelwerte aus 5-fach Ausplattierung)

Die unverdünnten Reinkulturen wurden in unten aufgeführten Verhältnissen gemischt und gemeinsam auf die angegebenen Verdünnungsstufen weiter verdünnt.

Mischungs-verhältnis	gemeinsamer Verd. Faktor		berechnete KBE/Platte	gezählte KBE/Platte
WD1/Pf2 = 100/1	10^5	WD1/Pf2	8860/63.6	> 1000*/59 ± 7
	10^7	WD1/Pf2	88.6/0.6	95 ± 11/< 30*
WD1/Pf2 = 10/1	10^6	WD1/Pf2	886/63.6	n.b./68 ± 9
	10^7	WD1/Pf2	88.6/6.36	98 ± 6/< 30*

n.b. = nicht bestimmt
* = KBE kleiner 30 und größer 1000 nicht gewertet

Tab. 11: Berechnete und gemessene KBE von WD1 und *P. fluorescens* bei unterschiedlichen Mischungs- und Konzentrationsverhältnissen

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, bestand eine gute Übereinstimmung von berechneten und gemessenen anteiligen KBE beider Bakterienstämme an der Mischkultur. Selbst geringste Anteile von *P. fluorescens* an einer Mischkultur mit WD1 waren problemlos quantifizierbar. Lediglich wenn *P. fluorescens* in deutlich höherer Konzentration als WD1 vorlag (aus Tab. 11 nicht ersichtlich), führte das zu Minderbefunden für die tatsächliche Konzentration von WD1 (Überwachsen von WD1 durch *P. fluorescens*).

Das Wachstum beider Organismen auf Standard-I-Nähragar ließ keinerlei Anzeichen für eine gegenseitige Hemmung oder Förderung erkennen.

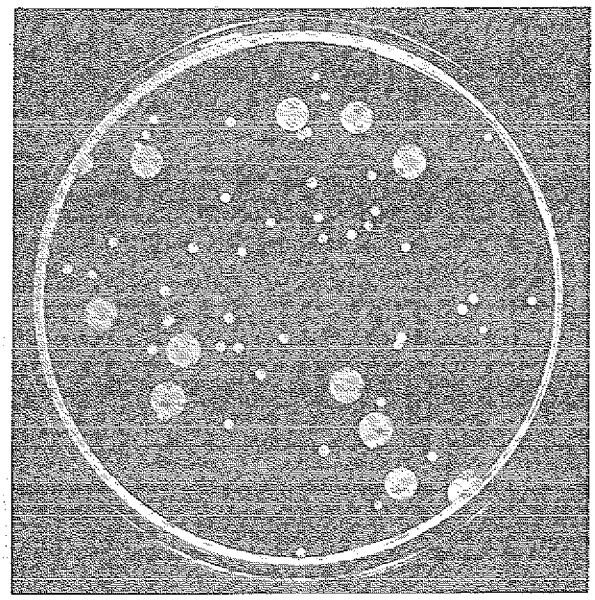


Abb. 35:
Fotografie einer Agarplatte mit Kolonien von WD1 (kleine Kolonien) und *Pseudomonas fluorescens*

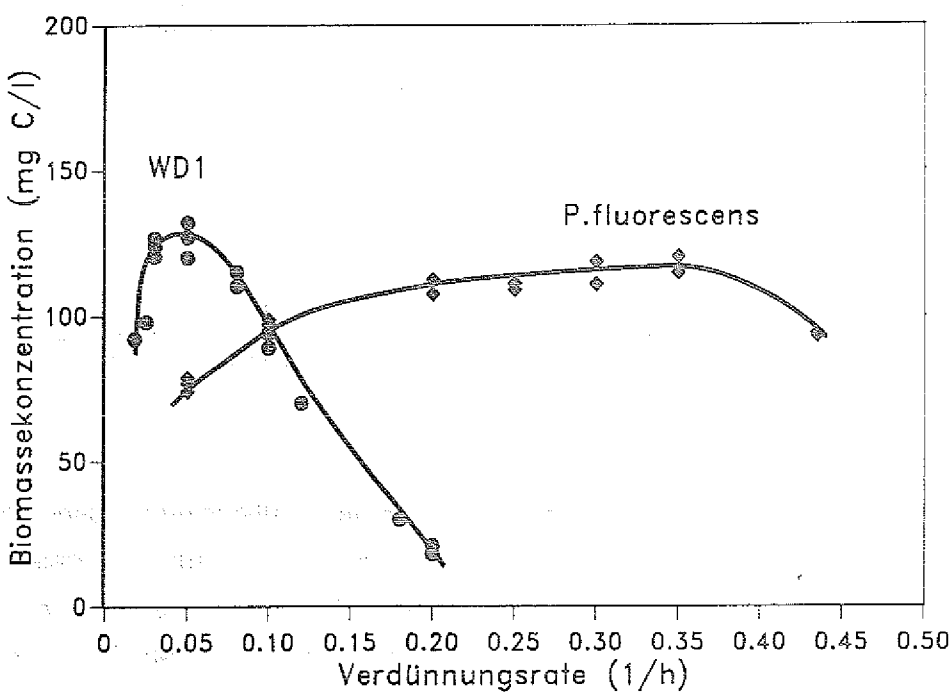


Abb. 36: Biomassekonzentrationen von WD1 und *P. fluorescens* im Chemostaten.
Gemeinsame Auftragung der Meßwerte aus den Einzelexperimenten mit Reinkulturen

Abbildung 36 gibt die Biomassekonzentrationen beider Bakterien in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate wieder, wie sie in den Versuchen mit den einzelnen Reinkulturen ermittelt worden waren.
Zur Abschätzung der möglichen Entwicklung einer Mischpopulation aus beiden Organismen im Chemostaten bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratversorgung seien einige theoretische Überlegungen aufgeführt und auf Basis der μ_{max} und K_m-Werte die hypothetische Populationsentwicklung bei einer Verdünnungsrate von $D = 0.05\ h^{-1}$ dargestellt.

3.1.4.1. Theoretische Überlegungen und hypothetische Populationsentwicklung bei einer ausgewählten Verdünnungsrate

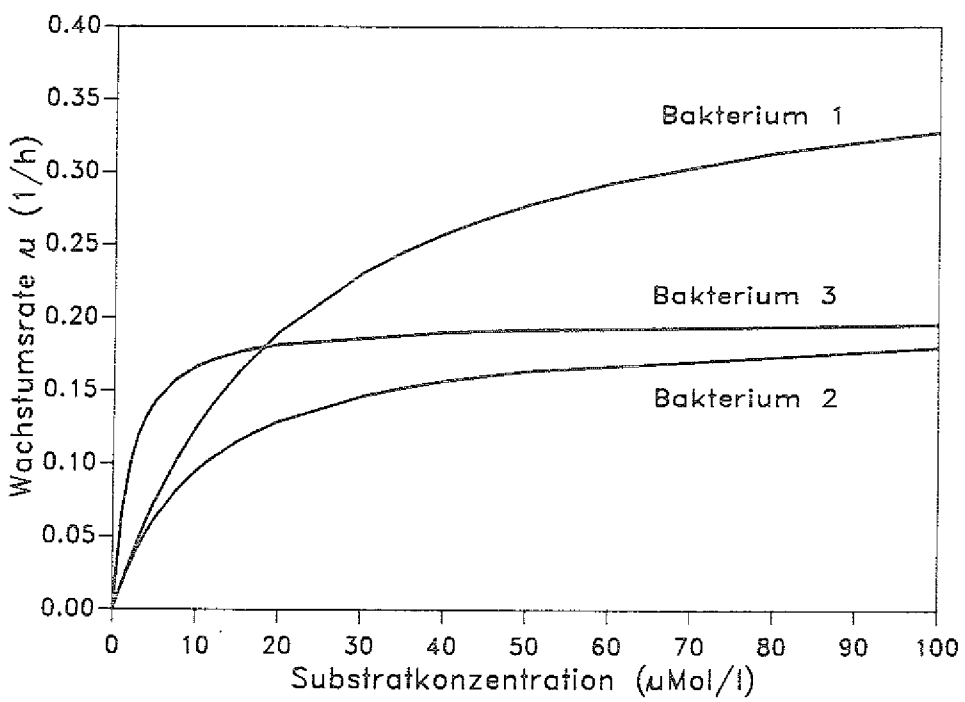


Abb. 37: Wachstumsraten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Wachstum nach Monod) von drei hypothetischen Organismen
Bakterium 1: $\mu_{max} = 0.4\ h^{-1}$
$K_s = 22\ \mu Mol/l$
Bakterium 2: $\mu_{max} = 0.2\ h^{-1}$
$K_s = 11\ \mu Mol/l$
Bakterium 3: $\mu_{max} = 0.2\ h^{-1}$
$K_s = 2\ \mu Mol/l$

Wie aus Abbildung 37 deutlich wird, bietet die doppelt so hohe Substrataffinität von Bakterium 2 (K_s = 11 µMol/l) gegenüber Bakterium 1 (K_s = 22 µMol/l) keine hinreichende Voraussetzung für einen Selektionsvorteil bei irgendeiner Wachstumsrate (= Verdünnungsrate im Chemostaten). Ein Bakterium 3 mit gleicher maximaler Wachstumsrate wie Bakterium 2 (μ_{max} = 0.2 h^{-1}) und einem K_s-Wert, welcher der Beziehung

$$\frac{\mu_{max}\ (\text{Bakterium 1})}{\mu_{max}\ (\text{Bakterium 3})} \leq \frac{K_s\ (\text{Bakterium 1})}{K_s\ (\text{Bakterium 3})}$$

genügte, würde dagegen bei Wachstumsraten (= Verdünnungsraten) unterhalb des resultierenden Schnittpunktes beider Wachstumskurven (nach Monod) selektioniert werden.

Übertragung auf die Testorganismen

Annahme: Das Wachstum beider Bakterien (WD1; *P. fluorescens* = Pf2) auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle kann entsprechend der Monod-Gleichung:

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_s + [S]}$$ beschrieben werden.

Eine definierte Verdünnungsrate D*, bei der Pf2 und WD1 koexistieren könnten, ist gemäß der vorangestellten Herleitungen nur gegeben unter der Bedingung:

$$\frac{\mu_{max}\ (\text{Pf2})}{\mu_{max}\ (\text{WD1})} \leq \frac{K_s\ (\text{Pf2})}{K_s\ (\text{WD1})}$$

Das heißt, die Wachstumskurven beider Organismen in der Auftragung nach Monod (µ gegen [S]) hätten einen gemeinsamen Schnittpunkt. Dann wäre in diesem Punkt [S](Pf2) = [S](WD1) und µ(Pf2) = µ(WD1) und im Chemostaten wäre D* = µ(Pf2) = µ(WD1) die gesuchte Verdünnungsrate, bei der beide Bakterien koexistierten.

Bei Verdünnungsraten D < D* würde WD1 selektioniert

Bei Verdünnungsraten D > D* würde Pf2 selektioniert.

Diese Annahme besitzt nur in einem komplett durchmischten Reaktor mit kontinuierlicher Substratzugabe Gültigkeit. Eine gepulste Substratzugabe (diskontinuierlich = Intermittent Feeding), hätte einen zeitli-

chen Gradienten in der Substratkonzentration zur Folge und das bedeutete, daß auch bei $D < D^*$ für Pf2 kurzzeitig ausreichend Substrat verfügbar wäre. Damit wären die Koexistenzbedingungen nicht nur für eine definierte Verdünnungsrate D^*, sondern für einen größeren Bereich von $D < D^*$ gegeben. Die Populationszusammensetzung über diesen Bereich von D wäre dann abhängig von der Pulsfrequenz.

Für die Versuche mußte zunächst geprüft werden, ob die Wachstumsparameter beider Organismen obiger Beziehung genügten.
Während die gesuchten Werte für μ_{max} aus den Batch-Versuchen bekannt waren, gestaltete sich die Bestimmung der K_s-Werte problematischer. Wie aus den Respirometerversuchen bekannt war, besaßen beide Organismen offenbar eine sehr hohe Affinität für das Substrat (kleine K_m-Werte), so daß die Bestimmung des K_s-Wertes über die Ermittlung der Wachstumsrate μ bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen in Batch-Experimenten keine verwertbaren Ergebnisse liefern könnte:
Ein Bakterium mit einem sehr kleinen K_s-Wert wächst bei allen Substratkonzentrationen, bei denen der Biomassezuwachs über die O.D., TS-Bestimmung oder DOC-Abnahme bestimmt werden könnte, mit nahezu maximaler Wachstumsrate, da die Anfangskonzentration des Substrates näherungsweise der Sättigungskonzentration entsprechen würde.

Die andere Möglichkeit, K_s als die Substratkonzentration bei $D_{max}/2$ im Chemostaten zu bestimmen, scheiterte daran, daß keine genügend empfindliche Analytik für derartig niedrige Acetatkonzentrationen zur Verfügung stand. So war beispielsweise mit *P. fluorescens* in kontinuierlicher Kultur bei Verdünnungsraten $< 0.35\ h^{-1}$ kein Acetat im Kulturfiltrat nachweisbar. Im Gegensatz dazu lag in kontinuierlicher Kultur von WD1 bei $D_{max}/2 = 0.1\ h^{-1}$ wider Erwarten eine mittlere DOC-Konzentration von 118 mg/l vor und es wurde eine Acetatkonzentration von 250 mg/l bzw. 4.2 mMol/l nachgewiesen. Dem respirometrisch ermittelten K_m-Wert entsprechend wäre bei dieser Verdünnungsrate eine erheblich niedrigere Substratkonzentration (8 µMol Acetat/l) zu erwarten gewesen. Da auch die Biomassekonzentration bei Verdünnungsraten $> 0.05\ h^{-1}$ schon wieder abnahm (Abb. 23), schließe ich daraus, daß bei höheren Verdünnungsraten ein anderer Faktor als die zugeführte Kohlenstoffquelle das Wachstum von WD1 limitierte. Beispielsweise können Bakterien wachstumsregulierende Substanzen produzieren, welche nur in Batch-Kultur oder bei langen Verweilzeiten im Chemostaten in den benö-

tigten Konzentrationen vorliegen (Depauw-Gillet und Remacle 1978). Das könnte die apparente Zunahme des K_S-Wertes bei höheren Verdünnungsraten erklären.

Mit der bei $D_{max}/2$ im Chemostaten gemessenen Acetatkonzentration von 4.2 mMol/l, eingesetzt für K_S in die Monod-Gleichung, errechnete sich für eine Verdünnungsrate von $D = 0.05\ h^{-1}$ noch eine Acetatkonzentration von 1.4 mMol/l. Tatsächlich war jedoch kein Acetat nachweisbar. Für Wachstumsraten $> 0.05\ h^{-1}$ konnte das Wachstum von WD1 also nicht mit der Monod-Gleichung beschrieben werden, da die Substrataffinität scheinbar mit zunehmender Wachstumsrate abnahm. Damit war aber nicht auszuschließen, daß für Wachstumsraten $\leq 0.05\ h^{-1}$ die eingangs dieses Kapitels aufgeführten Beziehungen für das Wachstums beider Bakterien in Cokultur Gültigkeit besaßen. Deshalb wurde zur Ermittlung des hypothetischen Schnittpunktes beider Wachstumskurven dennoch die in Abb. 38 dargestellten Wachstumsraten für beide Organismen nach der Monod-Gleichung berechnet.

Für μ_{max} wurden die Ergebnisse aus den Batch-Versuchen (Pf2: $0.38\ h^{-1}$, WD1: $0.2\ h^{-1}$) und für K_S die K_m-Werte (Pf2: 22 µMol Acetat/l; WD1: 8 µMol Acetat/l) aus den Respirometerversuchen (für *P. fluorescens* die Mittelwerte aus kontinuierlicher und diskontinuierlicher Kultur) eingesetzt.

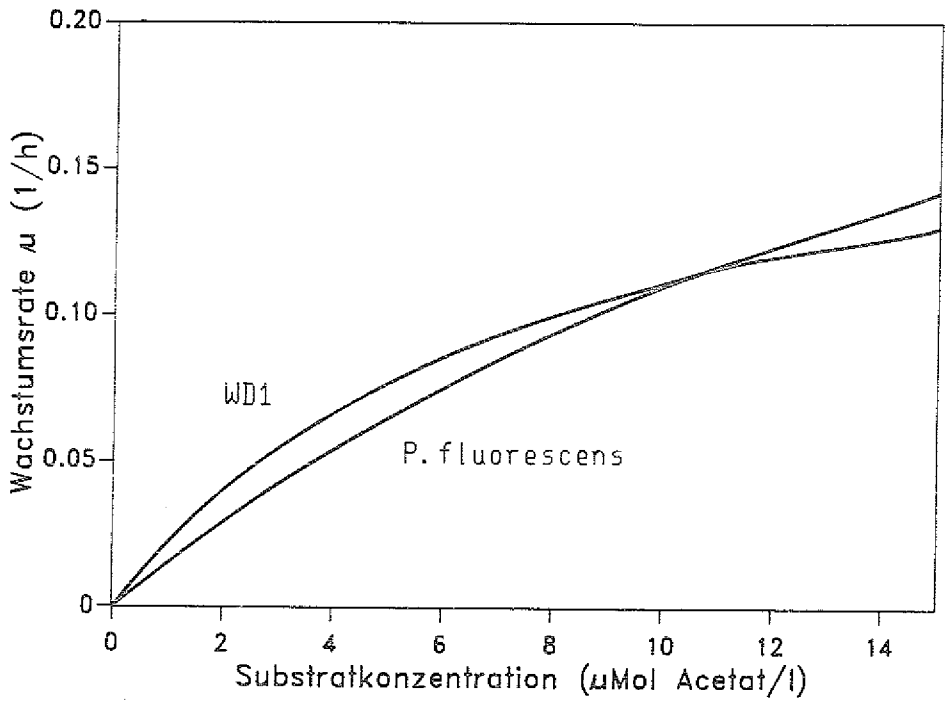


Abb. 38: Berechnete Wachstumsraten von *P. fluorescens* und WD1 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration
Die zugrundegelegten Wachstumsparameter sind im vorgenannten Text aufgeführt

Wie aus der Abbildung ersichtlich, ergäbe sich als Koexistenzpunkt [S](Pf2) = [S](WD1) ein $\mu = 0.112\ h^{-1}$, entsprechend einer Verdünnungsrate $D = 0.112\ h^{-1}$ im Chemostaten, bei der beide Organismen gleichgute Wachstumsbedingungen vorfinden sollten. Bei $D < 0.112\ h^{-1}$ sollte zugunsten des Isolastes WD1 selektioniert werden, bei $D > 0.112\ h^{-1}$ sollte *P. fluorescens* selektioniert werden.
Wie aber zuvor gezeigt worden war, konnte die nach der Monod-Gleichung abgeleitete Verdünnungsrate von $0.112\ h^{-1}$ nicht der tatsächlichen Wachstumsrate entsprechen, bei der beide Organismen koexistierten.
Es blieb experimentell zu prüfen, ob und bei welcher Wachstumsrate (für $\mu \leq 0.05\ h^{-1}$) WD1 gegen *P. fluorescens* erfolgreich um das Substrat (Acetat) konkurrieren konnte.

Abb. 39 zeigt die hypothetische Populationsänderung bei $D = 0.05\ h^{-1}$ unter Zugrundelegung der selben Wachstums- bzw. Aktivitätsparameter wie sie für die Herleitung in Abb. 38 eingesetzt wurden. Die Startkonzentrationen entsprechen den Anfangskonzentrationen der beiden Organismen, wie sie dann auch im Experiment gewählt wurden.

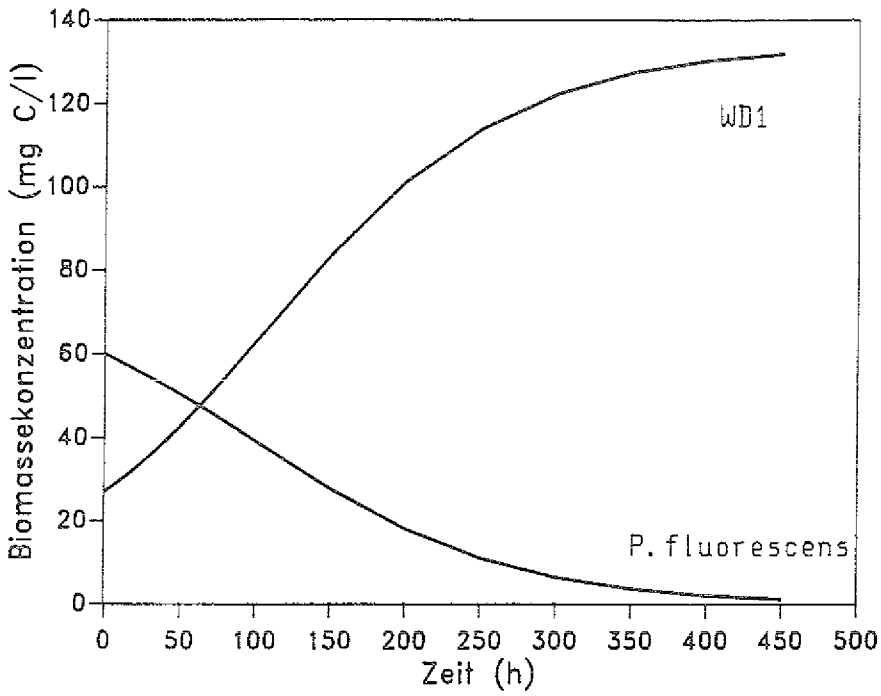


Abb. 39: Hypothetische Populationsänderung bei D = 0.05 h^{-1} in kontinuierlicher Kultur

3.1.4.2. Populationsdynamik in kontinuierlicher Kultur (Durchflußreaktor)

Zur experimentellen Überprüfung der hypothetischen Populationsentwicklung in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate und Art der Substratdosierung wurden zunächst zwei Reaktoren mit jeweils einer Reinkultur von WD1 und *P. fluorescens* als Chemostaten mit einer Verdünnungsrate von D = 0.05 h^{-1} betrieben. Nach Erreichen der Fließgleichgewichte und Bestimmung der Routinemeßparameter (O.D., TRS, DOC, Acetat, KBE) wurden jeweils 20 % des einen Fermenterinhaltes in den anderen inokuliert und die Populationsentwicklung über die Anzahl der koloniebildenden Einheiten verfolgt. Zur Minimierung von Systemstörungen durch die Probenentnahme wurde desweiteren auf die Bestimmung aller anderen Meßparameter verzichtet und nur 10 ml Proben zur Bestimmung der KBE entnommen.

In den Abbildungen 40 und 41 sind die resultierenden Änderungen der Populationszusammensetzung in den Fermentern dargestellt.

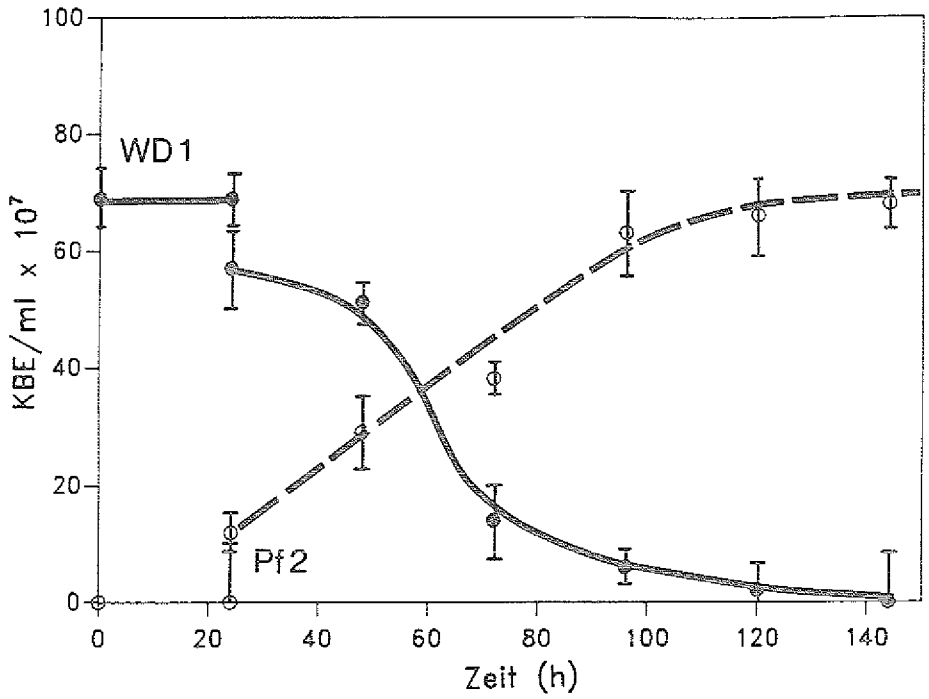


Abb. 40: Steady-state-Konzentration der KBE von WD1 und Populationsentwicklung nach dem Austausch von 20 % des Fermentervolumens gegen das gleiche Volumen einer Reinkultur von *P. fluorescens*
(Verdünnungsrate D = 0.05 h^{-1}

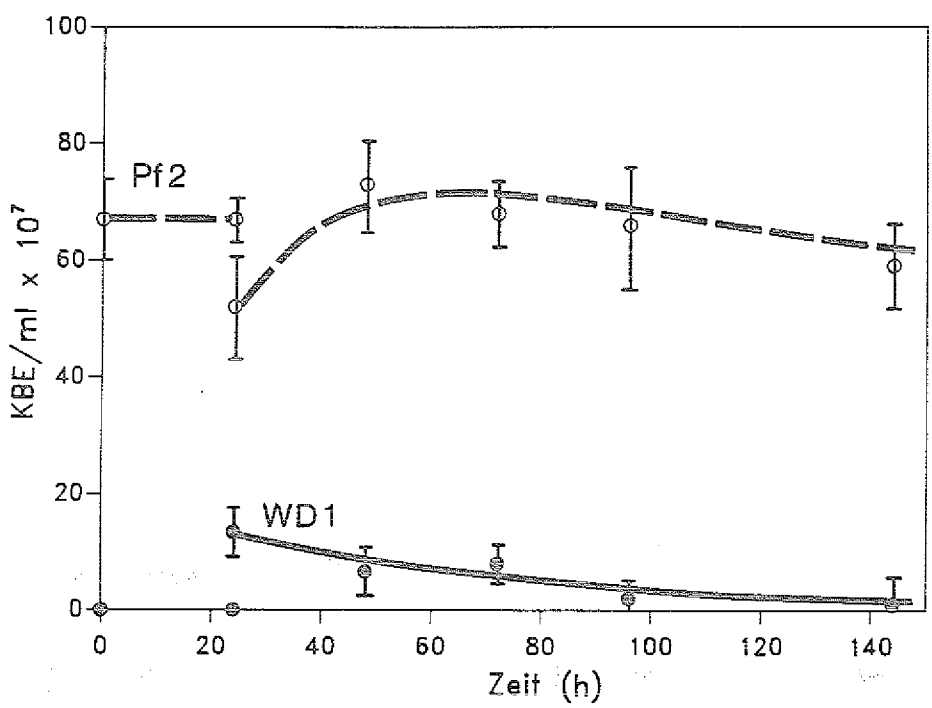


Abb. 41.: Steady-state-Konzentration der KBE von *P. fluorescens* und Populationsentwicklung nach dem Austausch von 20 % des Fermentervolumens gegen das gleiche Volumen einer Reinkultur von WD1
(Verdünnungsrate D = 0.05 h^{-1})

Die Ergebnisse belegen, daß sich unter den eingestellten Kultivierungsbedingungen - entgegen den Berechnungen nach der Monod-Gleichung - WD1 gegenüber *P. fluorescens* nicht behaupten konnte.
Auf die Durchführung der Versuche mit diskontinuierlicher Substratzugabe unter sonst gleichen Bedingungen wurde deshalb verzichtet.

Die Frage, ob WD1 überhaupt aufgrund einer höheren Substrataffinität (verglichen mit *P. fluorescens*) unter Bedingungen größerer Substratlimitierung erfolgreich um das Substrat Essigsäure konkurrieren könnte, sollten die im folgenden beschriebenen Versuche im Reaktor mit Biomasserückhaltung klären helfen.

3.1.4.3. Populationsdynamik im Reaktor mit Biomasserückhaltung

Die teilweise Biomasserückhaltung (vergleiche 2.2.1.2.) führt zu einer Aufkonzentrierung von Biomasse im Fermenter. Dies bedingt, bei konstanter hydraulischer Verweilzeit, eine niedrige "Biomassebelastung" (food to biomass ratio). Diese sinkt mit zunehmendem Rückhaltegrad proportional zur Erhöhung der Biomassekonzentration im Reaktor (Kap. 1.2.). Die Mikroorganismen konkurrieren dann um immer weniger verfügbares Substrat, wobei die Selektionsvorteile für "Affinitätstrategen" wachsen.
In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde die Populationsentwicklung einer Mischpopulation von WD1 und *P. fluorescens* bei konstanter mittlerer hydraulischer Verweilzeit jedoch unterschiedlicher mittlerer Verweilzeit der Biomasse untersucht. Experimente dieser Art konnten früher nicht durchgeführt werden, da die apparativen Voraussetzungen nicht gegeben waren.

3.1.4.3.1. Mittleres Biomassealter 4 Tage (kontinuierliche und diskontinuierliche Substratzugabe)

Im 1000 ml-Fermenter mit Biomasserückhaltung wurde WD1 bei einer mittleren hydraulischen Verweilzeit von 20 h ($D = 0.05\ h^{-1}$) kultiviert. Die Aufteilung des Fermenterablaufs in einen bakterienfreien Filtratvolumenstrom und einen biomassehaltigen Volumenstrom (gleiche Biomassekonzentration wie im Reaktor) erlaubte es, die mittlere Verweilzeit

der Bakterien im System von der mittleren hydraulischen Verweilzeit zu entkoppeln.
Über das Verhältnis der Volumenströme wurde für diesen Versuch ein mittleres Biomassealter (Verweilzeit) von 4 d eingestellt.

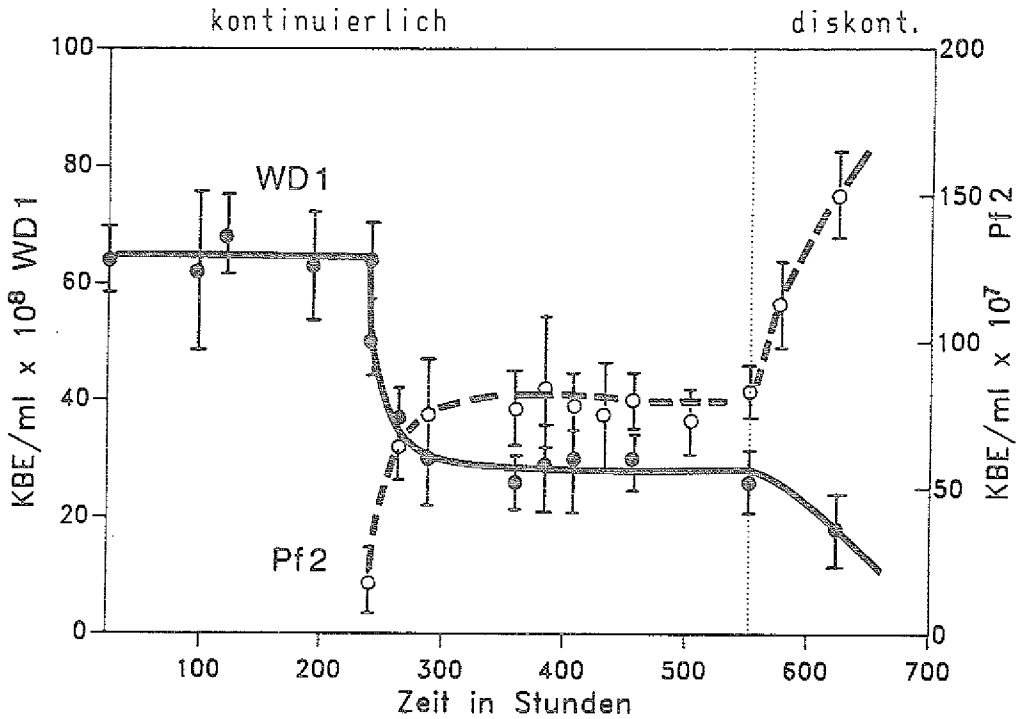


Abb. 42: Steady-state-Konzentration der KBE von WD1 und Populationsentwicklung nach Zuimpfen von *P. fluorescens*
Mittlere Verweilzeit: hydraulisch 20 h, Biomasse 4 d

Etwa 15 Tage nach Kultivierungsbeginn war kein weiterer Biomassezuwachs mehr meßbar. Von diesem Zeitpunkt an (Zeit 0 in Abbildung 42) wurden nur noch 10 ml Proben zur Keimzahlbestimmung genommen. Der in diesem Fließgleichgewichtszustand gemessenen Biomassekonzentration von ca. 1.2 g TRS/l entsprechen die Anfangswerte (0 - 240 Stunden) der in Abbildung 42 aufgetragenen KBE/ml von WD1. Nachdem ca 15 % des Reaktorvolumens gegen ein gleiches Volumen einer Reinkultur von *P. fluorescens* (frühe stationäre Phase einer Batch-Kultur) ausgetauscht wurden, verringerte sich der Anteil von WD1 an der Gesamtpopulation zugunsten von *P. fluorescens* um ca. 60 %, d.h. über das aus der Verdünnung resultierende Maß hinaus. Es stellte sich innerhalb von ca. 2 Tagen eine Mischpopulation mit gleichbleibenden Anteilen beider Bakterien ein, solange die Substratzugabe kontinuierlich erfolgte.

Die Zellkonzentration von WD1 betrug dabei im Mittel 30 * 10^8 KBE/ml gegenüber durchschnittlich 7.5 * 10^8 KBE/ml von *P. fluorescens*.
Das Umschalten der Substratversorgung von kontinuierlicher auf diskontinuierliche Zugabe nach 550 Stunden Betrieb (Abb. 42) bewirkte eine rasche Veränderung der Populationszusammensetzung zugunsten von *P. fluorescens*. Die aus der gepulsten Zugabe resultierende kurzzeitige Erhöhung der Substratkonzentration zu Beginn jedes Dosierungstaktes (stündliche Zugabe innerhalb 1 min) bewirkte offenbar einen Wachstumsvorteil für *P. fluorescens*.
Die über den Zeitraum der kontinuierlichen Substratzugabe gleichbleibende Zusammensetzung der Mischpopulation zeigt, daß bei Organismen unter diesen Kulturbedingungen stabil koexistieren konnten (entsprechend dem Schnittpunkt der hypothetischen Wachstumsfunktionen beider Organismen wie in 3.1.4.1. hergeleitet). Eine weitere Verringerung der spezifischen Biomassebelastung durch eine Erhöhung des Rückhaltegrades im Kultursystem sollte gemäß Abb. 38 hingegen einen Selektionsvorteil für WD1 ergeben.
Diese Annahme wurde im selben Kultursystem bei der gleichen mittleren hydraulischen Verweilzeit des Kulturmediums experimentell geprüft.

3.1.4.3.2. Mittleres Biomassealter 7 Tage (kontinuierliche und diskontinuierliche Substratzugabe)

Der Versuch wurde analog dem zuvor beschriebenen Experiment jedoch mit einem von 4 auf 7 Tage erhöhten Biomassealter durchgeführt. WD1 erreichte im Fließgleichgewicht eine Konzentration von ca. 1.9 g TRS/l. Die zugehörige Lebendzellkonzentration gemessen als KBE/ml betrug im Mittel 87 * 10^8 KBE/ml.

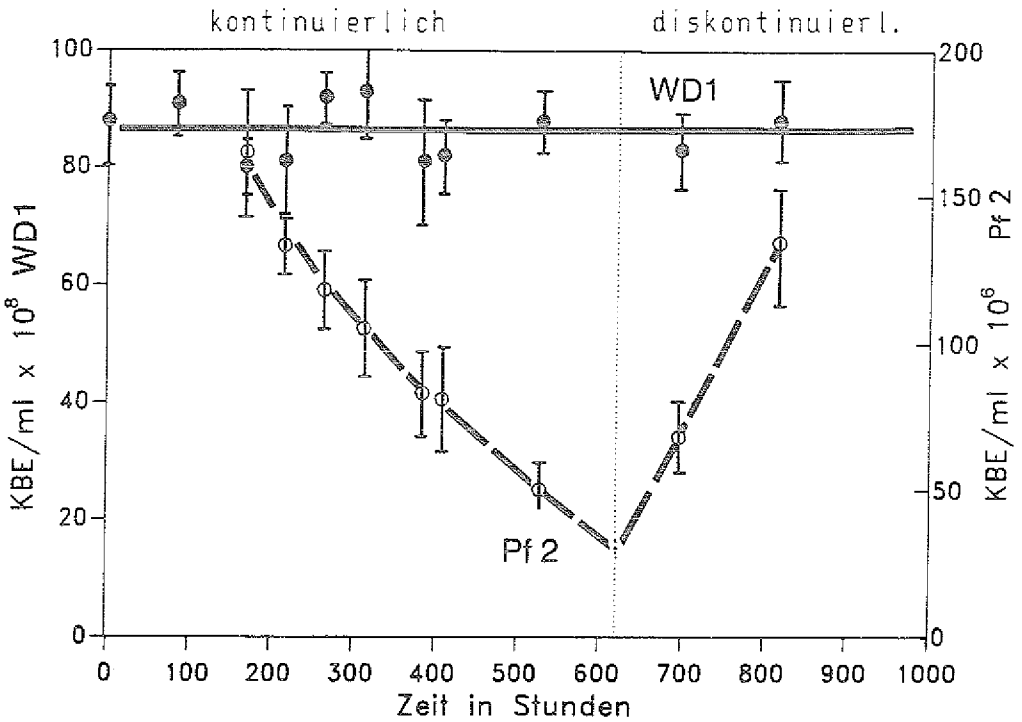


Abb. 43: Steady-state-Konzentrationen der KBE von WD1 und Populationsentwicklung nach Animpfen von *P. fluorescens*
Mittlere Verweilzeiten: hydraulisch 20 h, Biomasse 7 d

Nach dem Hinzuimpfen von 17 * 10^7 KBE/ml (Endkonzentration) von *P. fluorescens* nahm dessen Populationsanteil ab, während der Anteil von WD1 an der Mischpopulation sich nicht signifikant änderte. Die Konzentrationsabnahme von *P. fluorescens* hielt über den gesamten Kultivierungszeitraum mit kontinuierlicher Substratzugabe an. Die gewählten Versuchsbedingungen erbrachten WD1 den erwarteten Wachstumsvorteil gegenüber dem um das gleiche Substrat konkurrierenden *P. fluorescens*.
Die Umstellung von kontinuierlicher auf diskontinuierliche Substratzugabe (I.F. = Intermittent Feeding) verhalf *P. fluorescens* wiederum zu einer relativ raschen Erhöhung seines Populationsanteils.
Eine gleichzeitige Abnahme der Lebendkeimzahl von WD1 war nicht meßbar und hätte im dargestellten Versuchszeitraum wegen der geringen absoluten Anteile von *P. fluorescens* auch lediglich im Streubereich der Einzelbestimmungen liegen können.
Es muß angenommen werden, daß *P. fluorescens* trotz der Abnahme der Populationsanteile an der Mischpopulation bei kontinuierlicher Substratzugabe noch zu wachsen vermochte. Die Abnahme bedeutete ja lediglich, daß die Austragsrate durch die Zuwachsrate nicht kompen-

siert werden konnte. Die Wachstumsrate von *P. fluorescens* unter diesen Bedingungen läßt sich mit Hilfe der bekannten theoretischen Austragsrate (Abnahme der Biomassekonzentration einer nicht wachsenden Kultur aufgrund des kontinuierlichen Biomasseabzugs) und den Meßwerten der KBE/ml von *P. fluorescens* wie folgt berechnen:

Die Austragsrate für eine nicht wachsende Kultur im Fermenter beträgt:

$$D * x = - dx/dt \qquad (1)$$

Die Bakterienkonzentration im Fermenter würde also gemäß

$$x(t) = x_o * e^{-Dt} \qquad (2)$$

abnehmen.

Da die mittlere hydraulische Verweilzeit und die mittlere Verweilzeit der Biomasse im System mit teilweiser Biomasserückhaltung um den Faktor α entkoppelt waren (Kap. 1.2.), ist D in (1) und (2) durch $D_b = \alpha * D$ zu ersetzen

mit D = Verdünnungsrate (hydraulisch)
D_b = Verdünnungsrate (Biomasse)
$\alpha = \dot{V}_a/\dot{V}_z$
wobei $\dot{V}_a$ = Volumenstrom des Ablaufs mit Biomasse
$\dot{V}_z$ = Volumenstroms des Zulaufs

Die Zuwachsrate ist gegeben durch:

$$\mu * x = dx/dt \qquad (3)$$

entsprechend einer Zunahme der Bakterienkonzentration im Fermenter gemäß:

$$x(t) = x_o * e^{\mu t} \qquad (4)$$

Die Rate der Änderung der Bakterienkonzentration (dx/dt) beträgt:

$$dx/dt = \mu x - D_b x \qquad (5)$$

Die gesuchte Wachstumsrate von *P. fluorescens* unter diesen Kulturbedingungen berechnete sich dann nach:

$$\mu = (\ln x - \ln x_o)/t + D_b \qquad (6)$$

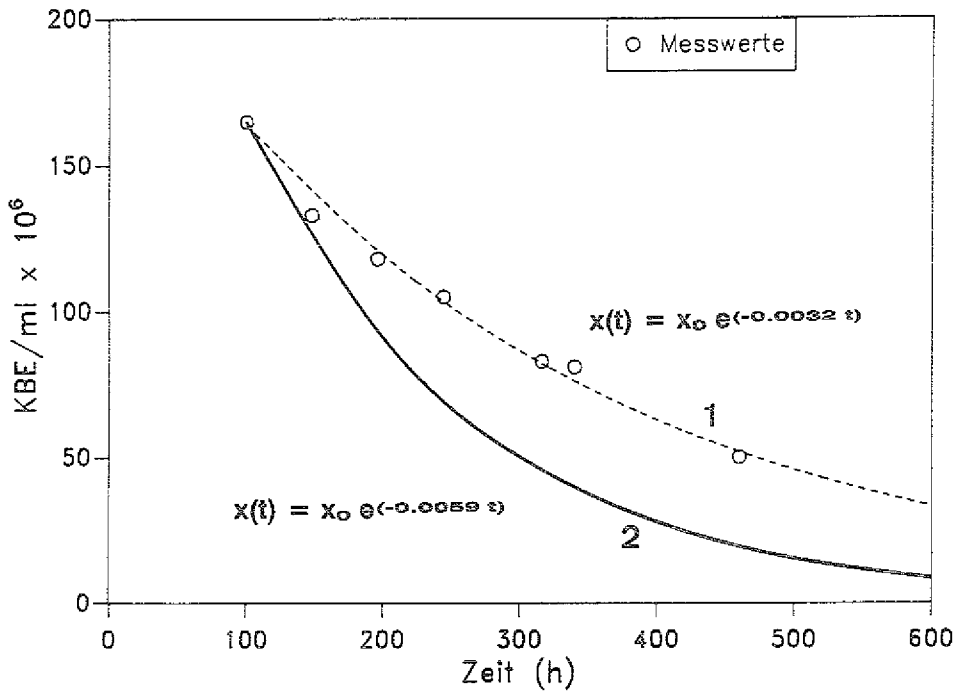


Abb. 44: KBE von *P. fluorescens* bei kontinuierl. Substratzugabe (1) und theoretische Konzentrationsabnahme ohne Wachstum (2)

In Abb. 44 ist die Lebendkeimzahl von *P. fluorescens* (KBE/ml) gegen die Zeit (Kurve 1) zusammen mit dem Verlauf der theoretischen Konzentrationsabnahme aufgetragen, wenn kein Zuwachs erfolgte (Kurve 2).
Bei der im Experiment eingestellten mittleren Verweilzeit der Biomasse von 7 Tagen ($D = 0.0059\ h^{-1}$) wäre die Abnahme der Populationsanteile von *P. fluorescens* an der Mischkultur ohne Wachstum gemäß Gleichung 2

mit $$x(t) = x_o * e^{-0.0059\ h^{-1} * t}$$

erfolgt.

Die gemessene Abnahme der KBE/ml erfolgte im Gegensatz dazu mit

$$x(t) = x_0 * e^{-0.0032\ h^{-1} * t}$$

also $$(\ln x - \ln x_0)/t = -0.0032\ h^{-1}$$

Eingesetzt in Gleichung (6) resultierte unter diesen Kulturbedingungen für

P. fluorescens eine Wachstumsrate μ von

$$\mu = -0.0032\ h^{-1} + 0.0059\ h^{-1} = 0.0027\ h^{-1}$$

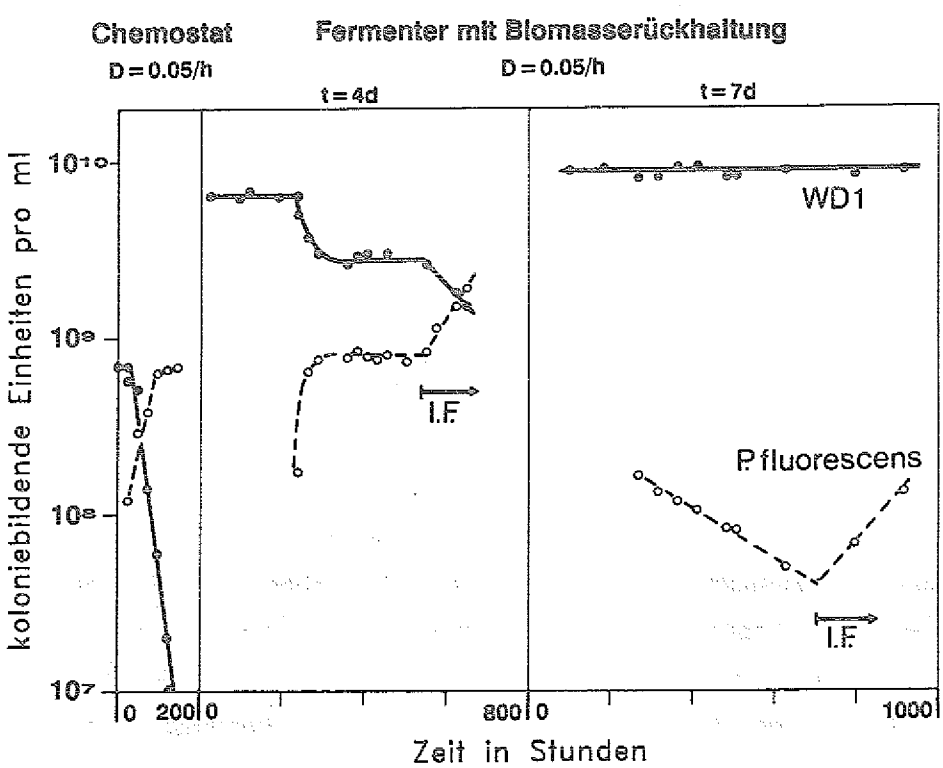


Abb. 45: Gemeinsame Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen zur Populationsdynamik mit Mischkulturen von WD1 und *P. fluorescens*.
Der Übergang zu diskontinuierlicher Substratzufuhr (Intermittent Feeding) ist jeweils durch "I.F." angegeben

Die Ergebnisse der Mischkulturversuche sind in Abbildung 45 zusammengefaßt.

Die diskontinuierliche Substratzugabe begünstigte unter allen Versuchsbedingungen die Selektion von *P. fluorescens*. Bei kontinuierlicher Substratzugabe wurde im Gegensatz dazu mit abnehmender spezifischer Biomassebelastung und daraus folgender Zunahme der Substratlimitierung ein Konkurrenzvorteil des Isolates WD1 deutlich.
Die Tatsache, daß allein durch die Art der Substratzugabe (kontinuierlich oder diskontinuierlich bei sonst gleichen Kulturbedingungen) die Wachstumsvorteile umkehrbar waren, belegt, daß die festgestellten Populationsentwicklungen ursächlich das Konkurrenzverhalten beider Bakterien um die angebotene Kohlenstoffquelle widerspiegelten. Andere mögliche Faktoren, wie zum Beispiel die gegenseitige Beeinflussung durch Stoffwechselprodukte oder Ähnliches, waren vernachlässigbar.
Es wird zu diskutieren sein, ob die spezifische Biomassebelastung, wie sie durch die Verwendung des Fermenters mit Biomasserückhaltung erzielt werden konnte, nicht grundsätzlich auch im Chemostaten durch die Einstellung entsprechend kleiner Verdünnungsraten realisierbar sein könnte.
Sicher aber ist, daß <u>absolute</u> Umsatzraten und Biomassekonzentrationen, wie sie im Fermenter mit Biomasserückhaltung realisiert werden konnten, im Chemostaten bei gleicher spezifischer (relativer) Belastung der Biomasse bezüglich eines Substrates oder sonstiger Substanzen <u>prinzipiell nicht</u> erreichbar sind.

3.2. Betriebstechnische Erfahrungen mit dem neuartigen Kultursystem

An die von mir konzipierten und in den Werkstätten des Forschungszentrum Jülich gefertigten Fermenter hatte ich die im folgenden aufgeführten Anforderungen gestellt:

1. Preisgünstige Alternative zu käuflichen Fermentern
2. Integration von im Institut bereits vorhandenen Meß- und Regelgeräten
3. Größere Flexibilität bezogen auf die unterschiedlichen beabsichtigten Einsatzmöglichkeiten, wie
   - niveaugeregelter Kulturabzug
   - Bypass-Schaltung eines Filtrationsmoduls
   - batchweise, kontinuierliche und diskontinuierliche Betriebsweise u.a.
4. Leichte Handhabung und hohe Betriebssicherheit
5. Kompatibilität der Bauteile: rascher Ersatz/ Austausch im Störungsfall
6. Unabhängigkeit von Kundendienst und Lieferzeiten eines Herstellers, da alle Bauteile im Forschungszentrum Jülich gefertigt werden konnten bzw. aus dem Zentrallager oder Laborfachhandel kurzfristig zu beziehen waren.

Während anstelle der selbstgefertigten Fermenter als Kompromißlösung grundsätzlich auch käufliche Kultursysteme verwendbar gewesen wären, galt dies nicht für das Filtrationsmodul, welches zur Biomasserückhaltung eingesetzt wurde. Nach meinem Kenntnisstand konnte keines der im Handel angebotenen Filterelemente den in 2.2.1.3. formulierten Anforderungen genügen. Erst die Weiterentwicklung eines Moduls zur kontinuierlichen aseptischen Probenentnahme zu dem in Abb. 9 dargestellten Filtrationsmodul ermöglichte die Durchführung der Experimente mit beliebig von der hydraulischen Verweilzeit entkoppeltem Biomassealter unter axenischen Bedingungen.

3.2.1. Fermenter

Die Fermenter konnten nach mehrfach erforderlichen und durchgeführten konstruktiven Änderungen bis zu dem in 2.2.1. beschriebenen Entwicklungsstand schließlich alle an sie gestellten Erwartungen erfüllen. Es ist mir wichtig, einige Punkte an dieser Stelle besonders zu erwähnen:

Rührverschluß und Rührwellenlagerung

Die Kombination des Magnetrührverschlusses mit der innerhalb des Fermenters zweifach gelagerten Rührwelle (VA-Kugellager) erwies sich als eine wartungsfreie und zuverlässige Einheit zur Turbulenzerzeugung. Erst nach jeweils ca. 18-monatigem Betrieb, mit nur kurzzeitigen Unterbrechungen, mußte an den beiden zuerst in Betrieb genommenen Fermentern das unterhalb des Deckels angeordnete Lager nebst Wellendichtung ersetzt werden. Es erwies sich auch als vorteilhaft, daß trotz leichter Unwuchten der Rührwellen aufgrund der defekten Lager die laufenden Versuche erst noch zu Ende geführt werden konnten. Im Gegensatz dazu treten kurzfristig und öfter Defekte an den häufig in Fermentern verwendeten Gleitringdichtungen auf und bedingen dann meistens einen sofortigen Versuchsabbruch.

Druckgehäuse für pH-Elektrode

Der Einbau von pH-Elektroden im Druckgehäuse ist bei in situ sterilisierbaren Fermentern obligatorisch. An Fermentern, welche zur Sterilisation in Autoklaven konzipiert sind, wird allgemein darauf verzichtet. In den anfänglichen Experimenten wurden von mir die pH-Elektroden ebenfalls ohne Druckgehäuse eingesetzt und etwa ab einer Woche nach Versuchsbeginn mußten sie täglich nachgeeicht werden. Druckmessungen im Gasraum des Fermenters ergaben einen Überdruck von ca. 20 mbar (abhängig von der Begasungsrate und dem Feuchtegehalt des Abluftfilters). Der hydrostatische Druck des 12 cm über der Oberfläche der Kultursuspension liegenden Elektrolytreservoirs reichte also nicht aus, einen für langzeitstabile Messungen erforderlichen Druckgradienten von der Elektrolytlösung zum Meßgut zu gewährleisten. Die gasdichte Ummantelung des oberhalb des Fermenterdeckels gelegenen Elektrodenteils und die Verbindung dieses Druckgehäuses mit der Zuluftleitung schaffte sofortige Abhilfe. Der pH-Wert wurde auch während des längsten, über 2.5 Monate andauernden Kulturversuchs zuverlässig angezeigt.

Handhabung

Die unkomplizierte Handhabung der Fermenter war besonders durch die Möglichkeit, das Kultursystem nahezu komplett aufgebaut autoklavieren zu können, gewährleistet. Lediglich die nachträglich herzustellenden Verbindungen zwischen den Förderschläuchen zur Substratvorratsflasche und zur Ablaufflasche bargen ein größeres Kontaminationsrisiko, welches aber durch die unter 2.2.1.1. beschriebene Vorgehensweise minimiert werden konnte.

Inzwischen sind im IBT-3 sieben Fermenter dieser Bauweise mit Arbeitsvolumina zwischen 800 ml und 3 l in Betrieb.

3.2.2. Filtrationsmodul

Die an das Filtrationsmodul zur Durchführung der geplanten Experimente gestellten Anforderungen und die konstruktiven Merkmale des entwickelten Gerätes sind ausführlich unter 2.2.1.3. aufgeführt. Mit der zuletzt modifizierten und schließlich in den Kulturversuchen eingesetzten Version wurden Untersuchungen zur Abhängigkeit der Filtrationsleistung von der Rührergeschwindigkeit und zur Standzeit gemacht. Dazu fand Bakterienmasse aus Fermenterabläufen mit einem durchschnittlichen TRS von 500 mg/l Verwendung.

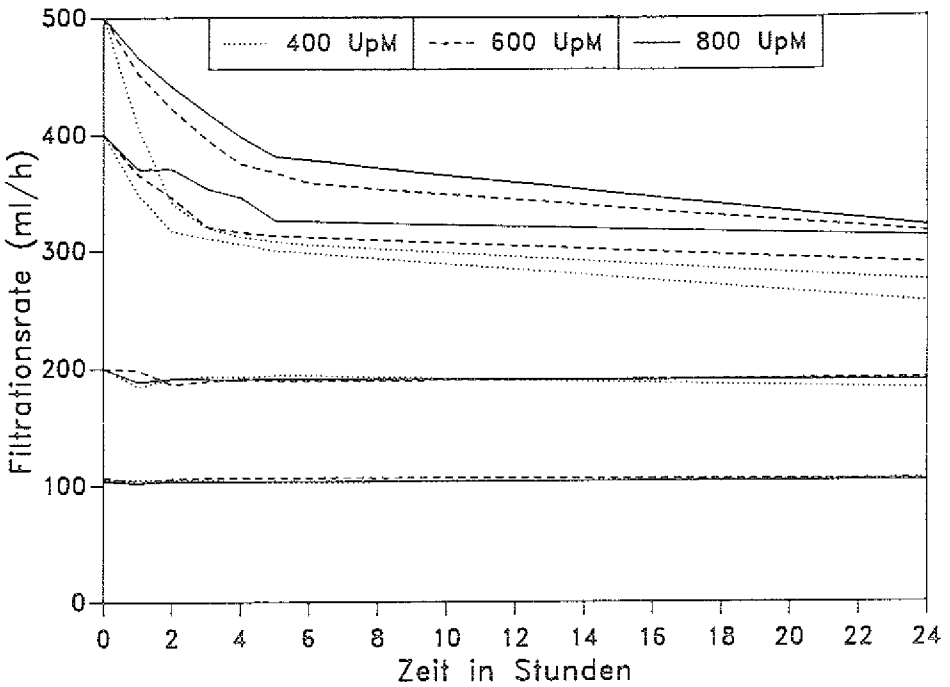


Abb. 46.: Zeitlich Änderungen der Filtrationsraten bei unterschiedlichen Rührerdrehzahlen

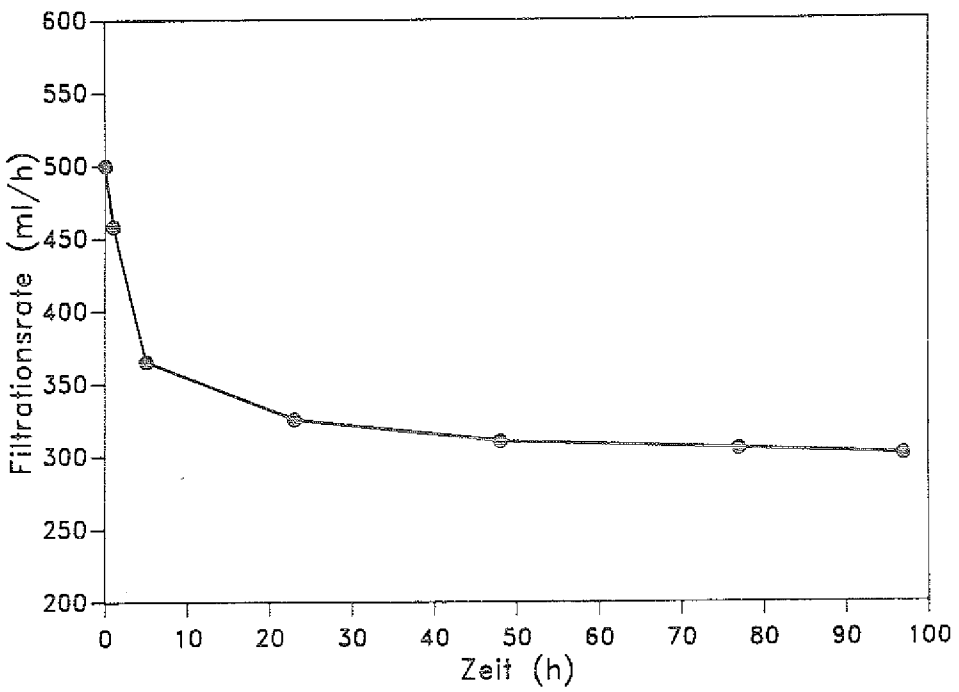


Abb. 47: Zeitliche Änderung der Filtrationsrate bei einer Rührerdrehzahl von 800 UpM über einen Untersuchungszeitraum von 100 Stunden

Den Untersuchungsergebnissen zufolge sollte es also möglich sein, Filtrationsraten von ca. 250 ml/h (entsprechend einer spezifischen Filterflächenbelastung = 42 $l/m^2 * h^{-1}$) über den Zeitraum von mehreren Wochen ohne Filterwechsel aufrecht zu erhalten. In den Kulturversuchen (Fermenter mit Biomasserückhaltung) wurden schließlich Standzeiten von > 2 Monaten ohne Filterwechsel erzielt, und zwar bei Biomassekonzentrationen von ca. 1900 mg TRS/l. Dabei betrug die Filtrationsrate allerdings max. 50 ml/h (je nach Rückhaltefaktor). Es bestanden also noch erhebliche Sicherheitsreserven, so daß auch die Durchführung von Langzeitversuchen selbst in den größeren 2-l Reaktoren mit Biomasserückhaltung unter "kläranlagentypischen" Bedingungen (z.B. 10 h "Belüftungszeit" bei 14 Tagen "Schlammalter") realisierbar wäre.
Obwohl das aseptische Auswechseln des Filtrationsmoduls im laufenden Versuch rein technisch problemlos möglich war, sollte das durch eine hohe Standzeit und Zuverlässigkeit unbedingt vermieden werden.
Ein Auswechseln des Filters hätte den Verlust von ca. 12 % des Gesamtvolumens im Kultursystem und damit jedesmal eine Änderung der Belastungsverhältnisse (Konkurrenzbedingungen) bedeutet. Das konnte besonders für die Versuche zur Untersuchung der Populationsdynamik nicht akzeptiert werden. Das Filterbild (Biomasseablagerungen auf der Filtermembran) und Einschaltzeiträume der Filtratpumpe zum Ende der bis zu 10-wöchigen Experimente berechtigte zu der Annahme, daß eine Ausdehnung der Versuchsdauer möglich gewesen wäre.

4.0 Diskussion

Selbst in komplexen Ökosystemen, in denen eine einzelne Population einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt ist, können die beobachteten Populationsänderungen größtenteils auf das Zusammenwirken relativ weniger "Schlüsselfaktoren" zurückgeführt werden, während eine große Zahl anderer Faktoren - obwohl vorhanden - keinen nachweisbaren oder nur einen geringen Effekt hat (Czihak et al. 1981).
Erst dieser Umstand berechtigt zu der Annahme, daß es mit den an Experimentalsystemen gewonnenen Kenntnissen überhaupt möglich sein kann, Teilaspekte oder Zusammenhänge in einem simulierten komplexen Bezugssystem zu verstehen.

In meinen Untersuchungen habe ich in der spezifischen Biomassebelastung (food to biomass ratio) einen solchen "Schlüsselfaktor" erkannt, welcher die Populationsanteile verschiedener um das gleiche Substrat konkurrierender Bakterienstämme maßgeblich bestimmt. Neben der Untersuchung dieser unmittelbaren Auswirkungen der spezifischen Belastung als Selektionsfaktor beabsichtigte ich ursprünglich, den Einfluß der Biomassebelastung (bzw. der daraus resultierenden mittleren Generationszeit für die Bakterien) auf die vermehrte Phosphatspeicherung und Rücklösung dazu befähigter Bakterien zu untersuchen (Kap. 4.3.), was jedoch nicht im gewünschten Umfang gelang.
Mit dem von mir entwickelten und beschriebenen Kultursystem waren die Voraussetzungen gegeben, das Wachstum von Bakterienreinkulturen und definierten Mischkulturen unter Bedingungen zu untersuchen, die bezüglich der Substratlimitierung und der Biomassekonzentration den in einer biologischen Kläranlage (Belebtschlammverfahren) vorliegenden gleichen. Insbesondere die Untersuchungen der Populationsdynamik erforderten eine langzeitstabile und axenische Kultivierung, bei der jedes Rückspülen oder Auswechseln des Filtrationsmoduls vermieden werden mußte, weil das eine ungewollte Änderung der Konkurrenzbedingungen für die untersuchten Organismen bedeutet hätte. Diesen Anforderungen wurde das konzipierte und verwendete Kultursystem in vollem Umfang gerecht.

Zunächst aber wurden die Wachstumsparameter der ausgewählten Testorganismen im Batch- und Chemostatexperiment ermittelt.

4.1. Wachstum der Reinkulturen und die Auswirkungen diskontinuierlicher Substratzugabe

Die nach den in 2.1.1. aufgeführten Kriterien ausgewählten drei Bakterienstämme wurden jeweils in Batch- und kontinuierlicher Kultur (Chemostat) untersucht (Versuchsbedingungen Kap. 2.2.1.4.).

Acinetobacter sp. und *P. fluorescens* wurden in kontinuierlicher Kultur auch bei Verdünnungsraten, die größer waren als die zuvor in Batch-Versuchen ermittelten maximalen Wachstumsraten, noch nicht vollständig ausgespült. Über einen solchen von der Chemostat-Theorie abweichenden Befund ist auch in anderen Arbeiten berichtet worden (z.B. Fingerhut 1985, Bergter 1983). Bereits in der klassischen Arbeit von Herbert et al. (1956) wurden als möglichen Ursachen Variationen in den Wachstumsraten individueller Bakterien einer Population und Selektion von Bakterien mit kürzeren Generationszeiten, keine ideale Durchmischung ($D \neq \mu$) und Wandbewuchs diskutiert.

Die maximalen steady-state-Biomassekonzentrationen und die maximalen Produktivitäten wurden erwartungsgemäß bei allen drei kultivierten Organismen bei Verdünnungsraten $< \mu_{max}$ (Batch) erreicht. Während die genannten Abweichungen der gemessenen Biomassekonzentrationen von den theoretisch erwarteten Konzentrationen bei Verdünnungsraten nahe μ_{max} für *P. fluorescens* und *Acinetobacter sp.* aufgrund einer oder mehrerer der vorerwähnten möglichen Ursachen erklärt werden können, ist das für das Belebtschlammisolat WD1 nicht der Fall:

Die Biomassekonzentration nahm schon bei Verdünnungsraten $\ll \mu_{max}$ wieder ab (Abb. 23) und Acetat wurde im Kulturfiltrat nachgewiesen. Wie schon in 3.1.4. ausgeführt, konnte das Wachstum von WD1 im Chemostaten nicht nach der Monod-Gleichung unter der Annahme eines konstanten K_S-Wertes beschrieben werden. Die apparente Zunahme des K_S-Wertes bei hohen Substratkonzentrationen konnte die Ursache darin haben, daß sich bei höheren Verdünnungsraten ein anderer Faktor als die zugeführte Kohlenstoffquelle (Acetat) wachstumslimitierend auswirkte. Beispielsweise können Organismen wachstumsregulierende Substanzen produzieren, welche nur in Batch-Kultur oder bei langen Verweilzeiten im Chemostaten in den benötigten Konzentrationen vorliegen (Depauw-Gillet und Remacle 1978).

Alle nachfolgenden Experimente wurden aber bei niedrigen Verdünnungsraten $\leq 0.05\ h^{-1}$ durchgeführt. Da WD1 bei $D = 0.05\ h^{-1}$ seine maximale Biomassekonzentration erreichte ($\approx$ 80 % mehr als die beiden anderen Organismen bei dieser Verdünnungsrate), schließe ich daraus, daß das Wachstum von WD1 bei Verdünnungsraten $\leq 0.05\ h^{-1}$ tatsächlich kohlenstoff- bzw. energielimitiert war und die zuvor diskutierte Limitierung durch einen anderen Faktor bei dieser Verweilzeit vernachlässigt werden konnte.

Als Maß der Affinität der kultivierten Organismen für Acetat wurden im Respirometer die Konzentrationen ermittelt, bei denen das Substrat mit halbmaximaler Rate oxidiert wurde (K_m). Wenn die Substrataufnahmerate geschwindigkeitsbestimmend ist, sollten die aus der Substrataufnahme und Respiration bestimmten K_m-Werte übereinstimmen (Van den Eynde 1983).

Die direkte, d.h. analytische, Bestimmung des K_s-Wertes als Wachstumsparameter (Substratkonzentration bei der ein Organismus mit halbmaximaler Rate wächst) war für die untersuchten Organismen aufgrund der sehr hohen Substrataffinitäten nicht möglich (Kap. 3.1.4.) bzw. für WD1 aus den zuvor genannten Gründen nicht sinnvoll. Für die Modellierung des Wachstums von *P. fluorescens* und WD1 in Cokultur wurden deshalb die Mittelwerte der im Respirometer ermittelten Halbsättigungssubstratkonzentrationen mit K_s gleichgesetzt. Das wiederum ist nur zulässig, wenn im Kurzzeitversuch (Respirationsmessung) wie in kontinuierlicher Kultur (Chemostat) Substrataufnahme und Wachstum bei gleichem Ertragskoeffizienten direkt gekoppelt sind.
Inwieweit diese Vereinfachungen ($K_s = K_{mresp}$) noch eine zutreffende Berechnung der Populationsentwicklung zuließen, konnte durch die Versuche mit *P. fluorescens* und WD1 in Cokultur festgestellt werden (Kap. 4.2.2.).

Organismus	μ_{max} [1]	R_{max} [2]	K_m [3]	m [4]
Acinetobacter sp.	0.54	485	20	0.09
P. fluorescens	0.38	385	23	0.06
WD1	0.20	93	8	0.03

[1] maximale Wachstumsrate im Batch (h^{-1})
[2] spezifische maximale Respirationsrate, (nMol O2/mg C * min^{-1})
[3] respirometrisch ermittelte Halbsättigungssubstratkonzentration (µMol/l)
[4] maintenance coefficient (mg Acetat-C/mg Biomasse-C *h^{-1})

Tab. 12 : Wachstums- und Aktivitätsparameter der untersuchten Bakterienstämme

In Tabelle 12 sind die in Batch-Versuchen ermittelten maximalen Wachstumsraten der untersuchten Organismen zusammen mit den im Respirometer ermittelten maximalen Respirationsraten und Halbsättigungssubstratkonzentrationen aufgetragen. Die aufgeführten "maintenance coefficients" wurden aus der Änderung des effektiven Ertragskoeffizienten mit der Verdünnungsrate im Chemostaten nach Pirt (1965) ermittelt, wobei für WD1 die Ertragskoeffizienten bei Verdünnungsraten > 0.05 h^{-1} nicht berücksichtigt wurden.
Die spezifischen maximalen Respirationsraten stehen annähernd im gleichen Verhältnis wie die maximalen Wachstumsraten zueinander. Eine direkte Vergleichbarkeit wäre jedoch nur gegeben, wenn sie als Sauerstoffverbrauchsraten in mit maximaler Wachstumsrate wachsenden Kulturen unter Berücksichtigung des Ausnutzungsgrades des Substrates ermittelt worden wären. Aus methodischen Gründen wurden sie aber unter "Batch-Bedingungen" in Kulturproben aus Chemostatversuchen gemessen.

Vergleicht man nun die maximalen Wachstumsraten und die "maintenance coefficients" der Organismen, fällt auf, daß das Bakterium mit der niedrigsten maximalen Wachstumsrate (0.2 h^{-1}) auch den kleinsten "maintenance coefficient" (0.03 mg C/mg C * h^{-1}) aufwies. *Acinetobacter sp.* mit einer fast dreimal höheren maximalen Wachstumsrate als WD1 benötigte auch die dreifache Substratmenge für den Erhaltungsstoffwechsel.

Richard et al. (1985) fanden für zwei Isolate (N2 und N7) des Bakteriumtypes 021N in glukoselimitierter Chemostatkultur ebenfalls für das Isolat mit der höheren Wachstumsrate (N2, μ_{max} = 3.8 d^{-1}) den höheren "maintenance coefficient" von m = 0.78 g Glukose/g TRS * d^{-1} (gegenüber N7, μ_{max} = 1,4 d^{-1} mit m = 0.32 g Glukose/g TRS * d^{-1}).
Desgleichen ermittelten Matin und Veldkamp (1978) in Chemostatexperimenten mit *Pseudomonas sp.* und *Spirillum sp.* für das Bakterium mit der höheren maximalen Wachstumsrate (*Pseudomonas sp.*, μ_{max} = 0.64 h^{-1}) ein vierfach höheren "maintenance coefficient" (66 mg L-Lactat/g TRS * h^{-1}) verglichen mit dem langsamer wachsenden *Spirillum sp.* (μ_{max} = 0.35 h^{-1} und m = 16 mg L-Lactat/g TRS * h^{-1}).
Die Bedeutung des "maintenance coefficient" eines Bakteriums für seine möglichen Populationsanteile in einer Mischkultur bei sehr niedrigen Wachstumsraten wird im nachfolgenden Kapitel weiter diskutiert (Kap. 4.2.).

Die <u>diskontinuierliche</u> <u>Substratzugabe</u> (die im Chemostaten bei D = 0.05 h^{-1} kontinuierlich während einer Stunde zugeführte Substratmenge wurde stündlich innerhalb einer Minute zugegeben) wirkte sich auf die drei Testorganismen unterschiedlich aus:

1. <u>*Acinetobacter sp.*</u> begann nach der Umstellung auf diskontinuierliche Substratzugabe Flocken zu bilden und neigte zu Anheftung an Reaktorwandungen und Einbauten. Zusätzlich trat starke Schaumbildung auf und die Konzentration der frei suspendierten Biomasse nahm stetig ab (Abb. 16). Eine zuverlässige Bestimmung des Ertragskoeffizienten unter diesen Bedingungen war nicht möglich. Der respirometrisch ermittelte niedrigere K_m-Wert für *Acinetobacter sp.* bei gepulster Substratzugabe (K_m = 12 µMol Acetat/l gegenüber 20 µMol Acetat/l bei kontinuierlicher Substratzugabe) muß kritisch bewertet werden, da sich unter diesen Bedingungen kein Fließgleichgewicht im Reaktor einstellte und außerdem die ermittelten Respirationsraten nach Zugabe der höchsten Konzentration Substrathemmungen erkennen ließen (Abb. 17).
Die Neigung zu Aggregatbildung, Anheftung an Wandung und Einbauten und die Schaumentwicklung lassen den Schluß zu, daß ein Teil der Bakterien unter diesen Bedingungen lysierte und/oder daß exkretierte Metabolite diesen Effekt verursachten.
Neijssel und Tempest (1975) berichten über die Synthese großer Mengen extrazellulärer Polysaccharide, wenn *Klebsiella aerogenes* ammonium-

limitiert auf Glukose kultiviert wurde. Auch andere, als "overflow"-Metabolite bezeichnete Verbindungen, wurden nur im Kulturmedium bestimmt, wenn die Kohlenstoff- und Energiequelle im Überschuß angeboten worden war. Die Metabolite waren immer höher oxidiert als die Kohlenstoffquelle aus der sie gebildet worden waren.
Van den Eynde et al. (1983) konnten in Reinkulturen von *Arthrobacter globiformis* und *Sphaerotilus natans* "overflow"-Metabolite nachweisen auch wenn diese kohlenstofflimitiert, aber mit diskontinuierlicher Substratzugabe kultiviert wurden.

Die von mir an *Acinetobacter sp.* bei pulsweiser Substratzugabe beobachteten Phänomene resultierten aber wahrscheinlich aus der sich dem Substratschub anschließenden Mangelphase, denn die Unterbrechung der Substratzufuhr in kontinuierlicher Kultur führte ebenfalls schon nach etwa 30 Minuten zu starker Schaumentwicklung. Weitere Versuche zur Unterscheidung zwischen einer Freisetzung von Metaboliten aufgrund von Zell-Lysis oder der Ausscheidung von Metaboliten aus intakten Zellen wurden nicht durchgeführt.
Acinetobacter sp. war wegen der beschriebenen Reaktionen auf die diskontinuierliche Substratzugabe als Modellorganismus für die Untersuchungen in definierter Mischkultur ungeeignet.

2. *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50108) erreichte auch in Kultur mit diskontinuierlicher Substratzugabe die gleiche Biomassekonzentration wie in kontinuierlicher Kultur. Aggregatbildung oder vermehrtes Wandwachstum, wie für *Acinetobacter sp.* unter diesen Bedingungen beschrieben, konnten nicht beobachtet werden. Weil die Betriebsweise keinen meßbaren Einfluß auf die Biomassekonzentration und den DOC-Gehalt im Filtrat hatte, kann ein erhöhter Energiebedarf für den Grundstoffwechsel, wie er von Bulthuis et al. (1989) für eine gepulste Substratzugabe gegenüber kontinuierlicher Substratzugabe postuliert wurde, nicht festgestellt werden.
Van den Eynde et al. (1983) bestimmten in den zuvor zitierten Versuchen einen geringfügig niedrigeren Ertrag für die diskontinuierlich mit Substrat versorgten Kulturen. Sie erklärten das mit dem erhöhten Energiebedarf zur ständigen Erhaltung bestimmter Enzymaktivitäten, welche die Fähigkeit, angebotenes Substrat sofort mit erhöhter Rate aufnehmen zu können, gewährleisten sollten.
Die erhöhte Substrataufnahmerate oder Sauerstoffverbrauchsrate von

Belebtschlamm aus diskontinuierlich mit Abwasser versorgten Belebungsbecken (oder aus "plug flow"-Systemen) gegenüber Belebtschlamm aus kontinuierlich versorgten, komplett durchmischten Systemen wurde überwiegend mit der Selektion von Organismen mit großer Substrataufnahme-/Speicherkapazität unter diesen Bedingungen erklärt (Chudoba et al. 1973(b), Houtmeyers 1978, Chudoba et al. 1985, Tappe 1987).
Van den Eynde et al. (1983) zeigten, daß auch in Reinkulturen infolge einer Adaptation eine höhere Substrataufnahmerate gemessen werden konnte, wenn sie mit diskontinuierlicher Substratzugabe kultiviert wurden.

Die von mir durchgeführten Respirationsmessungen an *P. fluorescens* ergaben unabhängig von den Bedingungen der Vorkultivierung (kont. oder disk. Substratzugabe) gleiche maximale Respirationsraten. Das mag aber nur bedeuten, daß die energieliefernden Reaktionen (Respiration) mit gleicher maximaler Rate abliefen. Erst eine Parallelbestimmung von Sauerstoffverbrauchsraten und Substrataufnahmeraten würden Rückschlüsse auf den Kopplungsgrad von Substrataufnahme und Wachstum und damit über die Akkumulationskapazität (Bildung von Reservestoffen wie PHB oder Polysaccharide) zulassen.
Deutlich unterschiedlich waren im Gegensatz dazu die ebenfalls respirometrisch ermittelten K_m-Werte. Der mittlere K_m-Wert für *P. fluorescens* aus kontinuierlicher Kultur betrug 28.5 µMol Acetat/l gegenüber 17.5 µMol Acetat/l bei diskontinuierlicher Substratzugabe. Eine Abnahme der Affinitätskonstanten (K_m) für Aufnahmesysteme oder Enzymsysteme, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim Metabolisieren des limitierenden Nährstoffes bestimmen, ist eine allgemein angenommene "Strategie", die Bakterien das Wachstum bei geringen Nährstoffkonzentrationen ermöglichen soll (Akagi und Taga 1980, Morgan und Dow 1986 und Gottschal 1990).
Die diskontinuierliche Substratzugabe verursacht einen ständigen Wechsel zwischen einem kurzzeitig relativ hohen Substratangebot und einer längeren Substratmangelphase. Bakterien mit einer hohen Substrataufnahmerate und Akkumulationskapazität werden auch während der Substratmangelphase mittels der zuvor gebildeten Speicherstoffe wachsen können. Bakterien, welche nicht in der Lage sind, intrazelluläre Speicherstoffe zu synthetisieren, werden nach Substratzugabe mit der gleichen Rate wachsen können, mit der sie das Substrat aufnehmen. Der überwiegende Teil des Dosierungstaktes wird aber dadurch zur "Hungerphase".

Da *P. fluorescens* nicht in der Lage ist, Polyhydroxybuttersäure zu speichern (Bergey's Manual 1983), und bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe die gleichen spezifischen maximalen Respirationsraten gemessen wurden, scheint das Wachstum von *P. fluorescens* eng an die unmittelbare Substrataufnahme gekoppelt zu sein.
Die diskontinuierliche Substratzugabe würde dann für einen kurzen Zeitraum eine höhere Wachstumsrate zulassen, gefolgt von einer längeren Mangelphase, während der die verfügbare Substratkonzentration und Wachstumsrate niedriger wären als die mittlere Substratkonzentration und Wachstumsrate bei kontinuierlicher Substratzugabe.
Der niedrige K_m-Wert für Acetat könnte als eine Anpassung an den zeitlich überwiegenden Substratmangel interpretiert werden.

3. Die Umstellung von kontinuierlicher auf diskontinuierliche Substratzugabe hatte auf das Wachstum und die Aktivität des Belebtschlammisolates WD1 keinen meßbaren Einfluß. Sowohl für die Biomasse als auch den DOC im Kulturfiltrat waren nach der Änderung der Betriebsbedingungen gleichbleibende Konzentrationen meßbar. Ebenso wurden im Respirometer unabhängig vom Substratzugabemodus in der beprobten Kultur gleiche maximale Respirationsraten und K_m-Werte ermittelt.
Wenn das Wachstum von WD1, wie eingangs dieses Kapitels hergeleitet, nur bei Verdünnungsraten $< 0.05\ h^{-1}$ tatsächlich kohlenstoff- bzw. energielimitiert war und μ_{max} ohnehin nur $0.2\ h^{-1}$ betrug, konnte der aus diskontinuierlicher Substratzugabe resultierende zeitliche Konzentrationsgradient auch nicht in dem Maße eine Entkoppelung von Wachstumsrate und mittlerer Verdünnungsrate bewirken, wie das für die beiden anderen Bakterienstämme angenommen werden kann. Die diskontinuierliche Substratzugabe müßte bei gleicher mittlerer Durchlußrate (hier: $0.05\ h^{-1}$) für Organismen mit einer höheren maximalen Wachstumsrate eine längere Substratmangelphase gegen Ende eines Dosierungstaktes hervorrufen als für Organismen mit niedriger maximaler Wachstumsrate.
Wie in den Untersuchungen auch festgestellt wurde, waren die stoffwechselphysiologischen Auswirkungen dieser Betriebsweise entsprechend für das Bakterium mit hoher maximaler Wachstumsrate (*Acinetobacter sp.*, $\mu_{max} = 0.54\ h^{-1}$) größer als für das Bakterium mit der niedrigsten maximalen Wachstumsrate (WD1, $\mu_{max} = 0.2\ h^{-1}$).

4.2. Untersuchungen im Reaktor mit Biomasserückhaltung

Beim Belebtschlammverfahren erlauben die im Vergleich zur hydraulischen Verweilzeit (mehrere Stunden) sehr langen Verweilzeiten für den Belebtschlamm (mehrere Tage) den Mikroorganismen nur entsprechend niedrige Wachstumsraten. Die überwiegende Anzahl der für Bakterien veröffentlichten Wachstumskonstanten wurden jedoch in Experimenten ermittelt, in denen die Bakterien bei hohen Wachstumsraten (10 % μ_{max} bis μ_{max}) kultiviert worden waren (Pirt 1987). Dies entspricht also nicht den in Belebtschlammanlagen herrschenden Bedingungen und wohl vielfach auch nicht den Wachstumsbedingungen in Gewässern und Böden.
Der Mangel an Versuchsdaten aus Kulturversuchen bei niedrigen Wachstumsraten ist meiner Meinung nach im wesentlichen durch zwei Sachverhalte zu erklären:

1. Neben dem zeitlichen Mehraufwand für Versuche bei $\mu = < 10\ \%\ \mu_{max}$ ergeben sich aus der längeren Versuchsdauer höhere Ansprüche an die Betriebssicherheit und die Zuverlässigkeit der Kultursysteme.

2. Die Untersuchung des Wachstums von Bakterien bei sehr kleinen Wachstumsraten = Verdünnungsraten stößt auch an technische Grenzen (siehe unten).

Hansford und Humphrey (1966) zeigten, daß die gleichmäßige Verteilung eines die Wachstumsrate limitierenden Substrates bei Verdünnungsraten $< 0.05\ h^{-1}$ nicht mehr gewährleistet ist, da ein Volumen, welches nur dem 1/72000 des Fermentervolumens entspricht, innerhalb einer Sekunde zugeführt und augenblicklich homogen verteilt werden muß. Die Folge ist ein zunehmender Unterschied zwischen der Verdoppelungszeit einzelner Bakterien und der mittleren Verdoppelungszeit der Gesamtpopulation.
Gerade aber die in einem Chemostaten erreichbare Homogenität der Population (alle Zellen haben im Idealfall die gleiche, durch die eingestellte Verdünnungsrate vorgegebene Verdoppelungszeit) macht ihn zu einem unverzichtbaren Experimentalsystem in der Mikrobiologie (Herbert et al. 1956, Veldkamp 1977).
Van Versefeld (1984) schreibt zur gleichen Problematik, die spezifische Wachstumsrate μ sei zwar gut geeignet, mathematische Berechnungen

an exponentiell wachsenden Kulturen durchzuführen, und 98 % der möglichen μ-Werte könnten zuverlässig im Chemostaten bei Verdünnungsraten zwischen 2.07 - 0.05 h^{-1} untersucht werden, doch sei diese Betrachtungsweise irreführend, wenn langsam wachsende Kulturen Gegenstand der Untersuchung seien. Betrachtet man den im Chemostaten möglichen Untersuchungsbereich unter dem Aspekt der Verdoppelungszeit der Mikroorganismen, so repräsentiert dieser Bereich (D = 0.05 - 2.07 h^{-1}) lediglich etwa 7 % des Untersuchungsbereiches, welcher in einem Fermenter mit Biomasserückhaltung einstellbar ist, wenn man von einer maximal angenommenen Verdoppelungszeit von 200 h ausgeht (Van Verseveld 1984).
Zum Vergleich möchte ich hier erwähnen, daß in Kläranlagen die mittleren Verdoppelungszeiten des Belebtschlammes zur sicheren Gewährleistung der Nitrifikation etwa 150 h nicht unterschreiten sollten (umgerechnet aus Schlammbelastung z.B. nach Mudrack und Kunst 1988).
Je nach der Schlammbelastung betragen die mittleren Generationszeiten in technischen Belebtschlammanlagen ca. 150 - 500 h!
Auch wenn aufgrund von Inhomogenitäten in einem so komplexen System wie dem Belebungsbecken (unvollständige Durchmischung, wechselnde Konzentrationen und Abwasserzusammensetzung) keine einheitliche Verdoppelungszeit für alle Mikroorganismen angenommen werden darf, ist doch die Verdoppelungszeit der Gesamtpopulation durch das Schlammalter festgelegt. Bleibt die Organismenzusammensetzung einer Belebtschlammbiozönose über einen langen Zeitraum stabil, so muß die effektive Generationszeit einer jeden Organismenspezies dem Schlammalter entsprechen. Zeitweise kürzeren Generationszeiten, z. B. bedingt durch eine zeitlich oder räumlich höhere Konzentration eines Nährstoffes müßten durch Zeiträume kompensiert werden, während denen die Generationszeiten länger sind als das mittlere Schlammalter. Jede andauernde Abweichung der effektiven Generationszeit vom mittleren Schlammalter muß zur Dominanz oder dem Verschwinden der betreffenden Organismenspezies aus der Biocönose führen.
Diese Überlegungen, und die im vorstehenden Absatz gezogene Schlußfolgerung, so selbstverständlich sie auch erscheinen mögen, halte ich für sehr wichtig, wenn man sich eine Vorstellung von der Rolle einzelner Bakterienspezies in einer Kläranlage machen will oder Experimente dazu durchführt. Die wichtigste Frage wird dann weniger sein, wie schnell ein Organismus auf einem bestimmten Substrat maximal wachsen kann, als vielmehr: Wie verhält sich der Organismus bei extremer Substratlimitierung?

4.2.1. Auswirkungen des Rückhaltegrades auf das Wachstum einer Reinkultur

Aus den Chemostatversuchen ließen sich durch die doppelt reziproke Auftragung der effektiven Ertragskoeffizienten gegen die Verdünnungsrate jeweils der theoretisch maximale Ertragskoeffizient (Y_M) und der "maintenance coefficient" (m) bestimmen (Auftragung nach Pirt 1965). Durch die Konstruktion eines Kultursystemes mit Biomasserückhaltung war zusätzlich die Voraussetzung geschaffen worden, die Wachstumsparameter der kultivierten Bakterien auch bei so niedrigen Wachstumsraten zu bestimmen, wie das im Chemostat aus den zuvor genannten Gründen (Kap. 4.2.) nicht realisierbar gewesen wäre.
In einem Versuch, welcher vorrangig der Erprobung des Filtrationsmoduls dienen sollte, wurde von chemostatischer Betriebsweise auf die vollständige Rückhaltung der Biomasse umgestellt und die Konzentrationszunahme der Biomasse über die Zeit gemessen (Kap. 3.1.2.5.).
In weiteren Experimenten, in denen ein definierter Teilstrom des Gesamtablaufs als bakterienfreies Filtrat abgezogen wurde (teilweise Biomasserückhaltung), konnten die effektiven Ertragskoeffizienten bei Generationszeiten von 2.5, 4 und 7 Tagen für WD1 ermittelt werden.

Einen konstanten Anteil des Grundstoffwechsels am Substratverbrauch (unabhängig von der Wachstumsrate) vorausgesetzt (Pirt 1965), sollten die für die bei längeren Generationszeiten (2.5, 4 und 7 Tage) ermittelten effektiven Ertragskoeffizienten mit den aus den Chemostatexperimenten durch Extrapolation für diese Generationszeiten berechneten effektiven Ertragskoeffizienten übereinstimmen (Abb. 48).
Ebenso läßt sich die Zunahme der Biomassekonzentration im Experiment mit vollständiger Biomasserückhaltung aus den im Chemostatexperiment gewonnenen Daten berechnen (siehe unten).

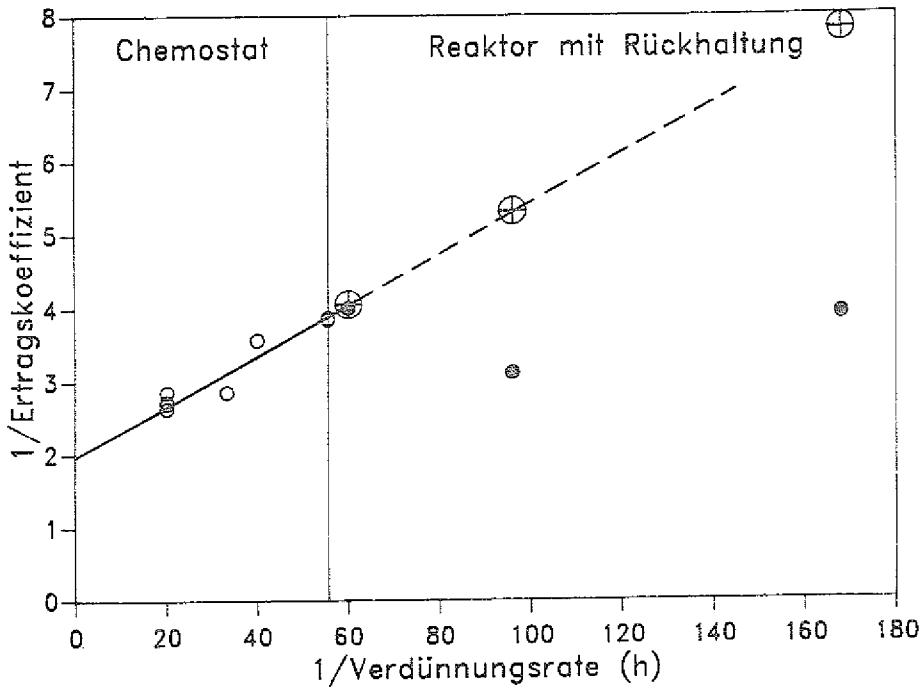


Abb. 48: Reziproke Auftragung der gemessenen Ertragskoeffizienten Y im Chemostaten (o) und im Reaktor mit Rückhaltung (●) gegen 1/D bzw. 1/D_b
Regressionsgrade zu Meßwerten aus Chemostatversuchen
⊕ extrapolierte Werte

Wie Abb. 48 zeigt, weichen die für die niedrigen Wachstumsraten bestimmten Ertragskoeffizienten Y erheblich von den berechneten Werten ab.

Die unerwartet hohen Werte für Y bei derartig niedrigen Wachstumsraten wären durch eine Abnahme des "maintenance coefficient" (m) mit abnehmender Wachstumsrate zu erklären. Wegen der wenigen, nicht durch Mehrfachbestimmungen abgesicherten Meßwerte[1], können diese alleine nur als ein Hinweis auf die Möglichkeit eines solchen Effektes gewertet werden.

Zur Unterstützung dieser Vorstellung können aber die Meßergebnisse aus dem Versuch mit vollständiger Biomasserückhaltung herangezogen werden: Mit Hilfe des im Chemostatversuch ermittelten "maintenance coefficient" ($m = 0.034$ mg C/mg C * h^{-1}) und der bekannten Menge

1) Jede weitere Probennahme hätte das für die Untersuchung der Populationsdynamik erforderliche Fließgleichgewicht erneut gestört

stündlich zugeführten Substratkohlenstoffes läßt sich eine maximal mögliche Biomassekonzentration von 590 mg POC/l berechnen, bei der alles zugeführte Substrat den Grundstoffwechsel der Bakterien deckte und kein Zuwachs mehr erfolgen könnte. Aus den tatsächlich erreichten 1510 mg POC/l errechnet sich umgekehrt ein $m = 0.012$ mg C/mg C * h^{-1} für die nicht wachsende Biomasse im Reaktor.

Dieses bestätigt die zuvor aufgeführten Befunde, die auf einen mit der Wachstumsrate abnehmenden "maintenance coefficient" schließen ließen. Mit $m = 0.012$ mg C/mg C * h^{-1} scheint demnach ein nicht unterschreitbarer Minimalwert für den untersuchten Organismus erreicht worden zu sein.
Diese Zusammenhänge sollen im folgenden anhand der Meßwerte aus dem Versuch mit vollständiger Rückhaltung der Biomasse näher erläutert und diskutiert werden:

Wegen der vollständigen Entkoppelung der hydraulischen Verweilzeit von der Verweilzeit der Biomasse ist die Verdünnungsrate zur Berechnung der Biomasseentwicklung im Reaktor mit vollständiger Biomasserückhaltung keine brauchbare Größe. Sie ist deshalb durch die aus der Verdünnungsrate des Kulturmediums resultierende Substratzugabe (im folgenden SZR bezeichnet) zu ersetzen.
Der Zeitfaktor gewinnt im Gegensatz zum Chemostatexperiment (Fließgleichgewicht: $dx/dt = 0$) wieder an Bedeutung, so daß der Anteil des für den Grundstoffwechsel (maintenance) verbrauchten Substrates proportional zu der Biomassekonzentration ansteigt.

$$dx/dt = (SZR - mx_{(t)}) * Y_M \qquad (1)$$

mit

SZR = Substratzugaberate (mg C/l * h^{-1})
m = maintenance coefficient (mg C/mg C * h^{-1})
$x_{(t)}$ = Biomassekonzentration zur Zeit t (mg C/l)
Y_M = theoretisch maximaler Ertragskoeffizient (mg C/mg C)

integriert:

$$X_{(t)} = SZR/m + [X_{(0)} - SZR/m] * e^{-mt \cdot Y_M} \qquad (2)$$

Nach Gleichung (2) wurden die in Abb. 49 aufgetragenen Kurven des theoretischen Verlaufs der Biomassekonzentration während des Versuchszeitraumes mit m = 0.03 mg C/mg C * h^{-1} (aus Chemostatversuch ermittelt) und mit m = 0.012 mg C/mg C * h^{-1} (Quotient aus SZR und Biomassekonzentration nach 29 Tagen in diesem Versuch) berechnet.

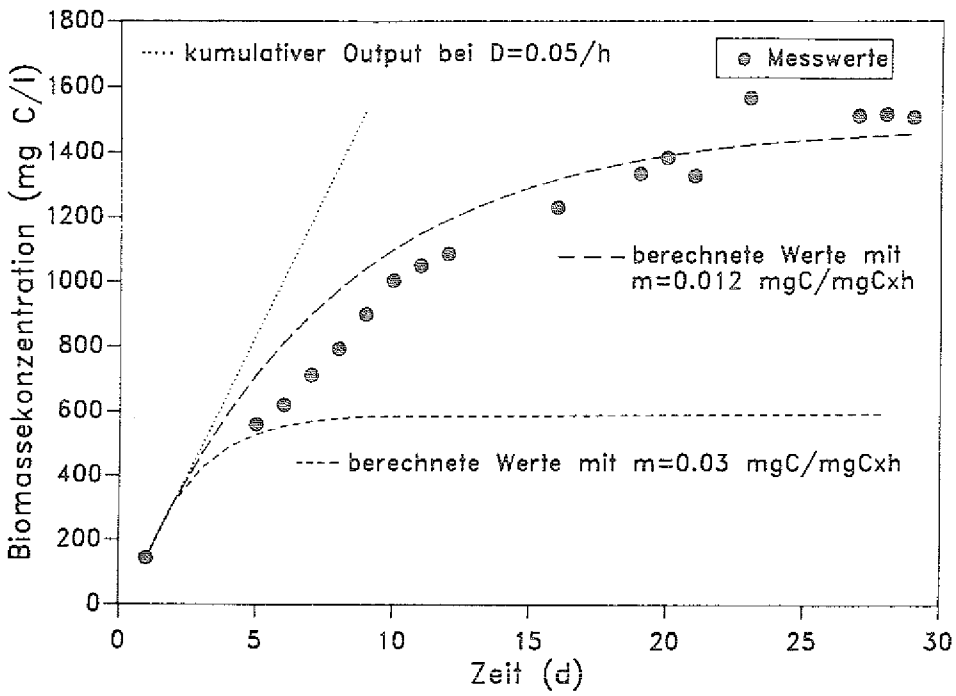


Abb. 49: Meßwerte des POC aus Abb. 26 und die berechneten Zunahmen mit m = 0.034 und m = 0.012

Bei konstanter Substratzugabe nahm die Wachstumsrate ab, bis schließlich die gesamte pro Zeiteinheit zugeführte Substratmenge für den Grundstoffwechsel der akkumulierten Biomasse verbraucht wurde und kein Zuwachs mehr erfolgen könnte. Es gilt für $t = \infty$:

$$dx/dt = 0$$

eingesetzt in Gleichung (1)

$$0 = (SZR - mx_{(t)}) * Y_M$$

ergibt für m

$$m = SZR / x_{(t)} \qquad (3)$$

Die für m = 0.03 mg C/mg C * h^{-1} aufgetragene Kurve in Abb. 49 gibt den zeitlichen Verlauf der Biomassekonzentration wieder, wie er bei konstantem m meßbar gewesen wäre. Tatsächlich nahm die Biomassekonzentration weiter zu, bis sie nach etwa 25 Tagen annähernd konstant blieb. Da sich aus dieser Biomassekonzentration und der Substratzugaberate nach Gleichung (3) der niedrige Wert für m = 0.012 mg C/mg C * h^{-1} errechnet, muß m im Untersuchungszeitraum bis auf diesen minimalen Wert abgenommen haben. Der Zeitraum, bzw. die daraus abzuleitenden Wachstumsraten, in dem die Änderung erfolgte, wird demnach durch den Bereich der annähernd linearen Zunahme der Biomassekonzentration (bis etwa 1000 mg POC/l) wiedergegeben. In diesem Bereich ist auch die Abweichung der Meßwerte von der berechneten Biomassezunahme am größten (die Abweichung der gemessenen von der berechneten Biomassekonzentration zwischen 20d und 25d ist auf das Auswechseln des Filtrationsmoduls und dem damit verbundenen Verlust an Biomasse zurückzuführen).

Die Verwendung des Bioreaktors mit vollständiger Biomasserückhaltung ermöglichte also die direkte Bestimmung des spezifischen Substratbedarfs der nicht wachsenden Biomasse. Im Gegensatz dazu kann im Chemostatexperiment m nur indirekt aus der Änderung des effektiven Ertragskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wachstumsrate ermittelt werden (Stouthamer und Bettenhausen 1973).
Viele Untersuchungen (z.B. Pirt 1975, Hempfling und Mainzer 1975, Stouthamer 1977) schienen zu bestätigen, daß der "maintenance coefficient" eine von der Wachstumsrate unabhängige Konstante ist. Anderen Versuchsergebnissen zufolge ist die Annahme eines konstanten, von der Wachstumsrate unabhängigen Energiebedarfs für den Grundstoffwechsel nicht gerechtfertigt. Neijssel und Tempest (1976) fanden für Kulturen von *Klebsiella aerogenes*, welche stickstoff-, schwefel- oder phosphatlimitiert, aber mit einer ausreichenden Kohlenstoff- und Energiequelle versorgt waren, einen erhöhten Grundstoffwechsel mit abnehmender Wachstumsrate im Chemostaten. Sie erklärten das mit der Entkoppelung von Respiration und Wachstum. Für kohlenstofflimitierte Kulturen postulierten sie im Gegensatz dazu einen mit der Wachstumsrate zunehmenden Anteil des Energiebedarfs für den Grundstoffwechsel, welches mit dem erhöhten intrazellulären Gehalt an osmotisch aktiven Ionen und labilen Makromolekülen wie RNA zu erklären sei. Letzterer Effekt würde in ausreichend mit Kohlenstoff und Energie versorgten

Kulturen (S,N oder P-limitiert) durch die Entkoppelung von Respiration und Wachstum "maskiert". Auch Pirt (1987) räumt später ein, die ursprünglich formulierte Beziehung

$$1/Y = 1/Y_M + m/\mu \qquad \text{(Pirt 1965)}$$

habe nur bis zu einer kritischen niedrigen Verdünnungsrate (= Wachstumsrate) Gültigkeit. Mit weiterer Abnahme der Wachstumsrate würde ein zunehmender Anteil der Population zu ruhenden Zellen ("dormant fraction") differenzieren. Bakterien im "dormant state" sind nach Pirt unfähig zu wachsen und sich zu teilen, ihr endogener Metabolismus sei eingestellt.
Da der Anteil dieser ruhenden Zellen zwar in die Berechnung des Ertragskoeffizienten eingeht, diese aber kein Substrat mehr metabolisieren, schlägt Pirt für den Anteil der "viable fraction" nach wie vor einen konstanten, von der Wachstumsrate unabhängigen "maintenance coefficient" vor. Damit seien die unerwartet hohen Ertragskoeffizienten bei sehr niedrigen Wachstumsraten zu erklären.

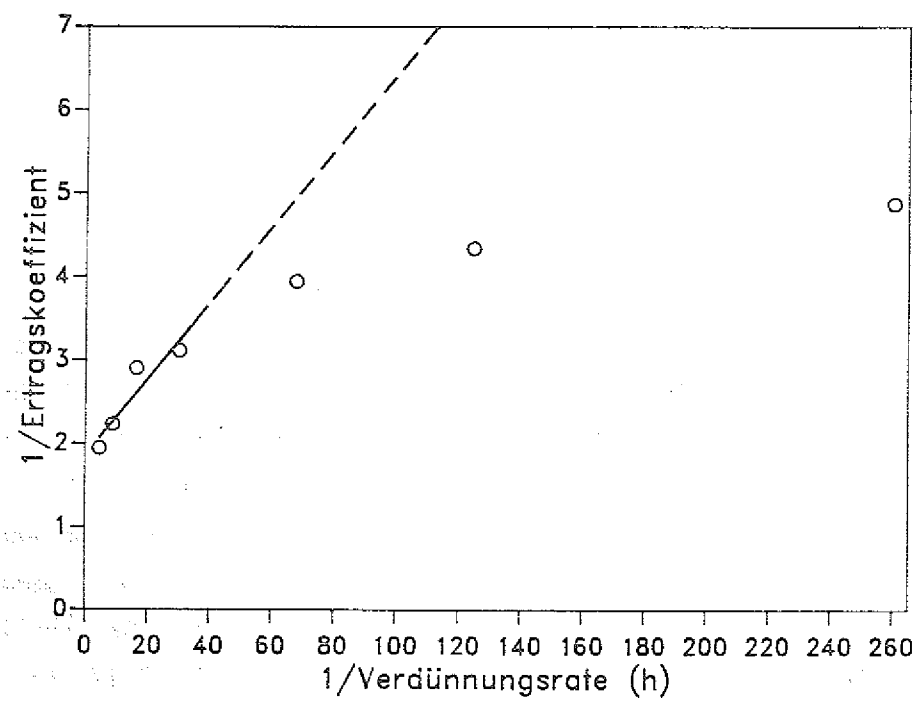


Abb. 50: Auftragung der reziproken Ertragkoeffizienten gegen 1/D für eine glycerollimitierte Substratkultur von *K. aerogenes*
Aus Pirt (1987) nach Daten von Tempest et al. (1967).
Geänderte Darstellungsweise zur besseren Vergleichbarkeit mit Abb. 48.

Die in Abb. 50 dargestellten Meßwerte sind mit Pirts Vorstellungen schlüssig zu erklären und die Richtigkeit dieser Überlegungen wird durch weitere Versuchsdaten von Tempest et al. (1967) unterstützt: Mit abnehmender Verdünnungsrate (Wachstumsrate) im Chemostaten konnten sie eine Abnhame der "viable fraction" an der Gesamtpopulation von *K. aerogenes* nachweisen.

Obwohl die von mir ermittelten hohen Ertragskoeffizienten für WD1 bei niedrigen Wachstumsraten diese Vorstellung ebenfalls zu bestätigen scheinen, läßt sich dieses Ergebnis auch anders interpretieren:
Die Population setzt sich nicht nur aus "viable cells" mit konstantem "maintenance coefficient" und "dormant cells" ohne Grundstoffwechsel zusammen, sondern m kann der Wachstumsrate über einen gewissen Bereich angepaßt werden, d.h. er nimmt mit abnehmender Wachstumsrate bis auf einen minimalen Wert ab.
Die Ergebnisse aus den Kulturversuchen mit dem Belebtschlammisolat WD1 im Reaktor mit vollständiger und teilweiser Biomasserückhaltung erhärten in zweifacher Hinsicht diese Möglichkeit einer Reduzierung des Grundstoffwechsels bei niedrigen Wachstumsraten, bei gleichzeitigem Erhalt der Lebensfähigkeit("viability"):

1. Bei vollständiger Biomasserückhaltung wurde nach 25 Tagen eine annähernd gleichbleibende Biomassekonzentration gemessen (Abb. 26). Nach der Vorstellung von Pirt hätte die "dormant fraction" im Versuchszeitraum aber ständig zunehmen müssen und durch die vollständige Rückhaltung auch dieser nicht aktiven Organismen hätte die Biomassekonzentration stetig weiter ansteigen müssen. Der in Abb. 26 dargestellte Verlauf der Biomassekonzentration wurde zuvor von mir schon in der Weise interpretiert, daß letztlich kein weiterer Zuwachs mehr erfolgen konnte, weil das kontinuierlich zugeführte Substrat gerade den Energiebedarf des Grundstoffwechsels der vorhandenen Biomasse decken konnte. Nur wenn der überwiegende Anteil der Bakterien noch aktiv war ("viable fraction") konnte die Biomassekonzentration von diesem Zeitpunkt an gleich bleiben. Der mögliche Verlust einer "dormant fraction" nach Zell-Lysis über das Filter, hätte als Zunahme des DOC im Filtrat meßbar sein müssen. Das war aber nicht der Fall.

2. Mit abnehmender Wachstumsrate konnte keine Abnahme der spezifischen Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE/mg TRS) festgestellt werden. Es

waren sogar bei einer mittleren Generationszeit von 7 Tagen (μ = 0.006 h^{-1}) doppelt soviele KBE/mg TRS bestimmt worden (4,6 * 10^9) wie bei einer mittleren Generationszeit von 20 Stunden (μ = 0.05 h^{-1}). Die höhere spezifische Lebendzellzahl (KBE) ist durch eine Verringerung der Zellmasse bei niedrigen Wachstumsraten erklärbar. Über eine Abnahme der Zellgröße bzw. Zellmasse bei größerer Nährstofflimitierung und daraus resultierenden niedrigen Wachstumsraten wurde schon mehrfach berichtet (Dawes und Ribbons 1964, Fingerhut 1985, Morgan und Dow 1986).

Das "dormant cell model" von Pirt (1987) bietet eine einfache physiologische Erklärung für die beobachtbaren Abweichungen zwischen meßbaren und berechneten Ertragskoeffizienten (nach Pirt 1965) für niedrige Wachstumsraten. Die darin gemachte vereinfachende Annahme, daß der im Prozeß der Differenzierung (von "viable" zu "dormant cells") befindliche Anteil der Population sehr klein und deshalb zu vernachlässigen sei, ist zwar für die mathematische Formulierung sehr nützlich, doch bleibt dadurch ein für die Konkurrenzfähigkeit der untersuchten Organismen wichtiger Aspekt unberücksichtigt:
Während die "dormant fraction" im Sinne Pirts "useless biomass" (Pirt 1987) wäre, könnten "viable cells" mit einem reduzierten Grundstoffwechsel immer noch auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren und z.B. eine kurzzeitige Erhöhung des Substratangebotes effektiver in eine Erhöhung der Populationsanteile umsetzen.
Pirt schließt allerdings auch eine Dedifferenzierung der "dormant cells" zu "viable cells" nicht aus.

Meine Versuchsergebnisse zeigen die Möglichkeit auf, daß offenbar auch die gesamte Population eines Bakterienstammes in einen Zustand differenzieren kann, in dem sie mit reduziertem Grundstoffwechsel die Fähigkeit zu wachsen und sich zu teilen ("viability") beibehalten kann.
Für *Arthrobacter crystallopoietes* konnten Boylen und Ensign (1970) nach 30 Tagen Kultivierung ohne exogenes Substrat, bei einer sehr niedrigen endogenen Respirationsrate, auch noch die volle "viability" nachweisen.

Die eindeutige Anwendung der Begriffe "dormancy", "viability", "tot" oder "lebend" auf den zu beschreibenden physiologischen Zustand eines

Bakteriums ist problematisch. Beispielsweise ist es allgemein akzeptiert, ein Bakterium als "tot" zu definieren, wenn es seine Fähigkeit zur Teilung auf einem geeigneten Medium irreversibel verloren hat (Henis 1987). Andererseits können Bakterien ihre Teilungsfähigkeit verloren haben (definitionsgemäß "tot" sein), aber dennoch Substrat aufnehmen, metabolisieren und die Integrität der Zellmembran erhalten (Henis 1987, Postgate und Hunter 1962). Den "dormant state" wiederum charakterisiert Pirt (1987) als einen Zustand, in dem die Bakterien nicht wachsen, sich nicht teilen und auch kein Substrat aufnehmen.
Der experimentellen Möglichkeit, zwischen diesen Zuständen (oder Zwischenformen) unterscheiden zu können, kommt mehr als nur eine akademische Bedeutung zu, da sie die Konkurrenzfähigkeit der Bakterien unmittelbar betreffen.
Wie gezeigt, bietet die Durchführung von Experimenten mit Bakterienreinkulturen in einem Reaktor mit Biomasserückhaltung eine gute Möglichkeit dazu. Aus dem Verlauf der Biomassekonzentration bei vollständiger Biomasserückhaltung läßt sich schließen, ob ein Teil der Population seine Fähigkeit zur Substrataufnahme verliert ("dormant fraction"; stetiger Anstieg der Biomassekonzentration) oder ob die gesamte Population schließlich das Wachstum einstellt und das kontinuierlich zugeführte Substrat den Grundstoffwechsel aller Organismen aufrecht erhält (Erreichen einer gleichbleibenden Biomassekonzentration).
Eingeschränkt wird die Aussagekraft dieser Versuchsergebnisse aber durch einen möglicherweise stattfindenden internen turnover der Nährstoffe aufgrund von "cryptic growth" (Hamer 1985). Dabei könnten sich, auch ohne daß Nährstoffe von außen zugeführt werden, Wachstumsmöglichkeiten für die Bakterien auf den Lysisprodukten abgestorbener Bakterien ergeben. Dieser in Mischkulturen unter starker Substratlimitierung wahrscheinlich wichtige Vorgang (Hamer 1985) scheint aber in Reinkulturen nicht von großer Bedeutung zu sein (Nioh und Furusaka 1968). Untersuchungen dazu werden späteren Experimenten vorbehalten bleiben.

4.2.2. Auswirkungen des Rückhaltegrades auf die Populationsdynamik in einer definierten Mischkultur mit kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe

Sowohl WD1 als auch *P. fluorescens* wuchsen in kontinuierlicher Reinkultur (Chemostat) ebenso wie bei diskontinuierlicher Substratzugabe und in Mischkultur überwiegend freisuspendiert und waren in dieser durch die koloniebildenden Einheiten (KBE) gut quantifizierbar (Tab. 11, Kap. 3.1.4.). Die so meßbare Populationszusammensetzung und veränderung spiegelte in definierter Mischkultur die Konkurrenz beider Bakterien um die C-Quelle (Acetat) in Abhängigkeit von den Betriebsbedingungen wider.

Anhand der μ_{max} und K_m-Werte beider Bakterien wurden für niedrige Verdünnungsraten im Chemostaten ($D < 0.11\ h^{-1}$) Wachstumsvorteile für WD1 berechnet, und bei höheren Verdünnungsraten ($D > 0.11\ h^{-1}$) war ein Selektionsvorteil für *P. fluorescens* zu erwarten (Kap. 3.1.4.1.).

Diskontinuierliche Substratzugabe hätte die Koexistenz beider Bakterien nicht nur bei dieser für den Chemostat berechneten Verdünnungsrate (D^*), sondern über einen größeren Bereich von Verdünnungsraten $D \leq D^*$ ermöglichen sollen (vergleiche Kap. 3.1.4.1.).

Den Ergebnissen der Chemostatexperimenten mit WD1 war aber zu entnehmen, daß das Wachstum bei Verdünnungsraten $> 0.05\ h^{-1}$ nicht mehr substratlimitiert erfolgte, sondern sich ein anderer Faktor als die Substratzufuhr wachstumslimitierend auswirkte (Kap. 4.1.).

Die nach dem μ_{max} im Batch-Versuch und respirometrisch ermittelten K_m-Werte berechnete Verdünnungsrate, bei der sich die Wachstumskurven beider Bakterien kreuzten (Koexistenz), lag mit $0.11\ h^{-1}$ jedoch bei einer Wachstumsrate, bei der WD1 in kontinuierlicher Kultur nicht mehr substratlimitiert war. Wegen dieser Diskrepanz zwischen gängigem theoretischen Ansatz und experimentellem Befund war es nur empirisch möglich, durch die Verfolgung der Populationsentwicklung einer Mischkultur aus WD1 und *P. fluorescens* bei unterschiedlicher Substratlimitierung ($\mu \leq 0.05\ h^{-1}$) festzustellen, ob und bei welcher Substratkonzentration / Wachstumsrate (Verdünnungsrate) ein solcher Schnittpunkt der Wachstumskurven existierte.

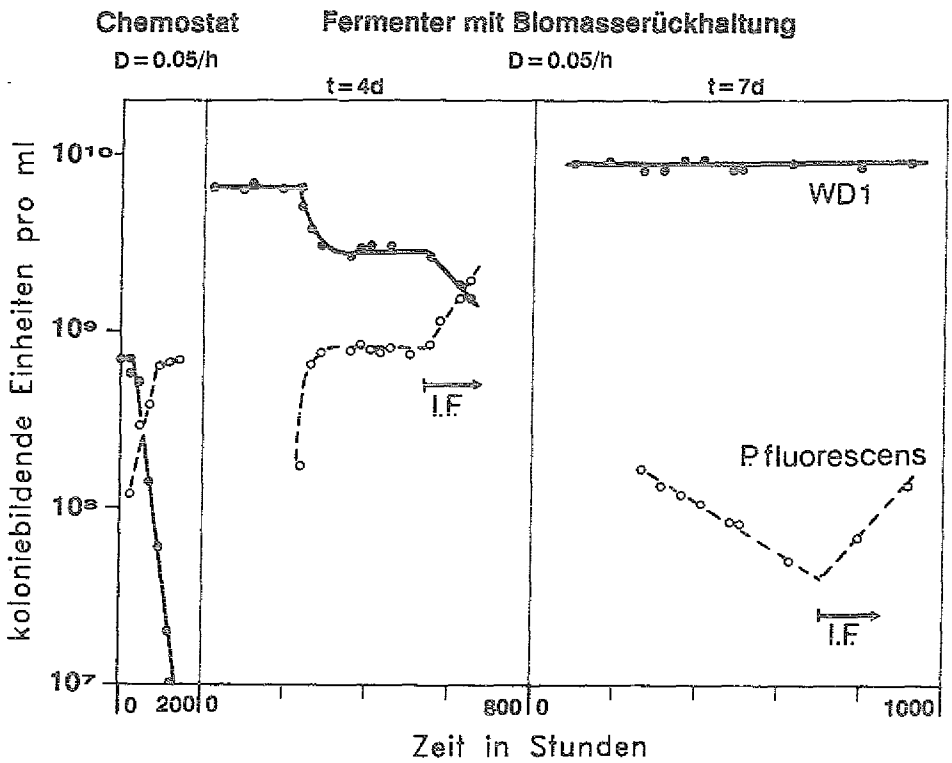


Abb. 51: Gemeinsame Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen zur Populationsdynamik mit Mischkulturen von WD1 und *P. fluorescens*

Im Chemostat wurde WD1 auch bei einer Verdünnungsrate von D = 0.05 h^{-1} vollständig von *P. fluorescens* verdrängt. Auf einen weiteren Versuch mit diskontinuierlicher Substratzugabe bei dieser Verdünnungsrate wurde deshalb verzichtet.

Im Reaktor mit Biomasserückhaltung wurde daraufhin die mittlere Verweilzeit der Biomasse von der mittleren hydraulischen Verweilzeit des Kulturmediums entkoppelt. Dadurch konnten bei gleichbleibender Substratzufuhr die Wachstumsrate und die Biomassekonzentration, und damit die spezifische Biomassebelastung, verändert werden.
Bei einer mittleren Verweilzeit der Biomasse von 4 Tagen war die Konzentration von WD1 um den Faktor 4 höher (1.2 g/l TRS) als im Chemostaten (0.3 g/l TRS) bei gleichbleibender Substratzufuhr. Unter diesen verschärften Konkurrenzbedingungen (die spezifische Biomassebelastung betrug nur 1/4 der Belastung im Chemostat bei gleicher hydraulischer Verweilzeit) konnte WD1 bei kontinuierlicher Substratzugabe erfolgreich mit *P. fluorescens* um das Acetat konkurrieren, und es waren nun offenbar die zuvor für D = 0.11 h^{-1} errechneten Koexistenzbedingungen gegeben.

Eine weitere Substratlimitierung durch eine nochmalige Erhöhung des mittleren Biomassealters bei gleicher Substratversorgung sollte schließlich das Wachstum von WD1 gegenüber *P. fluorescens* begünstigen. Erwartungsgemäß konnte in dem anschließenden Experiment mit 7 Tagen mittleren Biomassealters auch *P. fluorescens* bei kontinuierlicher Substratzugabe nicht mehr gegen WD1 konkurrieren und der Populationsanteil von *P. fluorescens* nahm ab.

Nach dem Umschalten auf diskontinuierliche Substratzugabe nahm jedoch der Populationsanteil von *P. fluorescens*, wie schon zuvor im Experiment mit 4 Tagen Biomassealter, wieder zu.

Kontinuierliche Substratzugabe ermöglichte also beiden Bakterien die Koexistenz nur bei <u>einer</u> bestimmten Substratkonzentration (resultierend aus der spez. Belastung bei 4 Tagen Biomassealter). Aus den Versuchsergebnissen darf aber nicht geschlossen werden, daß bei diskontinuierlicher Substratzugabe immer *P. fluorescens* selektioniert worden wäre. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse, daß eine diskontinuierliche Zugabe des Substrates die Koexistenz von WD1 und *P. fluorescens* über einen weiten Belastungsbereich (resultierend aus einem Biomassealter ab 4 Tagen und länger) gewährleisten könnte. Die mittleren Anteile des jeweiligen Bakterienstammes an der Gesamtpopulation würden dann durch die Höhe der Konzentrationsgradienten bzw. durch die Taktzeiten der Substratzugabe bestimmt. Bei niedrigen Substratkonzentrationen (kurze Taktzeiten) würde der "Affinitätsstratege" WD1 erfolgreicher konkurrieren, wogegen bei zeitweilig höheren (längeren Taktzeiten) oder andauernd höheren (kontinuierlicher Zugabe bei hoher spezifischer Belastung) Substratkonzentrationen *P. fluorescens* erfolgreicher wäre.
Aus Zeitgründen konnten weitere experimentelle Belege für diese Zusammenhänge noch nicht erbracht werden. Bereits die Experimente bei nur drei verschiedenen Biomassebelastungen und nur einer Taktzeit für die diskontinuierliche Substratzugabe erforderten einen erheblichen Zeitaufwand und stellten einen hohen Anspruch an die Zuverlässigkeit des Kultursystemes.
So ist beispielsweise für den Versuch mit 7 Tagen Biomassealter in Abb. 51 ein Zeitabschnitt von 0 - 1000 Stunden aufgetragen, ohne daß damit der Zeitraum bis zum Erreichen einer konstanten Biomassekonzentration von WD1 berücksichtigt worden wäre. Der gesamte Versuch setzte

den axenischen, störungsfreien Betrieb des Kultursystemes (Reaktor und Filtrationsmodul) von über 9 Wochen voraus.

Erst die Verwendung eines Reaktors mit Biomasserückhaltung ermöglichte es, bei sehr kleinen Wachstumsraten überhaupt eine kontinuierliche Substratzugabe zu simulieren. Nach Hansford und Humphrey (1966) ist aus technischen Gründen im Chemostaten ab Verdünnungsraten $< 0.05\ h^{-1}$ die zeitliche Homogenität der Substratverteilung nicht mehr gewährleistet und mit dem zeitlichen Abstand der tropfenweisen Zugabe nimmt der Charakter des "pulse feeding" mit weiterer Abnahme der Verdünnungsrate zu.
Deshalb sind Chemostatexperimente auch bei sehr niedrigen Verdünnungsraten ($\ll 0.05\ h^{-1}$) nicht geeignet, das Wachstum von Bakterien unter Belastungsbedingungen (B_{TS}, "food to biomass ratio") wie sie in einer schwachbelasteten Kläranlage vorherrschen, zu simulieren. Erschwerend kommt noch der Umstand hinzu, daß die Stoffwechselaktivität der eventuell an Gefäßwand und Einbauten haftenden Biomasse im Chemostaten bei niedrigen Verdünnungsraten einen erheblich größeren Anteil am Umsatz des zugeführten Substrates (verglichen mit dem der freisuspendierten Biomasse) hat, als das im Reaktor mit Biomasserückführung aufgrund der wesentlich höheren Konzentration freisuspendierter Biomasse der Fall ist. Durch die Biomasserückhaltung gelingt es außerdem, stoffwechselphysiologische Untersuchungen an sehr langsam wachsenden Bakterien (oder Kulturen ohne Nettozuwachs Kap. 4.2.) mit hohen Biomassekonzentrationen durchzuführen. Das wird für die Untersuchung von z.B. Reinkulturen nitrifizierender Bakterien oder für Versuche zur biologischen Phosphorelimination mit Bakterienreinkulturen zukünftig von großer Bedeutung sein.

4.3. Untersuchungen zur vermehrten Phosphataufnahme und Rücklösung

In konventionell betriebenen biologischen Kläranlagen werden aufgrund des assimilierten und mit dem Überschußschlamm entfernten Phosphors üblicherweise 10 - 30 % der Phosphatzulaufmenge eliminiert (Lan et al. 1983, Mudrack und Kunst 1988). Levin und Shapiro (1965) erkannten, daß die in Kläranlagen unter bestimmten Betriebsbedingungen (Kap. 1.3.) beobachtete vermehrte P-Elimination auf biochemische Vorgänge im Belebtschlamm zurückzuführen war. Seither wurde eine Vielzahl von Untersuchungsergebnissen zu dieser Thematik veröffentlicht und Modelle über die stoffwechselphysiologischen Zusammenhänge formuliert (Kap. 1.3.).

In Experimenten mit Bakterienreinkulturen konnten bislang aber nur einzelne Stoffwechselleistungen des für ein "Bio-P-Bakterium" postulierten Potentials nachgewiesen werden. Der Grund dafür ist nach meiner Vorstellung im wesentlichen in drei Möglichkeiten zu sehen:

1. Die unterschiedlichen Stoffwechselleistungen nicht eines, sondern <u>mehrerer</u> Bakterienstämme bewirken die biologisch vermehrte Phosphorelimination.
2. Aufgrund der selektiven Isolationstechniken werden nicht die "richtigen" Bakterien isoliert.
3. Die Bedingungen, unter denen die Reinkulturen üblicherweise kultiviert werden, sind nicht geeignet, die potentiellen Fähigkeiten der untersuchten Organismen vollständig auszuprägen.
   a) Die möglicherweise erforderliche Induktion der Bakterien, vermehrt Phosphat rücklösen und aufnehmen zu können, wurde in Versuchen mit Reinkulturen nicht berücksichtigt.
   b) Alle Experimente mit Reinkulturen wurden in Batch-Ansätzen oder Chemostaten durchgeführt. Die Kulturbedingungen unterschieden sich damit erheblich von den Lebensbedingungen, denen die Bakterien in einer Kläranlage ausgesetzt sind. (Insbesondere bzgl. der spezifischen Biomassebelastung und der effektiven Wachstumsraten.)

In den eigenen Untersuchungen habe ich der dritten Möglichkeit besondere Bedeutung beigemessen.

Zu a): Es wurden nicht nur unter daueraeroben Kulturbedingungen wachsende Reinkulturen nach einmaligem Wechsel zu anaeroben Bedingungen bei gleichzeitiger Acetatzugabe untersucht, sondern die

Bakterien waren auch über mehrere Aufenthaltszeiten im Chemostaten ($D = 0.05\ h^{-1}$) wechselweise aeroben und anaeroben Bedingungen ausgesetzt, und Acetat wurde jeweils zu Beginn der anaeroben Phase zugegeben.

Zu b): Das aus der Anreicherungskultur gewonnenen Isolat WD1 (Kap. 2.2.5.) wurde zusätzlich im Fermenter mit teilweiser Biomasserückhaltung auf die Fähigkeit zur vermehrten P-Aufnahme und Rücklösung untersucht. Das mittlere Biomassealter betrug dabei 2.5 Tage bei gleicher mittlerer Verweilzeit für das Kulturmedium wie in den Chemostatversuchen (20 h).

In einer Anreicherungskultur (Mischkultur) für "Bio-P-Organismen" (Kap. 2.2.5.) war nach einer Betriebsdauer von etwa 10 Tagen eine Zunahme der ortho-Phosphatkonzentration im Kulturfiltrat während der anaeroben Phase meßbar (P-Rücklösung), gefolgt von einer Abnahme der ortho-Phosphatkonzentration nach Umschalten auf Luftbegasung (P-Aufnahme) (Abb. 19 und 20). Die daraus ermittelten spezifischen Raten betrugen für die Phosphatrücklösung 6 - 8 mg P/g TRS * h^{-1} und für die Phosphataufnahme 5 - 7 mg P/g TRS * h^{-1} (berechnet aus den Raten der ersten 20 Minuten Anaerobie).

Ein Vergleich mit den in veröffentlichten Untersuchungen für Belebtschlamm oder Reinkulturen ermittelten Aufnahme- oder Rücklöseraten gestaltet sich schwierig. Die jeweiligen Betriebs- und Untersuchungsbedingungen waren sehr unterschiedlich und die Angaben dazu sind teilweise nicht übertragbar.
Schönberger (1988) schreibt: "Die Phosphatrücklösung war so intensiv, daß im Schlammwasser nach 15 stündiger (!) anaerober Aufenthaltszeit bis zu 150 mg PO_4-P/l nachgewiesen werden konnten."
Oder: "Dabei erreichte die Rücklöserate jedoch nur 32 mg/l" (Machado et al. 1989).
In der vielzitierten Arbeit von Gersberg und Allen (1985) wird die spezifische P-Aufnahmerate von *Acinetobacter calcoaceticus* mit 14.1 - 17.1 mg P/(l * h * OD-Einheit) angegeben. *Klebsiella pneumoniae* war mit 24.6 mg P/l * h^{-1} "among the highest ever reported in the literature". Die Biomassekonzentrationen lassen aber sich aus den übrigen Angaben in dieser Veröffentlichung nur grob abschätzen.

Brauchbarer sind dagegen die Angaben von Appeldoorn und Deinema

(1987), welche die spezifischen P-Rücklöseraten von Belebtschlamm und einer Reinkultur von *Acinetobacter* (Stamm B8) nach Zugabe verschiedener C-Quellen ermittelt haben. Sie betrugen für Belebtschlamm einer mit kommunalem Abwasser betriebenen halbtechnischen Versuchsanlage 14 - 28 mg P/g TRS, für Belebtschlamm einer Laboranlage ("fill and draw"-Reaktor) 22 - 50 mg P/g TRS und für *Acinetobacter* Stamm B8 4 - 11 mg P/g TRS, gemessen 6 Stunden nach Zugabe der C-Quelle.
Ohtake et al. (1985) ermittelten für 4 Stämme von *Acinetobacter calcoaceticus* P-Rücklöseraten von 0.18 - 0.46 mg P/g TRS * h^{-1}, nachdem die Bakterien aus der logarithmischen Wachstumsphase aus einem Batch-Ansatz in phosphatfreies, N_2-begastes Medium übertragen worden waren.
Aus graphischen Darstellungen in Wentzel et al. (1985) zur P-Rücklösung in einem anaeroben Batch-Reaktor lassen sich Rücklöseraten von etwa 5.5 mg P/g TRS * h^{-1} ermitteln.

Die von mir in der Anreicherungskultur gemessenen spezifischen P-Aufnahme- und -Rücklöseraten waren offenbar vergleichsweise hoch und konnten mit größter Sicherheit auch auf biochemische Reaktionen zurückgeführt werden (pH-statischer Betrieb).
Bemerkenswert scheint mir die Beobachtung zu sein, daß in der Anreicherungskultur im Durchflußreaktor (keine Biomasserückführung) die gemessenen Unterschiede in der ortho-Phosphatkonzentration während der aeroben und anaeroben Phasen dann am größten waren, wenn für einen Teil des "Belebtschlammes" durch Ablagerung an Elektroden und Prallblechen eine längere Verweilzeit resultierte als für den freisuspendierten Anteil. Die Steigerung der P-Rücklöse- und -Aufnahmeraten war mit der erhöhten Biomassekonzentration aufgrund der Ablagerungen alleine nicht zu erklären. Diese Beobachtung unterstützte meine Vorstellung von dem Einfluß der Kulturbedingungen bzw. der effektiven Wachstumsraten der Bakterien auf den P-Umsatz und bot ein weiteres Argument zur Konzipierung eines axenisch zu betreibenden Reaktors mit teilweiser Biomasserückführung.

In den Experimenten mit Bakterienreinkulturen (*Acinetobacter sp.* und Isolat WD1) konnte ich jedoch trotz der Berücksichtigung der zuvor aufgeführten Aspekte in keinem Fall eine vermehrte P-Aufnahme oder -Rücklösung nachweisen. Weder die Berücksichtigung einer notwendigen Induktion brachte Erfolg, noch war in Versuchen mit WD1 bei sehr nied-

rigen Wachstumsraten und erhöhter Biomassekonzentration, welche durch die Entkoppelung von hydraulischer Verweilzeit (20 h) und der mittleren Verweilzeit der Biomasse (2.5 d) im Reaktor mit teilweiser Biomasserückhaltung eingestellt wurden, eine vermehrte P-Aufnahme/Rücklösung meßbar.
Im Chemostatexperiment (Dauerbelüftung) zeigten die P-Gehalte der Biomasse für beide Organismen keine signifikante Abhängigkeit von der Wachstumsrate (Verdünnungsrate im Chemostat). Sie betrugen für *Acinetobacter sp.* 2.5 % - 3 % P am TRS und für WD1 2.7 % - 4.2 %.

Hao und Chang (1987) stellten im Gegensatz dazu für *Acinetobacter calcoaceticus* in Chemostatexperimenten eine Zunahme des P-Gehaltes von von 3.2 % bei einer Verdünnungsrate von 0.04 h^{-1} auf 4.8 % bei einer Verdünnungsrate von 0.5 h^{-1} fest.

Weltin und Hoffmeister (1990) ermittelten für einen *Acinetobacter*-Stamm (*A. lwoffii* 221), wiederum unabhängig von der Verdünnungsrate im Chemostaten (D = 0.15 - 0.71 h^{-1}), einen mittleren P-Gehalt von 3.5 % am TRS. Für einen ebenfalls in Chemostatkultur untersuchten *A. calcoaceticus* (DSM 1532) wurde dagegen ein mit der Verdünnungsrate zunehmender P-Gehalt (3.4 % bei D = 0.25 h^{-1} bis 6.7 % bei D = 0.62 h^{-1}) bestimmt. Für beide Stämme konnten sie aber auch keine P-Rücklösung oder vermehrte P-Aufnahme unter anaeroben bzw. aeroben Versuchsbedingungen feststellen.
Der untersuchte Stamm *Acinetobacter lwoffii* 221 war aus dem Belebtschlamm einer Kläranlage isoliert worden:
Kämpfer et al. (1990) hatten die Bakterienflora einer Kläranlage mit vermehrter P-Elimination (Berlin-Ruhleben) analysiert und dabei insgesamt 448 Reinkulturen gewonnen, wovon 12 % der Gattung *Acinetobacter* zugeordnet werden konnten. Die Untersuchung der Phosphataufnahme durch 47 ausgewählte Stämme (davon 15 Stämme der Gattung *Acinetobacter*) ergaben einen mittleren P-Gehalt von 2.1 %. Obwohl der mittlere P-Gehalt der Acinetobacter-Stämme mit 2.8 % nicht wesentlich höher lag, erreichten einzelne Stämme doch bis zu 4.2 % P vom TRS. Die Autoren konnten aber die gute P-Elimination der Kläranlage allein durch eine erhöhte P-Aufnahme von *Acinetobacter* nicht erklären.

Van Groenestijn (1988) fand für einen aus einer Kläranlage isolierten *Acinetobacter* (Stamm 210A) unter Substratlimitierung im Chemostat

einen maximalen P-Gehalt von 8.3 % vom TRS bei einer Verdünnungsrate von 0.1 h^{-1}. Anders als bei Hao und Chang (1987) und Weltin und Hoffmeister (1990) nahm der P-Gehalt mit höheren Verdünnungsraten wieder bis auf 5.8 % bei 0.69 h^{-1} ab. Im Batch-Versuch nahm der P-Gehalt unterhalb des Temperaturoptimum für die maximale Wachstumsrate (25 - 33°C) deutlich zu und erreichte bei 5°C (!) ein Maximum von 10 % P vom TRS. Schwefellimitierung im Chemostatexperiment (25°C) bewirkte auch eine Zunahme des P-Gehaltes mit abnehmender Verdünnungsrate bis zu einem Maximalwert von 8.8 % bei der niedrigsten eingestellten Verdünnungsrate von 0.04 h^{-1}.
Van Groenestijn (1988) leitet aus diesen und weiteren Ergebnissen seiner Versuche mit Stamm 210A zur P-Aufnahme die Hypothese ab, die Polyphosphatakkumulation sei eine Folge des Energieüberschusses in den Zellen, oder der Störung der Synthese andere Polymere.
Da nach Linton und Stephenson (1978) das Wachstum heterotropher Bakterien auf Acetat energielimitiert und nicht kohlenstofflimitiert erfolgt, ist eine Zunahme des Polyphosphatgehaltes mit abnehmender Wachstumsrate im Chemostaten, und erst recht unter der extremen Limitierung in einer Kläranlage, mit dieser Vorstellung nicht vereinbar. Auch fanden Suresh et al. (1985) die höchste Aktivität der Polyphosphatkinase bei *Pseudomonas vesicularis* während der <u>späten stationären Phase</u>. Die Enzymaktivität korrelierte mit der Zunahme des intrazellulären Polyphosphates. Andererseits würde die postulierte PHB-Synthese während der anaeroben Phase zur Folge haben, daß Bio-P-Organismen zu Beginn der aeroben Phase, trotz des Mangels an exogenem Substrat, nicht substratlimitiert sind, da sie endogene Speicherstoffe (PHB) metabolisieren könnten.
Diese wenigen Beispiele zeigen die gegenwärtig bestehenden Schwierigkeiten auf, die Ergebnisse aus Untersuchungen an Belebtschlämmen und aus Versuchen mit Bakterienreinkulturen mit dem (den) Modell(en) in Übereinstimmung zu bringen. Erschwerend kommt noch hinzu, daß die Fähigkeit zu Phosphatspeicherung und -Rücklösung einzelner Bakterienstämme wahrscheinlich genetisch nicht stabil ist: Der wohl am gründlichsten untersuchte Stamm, Stamm 210A von *Acinetobacter sp.*, hat nach Zwischenkultivierungen seine Fähigkeit zur P-Rücklösung verloren (persönliche Mitteilung von K.J. Appeldoorn, Wageningen).

Nach dem heutigen Kenntnisstand ist es also nicht möglich, die im Belebtschlamm bzw. Mischkulturen beobachteten Phänomene auf die Stoff-

wechselleistungen eines Bakterientypes ("Bio-P-Organismus") zurückzuführen, obwohl fast alle postulierten Teilreaktionen und Produkte bisher in Reinkulturen und Belebtschlamm nachgewiesen werden konnten:

- In Reinkulturen von *Acinetobacter* wurde PHB (Polyhydroxybuttersäure) nachgewiesen (Fuhs und Chen 1975, Nicholls und Osborn 1979)
- Zu Beginn der aeroben Phase dem Belebtschlamm zugegebenes ^{14}C-markiertes Acetat konnte anschließend zu 70 % in PHB nachgewiesen werden (Bordacs und Chiesa 1987).
- In Reinkulturen von *Acinetobacter sp.* wird Polyphosphat unter anaeroben Bedingungen abgebaut (Ohtake et al. 1985, Adamse et al. 1985, v. Groenestijn 1988).
- Die Zugabe kurzkettiger Fettsäuren oder/und Alkohol fördert die Phosphatrücklösung in Reinkulturen von *Acinetobacter sp.* (Deinema et al. 1985).

Die zentrale Forderung des Modells, nämlich die Aufnahme kurzkettiger <u>Fettsäuren und die Synthese von PHB unter anaeroben Bedingungen</u> in <u>einem</u> Mikroorganismus konnte aber bis heute experimentell nicht bestätigt werden.

Die eigenen Untersuchungen konnten mangels der Fähigkeit der kultivierten Bakterien, Phosphat rückzulösen oder vermehrt aufzunehmen, keinen direkten Beitrag zum Verständnis der Zusammenhänge bei der biologischen P-Elimination leisten. Es war daher auch nicht möglich, einen experimentellen Beleg für die Richtigkeit der eingangs dieses Kapitels formulierten kritischen Anmerkungen (3.a und b) zur üblichen Versuchspraxis zu liefern.
Dennoch lassen sich einer Vielzahl von Veröffentlichungen Hinweise auf die Unzulänglichkeit der darin beschriebenen Kultursysteme entnehmen, welche die Untersuchung der Mechanismen der biologischen Phosporelimination an Reinkulturen in einem Fermenter mit teilweiser Biomasserückhaltung unter "kläranlagentypischen" Wachstumsbedingungen wichtig erscheinen lassen, wie er sich bei meinen Untersuchungen zur Analyse der Populationsdynamik in Mischkulturen zweier Bakterienstämme bewährt hat.

5.0 Zusammenfassung

Das Zusammenwirken einzelner Bakterienspezies und ihre Wachstums- und Koexistenzbedingungen in biologischen Kläranlagen wurden bislang wenig untersucht. Aus methodischen Gründen ist es kaum praktikabel, derartige Untersuchungen im komplexen System Kläranlage selbst durchzuführen. Eine Alternative bieten Experimente mit möglichst modellhaften Testsystemen und Testorganismen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß kontinuierlicher und diskontinuierlicher Substratzugabe auf das Wachstum von Bakterienreinkulturen und von definierten Mischkulturen untersucht. Mit Hilfe eines von mir entwickelten Kultursystems gelang es außerdem, axenische Kulturen über lange Zeiträume (2-3 Monate) unter Bedingungen zu untersuchen, die bezüglich der Wachstumsraten, der Biomassekonzentrationen und der Substratverfügbarkeit denen in einer nach dem Belebtschlammverfahren betriebenen Kläranlage entsprachen.

Als Testorganismen wurden zwei aus Belebtschlamm isolierte Bakterien (eines als *Acinetobacter sp.* identifiziert, das andere als WD1 benannt und biochemisch-physiologisch charakterisiert aber nicht abschließend identifiziert) und ein Biotyp von *Pseudomonas fluorescens* (Biotyp 2, DSM 50108) eingesetzt.
In Batch- und Chemostatversuchen wurden die maximalen Wachstumsraten und Ertragskoeffizienten der Testbakterien mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle ermittelt.
Auf die Umstellung von kontinuierlicher auf diskontinuierliche Substratzuführung im Durchflußreaktor reagierten die drei Bakterienspezies unterschiedlich:

Das Bakterium mit der höchsten maximalen Wachstumsrate *Acinetobacter sp.* (μ_{max} = 0.53 h^{-1}) begann zu flocken, zu schäumen und haftete an Fermenterwandungen und -einbauten. Die diskontinuierliche Substratzugabe hatte wahrscheinlich eine Entkoppelung der Wachstumsrate von der mittleren Verdünnungsrate zur Folge, so daß *Acinetobacter sp.* nach Zugabe des Substrates kurzzeitig mit hoher Rate zu wachsen vermochte und in der sich anschließenden Mangelphase ein Teil der Zellen lysierte.

P. fluorescens (μ_{max} = 0.38 h^{-1}) wuchs unabhängig von Substratzugabemodus freisuspendiert und mit gleichem Yield. Im Respirometer

war aber für die Bakterien aus der Kultur mit diskontinuierlicher Substratzugabe eine niedrigere Halbsättigungskonzentration K_m für Acetat (17 µMol/l) ermittelt worden als für Biomasse aus kontinuierlicher Kultur (28 µMol/l).

Auf das Isolat WD1 (μ_{max} = 0.2 h^{-1}) hatte die Umstellung auf diskontinuierliche Substratzugabe keinen meßbaren Einfluß.

Experimente im Fermenter mit vollständiger Biomasserückhaltung und mit Isolat WD1 als Testbakterium zeigten, daß der "maintenance coefficient" keine von der Wachstumsrate unabhängige Größe war, da er sich mit abnehmender Wachstumsrate ebenfalls verringerte. Er nahm von 0.03 mg C/(mg C * h) auf einen konstanten minimalen Wert von 0.012 mg C/(mg C * h) ab. WD1 blieb auch vollständig lebensfähig, wenn trotz kontinuierlicher Substratnachlieferung aufgrund der hohen Biomassekonzentration kein Wachstum mehr erfolgen konnte und alles Substrat gerade den Bedarf für den Erhaltungsstoffwechsel deckte.
Das Konkurrenzverhalten von zwei um die gleiche Kohlenstoff- und Energiequelle (Acetat) konkurrierenden Bakterien wurde exemplarisch in einer Mischkultur aus *P. fluorescens* und Isolat WD1 untersucht. Aufgrund der jeweils in Reinkultur ermittelten Wachstumsparameter wurde für niedrige Wachstumsraten (starke Nährstofflimitierung) in Mischkultur ein Konkurrenzvorteil für WD1 errechnet, bei hohen Wachstumsraten sollte *P. fluorescens* Wachstumsvorteile genießen.
Das Experiment konnte die Versuchshypothese zwar prinzipiell bestätigen, doch wurden Wachstumsvorteile für WD1 erst bei einer Wachstumsrate erreicht, die deutlich niedriger lag als die errechnete Wachstumsrate (bzw. die daraus resultierende spezifische Biomassebelastung = "food to biomass ratio"). Die für die Untersuchungen relevante Substratverfügbarkeit wurde erst im Fermenter mit teilweiser Rückhaltung der Biomasse erreicht.
Wie durch die Versuche auch gezeigt werden konnte, werden durch diskontinuierliche Substratzugabe ("Intermittent Feeding") über einen größeren "Belastungsbereich" günstigere Koexistenzbedingungen geschaffen, als das bei kontinuierlicher Substratzugabe in einem komplett durchmischten Reaktor der Fall ist.

Eines der ursprünglichen Ziele der Arbeit, nämlich die Untersuchung des Phosphatrücklöseverhaltens eines dazu befähigten Bakteriums in Cokultur mit einem denitrifizierenden Bakterium, konnte mangels eines

geeigneten Testorganismus nicht weiterhin berücksichtigt werden:
Sowohl *Acinetobacter sp.* als auch das aus einer Anreicherungskultur zur vermehrten P-Aufnahme und -Rücklösung isolierte Bakterium WD1 waren auch unter der Berücksichtigung eventuell notwendiger Adaptationszeiträume und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen nicht zur vermehrten P-Aufnahme und -Rücklösung befähigt.
Im Gegensatz dazu war in der Anreicherungskultur (Mischkultur) durch die Wahl geeigneter Betriebsbedingungen schon nach etwa 10 Tagen eine vermehrte P-Aufnahme und -Rücklösung meßbar.

6.0 Literaturverzeichnis

Adamse, A.D.: Response of dairy waste activated sludge to experimental conditions affecting pH and dissolved oxygen concentration. Water Research, Vol. 2, 703-713, 1968.

Akagi, Y. und Taga, N.: Uptake of D-glucose and L-proline by oligotrophic and heterotrophic marine bacteria. Canadian Journal of Microbiology 26, 454-459, 1980.

Alarcon, G.O.: Removal of phosphorus from sewage Masters Essay. The Johns Hopkins Univ., Baltimore, Md. 1961.

Appeldoorn K.J. und Deinema, M.H.: Biological phosphorus removal under defined conditions in a fill-and-draw system Proccedings of an IAWPRC specialized conference, Rome. Adv. Wat. Poll. Control Pergamon Press, 309-311, 1987.

Arvin, E.: Observations supporting phosphate removal by biologically mediated chemical precipitation - a review Water Science Technology, Vol. 15, 43-63, 1983.

Arvin, E. und Holm Kristensen, G.: Exchange of organics phosphate and cations between sludge and water in biological phosphorus and nitrogen removal processes Water Science Technology, Vol. 17, 147-162, 1985.

ATV-Arbeitsberichte: Biologische Phosphatentfernung Korrespondenz Abwasser, 36. Jahrgang, Heft 3, 337-348, 1989.

Barnard, J.L.: Background to biological phosphorus removal Water Science Technology, Vol. 15, 1-3, 1983.

Bergey's Manual of systematic Bacteriology, Vol. 1, Krieg, N.R. (ed) Williams & Wilkins, Baltimore, 1983.

Bergter, F.: Wachstum von Mikroorganismen Gustav Fischer Verlag, Jena, 1983.

Bock, E., Koops, H.P. und Harms, H.: Cell biology of nitrifying bacteria. In: Nitrification 17-38
Special publications of the Society for General Microbiology Vol. 20, IRL Press 1986.

Böhnke, B. und Pinnekamp, J.: Nitrifikation und Denitrifikation in ein- und zweistufigen Belebungsanlagen
Korrespondenz Abwasser, Nr. 5, 570-581, 1989

Bordacs, K. und Chiesa, S.C.: Carbon flow patterns in enhanced biological phosphorus accumulating activated sludge cultures
Water Science Technology, Vol. 21, Brighton 387-396, 1989.

Boylen, C.W. und Ensign, J.C.: Intracellular substrates for endogenous metabolism during long term starvation of rod and spherical cells of *Arthrobacter crystallopoietes*
J. Bacteriol. 103, 578-587, 1970

Brodisch, K.E.U.: Interaction of different groups of micro-organisms in biological phosphate removal
Water Science Technology, Vol. 17, 89-97, 1985.

Brodisch, K.: Zusammenwirkung zweier Bakteriengruppen bei der biologischen Phosphateliminierung
gwf - wasser/abwasser 126, 237-240, 1985.

Brodisch, K. und Joyner, S.J.: The role of micro-organisms other than *Acinetobacter* in biological phosphate removal in activated sludge processes
Water Science Technology, Vol. 15, 117-125, 1983.

Buchan, L.: Possible biological mechanism of phosphorus removal
Water Science Technology, Vol. 15, 87-103, 1983.

Bulthuis, Ben A., Koningstein, G.M., Stouthamer, A.H. und Van Verseveld, H.W.: A comparison between aerobic growth of *Bacillus licheniformis* in continuous culture and partial-recycling fermentor, with contributions to the discussion on maintenance energy demand
Arch. Microbiol. 152, 499-507, 1989.

Carlone, G.M., Valadez, M.J. und Pickett, M.J.: Methods for distinguishing gram-positive from gram-negative bacteria
J. Clin. Microbiol. 16, 1157-1159, 1983.

Cerny, G.: Studies on the aminopeptidase test for the distinction gram-positive from gram-negative bacteria
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5, 113-122, 1978.

Chesbro, W.: The domains of slow bacterial growth
Can. J. Microbiol, Vol. 34, 427-435, 1988.

Chesbro, W., Arbige, M. und Eifert, R.: When nutrient limitation places bacteria in the domains of slow growth: metabolic, morphologicand cell-cycle behavior
FEMS Microbiology Ecology 74, 103-120, 1990.

Chudoba, J., Grau, P. und Ottavá, V.: Control of activated sludge filamentous bulking - II. Selection of microorganisms by means of a selector
Water Research, Vol. 7. 1389-1406, 1973 (b).

Chudoba, J., Ottavá, H. und Madéra, V.: Control of activated sludge filamentous bluking - I. Effect of the hydraulic regime or degree of mixing in an aeration tank
Water Research, Vol. 7, 1163-1182, 1973(a).

Chudoba, J., Bláha, J. und Madéra, V.: Control of activated sludge filamentous bulking - III. Effect of sludge loading
Water Research, Vol. 8, 231-237, 1974.

Chudoba, J., Cech, J.S. Farkac, J. und Grau, P.: Control of activated sludge filamentous bulking
Water Research, Vol. 19, 191-196, 1985.

Comeau, Y., Hall, K.J., Hancock, R.E.W. und Oldham, W.K.: Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal
Water Resaerch, Vol. 20, No. 12. pp., 1511-1521, 1986.

Czihak, G., Langer, H. und Ziegler, H.: Biologie
Springer Verlag, 3. Auflage, Seite 728, 1981

Daigger, G.T. und Grady, C.P.L.: The dynamics of microbial growth on soluble substrates. A unifying theory
Water Research, Vol. 16, 365-382, 1982.

Dawes, E.A. und Ribbons, D.W.: Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria
Bacteriological Reviews, Vol. 28, No. 2, 126-149, 1964.

Deinema, M.H., van Loosdrecht, M. und Scholten, A.: Some physiological characteristics of *Acinetobacter ssp.* accumulating large amounts of phosphate
Water Science Technology, Vol. 17, 119-125, 1985.

Depauw-Gillet, M.C. und Remacle, J.: The kinetics of a microbial population. In: Microbial Ecology. Loutit, M.W. und Miles, J.A.R. (Eds.)
Springer Verlag, 1978

DEV 1988: Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft deutscher Chemiker (Hrsg.): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
VCH Verlagsgemeinschaft, Weinheim, 1988.
C1 - Bestimmung der Färbung
C2 - Bestimmung der Trübung
S6 - Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate
S12 - Bestimmung von Phosphorverbindungen in Schlämmen und Sedimenten

Diekmann, H. und Faby, S.: Mischkulturversuche mit dem Fadenbildner *Haliscomenobacter hydrossis* und dem flockenbildenden *Arthrobacter globiformis* - I. Kultivierung und Einfluß des pH-Wertes
gwf - wasser/abwasser 129, Heft 5, 351-355, 1988.

Eikelboom, D.H.: Filamentous organisms observed in activated sludge
Water Research, Vol. 9, 365-387, 1975.

Felber, H. Metz, G. und Röske,I.: Eigenschaften und Behandlung des Schlammes aus Abwasserbehandlungsanlagen mit biologischer Phosphatelimination

Wasserwirtschaft-Wassertechnik 4, 79-83, 1990.

Fingerhut, U.: Wachstum und Zusammenwirken von *Scenedesmus falcatus* und *Pseudomonas aeruginosa* bei chemostatischer Kultur in acetathaltigem Modellabwasser
Dissertation. Universität Bochum, 1985.

Fuhs, G.W. und Chen, M.: Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater
Microbial Ecology, Vol. 2, 119-138, 1975.

Garrido, D.: Crecimiento quemiostatico de *Acinetobacter* sp. bajo condiciones de entrada de sustrato constante o intermitente
Diplomarbeit. Universität Granada, 1987.

Gersberg, R.M. und Allen, D.W.: Phosphate uptake by *Klebsiella pneumoniee* and *Acinetobacter calcoaceticus*
Water Science Technology, Vol. 17, 113-118, 1985.

Gottschal, J.C.: Phenotypic response to environmental changes
FEMS Microbiology Ecology 74, 93-102, 1990.

Gottschal, J.C., de Vries, S. und Kuenen, J.G.: Competition between the facultatively chemolithotrophic *Thiobacillus* A2, and obligately chemolithotrophic *Thiobacillus* and a heteretrophic Spririllum for inorganic and organis substrates.
Arch. Microbiol, 121, 241-249, 1979.

Gregersen, T.: Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria
European. J. Appl. Microbiol. Biotechnol 5, 123-127, 1978.

Groeneweg, J. und Soeder, C.J.: An improved culture tube for axenic cultures of microalgae
Br. phycol. J. 13, 337-340, 1978.

Hamer, G.: Lysis and "cryptic" growth in wastewater and sludge treatment processes
Acta Biotechnol. 5,2, 117-127, 1985.

Hansford, G.S. und Humphrey, A.E.: The effect of equipment scale and degree of mixing on continuous fermentation yield at dilution rates
Biotech. Bioeng. 8, 85-96, 1966.

Hao, O.J. and Chang, C.H.: Kinetics of growth and phosphate uptake in pure culture studies of *Acinetobacter species*
Biotech. Bioeng. 29, 819-831, 1987.

Hempfling, W.P. und Mainzer, S.E.: Effects of varying the carbon source limiting growth on yield and maintenance characteristics of *E. coli* in continuous culture
J. Bacteriol. 123, 1076-1087, 1975.

Henis, Y.: Survival and dormancy of microorganisms
John Wiley and Sons, 1987.

Herbert, D., Elsworth, R. und Telling, R.C.: The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study
J. Gen. Microbiol. 14, 601-622, 1956.

Hoffmeister, D., Weltin, D. und Dott, W.: Untersuchungen zur bakteriellen Phosphateliminierung. II. Mitteilung: Physiologische Untersuchungen an Reinkulturen
gwf - wasser/abwasser 131, Nr. 5, 270-276, 1990.

Houtmeyers, J.: Relations between substrate feeding pattern and development of filamentous bacteria in activated sludge process
Dissertation. Universität Leuven, 1978.

Houtmeyers, J., van den Eynde, E., Poffé, R. und Verachtert, H.: Relations between substrate feeding pattern and development of filamentous bacteria in activated sludge processes. Part I: Influence of process parameters
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9, 63-77, 1980.

Hütter, L.A.: Wasser und Wasseruntersuchung. 2. Auflage
Verlage Diesterweg, Salle, Sauerländer, 1984.

Jannasch, H.W.: Bakterielles Wachstum bei geringen

Substratkonzentrationen
Archiv für Mikrobiologie 45, 323-342, 1963.

Jenkins, D., Nutkling, J.B., Bode, H. und Richard, M.G.: The use of chlorinations for control of activated sludge bulking
In: Chambers, B., Tomlinson, E.J. (eds.): Bulking of activated sludge. S. 187-206, Ellis Harwood Chichester, 1982.

Kämpfer, P.: Automatisierte Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften
Hygiene Berlin, Veröffentlichung aus dem Fachgebiet Hygiene der TU Berlin und dem Institut für Hygiene der FU Berlin 1, 1988.

Kämpfer, P., Eisenträger, A., Hergt, V. und Dott,W.: Untersuchungen zur bakteriellen Phosphateliminierung. I. Mitteilung: Bakterienflora und bakterielles Phosphatspeicherungsvermögen in Abwasserreinigungsanlagen
gwf - wasser/abwasser 131, Nr. 4, 156-164, 1990.

Kappesser, S.: Populationsanalysen, Nährstoffansprüche und Physiologie der Belebtschlamm-Mikroflora sowie "spezieller" Bakterienkulturen für die aerobe Abwasserbehandlung
Dissertation. Technische Hochschule Darmstadt, 1990.

Knappertsbusch, V.: Optimierung eines Bioreaktors mit Biomasserückhaltung und physiologische Charakterisierung einer Bakterienreinkultur unter besonderer Berücksichtigung des zellulären Phosphathaushaltes
Diplomarbeit. Universität Bochum, 1991.

Kusnetsov, S.I., Dubinina, G.A. und Lapteva, N.A.: Biology of oligotrophic bacteria
Annual review of Microbiology 33, 377-387, 1979.

Lan, J.C., Benefield, L. und Randall, C.W.: Phosphorus removal in the activated sludge process
Water Research, Vol. 17, 1193-1200, 1983.

Lau, A.O.:, Strom, P.F. und Jenkins, D.: Growth kinetics of *Spaerotilus natans* and a floc former in pure an dual continuous

culture.
J. Water Poll. Contr. Fe., Vol. 56, 52-61, 1984.

Levin, G.V. und Shapiro, J.: Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms
Journal WPCF, Vol. 37, No. 6, 800-821, 1965.

Linton, J.D. und Stephenson, R.J.: A preliminary study on growth yields in relation to the carbon and energy content of various organic growth Substrates
FEMS Microbiol. Letters 3, 95-98, 1978.

Machado, A., Pinto, M., Neder, K. und Hoffmann, H.: Betriebsergebnisse von Belebungsanlagen mit biologischer Phosphoreliminierung
gwf - wasser/abwasser 130, Nr. 2, 56-62, 1989.

Marais, G.v.R., Loewenthal, R.E. und Siebritz, I.P.: Observations supporting phosphate removal by biological excess uptake. A review
Water Science Technology 15, 15-41, 1983.

Matché, N.: Blähschlamm-Ursachen und Bekämpfung
Wien. Mitt. 22, 1-28, 1977.

Matin, A. und Veldkamp, H.: Physiological basis of the selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment
Journal of General Microbiology, 105, 187-197, 1978.

Meltzer, A. und Steinberg, C.: Nutrient Cycling in Freshwater Ecosystems.
Physiological Plant Ecology IV, Encyclopedia of Plant Physiology. Hg. Lange, O.L. et al. New Series, Vol. 12 D.
Berlin, Heidelberg; Springer 1983.

Menar, A.B. und Jenkins, D.: Fate of phosphorus in waste treatment processes: Enhanced removal of phosphate by activated sludge
Env. Science and Technol., Vol. 4, No. 12, 1115-1121, 1970.

Monod, J.: The growth of bacterial cultures
Ann. Rev. Microbiol. 3, 371-394, 1949.

Morgan, P. und Dow, C.S.: Bacterial adaptations for growth in low nutrient environments. In: Microbes in extreme environments, Herbert und Codd (eds)
Special publications of the Society for General Microbiology 17, Academic Press 1986.

Mudrack, K. und Kunst, S.: Biologie der Abwasserreinigung
Verlag Gustav Fischer, Stuttgart, 2. Auflage, 1988.

Neijssel, O.M. und Tempest, D.W.: The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 organisms, growing in chemostat culture
Arch. Microbiol. 106, 251-258, 1975.

Neijssel, O.M. und Tempest, D.W.: Bioenergetic aspects of aerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in carbon-limited and carbon-sufficient chemostat culture
Arch. Microbiol. 107, 215-221, 1976.

Nicholls, A. und Osborn, D.W.: Bacterial stress: Prerequisite for biological removal of phosphorus
Journal WPCF, Vol. 51, 557-569, 1979.

Nioh, I. und Furusaka, C.:
J. Gen. Appl. Microbiol. 14, ab 373, 1968.

Novick, A. und Szilard, L.: Description of the chemostat
Science 112, 715-716, 1950.

Ohtake, H., Takahashi, K., Tsuzuki, Y. und Toda, K.: Uptake and release of phosphate by a pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*
Water Research, Vol. 19, No. 12, 1587-1594, 1985.

Payer, H.D. und Trültzsch, U.: Ein Beitrag zur Versorgung dichter Kulturen von Grünalgen mit Mangan, Vanadium und anderen Spurenelementen
Arch. Microbiol. 84, 43-53, 1972.

Pirt, S.J.: The maintenance energy of bacteria in growing cultures.
Proc. Royal Soc. London, B163, 224-231, 1965.

Pirt, S.J.: Principles of microbe and cell cultivation.
Blackwell Sci. Publ., Oxford, London, Edingburgh, Melbourne, 1975.

Pirt, S.J.: Maintenance energy in a general mode for energy-limited and energy-sufficient growth.
Arch. Microbiol. 133, 300-302, 1982.

Pirt, S.J.: The energetics of microbes at slow growth rates: Maintenance energies and dormant organisms
J. Ferment. Technol., Vol. 65, No. 2, 173-177, 1987.

Postgate, J.R. und Hunter, J.R.: The survival of starved bacteria.
Journal of General Microbiol. 29, 233-263, 1962.

Reichardt, W.: Einführung in die Methoden der Gewässermikrobiologie
G. Fischer Verlag Stuttgart, New York, 1978.

Reinnarth, G. und Rüffer, H.: Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsraten von Belebtschlamm
Vom Wasser 60, 223-235, 1983.

Rensink, J.H. und Donker, H.J.G.W.: Biologische Phosphorelimination aus Abwasser
gwf - wasser/abwasser 125, H.5, 238-245, 1984.

Rensink, J.H., Donker, H.J.G.W. und Simons, T.S.J.: Phosphorus removal at low sludge loadings
Water Science Technology, Vol. 17, 177-186, 1985.

Richard, M.G., Shimizu, G.P. und Jenkins, D.: The growth physiology of the filamentous organism Type 021N and its significance of activated sludge bulking
Journal WPCF, Vol. 57, No. 12, 1152-1162, 1985.

Shimizu, G.P.: The growth and nutrient uptake kinetics of Type 012M, a novel Thiothrix-like bacterium resonsible for activated sludge

bulking
Dissertation, University of California, Berkeley, 1985.

Soeder, C.J.; Abwasserbehandlung als aktuelle Aufgabe für die Biotechnologie
Schriften der Gesellschaft für Verantwortung in der Wissenschaft, No. 5, 41-57, 1987.

Sommer, U.: Comparison between steady state and non-steady state competition: Experiments with natural phytoplankton
Limnol. Oceanogr. 30(2), 335-346, 1985a.

Sommer, U.: Phytoplankton natural community competition experiments: A reinterpretation
Limnol. Oceanogr. 30(2), 436-440, 1985.

Srinath, E.G. et al.: Rapid removal of phosphorus from sewage by activated sludge
Experientia 15, 339-443,1959.

Stouthamer, A.H.: Energetic aspects of the growth of microorganisms. In: Haddock, B.A., Hamilton, W.A. (eds) Microbial energetics, 27th Symposium of the Soc. gen. Microbiol. Cambridge University Press, London, 283-315, 1977.

Stouthamer, A.H. und Bettenhausen, C.: Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms
Biochimica et Biophysica Acta 301, 53-70, 1973.

Suresh, N., Warburg, R., Timmerman, M., Wells, J., Coccia, M., Roberts, M.F. und Halvorson, H.O.: New strategies for the isolation of microorganisms responsible for phosphate accumulation
Water Science Technology, Vol. 17, 99-111, 1985.

Schlegel, Hans G.: Allgemeine Mikrobiologie. 5., überarbeitete und erweiterte Auflage
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1981.

Schön, G. und Streichan, M.: Anoxische Phosphataufnahme und Phosphatabgabe durch belebten Schlamm aus Kläranlagen mit biologischer Phosphorentferung
gwf - wasser/abwasser 130, Nr. 2, 67-72, 1989.

Schönberger, R.: Biologische Phosphorelimination nach dem EASC-Verfahren
Abwassertechnik Heft 3, 22-25, 1988.

Schwarzer, H., Reuss, N. und Schindler, W.: Blähschlammbekämpfung mit H_2O_2
Korr. Abwasser 27, 834-837, 1980.

Tempest, D.W., Hunter, J.R. und Sykes, J.: Magnesium limited growth of *Aerobacter aerogenes* in a chemostat
Journ. Gen. Microb. 39, 355-366, 1965

Themel, K.: Nitrifikation und Denitrifikation in einstufigen Modellbelebtschlammanlagen
Diplomarbeit. Bochum, 1988.

Uhlmann, Dietrich: Hydrobiologie, 2., bearbeitete Auflage
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1982.

Van den Eynde, E., Geerts, J., Maes, B. und Verachtert, H.: Influence of the feeding patterns on the glucose metabolism of *Arthrobacter* sp. and *Sphaerotilus natans*, growing in Chemostat culture, simulating activated sludge bulking
European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17, 35-43. 1983.

Van den Eynde, E., Vriens, L., Wynants, M. und Verachter, H.: Transien behaviour and time aspects of intermittently and continuously fed bacterial cultures with regard to filamentous bulking of activated sludge
Appl. Microbiol. Biotechnol. 19, 44-52, 1984.

Van Groenestijn, J.W.: Accumulation and degradation of polyphosphate in *Acinetobacter sp.*
Dissertation. Universität Wageningen, 1988.

Van Verseveld, H.W., Chesbro, W.R., Braster, M. und Stouthamer, A.H.: *Eubacteria* have 3 growth modes keyed to nutrient flow
Arch. Microbiol. 137, 176-184, 1984.

Van Verseveld, H.W., Arbige, M. und Chesbro, W.R.: Continuous culture of bacteria with biomass retention
Tends in Biotechnology, Vol. 2, No. 1, 8-12, 1984.

Veldkamp, H.: Ecological studies with the chemostate
In. Adv. Microb. Ecol. 1, 59-94, 1977.

Verachtert, H., Van den Eynde, E., Poffé, R. und Houtmeyers, J.: Relations between substrate feeding pattern and development of filamentous bacteria in activated sludge processes: Part II: Influence of substrates present in the influent
Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9, 137-149, 1980.

Wagner, F.: Ursachen, Verhinderung und Bekämpfung der Blähschlammbildung in Belebungsanlagen
Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Band 76, Oldenbourg Verlag, München, 1982.

Webb, L.E.: Geräte zur Florenanalyse von Bakterien-Mischpopulationen
Forum Mikrobiologie 9, 397-399, 1988.

Weltin, D. und Hoffmeister, D.: Physiologische Untersuchungen an Reinkulturen. In: Untersuchungen zur bakteriellen Phosphataufnahme
Hygiene Berlin, Veröffentlichungen aus dem Fachgebiet Hygiene der TU Berlin und dem Institut für Hygiene der FU Berlin, 4, 51-111, 1990.

Wentzel, M.C., Dold, P.L., Ekama, G.A. und Marais, G.v.R.: Kinetics of biological phosphorus release
Water Science Technology, Vol. 17, 57-71, 1985.

Wentzel, M.C., Lötter, L.H., Loewenthal, R.E. und Marais, G.v.R.: Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal - a biochemical model
Water SA, Vol. 12, No. 4, 209-224, 1986.

Wiemeler, T.: Bestimmung und Differenzierung des Anteils assimilierbaren organischen Kohlenstoffes im Kulturfiltrat von Bakterienreikulturen mittels "Bioassay". Diplomarbeit, Ruhruniversität Bochum. 1991.

Zanders, E.: Nitrifikation, Denitrifikation und Blähschlammverhinderung bei Kläranlagen durch schubweise Abwasserzugabe Dissertation. Universität Bochum, 1989.

7.0 Anhang

Untersuchungsergebnisse zur Identifizierung des Isolates WD1

(Durchgeführt am Institut für Hygiene der FU Berlin, nach Kämpfer 1988)

Gram	+
Oxidase	-
Zellform	Ko.-St.
Tryptophandesaminase	-
Indol	-
H2S	-
Esculin	+
Lysindecarboxylase	-
Ornithindecarboxylase	-
Arginidihydrolase	-
Urease	-
Citrate	-
Malonate	-
Voges Proskauer	-
Säure aus:	
D-Glucose	-
Rhamnose	-
Saccharose	-
Adonit	-
Inositol	-
Xylose	-
Sorbitol	-
Hydrolyse von:	
PNP N Acetyl Beta D Galaktosaminid	-
PNP N Acetyl Beta D Glucosaminid	-
PNP Alpha L Arabinopyranosid	-
PNP Beta D Cellopyranosid	-
PNP Beta D Galaktopyranosid	-
PNP Beta D Glucoronid	-
PNP Alpha D Glucopyranosid	+
PNP Beta D Glucopyranosid	+
PNP Beta D Lactosid	-
PNP Alpha D Mannosid	-
PNP Alpha D Maltosid	-
PNP Beta D Xylosid	-
Bis PNP Phosphat	+
Benzolphosphonsäure PNP Ester	+
PNP Phosphocholin	+
2 Desoxythymidin 5 PNP Phosphat	+
L Alanin PNA	+
Gamma 1 Glutamat PNA	+
L Glutamat Gamma 3 Carboxy PNA	-
Glycin Pna	+
L Leucin PNA	+
L Lysin PNA	+
L Prolin PNA	+
L Valin PNA	-

Verwertung von:	
N Acetyl D Glucosamin	-
L Arabinose	-
D Cellobiose	-
D Fructose	-
D Galactose	-
Alpha D Galakturonat	-
Gluconat	-
D Glucose	+
Glycogen	-
D Maltose	-
D Mannose	-
Alpha D Melibiose	-
L Rhamnose	-
D Ribose	-
D Saccarose	+
Salicin	-
D Trehalose	+
L Xylose	-
Adonit	-
I Inosit	-
D Mannit	-
Sorbit	-
Acetat	+
Propionat	+
T Aconitat	-
Adipat	-
Citrat	-
Fumarat	+
DL 3 Hydroxybutyrat	+
DL Lactat	-
L Malat	+
Pyruvat	+
Suberat	+
L Alanin	+
L Aspartat	+
L Histidin	+
L Hydroxyprolin	-
L Prolin	+
L Serin	+
Putrescin	+
3 Hydroxybenzoat	-
4 Hydroxybenzoat	-
Phenylacetat	-
N Acetyl D Galaktosamin	-
L Ornithin	+

St. = Stäbchen
PNP = P-Nitrophenyl
PNA = P-Nitroanilid

Herrn Prof. Dr. C.J. Soeder danke ich für die Bereitstellung von Thema, Sachmitteln und Arbeitsplatz sowie für seine wissenschaftliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. Voß danke ich für Übernahme des Korreferats.

Mein weiterer Dank gilt:
Herrn Dr. J. Groeneweg für die vielen anregenden Diskussionen und die Durchsicht der Arbeit.

Herrn Professor Dr. H. Kneifel für die Entwicklung und den Aufbau der Acetat-Analytik.

Den Mitarbeitern der IBT-Werkstatt und besonders Herrn H. Milz und Herrn H. Ruhrig für die sorgfältige Herstellung der Kultursysteme und die vielen Anregungen.

Herrn Dipl.-Biol. H.P. Rohns für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Entwicklung des Filtrationsmoduls.

Herrn Dipl.-Biol. V. Knappertsbusch für die gewissenhafte Durchführung der Versuche zur Erprobung des neuen Kultursystems.

Allen übrigen Mitarbeitern des IBT-3 für die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt, aber besonders herzlich, meiner Frau für ihre Geduld (insbesondere mit mir) und ihre Ausdauer bei den Schreibarbeiten und der Durchsicht der Arbeit.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2677
September 1992
ISSN 0366-0885