



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH
GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG
Institut für Physikalische Chemie

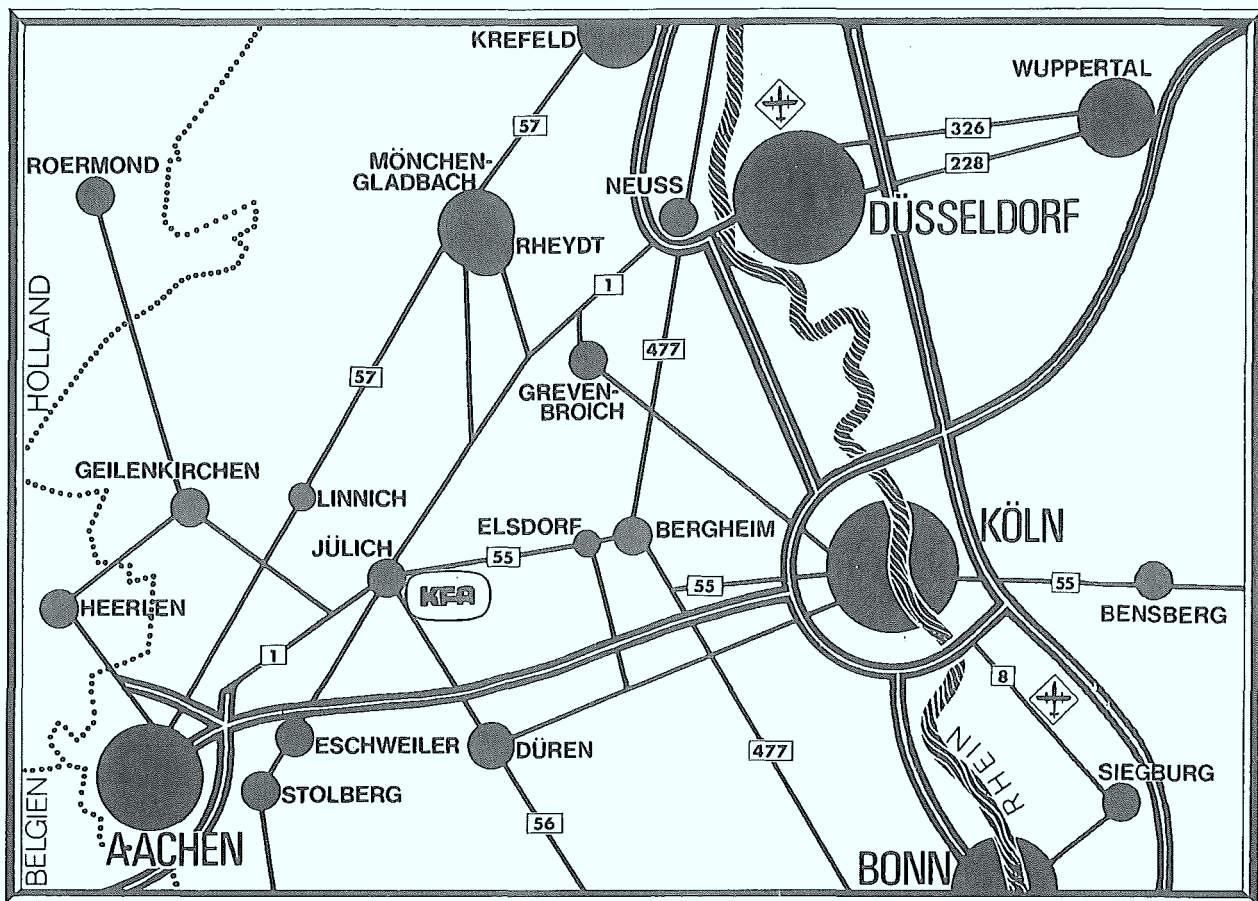
Kontinuierliche Atmungsmessungen bei E. coli

von

H. Förstel, E. Neugebauer und G. Schleser

Jül - 1130 - PC
Oktober 1974

Als Manuskript gedruckt



Berichte der Kernforschungsanlage Jülich - Nr. 1130

Institut für Physikalische Chemie Jül - 1130 - PC

Dok.: Bacteria
Culture
Respiration
Oxygen Electrode
Diauxie
Glucose Metabolism

Im Tausch zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH,
Jülich, Bundesrepublik Deutschland

Kontinuierliche Atmungsmessungen bei E. coli

von

H. Förstel, E. Neugebauer und G. Schleser

S u m m a r y :

Escherichia coli wild type is grown in a gas tight batch culture. The oxygen partial pressure is measured continuously in the liquid phase during the growth of the bacteria. The system allows the observation of rapid changes of the respiration rate. Thereby we found a diauxic respiration behavior with glucose as the only carbon source in a pure mineral salt medium. The second respiration phase is caused by a substance secreted into the medium during the uptake of glucose. The presence of glucose in the medium stops the metabolic uptake of this secretion product.

Inhaltsverzeichnis

1. Problemstellung
2. Wachstum von E. coli in Glucose-Mineralsalz-Medien
 - 2.1 Vorbemerkung
 - 2.2 Diauxie
 - 2.3 Der "Glucose-Effekt"
 - 2.4 Substanzabgabe ins Nährmedium
3. Material und Methode
 - 3.1 Material
 - 3.2 Methode
 - 3.2.1 Meßprinzip und Versuchsaufbau
 - 3.2.2 Beschreibung der einzelnen Systemteile
 - 3.2.3 Meßmethoden
 - 3.2.3.1 Bakterienzahl
 - 3.2.3.2 Glucosebestimmung
4. Atmungsmessungen von E. coli bei geringen Glucosekonzentrationen
 - 4.1 Zeitlicher Verlauf des Sauerstoffverbrauchs
 - 4.2 Abhängigkeit vom System
 - 4.2.1 Abhängigkeit von der Rührintensität
 - 4.2.2 Abhängigkeit von der Form des Kulturgefäßes
 - 4.2.3 Verhältnis von Gas- zu Flüssigkeitsphase
 - 4.3 Reproduzierbarkeit des Verfahrens
 - 4.4 Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von der Glucosekonzentration
 - 4.5 Bestimmung des Sauerstoffüberganges über die Phasengrenze
 - 4.6 Zusammenfassung
5. Messungen zur Ursache der zweiten Atmungsphase
 - 5.1 Atmungsverlauf, Wachstum und Substratverbrauch von E. coli in der Nährlösung

- 5.2 Nachweis des "Glucose-Effektes" für das verwendete System
- 5.3 Succinat als organische Kohlenstoffquelle
- 5.4 Ausscheidung von Stoffwechselprodukten während des Wachstums von E. coli mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle

- 6. Mathematische Erfassung des Sauerstoffkonzentrationsverlaufs in der Nährlösung während des Wachstums von E. coli
 - 6.1 Theoretische Beschreibung des Systems
 - 6.2 Variation wichtiger Versuchsparameter

- 7. Schlußbetrachtung
 - 7.1 Anwendbarkeit der Meßmethode
 - 7.2 Einordnung der Befunde

- 8. Literaturverzeichnis

1. Problemstellung

Wächst eine Bakterienpopulation bei konstanter Temperatur in einem abgeschlossenen Volumen, so steigt die Bakteriendichte exponentiell an. Für ihr Wachstum nehmen die Bakterien aus der Nährlösung organische und anorganische Substanzen auf. Setzt man voraus, daß die anorganischen Komponenten im Überschuß vorliegen, so wird das Wachstum durch die organische Substanz begrenzt: Es dauert nur so lange an, bis alle organische Substanz verbraucht ist. Dann bleibt die Bakteriendichte für einige Zeit konstant (statische Phase).

Eine genaue Betrachtung der Abnahme an organischer Substanz während des Aufwachsens zeigt, daß erst bei sehr geringen Substratkonzentrationen am Ende der Wachstumsphase eine Verlangsamung des Wachstums auftritt. Die Wachstumskurve, als semilogarithmische Auftragung der Bakteriendichte über der Zeit, "knickt ab". Es wird allgemein angenommen (zum Beispiel MONOD 1942), daß das Wachstum von der Nährstoffkonzentration nach der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik abhängt:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C}{K_c + C}$$

μ	= Wachstumsrate
$\mu_{\max}$	= maximale Wachstumsrate
C	= Konzentration der organischen Substanz

Die Konstante K_c ist substratspezifisch. Sie gibt an, für welche Konzentration organischer Substanz gerade die halbe maximale Wachstumsrate erreicht wird.

Die Werte für K_c liegen allgemein sehr niedrig. SCHLESER und FÖRSTEL 1972 extrapolierten aus der Wachstumskurve für *E. coli* und Glucose als Substrat ein K_c von 7,5 mg/l. Bei Versuchen muß allgemein aber mit wesentlich höheren Substratkonzentrationen gearbeitet werden, da die gebildete Biomasse und umgesetzte Substanzen unterhalb der Nachweisgrenzen biochemischer Tests liegen.

In der Arbeitsgruppe "Sauerstoffkreislauf" der KFA war es notwendig, den Sauerstoffumsatz bei Glucosekonzentrationen nahe den K_c -Werten zu messen. Einem Umsatz einer bestimmten Glucosemenge entspricht unter gegebenen Bedingungen immer der Verbrauch einer bestimmten Menge an Sauerstoff. Die WARBURG-Technik ließ nur eine Bestimmung bis ca. 100 mg Glucose/l zu. Hier wird die Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes in der abgeschlossenen Gasphase manometrisch bestimmt. Dagegen ist die Messung in der wässrigen Phase wesentlich empfindlicher. Sind in einem Liter Luft bei 20° C 258 mg O_2 enthalten, so lösen sich im gleichen Volumen Wasser unter Gleichgewichtsbedingungen 8,84 mg O_2 . Dabei kann mit geringen Sauerstoffmengen bei gleichbleibendem Partialdruck gearbeitet werden. Der Ersatz der flüssigen durch die wässrige Phase ist unerheblich, da alle Lebewesen letztlich wässrige Phasen darstellen. Schließt man die wässrige Phase ab, so können schon geringe Sauerstoffumsätze gemessen werden. Bei steigenden Nährstoffmengen und damit wachsendem Sauerstoffverbrauch wird ein steigender Anteil der Gasphase mit eingeschlossen.

Bei dieser Versuchsanordnung wird der Sauerstoff mit einer Elektrode kontinuierlich gemessen und registriert. Entscheidend für den Verlauf der Atmungskurven ist der Sauerstoffübergang von der Gas- in die flüssige Phase. Die geringe Sauerstoffnachlieferung verstärkt den Effekt. So konnte überraschend nach einem normalen "logarithmischen Wachstum" und entsprechendem Sauerstoffverbrauch bei *E. coli* mit Glucose als Substrat eine zweite Atmungsphase beobachtet werden. Ihre Größe und die Ursachen dieses Effektes sollen in dieser Arbeit untersucht werden. Die hauptsächlichste technische Schwierigkeit der Arbeit stellte die Anforderung dar, alle Versuche unter streng sterilen Bedingungen durchzuführen.

2. Wachstum von E. coli in Glucose-Mineralsalz-Medien

2.1 Vorbemerkung

Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche haben gezeigt, daß der Sauerstoffverbrauch eines (stoffwechselphysiologisch gesehen) Wildtyps von E. coli beim Wachstum mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle in zwei deutlich voneinander getrennte Abschnitte zerfällt. Solches Wachstum in zwei aufeinanderfolgenden Phasen, allgemein mit einer Ruheperiode dazwischen, wird seit MONOD 1942 als Diauxie bezeichnet. Dabei werden diese beiden Wachstumsphasen aber durch zwei verschiedene Substanzen in der Nährlösung hervorgerufen, während in diesen Versuchen nur eine Substanz ins System eingegeben wurde. Da nun der Wachstumsverlauf einer Diauxie beobachtet wird, kann dies nach ersten Überlegungen nur bedeuten, daß während des Glucosestoffwechsels mindestens eine zweite Substanz produziert wird. Diese Substanz wird ins Medium abgegeben und erst nach dem Verbrauch der Glucose im Stoffwechsel umgesetzt. Die Bevorzugung der Glucose im Stoffwechsel, nicht nur bei E. coli, wurde seit EPPS und GALE 1942 als Glucose-Effekt beschrieben und hat zu erfolgreichen molekularbiologischen Arbeiten über den Transport durch die Bakterienmembran und die Stoffwechselregulation veranlaßt. Diese Arbeit kann hierzu kaum etwas beitragen. Dennoch sollte der derzeitige Wissensstand über die regulatorische Funktion der Glucose im Stoffwechsel nach einem Überblick über Arbeiten zur Diauxie kurz dargestellt werden, da diese Kenntnisse zur Auswertung der Befunde beitragen können.

Nach der Darstellung des Glucose-Effektes soll noch kurz berichtet werden, was in der Literatur über die Ausscheidung und Speicherung organischer Substanzen durch E. coli und verwandte Mikroorganismen unter aeroben Bedingungen zu finden ist. Eine intensive Suche wurde deshalb durchgeführt, da der Effekt als allgemein bekannt angenommen wurde. Verschiedene Arbeiten brachten zwar Anregungen, doch konnten erklärende

Befunde nicht erhalten werden. Auf die Literatur vor MONOD 1942 wurde nicht zurückgegriffen, da die Ergebnisse für die Zwecke dieser Arbeit nur schwer zu interpretieren waren.

2.2 Diauxie

MONOD 1942 hat systematisch untersucht, wann in einem Mineral-salzmedium Mikroorganismen auf zwei verschiedene Kohlenstoff-quellen mit zwei aufeinanderfolgenden, allgemein durch eine lag-Phase getrennten Wachstumsphasen, reagieren. PAIGEN und WILLIAMS 1970 bezeichnen nur dann aufeinanderfolgenden Substratverbrauch als Diauxie, wenn beide Wachstumsperioden durch eine lag-Phase getrennt werden. Die Ausprägung der lag-Phase kann allerdings von der Inkubation vor dem Versuch abhängen und durch tiefere Temperaturen verhindert werden (STUMM-ZOLLINGER 1966). So erscheint es als wenig sinnvoll, die Ausprägung der lag-Phase in die Definition aufzunehmen. Allgemein tritt Diauxie bei Zugabe zweier Kohlenhydrate auf. Dabei wird sehr häufig Glucose zuerst verbraucht. So ist es bemerkenswert, wenn *Pseudomonas aeruginosa* Succinat, Citrat, Malat und Fumarat vor der Glucose verbraucht (HAMILTON und DAWES 1972). Am besten bekannt ist die Glucose-Galactose-Diauxie (LOOMIS und MAGASANIK 1967, MAGASANIK 1970) bei *E. coli*. Untersucht wurden in neuerer Zeit eine Glucose-Succinat-Diauxie bei *E. coli* (RUIZ-HERRERA und GARCIA 1972) und eine Glucose-Citrat-Diauxie bei *Salmonella typhimurium* (ENGELSBERG, WATSON und HOFFEE 1961). STUMM-ZOLLINGER 1966 hat die Diauxie sogar für Mischpopulationen aus Klärwerkschlamm beobachtet.

Sie konnte dabei dreierlei Verhalten der Mischpopulation gegenüber zwei Kohlenstoffquellen feststellen. Einmal wurden Glucose und Benzoat gleichzeitig aufgenommen. Im zweiten Fall hemmte Glucose, solange sie noch in der Nährlösung anwesend war, die Verwertung der Galactose. Dabei wurden die Galactose-abbauenden Enzyme zwar induziert, aber durch die Glucose gehemmt. Das war daran zu erkennen, daß keine lag-Phase nach dem Glucoseverbrauch auftrat. Im dritten Fall, der Zugabe von

Glucose und L-Phenylalanin, wurde eine Repression der Enzyme des L-Phenylalanin-Stoffwechsels in Anwesenheit von Glucose beobachtet. Beide Wachstumsphasen waren durch eine Induktionsphase getrennt.

In den beiden beschriebenen Fällen der Diauxie hemmt Glucose konkurrierende Stoffwechselwege. Da die Glucose diese Hemmwirkungen bei vielen Mikroorganismen sehr ausgeprägt zeigt und die Effekte mit Glucose zuerst und später am ausführlichsten damit untersucht worden sind, wurde lange Zeit vom Glucose-Effekt gesprochen. Der Effekt, wie ihn die Glucose zeigt, wird auch nach Zugabe von anderen Substanzen beobachtet (zum Beispiel Mannitol, MAGASANIK 1961), doch wird sich die kurze Übersicht im folgenden auf die Glucose konzentrieren.

2.3 Der "Glucose-Effekt"

Der Glucose-Effekt wurde 1942 von EPPS und GALE erstmals beschrieben. Sie beobachteten, daß Glucose die Bildung von Aminosäuredeaminasen hemmt. Weitere Hemmungen sind inzwischen bekannt geworden. Sie sind reversibel (MOSES und PREVOST 1966).

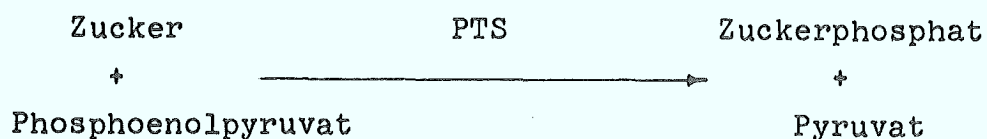
Der biologische Sinn der Glucose-Hemmung wird verständlich, wenn man die geringen Abmessungen einer Bakterienzelle bedenkt. Die Bakterienzelle hat dadurch den Vorteil, daß bei fehlenden Transportprozessen im Inneren jeder Teil des Organismus schnell durch Diffusion versorgt werden kann. Andererseits aber ist die Zahl der Eiweißmoleküle, also auch die Zahl der Enzymmoleküle begrenzt. Werden Enzyme eines wenig effektiven Stoffwechselweges gebildet, so ist dies nur auf Kosten anderer Enzyme möglich.

Es ist ein Selektionsvorteil, wenn eine Bakterie mit möglichst geringstem Aufwand um die Kohlenstoff- und Energiequelle konkurrieren kann (DAVIS 1961). Schon 1950 haben SIEGEL und CLIFTON gemessen, daß der Kohlenstoff der Glucose schnell in das Zellmaterial von *E. coli* eingebaut wird. Über die Abbau-

wege werden in kürzester Zeit alle Bausteine für Synthesen bereitgestellt. GRAY, WIMPENNY und MOSSMAN 1966 fanden zwar eine Repression der Zitronensäurezyklus-Enzyme bei *E. coli* in Nährmedien, die mehrere verschiedene organische Substanzen enthielten, doch wurden diese Enzymaktivitäten in einem reinen Mineralsalzmedium mit Glucose erhöht. Die Abbauwege der Glucose können über allosterische Effekte der Enzyme und Konkurrenz um Substrate und Kofaktoren für die Zelle optimal gesteuert werden (HOLZER 1961, MACNAB, MOSES und MOWBRAY 1973). In den Fällen, in denen neben der Glucose eine weitere Substanz aufgenommen werden muß, um die Zellsubstanz aufzubauen, kann der Glucose-Effekt hinderlich sein. Er wird dann aufgehoben. Als Beispiel seien NEIDHARDT und MAGASANIK 1957 zitiert: Bei *Aerobacter aerogenes* wird die Histidaserepression durch Glucose aufgehoben, wenn Histidin die einzige Stickstoffquelle im Nährmedium ist.

Die Klärung der molekularbiologischen Grundlagen hat wesentlich zum Verständnis der Stoffwechselregulation bei Bakterien beigetragen. Die Regulationsmechanismen setzen bereits bei der Aufnahme in die Zelle während des Transports über die Membran ein. MCGINNES und PAIGEN 1973 konnten zeigen, daß der Transportschritt der Glucose selbst bereits die Glucose-hemmung auslöst. Intrazellulär gebildete Glucose (aus Lactose) hat einen ungleich schwächeren Effekt. Bei *Salmonella typhimurium* wurde eine Mutante gefunden, die Glucose nicht mehr verarbeiten, sondern nur noch transportieren kann. Dennoch hemmt Glucose die Verwertung von Citrat (ENGELSBERG 1959). Da das Glucosetransportsystem bei *E. coli* konstitutiv ist (OXENDER 1972), kann zugegebene Glucose ohne längere lag-Phase wirken. PARDEE und PRESTIDGE 1961 fanden, daß es etwa fünf Minuten dauert, bis der Inhibitor die m-RNA-Synthese umgelenkt hat. Bei *Pseudomonas aeruginosa* ist das Glucosetransportsystem nicht konstitutiv, sondern induzierbar (NG und DAWES 1973). Bei einem Diauxiewachstum wird erst das Citrat, dann die Glucose verbraucht.

Glucose wird über ein Phosphotransferase-System (PTS-System) in die Zelle transportiert:



Das PTS-System ist nicht auf *E. coli* beschränkt. Z. B. bei *Staphylococcus aureus* arbeitet das Transportsystem wie bei *E. coli*. Die Phosphorylierung von Zuckern beim Transport ist dabei schon längere Zeit bekannt gewesen (HENGSTENBERG, EGAN und MORSE 1968). Das PTS-System besteht aus vier Proteinen. Davon ist das eine membrangebundene Enzym eines der beiden zucker-spezifischen Proteine (ROSEMAN 1972). Wird dem intakten PTS-System Glucose angeboten, so werden andere Enzyme gehemmt oder repressiert. Die Hemmwirkung kann eine Inaktivierung ("inhibition") oder eine Verminderung der Enzymsynthese ("repression") sein. Eine Übersicht findet man bei MAGASANIK 1970. PASTAN, PERLMAN 1969 beschreiben die Repression der β -Galactosidase bei *E. coli*. LOOMIS und MAGASANIK 1967 beobachteten, daß bei der Glucose-Lactose-Diauxie die Ausprägung des lag-Operons verhindert wird. Dieser Vorgang wird als "catabolite repression" (zum Beispiel MAGASANIK 1961, MAAS und McFALL 1964) bezeichnet: Ein Metabolit hemmt die Synthese eines oder mehrerer Enzyme. Es kann aber auch das Enzym nur inaktiviert werden (BOEZI und MOSS 1961, Tryptophan-Transport). Dann spricht man von "catabolite inhibition" (zum Beispiel MAAS und McFALL 1964, MCGINNES, PAIGEN 1966). Bestimmte Autoren unterscheiden noch einen ungefähr zwanzig Minuten andauernden starken Hemmeffekt nach Glucosezugabe ("transient repression") (PAIGEN und WILLIAMS 1970, PASTAN und PERLMAN 1970). Diese Hemmung der Produktion der Aktivität anderer Enzyme ist verantwortlich für die Diauxie. Zuerst wird Glucose verbraucht. Beim Transport in die Zelle werden andere Enzyme gehemmt oder repressiert. Werden die Enzyme nur inaktiviert, tritt kaum eine lag-Phase nach dem Glucoseverbrauch auf. Wurde die Enzymsynthese anderer Stoffwechselwege repressiert, ist eine Induktions- und Synthesephase notwendig.

Als molekulare Ursachen des Glucose-Effektes werden zwei Mechanismen diskutiert. Einmal soll das aktive Glucosetransportsystem den Induktor ausschließen (SAIER und ROSEMAN 1971, ROSEMAN 1972). Das Enzymsystem der anderen Kohlenstoffquelle kann nicht induziert werden. Zum anderen ist nach Zugabe von Glucose ein Ausstrom von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zu beobachten (MAKMAN und SUTHERLAND 1965, MOSES und SHARP 1972). Eine hohe cAMP-Konzentration ist aber zur Enzyminduktion notwendig. MOSES und SHARP 1970 haben eine deutliche Änderung des Proteinbestandes der E. coli-Zellen durch cAMP beobachtet. cAMP erhöht bei E. coli die β -Galactosidase-Synthese nach einer lag-Zeit von vier Minuten (PERLMAN und PASTAN 1968). Ebenso hebt cAMP in intakten oder mit EDTA/Tris permeabel gemachten Zellen die Glucoserepression auf (PERLMAN und PASTAN 1968, DE CROMBRUGGHE, PERLMAN, VARMUS und PASTAN 1969). Der cAMP-Gehalt in E. coli-Zellen ist der Außenkonzentration an Glucose umgekehrt proportional (MAKMAN und SUTHERLAND 1965). Er steigt mit dem Verbrauch der Glucose aus dem Nährmedium im Laufe des Wachstums an (PETERKOFISKY und GAZDAR 1971).

Das cAMP ist bereits eine Substanz, deren Außenkonzentration den Stoffwechsel bei E. coli reguliert. Es ist auch denkbar, daß während des Wachstums von E. coli entweder Substanzen ins Nährmedium sekretiert werden oder ein großer Stoffwechselpool Substanz durch ein Leck aus dem Zellinneren verliert.

2.4 Substanzabgabe ins Nährmedium

Dem Techniker sind eine größere Zahl biologischer Verfahren zur Substanzproduktion bekannt. Die Alkohol- und Milchsäuregärung sind wohl die ältesten Verfahren. Allgemein treten besonders bei Fermentationen der anaerob ablaufenden Stoffwechselwege Substanzen ins Außenmedium über. Da die Versuche dieser Arbeit unter aeroben Verhältnissen durchgeführt wurden, bringt das Studium von Fermentationen nur wenig Information und wird hier nicht dargestellt. Für E. coli ist bekannt (THOMAS, DÖLLE, WESTWOOD und GORDON 1972), daß sie bei Sauerstoffmangel Lactat

produzieren und abgeben. *Azotobacter vinelandii* gibt erst unter anaeroben Verhältnissen Produkte aus dem Citronensäurezyklus in nennenswerten Mengen ins Außenmedium ab (POSTMA, COOL, VAN DAM 1973).

Unter aeroben Verhältnissen gibt *Azotobacter vinelandii* nur wenig Metaboliten aus den intrazellulären Pools ab. *Spirochaeta aurantia* dagegen oxidiert Glucose nur sehr unvollständig und gibt trotz eines Einbaus von der Hälfte homogen markierter ^{14}C -Glucose in die Zelle noch Acetat, Pyruvat und Lactat ab (BREZNAK, CANALE-PAROLA 1972). Auch bei *E. coli* gibt es Hinweise auf eine Säureproduktion (ECKER und LOCKHART 1961, MCGINNES und PAIGEN 1966, CAVART, AVI-DOR, GROSSOWICZ 1968). *Bacillus subtilis* scheidet Pyruvat, Acetat, Acetoin, Butanediol, Isobutyrat und Isovalerat aus (SPECK und FREESE 1973). LUND und WYATT 1972 fanden, daß mit Rübenzucker wachsende *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* Disaccharide ausscheidet. GOGOLEVA, GRECHUSHKINA und EGOROV 1973 beschreiben die Abgabe von sauren Polysacchariden durch *Mycobacterium lacticolum*. SILBERT, COHEN und HARDER 1972 fanden, daß *E. coli* vier Prozent der synthetisierten Fettsäuren ins Medium abgibt. Ein Sonderfall dürfte die Ausscheidung von Membranbestandteilen sein, wie sie ROTHFIELD und PEARLMAN-KOTHENCZ 1969 bei *Salmonella typhimurium* und *E. coli* unter Eiweißmangelbedingungen fanden.

Über Ausscheidungen, die nach dem Verbrauch des eingesetzten Substrats im Stoffwechsel umgesetzt werden, ist nur wenig Literatur zu finden. DEGN, LILLEØR und IVERSEN 1973 haben die Atmung von *Klebsiella aerogenes* kontinuierlich verfolgt und finden gleich mehrere sprungartige Änderungen der Atmungsrate nach dem Verbrauch des eingesetzten Substrats. Sie deuten dies als aufeinanderfolgende Erschöpfung mehrerer Stoffwechsel-pools. Es wurden allerdings ruhende Zellen benutzt, da die Meßmethode eine konstante Sauerstoffverbrauchsrate im Meßvolumen voraussetzt. HADJIPETROU, GERRITS, TEULINGS und STOUTHAMER 1964 haben bei *Aerobacter aerogenes* eine Acetatanhäufung bis zum Aufbruch der Glucose und dem Ende der Wachstumsphase beobachtet. Ist die Glucose erschöpft, so wird das Acetat

ohne Biomasseproduktion veratmet. Dieser Befund der Glucose-Acetat-Aufeinanderfolge im Sinne einer Diauxie, wobei auch hier nur Glucose als ein Substrat eingesetzt wurde, kann als Modell für die Deutung der Befunde dieser Arbeit dienen.

Daß vor allem Stoffwechselzwischenprodukte (wie Pyruvat) ausgeschieden werden, ist wenig überraschend, wenn man den raschen Austausch von Substanzen im Stoffpool des Zellinneren mit dem Nährmedium betrachtet. Versuche mit ^{32}P -markiertem Phosphat zeigten ein großes Leck für alle Zuckerphosphate (MOSES und SHARP 1972). Der Aminosäurepool der Zelle tauscht innerhalb von Minuten mit Aminosäuren im Medium aus (BRITTEN, McLURE 1962). PIPERNO und OXENDER 1968 haben einen raschen Austausch intra- und extrazellulärer Aminosäuren bei *E. coli* beobachtet. Gibt man radioaktiv markiertes L-Glyzerophosphat ins Zuchtmedium von *E. coli*, so wird es tausendfach angereichert. Zentrifugiert man diese Zellen ab, wäscht sie und suspendiert sie in einem Medium mit inaktiver Verbindung, so wird die radioaktive Anreicherung in den Zellen sofort verdünnt (HAYASHI, KOCH und LIN 1964). Eine Abgabe von Stoffwechselzwischenprodukten und Aufnahme nach Erschöpfung der Glucose erscheint nach den aus der Literatur bekannten Fakten über den intensiven Stoffaustausch der Mikroorganismenzellen mit dem Medium denkbar.

Ebenso könnte eine in den Zellen gespeicherte Substanz aufgebraucht werden. *E. coli* speichert bis zu sechs Prozent ihres Trockengewichtes Kohlenhydrate (DAWES und RIBBONS 1962). Dabei wird gerade während des Wachstums von *E. coli* in einem Glucose-Mineralsalz-Medium Polysaccharid intrazellulär gespeichert und in der statischen Phase verbraucht (DAGLEY und DAWES 1949).

Die Klärung der Frage, ob die in dieser Arbeit beschriebene zweite Atmungsphase durch eine oder mehrere Substanzen aus den inneren Speichern der Zelle oder aber durch vorher abgegebene Stoffwechselprodukte aus dem Außenmedium verursacht wird, ist für das Verständnis der Befunde dieser Arbeit eine zentrale Frage.

3. Material und Methode

3.1 Material

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein E. coli-Stamm K12 Y mel λ -lysogen von Herrn Dr. Schairer aus dem Institut für Genetik der Universität Köln benutzt. Die Bakterien wurden als Ausstrich auf einer Platte geliefert und bei 37° C einen Tag lang bebrütet. Anschließend wurden die Bakterien auf ein Schrägagar-Röhrchen (Standard-II Nähragar Merck 7885) überimpft. Die bebrüteten Röhrchen wurden bei 4° C aufbewahrt und regelmäßig überimpft.

Um zu gewährleisten, daß stets dasselbe biologische Material vorlag, wurden bei allen Versuchen, nicht nur beim Überimpfen der Stammkulturen, mehrere Tests auf Identität und Reinheit durchgeführt:

1. Mikroskopische Untersuchung von Form und Größe der Bakterien nach Hitzefixierung und Methylenblaufärbung nach HARRIGAN und McCANCE 1966.
2. ENDO-Platten als Identitäts- und Reinheitstests (Fuchsin-Laktose-Agar nach ENDO, Merck 4044): E. coli-Kolonien entwickelten einen Fuchsinglanz.
3. Erst die positiven Ergebnisse aller Tests der "bunten Reihe" nach KNOTHE, SEELIGER, DÖLL und WIEDEMANN 1969 sowie SCHLESER und FÖRSTEL 1972 beweisen die Identität der Bakterien. Damit werden die biochemischen Synthesefähigkeiten getestet. Wicht auch nur einer der Tests vom für E. coli charakteristischen Ergebnis ab, so wurde das Experiment nicht gewertet.

Für alle Untersuchungen wurden Nährlösungen benutzt, deren mineralische Komponenten gleich waren. Sie unterschieden sich, je nach Problemstellung für den jeweiligen Versuch, in der Kohlenstoffquelle und deren Konzentration. Beim Ansetzen der Nährlösung war darauf zu achten, daß das $Mg Cl_2$ erst nach vollständiger Lösung aller anderen Komponenten zugegeben werden

konnte, da sich sonst ein weißer, schwerlöslicher Niederschlag von Phosphat bildete.

Mineralische Bestandteile der Nährlösungen:

KCl	2,237 g
Mg Cl ₂ · 6 H ₂ O	0,203 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	16,020 g
Na H ₂ PO ₄ · H ₂ O	4,114 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,980 g

destilliertes Wasser auf tausend Milliliter.

Als organische Kohlenstoffquelle wurde im ersten Teil der Arbeit Glucose (Merck 8342 D(+)-Glucose Monohydrat für biologische und mikrobiologische Zwecke) eingesetzt. Aus praktischen Gründen wurden glatte Glucosemengen eingewogen. Für alle Konzentrations- und Mengenangaben wurde das Hydratwasser berücksichtigt. Es brauchte am Ende keine pH-Korrektur durchgeführt zu werden. Ein pH-Wert von 7,17 stellte sich ein und blieb während der Atmungsversuche aufgrund der geringen Glucosekonzentration (zwanzig bis hundert Milligramm pro Liter) erhalten. Erst wenn der pH-Wert während des Wachstums unter pH 6 sinkt, wird das Wachstum beeinflusst.

Die Sterilisation im Autoklaven mit überspanntem Wasserdampf (1 atü, 120° C) führte bisweilen zu Ausfällungen und zu Zersetzungen der Nährstoffe, was am Verfärben der Lösung gesehen werden konnte. Da die Glucosekonzentrationen an sich schon gering waren, die Ergebnisse reproduzierbar sein sollten und vor allem nur eine Nährsubstanz in der Lösung vorkommen durfte, mußte ohne Erhitzung gearbeitet werden. Es wurde ein Papierplattenfilter der Firma Seitz, Sorte EKS, benutzt. Das Filter lag auf einer Lochplatte als Verstärkung zwischen zwei verschraubbaren Stahlplatten. Die unsterile Nährlösung wurde aus einem Druckkessel mit drei atü Luftdruck durch das Plattenfilter gepreßt. Die filtrierte, danach sterile Nährlösung wurde in einem geeichten Meßgefäß gesammelt. Meßgefäß und Filter

wurden vorher im Autoklaven mit Wasserdampf bei einem atü und 120°C eine Stunde sterilisiert.

Zur Überprüfung der Sterilität der Nährlösung, bzw. des abgeschlossenen ganzen Systems, wurde, wie in Punkt 3.2 beschrieben, der Sauerstoffgehalt in der nicht angeimpften Nährlösung mittels einer Sauerstoffelektrode über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen. Es war dabei keine Abnahme feststellbar. Außerdem konnte keine Trübung festgestellt werden.

Ziel der Arbeit war es unter anderem, alle Parameter festzulegen, die zu einer genauen Reproduzierbarkeit der Atmungskurven, wie in 3.2 beschrieben, führen. Zu diesen Parametern gehörte auch, daß sich *E. coli* immer im gleichen Wachstumsstadium und Alter befand, bevor sie in den Versuch eingeimpft wurde.

Es wurden auf Schrägagar angewachsene *E. coli*-Kulturen in einer sterilen Nährlösung mit 455 Milligramm Glucose je Liter bei 37°C und dreißig Prozent Schüttelintensität (HFL-Schüttelbad) angezogen. Dabei hatte die Schüttelintensität einen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum der Kultur. Mit geringerer Schüttelintensität wurde sicherlich die Sauerstoffversorgung für die Bakterien schlechter. Es wurde außerdem eine Verklumpung der Bakterien zu größeren Einheiten festgestellt. Das Wachstum wurde mit Hilfe von Trübungsmessungen verfolgt. Befand sich die Kultur ungefähr drei bis vier Stunden in der statischen Phase, so wurden von dieser Bakterienkultur vier Milliliter in eine neue Nährlösung, die ebenfalls 455 Milligramm Glucose je Liter enthielt, steril überimpft. Das Wachstum, das unter den gleichen Bedingungen erfolgte, wurde erneut als Trübung verfolgt. Durch das nochmalige Überimpfen sollte die lag-Phase verkürzt werden. Die lag-Phase, die Phase der Enzyminduktion, ist nur schwer zu reproduzieren.

Aus der graphischen Darstellung der Wachstumskurve wurde als weiteres Kriterium für die Identität der *E. coli*-Bakterien die Generationszeit zu 61 ± 3 min bestimmt.

Während des Wachstums wurde der Gehalt an Glucose in der Nährlösung verfolgt. Dabei ergab sich, daß der Glucosegehalt ab fünf Stunden unter der Nachweisgrenze liegt (s. 3.2.3.2).

Um sicher zu gehen, daß mit dem Impfmateriail in den Versuch keine Glucose mehr eingeschleppt wurde, ist ein Milliliter Bakteriensuspension erst nach 6 1/2 Stunden aus der Kultur entnommen, vor dem Einimpfen mit Phosphatpuffer pH 7,0 (steril), 1 : 10 verdünnt und gut durchgeschüttelt worden. Diese Bakteriensuspension, die ungefähr 50 000 Bakterien je Milliliter enthielt, wurde zum Einimpfen in den Versuch verwendet.

Zusammensetzung des Phosphatpuffers:

0,5 g	K_2HPO_4
0,5 g	KH_2PO_4

auf 1000 ml destilliertem Wasser.

Eine pH-Korrektur war nicht nötig. Der Puffer wurde vor der Verwendung sterilisiert.

Zum Einimpfen wurde ein Milliliter der hergestellten Bakteriensuspension verwendet. Durch die Verdünnung von 10^4 sind Glucose oder deren Stoffwechselprodukte als mögliche Störquellen soweit reduziert worden, daß sie den Versuch nicht beeinflussen können. Auch die eingetragene Biomasse von $5 \cdot 10^4$ Bakterien ist gegenüber $4 \cdot 10^7$ am Ende des Versuchs vernachlässigbar. Die zweite Atmungsphase ist in keinem Fall auf eingeschlepptes Material zurückzuführen.

3.2 Methode

3.2.1 Meßprinzip und Versuchsaufbau

Um den Sauerstoffverbrauch einer wachsenden Bakterienpopulation zu verfolgen, ist in einem abgeschlossenen Volumen gearbeitet worden. Bei der Zugabe der organischen Substanz wird davon ausgegangen, daß zum Umsatz einer bestimmten Glucosemenge eine

bestimmte Menge an Sauerstoff verbraucht wird. Wenn man annimmt, daß alle Glucose veratmet wird, so verbraucht ein Milligramm Glucose 0,75 Milliliter Sauerstoff. Danach wird das System jeweils angesetzt: In der Meßzelle muß das Luftpilster so groß sein, daß die eingeschlossene Sauerstoffmenge für den Glucoseumsatz ausreicht.

Das vorliegende abgeschlossene System stellt mikrobiologisch gesehen eine statische Kultur (batch-Kultur) dar. Man muß in Kauf nehmen, daß sich in einer solchen batch-Kultur die Kulturbedingungen laufend ändern.

Das Meßverfahren beruht darauf, daß man ein abgeschlossenes System zweier Phasen benutzt. Luft stellt die Gasphase dar, die gerührte Nährlösung die flüssige Phase. In der wässrigen Phase ist Sauerstoff nur in geringer Konzentration löslich: bei 37° C zu 6,8 Milligramm je Liter (luftgesättigt). Deshalb wird in der wässrigen Phase gemessen. Ohne Nachlieferung des Sauerstoffs aus der Gasphase können bereits geringe Sauerstoffumsätze gemessen werden. Es ist aber immer darauf zu achten, daß die Sauerstoffkonzentration in der Nährlösung nicht zu stark absinkt oder gar gegen null Milligramm O₂ Liter geht. Dann können anaerobe Verhältnisse auftreten und das Ergebnis verfälschen. Dazu muß bekannt sein, bis zu welchen Gehalten der Sauerstoff absinken darf, ehe die Stoffwechselintensität beeinflußt wird. Dieser Wert, der kritische Sauerstoffpartialdruck, liegt aber allgemein sehr tief (KOBAYACHI, KEYAMA 1973), unter 0,6 Milligramm O₂ je Liter. Erst dann wird die Sauerstoffaufnahme verringert. Das weist auf die Sättigung eines Transportmechanismus oder eines Akzeptorsystems beim biochemischen Umsatz hin.

Bei der Versuchsanordnung wird angestrebt, daß sich der Sauerstoff nicht im Lösungsgleichgewicht befindet. Die Lösung wird so gerührt, daß die Sauerstoffverbrauchsrate der Mikroorganismen in der Nährlösung größer ist als die über die Phasengrenze aus der Gasphase nachgelieferte Sauerstoffmenge pro Zeit. Man mißt nicht, wie bei einem System im ständigen Gleichgewicht,

nur geringfügige Änderungen in der Steigerung einer Konzentrationskurve über die Zeit, sondern diese Änderungen werden durch die Versuchsanordnung verstärkt. Sinkt zum Beispiel die Sauerstoffverbrauchsrate unter die Nachlieferung aus der Gasphase in die Lösung, so wird sich die in der Nährlösung gemessene Sauerstoffkonzentration wieder vergrößern. Wird die Atmung gestoppt, so bleibt der Sauerstoffgehalt nicht konstant, sondern er ändert sich solange, bis sich das Gleichgewicht entsprechend der noch vorhandenen Menge an Sauerstoff eingestellt hat.

Ein wesentlicher Vorteil dieses Systems ist es, daß der Aufwand gering, das System aber leicht beschreibbar ist. Auf eine automatische Sauerstoffdosierung kann verzichtet werden. Ein Problem stellt die Konstanz des Rührens dar. Der Übergang über die Phasengrenze sollte für quantitative Messungen genau bekannt sein.

Gemessen wird der Sauerstoffgehalt in der Nährlösung mit einer Elektrode. Das Rühren geschieht mit einem Magnetrührer. Es dient nicht nur der Sauerstoffversorgung, sondern bewirkt auch die Entfernung von Stoffwechselgasen aus der Kultur, vor allem des CO_2 . Das CO_2 wurde mit 10 %-iger Kalilauge absorbiert. Bei hohen Glucosekonzentrationen entsteht entsprechend viel CO_2 . Es muß absorbiert werden, weil das gelöste CO_2 den pH-Wert der Lösung verändert.

Die Messungen werden bei der für *Escherichia coli* üblichen Temperatur von 37°C ($\pm 0,5^\circ \text{C}$) durchgeführt. Die Temperatur wird mit einem Thermostaten aufrecht erhalten.

In der folgenden Abbildung (Abb. 3.1) wird das benutzte Meßsystem schematisch dargestellt.

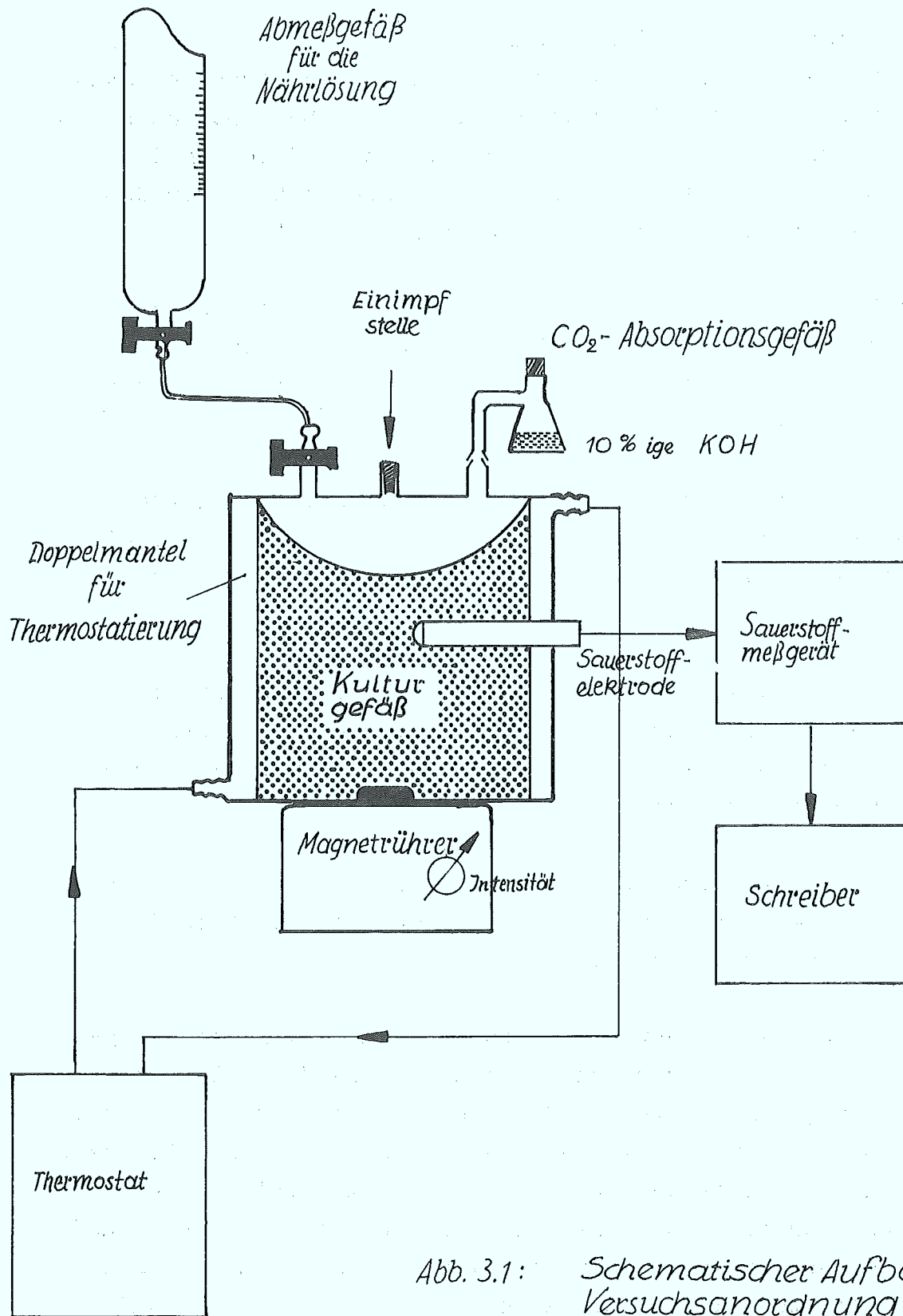


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau der Versuchsanordnung zur Messung von Änderungen des Sauerstoffverbrauchs statischer Bakterienkulturen.

3.2.2 Beschreibung der einzelnen Systemteile

Es wurde eine Sauerstoffelektrode EO 16 der Firma WTW, Weilheim, für die Versuche verwendet. Die Elektrode arbeitet nach dem Clark-System. Die Meßzelle der Elektrode besteht aus einem Elektrodensystem Silberanode-Kaliumchloridgel-Goldkathode, das durch eine sauerstoffdurchlässige Folienmembran von dem zu messenden Medium mechanisch abgeschlossen ist.

Bei der Reaktion wird der Sauerstoff in der unmittelbaren Membranumgebung "aufgezehrt". Deshalb muß die Lösung mit einer Geschwindigkeit von mindestens 50 cm/s gerührt werden. Das war bei allen Versuchen gewährleistet.

In einem Vorversuch wurde die Drift der Elektrode bei konstantem Sauerstoffgehalt einen Tag lang verfolgt. Der Abfall ist sehr gering und wurde in allen vorgenommenen Versuchen vernachlässigt.

Die Elektrode wurde gemäß der Firmenvorschrift mit einer Null-Lösung (drei Prozent Natriumsulfitlösung, erst zwei Stunden nach dem Lösen benutzen) und luftdurchperlttem, temperiertem Wasser geeicht.

Ein besonderes Problem stellte die Sterilisation der Elektrode dar. Es ist heute noch nicht befriedigend gelöst, besonders für technische Anwendungen.

Ein Sterilisieren in der Hitze des Autoklaven war nicht möglich, da durch freiwerdenden Wasserdampf aus der Gelschicht die Membran gesprengt wurde. Dickere Membranen (z. B. Teflon) konnten nicht verwendet werden, da die Ansprechempfindlichkeit zurückgeht und damit der zweite Atmungsspeak ausbleibt. Die Folie muß dünn sein, um eine schnelle Sauerstoffdiffusion und damit ein rasches Ansprechen der Elektrode auf Schwankungen zu gewährleisten. In der Hitze zeigten sich außerdem Schädigungen durch starke Verformung des Plastikmaterials der Elektrode.

Die Sterilisation wurde aus diesen Gründen mit einer hochkonzentrierten (neunzig bis hundert Prozent) Sagrotanlösung vorgenommen. Die Elektrode wurde über Nacht in Sagrotanlösung gehängt. Es wurde festgestellt, daß eine Sterilisationsdauer von mindestens zwölf Stunden erforderlich ist.

Störungen der Elektrode ergaben sich dann, wenn sie längere Zeit in Natriumsulfitlösung (Null-Lösung) aufbewahrt und anschließend sterilisiert wurde. Die Gelschicht verfärbte sich braun. Bei der anschließenden Sauerstoffmessung wurden ein Zittern des Schriebes und ungenaue Anzeige am Meßgerät festgestellt. Das Membran-Gel-System mußte erneuert werden.

Der Zellenstrom der O_2 -Elektrode wurde in einem Sauerstoffmeßgerät OXI 39 der Firma WTW, Weilheim, verstärkt und durch ein Anzeigeinstrument sichtbar gemacht. Das Instrument kann direkt in Sauerstoffpartialdruck bzw. da dieser bei konstanter Temperatur der gelösten Sauerstoffmenge proportional ist, in Milligramm O_2/l Wasser geeicht werden. Für die vorliegenden Versuche wurde ein Meßbereich von null bis zehn Milligramm O_2/l eingestellt.

Dem linear geeichten Anzeigeinstrument des Sauerstoffmeßgerätes ist ein Kompensationsschreiber parallel geschaltet und auf maximalen Ausschlag geeicht. Da alle Messungen bei $37^{\circ} C$ durchgeführt wurden und ein Maximalwert von 6,86 Milligramm O_2/l zu erwarten war, wurden deshalb am Schreiber als obere Grenze sieben Milligramm O_2/l , als untere null Milligramm O_2/l eingestellt. Man hatte damit die Atmungskurve der Bakterien maximal gespreizt.

Das Kulturgefäß besteht aus einem doppelwandigen Glasbehälter von 950 Milliliter Volumeninhalt. Seitlich ist eine Quick-fit-Schraubverbindung für die Sauerstoffelektrode angebracht. Am Kopf des Gefäßes befindet sich in der Mitte eine Öffnung zum Einimpfen und zur Probenentnahme. Die Öffnung ist während des Versuches mit einem Gummistopfen verschlossen. Seitlich davon sitzt ein Kugelschiff mit einem kleinen Glasgefäß zur Absorp-

tion von CO_2 . Durch einen Hahn mit angeschlossenen Schlauch wird die sterile Nährlösung aus dem Meßgefäß eingefüllt. Das Meßgefäß besteht aus einem geeichten Glasbehälter mit zwei Hähnen am oberen und unteren Ende und einer Entlüftung.

Das Kulturgefäß wird ohne Elektrode und CO_2 -Absorptionsgefäß im Autoklaven sterilisiert. Das CO_2 -Absorptionsgefäß wird getrennt sterilisiert und erst dann mit dem Kulturgefäß steril verbunden, wenn sich das System im Gleichgewicht befindet. Bis zur Einstellung des Gleichgewichtszustandes ist diese Öffnung mit Watte und Aluminiumfolie abgedeckt, ebenso die Schlauchverbindung zum Meßgefäß für die Nährlösung. Vor dem Einsetzen der Sauerstoffelektrode in das Kulturgefäß wird diese zweimal gründlich mit sterilem destilliertem Wasser gespült, um das Sagrotan weitgehend zu entfernen. Eventuell noch vorhandene geringe Restmengen stören nicht. Beim Einsetzen wird die Öffnung, die während der Sterilisation ebenfalls mit Aluminiumfolie abgedeckt war, mit einer Bunsenflamme abgeflammt. Die Elektrode wird vorsichtig eingesetzt und fest verschraubt. Jetzt wird die Nährlösung über die Hahnöffnung eingefüllt.

Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur ist das doppelwandige Kulturgefäß mit einem Thermostaten verbunden. Die Temperatur ist auf 37°C eingestellt.

Die Durchmischung der Kultur und somit eine homogene Verteilung von Nährlösung und Sauerstoff wird mit einem Magnetrührer durchgeführt. Der Magnetrührer bietet zwei Vorteile gegenüber einem mechanischen Rührer. Die beim Rühren unvermeidlich auftretenden Scherkräfte innerhalb der Flüssigkeit, denen die Bakterien ausgesetzt sind und die zu einer Schädigung und Zerstörung des biologischen Materials führen, sind bei einem Magnetrührer wesentlich geringer als bei einem mechanischen Rührer. Der zweite Vorteil liegt in der problemloseren Sterilisation.

3.2.3 Meßmethoden

3.2.3.1 Bakterienzahl

Um die Zahl der tatsächlich lebenden bzw. lebensfähigen Mikroorganismen bestimmen zu können, muß man ihr Wachstum auf geeigneten Nährböden verfolgen. Man verdünnt eine Suspension von Mikroorganismen so, daß sich nach Verteilen dieser verdünnten Suspension auf oder in einem Nährboden aus den lebensfähigen Mikroorganismen getrennt wachsende Kolonien bilden können. Diese zeigen jeweils eine Zelle im Untersuchungsmaterial an. Zu konzentrierte Suspensionen ergeben nur einen gleichmäßigen Bewuchs.

Um im günstigen Meßbereich zu liegen, wurde mit Phosphatpuffer (siehe 3.1) für eine zu untersuchende Flüssigkeitsprobe jeweils eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Ein Milliliter Bakterien-suspension wurde zu neun Milliliter sterilem Puffer zugegeben (Verdünnung 1 : 10) und intensiv mit einem Vibrator geschüttelt. Für eine weitere Verdünnungsstufe wurde der 1 : 10 verdünnten Suspension ein Milliliter entnommen und auf neun Milliliter Puffer gegeben.

Zwei Verfahren zum Verteilen und Bebrüten der Mikroorganismen aus der Verdünnungsreihe wurden erprobt:

1. Ein Milliliter einer Verdünnungsstufe wurde nach gleichmäßiger Verteilung durch ein Millipore-Filter gesaugt (Wasserstrahlpumpe). Nach dem Trockensaugen wurde das Filterscheibchen auf Fuchsin-Laktose-Agar gelegt und zwei Tage bei 37° C bebrütet. Bakterienkolonien waren als rote Punkte sichtbar. Das Verfahren war nicht genügend reproduzierbar. Die Streuung wurde besonders durch eine ungleichmäßige Verteilung der Bakterien auf dem Filter hervorgerufen. Oft war am Rand die Konzentration erheblich höher als in der Mitte. Das Verfahren wurde nur in Vorversuchen angewendet.

2. Dagegen hat sich die Reproduzierbarkeit des KOCH'schen Plattengießverfahrens bewährt. Ein Milliliter Bakterien-suspension wurde in eine sterile Petrischale gegeben und zehn Milliliter 45° C warmer Nähragar dazu pipettiert. Wichtig ist die schnelle, intensive Durchmischung durch Schütteln, wodurch eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien erzielt wird. Nach zwei Tagen Bebrütung bei 37° C zeigten sich die ausgewachsenen Kolonien als weiße Punkte. Sie wurden im Stereomikroskop gezählt, wenn die Bakterienzahl pro Platte zwischen hundert und tausend lag. Bei gleichmäßiger Verteilung wurden nur jeweils zehn Kästchen zu ein Quadratzentimeter ausgezählt und das Ergebnis umgerechnet.

Verwendeter Nährboden:

In tausend Milliliter Nährlösung (siehe 3.1) wurden 12 Gramm Agar-Agar (Merck 1614) und 500 Milligramm Glucose (Merck 8342) gelöst und im Autoklaven sterilisiert.

Das Wachstum von Mikroorganismen nach Animpfen einer Kulturlösung kann auch durch Trübungsmessung verfolgt werden. Unter der Annahme, daß Trübung und Bakterienzahl proportional ist, gibt die Extinktion direkt ein Maß für die gebildete Mikroorganismenkonzentration. Dies ist für die logarithmische Wachstumsphase bei *Escherichia coli* erfüllt. Die Extinktion wurde bei 400 nm in einem Photometer der Firma Beckmann, Typ DB-G, gemessen.

3.2.3.2 Glucosebestimmung

Der enzymatische Glucosetest mit Hilfe der Glucoseoxidase (Merck 3328) konnte nicht nach der Originalvorschrift angewendet werden. Einmal inaktiviert das zur Eiweißfällung benutzte Uranylacetat bei geringen Eiweißkonzentrationen die Glucoseoxidase vollständig, zum anderen war die Nachweisempfindlichkeit zu gering.

Bakteriensuspensionen wurden membranfiltriert, um kein Material aus dem Zellinneren der Bakterien mit zu erfassen. Bakterienfreie Lösungen wurden direkt verwendet. Zwei Milliliter der Testlösung wurden mit zwei Millilitern Puffer-Enzym-Farbreagenz-Lösung versetzt und dreißig Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Puffer-Enzym-Lösung wurde doppelt konzentriert angesetzt, um den vorgeschriebenen pH-Wert zu erreichen. Die Glucoseoxidase ist nur im neutralen pH-Bereich aktiv. Innerhalb der folgenden dreißig Minuten wurde die Extinktion bei 450 nm im Beckman-Photometer DB-G mit Küvetten von einem Zentimeter Schichtdicke gemessen. Die Nachweisgrenze der Methode wurde mit glucosefreier membranfiltrierter Nährlösung, glucosefreier unfiltrierter Nährlösung und Wasser zu 1,0 Milligramm Glucose pro Liter bestimmt. Konzentrationen darunter sind nicht mehr von der Streuung der Nullwerte zu unterscheiden.

4. Atmungsmessungen von E. coli bei geringen Glucosekonzentrationen

4.1 Zeitlicher Verlauf des Sauerstoffverbrauchs

Die Änderung des Sauerstoffgehaltes in einer E. coli-Kulturlösung mit Glucose als organische Kohlenstoffquelle wurde, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Es ergab sich dabei der in Abbildung 4.1 dargestellte Kurvenverlauf.

Man erwartet, daß der Sauerstoffgehalt in der Nährlösung, analog dem Wachstum der Bakterienkultur, exponentiell abfällt und sich dann auf einen konstant bleibenden Endwert einstellt. Die dargestellte Atmungskurve zeigt jedoch folgendes:

Nach einer lag-Phase (1) ergibt sich ein exponentieller Abfall des Sauerstoffgehaltes in der Nährlösung (2), entsprechend dem exponentiellen Wachstum der Bakterienkultur. Im Minimum des Sauerstoffgehaltes in der Nährlösung (3) hört die Atmung auf. Es folgt nun eine Ruhephase der Bakterien (4), die wie eine Induktionsphase aussieht. Der Sauerstoffgehalt der Nährlösung steigt aufgrund der Nachlieferung aus der Gasphase wieder an. Nach Ende dieser Ruhephase erfolgt aber jetzt eine zweite Atmungsphase (5), der Sauerstoffgehalt sinkt bis zu einem zweiten Minimum ab. Durch die Nachlieferung von Sauerstoff aus der Gasphase steigt der Gehalt an Sauerstoff in der Nährlösung danach langsam wieder an. Er ändert sich dabei solange, bis sich das Gleichgewicht entsprechend der noch vorhandenen Menge an Sauerstoff eingestellt hat (6). Es folgt nun ein sehr langsam stetiger Abfall der Atmungskurve (7), die möglicherweise auf eine Erhaltungsatmung zurückzuführen ist. Vorversuche schließen eine Drift der Elektrode aus.

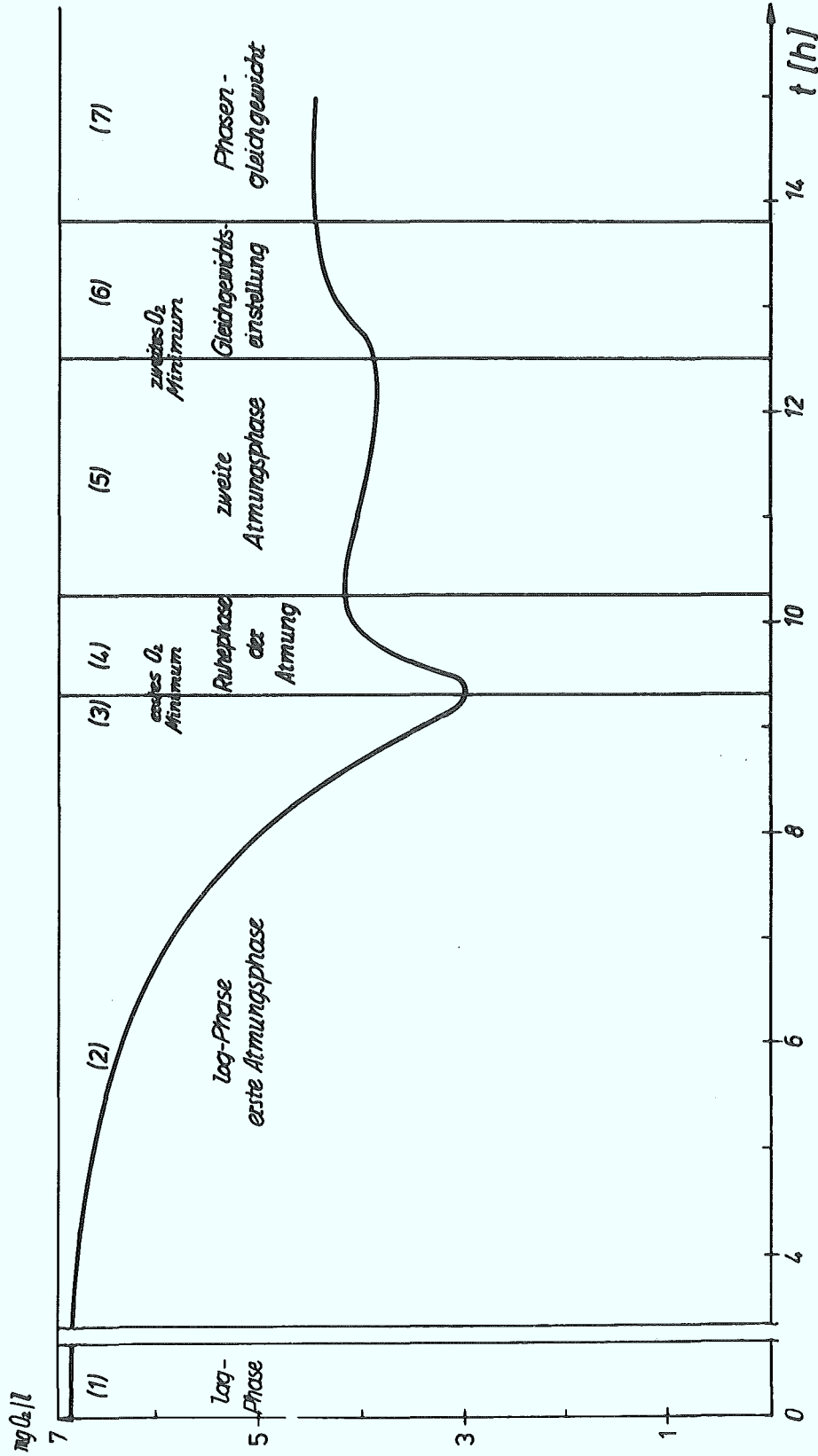


Abb. 4.1: Zeitlicher Verlauf der Sauerstoffkonzentration einer *E. coli* Kultur mit Glucose (45,5 mg/l) als organische Kohlenstoffquelle. Weitere Erläuterungen s. Text. 4.1

4.2 Abhängigkeit vom System

4.2.1 Abhängigkeit von der Rührintensität

Für die vorliegenden Versuche wurde aus den in Kapitel 3.2.2 benannten Gründen ein Magnetrührer verwendet. Bei der Einstellung der Rührintensität muß ein Kompromiß geschlossen werden. Die Rührintensität darf nicht zu gering sein, da dann bei mangelnder Durchmischung Zonen unterschiedlicher Sauerstoffversorgung entstehen können. Wird aber zu schnell gerührt, befindet sich das System nahe am Gleichgewichtszustand, d. h., die Sauerstoffnachlieferung aus der Gasphase wird zu rasch und der erwünschte Effekt der zweiten Atmung tritt schlechter zum Vorschein. Bei zu hoher Rührgeschwindigkeit wird zudem die Anzeige des Sauerstoffgehaltes durch mit in die Lösung gerissene Gasblasen gestört.

Es wurde, wie in Abbildung 4.2 dargestellt, eine sehr starke Abhängigkeit der Form und des Aussehens der Atmungskurve von der Rührintensität gefunden. Die Rührintensität war nur begrenzt genau einstellbar. In der Abbildung ist sie in Bruchteilen der maximal möglichen Einstellung angegeben. Die Abhängigkeit wurde mit einer Glucosekonzentration von 45,5 Milligramm pro Liter untersucht. Es ergaben sich sehr deutliche Effekte. Mit unterschiedlichen Rührintensitäten kann man den zeitlichen Verlauf der Sauerstoffkonzentration in der Nährlösung verändern.

Die Unterschiede in den Ergebnissen sind vor allem auf Differenzen im Gasaustausch über die Phasengrenze Flüssigkeit-Gasraum zurückzuführen. Bei unterschiedlichen Rührintensitäten bildet sich eine andere Form des Rührkegels an der Oberfläche aus, Blasen werden verschieden tief in die Flüssigkeit mitgerissen. Außerdem ist auch die Sauerstoffversorgung über die Oberfläche der Bakterien von der Durchmischung der Flüssigkeit abhängig. Eine weitere Untersuchung dieser Probleme, die beim Einsatz dieses Verfahrens der Atmungsmessung empirisch gelöst werden sollte, erschien aus zwei Gründen nicht sinnvoll:

Erstens sollte vor allem der Effekt der zweiten Atmungsphase untersucht werden. Die Versuchsanordnung hat für den gedachten Zweck ausreichend funktioniert. Zweitens finden sich bereits zahlreiche Überlegungen zur Sauerstoffversorgung und Durchmischung von Mikroorganismenkulturen in der verfahrenstechnischen und biotechnischen Literatur.

Als optimale Rührgeschwindigkeit wurde für alle weiteren Versuche die halbe Maximalgeschwindigkeit gewählt.

Besonders wichtig ist die Feststellung, daß der Gleichgewichtswert der Sauerstoffkonzentration nach Ablauf der zweiten Atmungsphase unabhängig ist von der Rührgeschwindigkeit. Der Gesamtsauerstoffverbrauch wird danach durch Unterschiede in der Rührgeschwindigkeit bei Sauerstoffgehalten bis 2,18 Milligramm O_2 pro Liter nicht beeinflußt. Diese Feststellung ist für alle Streuungsmessungen an diesem E. coli-Stamm wichtig und geht als Voraussetzung in die theoretischen Betrachtungen ein.

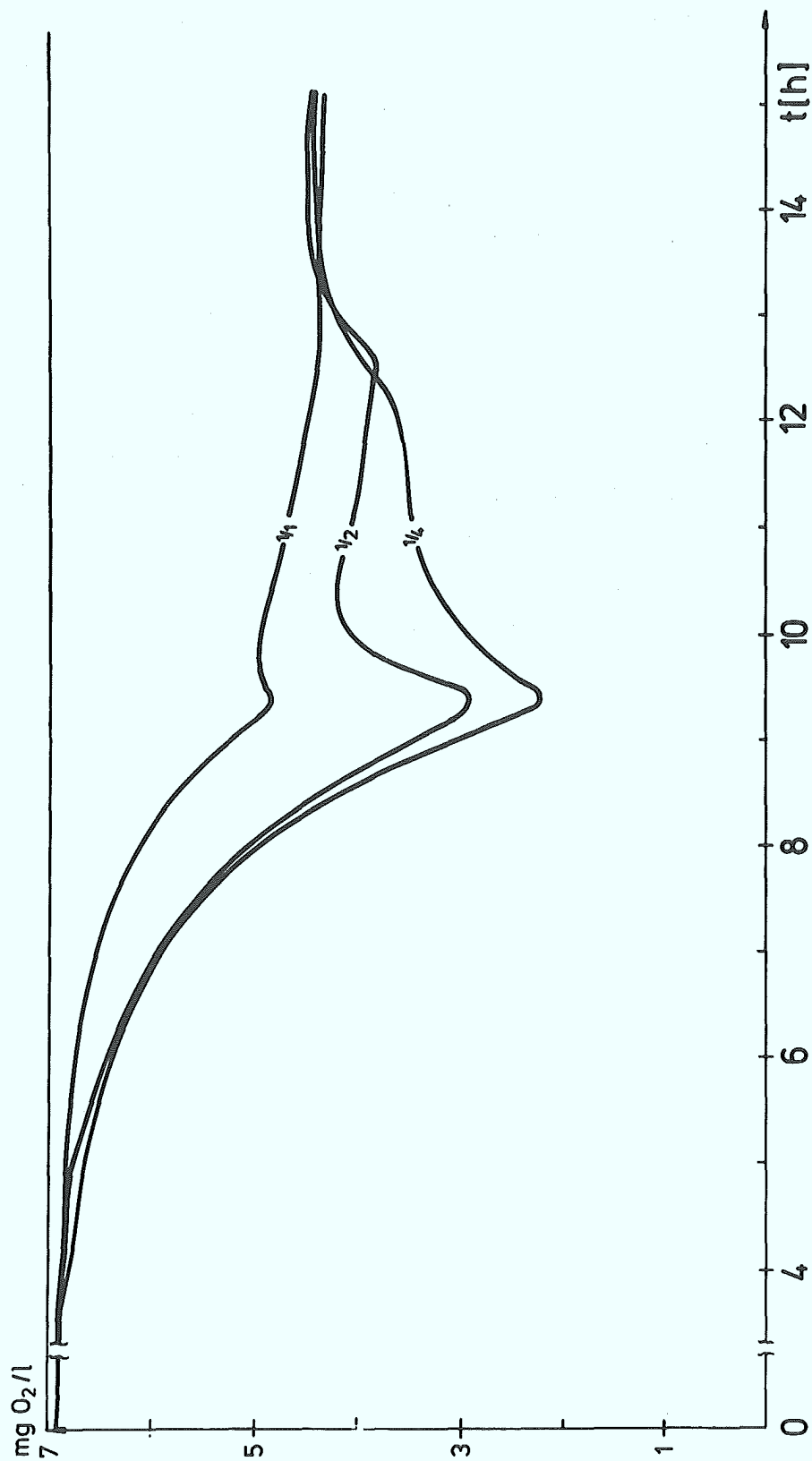


Abb. 4.2: Abhängigkeit des Verlaufs der Sauerstoffkonzentration von der Rührintensität. Anordnung wie in Abb. 4.1. Rührintensität als Bruchteile der maximalen Magnet-rührereinstellung.

4.2.2 Abhängigkeit von der Form des Kulturgefäßes

Eine Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs der Sauerstoffkonzentration von der Form des Kulturgefäßes konnte durch Messungen in zwei geometrisch etwas verschiedenen Kulturgefäßen hergestellt werden.

Gefäß A hatte einen Durchmesser von 9,4 cm und war 11,3 cm hoch, Gefäß B maß 9,0 cm und 11,5 cm. Die Gefäße unterschieden sich vor allem in der Form des oberen Gefäßteiles. Die Handfertigung der verschiedenen Anschlüsse brachte notwendigerweise Unterschiede in der Geometrie mit sich. Die Messungen wurden bei der gleichen Glucosekonzentration von 45,5 Milligramm pro Liter und gleicher Rührintensität durchgeführt. Für beide Gefäße wurde das gleiche Volumenverhältnis von Gasphase zu Flüssigkeitsphase benutzt. Durch die etwas unterschiedliche geometrische Form bildeten sich in beiden betrachteten Gefäßen beim Rühren verschiedene Rührkegel aus.

Die verschiedene Form der Rührkegel in Gefäß A und B hat veränderte Oberflächenverhältnisse zwischen flüssiger und gasförmiger Phase zur Folge. Die Oberfläche in Gefäß A ist gegenüber der in Gefäß B größer, d. h., die Sauerstoffnachlieferung aus der Gasphase ist besser. Wie bereits in Kapitel 4.2.1 festgestellt wurde, verschlechtert sich dadurch der erwünschte zweite Atmungseffekt, wie auch die Abbildungen 4.3a und 4.3b zeigen.

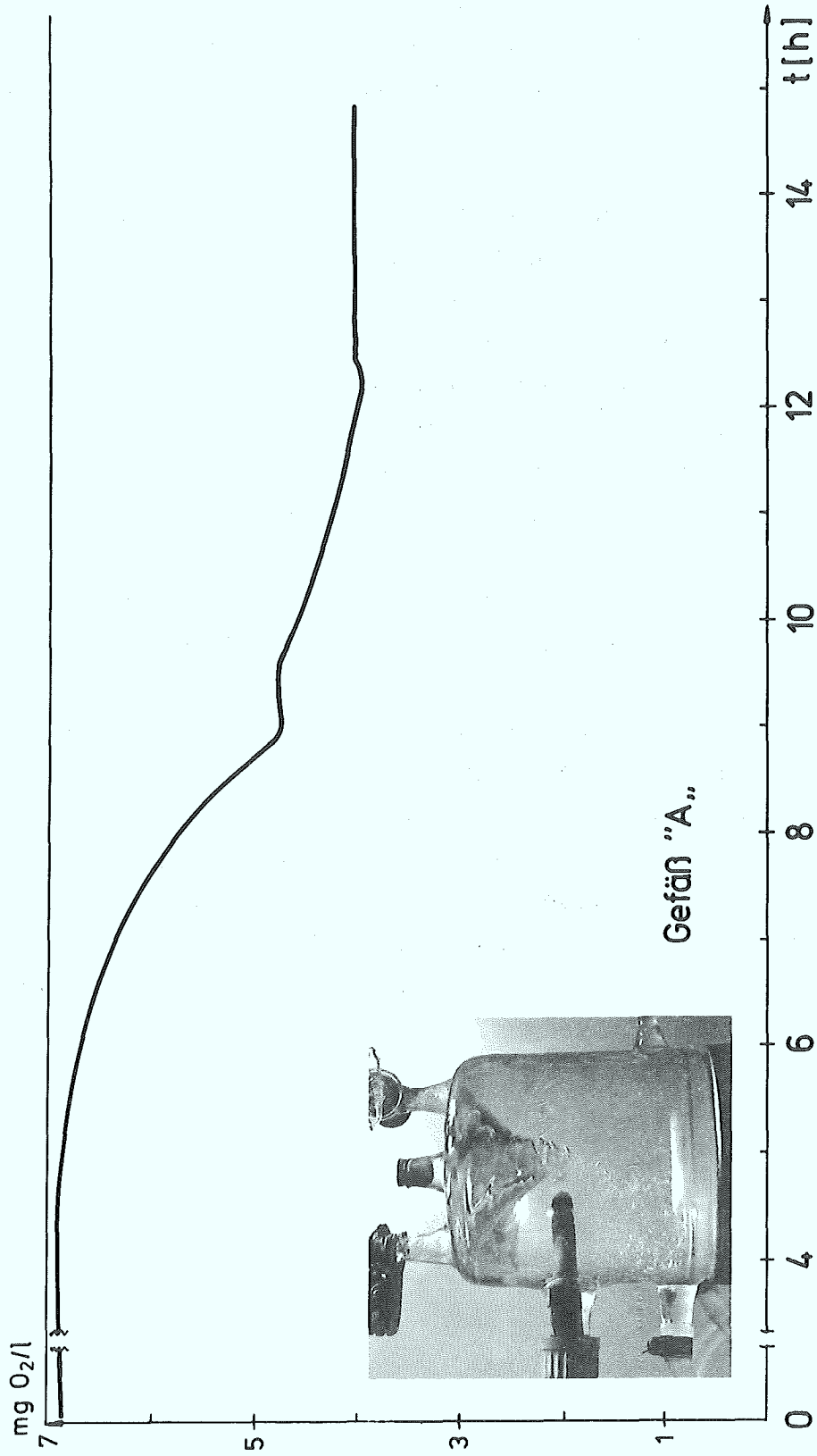


Abb. 4.3a: Abhängigkeit des Sauerstoffkonzentrationsverlaufs von der Form des Kulturgefäßes. Verwendet wurden zwei geometrisch nur geringfügig verschiedene Gefäße. 45,5 mg Glucose / l.

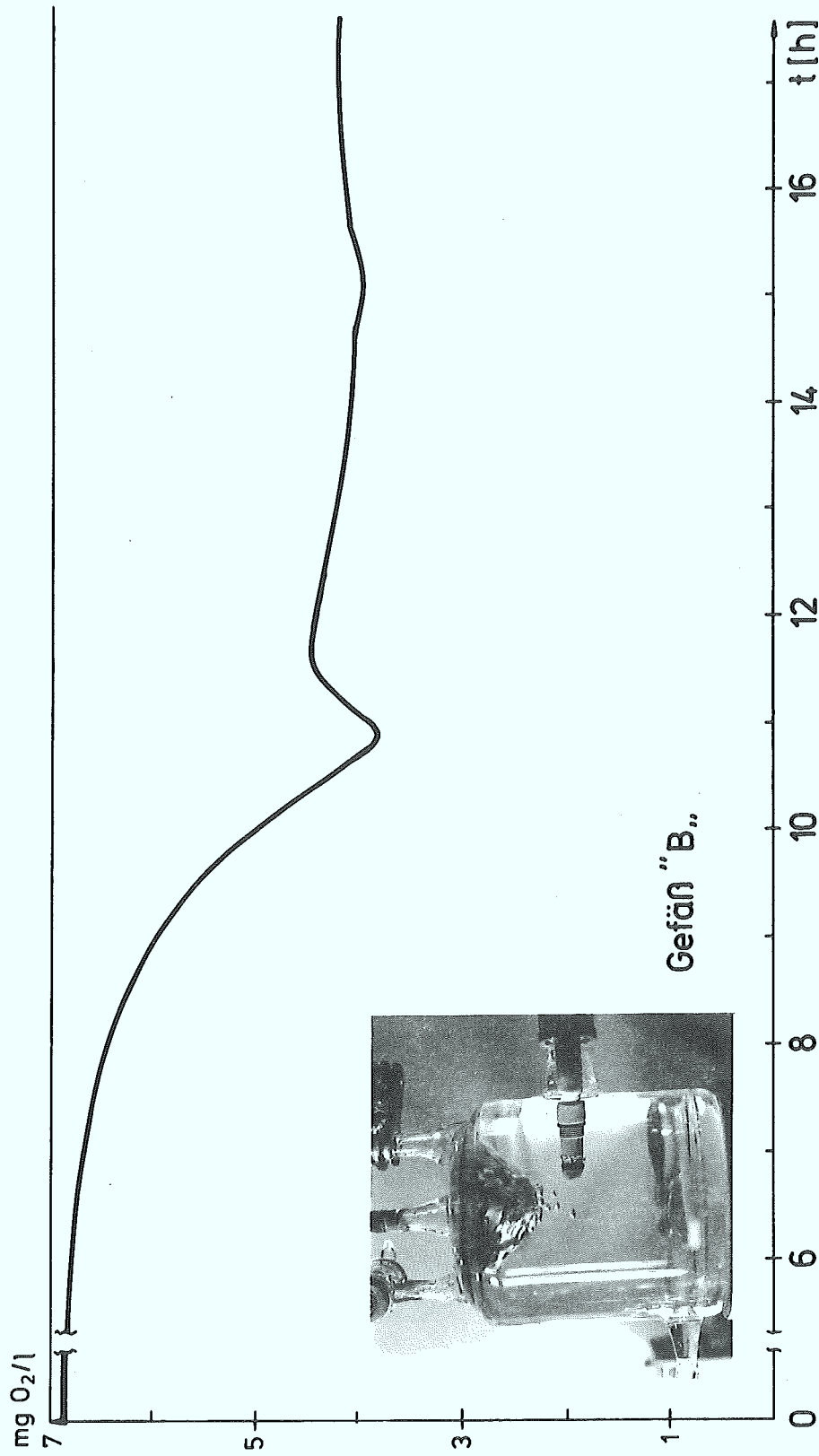


Abb. 4.3b: Abhängigkeit des Sauerstoffkonzentrationsverlaufs von der Form des Kulturgefäßes. Verwendet wurden zwei geometrisch nur geringfügig verschiedene Gefäße. 45,5 mg Glucose / l.

4.2.3 Verhältnis von Gas- zu Flüssigkeitsphase

Der Verlauf der Sauerstoffkonzentration wird außer durch die Rührintensität wesentlich durch das Verhältnis Gasphase zu Flüssigkeitsphase im Kulturgefäß beeinflusst. Dieses wird durch die vorgegebene Konzentration an organischem Substrat bestimmt. Je mehr Substrat unter Sauerstoffverbrauch umgesetzt wird, desto mehr Sauerstoff muß im System eingeschlossen sein. Auf alle Fälle muß vermieden werden, daß der Sauerstoffgehalt zu weit absinkt oder gar vollkommen anaerobe Verhältnisse auftreten, da sonst Umstellungen im Bakterienstoffwechsel zu anderen Ergebnissen als unter streng aeroben Verhältnissen führen. In Vorversuchen wurde durch Variation des Verhältnisses Gasphase zu Flüssigkeitsphase bei vorgegebener Substratkonzentration ein optimales Verhältnis gefunden. Die Variation von Gasanteil und Rührintensität hatte außerdem zum Ziel, die zweite Atmungsphase deutlicher sichtbar zu machen. Als optimales Verhältnis bei einer Glucosekonzentration von 45,5 Milligramm pro Liter wurde gefunden:

Flüssigkeitsphase	=	83,5 %
Gasphase	=	16,5 %

Dieses Verhältnis wurde für alle weiteren Versuche benutzt.

4.3 Reproduzierbarkeit des Verfahrens

Auf eine gute Reproduzierbarkeit wurde Wert gelegt, um den Effekt der zweiten Atmungsphase erklären und das System rechnerisch beschreiben zu können. Die Reproduzierbarkeit wird durch den Gasübertritt von der Gas- zur wässrigen Phase und durch das Wachstumsverhalten der Bakterienkultur bestimmt. In allen Versuchen hatte sich gezeigt, daß die lag-Phasen am schwierigsten zu reproduzieren sind, selbst wenn sich das Impfmateriail jeweils im gleichen Wachstumsstadium befand (siehe Kapitel 3.1).

Hier wurde die Reproduzierbarkeit des gesamten Systems untersucht. Es gehen sowohl Streuungen des Gasaustausches sowie Schwankungen im Verhalten der Bakterien ein. Beide Kulturgefäße enthielten Nährlösung gleicher Zusammensetzung, gleichen pH-Wertes und gleicher Sterilisationsbedingungen. Lediglich der angesetzte Glucosegehalt betrug 60,9 Milligramm pro Liter Glucose im Gefäß A und 45,5 Milligramm pro Liter Glucose im Gefäß B. Für die beiden Gefäße wurden unterschiedliche Konzentrationen an Glucose benutzt, um für die im folgenden Kapitel dargestellte Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs von der Glucosekonzentration eine größere Zahl unterschiedlicher Konzentrationswerte zur Festlegung der Geraden zu bekommen. Dieser Unterschied muß beim Vergleich der Atmungskurven zwischen den beiden Gefäßen beachtet werden. Die Sauerstoffkonzentrationswerte können schon wegen der unterschiedlichen Glucosekonzentration im Ansatz nicht direkt miteinander verglichen werden. Für Gefäß A wurden zwei, für Gefäß B drei Versuche unter identischen Bedingungen durchgeführt.

Abbildung 4.4a, b zeigt das Ergebnis der Versuche. Durch die Sterilisation im Sagrotan war die Anzeige des Sättigungswertes bei Versuchsbeginn von Versuch zu Versuch etwas verschoben. Deshalb wurden die Kurven auf die Grundlinie normiert. Nach Abbildung 4.4a, b wurde Tabelle 4.1 angefertigt. Die Sauerstoffkonzentrationen werden angegeben, um eine Vorstellung von der Reproduzierbarkeit des Atmungsverlaufes und des Gasaustausches für jeweils dasselbe Gefäß zu ermöglichen.

Aus Abbildung 4.4a, b und Tabelle 4.1 ist zu ersehen, daß die Reproduzierbarkeit für Versuche mit demselben Gefäß ausreichend ist, um aufeinanderfolgende Versuche vergleichen zu können. Dabei fällt der Wert des ersten Sauerstoffminimums heraus. Dessen Streuung resultiert vor allem aus den Mängeln des Rührsystems. Stand zum Beispiel das Kulturgefäß nicht ganz in der Mitte des Magnetrührers, so ergaben sich dadurch Abweichungen in der Durchmischung des Systems. Besonders hingewiesen sei auf die gute Reproduzierbarkeit des Endwertes.

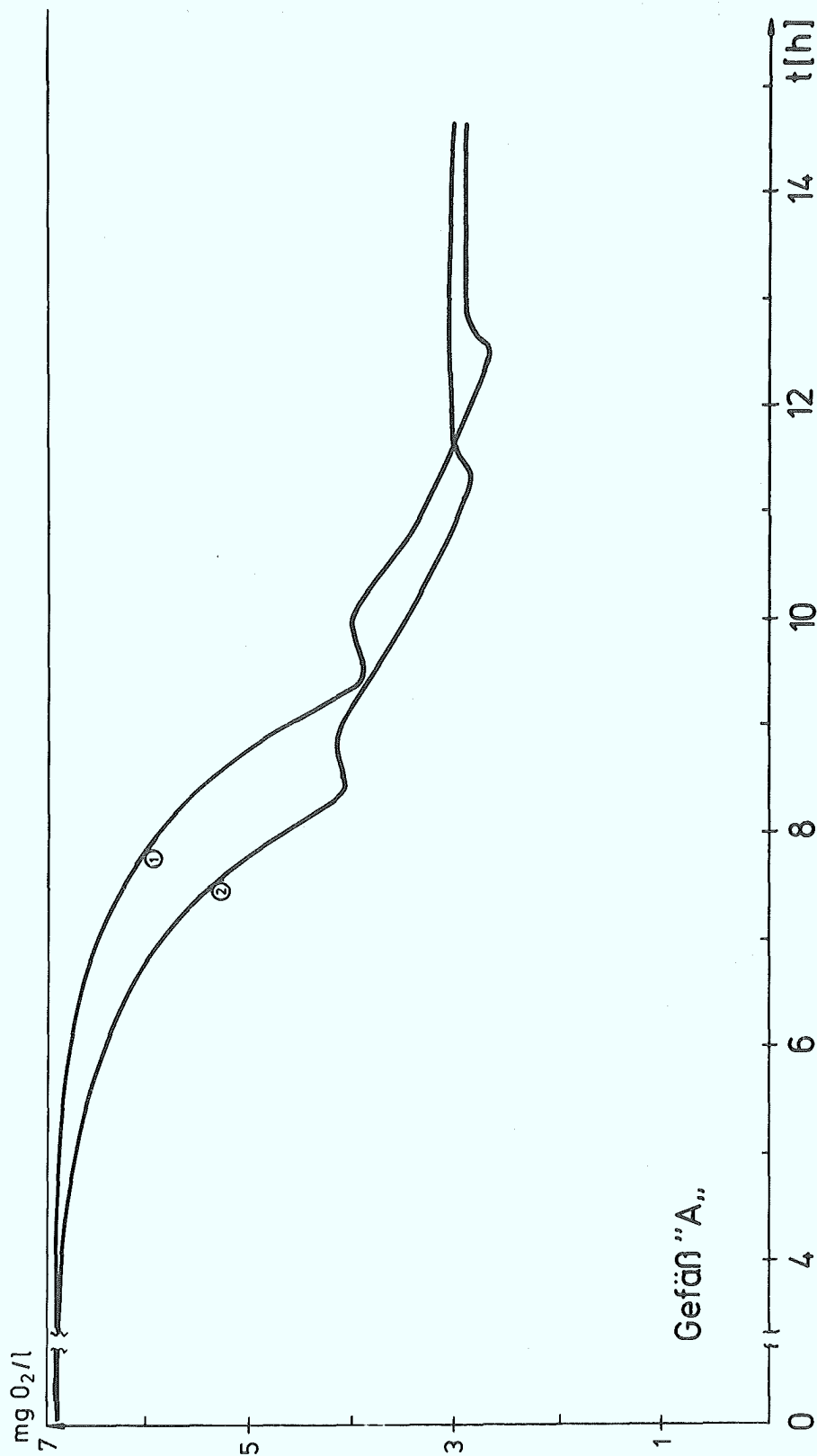


Abb. 4.4a: Versuche zur Reproduzierbarkeit des Sauerstoffkonzentrationsverlaufs in beiden Gefäßen, jeweils unter identischen Bedingungen.
Gefäß A enthielt 60,9 mg Glucose / l.

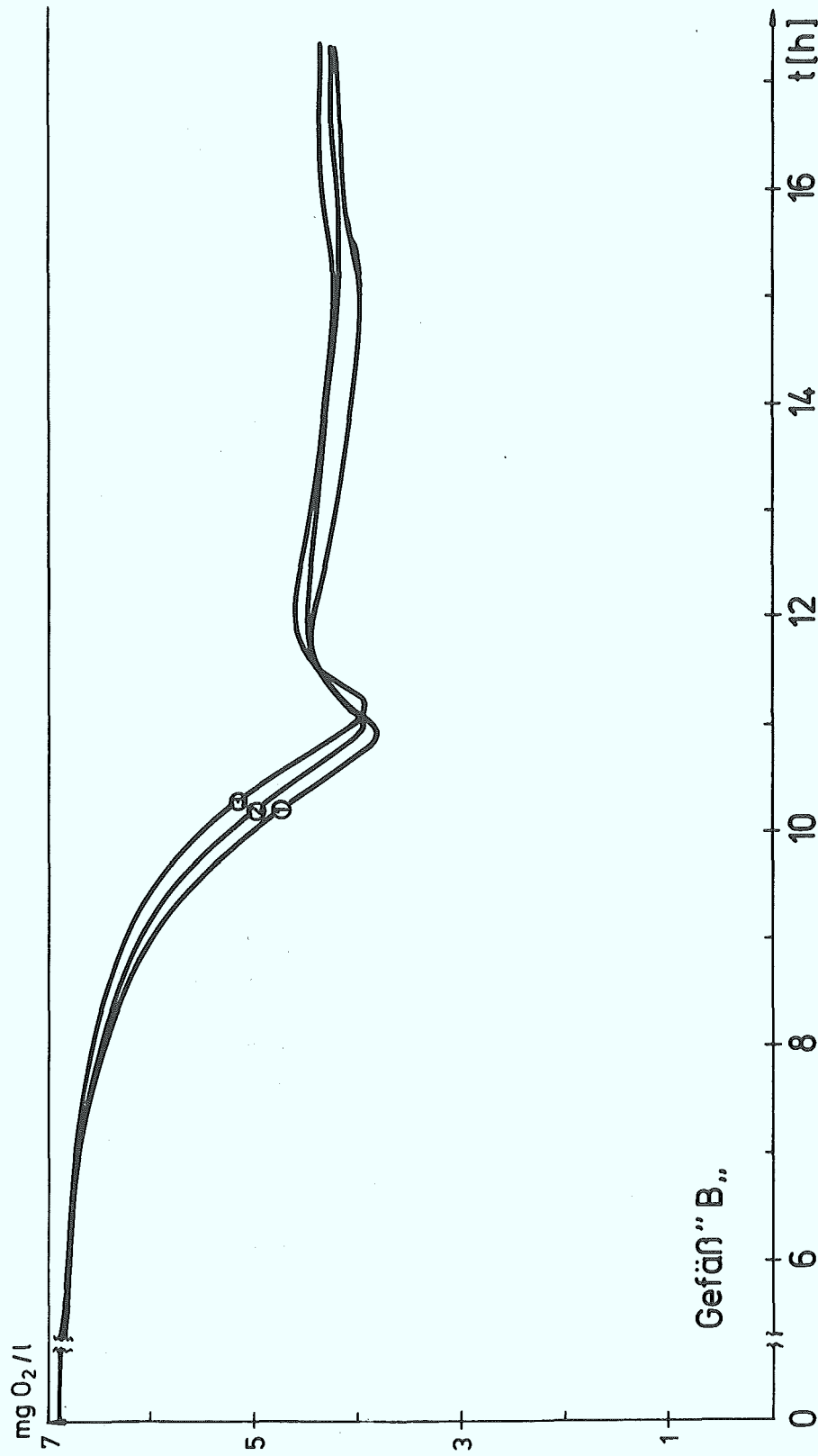


Abb. 4.4b: Versuche zur Reproduzierbarkeit des Sauerstoffkonzentrationsverlaufs in beiden Gefäßen, jeweils unter identischen Bedingungen.
 Gefäß B enthielt 45,5 mg Glucose / l.

Tab. 4.1: Zahlenwerte zu den Reproduzierbarkeitsversuchen, dokumentiert in Abb. 4.4. Die Versuche wurden, außer in der Glucosekonzentration, unter identischen Bedingungen durchgeführt. Wegen der etwas unterschiedlichen Glucosekonzentrationen und Unterschieden im Gasaustausch können zwischen den Gefäßen A und B nur die Zeitwerte verglichen werden. Die Konzentrationswerte für Sauerstoff sind nur für dasselbe Gefäß vergleichbar.

Gefäß		A			B		
		1	2		1	2	3
Versuch							
Glucose	mg/l	60,9			45,5		
Dauer der lag- und ersten Atmungsphase	h <u>min</u>	9 <u>32</u>	8 <u>30</u>		10 <u>55</u>	10 <u>52</u>	11 <u>10</u>
Konzentrationsdifferenz zwischen erstem Sauerstoffminimum und Ausgangsgleichgewichtswert	mg O ₂ /l	2.93	2.76		3.12	2.86	2.95
Dauer der zweiten lag-Phase	<u>min</u>	<u>32</u>	<u>28</u>		<u>60</u>	<u>60</u>	<u>58</u>
Konzentrationsdifferenz zwischen zweitem Sauerstoffminimum und Ausgangsgleichgewichtswert	mg O ₂ /l	4.16	3.98		2.93	2.62	2.62
zeitliche Differenz zwischen dem Ende der ersten und der zweiten Atmungsphase	h <u>min</u>	3 <u>00</u>	2 <u>52</u>		4 <u>20</u>	4 <u>23</u>	4 <u>16</u>
Konzentrationsdifferenz des Sauerstoffs zwischen Anfang und Ende des Versuchs	mg O ₂ /l	3.93	3.83		2.61	2.58	2.48

Vergleicht man die beiden Gefäße miteinander, so muß man von den systembedingten Unterschieden in den Sauerstoffkonzentrationen absehen. Diese resultieren aus den Konzentrationsunterschieden und vor allem aus der beschriebenen Verschiedenheit der beiden Rührsysteme. Vergleichbar sind nur die Zeiten für die einzelnen Phasen. Dabei fällt auf, daß die Vorgänge in Gefäß A in allen unterscheidbaren Phasen schneller ablaufen. Besonders deutlich ist der Unterschied bei der zweiten lag-Phase. Eine Erklärung kann hier nicht gegeben werden. Die geringe Differenz in der Glucosekonzentration im Ansatz ist wohl nicht die entscheidende Größe, da Unterschiede in der Glucose-Ausgangskonzentration eher einen gegenteiligen Effekt haben sollten.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß sich das benutzte System für die beabsichtigten Untersuchungen ausreichend reproduzierbar verhielt.

4.4 Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von der Glucose-Konzentration

Ziel dieser Versuche war es, die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von der Konzentration eingesetzter Glucose zu untersuchen und den sich daraus ergebenden Sauerstoffverbrauchs-koeffizienten a zu bestimmen. Der Sauerstoffverbrauchs-koeffizient wird hier nach der Formulierung von SCHLESER und FÖRSTEL 1972 benutzt. Es wird dabei angenommen, daß zur Verarbeitung einer vorgegebenen Menge an Mangelsubstanz M_{MS} immer die gleiche Menge an Sauerstoff M_{O_2} notwendig ist.

Das heißt: $M_{O_2} / M_{MS} = a = \text{konst.}$

a : Sauerstoffverbrauchs-koeffizient

M_{O_2} : verbrauchte Sauerstoffmenge (mg)

M_{MS} : verbrauchte Glucosemenge (mg)

Die Messungen wurden bisher mit Hilfe der WARBURG-Technik durchgeführt, doch die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs-koeffizienten für geringe Substratkonzentrationen war mit dieser Methode nicht möglich. Es wurde angestrebt, näher am Konzentrationsbereich der MICHAELIS-Konstanten für die Wachstumsrate in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration ($K_c = 7,5$ Milligramm pro Liter) zu arbeiten. Deshalb war es notwendig, die in dieser Arbeit beschriebene Methode der Atmungsmessung zu entwickeln.

Ebenso sollte untersucht werden, wie und ob die Atmungsphase von der eingesetzten Glucosekonzentration abhängen.

Die Atmungsversuche wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Substrat durchgeführt. Alle übrigen Parameter wurden beibehalten. Die Abbildungen 4.5a, b zeigen die Abhängigkeit des Sauerstoffkonzentrationsverlaufes in der Nährlösung für vier verschiedene Glucosekonzentrationen pro Gefäß. Die Kurven wurden auf die Grundlinie und auf das erste Sauerstoffminimum normiert. Eine Normierung auf das erste Sauerstoffminimum wurde vorgenommen, weil die erste lag-Phase der wachsenden Bakterienpopulation Streuungen unterworfen war.

Aus den Gleichgewichtswerten des Sauerstoffgehaltes in der Nährlösung zu Beginn und zu Ende des Versuchs und nach dem Befund, daß sämtliche Glucose verbraucht wird (s. Kapitel 5.1), wurde der Sauerstoffverbrauchskoeffizient berechnet. Aus den Abbildungen 4.5a, b wurde Tabelle 4.2 erstellt.

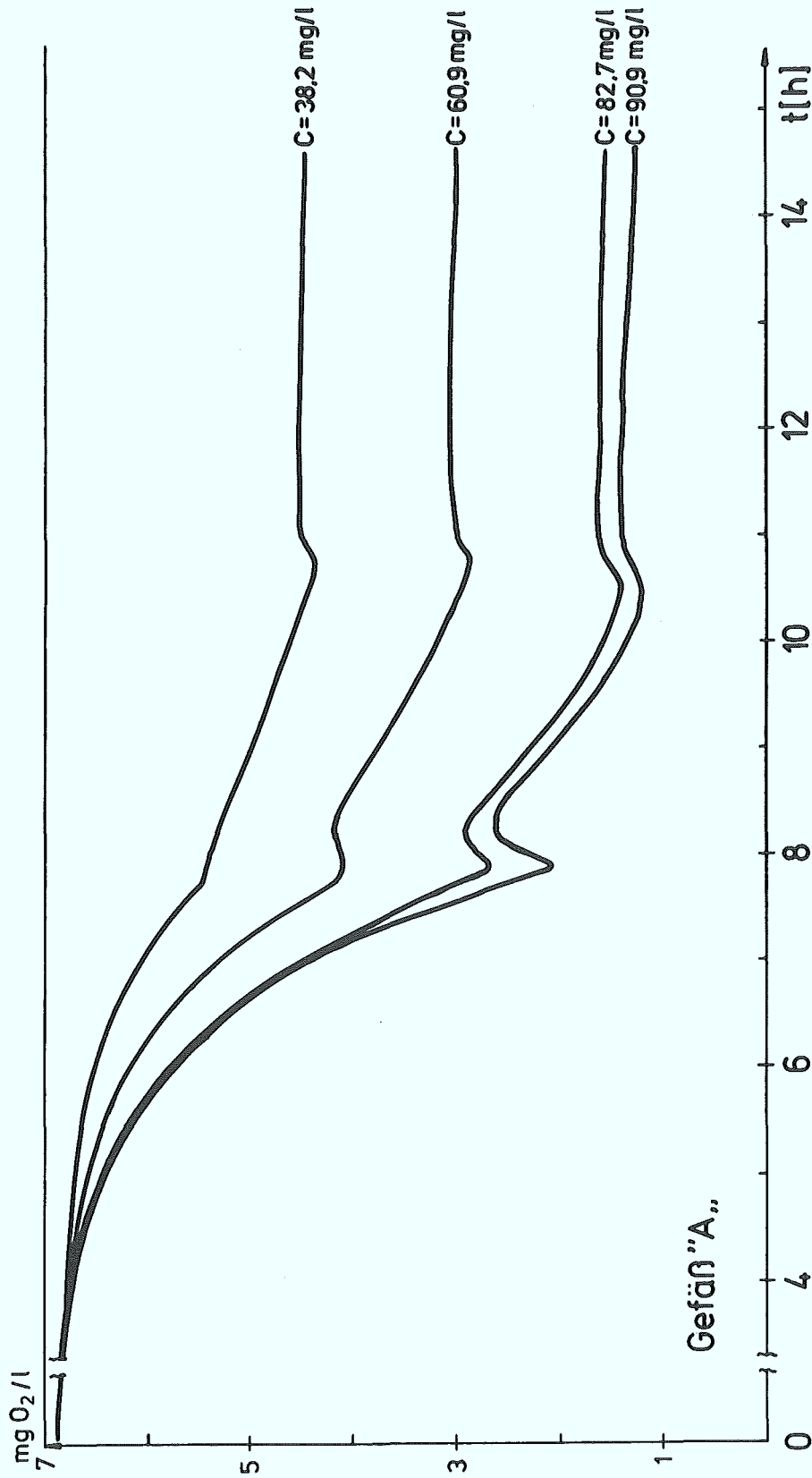


Abb. 4.5a: Abhängigkeit des Sauerstoffkonzentrationsverlaufes von der eingesetzten Glucosekonzentration für Gefäß A.

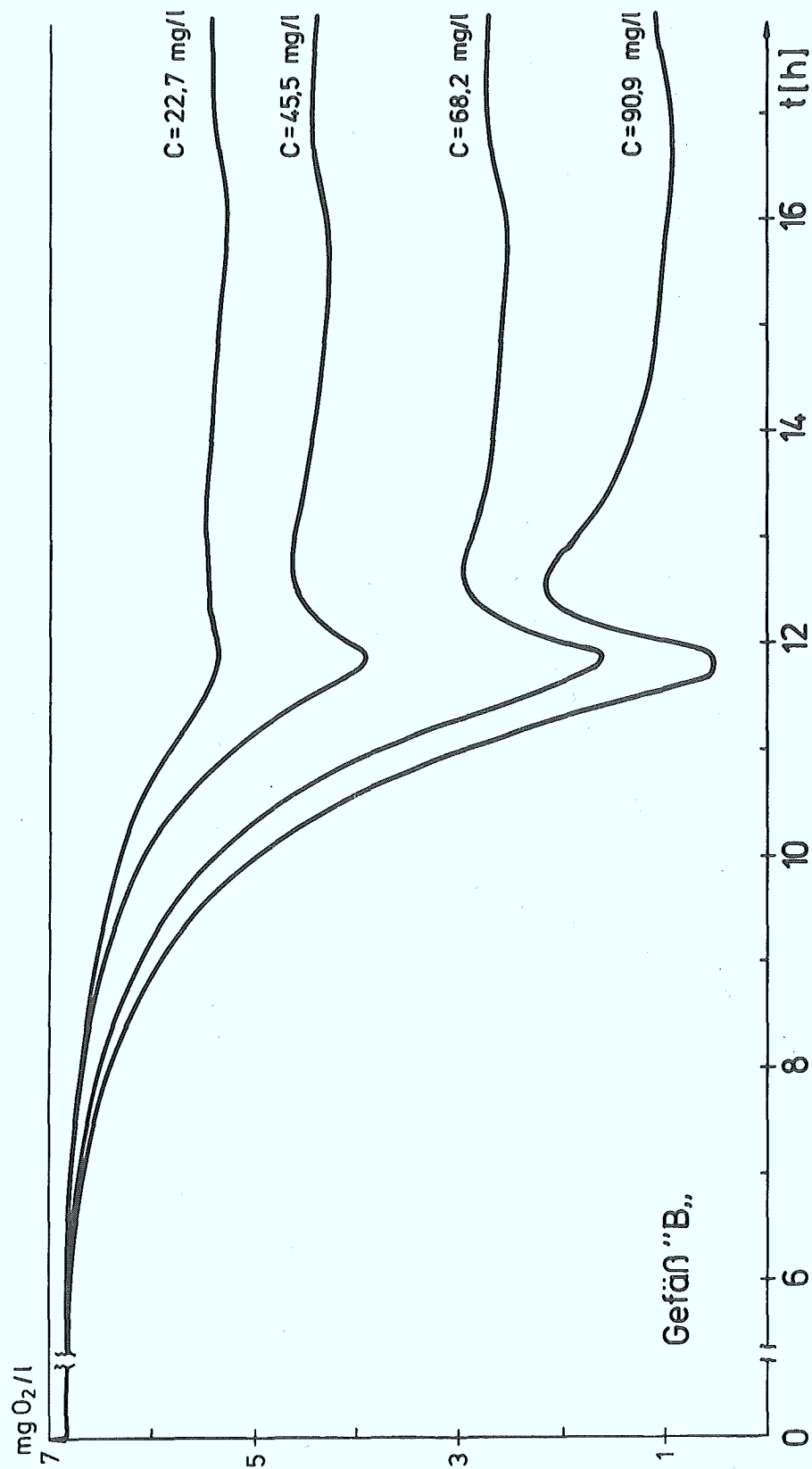


Abb. 4.5b: Abhängigkeit des Sauerstoffkonzentrationsverlaufes von der eingesetzten Glucosekonzentration für Gefäß B.

Tabelle 4.2: Glucosekonzentrationen und Konzentrationsdifferenz des gelösten Sauerstoffs zwischen Anfang und Ende der Versuche (siehe Abbildung 4.5)

	eingesetzte Glucosekonzentration (mg/l)	Konzentrationsdifferenz des Sauerstoffs zwischen Anfang und Ende des Versuches (mg/l)
Gefäß A	38,2	2,45
	60,9	3,88
	82,7	5,28
	90,9	5,74
Gefäß B	22,7	1,51
	45,5	2,50
	68,2	4,25
	90,9	5,92

Die verbrauchte Glucose- und Sauerstoffmenge errechnet sich nach:

$$M_{MS} = V_{fl} \cdot C_o$$

$$M_{O_2} = V_{fl}(S_{fl}^a - S_{fl}^e) + 264 V_g \left(1 - \frac{S_{fl}^e}{S_{fl}^a}\right)$$

V: Volumen einer Phase (l)

C_o : Glucosekonzentration bei Versuchsbeginn (mg/l)

S: Sauerstoffkonzentration der Nährlösung (mg/l)

Index a, e: steht für Anfang bzw. Ende des Versuches

Index g, fl: steht für Gas- bzw. Flüssigkeitsphase

Der Glucose- und Sauerstoffverbrauch für beide Gefäße wird in Tabelle 4.3 dargestellt. Als Ausgangswert für den Sauerstoffgehalt wurde der Gleichgewichtswert Luft-Wasser bei 37° C (6,86 Milligramm pro Liter) eingestellt.

Tabelle 4.3: Glucose- und Sauerstoffverbrauch der Versuche in den Abbildungen 4.5a, b

	Glucosever- brauch (mg)	Sauerstoffver- brauch (mg)	Flüssig- keitsvo- lumen (l)	Gasvo- lumen (l)
Gefäß A	30,3	16,8	0,792	0,157
	48,2	26,5		
	65,5	36,1		
	72,0	39,2		
Gefäß B	18,1	10,4	0,798	0,159
	36,3	17,3		
	54,4	29,4		
	72,5	41,0		

Der Sauerstoffverbrauchskoeffizient a ergibt sich aus:

$$M_{O_2} = a \cdot M_{MS}$$

Er folgt somit als Steigung aus der Geraden. Die Regressionsgeraden errechnen sich zu:

$$\text{Gefäß A} \quad M_{O_2} = 0,54 \cdot M_{MS} + 0,44$$

$$\text{Gefäß B} \quad M_{O_2} = 0,57 \cdot M_{MS} - 1,45$$

$$\text{aus beiden Gefäßen} \quad M_{O_2} = 0,56 \cdot M_{MS} - 0,83$$

Alle Werte werden in Abbildung 4.6 zusammengestellt.

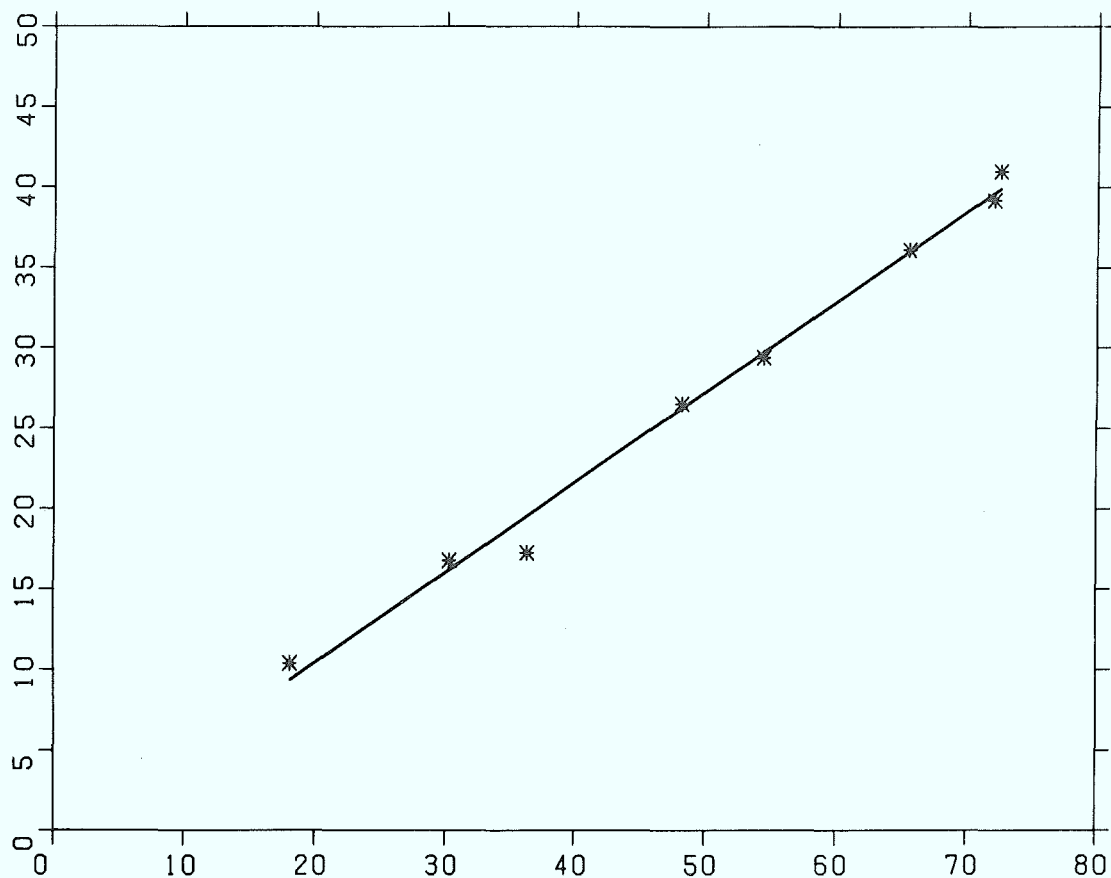


Abb. 4.6 Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauchs (mg) von der eingesetzten Glucosemenge (mg)

Der Sauerstoffverbrauchskoeffizient stimmt mit Befunden bei hohen Glucosekonzentrationen überein. Es konnte somit gezeigt werden, daß er auch auf niedrige Glucosekonzentrationen anwendbar ist. Diese Feststellung ist deshalb so wichtig, weil bei bestimmten Problemen im kontinuierlichen Zuchtverfahren für *E. coli* (Chemostat) niedrige Konzentrationen im Zuchtmedium vorliegen. Bemerkenswert ist auch, daß die Geraden praktisch durch den Nullpunkt des Koordinatensystems verlaufen. Das bedeutet, daß auch bei den geringsten Glucosekonzentrationen zur Verarbeitung einer vorgegebenen Menge an Glucose immer die gleiche Menge an Sauerstoff notwendig ist.

Der gemessene Sauerstoffverbrauchskoeffizient a , zusammen mit der Ausbeute Y ermöglicht eine Betrachtung, ob die gemessenen Größen mit dem Wert, der aus stöchiometrischen Überlegungen folgt, übereinstimmt. Die Ausbeute Y ergibt sich analog zu a als:

$$Y = \frac{M_B}{M_{MS}}$$

M_B : gebildete Bakterientrockenmasse (mg)

M_{MS} : aufgenommene Glucosemenge (mg)

Wird von *E. coli* Glucose abgebaut, so wird diese in zwei Stoffwechselwegen verbraucht:

I. Atmung:



Das Kohlendioxid wurde absorbiert und hier nicht weiter verfolgt. Unter Berücksichtigung der molaren Verhältnisse verbrauchen 0,935 Masseneinheiten Glucose eine Masseneinheit Sauerstoff. Der molare Sauerstoffverbrauchskoeffizient a' ergibt sich zu:

$$a' = a \cdot \frac{f_{MS}}{f_{O_2}} = a \cdot 0,935$$

$$a' = 0,52$$

f_{MS}/f_{O_2} : stöchiometrisches Verhältnis von Glucose- zu Sauerstoffverbrauch

II. Aufbau von Bakterienmasse:

Die Bakterienmasse besteht aus verschiedenen Elementen, die nicht alle aus der Mangelsubstanz selbst aufgenommen werden. Deshalb wird als Bezugssubstanz der Kohlenstoff benutzt. Eine Bruttoproduktion organischer Substanz aus dem freigesetzten CO_2 findet in dem abgeschlossenen System nicht statt. Deswegen muß aller Kohlenstoff der Bakterienmasse aus der Glucose

stammen. Die molare Ausbeute Y' für den Kohlenstoff ergibt sich zu:

$$Y' = Y \cdot \frac{f_B}{f_{MS}} = 0,49$$

f_B : Kohlenstoffgehalt der Bakterienmasse ($0,50 \pm 0,05$)
(siehe Tabelle 4.4)

f_{MS} : Kohlenstoffgehalt der eingesetzten Glucose (0,40)

Y wurde in früheren Messungen zu 0,39 bestimmt.

Aus der Bilanz für den Glucoseabbau folgt:

$$a' + Y' = 1,$$

gemessen wurde: $0,52 + 0,49 = 1,01$

Das bedeutet, daß etwa die Hälfte der Glucose unter Sauerstoffaufnahme veratmet und die andere Hälfte in die Bakterienmasse eingebaut wird.

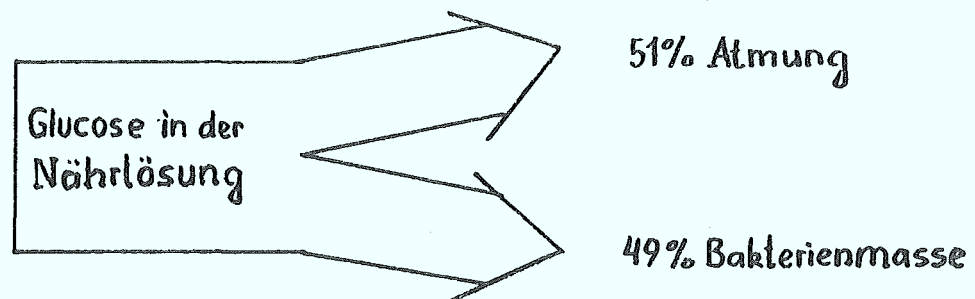


Abb. 4.7 Glucoseverwertung bei *E. coli*

Tabelle 4.4 Kohlenstoffgehalte vom Trockengewicht für biologische Materialien

Objekt	C-Gehalt vom Trockengewicht (%)	Autor
Weizen	43,6	MILLER 1938
Bakterien	50	LURIA 1960
Proteine	50 - 55	DOBY 1965
E. coli	50	STARKA 1968
Pflanzen allgem.	45 - 50	
Proteine	51 - 54	HELLER 1969
Zellulose	44,5	
Bakterien	50 $\pm$ 5	SCHLEGEL 1969
Spirochaeta aurantia	52	BREZNAK, CANALE- 1972 PAROLA

Mit Hilfe des gefundenen Sauerstoffverbrauchskoeffizienten a und des Ertragskoeffizienten Y kann nun noch eine weitere Größe, die spezifische Atmungsrate Q_{O_2} , errechnet werden. Die spezifische Atmungsrate beschreibt die verbrauchte Sauerstoffmenge pro Bakterientrockenmasse und Stunde. Nach SCHLESER / FÖRSTEL 1972 errechnet sich Q_{O_2} nach:

$$Q_{O_2} = \frac{a}{Y} \cdot \mu$$

Die spezifische Wachstumsrate μ hat den Wert $\mu = \mu_{\max} = 0,67$ im verwendeten System. μ ist eine Funktion der Mangelsubstanzkonzentration. Diese Abhängigkeit macht sich aber erst bei sehr niedrigen Konzentrationen an Mangelsubstanz bemerkbar. Nach dem Einsetzen der aufgeführten Größen in die obige Gleichung ergibt sich für Q_{O_2} der Wert $0,963 \text{ h}^{-1}$ bzw. $674 \text{ } \mu\text{l/mg} \cdot \text{h}$.

Aus der Umstellung der obigen Gleichung ergibt sich folgendes Verhältnis:

$$\frac{Q_{O_2}}{\mu} = \frac{a}{Y}$$

Man kann also sagen, daß das Verhältnis von spezifischer Atmungsrate zur spezifischen Wachstumsrate genauso groß ist wie das Verhältnis von verbrauchter Sauerstoffmenge zur gebildeten Bakterienmenge für eine Konzentration. Das wird plausibel, wenn man sich die Aufteilung der Kohlenstoff- und Energiequelle Glucose in die zwei (nur theoretisch trennbaren) Stoffwechselwege der Energiegewinnung unter Substanzabbau (Katabolismus) und Synthese von Zellsubstanz unter Energieverbrauch (Anabolismus) betrachtet (siehe Abbildung 4.7).

SIEGEL und CLIFTON 1950 beobachteten bei *E. coli*, daß etwa die Hälfte des Kohlenstoffs der eingesetzten Glucose veratmet, die andere Hälfte aber eingebaut wird. Sie haben nur in der frühen exponentiellen Phase gemessen. ABELSON, BOLTON und ALDOUS 1952 haben mit ^{14}C -markierter Glucose Entsprechendes gefunden. Pro Mol Glucose wurden von *E. coli* 3,4 Mol Kohlendioxid erzeugt. Bei einem respiratorischen Quotienten von 1,0 für Glucose errechnet sich ein molarer Sauerstoffverbrauchs-koeffizient a' von 0,58. Dieser Wert stimmt mit den Befunden dieser Arbeit überein. Ähnliche Werte wurden auch bei anderen Organismen gefunden. Aus der Arbeit von WALKER und DURHAM 1973 errechnet sich bei *Pseudomonas fluorescens* ein Wert von 0,41. Aus DEGN, LILLEØR und IVERSEN 1973 ergibt sich bei *Klebsiella aerogenes* für Glucose als Substrat 0,37, für Succinat, Pyruvat und Acetat 0,51.

Der mit dem gemessenen a -Wert und den in anderen Versuchen (SCHLESER und FÖRSTEL 1972, SCHLESER 1974) erhaltenen Zahlen für die Ausbeute Y und die Wachstumsrate μ errechnete Q_{O_2} -Wert stimmt mit den Befunden von SCHLESER 1974 und einem neueren Wert, errechnet aus RUIZ-HERRERA und GARCIA 1972, von über 800 $\mu\text{l}/\text{mg} \cdot \text{h}$ gut überein. Aus SIEGEL und CLIFTON 1950 errechnet sich ein Q_{O_2} von 700 bis 960 $\mu\text{l} \text{ O}_2/\text{mg} \cdot \text{h}$.

Eine größere Zahl von Meßwerten des Sauerstoffverbrauchs durch *E. coli* aus der Literatur kann nicht verglichen werden, da entweder die Bezugsbasis fehlt oder die Ergebnisse nur für bestimmte Versuchsbedingungen gelten. Die im Biological Data Book zitierten Werte um 200 nach KREBS 1937 und AJL 1950 sind aus den Originalzitaten nicht korrekt entnommen worden und daher unbrauchbar.

Besonders interessant für die Auswertung ist die Frage, ob sowohl a und Y oder aber ihr Verhältnis in weiten Konzentrationsbereichen konstant bleiben. Für a wurde dies hier gezeigt, Y war ebenso wie μ (bestimmt für Trübungsmessungen) wegen der geringen Biomasseproduktion nicht zu bestimmen. Da aber der Sauerstoffverbrauchskoeffizient a und die Ausbeute Y stöchiometrisch zusammenhängen, muß bei konstantem a dies auch für Y gelten. So kann man bei der Auswertung der Ergebnisse annehmen, daß das Verhältnis von Sauerstoffverbrauchskoeffizient a zu Ausbeute Y bis zu niedrigen Konzentrationen der Glucose konstant ist.

Zum Schluß muß noch eine weitere Abhängigkeit von der Glucoseanfangskonzentration betrachtet werden, die ebenfalls für die numerische Auswertung der Ergebnisse wichtig ist:

Die Abhängigkeit des Kurvenverlaufs von der Konzentration an eingesetzter Glucose. Die unterschiedliche Form der Atmungskurven der Abbildung 4.5 für die Gefäße A und B wurde in Kapitel 4.2 begründet. Über die Abhängigkeit der verschiedenen Atmungsphasen von der Anfangsglucosekonzentration kann folgendes ausgesagt werden: Das erste Sauerstoffminimum ist mit steigender Glucosekonzentration stärker ausgeprägt. Die Dauer der zweiten lag-Phase ist unabhängig von der Glucose-Anfangskonzentration. Das zweite Sauerstoffminimum ist umso geringer, je höher die Glucose-Anfangskonzentration ist. Der Abfall der Sauerstoffkonzentration nach der zweiten lag-Phase ist umso größer, je höher die Glucosekonzentration am Anfang ist. Allgemein zeigt sich, daß die Länge der Atmungsphasen nach dem ersten Sauerstoffminimum unabhängig von der Glucose-Anfangskonzentration ist.

4.5 Bestimmung des Sauerstoffüberganges über die Phasengrenze

Das verwendete System besteht aus zwei Phasen, Gasphase und Flüssigkeitsphase. Während des Wachstums einer Bakterienpopulation in einer batch-Kultur nehmen die Bakterien Sauerstoff aus der flüssigen Phase auf. Gleichzeitig findet eine Nachlieferung von Sauerstoff aus der Gasphase über die Phasengrenze statt. Um diesen Vorgang mathematisch erfassen und den damit verbundenen tatsächlichen Sauerstoffverbrauch von *E. coli* in jeder Phase des Wachstums errechnen zu können, mußten die Übergangskoeffizienten für Sauerstoff von der Gasphase in die Flüssigkeitsphase und umgekehrt durch Versuche ermittelt werden.

Für diese Versuche wurde ebenfalls das in Kapitel 3 beschriebene System verwendet. An den Parametern für die Rührintensität und dem Verhältnis Gasphase zu Flüssigkeitsphase wurde nichts geändert. Die Temperatur wurde ebenfalls auf 37° C eingestellt. Es wurden keine Bakterien eingimpft, außerdem enthielt die Nährlösung keine Mangelsubstanz. Auf Sterilität des Systems konnte deshalb in diesen Versuchen verzichtet werden.

Die Übergangsfunktionen für Sauerstoff konnten nun durch jeweiliges Wechseln der Gasphase mit reinem Stickstoff und Luft aufgenommen werden. Dabei wurde so vorgegangen, daß zuerst zwanzig Sekunden reiner Stickstoff von oben durch den Hahn mit ungefähr 0,5 atm eingeblasen wurde. Vor dem Einleiten befand sich das System im Gleichgewicht. Zum Druckausgleich wurde der mittlere Stopfen herausgenommen. Nach zwanzig Sekunden wurden Hahn und Stopfenöffnung sofort wieder geschlossen. Während dieser Zeit reagierte die Elektrode nur sehr gering. Der Sauerstoffgehalt der flüssigen Phase sank nun nach einer exponentiellen Funktion bis auf einen konstanten Gleichgewichtswert ab. Die aufgenommene Übergangsfunktion entspricht dem Übergang von Sauerstoff aus der flüssigen in die gasförmige Phase. Blieb der Gleichgewichtswert einige Zeit konstant, wurde die Gasphase gewechselt und durch Preßluft ersetzt. Auch hier war der Ausschlag der Elektrode während des Einleitens im Vergleich zum

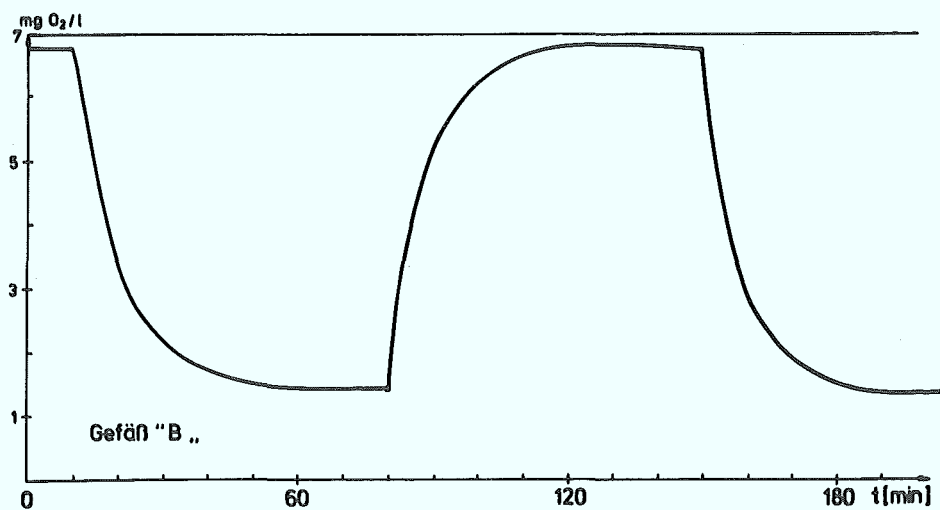
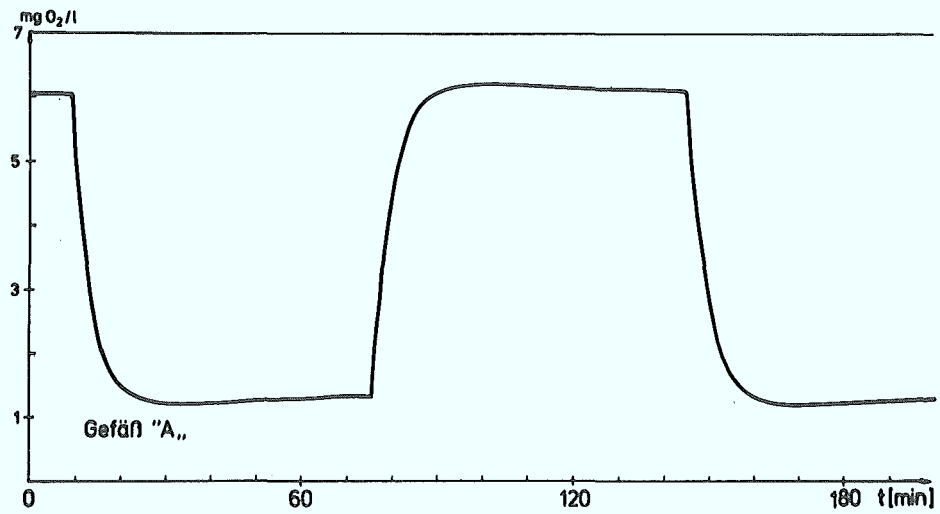


Abb. 4.8 Messungen zur Bestimmung des Sauerstoffübergangskoeffizienten für beide Gefäße. Die Gasphase wurde jeweils mit Luft bzw. Stickstoff beladen und der Sauerstoffgehalt in der Lösung zeitlich verfolgt.

Gesamtausschlag der aufgenommenen Funktion gering. Der Sauerstoffgehalt in der Lösung stieg nach einer exponentiellen Funktion an. Diese exponentielle Funktion entspricht dem Übergang des Sauerstoffs von der gasförmigen in die flüssige Phase. Diese Sauerstoffübergangsfunktionen wurden aus den in Kapitel 4.2 beschriebenen Gründen für beide Gefäße, A und B, aufgenommen. Die aufgenommenen Übergangsfunktionen dokumentiert Abbildung 4.6. Aus der Abbildung 4.6 ist deutlich zu ersehen, daß sich der Sauerstoff-Endwert für beide Gefäße mit unterschiedlicher Geschwindigkeit einstellt. Dies war zu erwarten, da auch die Atmungskurven keine Übereinstimmung zeigten. Wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich ist, sind durch die Unterschiede in der Form der Rührkegel auch die Oberflächen für den Gasaustausch verschieden.

Zur Berechnung der Sauerstoffübergangskoeffizienten wurden für die aufgenommenen Übergangsfunktionen folgende Ansätze gemacht:

I. Übergang von Sauerstoff aus der flüssigen in die gasförmige Phase

$$-dS_{fl}/dt = k_1(S_{fl}-S_s)$$

Das heißt, die Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit mit der Zeit dS_{fl}/dt ist gleich dem Sauerstoffübergangskoeffizienten k_1 mal der Konzentrationsdifferenz zwischen der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit und dem Sauerstoffsättigungswert in der Flüssigkeit (S_s).

Aus der Integration ergibt sich:

$$\ln(S_{fl}-S_s)-\ln(S_o-S_s) = -k_1(t-t_o)$$

$$S_{fl} = S_s + (S_o - S_s) \cdot \exp[-k_1(t-t_o)]$$

S_o = Sauerstoffanfangskonzentration in der Flüssigkeit (mg/l).

Für $t = t_o$ ergibt sich für S_{f1} die Sauerstoffkonzentration S_o .

Für große t bzw. $t \rightarrow \infty$ nähert sich die Sauerstoffkonzentration dem Sättigungswert S_s .

Der Sauerstoffübergangskoeffizient k_1 ergibt sich aus der Steigung der Geradengleichung zu:

$$k_1 = - \frac{\ln \frac{S_s - S_o}{S_{f1} - S_s}}{t - t_o}$$

II. Übergang von Sauerstoff aus der gasförmigen in die flüssige Phase

$$dS_{f1}/dt = k_2 \cdot (S_s - S_{f1})$$

Das heißt, die Zunahme der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit hängt vom Sauerstoffübergangskoeffizienten und der Differenz zwischen Sättigungskonzentration und Konzentration der Flüssigkeit zur Zeit t ab.

Integriert ergibt sich:

$$\ln(S_s - S_{f1}) - \ln(S_s - S_o) = -k_2 \cdot (t - t_o)$$

$$S_{f1} = S_s - (S_s - S_o) \cdot \exp[-k_2 \cdot (t - t_o)]$$

Für $t = t_o$ entspricht S_{f1} der Sauerstoffausgangskonzentration S_o .

Für $t \rightarrow \infty$ ergibt sich für S_{f1} die Sauerstoffsättigungskonzentration S_s .

Der Sauerstoffübergangskoeffizient k_2 ergibt sich auf die gleiche Weise wie in I. aus der Steigung der zugehörigen Geradengleichung.

Die Übergangsfunktionen wurden mehrmals aufgenommen. Die ermittelten Sauerstoffübergangskoeffizienten k_1 und k_2 sind

für beide Gefäße in der folgenden Tabelle 4.5 zusammengestellt. In die Koeffizienten geht sowohl die Geometrie des Gefäßes wie auch die eingestellte Rührgeschwindigkeit für die Kultur ein.

Mit Hilfe dieser Sauerstoffübergangskoeffizienten wird die in Kapitel 6 beschriebene mathematische Behandlung des Systems ermöglicht.

Tabelle 4.5 Ermittelte Sauerstoffübergangskoeffizienten der aufgenommenen Übergangsfunktionen aus Abb. 4.8

Gefäß A		Gefäß B	
k_1	k_2	k_1	k_2
1,51	1,45	0,97	0,95
1,41	1,39	1,00	1,01
1,40	1,45	0,94	1,04
1,40	1,49	1,02	1,14
1,20	1,26	1,16	0,93
1,18	1,39	0,94	1,17
$1,35 \pm 0,13$	$1,41 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,08$	$1,04 \pm 0,09$

4.6 Zusammenfassung

Als Ergebnisse der Atmungsmessungen von *E. coli* bei geringen Glucosekonzentrationen kann folgendes festgestellt werden: Verfolgt man den Sauerstoffgehalt in der Nährlösung einer wachsenden *E. coli*-Kultur mit Glucose als organische Kohlenstoffquelle, so zeigt sich ein biphasischer Atmungseffekt im Sinne einer Diauxie, obwohl als einzige organische Kohlenstoffquelle nur Glucose eingesetzt wurde. Die Ausprägung des Effektes ist abhängig vom verwendeten System. Die Rührintensität darf nicht zu hoch sein, da man dann nahe am Gleichgewicht zwischen Sauerstoffgehalt in der Gasphase und Sauerstoffgehalt in der Flüssigkeitsphase liegt. Sie darf nicht zu niedrig sein, weil sonst anaerobe Verhältnisse auftreten können. Weitere Systemparameter sind das Verhältnis der Gasphase zur Flüssigkeitsphase im Kulturgefäß und die geometrische Form des Kulturgefäßes. Die geometrische Form bestimmt die Phasengrenzfläche für den Sauerstoffübergang.

Aus der Untersuchung der Abhängigkeit des Effektes von der Rührintensität kann ausgesagt werden, daß der Effekt nicht durch Sauerstoffmangel verursacht wird. Für alle eingestellten Rührintensitäten stellt sich immer der gleiche Endwert ein. Für die Atmungsmessungen von *E. coli* verhält sich das verwendete System ausreichend reproduzierbar. Es besteht eine strenge Proportionalität zwischen angebotener Glucosemenge und verbrauchter Sauerstoffmenge. Es konnte festgestellt werden, daß etwa die Hälfte der Glucose in Bakterienmasse umgewandelt und die andere Hälfte veratmet wird.

Wahrscheinlich werden während des Wachstums von *E. coli* mit Glucose als Mangelsubstanz ein oder mehrere Stoffwechselprodukte ausgeschieden, die erst in der zweiten Phase der Atmung wieder verbraucht werden. Man kann also ähnlich wie DEGN, LILLEØR und IVERSEN 1973 mit Hilfe der Atmungsmessung Stoffwechseländerungen erfassen. Um das System mathematisch zu beschreiben und auszuwerten, müssen der Substrat- und Sauerstoffverbrauch in jeder Phase und das genaue Wachstum bekannt sein. Untersuchungen dazu sowie zur Ursache des zweiten Atmungseffektes werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

5. Messungen zur Ursache der zweiten Atmungsphase

5.1 Atmungsverlauf, Wachstum und Substratverbrauch von E. coli in der Nährlösung

Bei der Interpretation des in Abbildung 4.1 dargestellten Kurvenverlaufs wurde der mit (4) bezeichnete Teil der Kurve als eine Ruhephase bzw. als eine zweite Induktionsphase beschrieben. Ist das der Fall, so müßte es sich hierbei um eine Diauxie handeln. Nach Verbrauch einer Komponente muß für ein zweites Substrat ein neues Enzymsystem induziert werden. Für diesen Fall mußte also bewiesen werden, daß zu Beginn der zweiten lag-Phase kein eingesetztes Substrat mehr vorhanden war.

Es wurde dazu ein Versuch, wie in der im Kapitel 3.2 beschriebenen Weise, angesetzt. Neben der Aufnahme des Sauerstoffkonzentrationsverlaufs in der Nährlösung durch den Schreiber wurden während des gesamten Versuchs in bestimmten Zeitabständen Proben steril mit einer Injektionsspritze entnommen. Die entnommenen Proben wurden durch ein Membranfiltersystem (Millipore/Type HA 0,45 μ Porenweite) filtriert. Das Filtrat war bakterienfrei und konnte so zur Glucosebestimmung verwendet werden. Die Glucose wurde nach der GOD-Methode (Kapitel 3.2.3.2) bestimmt. Das Ergebnis der Messungen wird in Abbildung 5.1 dargestellt.

Um die Bedingungen, die an ein geschlossenes System gestellt werden, nicht zu verletzen, mußten die abgenommenen Probenvolumina so gering wie möglich gehalten werden. Größere Abnahmemengen verändern das Verhältnis von der Gas- zur Flüssigkeitsphase. Dies kann sofort an einer Änderung der Sauerstoffkonzentrationskurve erkannt werden. Durch das vorgegebene Volumen für die Glucosebestimmung und Filtrationsverluste durch das Filtersystem war pro Abnahme mindestens ein Volumen von drei Millilitern erforderlich. Der Glucosekonzentrationsverlauf für die Dauer des gesamten Versuchs wurde deshalb aus zwei Versuchen ermittelt. Der Verlauf der Kurve für die Glucosekon-

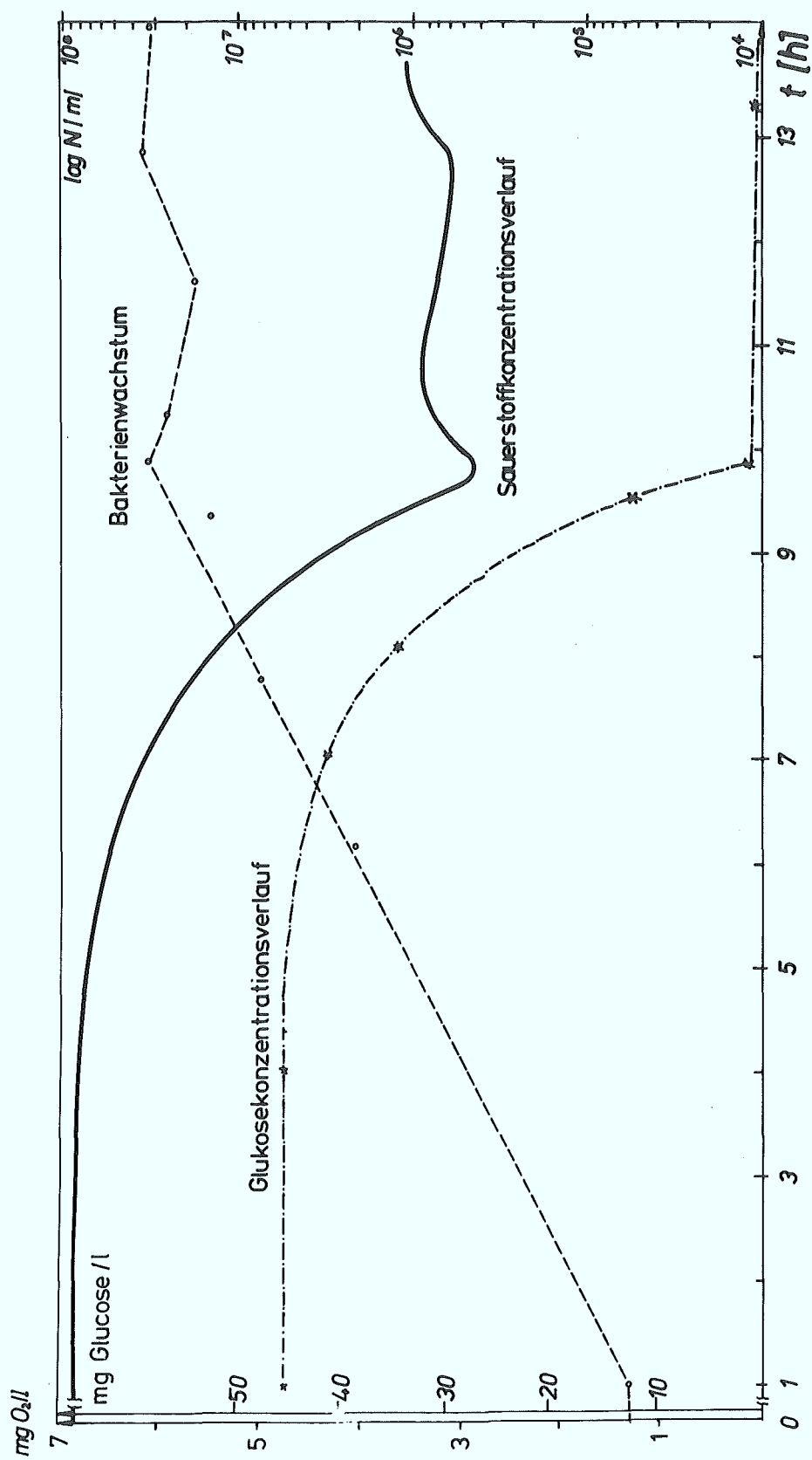


Abb. 5.1: Atmungsverlauf, Wachstum und Glucoseverbrauch von *E. coli* in der Nährlösung vom verwendeten System

zentration ist aber abhängig von der eingepfunden Menge an Bakterien. Die eingepfunde Menge war jedoch unvermeidbaren Streuungen unterworfen, so daß die einzelnen aufgenommenen Kurven geringfügig differieren. Die Gesamtkurve wurde erhalten, indem beide Einzelkurven auf die Glucosekonzentration eine Stunde nach Versuchsbeginn normiert wurden.

Der Verlauf der Glucosekonzentrationskurve beschreibt eine exponentielle Funktion. Aus der Kurve des Glucosekonzentrationsverlaufs ist zu ersehen, daß im ersten Sauerstoffminimum die Glucosekonzentration bereits unterhalb der Nachweisgrenze von 1,0 Milligramm Glucose pro Liter liegt. Als Ergebnis kann damit gesichert ausgesagt werden, daß die unterhalb der Nachweisgrenze liegenden sehr geringen Glucosekonzentrationen auf keinen Fall ausreichen, um die zweite Atmungsphase zu verursachen. Vielmehr kann angenommen werden, daß es sich in diesem Falle um mindestens eine andere Substanz handelt.

Für die Berechnung des Systems war nun weiter wichtig zu wissen, ob die Bakterien während der zweiten Atmungsphase noch wachsen oder ob sich bereits der in der allgemeinen Literatur beschriebene statische Zustand innerhalb des Wachstums eingestellt hat. Für diesen Fall wurde eine Wachstumskurve der Bakterienkultur aufgenommen. Es wurden ebenso wie bei der Glucosekonzentrationsbestimmung in bestimmten Zeitabständen Proben aus einem Versuch steril entnommen. Nach dem in Kapitel 3.2.3.1 beschriebenen KOCH'schen Plattengießverfahren wurde nun die Zahl der lebenden Bakterien bestimmt. Das Verfahren der Trübungsmessung zur Bestimmung der Bakterienkonzentration konnte hier nicht angewendet werden, da auch nicht mehr lebensfähige Bakterien mit in die Extinktion eingehen. Dies gilt besonders für die statische Phase der Wachstumskurve.

Die Wachstumskurve wird ebenfalls, gemeinsam mit der Kurve für den Glucosekonzentrationsverlauf und dem Sauerstoffkonzentrationsverlauf, in der Nährlösung während des Versuchs in Abbildung 5.1 wiedergegeben. Aufgetragen wurde die Bakterienzahl (N/ml) in halblogarithmischem Maßstab gegen die Zeit t (h).

Die Abbildung 5.1 zeigt, daß die Wachstumskurve analog dem Sauerstoffkonzentrationsverlauf in der Nährlösung verläuft. Bis zum ersten Sauerstoffminimum atmen und wachsen die Bakterien exponentiell, ebenso nimmt analog dazu die Substratkonzentration exponentiell ab. Das Wachstum hört dann für kurze Zeit auf.

Um eine gesicherte Aussage über das Wachstumsverhalten der Bakterien in der zweiten Atmungsphase zu machen, wurden außer der in der Abbildung 5.1 dargestellten Wachstumskurve noch zwei weitere Wachstumskurven aufgenommen. Die Wachstumskurven waren nur während der zweiten Atmungsphase interessant und wurden nur vom Zeitpunkt des ersten Sauerstoffminimums an betrachtet. Abbildung 5.2 zeigt die Regressionsgeraden der einzelnen Wachstumskurven. Aufgetragen wurde $\log N$ (Bakterienzahl) / Milliliter gegen die Zeit. Es wurden die Regressionskoeffizienten (R) bestimmt. Sie sind nicht signifikant von 0 verschieden. Danach kann nur folgende Aussage gemacht werden: Es ist ein geringes Wachstum während der zweiten Atmungsphase möglich. Dieses Wachstum läge jedoch innerhalb der Streugrenzen der Methode und ist somit nicht nachweisbar.

Mit Hilfe dieser Feststellungen können nun die Randbedingungen für die in Kapitel 6 behandelte mathematische Erfassung der Kurve für den zeitlichen Sauerstoffkonzentrationsverlauf festgelegt werden. Handelt es sich in diesem Falle wirklich um einen Diauxie-Effekt, obwohl nur ein Substrat als organische Kohlenstoffquelle angeboten wurde, so müssen während des Wachstums von *E. coli* mit Glucose Stoffwechselprodukte ausgeschieden werden, die erst nach dem Verbrauch der Glucose veratmet werden.

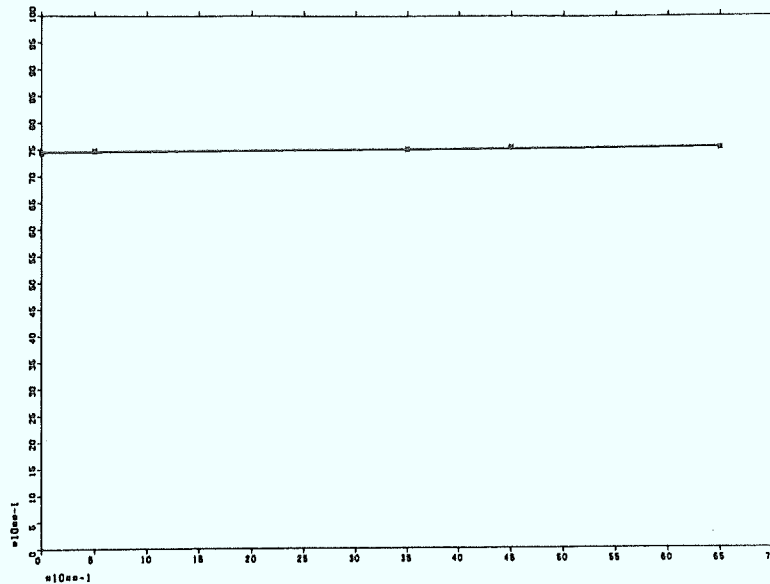
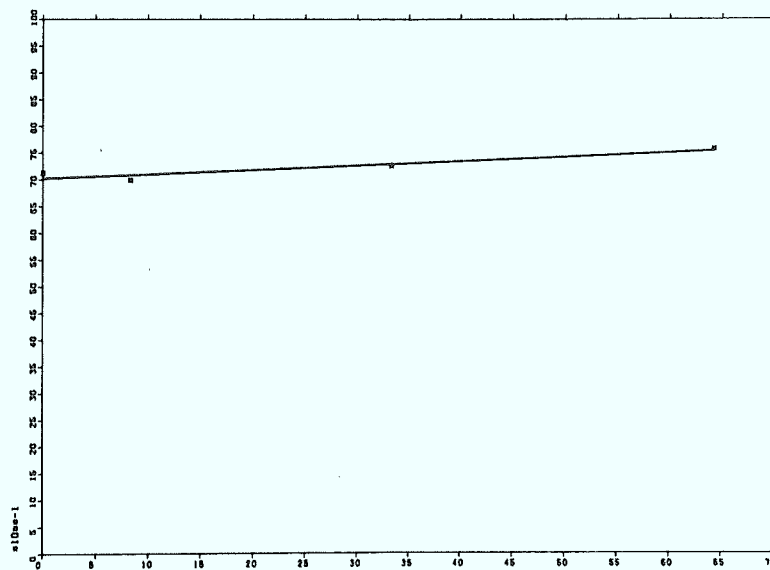
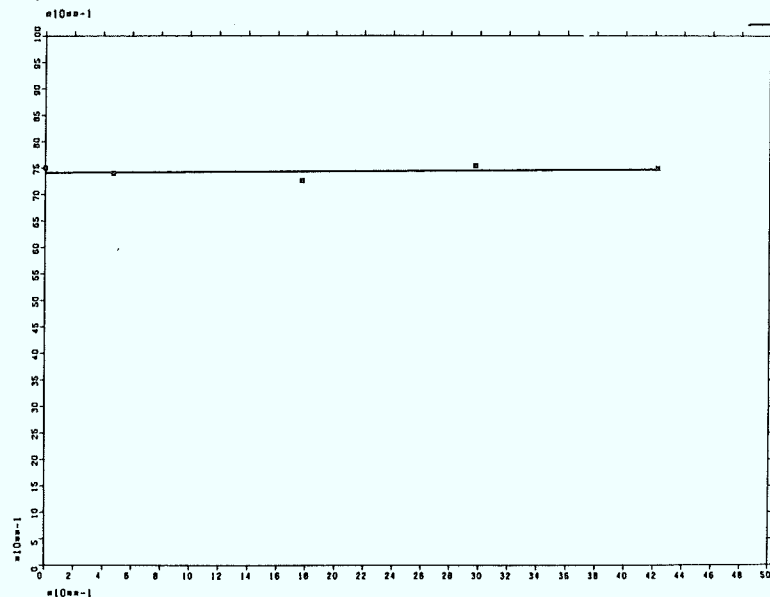
$\log(N/N_0)$  $R = 0,013$ $t \text{ (h)}$ $\log(N/N_0)$  $R = 0,079$ $t \text{ (h)}$ $\log(N/N_0)$  $R = 0,016$ $t \text{ (h)}$

Abb. 5.2: Wachstum von *E. coli* während der zweiten Atmungsphase. Der Zeitpunkt des ersten Sauerstoffminimums wurde mit Null angesetzt.

5.2 Nachweis des "Glucose-Effektes" für das verwendete System

In Kapitel 2.3 wurde eingehend auf die Sonderstellung der Glucose im Zellstoffwechsel von *E. coli* eingegangen. Im wesentlichen wurde dabei festgestellt, daß Glucose den Abbau anderer Stoffwechselprodukte hemmt, d. h., den sogenannten Glucose-Effekt hervorruft. Im folgenden wurde untersucht, ob dies auch bei dem hier verwendeten System der Fall ist. Dazu wird ein weiterer Beweis für die Annahme gewonnen, daß während des Wachstums von *E. coli* mit Glucose ein oder mehrere Stoffwechselprodukte ausgeschieden werden.

Zugrunde gelegt wurde wiederum der in Kapitel 3.2 beschriebene Atmungsversuch. Am Verfahren wurde nichts geändert. Die Glucosekonzentration betrug 45,5 mg/l. Nachdem alle Glucose verbraucht und das Enzym-System für den Abbau der ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte genügend induziert war, wurden in das erste Drittel der zweiten Atmungsphase zwei Milliliter einer einprozentigen sterilen Glucoselösung eingimpft und dabei die Atmung verfolgt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Der Versuch verlief für beide Gefäße reproduzierbar.

Wie aus der Abbildung 5.3 ersichtlich und auch erwartet, reagiert das System sofort auf die zugegebene Glucose. Die Reaktion ist innerhalb der ersten Minute sichtbar. Der Sauerstoffverbrauch der Bakterien nimmt schlagartig zu. Es ist keine Induktionszeit erkennbar. Glucose hemmt sofort das für den Abbau des ausgeschiedenen Stoffwechselproduktes notwendige Enzymsystem. Dies muß nach Verbrauch der Glucose erneut bereitgestellt werden. Es ist außerdem deutlich zu sehen, daß die zweite Atmungsphase nach Verbrauch der zugegebenen Glucose stärker ausgeprägt ist. Es wird also auch hier das gleiche Stoffwechsel-Endprodukt während des Glucose-Abbaus ausgeschieden. Der Endsauerstoffgehalt der Nährlösung entspricht einer primär eingesetzten Glucosekonzentration von 80 mg/l.

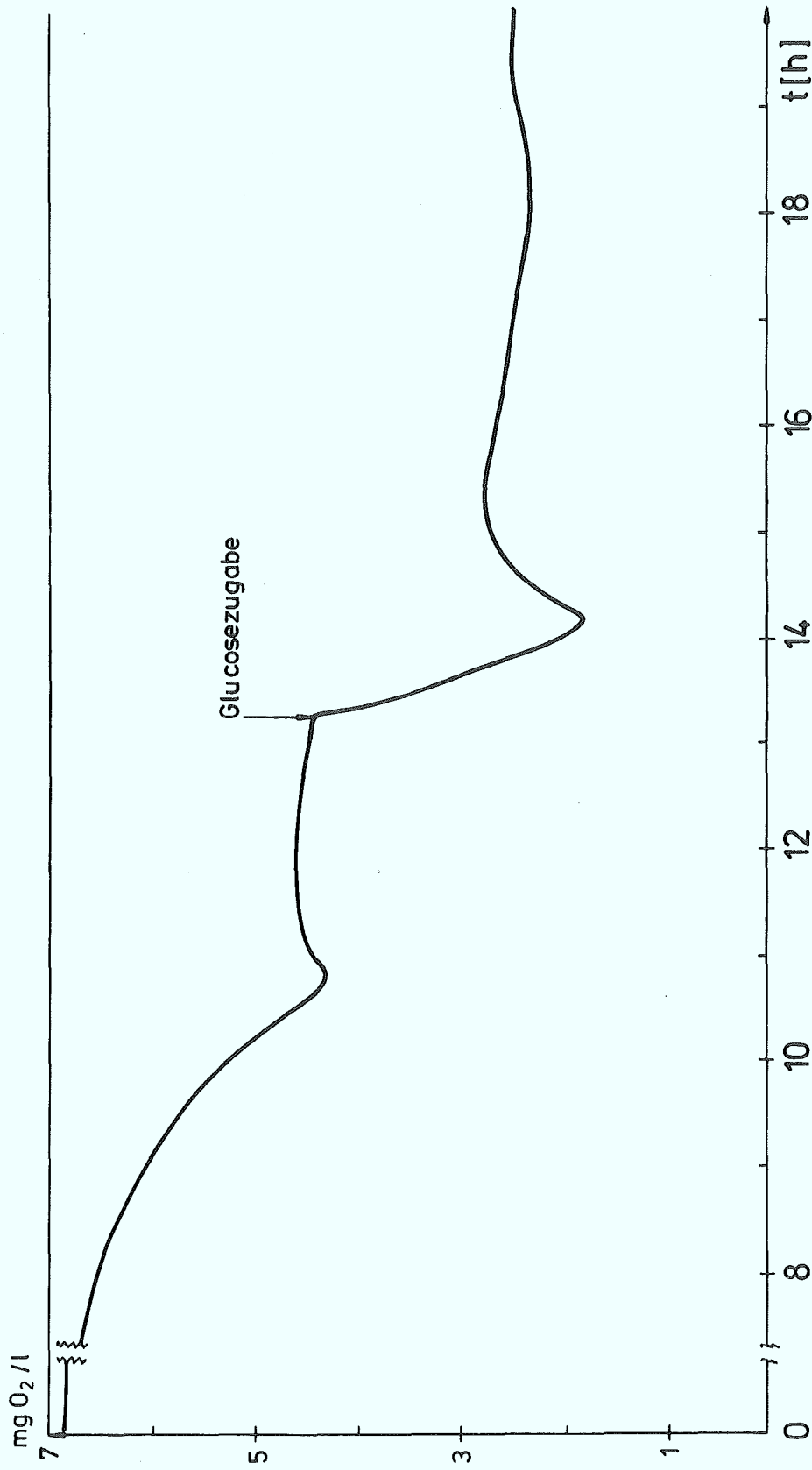


Abb. 5.3: Sauerstoffkonzentrationsverlauf in der Nährlösung während des Wachstums von *E. coli* bei einer Glucosekonzentration von 45,5 mg/l. In die zweite Atmungsphase wurden 2 ml einer einprozentigen Glucoselösung eingeimpft. Verwendet wurde Gefäß 'B'.

5.3 Succinat als organische Kohlenstoffquelle

SCHLESER und FÖRSTEL 1972 stellten fest, daß trotz der geringeren Wachstumsrate von *E. coli* mit Succinat als Kohlenstoffquelle, bei gleichem Ertragskoeffizienten Y im Vergleich zu Glucose als Kohlenstoffquelle, die Aufnahme an Sauerstoff pro Bakterienmasse und Zeit im Succinatmedium wesentlich höher liegt als im Glucosemedium. Das heißt, daß zur Produktion einer bestimmten Bakterientrockenmasse mit Hilfe von Succinat mehr Sauerstoff veratmet werden muß als beim Vorhandensein von Glucose.

Mit Hilfe des in Abbildung 5.4 dargestellten repräsentativen Atmungsversuchs konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Auf die Einzelheiten der acht Versuche mit Succinat wird hier nicht detailliert eingegangen. Für die gleiche Anfangskonzentration an organischer Substanz von 50 mg/l wurde ein Endwert der Sauerstoffkonzentration von $4,05 \pm 0,07$ mg Sauerstoff pro l bei Glucose und von $3,50 \pm 0,04$ mg Sauerstoff pro l bei Succinat gefunden.

Der Sauerstoffkonzentrationsverlauf in der Nährlösung mit Succinat unterscheidet sich vom Effekt her nicht von dem mit Glucose: auch hier treten zwei Atmungsphasen auf. Allerdings scheint mit Succinat die zweite Atmungsphase die Hauptatmung auszumachen. Dauer und Ausprägung der zweiten Atmung sind hier wesentlich intensiver. Es ist keine erste lag-Phase und nur eine sehr viel kürzere zweite lag-Phase von 15 min festzustellen. Das Fehlen der ersten lag-Phase ist evtl. auf die um einen Faktor 500 erhöhte eingepflichte Menge an Bakterien zurückzuführen. Diese große Menge an Impfmateriel war notwendig, da bei der für Glucose benutzten Einimpfmenge von ungefähr $5 \cdot 10^4$ Bakterien pro ml keine Atmung feststellbar war. Die Bakterien wuchsen nicht an. Die Vorbereitung des Impfmateriels war den Versuchen mit Glucose als Kohlenstoffquelle analog.

Es treten auch hier, wie bei den Versuchen mit Glucose, die gleichen Abhängigkeiten vom System und von der Rührgeschwindigkeit auf. Auch hier ist der Endgleichgewichtswert für Sauer-

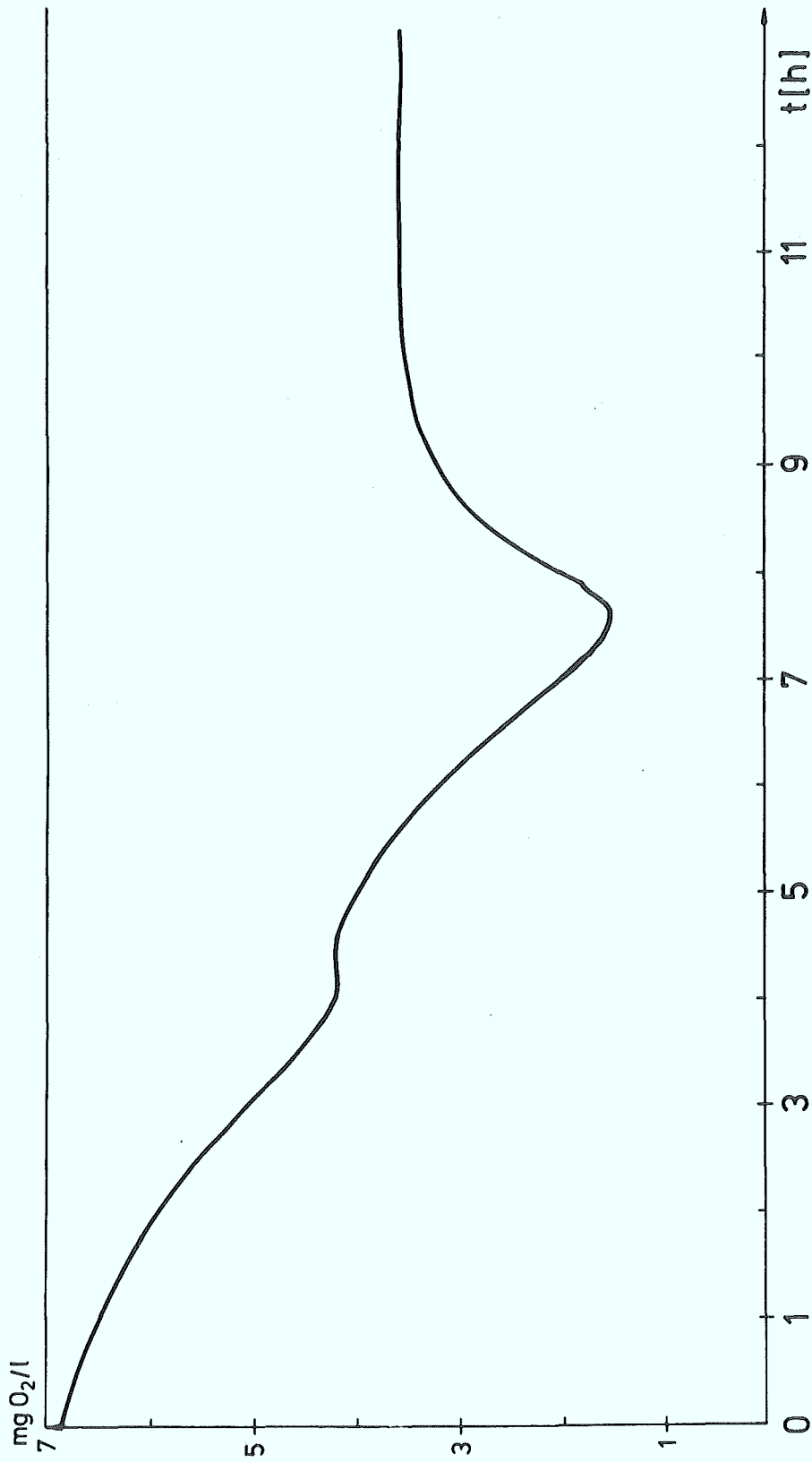


Abb. 5.4: Sauerstoffkonzentrationsverlauf in der Nährlösung bei Wachstum von *E. coli* mit Succinat als organische Kohlenstoffquelle. Konzentration: 50 mg Succinat / l.
Die Kurve wurde mit Gefäß A aufgenommen.

stoff in der Nährlösung für eine Konzentration an Succinat für beide Gefäße gleich. Diese Befunde zeigten die Anwendbarkeit des Systems auch für andere Stoffwechselversuche.

5.4 Ausscheidung von Stoffwechselprodukten während des Wachstums von E. coli mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle

Ein wesentlicher Versuch zur Klärung der Ursache des zweiten Atmungseffektes ist es nachzuweisen, ob während des Wachstums mit Glucose Stoffwechselprodukte abgegeben werden. Dabei ist es wichtig zu wissen, ob eine oder mehrere Substanzen ins Nährmedium ausgeschieden und später wieder aufgenommen werden, oder ob die Substanz innerhalb der Zelle verbleibt. Um diese wichtige Frage zu klären, wurden folgende Versuche durchgeführt.

Zunächst wurde eine batch-Kultur im Erlenmeyer-Kolben mit 5 g Glucose pro l angesetzt. Das Bakterienwachstum wurde mit Hilfe von Trübungsmessungen und der Glucosekonzentrationsverlauf mit dem GOD-Test (Kapitel 3.2.3.2) verfolgt. In einem Vorversuch wurde die Endextinktion für 5 g Glucose pro l für eine Schüttelintensität von 30 % festgestellt. In Kapitel 5.1 konnte gezeigt werden, daß der Glucosegehalt zum Zeitpunkt des ersten Sauerstoffminimums unter die Nachweisgrenze sinkt. Sobald in der angesetzten batch-Kultur die Glucosekonzentration unter die Nachweisgrenze sank, wurde noch eine Stunde gewartet, um die völlige Abwesenheit der Glucose in der Nährlösung zu garantieren. Danach wurden die Bakterien, die sich nun bereits in der statischen Phase befanden, durch ein Millipore-Filtersystem steril abfiltriert. Das glucose- und bakterienfreie Filtrat (1) wurde sofort eingefroren. Es sollte die während des Wachstums ins Nährmedium abgegebenen Substanzen enthalten. Ob im Filtrat tatsächlich ausgeschiedene Stoffwechselprodukte vorhanden waren, konnte mit einem, wie in Kapitel 3.2 beschriebenen, Atmungsversuch geklärt werden. Der Versuch wurde mit 45,5 mg Glucose pro l angesetzt. In das erste Drittel der zweiten Atmungsphase, also nachdem das

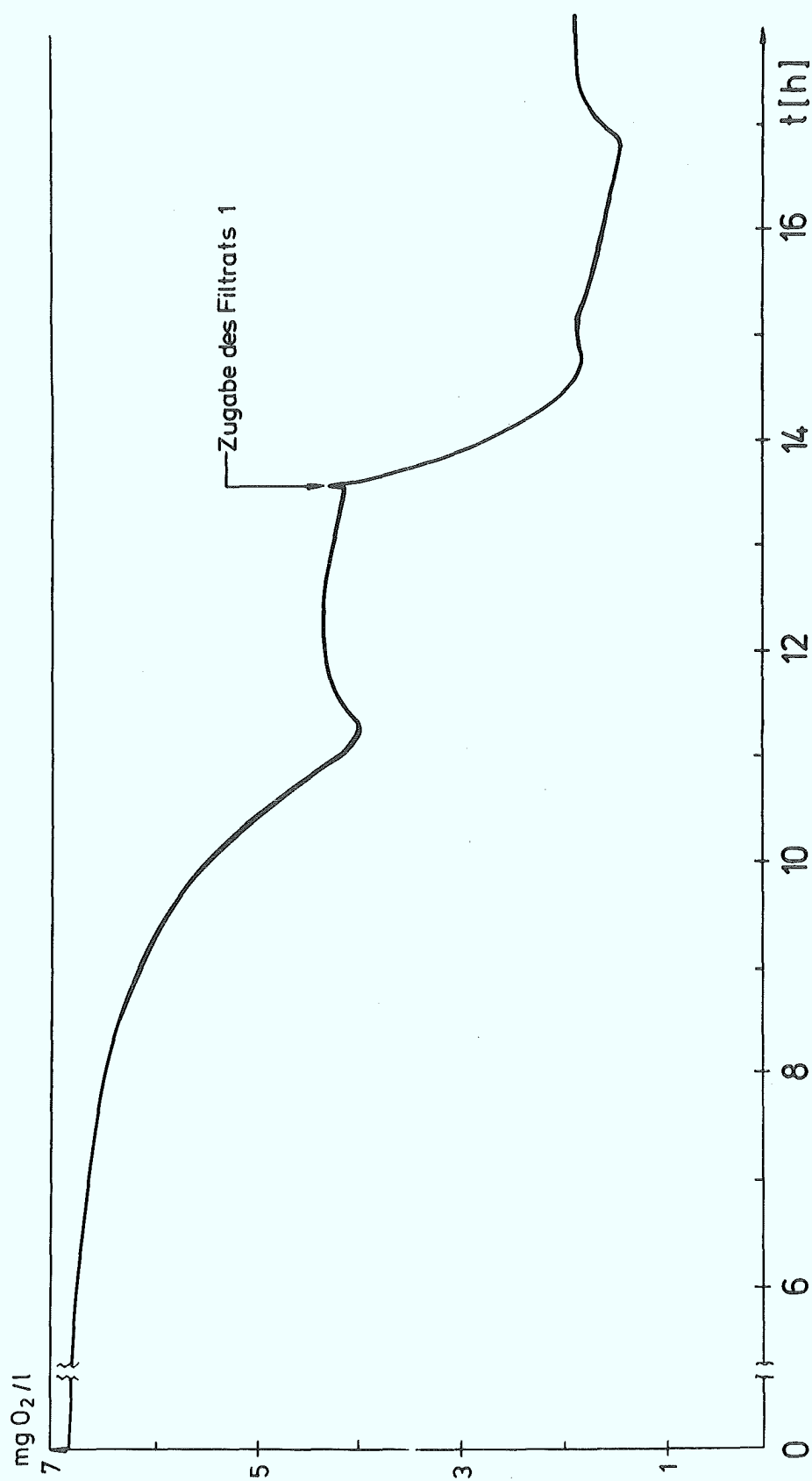


Abb. 5.5: Sauerstoffkonzentrationsverlauf in der Nährlösung während des Wachstums von *E. coli* mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle. In den Beginn der zweiten Atmungsphase wurden 10 ml Filtrat (1) aus einer Anzucht im Erlenmeyerkolben (siehe Text) eingeimpft.

Enzymsystem für den Abbau der Stoffwechselprodukte vollständig bereitgestellt war, wurden zehn Milliliter steriles Filtrat (1) eingeimpft. Ist die Substanz während des Wachstums ins Außenmedium abgegeben worden, so sollte jetzt nach Zugabe dieser Substanz mit einer verstärkten Veratmung zu rechnen sein. Dies sollte am stärkeren Abfall der Sauerstoffkonzentration in der Nährlösung erkannt werden.

Es ergab sich aber dabei der in Abbildung 5.5 dargestellte Kurvenverlauf. Man sieht, daß sofort nach der Zugabe des Filtrats die Sauerstoffkonzentration stark abnimmt. Die aufgenommene Atmungskurve ähnelt der Abbildung 5.3. Obwohl nur mit einer verstärkten zweiten Atmung gerechnet wurde, entstehen nach der Zugabe noch zwei Sauerstoffminima. Das Filtrat war jedoch vollkommen glucosefrei. Um zu überprüfen, ob während des Wachstums im Erlenmeyer anaerobe Verhältnisse aufgetreten sind, wurde der Sauerstoffgehalt während der experimentellen Wachstumsphase verfolgt. Dabei wurde festgestellt, daß der Sauerstoffgehalt der Kultur bis 0,1 mg Sauerstoff pro l absank, d. h., die Kultur befand sich längere Zeit am Rande zu anaeroben Verhältnissen. Es kann jedoch nicht sicher ausgesagt werden, ob sich schon ein Teil der Bakterien unter anaeroben Verhältnissen vermehrte. *E. coli* scheidet unter anaeroben Verhältnissen unter anderem Lactat ins Nährmedium aus.

Um die Fehlerquelle auszuschalten, daß durch anaerobe Verhältnisse die Glucose über einen anderen Stoffwechselweg abgebaut wird, wurde eine neue batch-Kultur unter gesichert aeroben Verhältnissen mit 5 g Glucose pro l angesezt. Die Kulturlösung wurde von unten mit steriler Luft durchperlt, so mit Sauerstoff versorgt und gleichzeitig durchmischt. Als Gefäß wurde ein doppelmanteliges Glasgefäß zur Thermostatisierung der Kultur mit Aufsatzkühler verwendet. Nachdem der Glucosegehalt unter die Nachweisgrenze gesunken war, wurde auch hier steril filtriert (Filtrat (2)). Wenn jetzt Stoffwechselprodukte ausgeschieden worden sind, dann unter gesichert aeroben Verhältnissen. Der gleiche Vorgang wie oben wurde wiederholt. Eingeimpft wurde nur Filtrat (2).

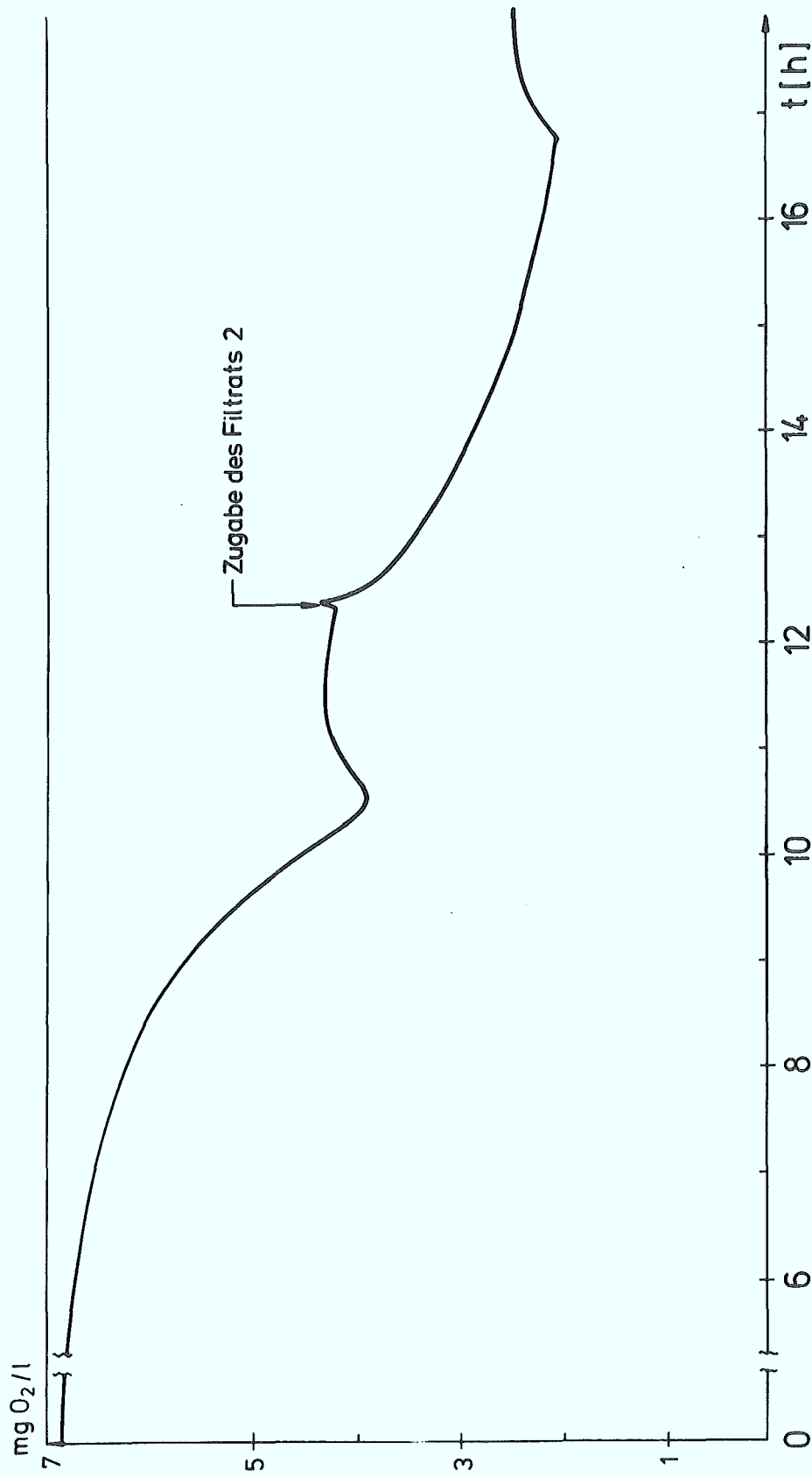


Abb. 5.6: Sauerstoffkonzentrationsverlauf in der Nährlösung während des Wachstums von *E. coli* mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle. In den Beginn der zweiten Atmungsphase wurden 10 ml Filtrat (2) aus einer luftdurchperlten Kultur (siehe Text) eingeimpft.

Der dabei aufgenommene Atmungsverlauf wird in Abbildung 5.6 dargestellt. Man sieht, daß nach der Zugabe von Filtrat (2) lediglich eine stärkere Veratmung der in der zweiten Atmungsphase abgebauten Stoffwechselprodukte stattfindet. Es entsteht ein Einimpfpeak, der wahrscheinlich auf die relativ große Temperaturdifferenz zwischen eingepfitem Filtrat und Kulturlösung zurückzuführen ist. Als Ergebnis kann damit festgestellt werden, daß *E. coli* beim Abbau von Glucose als einziger Kohlenstoffquelle Stoffwechselprodukte ins Nährmedium ausscheidet, die nach vollständigem Abbau der Glucose und einer Induktionszeit wieder aufgenommen und veratmet werden. Es werden je nachdem, ob das Wachstum unter aeroben oder unter anaeroben Verhältnissen erfolgt, andere Stoffwechselprodukte ausgeschieden. Es konnte gezeigt werden, daß die unter aeroben Verhältnissen gebildeten Stoffwechselprodukte tatsächlich ins Außenmedium abgegeben werden und für die zweite Atmungsphase verantwortlich sind.

Ein Nachweis, um welche Stoffwechselprodukte es sich dabei handelt, konnte nicht erbracht werden. Es wurde lediglich auf Lactat getestet, da *E. coli* unter anaeroben Bedingungen Lactat ausscheidet. Für den Nachweis wurde eine Biochemica-Testkombination der Firma Boehringer (TC-B 15972 TLAA) verwendet. Dabei wurde der Teil des Testes für die Eiweißfällung weggelassen. Zur Bestimmung wurden nur bakterienfreie Lösungen eingesetzt. Der Test wurde mit einem inneren Standard durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß es sich bei den ausgeschiedenen Stoffwechselprodukten nicht um Lactat handelt.

Weiterhin kann ausgeschlossen werden, daß Verunreinigungen in der verwendeten Glucose diese zweite Atmung verursachen (persönliche Mitteilung von Dr. Möckel der Firma Merck, Darmstadt). Dies wird auch durch die in Kapitel 6 errechnete spezifische Atmungsrate für die zweite Atmungsphase widerlegt. Hier wird festgestellt, daß die spezifischen Atmungsraten für beide Atmungsphasen etwa gleich groß sind. Die Verunreinigung müßte praktisch die Hälfte der Substanz ausmachen.

6. Mathematische Erfassung des Sauerstoffkonzentrationsverlaufs in der Nährlösung während des Wachstums von E. coli

6.1 Theoretische Beschreibung des Systems

Zur Untersuchung von Respirationsvorgängen in einem abgeschlossenen Zweiphasensystem ist eine theoretische Erfassung des Sauerstoffverhaltens im Gesamtsystem notwendig. Denn erst die mathematische Erfassung der im System ablaufenden Vorgänge erlaubt, durch gezielte Änderung verschiedener Systemgrößen, die Optimierung hinsichtlich der gerade durchzuführenden Experimente.

Zur mathematischen Behandlung wird eine experimentell aufgenommene Atmungskurve (wie Abbildung 4.1) zugrunde gelegt. Da der Gesamtverlauf der Atmungskurve nicht in geschlossener Form darstellbar ist (Auftreten mehrerer Unstetigkeitsstellen), ist es für die Rechnungen sinnvoll, den Gesamtverlauf in vier Teilbereiche, die geschlossen darstellbar sind, zu unterteilen:

1. Abfall der Atmungskurve bis zum ersten Sauerstoffminimum;
2. Anstieg der Atmungskurve vom ersten Sauerstoffminimum bis zum Beginn des zweiten Abfalls der Sauerstoffkonzentration;
3. Abfall der Atmungskurve bis zum zweiten Sauerstoffminimum;
4. Gleichgewichtseinstellung nach dem zweiten Sauerstoffminimum. Abbildung 6.1 zeigt den skizzierten Sauerstoffkonzentrationsverlauf in der Nährlösung mit den in der Ableitung verwendeten Zeitangaben.

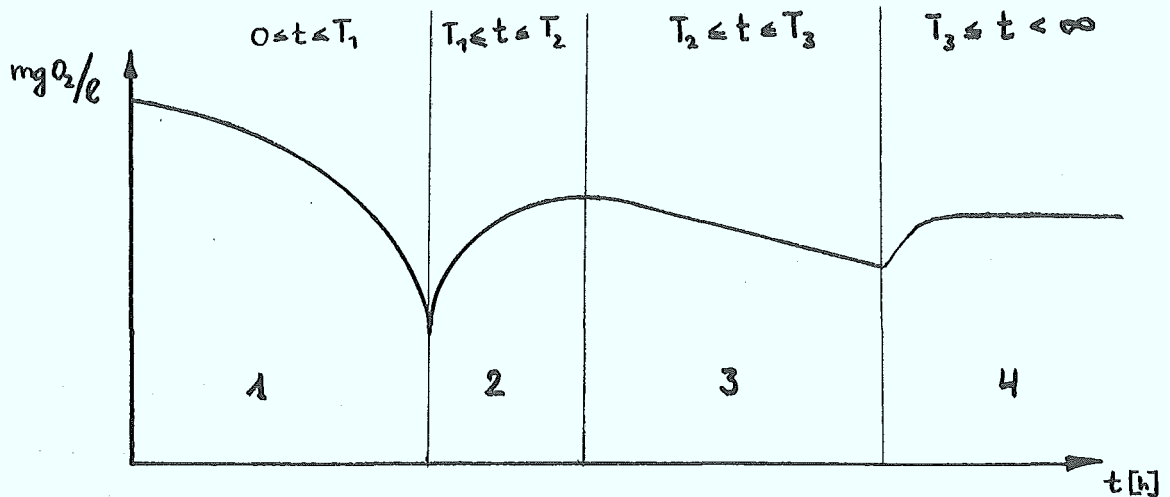


Abb. 6.1 Skizzierter Sauerstoffkonzentrationsverlauf in der Nährlösung mit den in der Ableitung verwendeten Zeitangaben.

Die bei den Ableitungen verwendeten Symbole sind der Übersichtlichkeit halber an den Anfang des Kapitels gestellt.

Symbol	Dimension	Erläuterung
S_{fl}	(mg/l)	Konzentration des Sauerstoffs in der Flüssigkeitsphase zur Zeit t
$S_{fl}(\text{Ende})$	(mg/l)	Konzentration des Sauerstoffs nach der zweiten Atmungsphase im Gleichgewicht
S_o	(mg/l)	Anfangskonzentration des Sauerstoffs in der flüssigen Phase
S_B	(mg/l)	Sauerstoffaufnahme pro Volumeneinheit der Bakterien
S_g	(mg/l)	Sauerstoffkonzentration der Gasphase
S_s	(mg/l)	Sättigungswert der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigkeit
M_{tot}^a	(mg)	Menge an Sauerstoff im Gesamtsystem zur Zeit $t = t_o$
M_{tot}	(mg)	Menge an Sauerstoff im Gesamtsystem zur Zeit t
C	(mg/l)	Konzentration der organischen Kohlenstoffquelle

C_o	(mg/l)	Anfangskonzentration der organischen Kohlenstoffquelle
N	(mg/l)	Trockenmasse der Bakterien pro Volumeneinheit zur Zeit t
N_o	(mg/l)	Trockenmasse der Bakterien pro Volumeneinheit zur Zeit $t = t_o$ (Bakterienanfangskonzentration)
k	(h ⁻¹)	Sauerstoffübergangskoeffizient: Gas-Flüssigkeitsphase
$\alpha = \frac{S_{fl}}{S_g}$		Bunsenscher Absorptionskoeffizient
a		Sauerstoffverbrauchskoeffizient
Y		Ertragskoeffizient
μ	(h ⁻¹)	spezifische Wachstumsrate der Bakterien
Q	(h ⁻¹)	spezifische Atmungsrate der Bakterien
V_g	(l)	Volumen der Gasphase
V_{fl}	(l)	Volumen der Flüssigkeitsphase.

Wird eine vorgegebene Menge Bakterien (N_o) in die flüssige Phase des Systems eingebracht, so nimmt aufgrund der Respiration der Zellen der Sauerstoffgehalt der flüssigen Phase ab. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht im Sauerstoffpartialdruck zwischen flüssiger und gasförmiger Phase. Dieses Ungleichgewicht bewirkt eine Teilnachlieferung von Sauerstoff aus der Gas- in die Flüssigkeitsphase. Das System versucht wieder einen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Die Größe des Ungleichgewichtes von Sauerstoff in der flüssigen und gasförmigen Phase hängt von zwei Größen ab: der spezifischen Atmungsrate der Mikroorganismen einerseits und dem Sauerstoffübergangskoeffizienten, gegeben durch verschiedene Rührgeschwindigkeiten, andererseits. Die Änderung des Sauerstoffgehaltes der flüssigen Phase ergibt sich aus der Bilanz des Sauerstoffverhaltens.

Handwritten signature or stamp in the bottom right corner.

Änderung von O_2 in der flüssigen Phase $\equiv$ Verbrauch an O_2 durch Bakterien $+$ Nachlieferung an O_2 aus der Gasphase

$$(1) \quad \frac{dS_{fe}}{dt} = \frac{dS_B}{dt} + K \cdot (\alpha \cdot S_g - S_{fe})$$

Die Aufnahme von Sauerstoff durch die Bakterien wird wie folgt erhalten:

$$\frac{dS_B}{dt} = -\frac{\alpha}{Y} \cdot \mu \cdot N = -Q \cdot N$$

Daraus folgt für Gleichung (1):

$$(2) \quad \frac{dS_{fe}}{dt} = -Q \cdot N + K \cdot (\alpha \cdot S_g - S_{fe})$$

Die Änderung des Sauerstoffgehaltes in der Gasphase ergibt sich aus der Bilanzgleichung für den Gesamtsauerstoff im System gemäß folgenden Ansätzen:

$$M_{tot}^a = S_g(t_0) \cdot V_g + S_{fe}(t_0) \cdot V_{fe}$$

$$M_{tot}(t) = S_g(t) \cdot V_g + S_{fe}(t) \cdot V_{fe} = M_{tot}^a - Q \cdot V_{fe} \cdot \int_{t_0}^t N \cdot dt$$

Auflösen nach $S_g(t)$ liefert:

$$S_g(t) = \frac{1}{V_g} \cdot \left(M_{tot}^a - Q \cdot V_{fe} \cdot \int_{t_0}^t N \cdot dt - S_{fe}(t) \cdot V_{fe} \right)$$

Damit erhält die Formel (2) folgende Gestalt:

$$\frac{dS_{fe}}{dt} = -Q \cdot N + K \cdot \left[\frac{\alpha}{V_g} \cdot \left(M_{tot}^a - Q \cdot V_{fe} \cdot \int_{t_0}^t N \cdot dt - S_{fe}(t) \cdot V_{fe} \right) - S_{fe} \right]$$

$$(3) \quad \frac{dS_{fe}}{dt} + K \cdot (\beta + 1) \cdot S_{fe} = \frac{\beta \cdot K}{V_{fe}} \cdot M_{tot}^a - Q \cdot \left(N + K \cdot \beta \cdot \int_{t_0}^t N \cdot dt \right)$$

Hierbei wurde $\frac{\alpha \cdot V_{fe}}{V_g} = \varphi$ gesetzt. φ soll eine Empfindlichkeit des Systems bezüglich Änderungen im Sauerstoffgehalt der flüssigen Phase darstellen.

Für das Verhalten des Sauerstoffs in der flüssigen Phase bis zum ersten Minimum der Atmungsphase ergibt sich somit:

$$(4) \quad S_{fe} = S_o \cdot \exp[-k \cdot (\varphi + 1) \cdot t] + \left(\frac{\varphi \cdot M_{tot}^a}{(\varphi + 1) V_{fe}} + \frac{Q N_o \varphi}{\mu (\varphi + 1)} \right) \cdot \left(1 - \exp[-k \cdot (\varphi + 1) \cdot t] \right) - \frac{Q N_o}{\mu + k \cdot (\varphi + 1)} \cdot \left(1 + \frac{k \cdot \varphi}{\mu} \right) \cdot \left(\exp[\mu \cdot t] - \exp[-k \cdot (\varphi + 1) \cdot t] \right)$$

Diese Formel gilt für alle Zeitwerte $t \leq T_1$, wenn unter T_1 die Zeit bis zum ersten Minimum der Atmungskurve verstanden wird.

Vereinfachung liefert:

$$(5) \quad S_{fe} = S_o + \frac{Q \cdot N_o \cdot K}{A \cdot (\mu + A)} \cdot \exp[-A \cdot t] - \frac{Q N_o}{\mu} \cdot \left(\frac{\mu + k \cdot \varphi}{\mu + A} \right) \cdot \exp[\mu \cdot t] + \frac{Q \cdot N_o \cdot K \cdot \varphi}{\mu \cdot A}$$

$$\text{mit: } A = k \cdot (\varphi + 1)$$

Formel (5) beschreibt das Verhalten des gelösten Sauerstoffs in der Nährlösung, solange die Bakterien wachsen ($\mu = \text{konst.} > 0$). Dabei ist in der Ableitung nur die exponentielle Wachstumsphase berücksichtigt, da das Wachstum während der lag-Phase mathematisch nicht erfaßbar ist.

Ist die eingesetzte Menge organischer Substanz der Nährlösung verbraucht, so scheint gemäß den Experimenten das Wachstum der Bakterien aufzuhören ($\mu = 0$).

Zählungen der Bakterien über das erste Minimum $t = T_1$ der Atmungskurve hinaus ergaben mit den verwendeten Nachweismethoden keine weitere Zunahme der Bakterien (Abbildung 5.2).

Mit dem Ende des Bakterienwachstums scheint zunächst die weitere Aufnahme an Sauerstoff durch die Bakterien aufzuhören. Das heißt: Sauerstoff aus der Gasphase kann das Defizit der flüssigen Phase bis zum Gleichgewichtswert ausgleichen. Unter Nichtberücksichtigung der zweiten Atmungsphase, um den Verbrauch an Sauerstoff bis zum ersten Minimum (T_1) bestimmen zu können, gilt für die Nachlieferung an Sauerstoff in die flüssige Phase:

$$(6) \quad \frac{dS_{fe}}{dt} = k(S_s - S_{fe})$$

Der Sättigungswert des Sauerstoffs in der Nährlösung S_s , zur Zeit T_1 , ergibt sich aus der Sauerstoffbilanz für diesen Zeitpunkt:

$$M_{tot}(T_1) = M_{tot}^a - Q \cdot V_{fe} \cdot \int_0^{T_1} N \cdot dt$$

$$S_g \cdot V_g + S_{fe} \cdot V_{fe} = M_{tot}^a - \frac{Q \cdot V_{fe} \cdot N_0}{\mu} \cdot (\exp[\mu \cdot T_1] - 1)$$

$$S_{fe}^s(T_1) \cdot \left(\frac{V_g}{\alpha} + V_{fe} \right) = M_{tot}^a - \frac{Q \cdot V_{fe} \cdot N_0}{\mu} \cdot (\exp[\mu \cdot T_1] - 1)$$

Mit $S_{f1}^s = S_s$ folgt weiter:

$$(7) \quad S_s(T_1) = \frac{\alpha \cdot M_{tot}^a}{V_g \cdot (1 + \varphi)} - \frac{Q \cdot \varphi}{\mu \cdot (\varphi + 1)} \cdot (N(T_1) - N_0)$$

Die Sauerstoffkonzentration S_{f1} zur Zeit T_1 folgt aus Gleichung (5) für $t = T_1$ zu:

$$(8) \quad S_{fe} = S_0 + \frac{Q \cdot N_0 \cdot K}{A \cdot (\mu + A)} \cdot \exp[-A \cdot T_1] - \frac{Q \cdot N_0 \cdot (\mu + K)}{\mu \cdot (\mu + A)} \cdot \exp[\mu \cdot T_1] + \frac{Q \cdot N_0 \cdot K \cdot \varphi}{\mu \cdot A}$$

Unter Berücksichtigung von (7) und (8) folgt damit für die Lösung von Gleichung (6):

$$S_{fe}(t - T_1) = \frac{\alpha \cdot M_{tot}^a}{V_g \cdot (1 + \varphi)} - \frac{Q \cdot \varphi}{\mu \cdot (\varphi + 1)} \cdot (N - N_0) - \left[\frac{\alpha \cdot M_{tot}^a}{V_g \cdot (1 + \varphi)} - \frac{Q \cdot \varphi}{\mu \cdot (\varphi + 1)} \cdot (N - N_0) \right. \\ \left. - S_0 - \frac{1}{(\varphi + 1) \cdot [\mu + K \cdot (\varphi + 1)]} \cdot \left(Q \cdot N_0 \cdot (\varphi + \exp[-A \cdot T_1]) - Q \cdot N \cdot (1 + \varphi) - \alpha \cdot \varphi \cdot C_0 \cdot K \cdot (\varphi + 1) \right) \right]$$

Umformungen liefern:

$$(9) S_{f1}(t-T_1) = S_o - \frac{\rho a C_o \exp[-k(t-T_1)]}{\rho+1} \frac{QN - QN_o \exp[-AT_1]}{(1+\rho)[\mu+k(\rho+1)]}$$

Für $t \rightarrow \infty$ stellt sich der Gleichgewichtswert in der Nährlösung ein. Er folgt zu:

$$S_{f1} = S_o - \frac{\rho a C_o}{\rho+1}$$

Man sieht daraus, daß der Endwert der Sauerstoffkonzentration in der Lösung von drei Größen abhängt:

1. der eingesetzten Menge organischer Substanz C_o
2. dem Sauerstoffverbrauchs-koeffizienten a
3. der Empfindlichkeit des Systems ρ .

Die Abnahme des Sauerstoffs in der Nährlösung $\Delta S = S_{f1} - S_o$ ist a und C_o direkt proportional. Für sehr große Empfindlichkeit des Systems (großes ρ), ist $V_{f1} \gg V_g$. Dann gilt:

$$\Delta S \approx - a C_o$$

und der gesamte Sauerstoffbedarf der Bakterien wird der Nährlösung entzogen. Ist die Empfindlichkeit des Systems klein (kleines ρ), d. h. V_g groß gegenüber V_{f1} , so gilt:

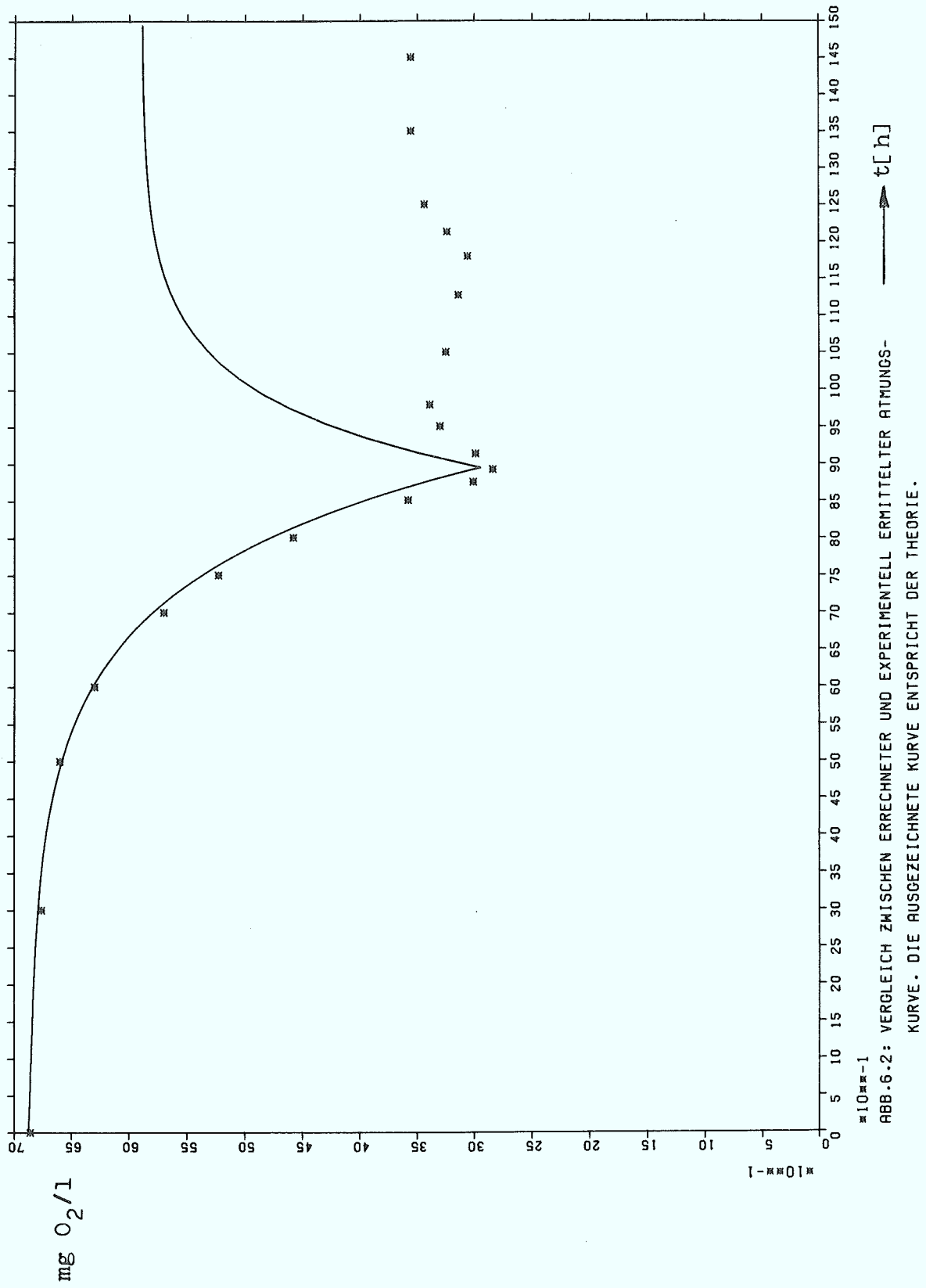
$$\Delta S \approx - \rho a C_o$$

und die Abnahme an Sauerstoff in der Flüssigkeit ist nur sehr gering. Wie die anschließenden Parameterstudien zeigen, kann in diesem Falle zwar noch ein Atmungsminimum zu sehen sein, aber der Endwert ist nur geringfügig kleiner als der Anfangswert. Ein a -Wert ist dann nur schlecht bestimmbar.

Abbildung 6.2 zeigt den Vergleich zwischen theoretisch errechneter und experimentell ermittelter Atmungskurve. Die Dauer der exponentiellen Wachstumsphase wurde aus der gemessenen Bakteriendichte N und N_0 der Atmungskurve errechnet. Um einen Vergleich von Theorie und Experiment zu ermöglichen, wurde die lag-Phase des Experiments nicht berücksichtigt. Dabei wird vorausgesetzt, daß die Zunahme der Bakteriendichte in der lag-Phase vernachlässigbar ist.

Der Kurvenverlauf wurde mit Hilfe eines FORTRAN-Programms, dem die abgeleiteten Formeln zugrunde liegen, auf einem IBM-370-Rechner ermittelt.

Der erste Teil der Atmungskurve bis zum Zeitpunkt T_1 ist durch die Theorie recht gut beschreibbar. Die theoretisch zu erwartende Spitze zum Zeitpunkt T_1 , wonach für $t > T_1$ sofort wieder ein steiler Anstieg der Sauerstoffkonzentration erfolgen sollte, entspricht jedoch nicht dem Experiment. Dafür ist folgender Grund verantwortlich: Vergleicht man die Steigung der Atmungskurve für $t > T_1$, so ist diese im Experiment geringer als nach der Theorie zu erwarten wäre. Das läßt darauf schließen, daß die Atmungsintensität nur herabgesetzt ist und erst zur Zeit $t = T_2$ wieder stark zunimmt. Es ist somit die von der Theorie angenommene spezifische Atmungsrate von $Q = 0$ zur Zeit $t = T_1$ nicht korrekt. Ist die Sauerstoffaufnahme durch die Bakterien jedoch nur herabgesetzt, so daß zunächst die Nachlieferung von Sauerstoff aus der Gasphase größer ist als die Aufnahmerate durch die Bakterien, muß ein derartig ausgeprägtes Minimum erwartet werden. Der Verlauf der theoretischen Kurve für $t > T_1$ entspricht der Übergangsfunktion für Sauerstoff von der gasförmigen in die flüssige Phase mit dem in Kapitel 4.6 ermittelten Sauerstoffübergangskoeffizienten $k_2 = 1,04 \cdot h^{-1}$.



Der Vergleich zwischen Theorie und Experiment läßt weiterhin Aussagen über die spezifische Atmungsrate für beide Atmungsphasen zu. Es errechnet sich die spezifische Atmungsrate für die erste Atmungsphase Q_1 aus Gleichung (3) durch Umstellung zu:

$$Q_1 = \frac{\frac{k \cdot g \cdot M_{\text{tot}}^{\infty}}{V_{\text{fe}}} - \frac{dS_{\text{fe}}}{dt} - k \cdot (g+1) \cdot S_{\text{fe}}}{N + k \cdot g \cdot \int_{t_0}^{t_1} N \cdot dt}$$

dS_{fe}/dt wird aus der Steigung der Atmungskurve unmittelbar vor Erreichen des ersten Sauerstoffminimums bestimmt. Daraus folgt ein Q_1 von $1,212 \text{ h}^{-1}$. Für die zweite Atmungsphase errechnet sich Q_2 zu:

$$Q_2 = \frac{1}{N(t_1)} \cdot \frac{S(t_1) - S_{\text{fe}}(\text{Ende})}{(T_3 - T_1)}$$

$$Q_2 = \frac{1}{N(t_1)} \cdot \frac{S_0 - \frac{Q \cdot g}{N \cdot (g+1)} \cdot [N(t_1) - N_0] - S_{\text{fe}}(\text{Ende})}{T_3 - T_1}$$

Q_2 folgt damit zu $1,087 \text{ h}^{-1}$.

Es zeigt sich überraschend, daß die spezifischen Atmungsraten für beide Phasen annähernd gleich sind. Der gemessene Gesamtwert von Q beläuft sich auf $Q = 0,963 \text{ h}^{-1}$.

Betrachtet man den Sauerstoffverbrauch aus der flüssigen Phase (siehe Abb. 6.2), so kann daraus abgeleitet werden, daß für die zweite Atmung mehr Sauerstoff verbraucht wird als für die erste Atmungsphase. Der Sauerstoffverbrauch für die erste Atmungsphase ergibt sich aus der Differenz des Sauerstoffgehaltes zu Beginn der Messung (Gleichgewicht am Anfang) und dem Gleichgewichtswert der theoretischen Kurve am Ende (Gleichgewicht für T_1). Der Verbrauch an Sauerstoff während der zweiten Atmungsphase wird durch die Differenz der Gleichgewichtswerte der experimentellen Kurve (nach T_3) und der theoretischen Kurve (nach T_1) unter Berücksichtigung der entsprechenden Sauerstoffwerte der Gasphase wiedergegeben.

Abbildung 6.2 zeigt, daß die Sauerstoffabnahme in der Nährlösung für die erste Atmungsphase geringer ist als für die zweite Atmungsphase. Unter der Voraussetzung, daß der Bunsensche Absorptionskoeffizient in bestimmten Bereichen unabhängig vom Druck ist, folgt aus obiger Feststellung, daß der gesamte aufgenommene Sauerstoff in der zweiten Atmungsphase größer ist als in der ersten Atmungsphase. Die trotzdem übereinstimmenden Q -Werte für beide Atmungsphasen erklären sich mit der in Kapitel 2.1 aufgeführten Formel für die spezifische Atmungsrate:

$$Q = \frac{\Delta S}{N \cdot \Delta t}$$

Tabelle 6.1 gibt eine Übersicht über die bestehenden Verhältnisse.

Tabelle 6.1 Aus Experiment und Theorie ermittelte Größen der ersten und zweiten Atmungsphase

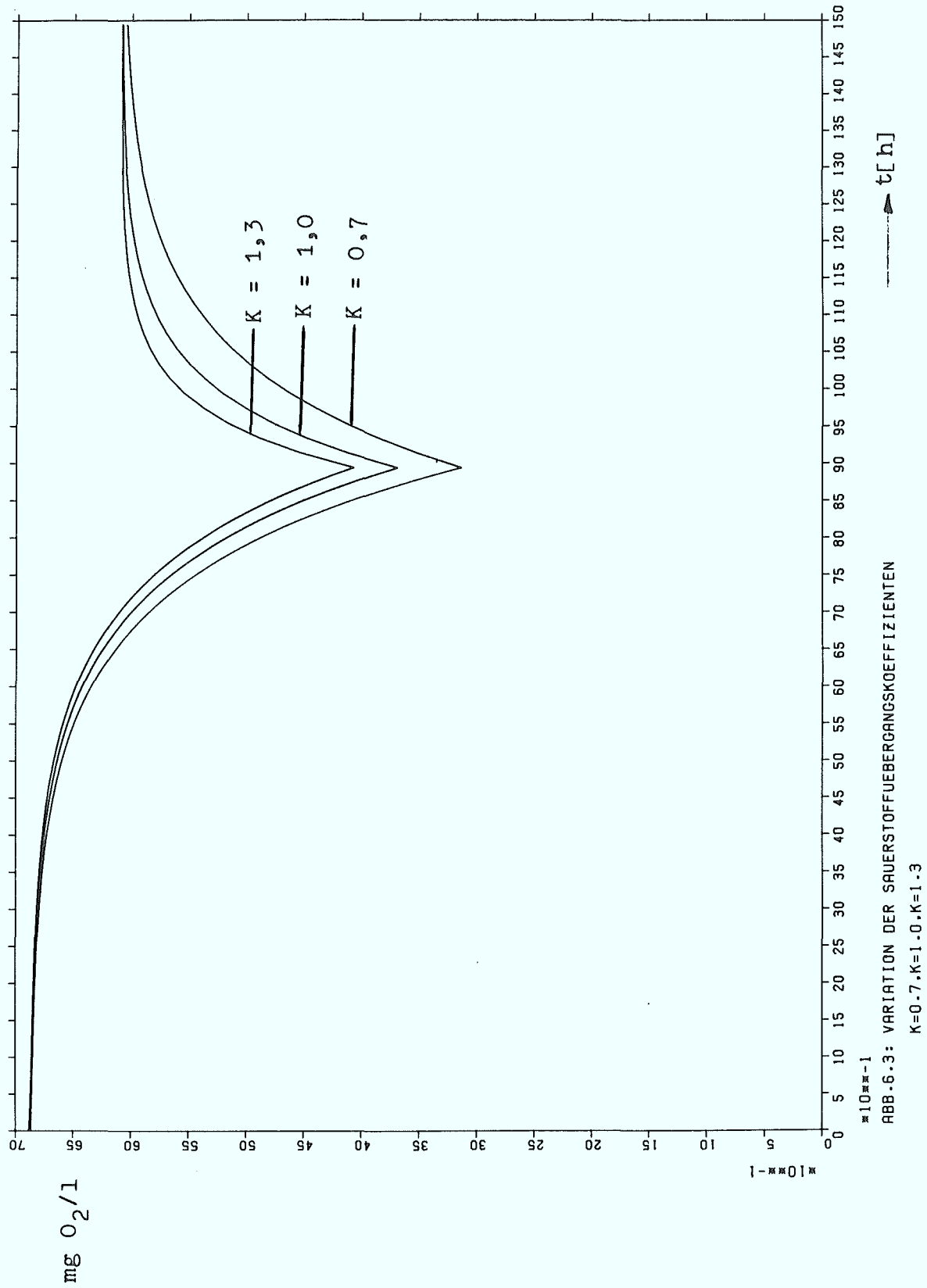
Atmungs- phasen	$\bar{N}(\text{mg/l})$	$t(\text{h})$	$S(\text{mg/l})$	$Q(\text{h}^{-1})$
1. Atmungs- phase ($O-T_1$)	0,836	8,92	9,034	1,212
2. Atmungs- phase (T_1-T_3)	5,000	2,88	15,653	1,087

6.2 Variation wichtiger Versuchsparameter

Mit Hilfe des erstellten Computer-Programms war es möglich, Versuchsparameter zu verändern und so die Abhängigkeit des Atmungsverlaufs in der Nährlösung von diesen Größen zu verfolgen. Von Bedeutung sind verschiedene Sauerstoffübergangskoeffizienten k entsprechend unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten und verschiedene Verhältnisse von Flüssigkeitsphase zu Gasphase.

Abbildung 6.3 zeigt die Variation des Sauerstoffübergangskoeffizienten. In die Koeffizienten gehen sowohl die Rührintensität als auch die geometrische Form des verwendeten Kulturgefäßes ein. Das heißt, daß der Sauerstoffübergangskoeffizient die Phasengrenzfläche zwischen Flüssigkeit und Gasphase bestimmt. Da der Übergangskoeffizient k nur die Geschwindigkeit der Sauerstoffnachlieferung in die flüssige Phase bestimmt, muß trotz verschiedener k -Werte immer die gleiche Endkonzentration des Sauerstoffs erwartet werden, solange das Verhältnis V_{fl}/V_g sowie die Bakteriendichte N unverändert bleiben. In Kapitel 4.2.1 (Abb. 4.2) wird das Ergebnis der Theorie durch das Experiment bestätigt. In den durchgeführten Versuchen wurde in Kapitel 4.5 ein k von $1,04 \text{ h}^{-1}$ für Gefäß "B" bestimmt. Ist der k -Wert kleiner als 1, so bedeutet das, daß Sauerstoff langsamer aus der Gasphase in die Flüssigkeit nachgeliefert wird. Die Folge ist, daß die Bakterien mehr Sauerstoff aus der Flüssigkeit verbrauchen, d. h., das Minimum für die erste Atmungsphase ist stärker ausgeprägt. Dies dokumentiert Abbildung 6.3 sehr deutlich. Ist der k -Wert klein, so heißt das auch, daß die Zeit für die Einstellung des Gleichgewichtszustandes nach einem Sauerstoffverbrauch durch die Bakterien sehr groß ist. Für $k = 0,5$ und $0,7 \text{ h}^{-1}$ ist nach 15 h (Abb. 6.3) noch kein Gleichgewichtszustand erreicht. Für $k = 1,0, 1,3$ und $1,5 \text{ h}^{-1}$ befindet sich das System nach dieser Zeit im Gleichgewichtszustand.

Die Variation des Verhältnisses von Flüssigkeitsphase zu Gasphase entspricht ebenfalls dem erwarteten Ergebnis. Ist die Gasphase relativ zur Flüssigkeitsphase klein ($V_{fl}/V_g = 100$),



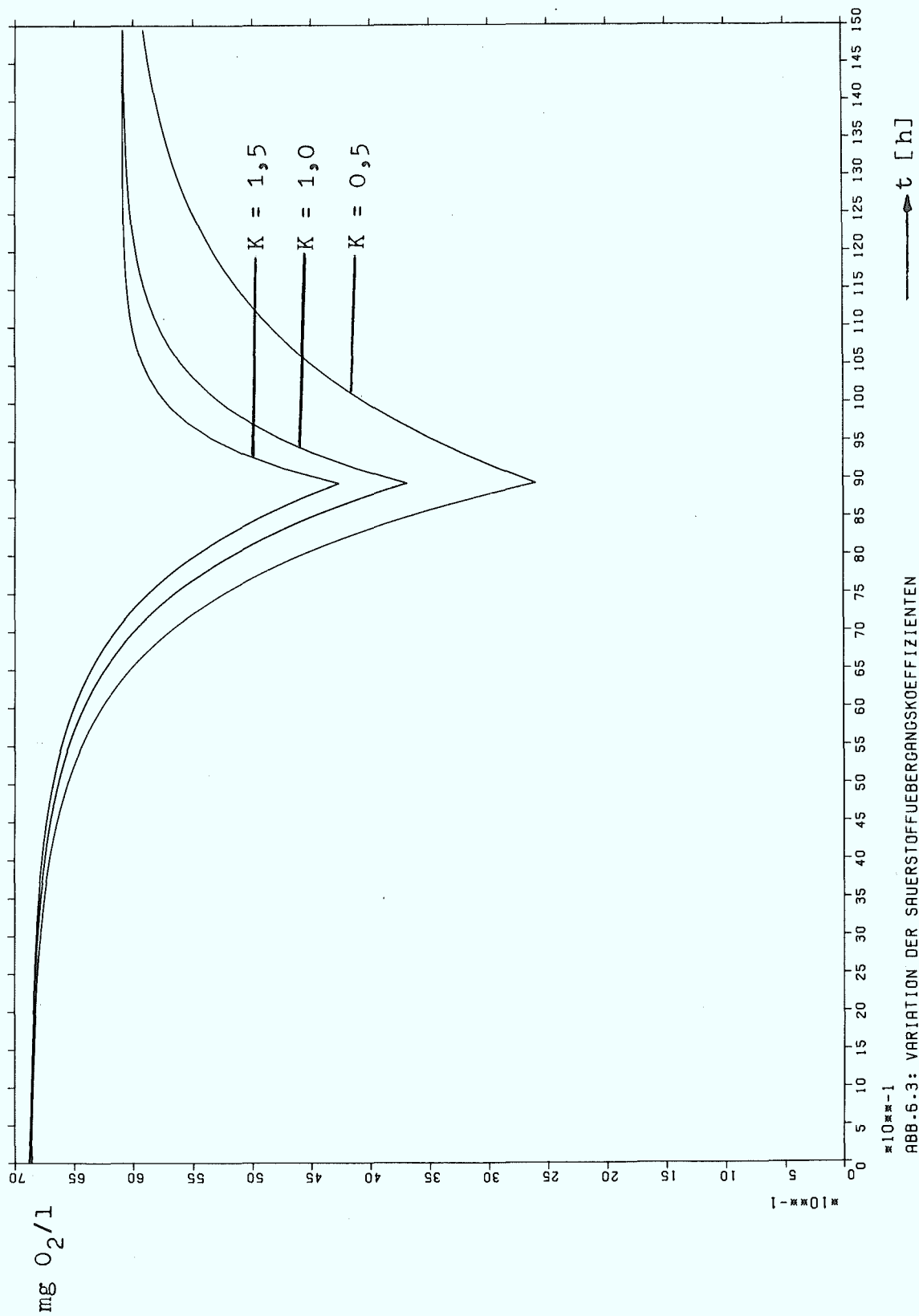
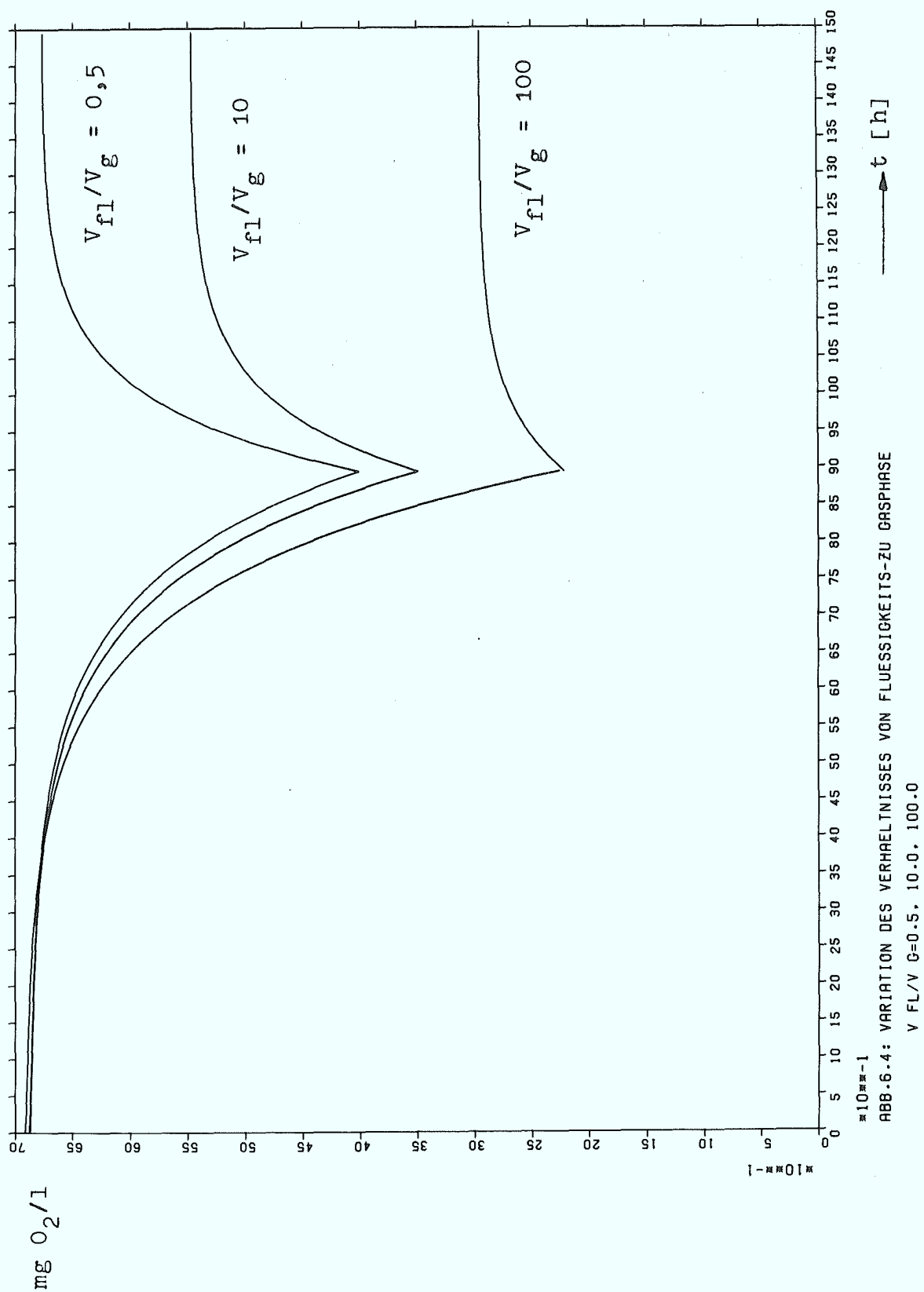


ABB.6.3: VARIATION DER SAUERSTOFFUEBERGANGSKOEFFIZIENTEN

K=0.5, K=1.0, K=1.5

bedeutet das, daß die Bakterien ihren gesamten Sauerstoffbedarf aus dem in der Flüssigkeit gelösten Sauerstoff decken müssen. Da fast kein Sauerstoff aus der Gasphase nachgeliefert werden kann, liegt der Gleichgewichtswert für Sauerstoff in der Flüssigkeit am Ende sehr niedrig. Im umgekehrten Fall, wenn die Gasphase sehr groß und die Flüssigkeitsphase demgegenüber sehr klein ist ($V_{fl}/V_g = 0,5$), ist durch die große Menge, die aus der Gasphase nachgeliefert werden kann, fast immer Gleichgewicht vorhanden. Das bedeutet eine geringere Ausprägung des ersten Atmungspeaks. Am Ende stellt sich ein kaum vom Beginn differierender Sauerstoffwert ein. Der Verlust an Sauerstoff in der Flüssigkeitsphase durch die Atmung der Bakterien wird fast vollständig wieder durch die Nachlieferung aus der Gasphase ausgeglichen.



7. Schlußbetrachtung

7.1 Anwendbarkeit der Meßmethode

Die in vielen Jahren und Experimenten erfolgreiche manometrische Sauerstoffverbrauchsmessung, allgemein als WARBURG-Technik bekannt, wird nur in begrenztem Maße für kontinuierliche Messungen benutzt. Das Ablesen des Manometerspiegels und die Übertragung auf einen Schreiber haben sich nicht allgemein durchgesetzt, wohl vor allem wegen des Aufwandes und wegen der Kosten einer solchen Einrichtung.

Sauerstoffelektroden dagegen sind preiswert herstellbar. Aus dem Vergleich der beiden Typen galvanometrischer und polarographischer Anordnung (SUKATSCH und JAENICKE 1973) folgt, daß nur die polarographische Meßanordnung wegen ihres geringen Sauerstoffverbrauchs für die Meßanordnung dieser Arbeit brauchbar war. LESSLER 1972 gibt eine Übersicht der in der Physiologie und Biochemie eingesetzten Typen und Meßanordnungen. So hat LONGMUIR 1954 die kontinuierliche polarographische Sauerstoffmessung benutzt, um die Abhängigkeit der Atmungsrate bei Bakterien vom Sauerstoffgehalt des Nährmediums zu verfolgen. 1966 mißt FOSTER in einer Mikroanordnung Atmungsraten weißer Blutkörperchen. Diese Meßanordnungen haben zwar eine hohe Meßgenauigkeit für Sauerstoff, doch ist der gelöste Sauerstoff rasch verbraucht und die Meßzeit dadurch begrenzt.

Messungen des Sauerstoffgehaltes haben HARRISON und MAITRA 1969 an *Klebsiella aerogenes* im Chemostaten durchgeführt. Zu einer kontinuierlichen Kultur im Chemostaten wurde Glucose zugesetzt und eine sofortige starke Abnahme des Sauerstoffgehaltes in der Lösung beobachtet. Während des Glucoseverbrauchs sammelt sich etwas Pyruvat an, daß in einer zweiten, deutlich ausgeprägten Atmungsphase verarbeitet wird. Eine dritte Phase war nicht zuordenbar. Dieses Meßsystem ist, da laufend Luft durchperlt, offen. Das Ergebnis der Versuche hängt, wie die Arbeit zeigt, von der Arbeit des Rührsystems ab. Eine quantitative Auswertung ist nur möglich, wenn Gasfluß und Abgasmessungen bekannt

sind. GARRISON und FORD 1970 führen anstelle eines Gasstroms sauerstoffgesättigte Lösung ins Meßsystem ein. Sie regeln den Sauerstoffpartialdruck und messen die Zahl der Hübe des Nachschubsystems. DEGN und WOHLRAB 1971 arbeiten mit einem Gas-mischsystem, das linear den Sauerstoffpartialdruck variieren kann. Zwischen dem Sauerstoffpartialdruck im Gasgemisch, der Nachlieferung in die Flüssigkeit und der Verbrauchsrate im Medium stellen sich stationäre Werte ein. In der weiteren Entwicklung gehen DEGN, LILLEØR und IVERSEN 1973 zu einem offenen Meßsystem über, das hier näher betrachtet werden muß.

DEGN, LILLEØR und IVERSEN 1973 messen in einer kleinen Küvette unter ständigem Luftzutritt. Damit ist eine Randbedingung des Systems gegeben: ein konstanter Sauerstoffgehalt in der Gasphase. Der Transport ist nun der Partialdruckdifferenz zwischen gasförmiger und wässriger Phase proportional. Steigt der Verbrauch in der Nährlösung an, so steigt die Partialdruckdifferenz und damit die Nachlieferung. Sinkt die Atmungsrate, so kann die Sauerstoffkonzentration ansteigen: die Nachlieferung aus der Gasphase wird geringer. Bei einer konstanten Atmungsrate im Probevolumen wird sich ein stationärer Zustand einstellen. Dieser stationäre Zustand wird zur Messung benutzt. Damit ist das Verfahren aber auch eingeengt: es ist streng nur für konstanten Sauerstoffverbrauch im Probenvolumen anwendbar. Es erfaßt allerdings auch sprunghafte Übergänge zwischen verschiedenen stationären Zuständen, ist aber doch nicht vollkommen kontinuierlich.

DEGN, LILLEØR und IVERSEN 1973 arbeiten deshalb auch mit ruhenden Zellen. Sie geben verschiedene Substrate zu und finden danach eine Folge verschiedener stationärer Zustände, die sie als aufeinanderfolgende Erschöpfung von Stoffwechsel-Zwischenprodukt-Pools auffassen. Die Methode und die Ergebnisse sind mit den in dieser Arbeit dargestellten nur bedingt vergleichbar.

In dieser Arbeit wurde ein geschlossenes System angewendet. Eine Verbesserung erscheint sinnvoll: Mißt man zugleich den Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase und in der Flüssigkeitsphase, so kennt man die gesamte Sauerstoffmenge im System. Mißt man dagegen, wie hier, nur in der flüssigen Phase, und das System befindet sich dazu noch bewußt nicht im Gleichgewichtszustand, so kann die zur Berechnung notwendige Gesamtsauerstoffmenge nur durch Annahme über die bakterielle Atmung erhalten werden.

Obwohl diese Verbesserung in dieser Arbeit noch nicht angewendet wurde, hat sich das Verfahren im geschlossenen System als empfindliche Meßanordnung gerade zur Beobachtung von Schwankungen der Atmungsrate bewährt. Das ist besonders für wachsende Mikroorganismenpopulationen interessant, aber auch für biochemische Untersuchungen. Der Nachweis des "Glucose-Effekts" war zum Beispiel leicht möglich. Die Diauxie nach Wachstum in einem Glucose-Mineralsalz-Medium konnte deutlich studiert werden.

Mit einigem Aufwand nur kann das Rührsystem und eine gasdichte, sterile Probennahme bzw. Reagenzzugabe technisch verbessert werden. Das läuft letztlich auf Messungen in einem gasdichten Chemostaten, benutzt als batch-Kultur, hinaus. Die Probleme sind biotechnisch grundsätzlich gelöst. Der in den hier dargestellten Messungen begangene Weg könnte als Methodik für viele biochemische Arbeiten angewendet werden. Die Variation der Substratkonzentration und das Verhältnis von Gas- zu Flüssigkeitsphase erlaubt es, einen weiten Meßbereich zu beobachten. Mehrere Substrat- oder Reagentienzugaben können eine größere Zahl von Informationen pro Versuch ergeben.

7.2 Einordnung der Befunde

Diauxie ist eine lang bekannte Erscheinung und wird oft beschrieben (siehe Kap. 2.3.2). Diauxie wird aber allgemein dann gefunden, wenn zwei Substrate im Medium vorhanden sind. In einigen wenigen Fällen tritt eine Diauxie durch Produktion

eines Stoffwechselzwischenproduktes auf. Bei *Klebsiella aerogenes* haben HARRISON und MAITRA 1969 sowie DEGN, LILLEØR und IVERSEN 1973 die Produktion von Pyruvat aus Glucose beschrieben. Erschöpfung erst der Glucose und dann des Pyruvats wirken sich als Sprünge in der Atmungsrate aus.

Entsprechendes ergibt sich aus den dargestellten Versuchen. Die Substanz, es können auch mehrere sein, konnte noch nicht identifiziert werden. Es ist aber sicher, daß sie aus den wachsenden *E. coli*s ausgeschieden wird. Ihr Stoffwechsel wird durch Glucose gehemmt. Zugabe von Glucose in die zweite Atmungsphase führt zu einem sofortigen Anstieg der Atmung. Nach Verbrauch der Glucose tritt die zweite Atmungsphase nun verstärkt auf.

Ob die Glucose durch Repression oder durch Inhibition wirkt, sollte in diesen Versuchen nicht entschieden werden. Die schnelle Reaktion nach Glucosezugabe in die zweite Atmungsphase weist auf eine Inhibition hin, da zur Wirkung auf die Enzymproduktion, also Repression, eine etwa fünfminütige Zeitspanne (PERLMAN und PASTAN 1968) notwendig ist. Für eine Inhibition spricht auch, daß das zweite Enzymsystem sofort nach dem Glucoseverbrauch aktiv wird.

Ebensowenig kann aus den Versuchen etwas darüber ausgesagt werden, ob Induktor-Ausschluß oder cAMP-Ausstoß vorliegt. Die ausgeschiedene Substanz kann als Stoffwechselzwischenprodukt angesehen werden. Es sollte ohne aktiven Rücktransport aus den Zellen ins Nährmedium diffundieren und sich dort verteilen. Da Glucose die Arbeit eines verarbeitenden Enzymsystems blockiert, wird sich die Substanz immer mehr im Nährmedium anreichern.

Eine Bedeutung dieser Substanzabgabe kann erst dann intensiv diskutiert werden, wenn die Natur dieses Sekretes bekannt ist. Ein Leck im Stoffwechsel der Zelle anzunehmen, wie zuerst vermutet, wird dadurch etwas unwahrscheinlich, daß etwa 2/3 des verbrauchten Sauerstoffs erst in der zweiten Atmungsphase ver-

arbeitet werden. *E. coli* kommt im Darm von Warmblütlern in einer wechselnden Mischpopulation vor. In der dort herrschenden Konkurrenz wird *E. coli* den effektiven Glucoseabbau wählen. Es ist denkbar, daß dieser Weg nicht zu Ende geführt wird. Ähnliches ist von anderen Darmbewohnern, z. B. Bandwürmern, und Lebewesen unter Überflußbedingungen bekannt. Diese Erscheinung wird in der Biotechnologie zur Substanzproduktion benutzt, z. B. die Gewinnung organischer Säuren mit Hilfe von Schimmelpilzen unter Überflußbedingungen. Man kann sich vorstellen, daß *E. coli* erst unter Ausnutzung der Glucose Material aufbaut und dann die entstandenen Produkte verwertet. Das kann auch durch andere Symbionten geschehen.

Dabei ist wohl erstaunlich, daß trotz des nicht nachweisbaren Wachstums, gerade in der zweiten Phase, eine so intensive Respiration beobachtet wird. Ähnlich der Reduktion organischer Verbindungen bei der Gärung zur oxidativen Energiegewinnung könnte die Substanz stärker reduziert sein.

Für eine Massengewinnung von Mikroorganismen ist die Tatsache der Substanzabgabe ins Nährmedium interessant. *E. coli* müßte im Chemostaten noch geringere Ausbeute bringen, wenn bei den benutzten Durchflußraten noch Glucose vorhanden ist, also das Stoffwechselprodukt nicht verarbeitet werden kann. Es wird dann ausgespült.

Am Ende der Versuche wurde gefunden, daß die Hälfte der Glucose veratmet wird und die andere Hälfte eingebaut. Vergleicht man das mit der Verteilung der Sauerstoffaufnahme auf die beiden Phasen, so müßte bei gleichbleibender Bakterienzahl die Biomasse der einzelnen Bakterien, nicht die der gesamten Population, vergrößert werden. Die Bakterien befinden sich dann in gänzlich unterschiedlichen physiologischen Zuständen.

Am Schluß der Arbeit sollte noch einmal betont werden, daß dieses einfache Zweiphasensystem mit einem Sauerstoff verbrauchenden Reaktanten in der Flüssigkeitsphase eine große Zahl von Anwendungsmöglichkeiten und Informationen bietet.

8. Literaturverzeichnis

ABELSON, P. H.; BOLTON, E. T.; ALDOUS, E.
J. biol. Chem. 198 (1952) 165-172

AJL, S. J.
J. Bacteriol. 59 (1950) 499-507

ALTMAN, P. L.; DITTMER, D. S. (eds.) (1964)
Biological Data Book, Fed. of Amer. Soc. for Exp. Biol.
Washington, D. C.

BOEZI, J. A.; de MOSS, R. D.
Biochim. biophys. Acta 49 (1961) 471-484

BREZNAK, J. A.; CANALE-PAROLA, E.
Arch. Mikrobiol. 83 (1972) 278-292

BRITTEN, R. J.; Mc CLURE, F. T.
Bacteriol. Rev. 26 (1962) 292-335

CAVARI, B. Z.; AVI-DOR, Y.; GROSSOWICZ, N.
J. Bacteriol. 96 (1968) 751-759

CLIFTON, C. E.; LOGAN, W. A.
J. Bacteriol. 37 (1939) 525-540

de CROMBRUGGHE, B.; PERLMAN, R. L.; VARMUS, H. E.; PASTAN, I.
J. biol. Chem. 244 (1969) 5828-5835

DAGLEY, S.; DAWES, E. A.
Biochem. J. 45 (1949) 331-337

DAVIS, B. D.
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 26 (1961) 1-10

DAWES, E. A.; RIBBONS, D. W.
Biochem. J. 82 (1962) 49

DEGN, H.; LILLEØR, M.; IVERSEN, J. J. L.
Biochem. J. 136 (1973) 1097-1104

DEGN, H.; WOHLRAB, H.
Biochim. biophys. Acta 245 (1971) 347-355

DOBY, G. (1965)
Plant Biochemistry, Interscience Publ.,
London, N. Y., Sidney

ECKER, E.; LOCKHART, W. R.
J. Bacteriol. 82 (1961) 511-516

ENGLESBERG, E.
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 45 (1959) 1494-1507

ENGLESBERG, E.; WATSON, J. A.; HOFFEE, P. A.
Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 26 (1961) 261-276

EPPS, W. M. R.; GALE, E. F.
Biochem. J. 36 (1942) 619-623

FOSTER, J. M.
Anal. Biochem. 14 (1966) 22-27

GARRISON, J. C.; FORD, G. D.
J. appl. Physiol. 28 (1970) 685-688

GOGOLEVA, E. V.; GRECHUSHKINA, N. N.; EGOROV, N. S.
Mikrobiologija 42 (1973) 409-412

GRAY, C. T.; WIMPENNY, J. W. T.; MOSSMAN, M. R.
Biochim. biophys. Acta 117 (1966) 33-41

HADJIPETROU, L. P.; GERRITS, J. P.; TEULINGS, F. A. G.;
STOUTHAMER, A. N.

J. gen. Microbiol. 36 (1964) 139-150

HAMILTON, W. A.; DAWES, E. A.

Biochem. J. 71 (1959) 25-26

HARRIGAN, W. F.; Mc CANCE, M. E. (1966)

Laboratory Methods in Microbiology

Academic Press, N. Y., London

HARRISON, D. E. F.; MAITRA, P. K.

Biochem. J. 112 (1969) 647-656

HAYASHI, S.; KOCH, J. P.; LIN, E. C. C.

J. biol. Chem. 239 (1964) 3098-3105

HELLER, R. (1969)

Biologie Vegetale 2, Masson, Paris

HENGSTENBERG, W.; EGAN, J. B.; MORSE, M. L.

J. biol. Chem. 243 (1968) 1881-1885

HODSON, P. H.

Appl. Microbiol. 19 (1970) 551-554

HOLZER, H.

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 26 (1961) 277-288

KLEINZELLER, A. (1965)

Manometrische Methoden, Fischer, Jena

KNOTHE, H.; SEELIGER, H.; DÖLL, W.; WIEDEMANN, R. (1969)

Enterobacteriaceae in: Bewährte Methoden in der Mikrobiologie,
Lieferung 10, Fischer, Stuttgart

KOBAYACHI, T.; KEYAMA, H. (1973)

persönliche Mitteilung

KREBS, H. A.

Biochem. J. 31 (1937) 2095-2124

LESSLER, M.

Methods in Cell Physiology 5 (1972) 199-217

LONGMUIR, I. S.

Biochem. J. 57 (1954) 81-87

LOOMIS, W. F.; MAGASANIK, B.

J. Bacteriol. 93 (1967) 1397-1401

LUND, B. M.; WYATT, G. M.

J. gen. Microbiol. 78 (1973) 331-336

LURIA, S. E. in: GUNSALUS, I. C.; STANIER, R. Y. (eds.) (1960)
The Bacteria 1, Academic Press, N. Y., London

MAAS, W. K.; McFALL, E.

Ann. Rev. Microbiol. 18 (1964) 95-109

MACNAB, R.; MOSES, V.; MOWBRAY, J.

Eur. J. Biochem. 34 (1973) 15-19

MAGASANIK, B. in: BECKWITH, J. R.; ZIPSER, D. (eds.) (1970)
The Lactose Operon, Cold Spring Harbour Lab.

MAKMAN, R. S.; SUTHERLAND, E. W.

J. biol. Chem. 240 (1965) 1309-1314

McGINNES, J. F.; PAIGEN, K.

J. Bacteriol. 114 (1973) 885-887

MILLER, E. C. (1938)

Plant Physiology, Mc Graw Hill, N. Y.

MONOD, J. (1942)

Recherches sur la Croissance des Cultures Bacteriennes,
Paris, Hermann & Cie.

MOSES, V.; PREVOST, C.

Biochem. J. 100 (1966) 336-353

MOSES, V.; SHARP, P. B.

Biochem. J. 118 (1970) 481-489

MOSES, V.; SHARP, P. B.

J. gen. Microbiol. 71 (1972) 181-190

NEIDHARDT, F.; MAGASANIK, B.

J. Bacteriol. 73 (1957) 253

NG, F. M.-W.; DAWES, E. A.

Biochem. J. 132 (1973) 129-140

OXENDER, D. L.

Ann. Rev. Biochem. 41 (1972) 806-814

PAIGEN, K.; WILLIAMS, B.

Adv. Microbiol. Physiol. 4 (1970) 252-324

PARDEE, A. B.; PRESTIDGE, L. S.

Biochim. biophys. Acta 49 (1961) 77-88

PASTAN, I.; PERLMAN, R. L.

J. biol. Chem. 243 (1968) 5420-5427

PASTAN, I.; PERLMAN, R.

Science 169 (1970) 339-334

PERLMAN, R. L.; PASTAN, I.

J. biol. Chem. 243 (1968) 5420-5427

PETERKOFISKY, A.; GAZDAR, C.

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 68 (1971) 2794-2798

PIPERNO, J. R.; OXENDER, D. L.

J. biol. Chem. 243 (1968) 5914-5920

POSTMA, P. W.; COOLS, A.; van DAM, K.
Biochim. biophys. Acta 318 (1973) 91-104

ROSEMAN, S. in: WOESSNER, J. F.; HUIJUNG, G. (eds.) (1972)
The Molecular Basis of Biological Transport
Miami Winter Symp. 3, 181-217, Academic Press, N. Y., London

ROTHFIELD, L.; PEARLMAN-KOTHENCZ, M.
J. mol. Biol. 44 (1969) 477-492

RUIZ-HERRERA, J.; GARCIA, L. G.
J. gen. Microbiol. 72 (1972) 29-35

SAIER, M. H.; ROSEMAN, S.
J. biol. Chem. 247 (1971) 972-975

SCHLEGEL, H. J. (1969)
Allgemeine Mikrobiologie, Thieme, Stuttgart

SCHLESER, G.; FÖRSTEL, H.
Chemostat zur Untersuchung der Isotopenfraktionierung des
Sauerstoffs bei der Respiration von Mikroorganismen
JÜL-912-PC (1972)

SCHLESER, G.
Diss. TH Aachen (1974)

SIEGEL, B. V.; CLIFTON, C. E.
J. Bacteriol. 60 (1950) 113-118

SILBERT, D. E.; COHEN, M.; HARDER, M. E.
J. biol. Chem. 247 (1972) 1699-1707

SPECK, E. L.; FREESE, E.
J. gen. Microbiol. 78 (1973) 261-275

STARKA, J. (1968)
Physiologie und Biochemie der Mikroorganismen,
Fischer, Stuttgart

STUMM-ZOLLINGER, E.

Appl. Microbiol. 14 (1966) 654-664

SUKATSCH, D. A.; JAENIKE, D. in:

3. Symposium Technische Mikrobiologie, Berlin (1973) 203-214

THOMAS, A. D.; DOELLE, H. W.; WESTWOOD, A. W.; GORDON, G. L.

J. Bacteriol. 112 (1972) 1099-1105

WALKER, C. A.; DURHAM, N. N.

Biochem. J. 136 (1973) 429-431