KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

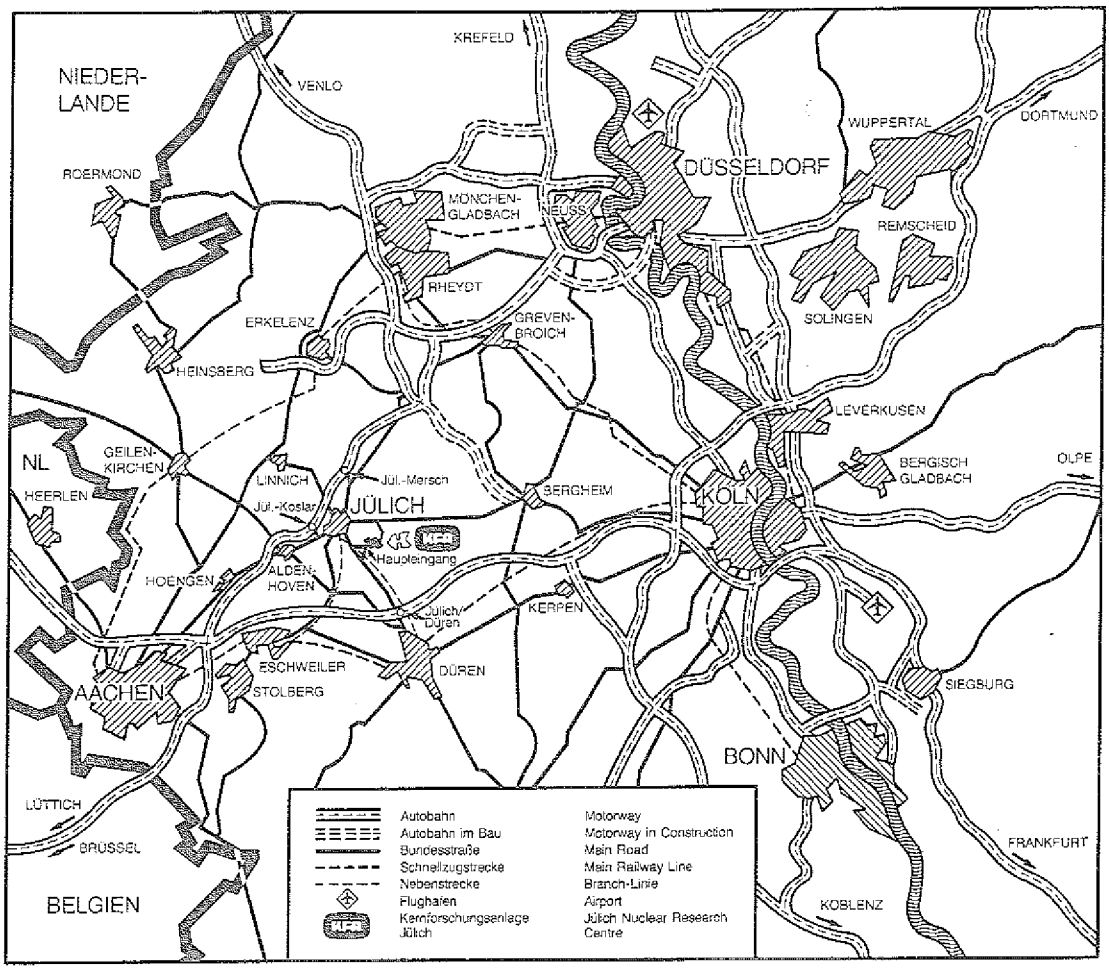
Institut für Biotechnologie 3

Wachstum und Zusammenwirken von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa bei chemostatischer Kultur in acetathaltigem Modellabwasser

von

U. Fingerhut

Jül – 1999
Juni 1985
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 1999

Institut für Biotechnologie 3 Jül – 1999

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

B_R =	Raumbelastung
BSB_5 =	biologischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
CI =	Cycling Index
cm =	Zentimeter
CSB =	chemischer Sauerstoffbedarf
D =	Durchflußrate
D_{crit} =	höchste Verdünnungsrate, bei der noch Steady States erreicht werden können
d =	Tag
DOC =	gelöster organischer Kohlenstoff
E_{570} =	Extinktion bei 570 nm
EDTA =	Ethylendiamintetraessigsäure
EGW =	Einwohnergleichwert (1 EGW = 54 g BSB_5)
g =	Gramm
h =	Stunde
IC =	anorganischer Kohlenstoff
K_s =	Substratkonzentration bei der die halbmaximale Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wird
l =	Liter
ln =	natürlicher Logarithmus
log =	Logarithmus
m =	"maintenance rate"
mg =	Milligramm
Min =	Minute
ml =	Milliliter
mmol =	Millimol
nm =	Nanometer
pH =	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
% (v/v) =	Volumenprozent (l/l)
% (w/v) =	Gewichtsprozent (g/100 ml)
% (w/w) =	Gewichtsprozent (g/g)
s =	Sekunde
TC =	Gesamtkohlenstoff (anorganischer und organischer Kohlenstoff)
TG =	Trockengewicht
TS =	Trockenmasse

τ =	Aufenthaltszeit
UpM =	Umdrehungen pro Minute
V =	Volumen
Y =	Ertragskoeffizient (produzierte Biomasse (mg C)/aufgenommenes Substrat (mg C))
Y_G =	theoretischer maximaler Ertragskoeffizient
μ =	Wachstumsrate
μ_{max} =	maximale Wachstumsrate
μE =	Mikroeinstein
μg =	Mikrogramm
μm =	Mikrometer
μmol =	Mikromol
μS =	Mikrosiemens

1. Einleitung

Die aerobe Behandlung von Abwässern in unbelüfteten flachen Teichen beruht, analog zur natürlichen Selbstreinigung der Oberflächengewässer, hauptsächlich auf dem Zusammenwirken von Algen und Bakterien. Dabei ist die photosynthetische O_2-Produktion der Algen von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung eines aeroben Stoffwechsels der Bakterien (Arthur 1982). Die Abwasserbehandlung in Algenteichen gewährleistet zugleich eine Reduktion pathogener Mikroorganismen (Matina & Yousef 1964, Arthur 1982). Da die hydraulische Verweilzeit des Abwassers in Algenteichen mehrere Wochen betragen kann (Arthur 1982), ist der Flächenbedarf entsprechend groß. Durch ständiges oder intermittierendes Umwälzen des zu behandelnden Abwassers in Gerinnen von 0,5 - 1 m Tiefe kann die Aktivität der Algen und Bakterien erheblich gesteigert und die Verweilzeit (1 - 6 Tage) dementsprechend verkürzt werden (Shelef et al. 1978, Oswald 1970).

Zur Unterscheidung von normalen Algenteichen, die in wärmeren Ländern weit verbreitet sind, werden die von Oswald und Mitarbeitern (Oswald und Gotaas 1957, Oswald 1963) durch Umwälzung intensivierten Systeme in der Literatur als HIROPs (High Rate Oxidation Pond) oder HIRAPs (High Rate Algal Ponds) (Shelef et al. 1976, 1980; Goldman 1979b; De Pauw & Van Vaerenbergh 1981) beziehungsweise in deutschen Arbeiten als Algengräben (Soeder et al. 1982) bezeichnet. Sie sind im allgemeinen Schwachlastverfahren, obwohl die zulässige Raumbelastung von Algengräben unter günstigen klimatischen Bedingungen bis 0,5 kg BSB_5/m^3 * Tag erreichen kann (Shelef et al. 1980). Der Abbau der Laststoffe vollzieht sich unter aeroben Bedingungen. Durch die Verfahrensweise bedingt, wird das Wachstum der in der Regel von einer Spezies dominierten Algenpopulation (Azov et al. 1980) stark gefördert.

Ein Algengraben verkörpert ein System, das die 2. und 3. Reinigungsstufe herkömmlicher Kläranlagen vereint, vorausgesetzt die anfallende partikuläre Masse, ALBAZOD (Soeder 1984), die größtenteils aus Algen, aber auch aus Bakterien, Zooplankton und Detritus besteht, wird abgetrennt.

Wie aus den Daten von Pilotanlagen und den in der Praxis eingesetzten Anlagen hervorgeht, kann ein breites Spektrum verschiedener Abwässer in Algengräben behandelt werden (Groeneweg et al. 1980, Shelef et al. 1980, Soeder 1980, Hill & Lincoln 1981).

Nach den Vorstellungen von Oswald (1970) laufen bei der Abwasserreinigung in Algengräben und in Algenteichen folgende Prozesse ab (Abb. 1):

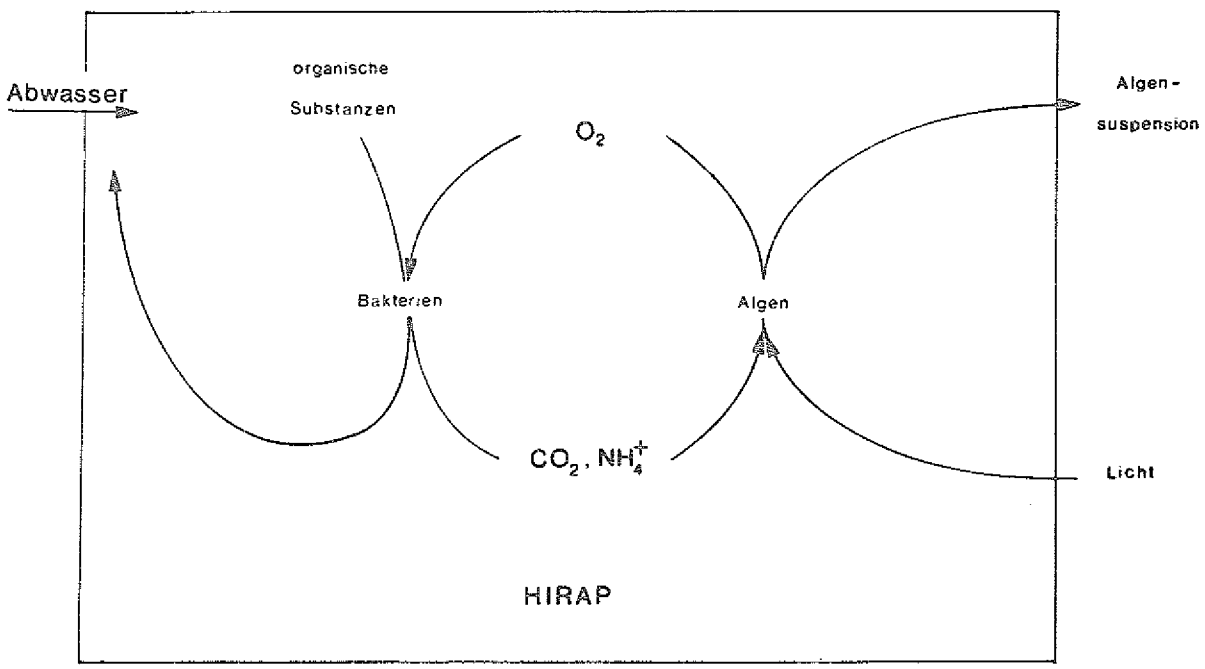


Abb. 1: Funktionsweise eines HIRAPs (aus Oswald 1970)

In organischen Abwässern ist die Freisetzung des von den Algen produzierten photosynthetischen O_2 von entscheidender Bedeutung für den aeroben Abbau durch Bakterien. Die organischen Substanzen des Abwassers werden von den Bakterien zum einen zum Aufbau ihrer Biomasse verwertet und zum anderen zu CO_2, NH_4^+, PO_4^{3-} und anderen Endprodukten des aeroben Stoffwechsels metabolisiert. Die Algen wiederum benötigen diese mineralisierten Substanzen zum Aufbau ihrer Biomasse.

Diese weitgehend anerkannte Arbeitshypothese ist aber niemals experimentell untersucht worden und kann aufgrund der vielen aus der Literatur bekannten Interaktionen zwischen Algen und Bakterien in Frage gestellt werden (Dor 1978). Die bisher festgestellten Interaktionen umfassen sowohl fördernde als auch hemmende Effekte (Cloete & Toerien 1981). Es ist zudem nicht auszuschließen, daß Algen und Bakterien um das gleiche organische Substrat konkurrieren, denn HIROPs sind in der Regel licht-limitierte Durchflußsysteme. Wie im Prinzip bereits Beijerinck (1890) erkannte, können z.B. Mikroalgen der Gattungen Chlorella und Scenedesmus unter licht-limitierenden Bedingungen ihre Ernährungsweise von photoautotroph auf photomixotroph umstellen (De Pauw & Van Vaerenbergh 1981, Follmann et al. 1978). Dies bedeutet, daß Mikroalgen nicht nur anorganische Nährstoffe (Oswald-Hypothese) sondern auch organische Verbindungen assimilieren. Die Konkurrenzfähigkeit der Algen gegenüber den Bakterien um das organische Substrat hängt dann weitgehend von ihren Halbsättigungskonstanten für das Substrat sowie von ihren maximalen Wachstumsraten ab.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Interaktionen zwischen Mikroalgen und Bakterien bei der Umsetzung eines synthetischen Modellabwassers unter definierten Bedingungen in belichteten Chemostaten zu untersuchen und dabei die Beiträge beider Organismentypen zur Gesamteliminationsleistung der Mischpopulation möglichst weitgehend zu quantifizieren. Das verwendete Modellabwasser mit Acetat als einziger organischer C-Quelle und NH_4^+ als einziger N-Quelle wurde unter dem Gesichtspunkt ausgewählt, daß es in seinen wichtigsten Komponenten ähnlich wie ein in der Praxis tatsächlich anfallendes Abwasser zusammengesetzt war. Als Bezugsabwasser wurde gelagerte Schweinegülle ausgesucht, die bereits erfolgreich in HIROPs behandelt worden ist (Groeneweg et al. 1980). Aus der Organismenvielfalt eines mit Schweinegülle belasteten HIROPs wählte ich für mein Modellsystem eine Algen- (Scenedesmus falcatus) und eine Bakterienspezies (Pseudomonas aeruginosa) aus. Diese Begrenzung auf zwei Organismentypen sollte eine genaue Charakterisierung der Interaktionen zwischen Algen und Bakterien in einer Mischkultur erlauben. Auf diese Weise sollte eine experimentelle Überprüfung der von Oswald aufgestellten Arbeitshypothese vorgenommen und ein Beitrag zum besseren Verständnis der mikrobiellen Aktivität von HIROPs geleistet werden.

Aus diesem Ansatz ergaben sich für die Untersuchungen folgende Schwerpunkte:

1. Charakterisierung der beiden Organismen
   - Charaterisierung der beiden Organismen in Reinkulturen bei verschiedenen Verdünnungsraten
   - Bestimmung der wachstumsrelevanten Parameter μ_{max}, K_s und Y
   - Bestimmung der Betriebsparameter für begaste Mischkulturen hinsichtlich der Eliminationsleistung des Systems im abwassertechnischen Sinne

2. Bestimmung der Interaktionen in belüfteter Mischkultur
   - Bilanzierung und Modellierung des C-Flusses durch das System
   - Vergleich der Eliminationsleistung der Mischkultur mit den Reinkulturen beider Organismen

3. Eliminationsleistung unbegaster Mischkulturen in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate und der Belastung des Systems

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

Als Teststämme dienten die chlorokokkale Grünalge Scenedesmus falcatus Chodat (KFA-Stamm Nr. 20b) und das gram-negative Bakterium Pseudomonas aeruginosa (KFA-Stamm Nr. 087), die von Frau Kordy bzw. Herrn Dr. Webb aus einem Algengraben isoliert und identifiziert worden waren. In diesem mit verdünnter, gelagerter Schweinegülle beschickten Graben behauptete sich Scenedesmus falcatus das ganze Jahr über trotz verschiedener Betriebsweisen der Anlage als eindeutig dominierende Algenspezies. Pseudomonas aeruginosa gehörte zwar zu den mengenmäßig wichtigsten und jederzeit nachweisbaren Bakterien, zeigte aber starke Schwankungen in der Populationsdichte (Groeneweg 1985). Isolate beider Organismen schienen deshalb gut geeignet, "die Algen und die Bakterien" in einem Modellsystem zu repräsentieren.

2.2. Kulturtechnik

2.2.1. Nährlösungen

Das CSB : N : P-Verhältnis von 100 : 10 : 1 der für beide Testorganismen geeigneten Nährlösung war, entsprechend den Angaben von Groeneweg et al. (1980) mit dem der verdünnten, gelagerten Schweinegülle identisch. Da der größte Teil des organischen Kohlenstoffs in der gelagerten Schweinegülle als Acetat vorlag (Groeneweg 1985), enthielt die Nährlösung Acetat als einzige organische C-Quelle, wenn man von der im Spurenbereich zugesetzten EDTA absieht. NH_4^+ war wie in der gelagerten Schweinegülle die einzige N-Quelle.

Zusammensetzung des Grundmediums:

Na-Acetat x 3 H_2O	2487 mg/l
NH_4Cl	400 mg/l
K_2HPO_4 x 3 H_2O	76 mg/l
$MgSO_4$ x 7 H_2O	50 mg/l
$CaCl_2$ x 2 H_2O	10 mg/l
Fe-EDTA-Stammlösung	1 ml/l
Spurenelementlösung	1 ml/l
entionisiertes H_2O	ad 1000 ml

Die Stammlösung des Fe-EDTA setzte sich zusammen aus: Titriplex III (930 mg/l) + $FeSO_4$ (695 mg/l).

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

Spurenelementlösung

$MnCl_2 * 4 H_2O$	99	mg/l
$ZnSO_4 * 7 H_2O$	6,3	mg/l
$NiSO_4 * 6 H_2O$	26,3	mg/l
$CoSO_4 * 7 H_2O$	2,81	mg/l
$CuSO_4 * 5 H_2O$	4,99	mg/l
$Al(SO_4)_3 * 18 H_2O$	6,66	mg/l
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} * 4 H_2O$	1,76	mg/l
NH_4VO_3	2,91	mg/l
KJ	249	mg/l
KBr	238	mg/l
LiCl	8,48	mg/l
H_3BO_3	30,9	mg/l

Als entionisiertes Wasser wird das Wasser bezeichnet, das über eine Umkehrosmoseanlage (Fa. Millipore RO60) und nachgeschalteter Christ Ministil-Anlage (max. Leitfähigkeit 1 μS) entionisiert worden ist. Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

Das Medium wurde im Autoklaven bei 121 ^{o}C in 10 l-Glasflaschen sterilisiert. $CaCl_2 \times 2 H_2O$ wurde getrennt autoklaviert und anschließend dem Medium zugegeben.

Für die Anzucht der Algen in einem Medium ohne organische C-Quelle wurde das Grundmedium modifiziert. Da das anorganische Medium ohne Acetat seine Puffereigenschaften verlor, wurde ein Ersatzpuffer mit einem PO_4^{3-}-Gemisch ($Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$, 590 mg/l; KH_2PO_4 184 mg/l) anstelle von $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ verwendet. Die Pufferkapazität im Bereich von pH 7 - pH 8 war allerdings gering. Bei Versuchsdauern von > 24 Stunden fiel der pH-Wert bei einer Begasung mit 1 % (v/v) CO_2 in Luft auf unter 4, und das Algenwachstum wurde sistiert. Die Algen wurden deshalb pH-statisch bei den in der Versuchsbeschreibung angegebenen pH-Werten kultiviert.

2.2.2. Stammkulturen

Die lyophilisierten Bakterien eines Isolats wurden in verschmolzenen Glasröhrchen in einer Kühlkammer bei 7 ± 2 °C aufbewahrt. Die auf Schrägagarröhrchen (N11) gehaltenen Algen eines Isolats entstammten der Stammsammlung des IBT-3 der Kernforschungsanlage Jülich. Um im Verlauf der Arbeit versuchsbeeinflussende genotypische Veränderungen der Organismen weitgehend von vornherein auszuschließen, wurden regelmäßig alle 3 Monate neue Inocula für die Versuche aus den Stammkulturen angesetzt.

2.2.3. Vorkulturen

Die lyophilisierten Pseudomonas-Kulturen wurden in einer 0,25 %igen Ringerlösung (Fa. Merck) aufgenommen, auf Agarplatten (Nähragar, Fa. Merck) überimpft und im Brutschrank bei 25 °C 5 Tage angezogen.

Die Scenedesmus-Stammkulturen wurden mit Grundmedium vom Schrägagar abgeschwemmt und in eine mit 200 ml Grundmedium gefüllte Chemostatröhre überimpft. Nach einer Anwachsphase von 1 - 2 Wochen wurden die bakterienfreien Algen kontinuierlich bei $D = 0{,}025\ h^{-1}$ kultiviert ($T = 25\ ^{o}C$, Begasung: 1 % CO_2 in Luft, Quantenflußdichte 157 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$).

2.2.4. Batchkulturen

Die Kulturgefäße bestanden, wenn nicht anders beschrieben, aus Röhren mit konisch verjüngtem Boden mit einem Fassungsvermögen von 300 ml (Groeneweg und Soeder, 1978). Die Kulturen wurden mit steriler Luft bzw. einem Luft/CO_2-Gemisch (1 % (v/v) CO_2; 7,8 l h^{-1}) begast und dadurch gleichzeitig durchmischt. Für konstante Belichtung und Temperatur sorgte ein Lichtthermostat (s. Abschnitt 2.2.5.), wie bei Kuhl und Lorenzen (1964) beschrieben. Die Versuche wurden mit der Organismenkonzentration, die der gewünschten Ausgangs-OD im Kulturgefäß entsprach, gestartet.

Berechnung des als Inoculum benötigten Suspensionsvolumens:

$$V = \frac{OD_o \times V_R}{OD_x} \qquad (1)$$

V = Volumen (ml) des Inokulums
OD_o = gewünschte Ausgangs-OD_{570} im Kulturgefäß
OD_x = OD_{570} des Inokulums
V_R = Nutzvolumen des Kulturgefäßes (300 ml)

2.2.5. Kontinuierliche Kulturen in Chemostaten

Die von mir verwendeten Chemostaten unterschieden sich hinsichtlich der Größe ihres Nutzvolumens (300 ml, 1600 ml) und der eingestellten Turbulenz. Die Turbulenz in den 300 ml Chemostaten wurde, wie in Abschnitt 2.2.4. beschrieben, erzeugt, während in den 1600 ml Chemostaten die Suspension gerührt (750 rpm) und in den meisten Fällen zusätzlich belüftet (12,5 l h^{-1}) wurde (Photo 1).

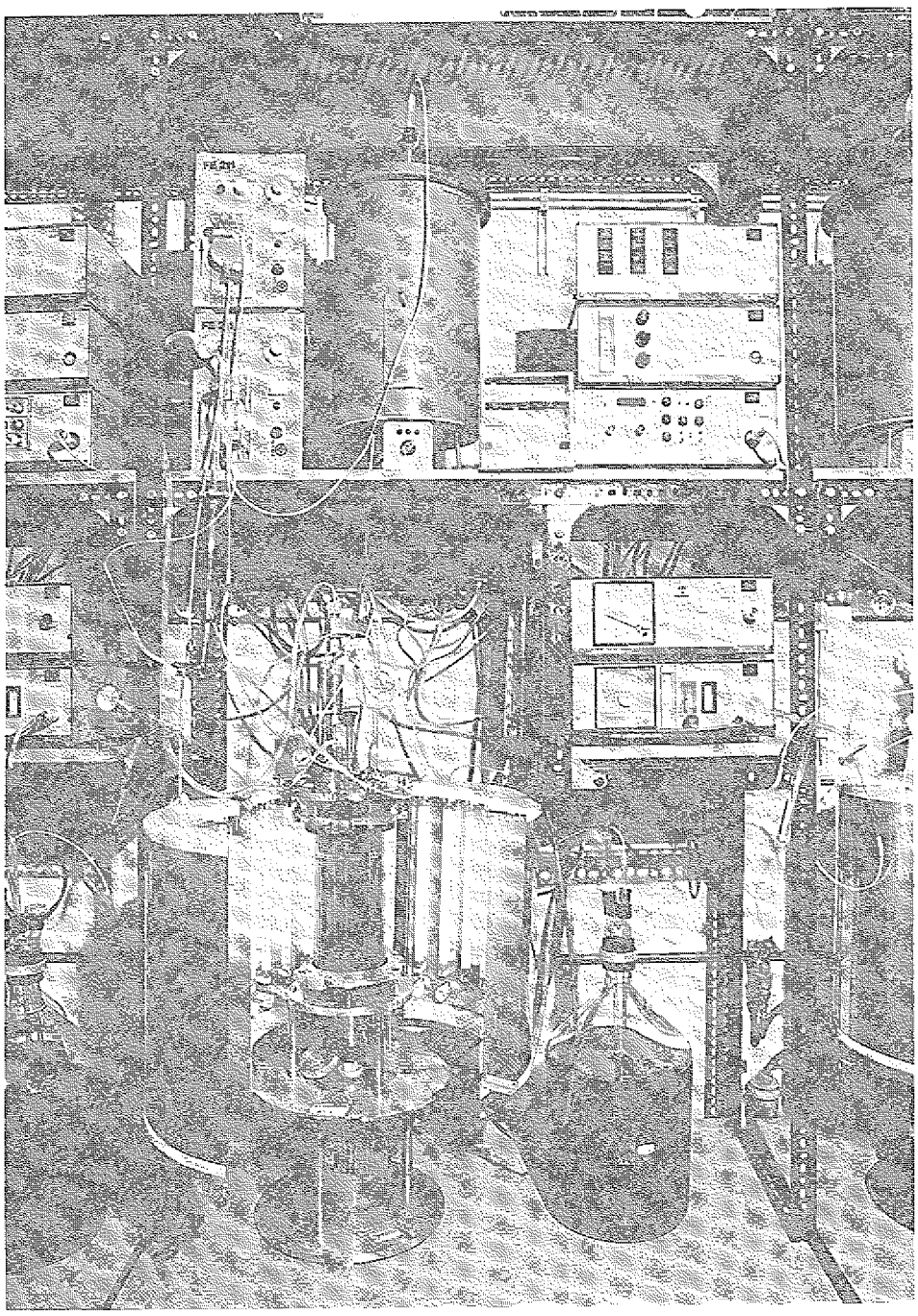


Photo 1: Chemostatenanlage mit 1600 ml Fermenter
(Anwendung : Reinkulturen von Scenedesmus falcatus (Versuchsreihe B), Mischkulturen von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa)

Die kleineren 300 ml-Reaktoren eigneten sich nicht für Kulturen, aus denen große Mengen an Proben für Analysen genommen werden mußten oder an denen Abgasmessungen vorgenommen werden sollten. Aus technischen Gründen (Fehlen kleiner sterilisierbarer pH-Elektroden) war es zudem nicht möglich, in den geschlossenen 300 ml Fermentern kontinuierlich den pH-Wert zu messen oder zu regeln.

Beim Aufbau meiner Versuchsanlagen kam es mir vor allem darauf an, ein verbessertes und preiswerteres Probenentnahmesystem, gegenüber den üblicherweise verwendeten zu konstruieren. Dies wurde erreicht, indem verschiedene, mit Schraubverschlüssen versehene Glasteile der Fa. Sovirel (Blasenzählerkopf, Reagenzgläser) benutzt wurden. Die Verbindung zum Gesamtsystem wurde über nicht korrosive VA-Stahlröhrchen (IØ = 2 mm) hergestellt. Die Röhrchen wurden mit dem offenen Ende weit in auf eine Seite mit Silikonkautschuk verschlossene Silikonschläuche eingesteckt. Dies erlaubte im Bedarfsfall (DOC-Bestimmung in Steady State) auch eine Einkopplung in das Gesamtsystem ohne vorherige Abflämmung des Röhrchens.

Das Probenentnahmesystem war so flexibel gestaltet, daß je nach der Art der zu bestimmenden Parameter, entweder das gesamte System ausgetauscht werden konnte oder aber nur die über einen Schraubverschluß verbundenen Probengläschen verschiedener Größen (5 - 100 ml).

Mit diesem System konnte zudem das Animpfmaterial in den Fermenter eingebracht werden. Mit Hilfe von Druckluft konnte ich die nach dem Vorgehen in den Schläuchen verbleibende Restsuspension in den Fermenter zurückdrücken. Weiterhin mußten folgende Anforderungen an die Betriebssicherheit der Anlagen erfüllt sein:

a) Alle Systemteile mußten auch während des Betriebs der Chemostaten in kürzester Zeit (einige Sekunden) ohne Infektionsgefahr austauschbar sein. Dazu mußte jedes Element des Systems getrennt autoklavierbar sein. Dies erreichte ich, indem ich die Verbindung der Einzelkomponenten (Nährlösungsreservoir, Durchflußmesser, Reaktor, Überlaufgefäß, Probenentnahmesystem) herstellte wie bei dem Probenentnahmesystem geschildert. Mit Hilfe dieser Röhrchen, die vor dem Einstecken in die Verbindungsschläuche aus Silikonkautschuk in der Regel abgeflämmt wur-

den, konnten die Einzelelemente des Gesamtsystems jederzeit ausgetauscht werden.

Während alle Teile der kleineren Chemostaten im Autoklaven sterilisiert werden konnten, ließen sich die 1600 ml Fermenter (Fa. Bioengineering, KLF 2000) in situ sterilisieren. Die Schläuche und übrigen Elemente des Systems sterilisierte ich im Autoklaven.

b) Die Dosiereinrichtungen, Schlauchpumpen (Fa. Abimed, Minipuls 2) für die kleineren Chemostaten und Hubpumpen (Fa. Braun-Melsungen, Fe 211) mit autoklavierbaren Pumpenköpfen für die 1600 ml Fermenter, arbeiteten über einen längeren Zeitraum konstant und reproduzierbar.

c) Alle Schlauchverbindungen innerhalb als auch außerhalb (z.B. Gaszufuhr) des Systems mußten aus Materialien bestehen, die keine die Kulturen beeinflussende Stoffe ins Medium oder in das zugeführte Gas abgeben. Dies konnte durch Verwendung von Schläuchen aus Teflon und in geringem Umfang aus Silikonkautschuk realisiert werden.

d) Die Reaktionsgefäße wurden so ausgelegt, daß keine Toträume entstanden und eine vollständige Durchmischung gewährleistet war. Bei homogener Durchmischung des Kulturgefäßes sollte eine nicht wachsende Kultur exponentiell nach

$$X = X_o * e^{-Dt} \qquad (2)$$

abnehmen.

X = Organismendichte zum Zeitpunkt t

X_o = Organismendichte zum Zeitpunkt 0

D = Verdünnungsrate

Dies wurde mit einem Farbstoff ($KMnO_4$) experimentell bei $D = 0{,}082\ h^{-1}$ überprüft. Es ergab sich für beide Reaktortypen eine gute Übreinstimmung der experimentellen mit den theoretischen Werten.

Im folgenden sei nun Funktion und Aufbau des von mir verwendeten Fermentersystems am Beispiel eines 300 ml Fermenters erklärt (Abb. 2).

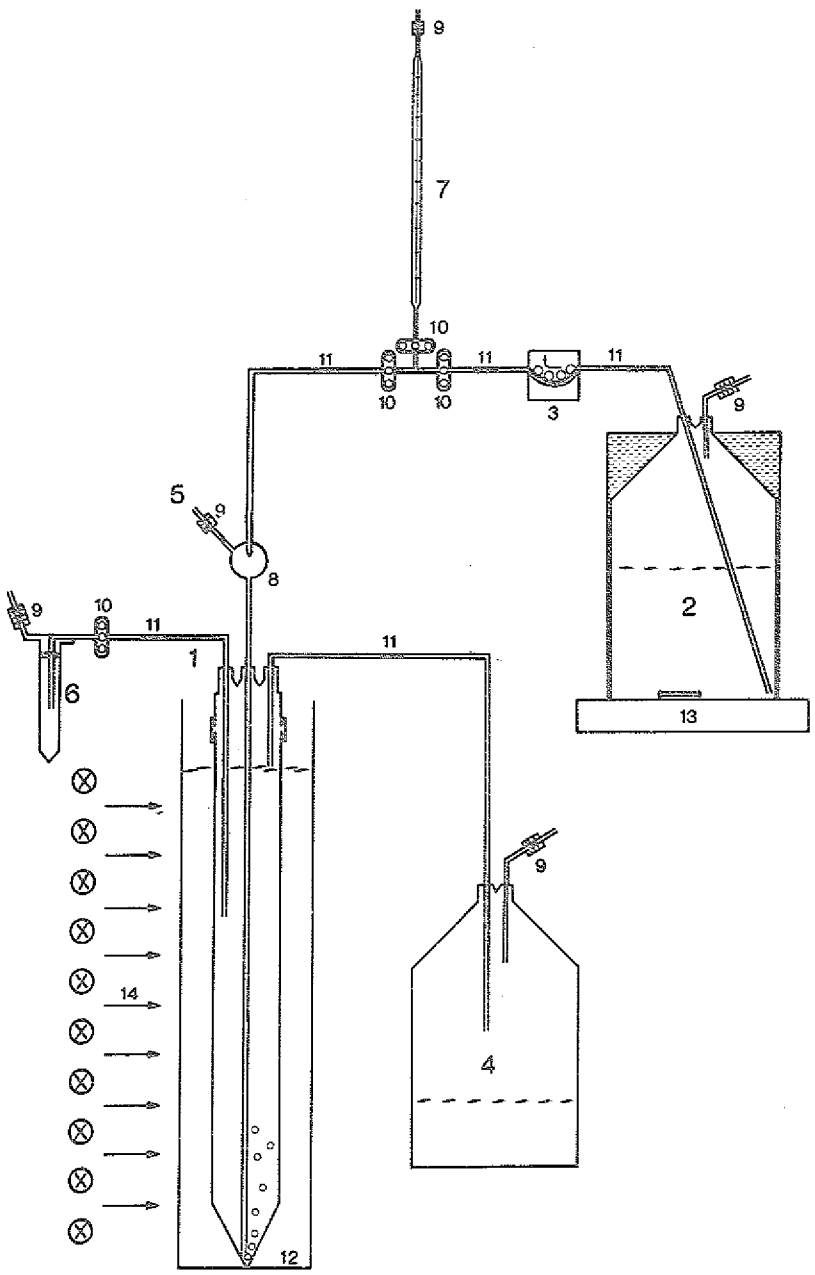


Abb. 2: Skizze des Chemostatensystems mit einem 300 ml Fermenter
(Anwendung: Reinkulturen von Pseudomonas aeruginosa
Reinkulturen von Scenedesmus falcatus (Versuchsreihe A))

Eine Schlauchpumpe (3) förderte die gerührte Nährlösung kontinuierlich aus einem abgedunkelten Vorratsgefäß (2) in das nach Groeneweg und Soeder (1978) gebaute Reaktionsgefäß (1). Die Pumpleistung wurde täglich über einen Durchflußmesser (7) überprüft und, falls nötig, entsprechend korrigiert. Dazu mußte der Medienfluß zum Fermenter kurz unterbrochen und in den Durchflußmesser umgeleitet werden. Nach Herstellung eines Druckausgleichs zwischen Fermenter und Durchflußmesser, ließ sich die Zuflußrate (ml/h) aus der Zeit berechnen, die die Pumpe benötigte, um 1 ml Medium in den Durchflußmesser zu fördern. Anschließend wurde das Medium aus dem Durchflußmesser in den normalen Zulauf abgelassen und wieder kontinuierlich Medium in den Fermenter gepumpt. Der Medienfilm wurde direkt über dem Kulturgefäß durch eine "Organismenfalle" (8) unterbrochen, die ein mögliches Rückwandern der Organismen in das Medienvorratsgefäß verhindern sollte. Zusammen mit dem Gasgemisch (die Begasungsrate wurde über Durchflußmesser der Fa. Fischer und Porter vorgegeben), das über ein Sterilfilter in den Mediumzufluß eingeleitet wurde, wurde die Nährlösung durch ein Glasröhrchen direkt über den Boden des Reaktors in das Gefäß eingeleitet. Das miteingebrachte Gas bewirkte so neben einer Versorgung der Organismen mit O_2 und CO_2 eine vollständige Durchmischung der Kultur. Der sich im Fermenter aufbauende Überdruck sorgte gleichzeitig über einen Niveauregler für einen kontinuierlichen Austritt der Kulturflüssigkeit, die in einem Auffanggefäß (4) gesammelt wurde.

Zur Beleuchtung des in einem thermostatisierten Wasserbad (25 $\pm$ 0,5 ^{o}C) stehenden Fermenters diente eine Lichtbank, auf die 10 Leuchtstoffröhren (5 x Philips TLD 58W/84 und 5 x TLD 36W/84) montiert waren. Die Röhren waren einzeln zuschaltbar.

Der Aufbau eines 1600 ml Chemostaten unterschied sich vom oben geschilderten wie folgt: Als Reaktionsgefäß diente ein 2000 ml Rührkesselreaktor mit einem Nutzvolumen von 1600 ml (Fa. Bioengineering, Wald, CH). Zur kontinuierlichen Messung des pH-Wertes konnte eine sterilisierbare Elektrode eingebaut werden. Die Beleuchtungseinrichtung bestand aus einem, den Fermenter umschließenden Leuchtstoffröhrenkranz mit 24 in Zweiergruppen zuschaltbaren Lichtquellen (Philips 8W/33). Die Temperatur (25 ^{o}C) wurde über einen eingebauten Heizfinger und einer Kühlschlange geregelt.

2.2.6. Messung der Quantenflußdichte

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

Die Messung erfolgte jeweils an der Oberfläche der Kulturgefäße. Sie betrug, wenn in der Versuchsbeschreibung nicht gesondert angegeben, bei den 1600 ml Fermentern 99 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, bei den 300 ml Fermentern an der zur Lichtquelle zeigenden Seite 157 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$.

2.2.7. O_2-Messung in unbegasten Mischkulturen

Die in situ sterilisierbare O_2-Elektrode (Fa. Dr. W. Ingold AG) erwies sich in Langzeitversuchen (> 2 Wochen), in denen die Elektrode nicht nachgeeicht werden konnte, als ungeeignet. Sie driftete mit zunehmender Versuchsdauer zu höheren O_2-Werten hin (0 - 5 % O_2-Sättigung). Eine exakte Bestimmung der O_2-Konzentration in unbegasten Mischkulturen war deshalb nicht möglich.

2.2.8. pH-Messung

In den 1600 ml Fermentern waren in situ sterilisierbare pH-Elektroden (Fa. Dr. W. Ingold) eingebaut. Nach dem Sterilisationsvorgang wichen die angezeigten Werte im ungerührten Medium in der Regel etwas (maximal bis 0,1 pH- Einheiten) von denen einer Referenzelektrode ab. Durch Verändern der Elektrodensteilheit wurde die sterilisierte Elektrode nachjustiert. Im kontinuierlichen Betrieb war keine weitere Drift festzustellen (gelegentliche Überprüfung mit eingeeichten Referenzelektroden).

In den geschlossenen 300 ml Fermentern konnte der pH-Wert nicht kontinuierlich gemessen werden, da keine entsprechend kleinen sterilisierbaren pH-Elektroden zur Verfügung standen. Der pH-Wert wurde deshalb extern in gerührten Gefäßen mit entnommener Kultursuspension gemessen.

Für die in Abschnitt 4.1.1.2. beschriebenen pH-statisierten photoautotroph wachsenden Kulturen (300 ml Gefäße) wurden kleine nicht sterilisierbare pH-Elektroden (Fa. Dr. W. Ingold) verwandt.

Die Elektroden wurden sofort nach dem Animpfen der Batchkulturen in das System eingebracht (Regelung mit 1 N NaOH). Da die Algen in diesem Fall in einem anorganischen Medium (Versuchsdauer: ca. 1 Tag) wuchsen, war die Kontaminationsgefahr durch Bakterien und Pilze gering. Infizierte Kulturen ($> 10^2$ Bakterien/ml) wurden verworfen.

2.2.9. Kontrolle auf Fremdinfektionen

Die Kontrolle auf mögliche Fremdinfektionen erfolgte zu Versuchsbeginn und zum Zeitpunkt der letzten Messung des Versuchs. Überschritt die Versuchsdauer eine Woche, wurden Zwischenkontrollen durchgeführt. Die Kulturen wurden mikroskopisch im Phasenkontrast bei 400facher Vergrößerung auf mögliche Verunreinigungen durch Fremdbakterien oder Pilze untersucht. Zusätzlich wurden die Kulturen auf Nähragar ausgestrichen und 3 Tage bei 25 ^{o}C bebrütet. Mit Fremdbakterien infizierte Versuchsansätze wurden jeweils verworfen.

2.3. Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte wurde im Spektralphotometer (Kontron Uvikon) in planparallelen Küvetten (d = 1 cm) bei 570 nm gemessen. Sie diente als schnell bestimmbarer Parameter als Maß der Biomassekonzentration.

2.4. Fließgleichgewichte (Steady States)

Als Fließgleichgewicht wurde der Zustand einer kontinuierlichen Kultur bezeichnet, bei dem die optische Dichte über 5 Aufenthaltszeiten konstant (maximale Abweichung $\pm$ 5 %) blieb.

2.5. Bestimmung der Zellkonzentration

Die Algen wurden in Zählkammern nach Neubauer, wie bei Soeder et al. (1967) beschrieben, gezählt. Es wurden so viel Zählungen pro Probe durchgeführt, daß mindestens 800 Zellen erfaßt wurden. Die Abweichungen der Einzelzählungen vom Mittelwert waren immer < 8 %.

Die Bakterien wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe auf ein zählbares Maß reduziert und auf einem Pseudomonas-Selektivagar (Cetrimid, Fa. Merck) ausgeplattet. Nach einer 3tägigen Inkubationszeit bei 25 ^{o}C wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt (Genauigkeit: $\pm$ 10 %). Cetrimidagar verzögerte das Schwärmen der Bakterien und wurde deshalb dem Nähragar vorgezogen.

Stichprobenartige Ausplattungen der Bakterien auf Nähragar zeigten keine Unterschiede zum Ausplatten auf Cetrimidagar. Eine lineare Korrelation der Zellkonzentration zur optischen Dichte der kontinuierlichen Bakterienkulturen ließ sich wie bei den Algenkulturen nicht herstellen. Die Extinktion ließ sich deshalb nicht zur Ermittlung der Zellkonzentration heranziehen. Die Zellkonzentration mußte bei jeder Kultur nach der beschriebenen Methode bestimmt werden.

2.6. Ermittlung der Trockenmasse

Den Reinkulturen wurden bestimmte Volumina (20 - 50 ml), abhängig von der Organismenkonzentration (entsprechend einer Biomassekonzentration von 10 - 20 mg/Probe), entnommen. Die Mikroorganismen wurden in einer Tischzentrifuge (Ecco 5170) bei 5000 UpM (Algen 5 Minuten, Bakterien 20 Minuten) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Organismen in 0,25 % (w/v)iger Ringerlösung resuspendiert, ein zweites Mal zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Die so vom Medium separierten Organismen wurden schließlich in 1,5 ml entionisiertem H_2O resuspendiert, eingefroren und sodann in kleinen Schraubdeckelgläschen lyophilisiert. Anschließend erfolgte bei 110 ^{o}C eine Nachtrocknung für 1 Stunde. Die Probe wurde im Exsikkator über trockenem Silikagel abgekühlt (1 Stunde). Nach der Bestimmung der Trockenmasse durch Wägung und Substraktion des Leergewichtes wur-

den die Proben im Bedarfsfall einer C:H:N-Analyse unterworfen, ohne daß hierfür eine zusätzliche Probennahme erforderlich war. Der Gefriertrocknungsschritt war nötig, damit die bei 110 °C getrocknete Biomasse nicht zu einer festen Masse am Boden des Gefäßes zusammenbackte und die Einwaage repräsentativer Teilmengen für die C:H:N-Analyse unmöglich machte.

Während die Trockenmasse der Algen mit dieser Methode zuverlässig bestimmt werden konnte, deuteten C-Defizite bei der Bilanzierung von Bakterienkulturen auf Verluste bei der Trockenmassebestimmung hin. Dies konnte dann mit der unter 2.9. aufgeführten Methode verifiziert werden.

2.7. C : H : N-Analyse der Biomasse

Die Proben wurden wie in Abschnitt 2.6. beschrieben vorbereitet. Die Analyse erfolgte im C:H:N-Analyser (Perkin-Elmer 240 B). Dazu wurde eine Mindestprobenmenge von 1 mg TS benötigt (Analysengenauigkeit ca. ± 0,1 %).

2.8. Kohlenstoffbestimmung

2.8.1. Anorganischer und organischer Kohlenstoff

Das Meßprinzip zur Bestimmung des Kohlenstoffs beruhte auf einer Oxidation des Kohlenstoffs zu CO_2, das im Infrarotphotometer gemessen wurde. Das benutzte Analysengerät (Beckman 915A) hatte zwei getrennte Verbrennungsrohre. In dem einen wurde der anorganische Kohlenstoff (IC) im sauren Milieu bei 300 °C, in dem anderen der Gesamtkohlenstoff (TC) (anorganischer und organischer) bei 800 °C zu CO_2 oxidiert. Die Differenz aus beiden Kanälen ergab den organischen Kohlenstoff.

Anhand einer Eichreihe (0 - 100 mg C l^{-1}) mit verschiedenen Verdünnungen eines Gemischs (Na_2CO_3, 4,404 g/l; $NaHCO_3$, 3,497 g/l) ließ sich der C-Gehalt einer Probe bestimmen. Die Meßgenauigkeit bei unverdünnten Proben betrug ± 2 mg.

2.8.2. Gelöster organischer Kohlenstoff

Die Kultursuspension (ca. 5 ml) wurde über ein 0,2 µm Filter (Celluloseacetat, Fa. Sartorius) abfiltriert. Durch die oben beschriebene Differenzbestimmung erhielt man den gelösten organischen Kohlenstoff (DOC).

Um die Konzentration des Nicht-Acetat-DOC zu ermitteln, also den von den Organismen ins Medium abgegebenen organischen Kohlenstoff, mußte das von den Kulturen nicht verwertete Acetat (bestimmt mittels Isotachophorese) von der Gesamtmenge an gelöstem organischem Kohlenstoff abgezogen werden.

2.8.3. Partikulärer Kohlenstoff

Die unbehandelte Kultursuspension wurde direkt in den C-Analysator eingespritzt. Der partikuläre Kohlenstoff ergab sich aus der Differenz zwischen TC und (IC plus DOC).

2.9. Bestimmung der Biomassekonzentration

Als Maß für die Biomassekonzentration diente der C-Gehalt der Organismen. Die Bestimmung des partikulären Kohlenstoffs und die C-Analyse der C : H : N-Bestimmung der TS zeigten bei den Algen im Gegensatz zu den Bakterien eine gute Übereinstimmung.

Die über eine C:H:N-Analyse der bakteriellen TS ermittelten C-Werte (Verluste bei der Aufbereitung der Proben) lagen deutlich unter denen, der im C-Analysator direkt gemessenen (Abb. 3). C-Bilanzen, die mit Hilfe dieser Methodik aufgestellt wurden, gingen recht gut auf. Der Kohlenstoffgehalt der bakteriellen Biomasse wurde deshalb im C-Analyser bestimmt (s. Abschnitt 2.8.3.).

Da die C-Gehalte der Algen- und Bakterienbiomasse mit der Extinktion (570 nm) der Kultursuspension linear korreliert waren (Abb. 3, 4), konnte die Biomassekonzentration (mg C l^{-1}) aus der Extinktion ermittelt werden.

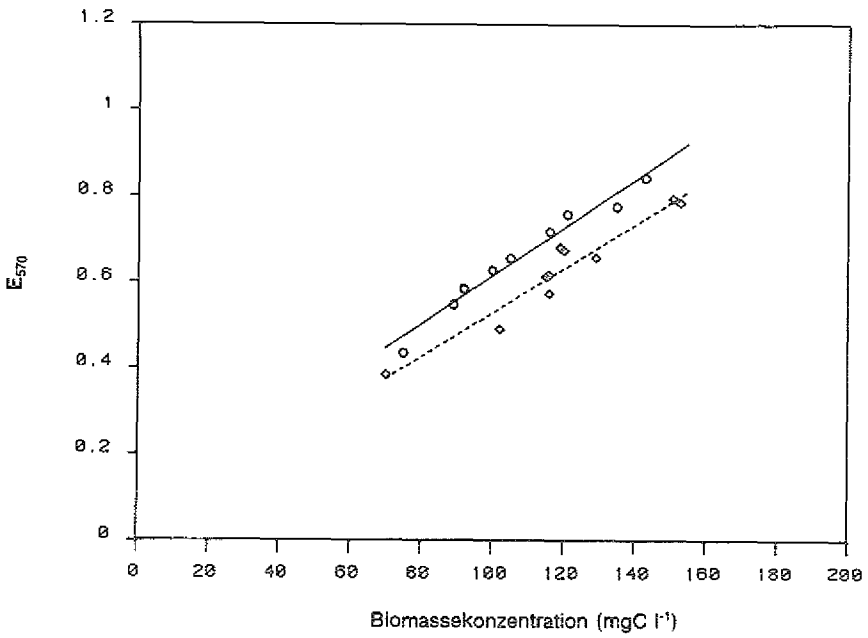


Abb. 3: Korrelation zwischen der Extinktion von Kulturen von Pseudomonas aeruginosa (Wellenlänge 570 nm) und der Biomassekonzentration im Chemostaten (Messungen im Steady State)

O-O Biomassekonzentration, direkt im C-Analysator gemessen
r = 0,9656 n = 9

◇-◇ Biomassekonzentration über eine C : H : N-Analyse der TS ermittelt r = 0,9826 n = 10

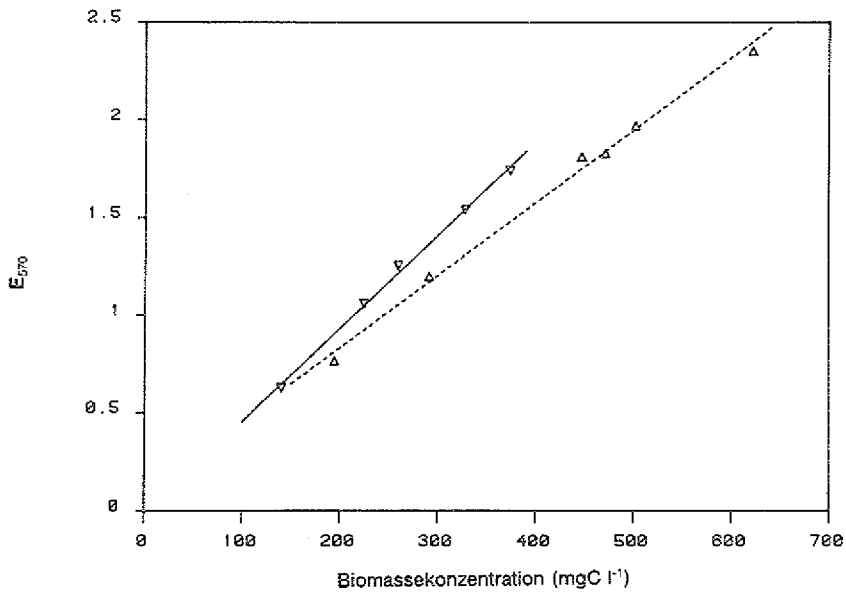


Abb. 4: Korrelation zwischen der Extinktion von Kulturen von <u>Scenedesmus falcatus</u> (Wellenlänge 570 nm) und der Biomassekonzentration im Chemostaten (Messungen im Steady State)

△- -△ Kulturen der Versuchsreihe A
(Quantenflußdichte: 157 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$) r = 0,9972 n = 6

▽—▽ Kulturen der Versuchsreihe B
(Quantenflußdichte: 99 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$) r = 0,9983 n = 5

2.10. CO_2-Messung und Bilanzierung

2.10.1. Meßverfahren

Das Begasungsgemisch für die Kulturen bestand, sofern nicht anders angegeben, aus 1 % (v/v) CO_2 in Luft. Es wurde über Durchflußmesser (1) (Fa. Fischer und Porter) mit nachgeschaltetem Gasmischbehälter (2) in den gewünschten Konzentrationen hergestellt (Abb. 5).

Zur Kontrolle des hergestellten Gemischs wurde eine konstante Menge (10 l h^{-1}) vom Hauptstrom abgezweigt. Da nur alternativ die CO_2-Konzentration im Abgas oder der Zuluft gemessen werden konnte, wurde bei einer Analyse des Abgases (Meßdauer 20 Minuten) der zur Messung der Zuluft abgeleitete Teilstrom über einen Dreiwegehahn (6) an die Außenluft abgelassen. Dies gewährleistete eine konstante Begasungsrate des Fermenters (3) von 12,5 l h^{-1}. Über einen Wasserabscheider (4) und einen weiteren Durchflußmesser gelangte der Gasstrom zu dem CO_2-Analysator (5) (Fa. Maihak, 3 Meßbereiche: 0 - 0,03 % (v/v), 0 - 0,3 % (v/v), 0 - 3 % (v/v)). Als Mindestdurchfluß benötigte das Gerät 8 l h^{-1}. Die eingestellte Gerätedurchflußrate betrug 10 l h^{-1}. Die 3 Meßbereiche des Gerätes wurden alle 2 Wochen mit N_2 und entsprechenden Eichgasen (0,021 %; 0,21 %; 2,1 % CO_2 (v/v) in N_2) nachgeeicht. Wegen der nur geringen Drift der Werte erwies sich dies als ausreichend.

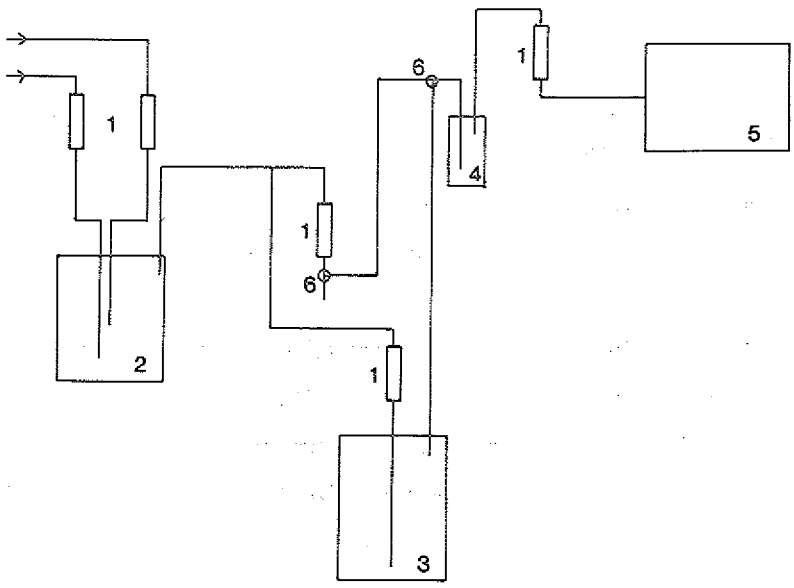


Abb. 5: Schematische Darstellung des Begasungssystems und der CO_2-Meß-einrichtung eines Chemostaten

2.10.2. Bilanzierung des verbrauchten bzw. produzierten CO_2

Nebem dem Anteil des CO_2, das sich im Medium des Reaktors löste, wurde mittels einer Differenzbestimmung (CO_2-Konzentration der Zuluft minus CO_2-Konzentration der Abluft) die Menge an CO_2 ermittelt, die letztendlich im Fermenter von den Organismen produziert bzw. konsumiert wurde.

Unter Versuchsbedingungen (25 ^{o}C, 131,6 Pascal) hatte das Gasgemisch ein Molvolumen von 24,48 l, berechnet nach der Formel:

$$V = \frac{131{,}6\ (1 + 0{,}0037\ t) * V_{o}}{P} \qquad (3)$$

t = Temperatur (^{o}C)
P = Druck (Pascal)
V_o = Molvolumen eines Gases im Normalzustand bei t = 0 ^{o}C
(V_o = 22,413 l)

Die produzierte bzw. konsumierte CO_2-Menge pro Stunde in der Gasphase ließ sich errechnen aus:

$$CO_2\ (mg\ h^{-1}) = \frac{\%\ CO_2 * MG_{CO_2} * D_{Gas}}{V} \qquad (4)$$

D_{Gas} = Gasdurchflußrate

2.11. Acetat-Bestimmung

Acetat wurde quantitativ mit Hilfe der Isotachophorese (Fa. LKB, Tachophor) analysiert.

Prinzip: Bei der Isotachophorese findet der Ionentrennprozeß, im Unterschied zur Elektrophorese, in einem diskontinuierlichen Elektrolytsystem mit zwei verschiedenen Elektrolyten statt. Der eine Elektrolyt (Leitelektrolyt) enthält ein Ion mit höherer Mobilität als die zu trennenden Ionen der Probe, der andere (Endelektrolyt) ein Ion mit niedrigerer Mobilität. Das Probengemisch wird in die Grenzfläche zwischen den Elektrolyten injiziert. Nach Anlegen einer Spannung ordnen sich die Ionen entsprechend ihrer Mobilität. In kurzer Zeit ist das Probengemisch völlig aufgetrennt in verschiedene Zonen, die jeweils nur Ionen gleicher Mobilität enthalten. Die einzelnen Zonen halten direkten Kontakt zu ihren Nachbarzonen und wandern in einem "Ionenzug" mit gleicher Geschwindigkeit. Die Längen der einzelnen Zonen sind ein Maß für die eingespritzten Mengen der einzelnen Ionen.

Die beiden Elektrolyte für die Acetatbestimmung setzten sich zusammen aus:

Leitelektrolyt (250 ml):	257,6 mg	Glycyl-Glycin (Fluka, puriss. CHR)
	500 mg	Triton (Merck, für Gaschromatographie)
	75 ml	1 %ige wässrige Lösung von Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)
	1,75 ml	1 N HCl

Das Glycyl-Glycin-Gemisch gab dem Elektrolyten die benötigten Puffereigenschaften (pH 2,9), Triton sollte als Detergenz Bakterienwachstum verhindern. HPMC verringerte die Elektroendoosmose zwischen den Nachbarzonen. Cl^- war in diesem System das Ion mit der größten Mobilität.

Endelektrolyt (250 ml):	0,175 ml	100 %iger n-Hexansäure (Merck, für biochemische Zwecke)

Das Hexansäureanion stellte das Ion mit der geringsten Mobilität dar.

Die eingesetzte Kapillare hatte eine Länge von 23 cm, die Stromstärke zum Zeitpunkt der Detektion betrug 50 µA.

Acetat konnte mit einem Leitfähigkeitsdetektor qualitativ und quantitativ bestimmt werden (Abb. 6).

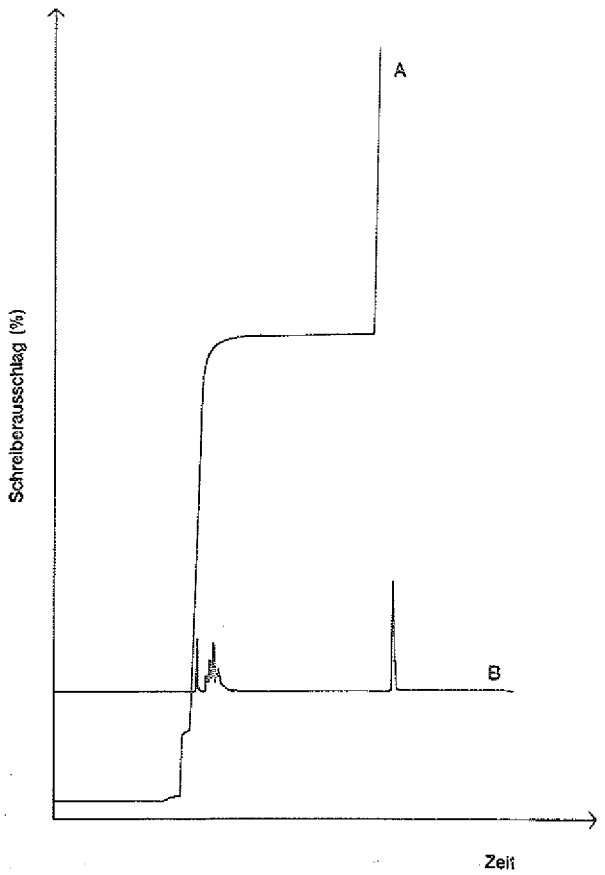


Abb. 6: Schreiberprotokoll einer Acetatbestimmung (Acetat-Eichlösung)

A Leitfähigkeit

B 1. Ableitung der Leitfähigkeit

Aus der Stufenhöhe (% vom Vollausschlag) konnten qualitative Rückschlüsse gezogen und aus der Stufenlänge die Konzentration des Anions der eingegebenen Probe bestimmt werden.

Als Maß für die Acetatkonzentration diente die Strecke zwischen den beiden Peaks der 1. Ableitung der Leitfähigkeitskurve. Die Eichung des Systems erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen an Acetat (0 - 10 mmol l^{-1}). Das Detektionslimit betrug 0,1 mmol l^{-1}, der Meßfehler $\pm$ 5 %.

2.12. Chlorophyllbestimmung

Zur Chlorophyllbestimmung wurde die von Nusch (1980) beschriebene Methode wie folgt modifiziert:

3 - 5 ml Kultursuspension wurden 5 Minuten bei 5000 U/Min. in verschraubbaren Röhrchen abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Biomasse in 3 ml mit $MgCO_3$ gesättigtem Äthanol resuspendiert. Die Algen wurden 10 Minuten bei 65 ^{o}C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe wurde erneut zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes bei 750 nm und 665 nm gemessen. Alle Aufbereitungsschritte nach der 1. Zentrifugation erfolgten im Dunkeln.

Zur Differenzierung zwischen Chlorophyll und Phaeophytin, die beide bei 665 nm ein Absorptionsmaximum haben (Abb. 7), mußte das Chlorophyll zunächst in das entsprechende Phaeophytin umgewandelt werden. Dies geschah durch eine Ansäuerung des extrahierten Chlorophylls mit 0,1 N HCl (2 ml Probe + 50 µl HCl). Nach 10 Minuten, wenn alles Chlorophyll in Phaeophytin umgewandelt worden war, wurde erneut die Extinktion bei 750 nm und 665 nm gemessen. Die Messung bei 750 nm diente zur Kontrolle des Extraktes auf eventuell vorhandene Zellrückstände. Verunreinigte Extrakte wurden verworfen.

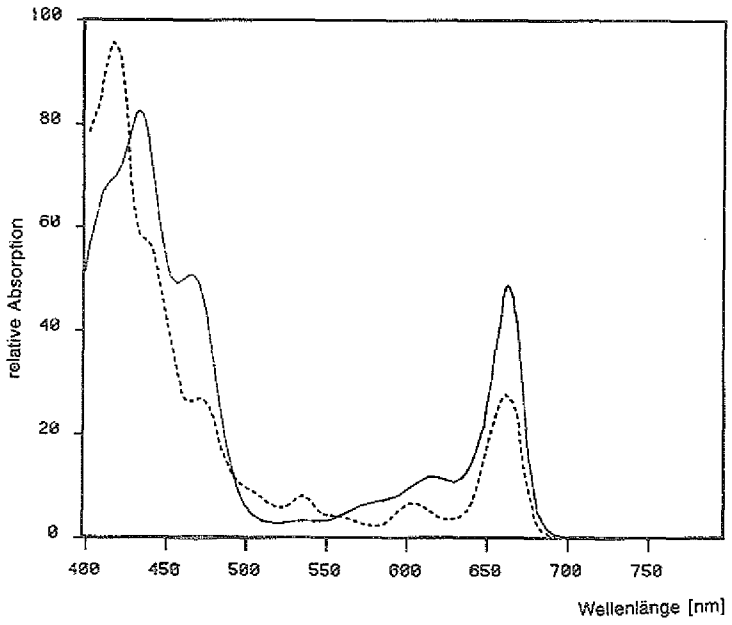


Abb. 7: Absorptionsspektrum eines Äthanolextrakts von Scenedesmus falcatus aus dem Chemostat

—— vor dem Ansäuern mit 1 N HCl

--- nach dem Ansäuern mit 1 N HCl

Mit Hilfe der von Nusch aufgestellten Formel konnte sowohl der Chlorophyll-Anteil als auch der des Phaeophytins errechnet werden.

$$\text{mg Chlorophyll} = 28{,}67 * ({}^{v}E_{665} - {}^{n}E_{665}) * \frac{v}{V * l} \qquad (5)$$

$$\text{mg Phaeophytin} = 21{,}24 * {}^{n}E_{665} * \frac{v}{V * l} - \text{mg Chlorophyll} \qquad (6)$$

Der Faktor ergab sich aus dem empirischen Extinktionskoeffizienten für 90 % Äthanol: 12,2 (Nusch 1980) und dem in Vorversuchen ermittelten Korrekturfaktor für die Phaeophytindifferenzierung (1,7406):

$$1{,}7406 : (1{,}7406 - 1) \text{ bzw. } 1{,}7406 : 1 \text{ (bei Phaeophytin)}$$

${}^{v}E_{665}$ = Extinktion bei 665 nm vor dem Ansäuern der Probe
${}^{n}E_{665}$ = Extinktion bei 665 nm nach dem Ansäuern der Probe
v = Extraktionsvolumen in ml
V = Probevolumen in l
l = Küvettenlänge in cm

Mit dieser Methode wurde festgestellt, daß der Phaeophytinanteil in meinen begasten Algenkulturen immer < 1 % war.

2.13. N- und P-Analytik

Die anorganischen N-Verbindungen NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+ und molybdatreaktives Phosphat wurden im automatischen Analysengerät (Fa. Cenco) vom Typ des Autoanalysers nach einem von der Firma für dieses Gerät modifizierten Verfahren (geringere Konzentrationen der Reagenzien) der "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (1975) analysiert.

2.13.1. Nitrat und Nitrit

Nitrat wurde mit Hydrazinsulfat im alkalischen Milieu zu Nitrit reduziert. Nitrit geht mit Sulfanilamiden in saurem Milieu eine Diazoverbindung ein, die mit N-1-Naphthyläthylendiamindihydrochlorid eine rot-violette Farbe ergibt. Deren Extinktion wurde bei 520 nm gemessen und anhand einer Eichkurve ausgewertet. Die Nitratkonzentration berechnete sich aus der Differenz der Summe (Nitrit und Nitrat) und der Nitritkonzentration. Für die Nitrateichkurve wurden Eichlösungen im Konzentrationsbereich von 0,5 - 5 mg NO_3-N l^{-1}, für die Nitriteichkurve Eichlösungen im Konzentrationsbereich von 0,05 - 0,5 mg NO_2-N l^{-1} verwendet. Da die NO_3-N- bzw. NO_2-N-Konzentrationen der analysierten Proben in der Regel unter diesen Grenzwerten lagen, wurden die Eichkurven zu den niedrigeren Werten hin extrapoliert.

Die Fehlergrenzen für die eingeeichten Konzentrationsbereiche betrugen für NO_3 ± 0,05 mg N l^{-1} und für NO_2 ± 0,005 mg N l^{-1}.

2.13.2. Ammonium

Durch Substitutionsreaktionen entstehen beim Einwirken von Hypochlorid-Ionen auf Ammoniak in wässriger Lösung Chloramine, die in Anwesenheit von Natriumnitroprussid als Katalysator im basischen Milieu mit Phenol tiefblau gefärbte Indophenole bilden. Deren Extinktion wurde im Photometer bei 620 nm gemessen. Die aufgenommenen Eichkurven galten für einen Konzentrationsbereich von 0,5 - 5 bzw. 5 - 20 mg NH_4^+-N l^{-1}. Die Meßgenauigkeit für unverdünnte Proben betrug 1 % vom jeweiligen Höchstwert der verwendeten Eichkurven.

2.13.3. Molybdatreaktives Phosphat

Phosphat reagiert im sauren Milieu mit Ammoniummolybdat zu Molybdophosphorsäure. Die Extinktion des durch Reduktion entstandenen Molybdänblau-Komplexes wurde im Photometer bei 888 nm gemessen. Es wurde eine Eichkurve für den Konzentrationsbereich von 0,1 - 0,7 mg PO_4^{3-}-P l^{-1} verwendet. Die Meßgenauigkeit betrug für unverdünnte Proben 0,007 mg PO_4^{3-}-P l^{-1}.

Mit dieser Methode wird nicht nur Orthophosphat, sondern auch Phosphor, der an kolloidale (MG > 5.000.000) und niedermolekulare organische Substanzen (MG ~ 250) gebunden ist, gemessen (Melzer & Steinberg 1983).

2.14. Mathematische und statistische Auswertungen

2.14.1 Beschreibung des Kohlenstofflusses einer begasten Mischkultur mit Hilfe einer Matrixrechnung

In dieser Arbeit wurde ein Input-Output-Modell zur Beschreibung der Kohlenstoffflüsse in einem ökologischen System verwendet, das auf einer bei Richey et al. (1978) beschriebenen Matrixrechnung beruht. Dieses Modell ist von dem ökonomischen Leontief-Modell (zitiert in Richey et al. 1978) abgeleitet, das in der Ökologie selten eingesetzt wurde (Hannon 1973).

Dieses Modell beschreibt, daß der gesamte Output des Systems aus dem Kohlenstoffluß aus dem System plus dem intern konsumierten Anteil besteht. Es wird angenommen, daß dieser Teil proportional zur Gesamtproduktion ist. Die wichtigste, aus dem Modell abgeleitete Größe ist der "Cycling Index" (CI), der den Anteil des recyclierten Kohlenstoffs in einem solchen System quantifiziert. Damit ist es möglich, Systeme, die sich aus den gleichen Komponenten zusammensetzen, miteinander bezüglich des Kohlenstoffflusses zu vergleichen. Dieses Modell erlaubt es zudem, die Wirkungen geänderter Kohlenstoffflüsse auf das System vorherzusagen. Es wurde nunmehr auf Anregung von Prof. Grobbelaar von mir eingesetzt, um die Bedeutung der Einzelkomponenten und die der nicht direkt meßbaren Kohlenstofflüsse in einer begasten Algen-Bakterien-Mischkultur zu beschreiben.

Methodik:
Die Spalten und Reihen der Rohmatrix stellen die einzelnen Komponenten des Systems dar (Abb. M1). Die Reihen repräsentieren die C-Lieferanten und die Spalten die C-aufnehmenden Kompartimente. Die eingesetzten Werte sind die Kohlenstoffflüsse aus den Komponenten der Reihen in die der Spalten. An die eigentliche Matrix wird eine zusätzliche Reihe (C-Input) und eine weitere Spalte (C-Output) angehängt.

Abb. M1: Rohdatenmatrix zur Beschreibung des C-Flusses (mg C τ^{-1}) durch eine begaste Algen-Bakterien-Mischkultur

	CO_2	Acetat	Algen	Bakterien	DOC	output	Summe e_i
CO_2	-	-	213	-	-	259	472
Acetat	-	-	-	691	-	-	691
Algen	-	-	-	-	40	173	213
Bakterien	471	-	-	-	37	176	684
DOC	-	-	-	37	-	40	77
Input	-	691	-	-	-		
e_j	471	691	213	728	77		

Die Rohmatrix wird normalisiert, indem jedes Element einer Spalte durch die Summe aller Elemente einer Spalte (ej) dividiert wird. Diese normalisierte Matrix wird dann von der Einheitsmatrix substrahiert. Durch Inversion erhält man letztlich die Strukturmatrix. Die Summe der Elemente einer jeden Reihe der Strukturmatrix gibt den Anteil dieser Komponente am Kohlenstoffmfluß im System an. Die Menge des rezyklierten Kohlenstoffs (E_c) wird berechnet nach:

$$E_c = \sum_i e_i \, (S_{ij}-1)/S_{ij} \qquad (7)$$

S_{ij} = Einzelelemente einer Strukturmatrix
e_i = Summe der Einzelelemente einer Reihe der Rohmatrix

Der "Cycling Index" (CI) errechnet sich aus:

$$CI = E_c / \sum e_i \qquad (8)$$

2.14.2 Statistische Auswertung und Modellierung von Meßdaten

Die statistische Auswertung der Meßdaten wurde mit Hilfe des Stat Pak-Programms (Fa. North West Analytical, Portland) und einigen kleinen selbstgeschriebenen Basic-Programmen auf einem Kleinrechner (Fa. Triumph-Adler, Alphatronic P3) durchgeführt. Das Programm zur Matrixrechnung wurde von Prof. Dr. J. U. Grobbelaar erstellt. Die nicht lineare Korrelationsanalyse (Berechnung der Algenbiomasse) wurde von Dr. Fiolitakis durchgeführt.

2.15. Theoretische Grundlagen mikrobiellen Wachstums im Chemostaten

Die theoretischen Arbeiten von Monod (1950) sowie Novick und Szilard (1950) bilden die Basis, auf der alle späteren Arbeiten über kontinuierliche Kulturen aufbauen. Mittlerweile gibt es über dieses Gebiet eine Fülle von theoretischen Abhandlungen, von denen sich einige gut als Übersichtsartikel eignen (Pfennig & Jannasch 1962, Herbert et al. 1956, Tempest 1970, Pirt 1975). In dieser Arbeit wird deshalb auf eine Darstellung der fundamentalen Zusammenhänge verzichtet.

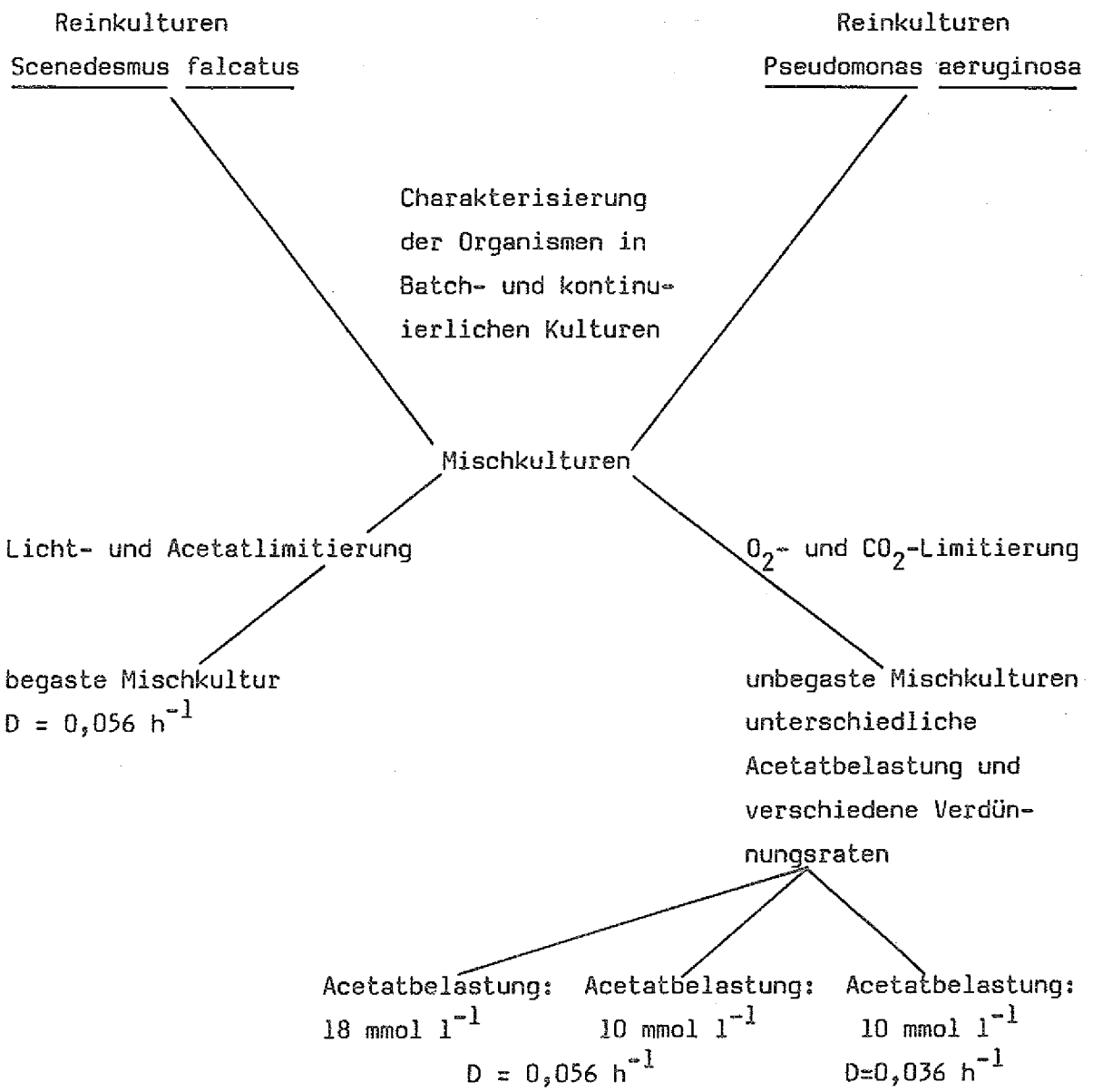
3. Konzept zur Versuchsdurchführung

Im folgenden soll kurz das Konzept der Versuchsdurchführung anhand Abb. 8 erläutert werden. Die im Institut isolierten Stämme von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa wurden zunächst bezüglich ihrer physiologischen Leistung und ihrer Wachstumsparameter in Reinkulturen charakterisiert. Dies geschah sowohl in Batchkulturen als auch in kontinuierlichen Kulturen im Chemostat.

Die genaue Kenntnis der für die beiden Organismen wachstumsrelevanten Parameter war die Voraussetzung, um das Verhalten beider Stämme in Mischkultur beurteilen zu können. Da Interaktionen in einer Mischkultur nur bei weitgehender Konstanz aller das Wachstum beeinflussenden Parameter klar definiert werden können, wurden diese Mischpopulationen ausschließlich im Chemostaten untersucht.

Die Überprüfung auf mögliche Interaktionen zwischen Pseudomonas aeruginosa und Scenedesmus falcatus im hier gewählten Medium erfolgte in einer mit O_2 und CO_2 ausreichend versorgten Mischkultur.
Mit Hilfe von unbegasten Mischkulturen wurde unter verschiedenen Acetatbelastungen und bei verschiedenen Verdünnungsraten untersucht, ob die O_2- und CO_2-Produktion der Organismen zum vollständigen Abbau der angebotenen Laststoffe ausreicht.

Abb. 8: Konzept zur Versuchsdurchführung



4. Ergebnisse

4.1. Wachstum in Batchkulturen

4.1.1. Ernährungsweise von Scenedesmus falcatus

Acetat kann von vielen Mikroalgen assimiliert werden (Droop 1974, Wiessner 1979). Einige wachsen strikt phototroph, während andere auch im Dunkeln Acetat assimilieren. Verbreitet ist photomixotrophes Wachstum im Sinne einer nicht obligaten Acetatverwertung im Licht (Wiessner 1979). Literatur über Scenedesmus falcatus gibt es praktisch nicht. Kessler (1982) stellte allerdings fest, daß allgemein die physiologischen Unterschiede zwischen Scenedesmus-Arten gering sind.

Wachstum und Acetatverbrauch von Scenedesmus falcatus wurde von mir in acetathaltigem Grundmedium, bei Begasung mit CO_2-haltiger und CO_2-freier Luft, im Dunkeln und im Licht untersucht. Die Wachstumsleistung wurde anschließend mit derjenigen von photoautotroph gewachsenen Kulturen verglichen.

4.1.1.1. Photoassimilation von Acetat

Als Inokulum dienten Algen einer sich in der log-Wachstumsphase befindlichen Vorkultur (in acetathaltigem Grundmedium, siehe Abschnitt 2.2.3.). Die Inokulumsgröße wurde so gewählt, daß zum Zeitpunkt t_0 die optische Dichte im Versuchsgefäß E_{570} ca. 0,18 betrug.

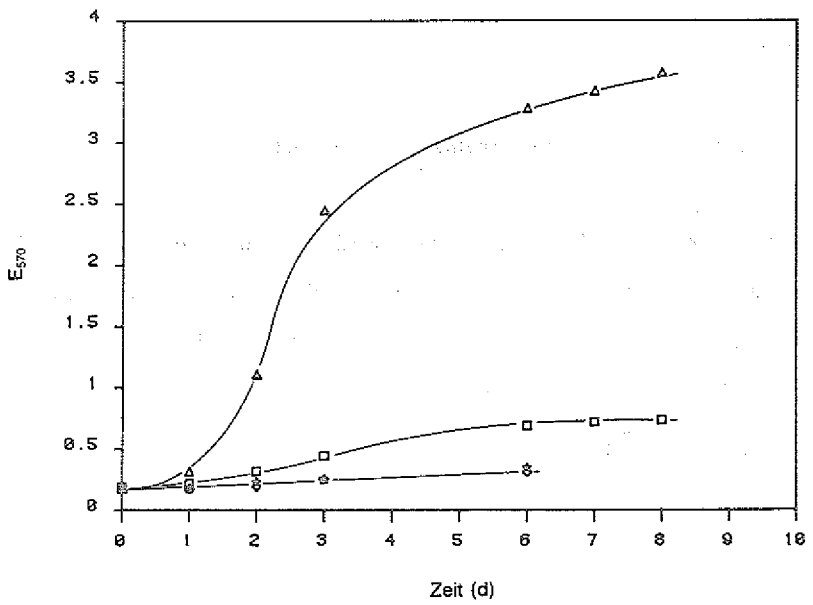


Abb. 9: Wachstum von Scenedesmus falcatus in Batchkulturen

△—△ mit CO_2 (1 % (v/v) CO_2 in Luft) im Licht (Quantenflußdichte: 157 µE m^{-2} s^{-1})

□—□ ohne CO_2 (CO_2-freie Luft) im Licht (Quantenflußdichte: 157 µE m^{-2} s^{-1})

◇—◇ mit CO_2 (1 % (v/v) CO_2 in Luft) im Dunkeln

✻—✻ ohne CO_2 (CO_2-freie Luft) im Dunkeln

Alle Werte sind Mittelwerte aus 3 parallel angesetzten Kulturen.

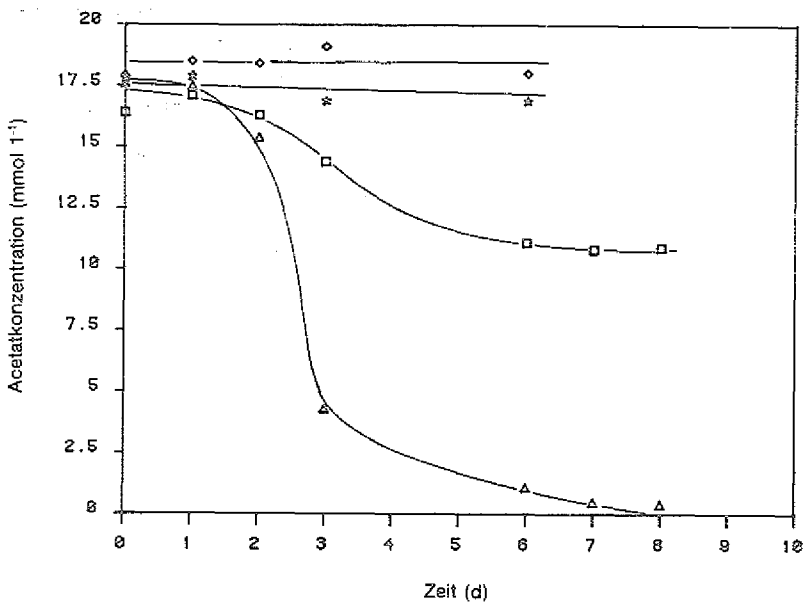


Abb. 10: Abnahme der Acetatkonzentration in Batchkulturen von Scenedesmus falcatus

△—△ mit CO_2 (1 % (v/v) CO_2 in Luft) im Licht (Quantenflußdichte: 157 µE m^{-2} s^{-1})

□—□ ohne CO_2 (CO_2-freie Luft) im Licht (Quantenflußdichte: 157 µE m^{-2} s^{-1})

◇—◇ mit CO_2 (1 % (v/v) CO_2 in Luft) im Dunkeln

✻—✻ ohne CO_2 (CO_2-freie Luft) im Dunkeln

Alle Werte sind Mittelwerte aus 3 parallel angesetzten Kulturen.

Aus Abb. 9, 10 wird deutlich, daß Scenedesmus falcatus phototroph wuchs. Acetat wurde nur im Licht aufgenommen.

Die Biomasse der mit CO_2-freier Luft begasten Kulturen vervierfachte sich nach acht Tagen. Im Vergleich zu den mit CO_2-haltiger Luft begasten Kulturen betrug jedoch der Zuwachs an Biomasse lediglich 19 %. Die Wachstumskurve erreichte schon nach 6 Tagen die stationäre Phase, obwohl die Acetatkonzentration im Medium noch 11 mmol l^{-1} betrug. Das zur Verfügung stehende Acetat konnte ohne CO_2 offensichtlich nicht genügend verwertet werden (vergl. Abschnitt 4.2.1.1.5.).

In belichteten, mit CO_2-haltiger Luft begasten Kulturen nutzten die Algen neben dem Acetat CO_2 als zusätzliche C-Quelle. Die aufgenommene Menge an Acetat reichte nicht aus, um die gesamte Biomasse aufzubauen. Der in 8 Tagen in der Biomasse festgelegte Kohlenstoff entstammte zu ca. 50 % dem Acetat, der Rest aus dem zugegebenen CO_2. Die Algen ernährten sich somit unter diesen Kulturbedingungen photomixotroph.

4.1.1.2. Wachstum bei unterschiedlichen Quantenflußdichten

Da Scenedesmus falcatus sowohl das Vermögen zur photomixotrophen als auch zur photoautotrophen Ernährungsweise besaß, sollten die Wachstumsraten in organischem und anorganischem Medium in Abhängigkeit von der auf die Kulturgefäße auftreffende Quantenflußdichte bestimmt und miteinander verglichen werden.

Während Endo et al. (1977) von einer deutlichen Erhöhung der maximalen Wachstumsrate photomixotroph wachsender Chlorellen (Substrat: Acetat) im Vergleich zu der von photoautotroph wachsenden berichtet, konnte Follmann et al. (1978) für Chlorella (Substrat: Glucose) keinen Unterschied in der maximalen Wachstumsrate feststellen. Es sollte daher vor allem untersucht werden, welchem Typus Scenedesmus falcatus zugeordnet werden kann.

Bei beiden Versuchsreihen wurde die Ausgangsextinktion der Kultursuspension zum Zeitpunkt t_o auf $E_{570} \sim 0{,}06$ eingestellt. Die photoautotrophen Kulturen wuchsen pH-statisiert bei pH 7,5 (s. Abschnitt 2.2.8.). Dieser pH-Wert stellte sich ebenfalls in den photomixotroph wachsenden Kulturen rasch ein. Die optische Dichte diente als Maß für die Biomassekonzentration. Über sie wurde die Wachstumsrate in der log-Phase bestimmt. Abb. 11 zeigt, daß die Kurven einer Sättigungsfunktion folgen.

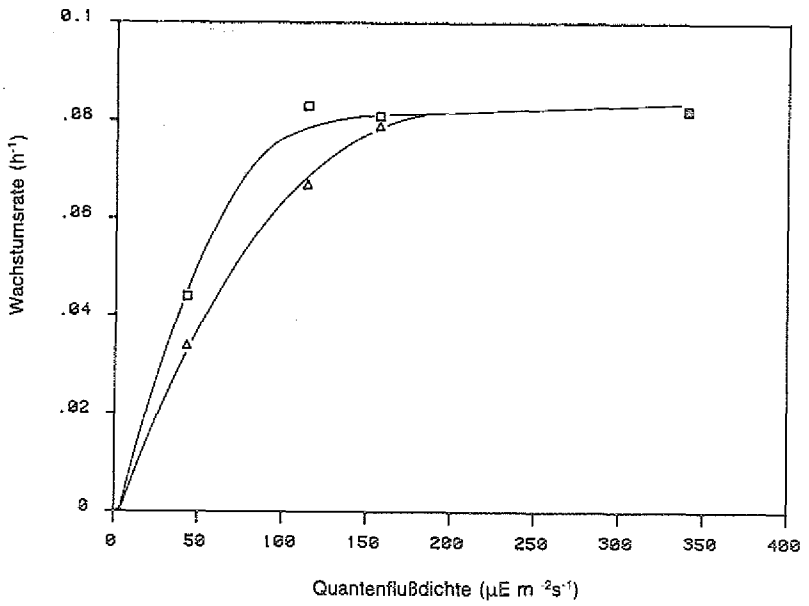


Abb. 11: Einfluß unterschiedlicher C-Quellen auf die Wachstumsrate von Scenedesmus falcatus bei verschiedenen Quantenflußdichten in Batchkulturen.

□—□ C-Quellen: Acetat (18 mmol l^{-1}) und CO_2

△—△ C-Quelle: CO_2

Begasung: 1 % (v/v) CO_2 in Luft (7,8 l h^{-1})

Die Quantenflußdichte wurde jeweils an der Oberfläche der lichtzugewandten Seite eines 300 ml Fermenters gemessen. Die Werte für die mit Acetat und CO_2 wachsenden Algen sind Mittelwerte aus 3 Versuchsansätzen, die für die nur mit CO_2 wachsenden sind Mittelwerte aus 2 Versuchsansätzen.

Unter beiden Anzuchtbedingungen erreichte die Alge eine maximale Wachstumsrate von ~ 0,082 h^{-1}. Mit abnehmender Quantenflußdichte sank die Wachstumsrate der photoautotrophen Kulturen früher ab (< 150 µE m^{-2} s^{-1}) als die der photomixotrophen (< 110 µE m^{-2} s^{-1}).

Da die Algen mit Acetat nicht heterotroph wachsen konnten und sie zum Wachstum ein Mindestlichtangebot benötigten, müssen beide Kurven die X-Achse schneiden. Unterhalb dieses Mindestangebotes (Kompensationspunkt) müssen die Algen von ihren Reservestoffen zehren, um ihren Erhaltungsstoffwechsel aufrecht zu erhalten. Dieses Mindestlichtangebot konnte nicht experimentell bestimmt werden. (Die Beleuchtungseinrichtung ließ eine weitere Verminderung der Quantenflußdichten nicht zu.) Die eingezeichneten Schnittpunkte ergaben sich aus der Extrapolierung des Kurvenverlaufs.

In der Literatur werden für diesen Kompensationspunkt je nach der untersuchten Algenspezies (chlorokokkale Grünalgen) Werte zwischen 3,9 und 7,8 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ angegeben (Azad & Borchardt 1969).

Das Licht ist also auch für die photomixotroph wachsenden Algen der entscheidende Parameter, der die Wachstumsleistung der Algen unter diesen Bedingungen bestimmt.

4.1.2. Ernährungsweise von Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa ist bekannt als ein bezüglich seines Nährstoffbedarfs anspruchsloses Bakterium. Es benötigt keinerlei Vitamine und wächst in einem anorganischen Medium mit Acetat als einziger C-Quelle (Bergey 1974). In dem in dieser Arbeit verwendeten Grundmedium wuchs der eingesetzte Pseudomonas-Stamm in belichteten wie unbelichteten, mit 1 % (v/v) CO_2 belüfteten oder auch mit CO_2-freier Luft begasten Kulturen mit übereinstimmender Rate.

4.2. Wachstum im Chemostaten

Das Prinzip der kontinuierlichen Kultur wird bei der Abwasserbehandlung in Algengräben angewandt (Shelef et al. 1972, Soeder 1982, Groeneweg et al. 1980). Da im Rahmen dieser Arbeit die Funktionsweise eines Algengrabens modellhaft mit ausgesuchten Organismen und synthetischem Abwasser untersucht werden sollte, wurden das Wachstumsverhalten der Organismen in Reinkulturen und die Interaktionen beider Testorganismen in Mischkulturen im Chemostat charakterisiert.

Wenn nicht anders angegeben, sind die dargestellten Werte einer Abbildung immer Mittelwerte von zwei Probenentnahmen der gleichen Kultur zum praktisch gleichen Zeitpunkt, da durch die relativ große Volumenentnahme für eine Probe (20 - 40 % des Fermenternutzvolumens) das Fließgleichgewicht im Chemostaten zerstört wurde.

4.2.1. Wachstum von Scenedesmus falcatus bei verschiedenen Verdünnungsraten

In diesem Abschnitt sollten die wachstumsrelevanten Parameter der Algen gekennzeichnet und mit denen aus Batchkulturen, soweit möglich, verglichen werden. Die Versuche sollten außerdem zeigen, wie das photomixotrophe Wachstum von der Verdünnungsrate und der Quantenflußdichte abhängt. Im Hinblick auf die Abwasserreinigung im Algengraben sollte die Eliminationsleistung der Algen betrachtet werden.

In diesem Abschnitt werden zwei Versuchsreihen mit unterschiedlichen Reaktionsgefäßen (Abschnitt 2.2.5.) beschrieben. Die 300 ml-Gefäße wurden mit 157 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ (Versuchsreihe A), die 1600 ml-Fermenter mit 99 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ (Versuchsreihe B) bestrahlt (Messung der Quantenflußdichte an der Oberfläche der Reaktionsgefäße, somit nicht identisch mit dem äquivalenten Lichtangebot (Follmann et al. 1978)). Alle Kulturen wurden mit 1 % (v/v) CO_2 in Luft begast, die der Versuchsreihe A mit einer Rate von 7,8 l h^{-1}, die der Versuchsreihe B mit einer Rate von 12,5 l h^{-1}. Die Konzentrationen der mit der Nährlösung (Grundmedium) zugeführten Substrate blieben konstant.

Bei den voneinander unabhängigen Versuchsreihen wurde die Verdünnungsrate und damit die Wachstumsrate der Algen von niedrigen zu höheren Werten bis zum Auswaschpunkt systematisch geändert.

4.2.1.1. Biomassekonzentration

Die Biomassekonzentration der Kulturen (mg C l^{-1}) nahm in beiden Versuchsreihen zunächst mit abnehmender Verdünnungsrate logarithmisch zu (Abb. 12). Bei Verdünnungsraten $D < 0{,}045\ h^{-1}$ flachte die Kurve für die Versuchsserie B deutlich ab. Die Biomassekonzentration der Kulturen aus der Versuchsreihe A war bei allen eingestellten Verdünnungsraten deutlich höher. Da die Kulturbedingungen mit Ausnahme des Lichtangebots (unterschiedliche Quantenflußdichten an der Oberfläche der Fermenter und unterschiedliche Turbulenz bedingten bei jeder Verdünnungsrate für die Kulturen aus Versuchsreihe A ein höheres Lichtangebot pro g Biomasse (Berechnung s. Abschnitt 4.2.1.4.6)) in beiden Versuchsserien gleich waren, ist dieser Zuwachs durch das erhöhte Lichtangebot bedingt. Die höchste Verdünnungsrate und damit die höchste Wachstumsrate, bei der sich Steady States einstellten, betrug $0{,}078\ h^{-1}$ (Versuchsreihe A) bzw. $0{,}079\ h^{-1}$ (Versuchsreihe B). Bei einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}085\ h^{-1}$ wurden die Kulturen ausgespült.

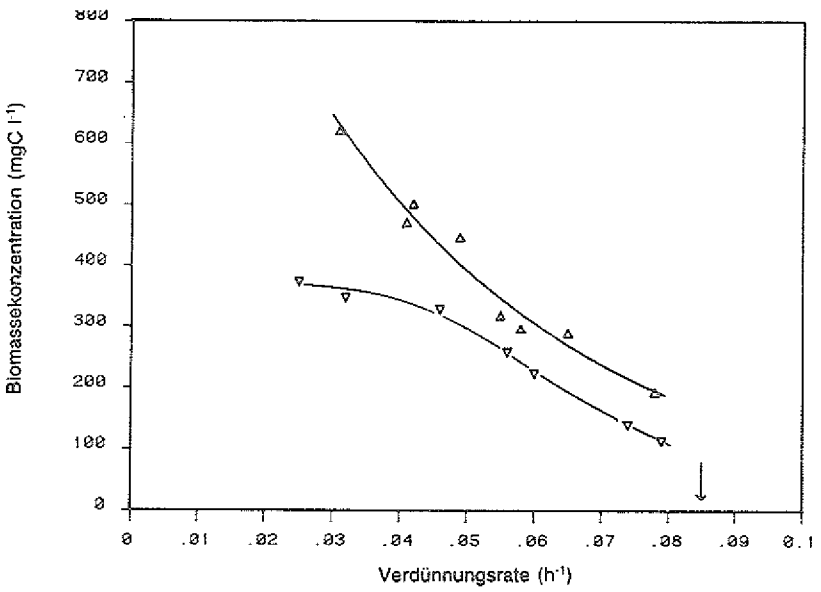


Abb. 12: Abhängigkeit der Biomassekonzentration von Scenedesmus falcatus im Steady State von der Verdünnungsrate im Chemostaten.

△—△ Versuchsreihe A

▽—▽ Versuchsreihe B

Der Pfeil kennzeichnet den Auswaschpunkt.

Die Biomassekonzentration nahm also im Gegensatz zu Kulturen, die durch ein mit der Nährlösung zugeführtes Substrat limitiert werden, ab. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren, die mit licht-limitierten photoautotrophen Kulturen gearbeitet haben (Eppley & Dyer 1965, Gons 1977, Goldmann 1979a, Iehana 1983).

4.2.1.1.1. Ausspüleffekt

Da durch ein schrittweises Verändern der Verdünnungsrate (Abschnitt 4.2.1.1) die maximale Wachstumsrate der Algen nur annähernd ermittelt werden konnte (sie sollte zwischen $\mu = 0.079\ h^{-1}$ und $\mu = 0.085\ h^{-1}$ betragen), sollte sie exakter mit Hilfe der Auswaschmethode (Jannasch 1969) bestimmt werden. Nach dieser Methode wird die Wachstumsrate bei einer Verdünnungsrate, die die maximale Wachstumsrate des betreffenden Organismus etwas übertrifft, gemessen. Bei einer solchen Verdünnungsrate müßte die gemessene Wachstumsrate der maximalen entsprechen, da die Organismen alle Nähr-

stoffe in ausreichender Menge zur Verfügung haben. Die Biomasse in Chemostaten sollte also langsamer abnehmen, als es der Auswaschrate nicht wachsender Organismen entsprechen würde. Die Wachstumsrate der Organismen läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\mu = D + \frac{1}{t} \ln (X/X_o) \qquad (9)$$

X_o = Populationsdichte zum Zeitpunkt t_o.

Dies wurde am Beispiel einer Algenkultur aus der Versuchsreihe A untersucht (Abb. 13). Die Verdünnungsrate einer Algenkultur, die sich bei $D = 0{,}055\ h^{-1}$ im Steady State befand, wurde auf $D = 0{,}085\ h^{-1}$ erhöht. Die gemessene Wachstumsrate betrug erstaunlicherweise nur $\mu = 0{,}049\ h^{-1}$ und war damit erheblich niedriger als die erwartete von $\mu \sim 0{,}080\ h^{-1}$. Dies ließ vermuten, daß die im Fermenter verbleibende höhere Acetatkonzentration unter den hier gewählten Bedingungen (die im Fermenter verbleibende Acetatkonzentration wird mit zunehmenden Verdünnungsraten größer, siehe Abbildung 15) einen negativen Effekt auf die Wachstumsrate ausübte.

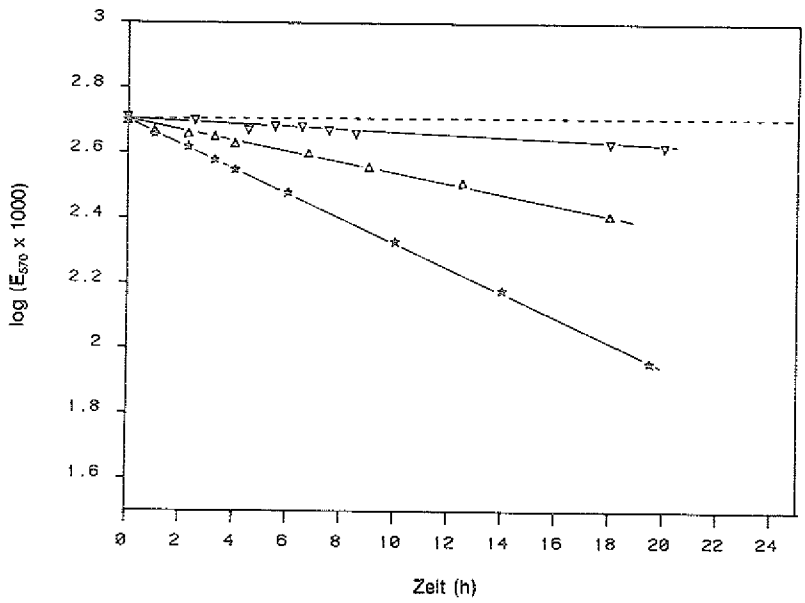


Abb. 13: Einfluß der Acetatkonzentration auf die Auswaschgeschwindigkeit von Kulturen von Scenedesmus falcatus im Chemostaten bei einer Verdünnungsrate von D = 0,085 h^{-1}.

▽—▽ Acetatkonzentration der zufließenden Nährlösung: 5 mmol l^{-1} ($\mu > 0$)

△—△ Acetatkonzentration der zufließenden Nährlösung: 18 mmol l^{-1} ($\mu > 0$)

✱—✱ Auswaschrate ($\mu = 0$)

--- $\mu = D$

Es wurde deshalb in Batchversuchen überprüft, welche Abhängigkeit zwischen dem Wachstumsverhalten der Algen und der Acetatkonzentration bei Lichtsättigung (157 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$) bestand.

Nach photomixotropher Anzucht unter Standardbedingungen bei D = 0.055 h^{-1} wurden die Algen der Vorkultur abzentrifugiert.Die Inokulumsgröße für die Batch-Versuche wurde so gewählt, daß sich im Versuchsgefäß eine optische Dichte von E_{570} = 0,14 einstellte.

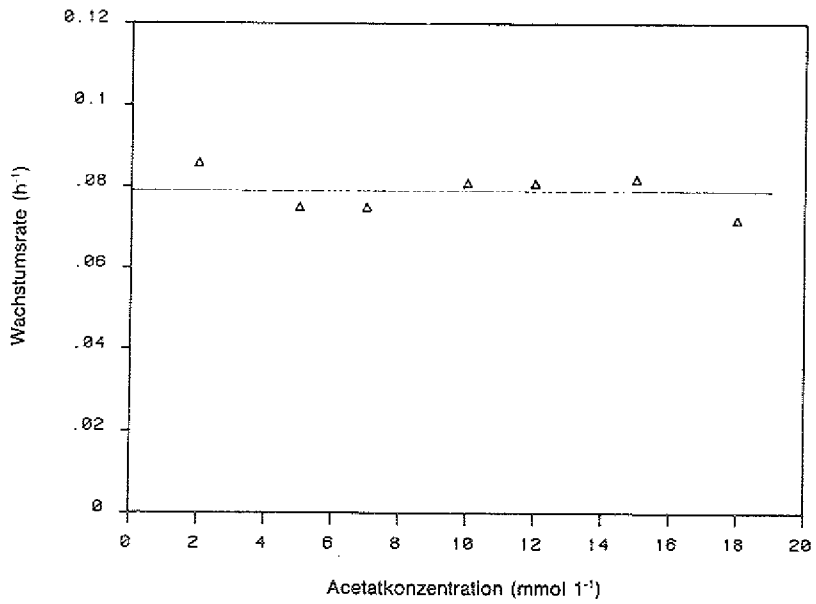


Abb. 14: Beziehung zwischen der Wachstumsrate von Scenedesmus falcatus und der Acetatkonzentration in Batchkulturen.
Begasung: 1 % (v/v) CO_2 in Luft (7,8 l h^{-1})
Quantenflußdichte: 157 μE m^{-2} s^{-1}
Die Werte sind Mittelwerte aus 2 Versuchsansätzen.

Aus Abb. 14 wird deutlich, daß die exponentielle Wachstumsrate bei Lichtsättigung in dem hier gewählten Konzentrationsbereich (2 - 18 mmol l^{-1}) unabhängig von der Acetatkonzentration war. Sie betrug 0,079 h^{-1} $\pm$ 6 % (n = 7). Eine hohe Acetatkonzentration erniedrigte also nicht die Wachstumsrate. Es fiel allerdings auf, daß die lag-Phase des Algenwachstums mit zunehmender Acetatkonzentration stark zunahm. Sie betrug bei einer Konzentration von 18 mmol l^{-1} schon 23 Stunden, bei 2 mmol l^{-1} dagegen nur 10 Stunden.

Dieser Versuch deutete an, daß die Algen bei einer plötzlichen Erhöhung der Verdünnungsrate, in diesem Fall von D = 0,055 h^{-1} auf D = 0,085 h^{-1}, und der damit verbundenen Erhöhung der Acetatkonzentration im Reaktionsgefäß, nicht in der Lage waren, sich schnell genug auf die neue Konzentration einzustellen und mit μ_{max} zu wachsen.

In einem zweiten Versuch zur Auswaschkinetik wurde deshalb nach Umstellung der Verdünnungsrate von D = 0,055 h^{-1} auf D = 0,085 h^{-1} die Acetatkonzentration der zufließenden Nährlösung von 18 mmol l^{-1} auf 5 mmol l^{-1} erniedrigt. Unter diesen Bedingungen konnte ein lag-Phasen-Effekt, wie bei den Batch-Versuchen festgestellt, ausgeschlossen werden, zumal die Acetatkonzentration unter Steady-State-Bedingungen bei einer Verdünnungsrate von D = 0,055 h^{-1} 10,8 mmol l^{-1} betrug.

Die aus den Werten in Abb. 13 ermittelte Wachstumsrate betrug 0,075 h^{-1}. Sie lag somit in der Nähe der erwarteten maximalen Wachstumsrate von $\mu \sim 0{,}080\ h^{-1}$. Diese Methode ermöglichte aber in diesem Fall keine genauere Feststellung der maximalen Wachstumsrate.

Vergleich mit Daten aus Batchkulturen:
Die maximalen Verdünnungsraten, bei denen Steady States erreicht wurden, stimmen mit den μ_{max}-Werten der Algen in Batchkulturen gut überein. Die maximale Wachstumsrate für Scenedesmus falcatus betrug unter den hier gewählten Bedingungen $\mu = 0{,}079\ h^{-1}$.

4.2.1.1.2. Limitierung

Der Chemostat ist ein System, in dem die Wachstumsrate der Organismen durch ein Substrat begrenzt wird, was die Stabilität des Fließgleichgewichts bewirkt. Bei phototrophen Algenkulturen kann auch die Quantenflußdichte der photosynthetisch aktiven Strahlung die Rolle des limitierenden Substrats spielen.

Die Kurven in Abb. 12 legten nahe, daß zumindest die Kulturen der Versuchsreihe B lichtlimitiert sein könnten, da bei gleichen Verdünnungsraten die Biomassekonzentrationen der Kulturen dieser Versuchsreihe deutlich niedriger waren als die der Kulturen der Versuchsreihe A.

Andererseits verbrauchten die Kulturen (Versuchsreihe B) bei Verdünnungsraten $D < 0.035\ h^{-1}$ alles ihnen angebotene Acetat (Abb. 15).

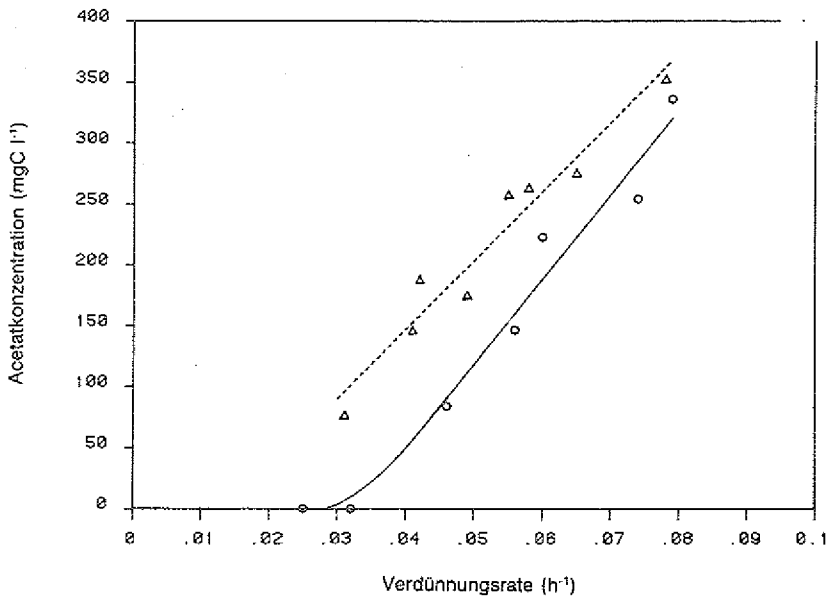


Abb. 15: Beziehung zwischen der Acetatkonzentration in Kulturen von Scenedesmus falcatus im Steady State und der Verdünnungsrate im Chemostaten.

△— △ Versuchsreihe A

○— ○ Versuchsreihe B

Die Algen könnten also bei diesen Verdünnungsraten mangels eines organischen Substrats gezwungen sein, ihren Stoffwechsel mehr auf eine photoautotrophe Ernährungsweise auszurichten. Dies könnte auch das Abknicken der Biomassekurve (Abb. 12) erklären, da die Biomasseerträge photoautotroph wachsender Algen in der Regel niedriger sind, als die photomixotroph wachsender Algen (Shamala et al, 1982).

Klarheit über das in diesem Fall limitierende Substrat sollte der folgende Versuch verschaffen.

Bei den Kulturen aus Versuchsreihe B wurde bei der Verdünnungsrate von $D = 0{,}025\ h^{-1}$ erstens die Acetatkonzentration und zweitens die Quantenflußdichte erhöht. Demgegenüber wurde bei den Kulturen aus Versuchsserie A nur die Qantenflußdichte bei einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}032\ h^{-1}$ erhöht, weil sich zu jedem Meßpunkt noch Acetat im Reaktor nachweisen ließ (> 75 mg C l^{-1}).

Aus Tab. 1 wird deutlich, daß die Biomassekonzentration bei einer Erhöhung des Acetatgehalts der Nährlösung nur geringfügig anstieg, wohl aber deutlich bei einem erhöhten Lichtangebot erhöht war. Bei den Kulturen der zweiten Versuchsreihe bewirkt eine Erhöhung der Quantenflußdichte bei der Verdünnungsrate von D = 0,032 h^{-1} ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Biomassekonzentration.

Tab. 1: Limitierung von Scenedesmus falcatus

	Quantenfluß-dichte $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$	Acetatkonzen-tration $mmol\ l^{-1}$	Biomassekonzen-tration %
Versuchsreihe B			
Kontrolle (D = 0,025 h^{-1})	99	18	100
Erhöhung des Acetatgehaltes	99	25	106
Erhöhung de Quantenflußdichte	231	18	145
Versuchsreihe A			
Kontrolle (D = 0,032 h^{-1})	157	18	100
Erhöhung der Quantenflußdichte	378	18	123

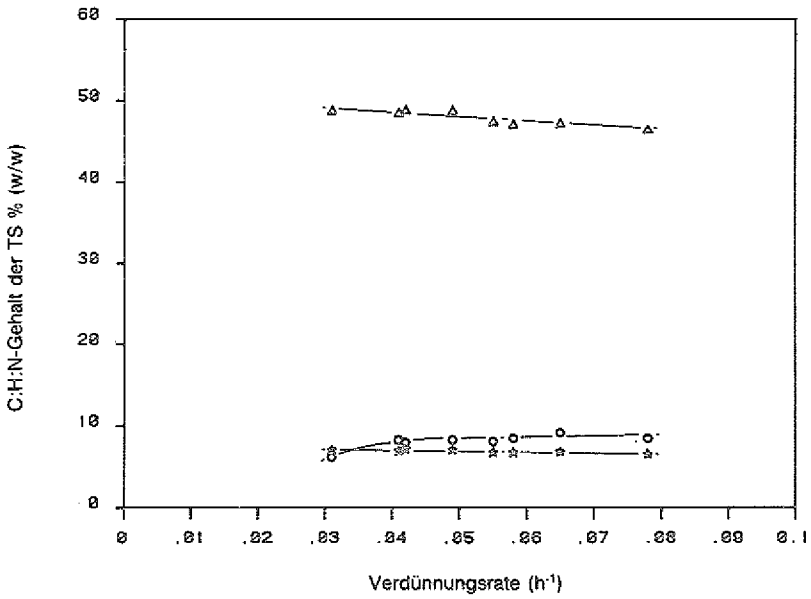
Die Kulturen beider Versuchsreihen waren damit deutlich lichtlimitiert (s. Diskussion). Das Abknicken der Kurve B (Abb. 12) ist somit darauf zurückzuführen, daß das Lichtangebot, trotz der längeren Bestrahlungszeit, nicht ausreicht, um die Biomassekonzentration weiter logarithmisch ansteigen zu lassen.

4.2.1.1.3. C-H-N-Gehalt der Trockenmasse in Prozent (w/w)

Die chemische Zusammensetzung der Trockenmasse von Mikroorganismen kann in beträchtlichem Maße von der Verdünnungsrate und dem limitierenden Substrat abhängen (Herbert 1976). Die Änderung der chemischen Zusammensetzung mit der Verdünnungsrate gibt demnach einen Hinweis auf die Art des limitierenden Substrats. Nach Herbert (1976) nimmt der C-Gehalt der aschefreien Trokkenmasse sowohl in C- als auch N-limitierten Organismen (Klebsiella, Candida) mit steigender Verdünnungsrate leicht ab. Der N-Gehalt von N-limitierten Kulturen fällt dagegen mit abnehmenden Verdünnungsraten erheblich stärker ab als bei C-limitierten Kulturen. In diesem Abschnitt wird die Abhängigkeit des C:H:N-Gehalts der Trockenmasse lichtlimitierter Algenkulturen von der Verdünnungsrate beschrieben.

Abb. 16, 17 stellen die Ergebnisse von Elementanalysen der Trockenmasse von Algenkulturen aus Steady States bei verschiedenen Verdünnungsraten aus beiden Versuchsreihen A und B dar.
Der C-Gehalt nahm mit wachsenden Verdünnungsraten leicht von 50,5 % auf 46,5 % ab. Dies kann bedeuten, daß die Algen bei niedrigen Verdünnungsraten trotz der Limitierung mehr Kohlenstoff speichern können. Da sich aber das Zellvolumen und die Zellmasse mit steigenden Verdünnungsraten erhöht (s. Abschnitt 4.2.1.2.1) und damit auch das Verhältnis Oberfläche (Zellwand): Volumen sich verkleinerte, kann die Verringerung des prozentualen C-Gehaltes auch darin begründet sein.
Die Kulturen aus beiden Versuchsreihen verhielten sich völlig gleich; somit war der C-Gehalt in dem untersuchten Bereich von der Quantenflußdichte unabhängig.
Der N-Gehalt stieg mit zunehmenden Verdünnungsraten leicht an, bei den Kulturen aus der Versuchsreihe A von 7,5 auf 9 %, bei den Kulturen aus Versuchsreihe B von 9 % auf 9,5 %.
Der H-Gehalt blieb in beiden Versuchsreihen über den gesamten Bereich der eingestellten Verdünnungsraten konstant bei 7 %.

Die lichtlimitierten Algenkulturen verhielten sich somit wie die bei Herbert (1976) beschriebenen C-limitierten Mikroorganismenkulturen, da die C-Verwertung der photomixotroph wachsenden Algen mit der lichtabhängigen Funktion des Photosyntheseapparates gekoppelt ist.



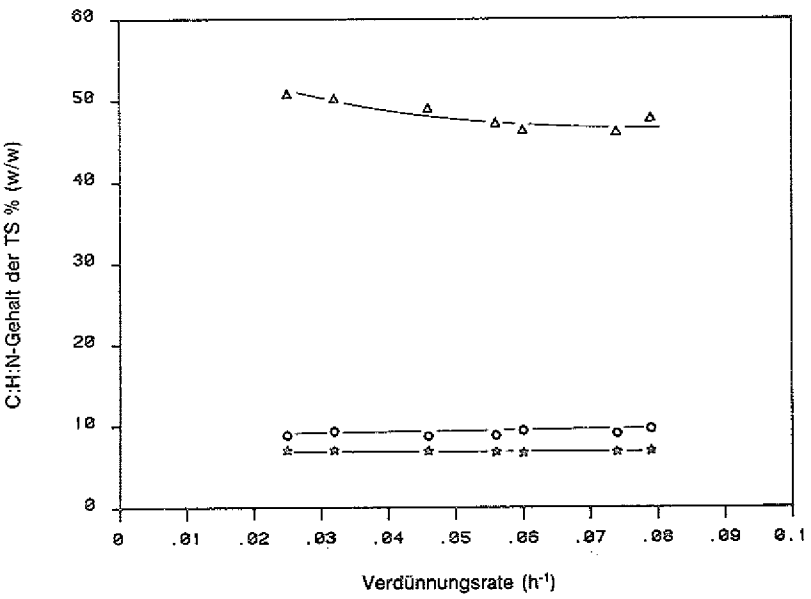


Abb. 16, 17: C : H : N-Gehalt der Trockenmasse von Scenedesmus falcatus in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate im Chemostaten (Messungen im Steady State).

△—△ C-Gehalt der Trockenmasse
○—○ N-Gehalt der Trockenmasse
✻—✻ H-Gehalt der Trockenmasse

Abb. 16: Versuchsreihe A
Abb. 17: Versuchsreihe B

Vergleich mit Batchkulturen

In Batchkulturen (Abb. 18) lag der C-Gehalt der Algenbiomasse in der lag-Phase bei ca. 39 %. Er stieg während der log-Phase auf bis zu 51 % an und fiel in der stationären Phase wieder ab. Der N-Gehalt der Algenbiomasse war in der log-Phase mit 9 % am höchsten. Der H-Gehalt betrug in der log-Phase 7 %.

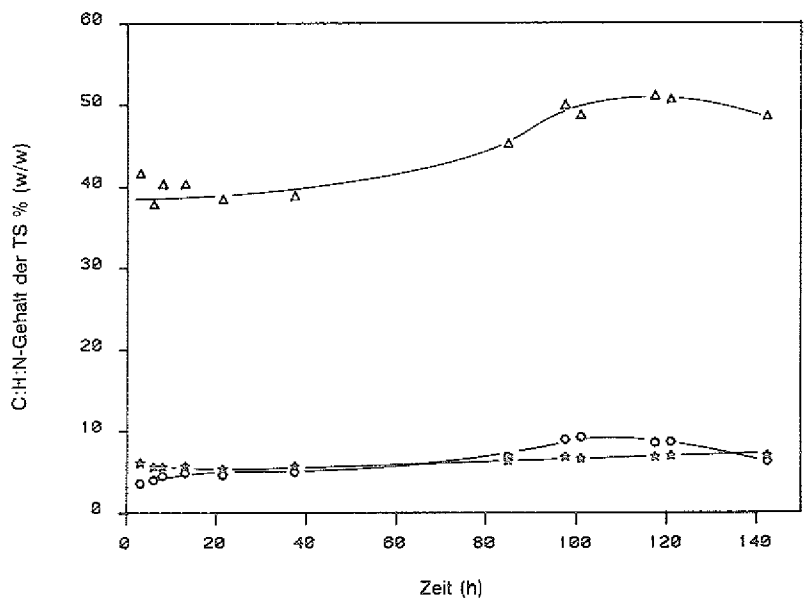


Abb. 18: C : H : N-Gehalt der Trockenmasse von Scenedesmus falcatus in Batchkulturen.

△—△ C-Gehalt der Trockenmasse

○—○ N-Gehalt der Trockenmasse

✱—✱ H-Gehalt der Trockenmasse

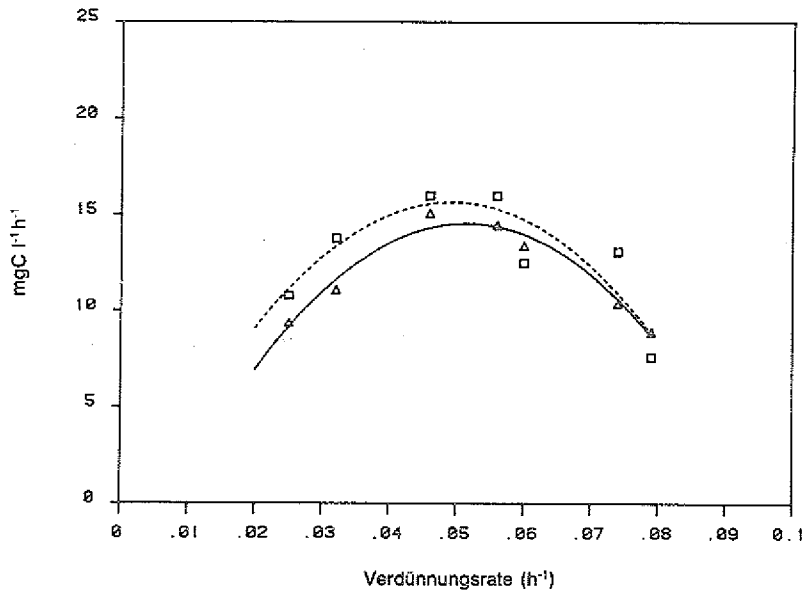
Alle Werte sind Mittelwerte aus 2 Versuchsansätzen.

Die in der log-Phase der Batchkulturen ermittelten Werte der Elementanalyse stimmten mit denen der kontinuierlichen Kulturen, die definitionsgemäß exponentiell wachsen, gut überein.

4.2.1.1.4. Biomasseproduktion und Acetataufnahme

Wiessner (1969) stellte fest, daß sich bei den von ihm untersuchten Algen der Anteil des fixierten Kohlenstoffs aus dem CO_2 bzw. aus dem Acetat mit den Bedingungen der Vorkultivierung (anorganisches bzw. organisches Medium) änderte.
Da sich in meinen Versuchen die Bedingungen für Scenedesmus mit der Verdünnungsrate änderten, sollte untersucht werden, ob sich hier ebenso das Verhältnis Biomasseproduktion/Acetataufnahmerate verändert. Die beiden Systeme wurden in diesem Sinne miteinander verglichen.

Bei einer Verdünnungsrate von $D \sim 0{,}05\ h^{-1}$ erreichte sowohl die Biomasseproduktion (14,6 mg C $l^{-1}\ h^{-1}$) als auch die Acetataufnahmerate (15,6 mg C $l^{-1}\ h^{-1}$) der Kulturen aus Versuchsreihe B ein Maximum (Abb. 19). Bei den eingestellten Verdünnungsraten nahmen die Algen geringfügig mehr Kohlenstoff in Form des Acetats auf, als sich in der Biomasse wiederfand. Erst bei $D > 0.075\ h^{-1}$ waren beide Funktionen annähernd deckungsgleich.



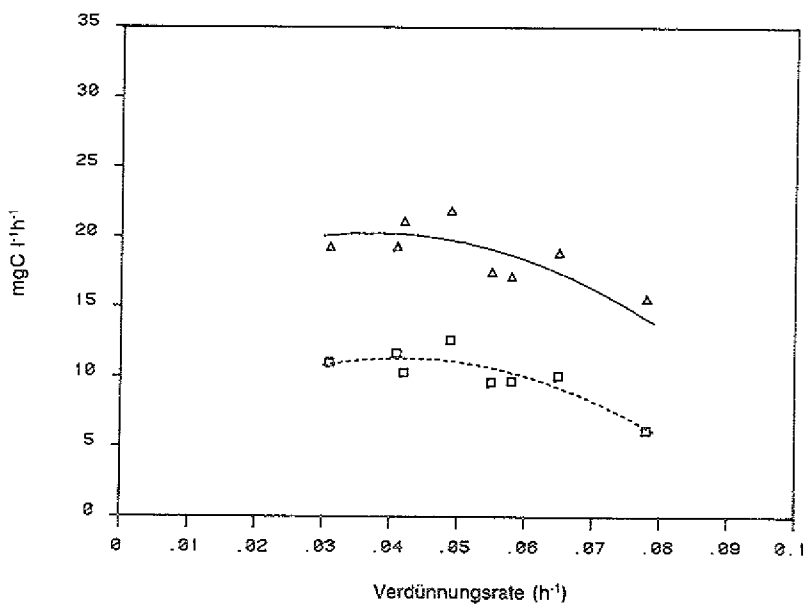


Abb. 19, 20: Biomasseproduktion und Acetataufnahmerate von Scenedemus falcatus als Funktion der Verdünnungsrate im Chemostaten (Berechnungen aus Steady State-Werten).

△—△ Biomasseproduktion
□—□ Acetataufnahmerate

Abb. 19: Versuchsreihe B
Abb. 20: Versuchsreihe A

Dieses Ergebnis zeigt wieder, daß die Algen in dem hier verwendeten Medium nicht heterotroph wachsen konnten (s. Abschnitt 4.1.1.), da Ertragskoeffizianten für Acetat von > 0,9 höchst unwahrscheinlich wären. Die bisher aus der Literatur für verschiedene Mikroorganismen bekannten Ertragskoeffizienten für Acetat liegen bei 0,4 (Payne 1970).
Die Algen wuchsen also photomixotroph. Ein Teil des aufgenommenen Acetat-Kohlenstoffs mußte die Zellen wieder verlasssen (DOC konnte aus technischen Gründen in diesem Versuch nicht gemessen werden). Bei photomixotropher Ernährungsweise müssen die Algen zusätzlich CO_2 aufnehmen. Das Verhältnis CO_2-Aufnahme zu Acetataufnahme war aber in diesem Versuch nicht verifizierbar, da nicht mit markierten Substraten gearbeitet werden konnte.

Auch in Versuchsreihe A hatten beide Kurven ein Maximum (Abb. 20). Es wurde bei einer Verdünnungsrate von $D \sim 0{,}04\ h^{-1}$ erreicht und betrug für die Biomasseproduktion 20,2 mg C $l^{-1}\ h^{-1}$ und für die Acetataufnahmerate 11,4 mg C $l^{-1}\ h^{-1}$.

Hier wird noch deutlicher, daß die aufgenommene Menge an Acetat nicht zur Biomasseproduktion ausreichte. Die Algen mußten wie in Versuchsreihe B zusätzlich CO_2 aufnehmen. Während die Biomasseproduktion aufgrund des größeren Lichtangebots gegenüber der anderen Versuchsreihe erhöht war, war die Acetataufnahmerate niedriger.

Berechnet man den Quotienten Biomasseproduktion/Acetataufnahmerate und trägt ihn gegen die Biomassekonzentration auf, so wird die Abhängigkeit der Acetataufnahme von der Biomassekonzentration und damit von dem den Algen tatsächlich zur Verfügung stehenden Lichtangebot besonders deutlich (Abb. 21).

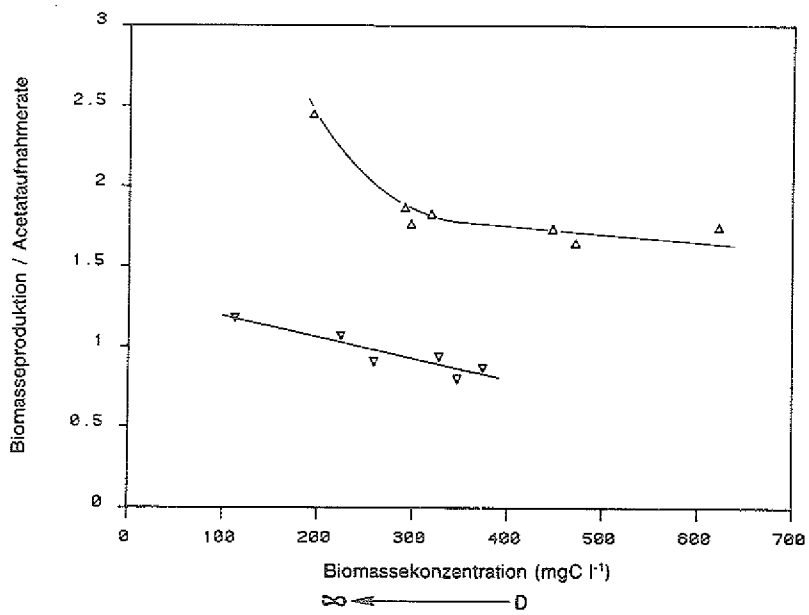


Abb. 21: Quotient Biomasseproduktion/Acetataufnahmerate als Funktion der Biomassekonzentration von Scenedesmus falcatus im Chemostaten (Berechnungen aus Steady State-Werten).

△—△ Versuchsreihe A

▽—▽ Versuchsreihe B

Zur Erinnerung: Mit steigenden Verdünnungsraten nahm die Biomassekonzentration ab.

Der Quotient war bei gleichen Biomassekonzentrationen bei den Kulturen aus Versuchsreihe A (1,7 - 2,5) deutlich größer als bei denen aus Versuchsreihe B (0,7 - 1,2). Bei beiden Versuchsreihen nahm er mit abnehmenden Biomassekonzentrationen (einhergehend mit zunehmender Verdünnungsrate) zu, d.h. es wurde prozentual weniger Acetat aufgenommen. Da die Quantenflußdichte an der Oberfläche der Fermenter gleich blieb, die Biomassekonzentration aber kleiner wurde, stand den einzelnen Algenzellen infolge einer geringeren Selbstbeschattung ein größeres Lichtangebot zur Verfügung.

Aus dem Vergleich beider Versuchsreihen und dem Vergleich der Biomassekonzentration einer Versuchsreihe bei verschiedenen Verdünnungsraten folgt, daß die Algen weniger Acetat aufnehmen, wenn das Lichtangebot für die Einzelzelle größer ist.

Dieses Ergebnis sollte nun auch bei einer Kultur überprüft werden, die bei gleicher Verdünnungsrate unterschiedlich bestrahlt wurde (Tab. 2).

Tab. 2: Bestimmung des Quotienten Biomasseproduktion/Acetataufnahmerate bei D = 0,025 h^{-1} und verschiedenen Quantenflußdichten

	99 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$	231 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$
Quotient (%)	100	166

Auch hier zeigte sich also, daß der Quotient Biomasseproduktion/Acetataufnahmerate bei größeren Quantenflußdichten größer wurde. Die Biomasseproduktion war also positiv, die Acetataufnahmerate negativ mit dem Lichtangebot korreliert.

4.2.1.1.5. Kohlenstoffbilanz

Anhand einer C-Bilanz sollte gezeigt werden, wie hoch der prozentuale Anteil der CO_2-Aufnahme an der gesamten C-Aufnahme einer Kultur aus Versuchsreihe B war. Dies war aus den Ergebnissen in Kapitel 4.2.1.1.4. nicht ohne weiteres ablesbar.

Dazu wurde eine Kultur (D = 0,054 h^{-1}) ausgewählt, bei der die Biomasseproduktion und die Acetataufnahmerate in dieser Versuchsreihe am höchsten war.

Die von den Algen aufgenommene Menge an CO_2 wurde berechnet aus der Differenz zwischen dem pro Aufenthaltszeit eingegebenen und aus dem System ausgeblasenen CO_2, abzüglich des in der Flüssigphase gelösten CO_2 (Die zufließende Nährlösung war durch Autoklavieren CO_2-frei).

Tab. 3: C-Bilanz einer Kultur bei einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}054\ h^{-1}$ und einer Quantenflußdichte von $99\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$

	C-Verteilungsmuster in Prozent des insgesamt aufgenommenen Kohlenstoffs (%)
Algenbiomasse	90,6
extrazelluläre org. Substanz (ohne Restacetat)	8,6
$\sum$ (Biomasse, extrazelluläre org. Substanz)	99,2
CO_2-Aufnahme	7,8
Acetataufnahme	92,2
$\sum$ (CO_2-, Acetataufnahme)	100

Lediglich 0,8 % des aufgenommenen Kohlenstoffs wurden bei der Bilanzierung nicht erfaßt (Tab. 3). 90,6 % des aufgenommenen Kohlenstoffs fanden sich in der Biomasse wieder, 8,6 % wurden als extrazelluläre organische Substanz (ohne Restacetat) im Medium gemessen. Von dem insgesamt aufgenommenem Kohlenstoff kamen 92,2 % aus dem Acetat. Nur 7,8 % stammten aus dem extern zugeführten CO_2.

Diese Bilanz zeigt, daß die Algen zum Wachstum CO_2 benötigen, obwohl rein rechnerisch die aufgenommene Menge an Acetat zur Bildung der Biomasse ausreicht. Die Algen wuchsen also photomixotroph.

4.2.1.1.6. Modell zur Berechnung der Biomasse

In Analogie zur Enzym-Substrat-Kinetik (Michaelis-Menten 1913) entwickelte Monod (1942) die Gleichung, die die Wachstumsgeschwindigkeit von Organismen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration beschreibt. Diese Gleichung gilt auch für lichtlimitierte Algenkulturen, wenn als Substrat das den Algen tatsächlich zur Verfügung stehende Lichtangebot eingesetzt wird (Eppley & Dyer 1965).

In dem in dieser Arbeit untersuchten System wuchs S. falcatus in Reinkulturen photomixotroph. Die Algen nahmen sowohl CO_2 als auch Acetat auf. Beide Vorgänge waren lichtabhängig (s. Abschnitt 4.1.1.), d.h. die zur Bildung der Zellsubstanz notwendige Energie entstammte der Photosyntheseleistung der Algen.
S. falcatus konnte in einem CO_2-freien Medium nicht über einen längeren Zeitraum (5 Tage) wachsen (wahrscheinlich nicht teilungsfähig; s. Kapitel 5.1.).

Dem aufzustellenden Modell lagen folgende Annahme zugrunde: S. falcatus benötigte externes CO_2, da Acetat offensichtlich nicht in ausreichender Menge zu CO_2 oxidiert werden konnte. Da das Wachstum lichtabhängig ist, besteht mit großer Wahrscheinlichkeit zwischen der Acetat- und CO_2-Assimilation eine Konkurrenzsituation um die aus den Photosynthesereaktionen stammende Energie. Bei konstantem CO_2-Angebot (durch die Begasung mit 1 % (v/v) CO_2 in Luft gewährleistet) muß das photomixotrophe Wachstum von Scenedesmus falcatus deshalb als Funktion der Acetatkonzentration und des Lichtangebots beschrieben werden können.
Auf der Basis der experimentellen Befunde wird ein Einzentrum-Mechanismus postuliert. Herr Dr. E. Fiolitakis leitete für die Wachstumskinetik auf Acetat und CO_2 folgende Gleichung ab (vgl. Anhang).

Modell des photomixotrophen Wachstums von S. falcatus:

$$\mu = \frac{\mu_{m1} * I}{I_{K1} + I} + \frac{\mu_{m2} * I}{I_{K2} + I} * \frac{s}{K_s + s} \qquad (10)$$

μ_m = maximale Wachstumsrate photomixotroph wachsender Algen, in die Konstanten μ_{m1} und μ_{m2} gehen eine Reihe verschiedener Konstanten ein (s. Anhang)

I_k = Halbsättingungskonstante für Licht von photomixotroph wachsenden Algen, in die Konstanten I_{k1} und I_{k2} gehen eine Reihe verschiedener Konstanten ein (s. Anhang)

I = Lichtangebot, das den Algen tatsächlich zur Verfügung steht

k_s = Halbsättigungskonstante für Acetat

s = Acetatkonzentration

Der erste Term der Gleichung beschreibt das Wachstum mit CO_2, der zweite das Wachstum mit Acetat und CO_2 unter Ausnutzung der Lichtenergie.

Unter der vereinfachten Annahme, daß die Lichtabsorption in dem von einer Seite bestrahlten Fermenter (Radius: 1,9 cm) ähnlich ist wie die in der Küvette im Photometer gemessenen, kann das den Algen zur Verfügung stehende Lichtangebot berechnet werden:

I berechnet sich nach Lambert Beer: $I = I_o * e^{-Exd}$ (11)

I_o = Quantenflußdichte an der Oberfläche des Fermenters

E = Extinktionskoeffizient bei 570 nm

x = Biomassekonzentration

d = Küvettenschichtdicke

Die Küvettenschichtdicke betrug 1cm. Da zudem die gemessene Biomassekonzentration (mg C l^{-1}) mit der Extinktion der Kulturen aus Versuchsreihe A (I_o = 157 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$) linear korreliert war (s. Abb. 4), konnte der Extinktionskoeffizient bestimmt werden. Er betrug 4,21.

Den 5 Konstanten der Gleichung 10 standen nur 8 gemessene Wertepaare von kontinuierlich photomixotroph wachsenden Algenkulturen gegenüber. Dies erlaubte keine sinnvolle mathematische Behandlung.

Wie in meinen Versuchen (s. Abschnitt 4.1.1.2.) festgestellt, wurde aber der μ_{max}-Wert nicht von der Ernährungsweise der Algen beeinflußt. Er blieb in jedem Fall gleich.
Mit der Annahme, daß die I_k-Werte hauptsächlich durch das Wachstum mit CO_2 bestimmt werden, könnten die unbekannten Konstanten auf 3 reduziert werden. In grober Annäherung an die tatsächlich herrschenden Bedingungen (s. Anhang) sollte dann $\mu_{m1} \approx \mu_{m2}$ und $I_{k1} \approx I_{k2}$ sein. Dies vereinfacht Gleichung 10 wie folgt:

$$\mu = \frac{\mu_m * I}{I_k + I} * \left(1 + \frac{s}{K_s + s}\right) \qquad (12)$$

Diese Gleichung wurde an die experimentell gefundenen μ-Werte angepaßt (Dr. E. Fiolitakis, 1984). Dabei wurde die Quadratsumme der Abweichungen zwischen den experimentell ermittelten Werten und der Modellverhersage mit Hilfe einer nichtlinearen Regression bestimmt (Dennis et al. 1981). Die 3 Parameter (μ_m, I_k, K_s) sind dabei frei optimiert worden. Die Anpassung wurde mit den 8 gemessenen Wertepaaren durchgeführt. Als Startwerte für die Anpassung im Rechner dienten der exprimentell bestimmte μ_m-Wert von $0{,}079 h^{-1}$ und Schätzwerte der beiden anderen Parameter ($I_k = 55 \mu E\ m^{-1}\ s^{-1}$, $K_s = 5{,}9$ mmol l^{-1}). Dabei wurde als I_k der Wert für I_o eingesetzt, bei dem die photoautotroph wachsenden Algen in Batch-Versuchen ihre halbmaximale Wachstumsgeschwindigkeit erreichten. Als K_s-Wert wurde die im Fermenter verbleibende Acetatkonzentration kontinuierlich wachsender photomixotropher Kulturen angenommen, bei der $0{,}5 \mu_{max}$ erreicht wurde.
Die beste vom Rechner ermittelte Anpassung ergab für die 3 Konstanten folgende Werte:

$$\mu_m = 0{,}080\ h^{-1},\ I_K = 23 \mu E\ m^{-2}\ s^{-1},\ K_s = 50\ mmol\ l^{-1}$$

Da bei kontinuierlichen Kulturen im Steady State die Wachstumsrate bekannt ist ($\mu = D$), die Biomassekonzentration bzw. die Biomasseproduktion ($P = D * X$) meist zur Beschreibung eines Systems herangezogen wird und die relativ hohe Substratkonzentration S in diesem Fall schnell meßbar war, wurde die Gleichung 10 mit Hilfe von 11 nach X aufgelöst.

$$\underbrace{(2\mu_m s + \mu_m K_s - \mu s - \mu K_s)}_{a} * (I)^2 + \underbrace{(\mu_m I_K K_s + 2\mu_m I_K s - 2\mu I_K s - 2\mu I_K K_s)}_{b} * I$$

$$- \underbrace{(\mu s\ (I_K)^2 + \mu K_s\ (I_K)^2)}_{c} = 0$$

$$I = I_o * e^{-Ex} = -\frac{b}{2a} \mp \sqrt{\left(\frac{b}{2a}\right)^2 + \frac{c}{a}}$$

$$x = -\frac{\ln\left(\frac{-\frac{b}{2a} \pm \sqrt{\left(\frac{b}{2a}\right)^2 + \frac{c}{a}}}{I_o}\right)}{E} \qquad (13)$$

Da negative Logarithmen nicht definiert sind, gibt es für x nur eine Lösung.

In Abb. 22 sind die berechneten und gemessenen Biomassekonzentrationen aus Versuchsreihe A im Steady State gegen die Verdünnungsrate aufgetragen. Die berechneten Werte deckten sich dabei gut mit den gemessenen. Die mittels nichtlinearer Anpassung ermittelten Konstanten erlaubten somit eine gute Beschreibung des Systems.

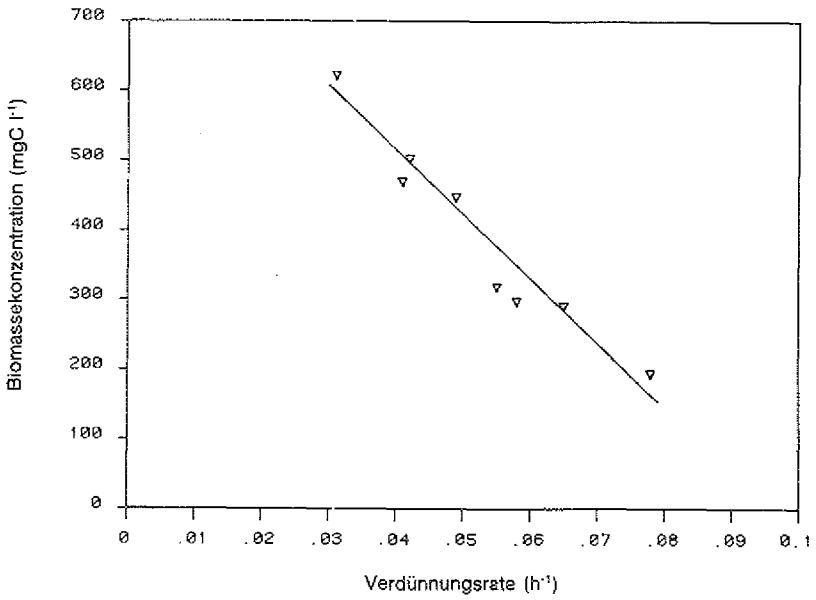


Abb. 22: Berechnung der Biomassekonzentration von Scenedesmus falcatus im Steady State bei verschiedenen Verdünnungsraten im Chemostaten am Beispiel der Versuchsreihe A

——— Berechnung nach Formel 13

▽—▽ gemessene Werte (s. Abb. 12, Versuchsreihe A)

4.2.1.2. Zellkonzentration

Scenedesmus falcatus konnte unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen als Einzelzelle, Zweier-, Vierer- oder seltener als Achter-Coenobium vorliegen. Das Verteilungsmuster änderte sich mit der Verdünnungsrate. Der Anteil der Vierercoenobien an der Gesamtzellkonzentration lag jedoch immer über 50 %. Zum besseren Verständnis des Parameters Biomasse wurde deshalb die Abhängigkeit der Zellkonzentration und der Masse der durchschnittlichen Zelle von der Verdünnungsrate untersucht.

Bei Scenedesmus falcatus erfolgt die Zellvermehrung nicht wie bei anderen Mikroorganismen durch Zweiteilung, sondern wie bei allen Algen der Familie der Scenedesmaceae durch Autosporen (Fott 1973). Diese sind Aplanosporen, die schon innerhalb der Mutterzelle ihre typische Gestalt annehmen. Nach ihrer Freisetzung wachsen diese Tochterzellen zu ihrer definitiven Größe heran. Sie bleiben in der Regel als Coenobium zusammen. Die Anzahl der Zel-

len eines Coenobiums variiert.

Bei der Bestimmung der Zellkonzentration wurde die Gesamtzellkonzentration als Maß genommen. Ein Vierercoenobium wurde wie vier Einzelzellen bewertet.

Die Zellkonzentration stieg bei beiden Versuchsreihen (A,B) logarithmisch mit abnehmender Verdünnungsrate an (Abb. 23). Ab Verdünnungsraten $D < 0{,}045\ h^{-1}$ verlangsamte sich bei Versuchsreihe B der Anstieg. Die Zellkonzentration der stärker bestrahlten Kulturen (Versuchsreihe A) war zu jeder Zeit größer als die der schwächer bestrahlten (Versuchsreihe B). Der Kurvenverlauf für beide Versuchsreihen war ähnlich wie der für die Biomassekonzentration.

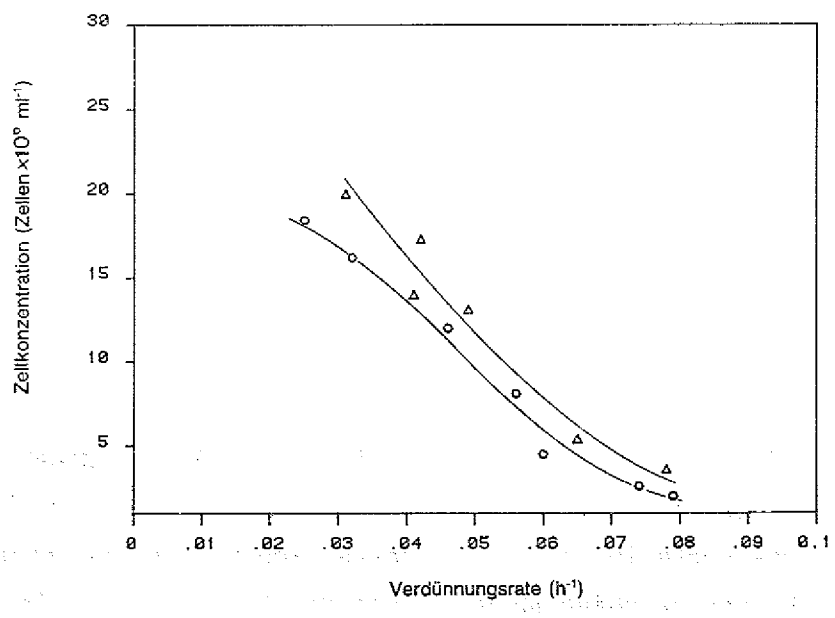


Abb. 23: Zellkonzentrationen von Scenedesmus falcatus im Steady State als Funktion der Verdünnungsrate im Chemostaten.

△—△ Versuchsreihe A

○—○ Versuchsreihe B

4.2.1.2.1. Zellmasse

Die Masse der durchschnittlichen Einzelzelle nahm in beiden Versuchsreihen mit zunehmender Verdünnungsrate von $\sim 0{,}6 * 10^{-10}$ g (Versuchsreihe A) bzw. $\sim 0{,}4 * 10^{-10}$ g (Versuchsreihe B) auf $\sim 1{,}2 * 10^{-10}$ g zu (Abb. 24). Ab $D > 0{,}055\ h^{-1}$ war die Zellmasse in beiden Versuchsreihen bei gleichen Verdünnungsraten gleich. Ab $D < 0{,}055\ h^{-1}$ hingegen war die Zellmasse der Kulturen aus Versuchsreihe B deutlich kleiner als die der Kulturen aus Versuchsreihe A.

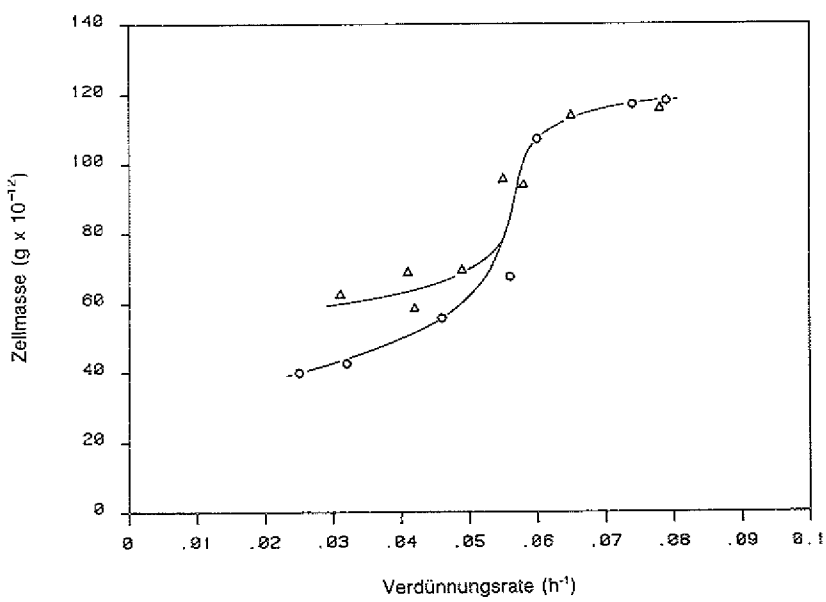


Abb. 24: Zellmasse von Scenedesmus falcatus im Steady State als Funktion der Verdünnungsrate im Chemostaten.

△—△ Versuchsreihe A

○—○ Versuchsreihe B

Die Erhöhung der Zellmasse ging einher mit einer Volumenzunahme der Zellen. Beobachtungen unter dem Mikroskop ergaben, daß die Zellen bei hohen Verdünnungsraten ($D > 0{,}06\ h^{-1}$) etwa 2-3 mal so groß waren wie bei den niedrigsten Verdünnungsraten. Ab $D > 0{,}06\ h^{-1}$ bildete Scenedesmus falcatus zudem mehr Autosporen aus. Die Coenobien bestanden in der Regel aus 4, 10 % der Coenobien sogar aus 8 Zellen. Bei niedrigeren Verdünnungsraten konnten keine 8-er Coenobien beobachtet werden.

Eine Volumenzunahme der Zellen mit steigenden Verdünnungsraten wurde auch bei anderen Mikroorganismen festgestellt (Herbert 1961, Slater 1975). Gons (1977) berichtete, daß die Anzahl der Autosporen von Scenedesmus protuberans zudem mit steigender Verdünnungsrate zunahm. Die Befunde meiner Arbeit decken sich somit prinzipiell mit denen aus der Literatur.

Komarek und Ruzicka (1969) konnten zeigen, daß in Batchkulturen das Zellvolumen mit steigendem Lichtangebot und gleichzeitig erhöhter Wachstumsrate zunimmt. Gleichzeitig verkürzt sich die Generationszeit. Dieser Befund wurde von Pfau und Senger (1972) im Turbidostaten bestätigt. Aus diesen Arbeiten wird aber das Ursache-Wirkungsprinzip nicht klar, da jeweils mit einer Erhöhung des Lichtangebots eine Steigerung der Wachstumsrate erzielt wurde. Die Trennung dieser beiden Faktoren konnte in meiner Arbeit klar vorgenommen werden. Bei gleichen Wachstumsraten (Verdünnungsraten) war das Lichtangebot für die Einzelzelle der Kulturen in Versuchsreihe A immer größer als für die in Versuchsreihe B.
Die Ergebnisse zeigen, daß bei niedrigen Verdünnungsraten $D < 0{,}055\ h^{-1}$, damit hohen Biomassekonzentrationen und einem relativ geringen Lichtangebot (Selbstbeschattung), das den Zellen zur Verfügung stand, die Zellmasse vom Lichtangebot abhing. Ab $D\ (\mu) > 0{,}055\ h^{-1}$ lag die Zellmassenzunahme ausschließlich in der erhöhten Wachstumsrate begründet.
Da sich mit zunehmender Wachstumsrate die Entwicklungsdauer hinsichtlich der Zeitspanne zwischen Autosporenfreisetzung und Eintritt der Teilungsreife verkürzt (Erhöhung der mittleren Autosporenzahl), muß sich dies als Zunahme des durchschnittlichen Zellvolumens und damit auch der Zellmasse bemerkbar machen.

Die von Gons (1977) angebotene physiologische Erklärung für die Zunahme der Zellmasse besagt, daß eine höhere Wachstumsrate einen höheren Gehalt an Ribosomen und damit eine höhere Proteinproduktionsrate bedingt.
In meiner Arbeit konnte mit Hilfe der C : H : N-Bestimmung der Trockenmasse von Scenedesmus falcatus belegt werden, daß das C/N-Verhältnis mit steigenden Verdünnungsraten etwas kleiner wurde (s. Abschnitt 4.2.1.1.3.), die Biomasse also einen etwas höheren N-Gehalt aufwies.
Vergleicht man die DNS-Gehalte von Chlorella bei unterschiedlichen Vermehrungsfaktoren (Vermehrungsfaktor 12 (Galloway et al., 1974) - Vermehrungsfaktor > 1,4 (Soeder et al. 1970)), so sind zwar deutliche Unterschiede er-

kennbar, aber nicht in einer Größenordnung, die eine solche von mir bei Scenedesmus falcatus beobachtete Zellmassenzunahme erklären könnten. Dies deutet an, daß der von Gons (1977) gemachte Erklärungsversuch zumindest in meinem Fall nicht den gesamten Effekt erhellen kann.

Es bleibt festzuhalten, daß unter den von mir vorgegebenen Bedingungen die mittlere Zellmasse der Einzelzellen von Scenedesmus falcatus bei niedrigen Verdünnungsraten von dem Lichtangebot, bei hohen Verdünnungsraten dagegen ausschließlich von der Wachstumsrate bestimmt wird.
Vergleicht man diese Befunde mit den ermittelten Biomassekonzentrationen bei verschiedenen Verdünnungsraten, so kann die unterschiedliche Biomassekonzentration von Scenedesmus falcatus in beiden Versuchsreihen bei gleichen Verdünnungsraten bei $D > 0{,}055\ h^{-1}$ ausschließlich auf eine Erhöhung der Zellkonzentration, bei $D < 0{,}055\ h^{-1}$ hingegen sowohl auf eine erhöhte Zellmasse als auch auf eine erhöhte Zellkonzentration zurückgeführt werden.

4.2.1.3. Chlorophyllgehalt

Die Algenbiomasse wird von Limnologen oft über die Messung des Chlorophyllgehalts einer Probe bestimmt (Sartori 1982, Nusch 1980).

In diesem Versuch wurde überprüft, ob die Chlorophyllkonzentration auch unter den hier gewählten Bedingungen ein brauchbares Maß zur Bestimmung der Biomasse ist.

Die Chlorophyllkonzentration (mg l^{-1}) verhielt sich bei verschiedenen Verdünnungsraten ähnlich wie die Biomasse oder die Zellkonzentration (Abb. 25). Sie stieg logarithmisch mit abnehmenden Verdünnungsraten an. Bei Verdünnungsraten $< 0{,}045\ h^{-1}$ knickte die Kurve B ab. Die Chlorophyllkonzentration der Kulturen der Versuchsreihe A war somit gegenüber der der Versuchsreihe B zu jeder Aufenthaltszeit erhöht.

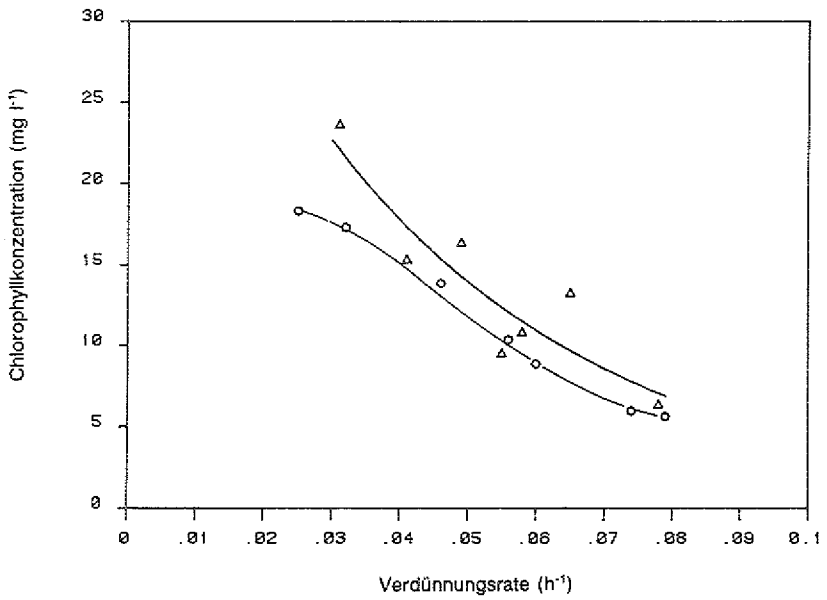


Abb. 25: Chlorophyllkonzentration von Scenedesmus falcatus im Steady State in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate im Chemostaten.

△—△ Versuchsreihe A

○—○ Versuchsreihe B

4.2.1.3.1. Chlorophyllgehalt der Einzelzelle

Der Chlorophyllgehalt der Einzelzellen war bei Verdünnungsraten $< 0{,}055\ h^{-1}$ unabhängig von der Verdünnungsrate und der Lichtstärke (Abb. 26). Trotz der unterschiedlichen Einzelzellmassen bei beiden Versuchsreihen enthielt eine Zelle von Scenedesmus falcatus ungefähr $11 * 10^{-13}$ g Chlorophyll. Dies schien der Mindestchlorophyllgehalt einer Zelle unter den hier vorgegebenen Bedingungen zu sein, bei dem der Photosyntheseapparat ausreichende Mengen an ATP und Reduktionsequivalenten zum Algenwachstum zur Verfügung stellen konnte. Bei Verdünnungsraten $> 0{,}055\ h^{-1}$ stieg der Chlorophyllgehalt der Zellen an und erreichte bei den Versuchsreihen mit ungefähr $24 * 10^{-13}$ g Chlorophyll sein Maximum ($D > 0{,}065\ h^{-1}$).

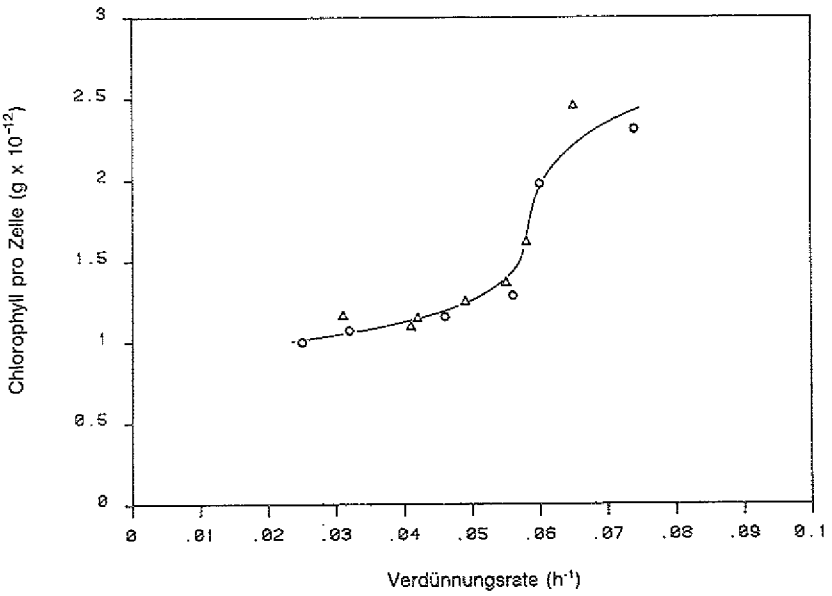


Abb. 26: Durchschnittlicher Chlorophyllgehalt einer Einzelzelle von Scenedesmus falcatus im Steady State in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate im Chemostaten

△—△ Versuchsreihe A

○—○ Versuchsreihe B

Die Berechnung des prozentualen Anteils des Chlorophylls an der Zellmasse zeigte, daß dieser Anteil relativ unabhängig von der Verdünnungsrate war. Er betrug für die Algen der Versuchsreihe A 1,75 % ± 0,6, für die der Versuchsreihe B 1,95 % ± 0,13. In Versuchsreihe B war allerdings bei den niedrigen Verdünnungsraten (0,025 und 0,032 h^{-1}) der Chlorophyllanteil auf 2,5 % erhöht (Abb. 27).

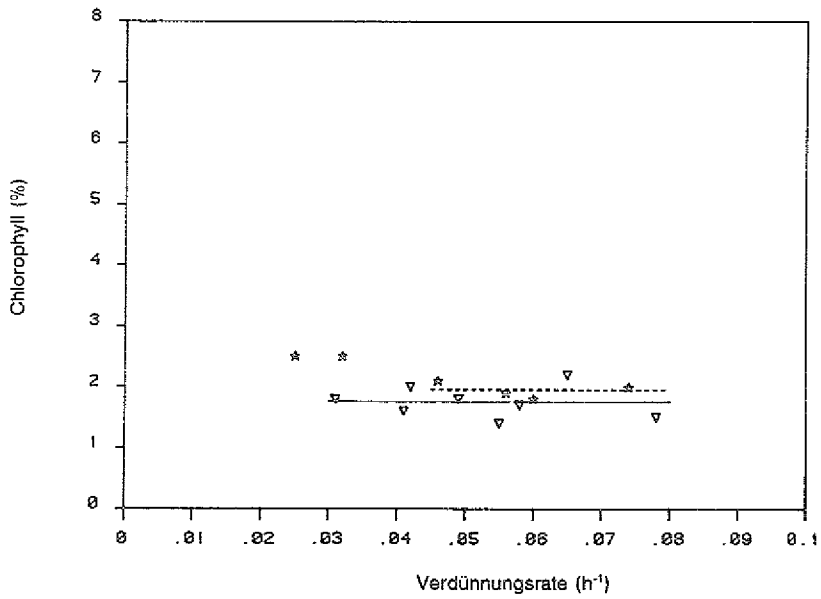


Abb. 27: Prozentualer Chlorophyllanteil der Zellmasse von Scenedesmus falcatus im Steady State in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate im Chemostaten.

▽—▽ Versuchsreihe A

✱—✱ Versuchsreihe B

Die Adaption der Algen an das den Zellen tatsächlich zur Verfügung stehende Licht ist aus der Literatur bekannt (Beale & Appleman 1971). Nach Tamiya et al. (1953) bedingt ein höheres Lichtangebot einen niedrigeren Chlorophyllgehalt.

Unter meinen Versuchsbedingungen scheint dies für Scenedesmus falcatus nur bei einem Vergleich gleich schnell wachsender Kulturen zuzutreffen (siehe prozentuale Chlorophyllgehalte der Biomasse in den beiden Versuchssystemen) und bei sehr limitierenden Bedingungen (sehr niedrige Verdünnungsrate, $D < 0.032\ h^{-1}$). Betrachtet man hingegen eine Kultur bei verschiedenen Verdünnungsraten und damit sich stetig veränderndem Lichtangebot für die Einzelzelle, so bleibt der prozentuale Chlorophyllgehalt der Biomasse konstant. Die mit steigender Verdünnungsrate sich erhöhende Chlorophyllkonzentration pro Zelle wird weitgehend durch die sich erhöhende Zellmasse kompensiert. Scenedesmus falcatus verhält sich somit ähnlich wie der von Gons (1977) beschriebene Scenedesmus protuberans.

Chlorophyll ist für Scenedesmus falcatus nur dann ein geeigneter Biomasseparameter, wenn die Lichtstärke an der Oberfläche des Kulturgefäßes konstant bleibt und nicht wie in Versuchsreihe B bei sehr niedrigen Verdünnungsraten extrem limitierend ist.

4.2.1.4. N-Elimination

Ein Vorteil eines Algengrabens gegenüber anderen herkömmlichen Abwasserreinigungssystemen liegt darin, daß außer den organischen Laststoffen auch die anorganischen N- und P-Verbindungen aus dem Abwasser entfernt werden (Shelef et al, 1976).

In diesem Abschnitt sollte die Rolle der Algen (Scenedesmus falcatus) bei der Elimination des mit in der Nährlösung kontinuierlich zugeführten NH_4^+-N (104,8 mg N l^{-1}) dargestellt werden.

Vorgänge, die für die Entfernung des Stickstoffs verantwortlich sind, seien im folgenden kurz aufgeführt:

a) Der Stickstoff wird von den Algen aufgenommen
b) Durch Entzug von Acetat und gelöstem CO_2, das die Algen assimilieren, wird der pH-Wert des Mediums erhöht. Da NH_4^+ mit NH_3 in einem Gleichgewicht steht, das pH-abhängig ist, verschiebt sich dieses Gleichgewicht bei einer pH-Wert-Erhöhung zugunsten des NH_3. Das gebildete NH_3 wird durch die kontinuierliche Begasung aus dem Kultursystem ausgetrieben.

4.2.1.4.1. N-Einbau in die Biomasse

Der N-Einbau in die Biomasse nahm mit abnehmenden Verdünnungsraten zu (Abb. 28). Bei Verdünnungsraten < 0,045 h^{-1} nahm die Steigung beider Kurven ab.

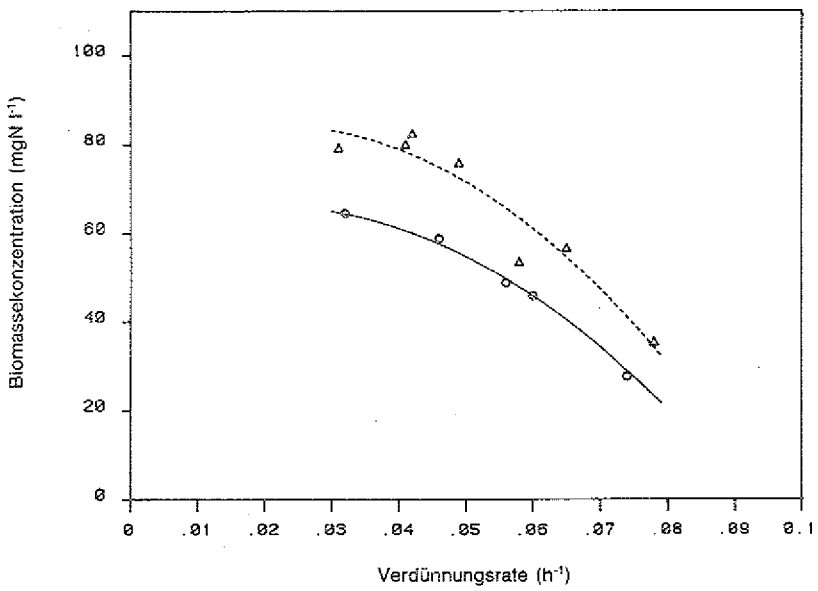


Abb. 28: Konzentration des in die Biomasse von Scenedesmus falcatus eingebauten Stickstoffs als Funktion der Verdünnungsrate im Chemostaten (Messungen im Steady State).

△—△ Versuchsreihe A

○—○ Versuchsreihe B

Der geringere Anstieg der Kurve (Versuchsreihe B) bei Verdünnungsraten < 0,045 h^{-1} war auf eine verringerte Zunahme der Biomassenkonzentration zurückzuführen (siehe Abb. 12). In Versuchsreihe A hingegen deutete das Abknicken der Kurve bei weiter exponentiell steigender Biomassekonzentration darauf hin, daß die Algen ihren prozentualen N-Gehalt reduzierten, da ihnen kein weiterer Stickstoff mehr zur Verfügung stand. Bei einer Verdünnungsrate von D = 0,031 h^{-1} betrug der prozentuale N-Gehalt der Biomasse nur noch 6,23 %. Nach Bongard (1956) wird die Photosyntheseleistung der Zellen aber erst bei einem Gehalt von 3 - 4 % stark verringert (Scenedesmus sp.). Somit waren die Algen in meinem System nicht N-limitiert (siehe auch Abschnitt 4.2.1.1.2.).

4.2.1.4.2. N-Elimination des Systems

Die N-Elimination wurde berechnet als Differenz des mit der Nährlösung zugeführten NH_4^+-N und des im Medium des Kulturgefäßes gemessenen NH_4^+-N. NO_3^--N und NO_2^--N konnten aufgrund ihrer sehr geringen Konzentration vernachlässigt werden. Die Summe der gemessenen Konzentrationen dieser beiden N-Verbindungen war immer < 0,6 mg N l^{-1}. Sie wurden schon als Verunreinigungen mit in das System eingebracht. Ihre Konzentration änderte sich im Verlauf der Versuche nicht.

Die NH_4^+-Elimination nahm mit abnehmenden Verdünnungsraten zu (Abb. 29). Die Elimination der Kulturen der Versuchsreihe A war zu jeder Zeit aufgrund der höheren Biomassenkonzentration größer als die der Versuchsreihe B. Bei Verdünnungsraten < 0,05 h^{-1} war der Unterschied in der Elimination größer. Bei der niedrigsten Verdünnungsrate (D = 0,031 h^{-1}) betrug die Elimination 97 %. Der eingesetzte gelöste Stickstoff wurde somit fast völlig aus dem System entfernt.

Bedingt durch die niedrigere Biomassekonzentration eliminierten die Kulturen der Versuchsreihe B maximal 74 % des eingesetzten NH_4^+-N (D = 0,032 h^{-1}).

Bei beiden Versuchsreihen betrug die minimale Elimination ungefähr 32 %. Sie war gegeben bei den höchsten Durchflußraten (D = 0,079 h^{-1}) und den damit verbundenen niedrigsten Biomassekonzentrationen.

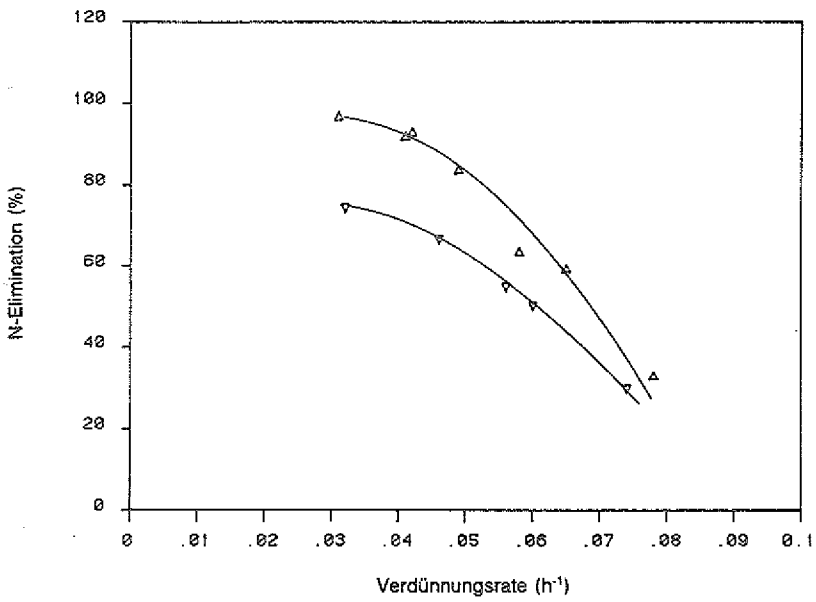


Abb. 29: N-Elimination durch Scenedesmus falcatus als Funktion der Verdünnungsrate im Chemostaten (Messungen im Steady State).

△ — △ Versuchsreihe A

▽ — ▽ Versuchsreihe B

4.2.1.4.3. N-Bilanz

Anhand einer N-Bilanz sollte untersucht werden, wieviel Stickstoff als NH_3-N durch "Stripping" aus dem System entfernt wurde.

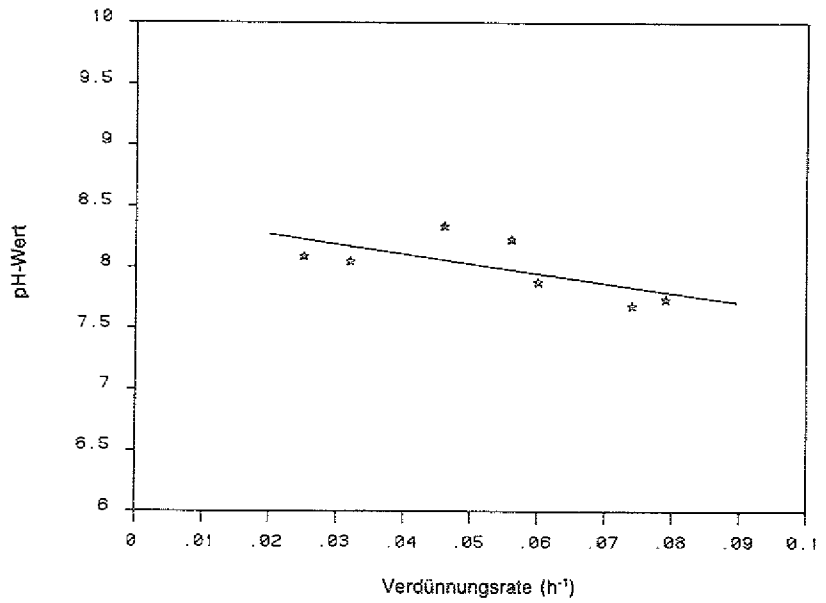
Da ich aus Kapazitätsgründen nur gelöste anorganische N-Verbindungen analysieren konnte, ging die Konzentration an gelösten extrazellulären organischen N-Verbindungen nicht in die Bilanzen ein. Die Konzentrationen dieser Substanzen dürften aber so klein sein, daß sie für die Bilanzen ohne Belang sind (Hellebust 1974).

Tab. 4: N-Bilanzen beider Versuchsreihen unter Steady State Bedingungen (die N-Konzentration in der Nährlösung betrug 104,8 mg N l^{-1})

	D (h^{-1})	pH-Wert	N-Gehalt der Biomasse (mg N l^{-1})	N-Konzentration im Medium (mg N l^{-1})	N-Defizit (gemessen) (mg N l^{-1})	N-Defizit (berechnet) (mg N l^{-1})
Versuchsreihe A	0,031	7,67	79,3	2,5	23,5	21
1300 ml Gefäße	0,041		80,0	8,1	16,7	15
(Quantenfluß-	0,042	7,79	82,5	7,0	15,3	14,5
dichte	0,049		75,9	16,7	12,2	12,3
157 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$)	0,058	7,61	53,6	38,0	13,2	10,4
	0,065	7,35	56,7	42,2	5,9	9,3
	0,078	7,21	35,5	69,8	-	9,3
Versuchsreihe B	0,032	8,05	64,5	26,6	13,7	14,5
1600 ml Gefäße	0,046	8,34	58,8	34,9	11,1	9,3
(Quantenfluß-	0,056	8,35	48,7	47,1	9,0	7,5
dichte:	0,060	7,88	45,8	52,2	6,8	6,8
99 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$)	0,074	7,69	27,7	73,3	3,8	5,6

Das in dieser Größenordnung auftretende Defizit (siehe Tabelle 4) kann nur mit dem Ausblasen von NH_3 aus dem System erklärt werden. Mit abnehmenden Verdünnungsraten erhöhte sich der pH-Wert (Abb. 30, 31) und das Defizit wurde größer (siehe Tab. 4).

Bedingt durch die Meßmethodik konnte der ermittelte pH-Wert geringfügig (1/10-Einheit) von dem tatsächlichen in der Kultursuspension abweichen (siehe Abschnitt 2.2.8.).



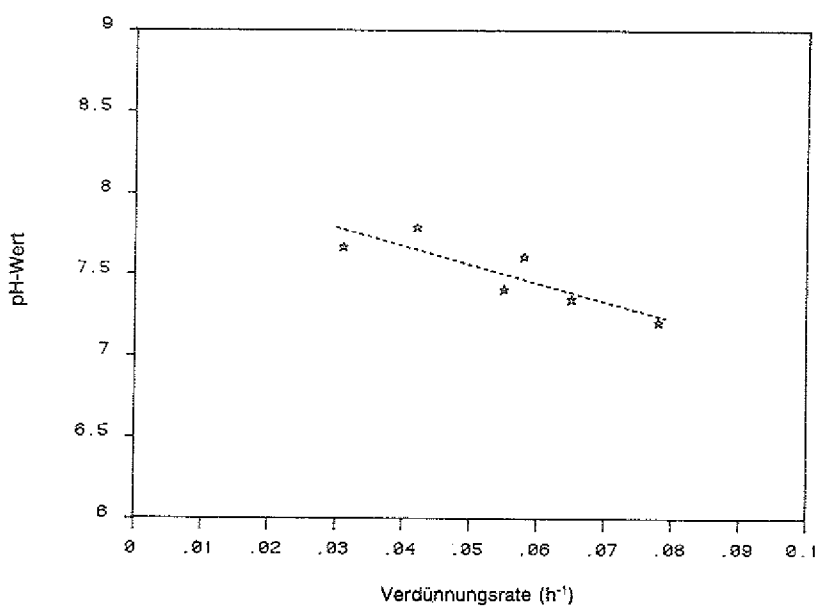


Abb. 30, 31: Korrelation zwischen pH-Werten von Kulturen von Scenedesmus falcatus und der Verdünnungsrate im Chemostaten (Messungen im Steady State)

Abb. 30: Versuchsreihe A

Abb. 31: Versuchsreihe B

Wie stark der pH-Wert auf das NH_4^+ : NH_3-Gleichgewicht einwirkt soll kurz an einem Beispiel aufgezeigt werden, bei dem der pH-Wert um 1/10 Einheit von 7,5 auf 7,6 geändert wird. Bei einem pH-Wert von 7,5 liegt 1,77 %, bei pH 7,6 2,18 % des Stickstoffs als NH_3 vor.

Bei der Modellierung der N-Elimination ging der Fehler bei der pH-Wert-Messung also mit ein.

4.2.1.4.4. Errechnung des N-Defizits

Die Menge des ausgeblasenen NH_3 ist abhängig von der Konzentration des nicht in der Biomasse eingebauten Stickstoffs, dem pH-Wert und einer Konstanten, in die die NH_3-Bildungsgeschwindigkeit und die Austreibgeschwindigkeit eingehen.

$$\uparrow N_{NH_3} = K\,\% * N_{NH_4^+\text{-Rest}} * K * 1/D \qquad (14)$$

K % = prozentualer NH_3-Anteil

$N_{NH_4^+}$ = Konzentration an NH_4^+-N, das nicht in die Biomasse eingebaut wird

K = Konstante

Der prozentuale NH_3-Anteil (K %) berechnet sich nach
$K\,\% = 1/(10^{pKa - pH} + 1)$, wobei der pKa-Wert nach Emerson et al. (1975) bestimmt wird:

$$pKa = 0{,}09018 + 2729{,}92/T \qquad (15)$$

T = °Kelvin

Der Wert der Konstanten K ist eine empirisch ermittelte Größe und beträgt für die Kulturen in den 300 ml Fermentern (Versuchsreihe A) 1,0, für die in den 1600 ml Gefäßen (Versuchsreihe B) 0,15. Diese Konstanten sind spezifisch für die verwendeten Kulturgefäße, da die Austraggeschwindigkeit für NH_3 abhängig ist von der erzeugten Turbulenz, der Größe der Grenzfläche Medium/Luft und dem Fermenterinnendruck.

Die Steady State Konzentrationen an NH_4^+-N, die für die Bildung von NH_3 zur Verfügung standen, wurden aus der Differenz des mit der Nährlösung eingesetzten NH_4^+-N (104,8 mg N l^{-1}) und des in die Biomasse aufgenommenen Stickstoff bestimmt.

Die ausgetriebene NH_3-N-Menge ließ sich nach der Formel berechnen:

$$\uparrow N_{NH_3} = \frac{104{,}8 - N_{Biomasse}}{10^{(pKa - pH)} + 1} * K * 1/D \qquad (16)$$

In Abhängigkeit von der Verdünnungsrate folgte der N-Gehalt der Biomasse in beiden Versuchsreihen einem Polynom zweiter Ordnung, der pH-Wert einer Exponentialfunktion.

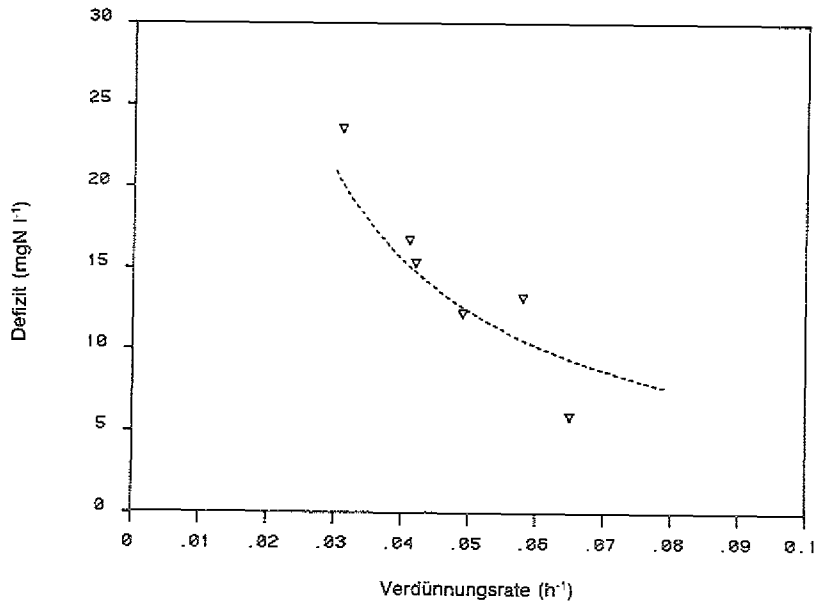
Daraus ergaben sich für die beiden Versuchsreihen folgende Funktionen, die nur für den untersuchten Verdünnungsraten zwischen 0,03 h^{-1} und 0,08 h^{-1} gelten.

Versuchsreihe A:

$$\uparrow N_{NH_3} = \frac{104{,}8 - (-15645{,}4 * D^2 + 671{,}057 * D + 77{,}0846)}{(10^{(0{,}09018 + (2729{,}92/298)) - (8{,}154333 * e^{(-1{,}51572 * D)})}) + 1} * 1{,}0 * 1/D \qquad (1$$

Versuchsreihe B:

$$\uparrow N_{NH_3} = \frac{104{,}8 - (-12778{,}9 * D^2 + 513{,}048 * D + 60{,}9598)}{(10^{(0{,}09018 + (2729{,}92/298)) - (8{,}43564 * e^{(-0{,}99854 * D)})}) + 1} * 0{,}15 * 1/D \qquad (1$$



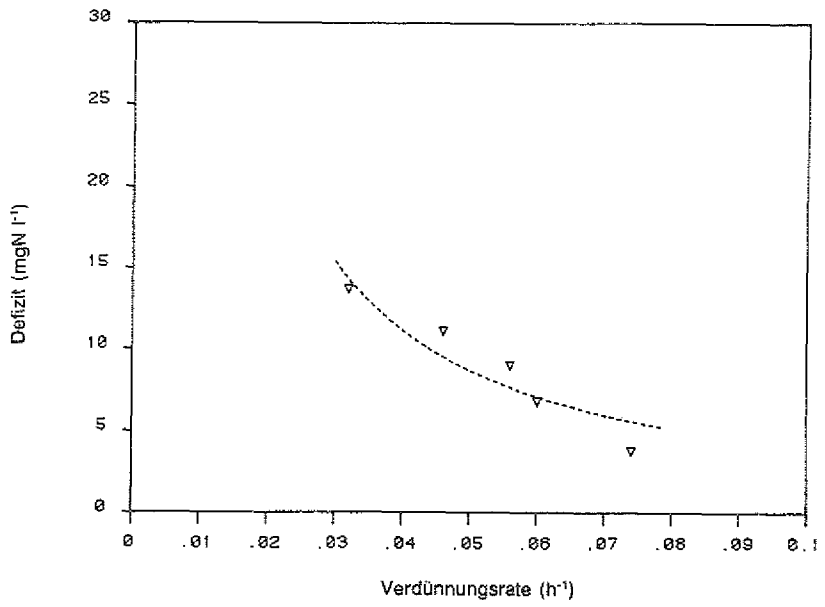


Abb. 32, 33: Berechnung der N-Defizite nach Gleichung 17 und 18 von Kulturen von Scenedesmus falcatus im Steady State in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate im Chemostaten.

— — — berechnete Abhängigkeit

▽—▽ gemessene Werte

Abb. 32: Versuchsreihe A
Abb. 33: Versuchsreihe B

Die errechneten Daten stimmten mit den gemessenen Werten gut überein (Abb. 32, 33). Der Korrelationskoeffizient betrug 0,9448 (n = 6) für Meßdaten der Versuchsreihe A und 0,9171 (n = 5) für die Versuchsreihe B.

4.2.1.5. P-Elimination

Ein weiteres Kriterium für die Abwasserreinigungsleistung eines Systems ist die P-Elimination,da Phosphat bei vielen Gewässertypen für deren Eutrophierung verantwortlich ist (Ohle 1953, 1955).

Die P-Elimination durch Scenedesmus falcatus wurde bestimmt als Differenz des mit der Nährlösung zugeführten Orthophosphats (10,4 mg PO_4^{3-}-P l^{-1}) und der im Medium im Steady State verbleibenden PO_4^{3-}-P Menge.

Die P-Elimination wurde mit abnehmenden Verdünnungsraten größer und näherte sich in beiden Versuchsreihen einem Grenzwert von 86,8 % an (Abb. 34).

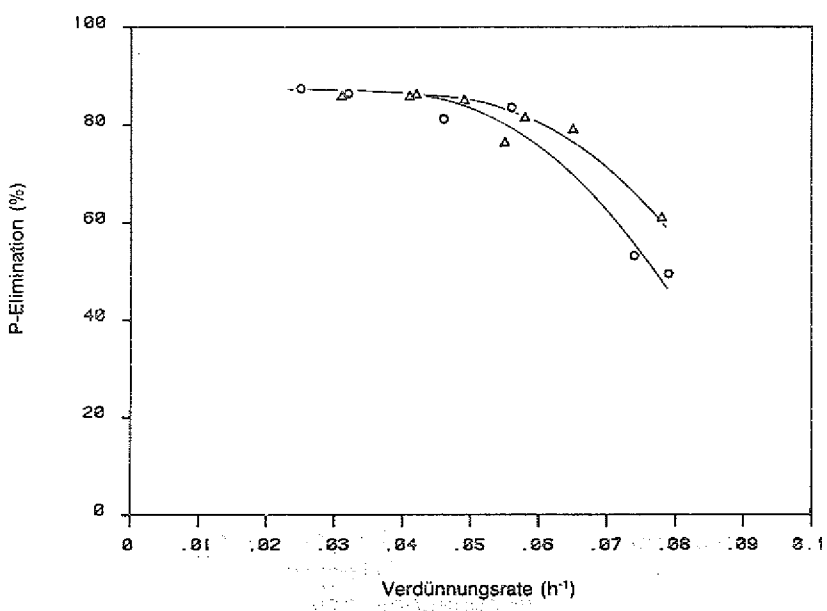


Abb. 34: P-Elimination durch Scenedesmus falcatus in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate im Chemostaten (Messungen im Steady State).

△—△ Versuchsreihe A

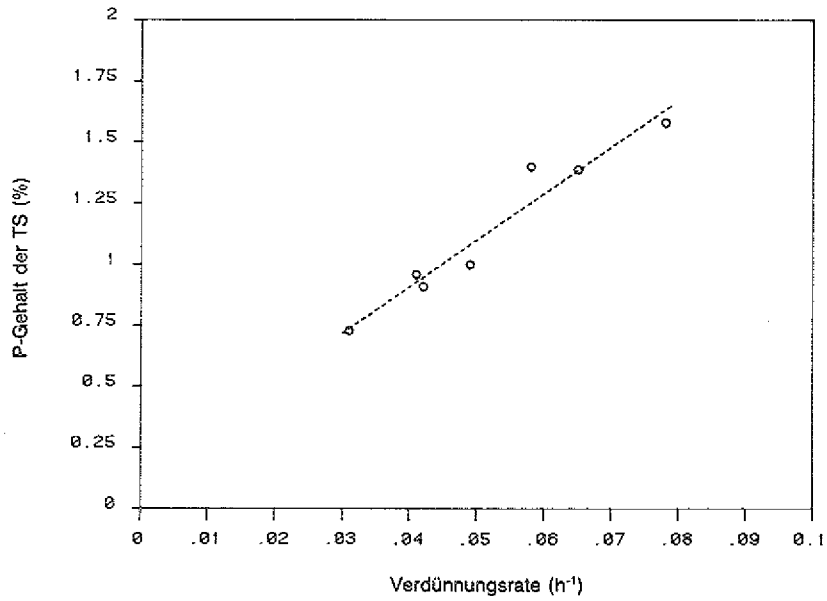
○—○ Versuchsreihe B

Obwohl bei den Kulturen der Versuchsreihe A die Biomassekonzentration bei Verdünnungsraten < 0,05 h^{-1} weiter logarithmisch anstieg, war Scenedesmus falcatus nicht in der Lage, das mit der Nährlösung eingegebene PO_4^{3-}-P über einen Grenzwert hinaus weiter aufzunehmen. Es verblieb ein Rest von 1,3 mg PO_4^{3-}-P l^{-1} im Medium.

Abb. 35, 36 zeigen, daß der prozentuale P-Gehalt der Biomasse in beiden Versuchsreihen mit der Verdünnungsrate anstieg. Die höchsten Werte bei den maximal erreichbaren Wachstumsraten im Chemostaten lagen bei den Kulturen der Versuchsreihe A bei 1,6 %, bei denen der Versuchsreihe B bei 2,1 %. Bei den Kulturen der Versuchsreihe B blieb der prozentuale P-Gehalt der Biomasse bei Verdünnungsraten < 0,05 h^{-1} mit 1,3 % in etwa gleich, da die Biomassekonzentration nicht weiter anstieg.

Bei Versuchsreihe A nahm hingegen der prozentuale P-Gehalt der Biomasse weiter ab und erreichte bei einer Verdünnungsrate von 0,031 h^{-1} einen Wert von 0,7 %. Bei Verdünnungsraten < 0,05 h^{-1} mußte der prozentuale P-Gehalt der Biomasse weiter abnehmen, da trotz steigender Biomassekonzentration die P-Elimination gleichblieb. Der von Paelinck (1978) angegebene P-Mindestgehalt von 0,8 % für Scenedesmus acutus wurde hier unterschritten. Es konnte aber nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.1.1.2.), daß die Algen trotz des niedrigen P-Gehaltes lichtlimitiert waren.

Es blieb ungeklärt, warum die Algen die im Medium verbleibende Menge von 1,3 mg P l^{-1} nicht verwerten.



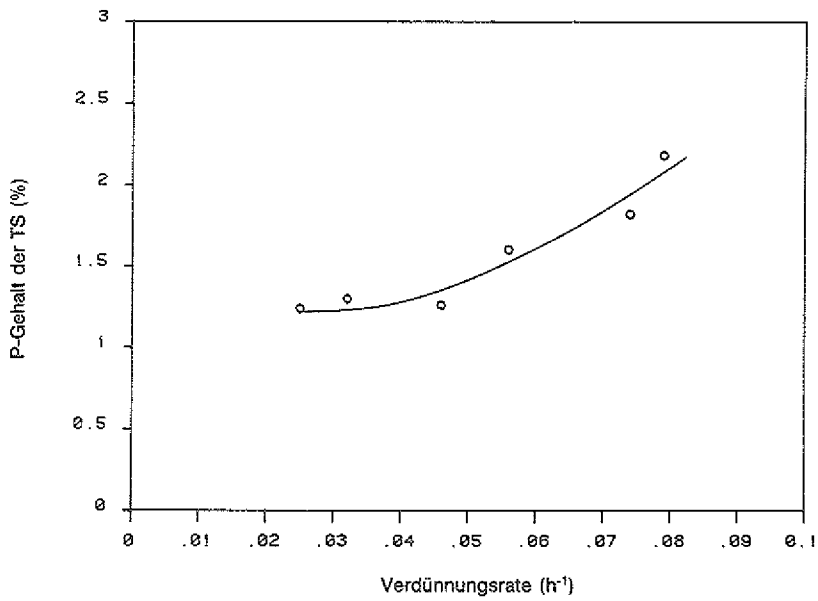


Abb. 35, 36: P-Gehalt der Trockenmasse von Scenedesmus falcatus in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate im Chemostaten (Messungen im Steady State)

Abb. 35: Versuchsreihe A
Abb. 36: Versuchsreihe B

4.2.2. Wachstum von Pseudomonas aeruginosa bei verschiedenen Verdünnungsraten

Diese Versuche sollen Aufschluß geben über die verschiedenen Wachstumsparameter von Pseudomonas aeruginosa.

Die Bakterien verhielten sich in beiden Kultursystemen völlig gleich. Pseudomonas aeruginosa wurde in belüfteten 300 ml Fermentern unter ansonsten gleichen Bedingungen wie die Algen kultiviert. Die Verdünnungsrate wurde wieder von niedrigeren zu höheren Werten systematisch geändert.

4.2.2.1. Biomasse- und Acetatkonzentration

Die Biomassekonzentration von Pseudomonas aeruginosa nahm mit zunehmenden Verdünnungsraten zu, erreichte bei einer Verdünnungsrate von 0,26 h^{-1} ein Maximum von 153 mg C l^{-1} (Abb. 37) und verringerte sich dann auf 52 mg C l^{-1} bei einer Verdünnungsrate von 0,451 h^{-1}. Bei einer Verdünnungsrate von 0,48 h^{-1} stellte sich kein Steady State mehr ein, d.h. die Bakterien wurden ausgespült.

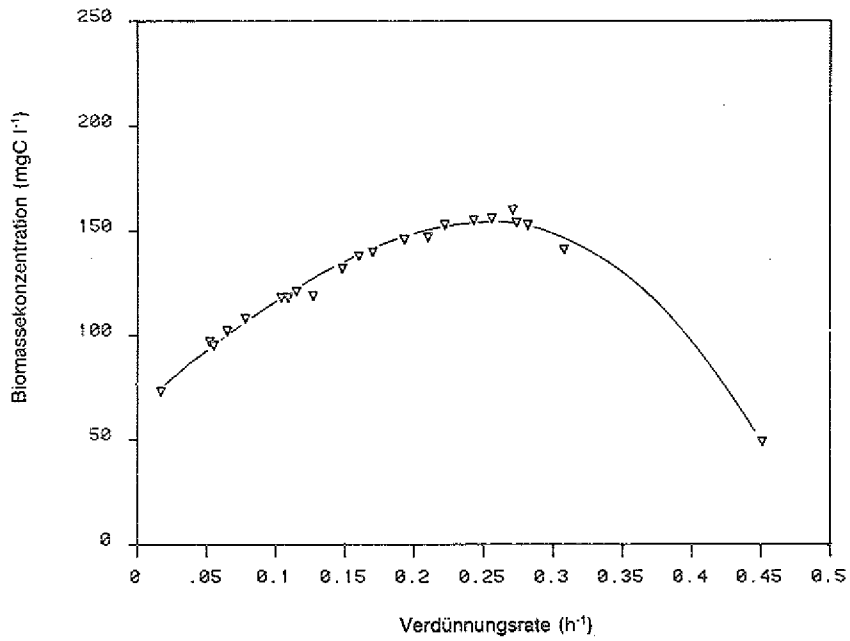


Abb. 37: Biomassekonzentration von Pseudomonas aeruginosa als Funktion der Verdünnungsrate im Chemostaten (Messungen im Steady State).

Bei Verdünnungsraten < 0,26 h^{-1} nahmen die Bakterien alles ihnen angebotene Acetat auf, d.h. es war in den Kulturen kein Acetat mehr nachweisbar. Ab Verdünnungsraten > 0,26 h^{-1} nahm die im Fermenter nachweisbare Acetatkonzentration mit steigenden Verdünnungsraten zu und erreichte bei D = 0,451 h^{-1} eine Konzentration von 301 mg C $^{-1}$ (Acetatkonzentration in der Nährlösung 432 mg C l^{-1}).

Die Verringerung der Biomassekonzentration bzw. die Erhöhung der im Fermenter verbleibenden Acetatkonzentration bei weiter steigenden Verdünnungsraten (D > 0,27 h^{-1}) erfolgte nicht so schnell, wie es nach der Theorie von Herbert (1956) zu erwarten wäre.

Bei einer Verdünnungsrate von D = 0,451 h^{-1} bildeten die Bakterien Zellaggregate, die mit bloßem Auge zu erkennen waren. Dieser Aggregatzustand war reproduzierbar. Setzte man die Verdünnungsrate herab (D = 0.26 h^{-1}), waren nach drei Aufenthaltszeiten keine Aggregate mehr beobachtbar. Die Bakterien lagen wieder als Einzelzellen vor. Eine Änderung wachstumsrelevanter Stoffwechselvorgänge könnte somit den Kurvenver-

lauf zwischen D = 0,308 h^{-1} und D = 0,451 h^{-1} erklären, der aber mangels anderer Steady States in diesem Bereich extrapoliert ist.

4.2.2.1.1. Limitierung

Die Zusammensetzung der Nährlösung ließ vermuten, daß die Kulturen von Pseudomonas aeruginosa im Bereich der hier ausgewählten Verdünnungsraten bis kurz vor dem Auswaschpunkt C-limitiert waren (s. Abschnitt 5.2.). Dies wurde bei einer Verdünnungsrate von 0,065 h^{-1}, bei der die Bakterien das angebotene Acetat vollständig aufnahmen, überprüft, indem die Acetatkonzentration im Zulauf von 18 mmol l^{-1} auf 25 mmol l^{-1} erhöht wurde.

Tab. 5: Reaktion von Pseudomonas aeruginosa auf eine Erhöhung der Acetatkonzentration im Zulauf bei D = 0,065 h^{-1} im Steady State

Acetatkonzentration im Zulauf (mg C l^{-1})	432	600
Biomassekonzentration (mg C l^{-1})	103	141
Ertragskoeffizient	0,24	0,24

Der Ertragskoeffizient (s. Kapitel 4.2.2.1.2.) blieb auch bei einer höheren Acetatkonzentration gleich (Y = 0,24; s. Tab. 5). Pseudomonas aeruginosa wächst unter den bei dieser Versuchsreihe vorgegebenen Bedingungen C-limitiert.

4.2.2.1.2. Ertragskoeffizient

Der Ertragskoeffizient gibt den Grad der Ausnutzung des Substrats zur Bildung von Zellsubstanz an. C-limitierte Kulturen, die mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle aerob wachsen, sind nach Linton et al. (1978) auch gleichzeitig energielimitiert. Eine Änderung des Koppelungsgrades zwischen Respiration und Energiefestlegung in der Biomasse drückt sich sofort in einer Änderung des Ertragskoeffizienten aus (Linton et al., 1978).

Der Ertragskoeffizient wurde berechnet aus dem in die Biomasse eingebauten Kohlenstoff pro aus dem Acetat aufgenommenen Kohlenstoff. Er war somit dimensionslos.

Der Ertragskoeffizient wurde mit zunehmenden Verdünnungsraten größer. Er erreichte mit $\sim 0{,}4$ bei einer Verdünnungsrate von $D \sim 0{,}3\ h^{-1}$ seinen höchsten Wert (Abb. 38). Er blieb also nicht, wie nach der Theorie von Monod erwartet, über den eingestellten Verdünnungsratenbereich bis kurz vor dem Auswaschpunkt konstant. Der mit abnehmenden Verdünnungsraten kleiner werdende Ertragskoeffizient zeigte an, daß bei niedrigeren Verdünnungsraten der Anteil des veratmeten Kohlenstoffs größer wurde.

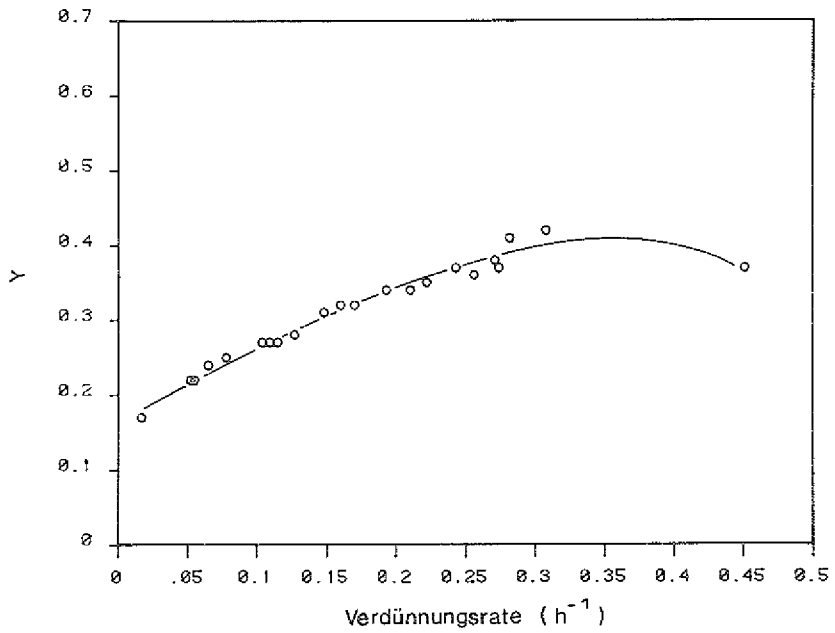


Abb. 38: Ertragskoeffizient von Pseudomonas aeruginosa für Acetat als Funktion der Verdünnungsrate im Chemostaten (Berechnung aus Steady State-Daten).
Y = gebildete Biomasse (mg C)/aufgenommenes Acetat (mg C)

Pirt (1965) entwickelte einen Ansatz zur Erstellung einer Energiebilanz:

$$1/Y = m/D + 1/Y_G \qquad (19)$$

Y_G = theoretischer maximaler Ertragskoeffizient
m = maintenance rate

Daraus folgt, daß in einem Graph 1/Y gegen 1/D der Schnittpunkt mit der 1/Y-Achse den Wert für $1/Y_G$ angibt; m ist die Steigung der resultierenden Gerade. Y_G ist dabei ein theoretischer Wert, der a) unabhängig von der Wachstumsrate und b) immer größer als der tatsächlich meßbare Ertragskoeffizient ist.
Mit zunehmenden Wachstumsraten nähert sich Y dem Wert von Y_G an, da der Anteil der "maintenance energy" an der insgesamt benötigten Energie immer geringer wird.
Aus der Definition von Y_G folgt, daß m bei allen Verdünnungsraten konstant

sein muß.

Aus Abb. 39 wird deutlich, daß sich die "maintenance rate" von Pseudomonas aeruginosa unter den von mir vorgegebenen Bedingungen mit der Wachstumsrate änderte. Es bestand keine einfache lineare Beziehung zwischen 1/Y und 1/D. Da m nicht konstant war, konnte kein einheitlicher Wert für Y_G berechnet werden.

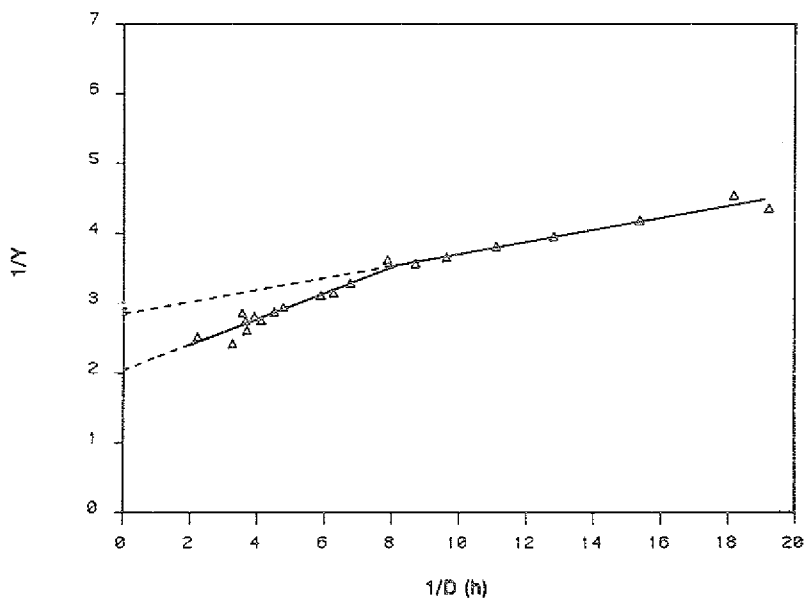


Abb. 39: Test der Gleichung 19 (Auftragung nach Pirt, 1965). Daten aus Abb. 38.

4.2.2.1.3. Berechnung der Biomassekonzentration

Die Beziehung zwischen 1/Y und 1/D konnte vereinfacht in zwei lineare Abschnitte aufgeteilt werden (Abb. 39).

Aus Gleichung 19 berechnete sich für die langsam wachsenden Bakterien ($\mu < 0{,}13\ h^{-1}$) ein Wert für m von $0{,}086\ h^{-1}$ und für Y_G von 0,35, für die schneller wachsenden ein Wert für m von $0{,}186\ h^{-1}$ und für Y_G von 0,49.

Durch diese vereinfachte Beschreibung des tatsächlichen Kurvenverlaufs war es möglich, ein von Pirt (1975) entwickeltes Modell zur Beschreibung der Biomassekonzentration einzusetzen. Dieses Modell galt, da es m und Y_G als konstant voraussetzte, mit den jeweils ermittelten Konstanten nur für den entsprechenden Verdünnungsratenbereich.

$$X = D * Y_G (S_R - S)/(D + mY_G) \qquad (20)$$

S_R = Acetatkonzentration im Zulauf
S = Acetatkonzentration im Fermenter
X = Biomassekonzentration im Fermenter

Die abschnittsweise berechneten Biomassekonzentrationen stimmten mit den gemessenen gut überein (Abb. 40). Der Korrelationskoeffizient r betrug 0,9886 (n = 21). Die Biomassekonzentration von Pseudomonas aeruginosa ließ sich somit, unter der oben gemachten Einschränkung, gut mit dem von Pirt entwickelten Modell beschreiben.

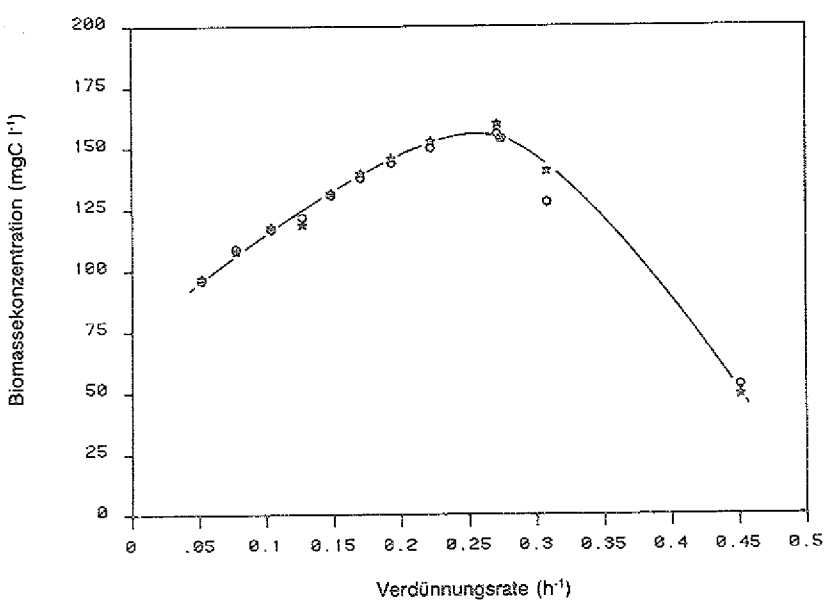


Abb. 40: Berechnung der Biomassekonzentration von Pseudomonas aeruginosa im Steady State nach Gleichung 20 bei verschiedenen Verdünnungsraten im Chemostaten.

○—○ berechnete Werte

✻—✻ gemessene Werte

4.2.2.1.4. Acetataufnahme

In diesem Versuch sollten die beiden Wachstumsparameter (K_s und μ_{max}) von Pseudomonas aeruginosa bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Parameter sollte es dann möglich sein, die im Fermenter verbleibende Acetatmenge, die im Chemostaten oft wegen ihrer geringen Konzentration analytisch nicht erfaßbar ist, nach einer Funktion von Pirt (1975) zu berechnen.

$$s = (D + mY_G) * K_s/(\mu_m - mY_G - D) \qquad (21)$$

s = Acetatkonzentration im Fermenter

K_s = Konstante für die Acetatkonzentration bei der die halbmaximale Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wird

μ_m = maximale Wachstumsgeschwindigkeit

Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Substratkonzentration konnte durch eine Monod-Kinetik beschrieben werden. Aus der Auftragung nach Lineweaver-Burk (Abb. 41) berechnete sich für die kontinuierlichen Kulturen ein μ_{max}-Wert von 0,294 h^{-1} und ein K_s-Wert von 0,059 mmol l^{-1}. Bei dieser Berechnung war der Steady State-Wert bei D = 0,451 h^{-1} nicht berücksichtigt, da hier die Bakterien Zellaggregate bildeten und damit wahrscheinlich ihr physiologisches Verhalten änderten. Trug man diesen Wert zusätzlich in den Graph ein, so lag er weit neben der berechneten Geraden. Der ermittelte K_s- und μ_{max}-Wert beschrieb also das Wachstum der Bakterien bei dieser Verdünnungsrate nicht.

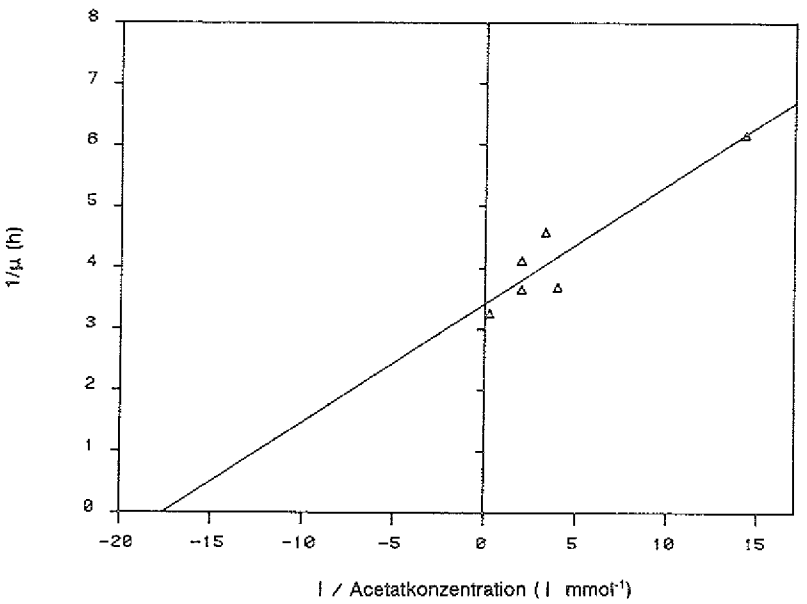


Abb. 41: Abhängigkeit der Wachstumsrate von Pseudomonas aeruginosa von der Acetatkonzentration im Chemostaten (Messungen im Steady (State). (n. Lineweaver-Burk)
r = 0,9340 n = 6

Zog man zur Darstellung der Wachstumskinetik nur die Steady State-Werte heran, deren Acetatkonzentration > 0,25 mmol l^{-1} war, so ergab sich aus dem Diagramm ein leicht erhöhter μ_{max}-Wert von 0,323 h^{-1} und ein mehr als verdoppelter K_s-Wert von 0,14 mmol l^{-1} (Abb. 42).

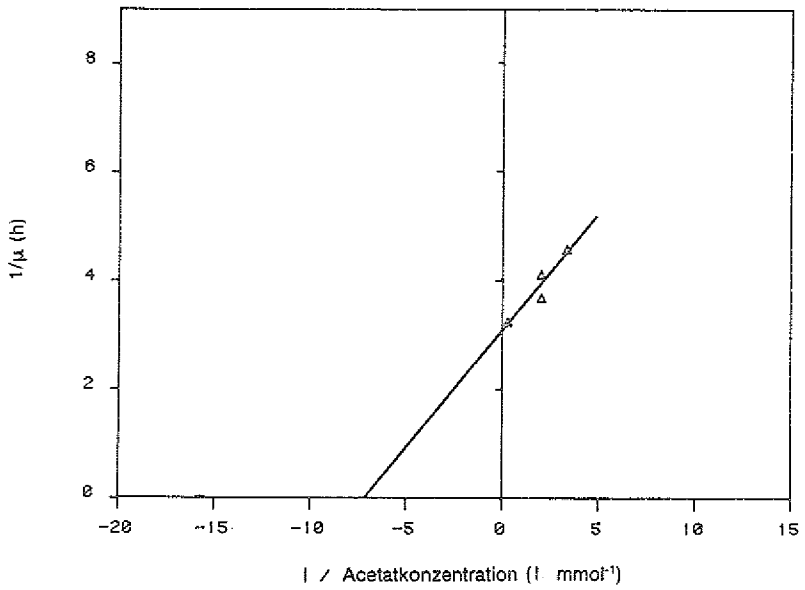


Abb. 42: Abhängigkeit der Wachstumsrate von Pseudomonas aeruginosa von der Acetatkonzentration im Chemostaten (Messungen der Acetatkonzentration im Steady State, bei Nichtberücksichtigung der Konzentrationen < 0,25 mmol l^{-1}) (n. Lineweaver-Burk)
r = 0,9464 n = 4

Da sich der pH-Wert der Kulturen mit der Verdünnungsrate änderte (Abb. 43), er nahm von höheren zu niedrigeren Werten mit steigender Verdünnungsrate ab, wurde untersucht, inwieweit er für die unterschiedlichen K_s- und μ_{max}-Werte verantwortlich war.

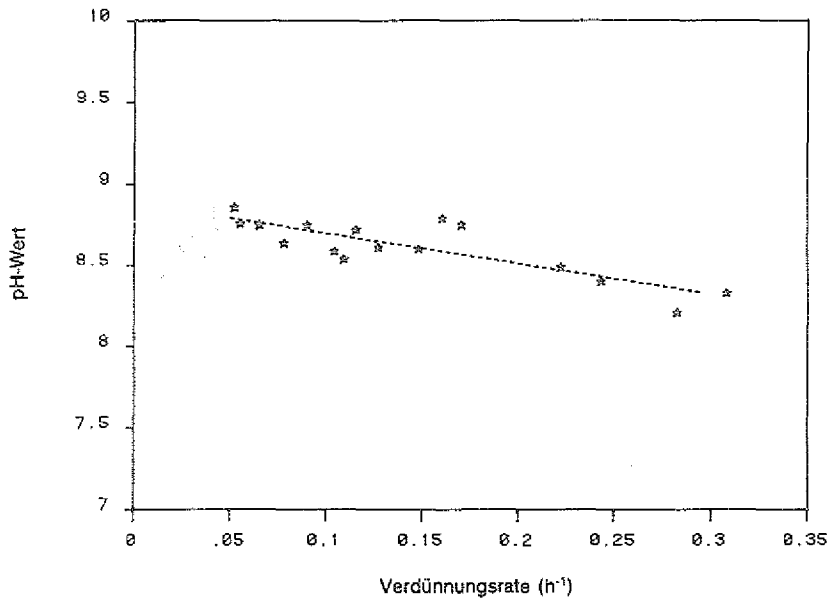
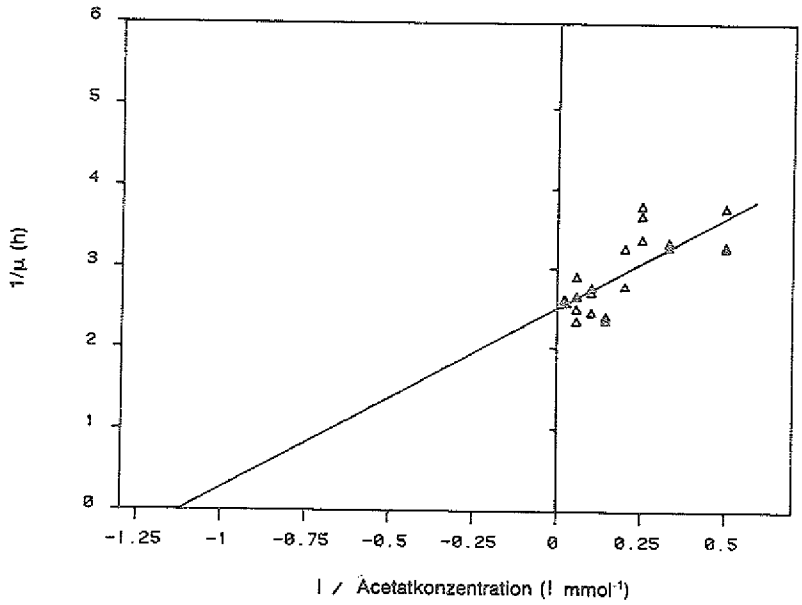


Abb. 43: pH-Werte von Kulturen von Pseudomonas aeruginosa im Steady State bei verschiedenen Verdünnungsraten im Chemostaten.

In Batch-Versuchen wurde der pH-Wert bei pH 7,5 ± 0,1 und pH 8,5 ± 0,1 konstant gehalten. Die Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Acetatkonzentration ist wieder nach Lineweaver-Burke dargestellt (Abb. 44, 45).



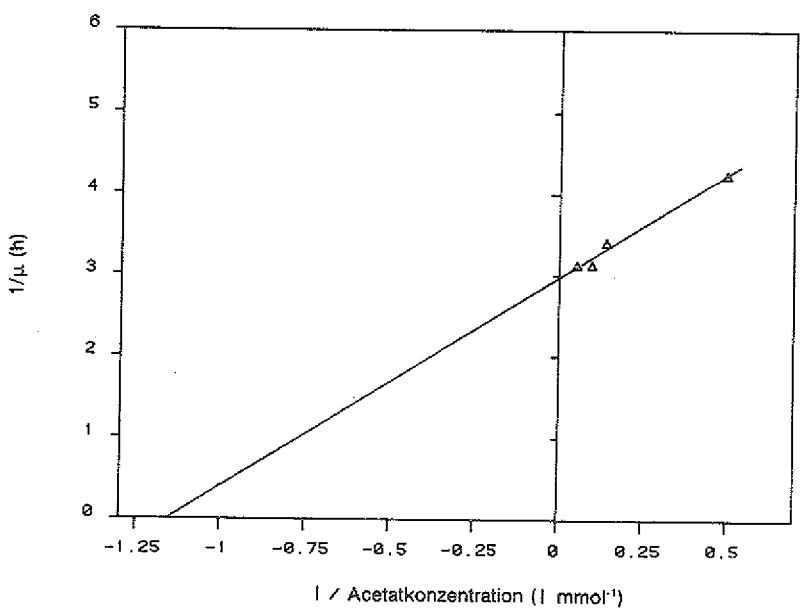


Abb. 44, 45: Abhängigkeit der Wachstumsrate von Pseudomonas aeruginosa von der Substratkonzentration in Batchkulturen bei konstantgehaltenen pH-Werten (n. Lineweaver-Burk)

Abb. 44: pH 7,5	r = 0,7453	n = 20
Abb. 45: pH 8,5	r = 0,9918	n = 4

Die ermittelten Halbsättigungskonstanten für Acetat waren bei beiden pH-Werten etwa gleich (0,87 bzw. 0,89 mmol l^{-1}), während die maximalen Wachstumsraten bei den bei pH 7,5 betriebenen Kulturen μ_{max} = 0,4 h^{-1} und bei den bei pH 8,5 betriebenen Kulturen μ_{max} = 0,338 h^{-1} betrugen. Eine Änderung des pH-Wertes zwischen pH 7,5 und pH 8,5 hatte also keinen Einfluß auf die Halbsättigungskonstanten; er beeinflußte aber sehr wohl die maximalen Wachstumsraten.

Die pH-Werte der zur Wachstumskinetik der kontinuierlichen Kulturen herangezogenen Steady State-Populationen lagen zwischen pH 8,6 und pH 8,3. Sie waren also nicht verantwortlich für die verschiedenen K_s-Werte, sondern allenfalls mitverantwortlich für die unterschiedlichen μ_{max}-Werte.

In den zur Ermittlung der beiden Parameter herangezogenen kontinuierlichen Kulturen betrugen die Substratkonzentrationen zwischen 0,07 und 3,9 mmol l^{-1}. Die Ausgangskonzentration der Batch-Kulturen lag zwischen 2 und 50 mmol l^{-1}. Geringere Acetatkonzentrationen konnten in den Batch-Versuchen nicht verwendet werden, da sonst die Wachstumsrate bei dem geringen Biomassezuwachs nicht zuverlässig bestimmt werden konnte.
Die Acetatkonzentrationen der Batch-Kulturen waren also 10 - 20fach höher als in den kontinuierlichen Kulturen.

Der K_s-Wert von Pseudomonas aeruginosa war somit von den gewählten Substratkonzentrationen abhängig. Je niedriger die Substratkonzentrationen waren, desto niedriger war der K_s-Wert.

In kontinuierlicher Kultur waren der K_s- und μ_{max}-Wert für <u>Pseudomonas aeruginosa</u> unter den vorgegebenen Bedingungen nicht konstant. Alle Formeln zur Bestimmung der Substratkonzentration im Fermenter, in die die K_s- und μ_{max}-Werte als Konstanten eingehen, eigneten sich nicht zur Beschreibung des Systems.

4.2.2.1.5. Kohlenstoffbilanzen

Bei zwei ausgewählten Verdünnungsraten wurden Kohlenstoffbilanzen erstellt. Da sich der Ertragskoeffizient mit der Verdünnungsrate änderte, wurden Bilanzen von langsam ($D = 0{,}055\ h^{-1}$) und schneller wachsenden Bakterienkulturen ($D = 0{,}109\ h^{-1}$) aufgenommen. Die Verdünnungsrate von $0{,}055\ h^{-1}$ wurde im Hinblick auf Algen-Bakterien-Mischkulturen ausgesucht, da die Algenbiomasseproduktion bei dieser Aufenthaltszeit am größten war (siehe Kapitel 4.2.1.1.4.).

Die Kulturen wurden mit einer Rate von $12{,}5\ l\ h^{-1}$ mit Luft begast. Die zufließende Nährlösung war CO_2-frei. Die von den Bakterien abgegebene Menge an CO_2 wurde berechnet aus der Differenz zwischen dem pro Aufenthaltszeit abgegebenen und in das System mit der Zuluft eingegebenen (s. Abschnitt 2.10) zuzüglich des in der Flüssigphase gelösten CO_2.

Tab. 6: C-Bilanzen von Steady State-Kulturen bei zwei verschiedenen Verdünnungsraten. (Die Nährlösung enthielt als Acetat $432\ mg\ C\ l^{-1}$)

		Verdünnungsraten (h^{-1})	
		0,055	0,109
Bakterienbiomasse	($mg\ C\ l^{-1}$)	95	116
DOC	($mg\ C\ l^{-1}$)	23	<1
CO_2-Produktion	($mg\ C\ \tau^{-1}\ l^{-1}$)	302	286
(davon als IC im Medium)	($mg\ C\ l^{-1}$)	202	180
$\sum$	($mg\ C\ l^{-1}$)	420	402
Acetataufnahme	($mg\ C\ l^{-1}$)	432	432

Von dem aufgenommenen Kohlenstoff des Acetats wurde bei der Bilanzierung bei den langsam wachsenden Kulturen 97 % und bei den schneller wachsenden 93 % wiedergefunden.

Aus Tab. 6 ist abzulesen, daß die Bakterien bei diesen Verdünnungsraten alles ihnen angebotene Acetat aufnahmen. Der gemessene DOC (23 mg C l^{-1}) bei D = 0,055 h^{-1} mußte demnach aus von den Bakterien produzierten Substanzen bestehen.

4.2.2.2. Zellkonzentration

In den Reinkulturen lagen die Bakterien in der Regel als Einzelzellen vor. Bei niedrigen Verdünnungsraten ($D < 0,1\ h^{-1}$) bildete ein geringer Prozentsatz der Bakterien (nach Beobachtungen unter dem Mikroskop < 10 %) Ketten aus, die aus höchstens 5 Einzelzellen bestanden. Da die Zellkonzentration mit Hilfe des Ausplattungsverfahrens bestimmt wurde, war die ermittelte Zellkonzentration der Kulturen bei niedrigen Verdünnungsraten um bis zu 10 % zu niedrig.
Dies beeinträchtigte aber nicht den Kurvenverlauf, wie er in Abb. 46 dargestellt ist.

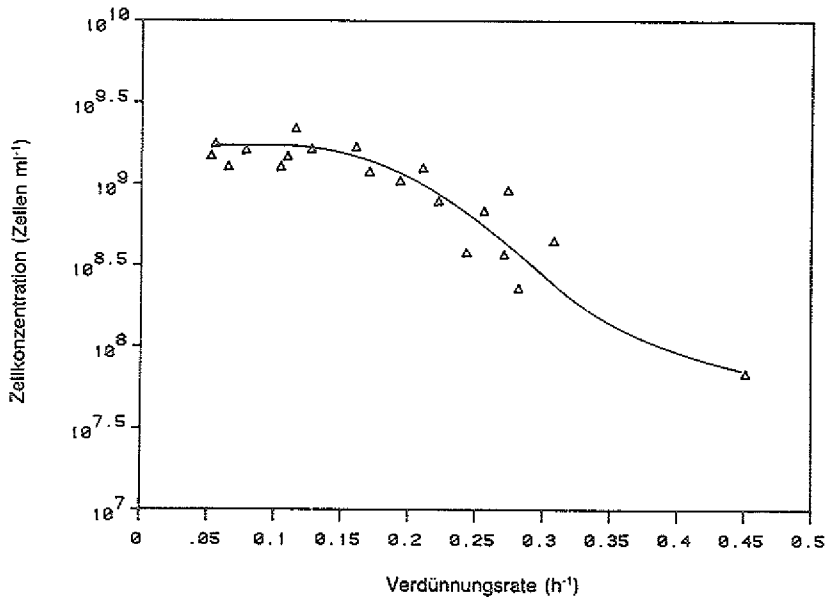


Abb. 46: Beziehung zwischen der Zellkonzentration von Pseudomonas aeruginosa im Steady State und der Verdünnungsrate im Chemostaten.

Die Zellkonzentration lag bei niedrigen Verdünnungsraten ($D < 0{,}17\ h^{-1}$) auf einem einheitlichen Niveau von $\sim 1{,}5 * 10^9$ Zellen ml^{-1}. Mit zunehmenden Verdünnungsraten bis $D = 0{,}308\ h^{-1}$ nahm sie stark ab. Danach wurde der Abfall der Kurve flacher. Die gemessene Zellkonzentration bei $D = 0{,}451\ h^{-1}$ betrug $0{,}7 * 10^9$ Zellen ml^{-1}. Der für die Biomassekonzentration beschriebene Effekt (verlangsamtes Ausspülen: Kapitel 4.2.2.1.) zeigte sich also auch bei der Bestimmung der Zellkonzentration. Möglicherweise war die bestimmte Zellkonzentration sogar noch zu niedrig, da eigentlich erwartet wurde, daß pro Zellaggregat nur eine Kolonie gebildet würde. Offensichtlich zerfiel aber dieses Aggregat beim Ausplatten weitgehend in die Einzelzellen. Die Zellkonzentration bei $D = 0{,}451\ h^{-1}$ und damit der exakte Kurvenverlauf ab $D > 0{,}308\ h^{-1}$ konnte aus diesen Gründen nicht abgesichert werden.

4.2.2.2.1. Zellmasse

Da die Biomassekonzentration mit zunehmenden Verdünnungsraten bis zu einem Maximum bei D $\sim$ 0,26 h^{-1} ansteigt (Abb. 37), die Zellkonzentration aber bei D < 0,16 h^{-1} gleich bleibt bzw. bei höheren Verdünnungsraten abnimmt (Abb. 46), muß die Trockenmasse pro Einzelzelle in diesem Bereich (D < 0,26 h^{-1}) zunehmen. Da als Biomasseparameter der Kohlenstoffgehalt der Bakterien diente, konnte die Masse pro Zelle nur unter der Annahme berechnet werden, daß der mittlere Kohlenstoffgehalt der Bakterien 48 % beträgt (Linton et al. 1978) und sich dieser bei C-Limitierung kaum mit der Wachstumsrate verändert (Herbert 1976). Die Zellmasse der Bakterien bei D = 0,451 h^{-1} wurde nicht berechnet (unzuverlässige Zellzahlbestimmung).

Die Masse pro Zelle stieg von 1,3 * 10^{-13} g bei einer Verdünnungsrate von 0,052 h^{-1} auf 6,5 * 10^{-13} g bei einer Verdünnungsrate von 0,308 h^{-1} an (Abb. 47).

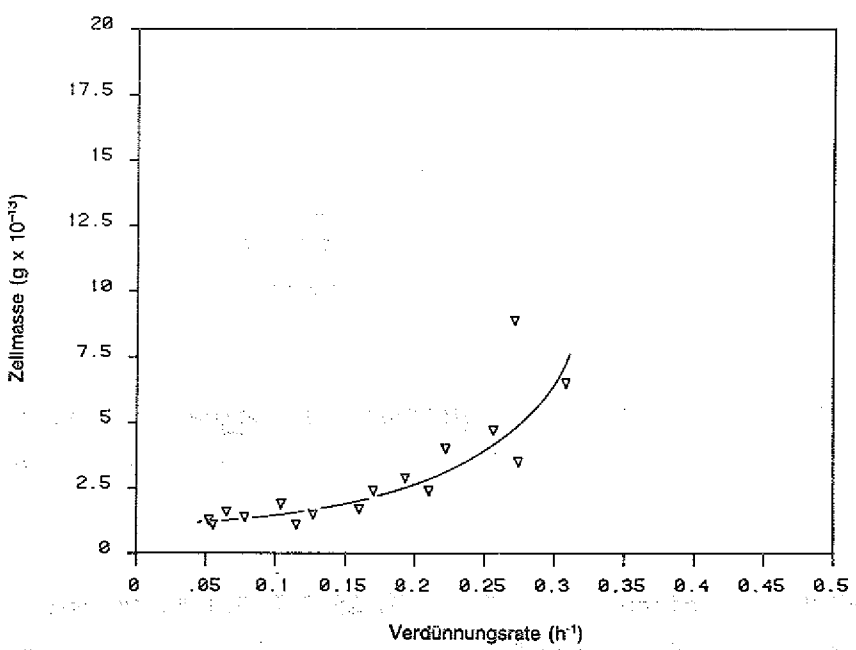


Abb. 47: Beziehung zwischen der durchschnittlichen Trockenmasse einer Zelle von Pseudomonas aeruginosa im Steady State und der Verdünnungsrate im Chemostaten.

4.2.2.3. N-Elimination

Eine N-Bilanz für das System konnte nicht durchgeführt werden, da der N-Gehalt der Biomasse nicht gemessen werden konnte. Deshalb wurde nur die N-Elimination für das Gesamtsystem anhand der Differenz zwischen der eingegebenen und der im Medium im Steady State verbliebenen Stickstoffmenge ermittelt.

Die N-Eliminierung durch Pseudomonas aeruginosa war in dem hier gewählten Medium unabhängig von der eingestellten Verdünnungsrate (Abb. 48).

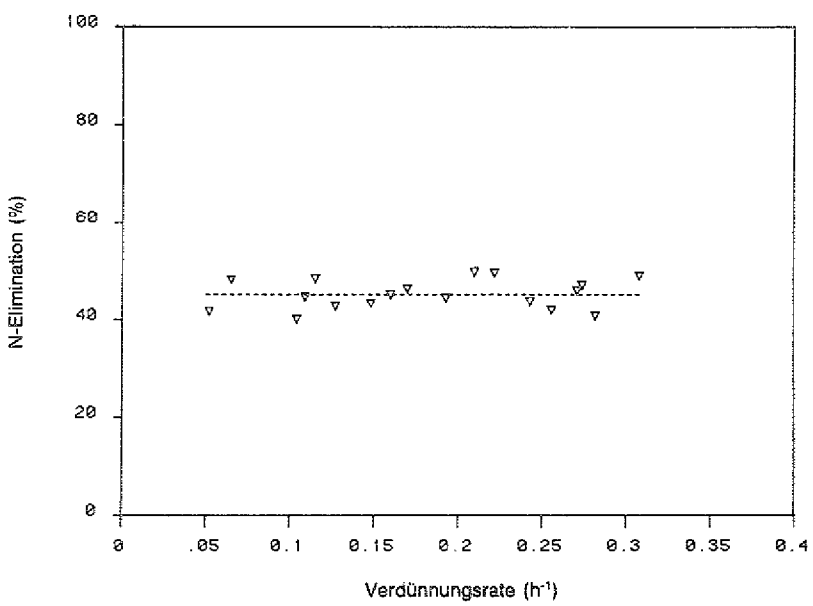


Abb. 48: N-Elimination durch Pseudomonas aeruginosa bei verschiedenen Verdünnungsraten im Chemostaten (Messungen im Steady State).

Sie schwankte um einen Mittelwert von 45,2 ± 3,1 %. Obwohl die Biomassekonzentration der Bakterien von ~ 100 mg C l^{-1} mit steigenden Verdünnungsraten auf ~ 150 mg C l^{-1} anstieg, blieb die N-Elimination die gleiche. Da der prozentuale N-Anteil der Biomasse von C-limitierten Kulturen bei unterschiedlichen Verdünnungsraten relativ konstant bleibt oder leicht mit zunehmender Verdünnungsrate ansteigen kann (Herbert 1976), sollte die N-Eliminierung eigentlich mit der Biomassekonzentration ansteigen.

Wie in Abschnitt 4.2.1.4. beschrieben, wird die Eliminierungsleistung des Gesamtsystems durch den pH-Wert mitbestimmt. Dieser stellt sich durch die Aktivität der Mikroorganismen ein und änderte sich im gegebenen System mit der Wachstumsrate der Bakterien. Bei langen Aufenthaltszeiten und damit niedrigen Wachstumsraten betrug er pH 9,0 ($D = 0{,}109\ h^{-1}$) und fiel mit zunehmenden Verdünnungsraten kontinuierlich auf pH 8,0 ($D = 0{,}451\ h^{-1}$) ab (s. Abb. 43). Unter der Annahme, daß die Freisetzung von organischen N-Verbindungen durch die Organismen keine Bedeutung für eine N-Bilanz des Systems hatte (DOC = 0 - 30 ppm), waren es zwei gegenläufige Prozesse, die die N-Eliminierungsleistung des Systems bestimmten. Während die Biomassekonzentration und damit auch die N-Inkorporation mit steigenden Verdünnungsraten anstieg, fiel der pH-Wert ab. Damit nahm die durch die Belüftung ausgetriebene Menge an NH_3 ab. (s. auch Abschnitt 4.2.1.4.).

In diesem System überlappten sich beide Prozesse dergestalt, daß die gemessene N-Elimination über die verschiedenen Aufenthaltszeiten konstant blieb.

Pseudomonas aeruginosa war also im Rahmen der eingestellten Bedingungen nicht in der Lage, den Stickstoff vollständig aus diesem System zu entfernen.

4.2.2.4. P-Elimination

Die P-Elimination des Systems nahm mit steigenden Verdünnungsraten zu (Abb. 49). In einem Bereich zwischen $D = 0{,}16\ h^{-1}$ und $0{,}271\ h^{-1}$ erreichte das System eine Elimination von > 99 %. Sie war gegeben bei einer Biomassekonzentration > 135 mg C l^{-1}. Bei $D > 0{,}274\ h^{-1}$ nahm die Biomassekonzentration und damit die P-Elimination wieder ab.

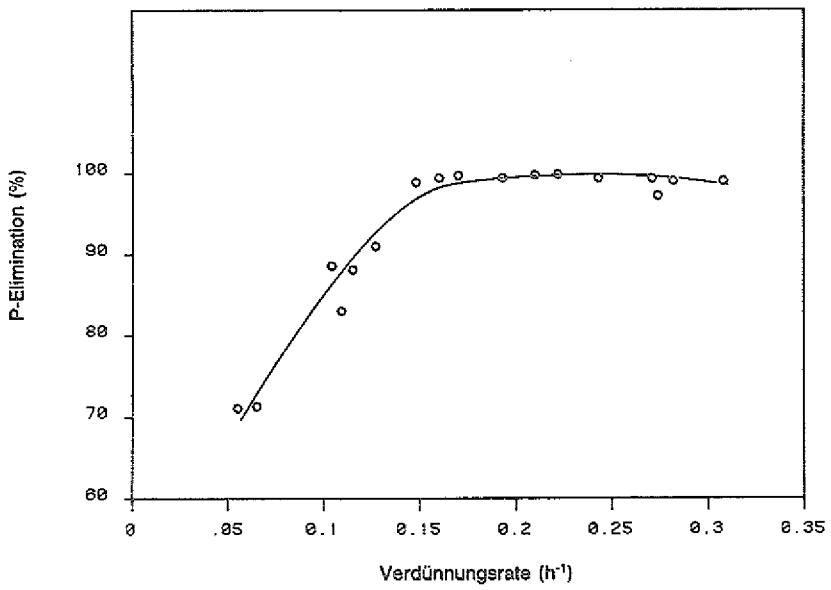


Abb. 49: P-Elimination durch Pseudomonas aeruginosa bei verschiedenen Verdünnungsraten im Chemostaten (Messungen im Steady State).

Unter der Voraussetzung, daß unter den gegebenen aeroben Verhältnissen die Konzentration an mit der verwendeten Methode (Abschnitt 2.13.3.) nicht bestimmbaren gelösten extrazellulären organischen P-Verbindungen gering war, konnte der P-Gehalt der Biomasse bestimmt werden.

Solange die Elimination < 99 % war, blieb der P-Gehalt der Bakterien (~3,7 %) konstant (Abb. 50). Bei einer Elimination von > 99 % ($D > 0{,}16\ h^{-1}$) nahm der P-Gehalt der Bakterien bei steigenden Biomassekonzentrationen auf ~3,2 % ab. Ab $D > 0{,}274\ h^{-1}$ nahm der P-Gehalt der Organismen wieder zu, da die Biomassekonzentration und damit die P-Elimination abnahm.

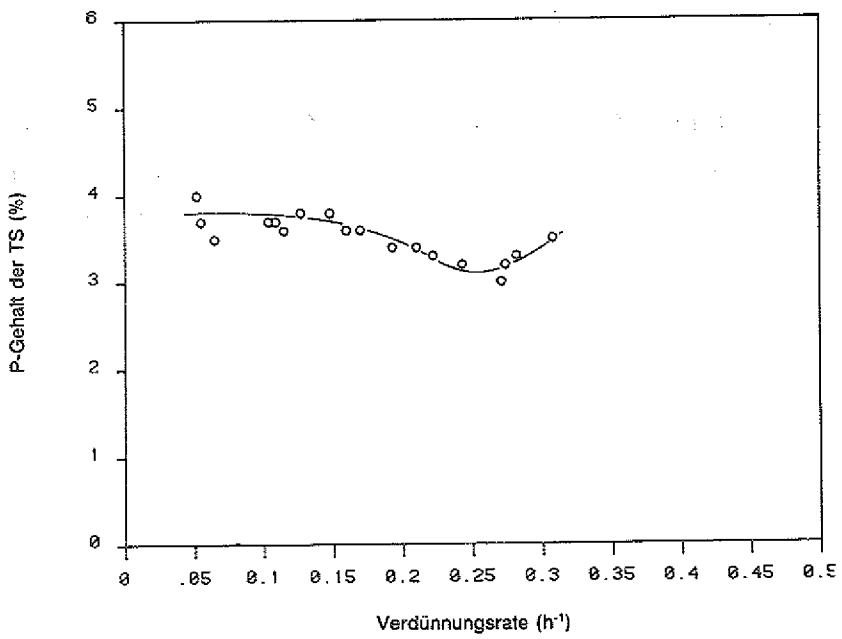


Abb. 50: P-Gehalt der Trockenmasse von Pseudomonas aeruginosa bei verschiedenen Verdünnungsraten im Chemostaten (Berechnung aus Steady State-Werten).

Durch das Einstellen einer geeigneten Verdünnungsrate ($D = 0{,}16\ h^{-1} - 0{,}27\ h^{-1}$) läßt sich das System auf eine optimale P-Elimination hin ausrichten.

4.2.3. Mischkulturen von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa im Chemostat

Neben den von Ludwig (1951) und Oswald (1962) postulierten synergistischen Interaktionen zwischen Algen und Bakterien (O_2- und CO_2-Produktion) sind aus der Literatur eine Fülle anderer Interaktionen bekannt geworden. Algen können das Bakterienwachstum sowohl fördern (Bell et al. 1974) als auch hemmen (Accorinti 1964, Chrost 1972, Dor et al. 1976, Dor 1978). Ebenso können aber auch Bakterien das Algenwachstum fördern (Lange 1971, Schiefer et al. 1982) oder hemmen (Allen et al. 1977, Berger et al. 1979).

In diesem Kapitel wurden folgende Fragenkomplexe abgehandelt:

a) Unter welchen Bedingungen ist die Koexistenz beider Organismen in Dauerlicht und bei Belüftung stabil?
b) Welche Interaktionen finden in diesem System statt?
c) Reicht die O_2- bzw. CO_2-Produktion der Organismen aus, um die vorgegebenen Laststoffe aus dem Medium zu eliminieren?

4.2.3.1. Bestimmung der Verdünnungsrate für begaste Algen-Bakterien-Mischkulturen

Stabile Mischpopulationen können sich nur in einem begrenzten Bereich von Verdünnungsraten einstellen, da die maximalen Wachstumsraten von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa in dem hier verwendeten begasten System weit auseinander lagen. Die maximale Wachstumsrate für Scenedesmus falcatus betrug 0,079 h^{-1}. Pseudomonas aeruginosa dagegen erreichte noch bei D = 0,451 h^{-1} Steady States. Obwohl die wirkliche maximale Wachstumsrate vom Pseudomonas aeruginosa nicht exakt zu bestimmen war (Abschnitt 4.2.2.1.4.) war sie also etwa 5 - 6mal größer als die von Scenedesmus falcatus.

Anhand der Biomasseproduktion beider Organismen aus Reinkulturen sind diese Verhältnisse einmal graphisch dargestellt (Abb. 51).

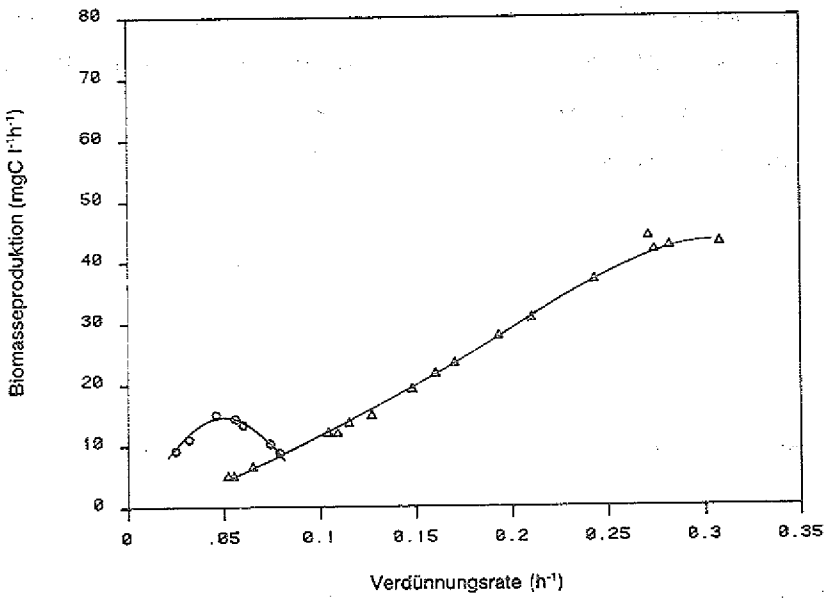


Abb. 51: Biomasseproduktion von Reinkulturen von Pseudomonas aeruginosa und Scenedesmus falcatus bei verschiedenen Verdünnungsraten im Chemostaten (Berechnungen aus Steady State-Kulturen).

△—△ Pseudomonas aeruginosa

○—○ Scenedesmus falcatus

Würden sich beide Organismen in Mischkultur und Reinkultur gleich verhalten, d.h. gäbe es keine Interaktionen in begasten Mischkulturen, so wären in dem von mir eingesetzten Experimentalsystem nur bei Verdünnungsraten $< 0{,}079\ h^{-1}$ stabile Mischpopulationen existent. Aufgrund der vielen aus der Literatur bekannten Interaktionen zwischen Algen und Bakterien können gegenseitige Beeinflussungen aber nicht von vornherein ausgeschlossen werden.

Damit die Algen nicht schon bei einer geringen Hemmung durch bakterielle Ausscheidungsprodukte aus dem System ausgespült werden, erschien es ratsam, die Mischkultur mit einer Verdünnungsrate, die etwas niedriger als $D = 0{,}079\ h^{-1}$ war, zu betreiben.

Die an das System hinsichtlich einer kurzen Aufenthaltszeit und hoher Produktivität gestellten Anforderungen schienen am besten bei einer Verdünnungsrate von $D \sim 0{,}055\ h^{-1}$ realisiert werden zu können. Bei dieser Aufenthaltszeit war die Biomasseproduktion der Algen am höchsten. Der Ertragskoeffizient der Bakterien für Acetat war dagegen sehr niedrig. Die Bakterien produzierten also entsprechend viel CO_2. Dies ist eine der Voraussetzungen damit das System nach der von Oswald und Mitarbeitern postulierten Hypothese funktioniert.

4.2.3.2. Begaste Mischkulturen bei einer eingestellten Verdünnungsrate von $0{,}056\ h^{-1}$

Als Startkultur diente eine im Steady State befindliche axenische Algenkultur ($D = 0{,}056\ h^{-1}$), die mit 50 ml einer Bakteriensuspension angeimpft wurde. Die Kultur wurde mit einem Luft/1,1 % CO_2-Gemisch begast. Das Bakterieninokulum entstammte einer kontinuierlichen Reinkultur ($E_{570} = 0{,}750$). Zum Startpunkt der Mischkultur betrug das Verhältnis Bakterienzellen : Algenzellen 140 : 1, ($6{,}4 * 10^8 : 0{,}46 * 10^7$ Zellen ml^{-1}).

In Abb. 52 sind die Einschwingvorgänge anhand der Algen- und Bakterienzellkonzentration, der optischen Dichte und der CO_2-Differenz zwischen Zu- und Abluft dargestellt. Zur Zeit des Animpfens betrug die Acetatkonzentration im Medium 3,4 mmol l^{-1}.

Schon einen Tag später war kein Acetat mehr nachweisbar. Nach 22 Tagen erreichte das System ein Steady State. Die Mischkultur brauchte also erheblich länger als die Reinkultur beider Organismen (statt 3 - 5 etwa 29 Aufenthaltszeiten) um ins Fließgleichgewicht zu gelangen.

Im Steady State betrug die Bakterienzellzahl pro ml $1{,}5 * 10^9 \pm 11$ % und die Algenzellzahl pro ml $0{,}43 * 10^7 \pm 6$ %. Die Zellkonzentration der Algen in der Mischkultur war damit praktisch identisch mit der in der axenischen Startkultur. Der Unterschied von 5 % lag im Fehlerbereich der Zellzählung.

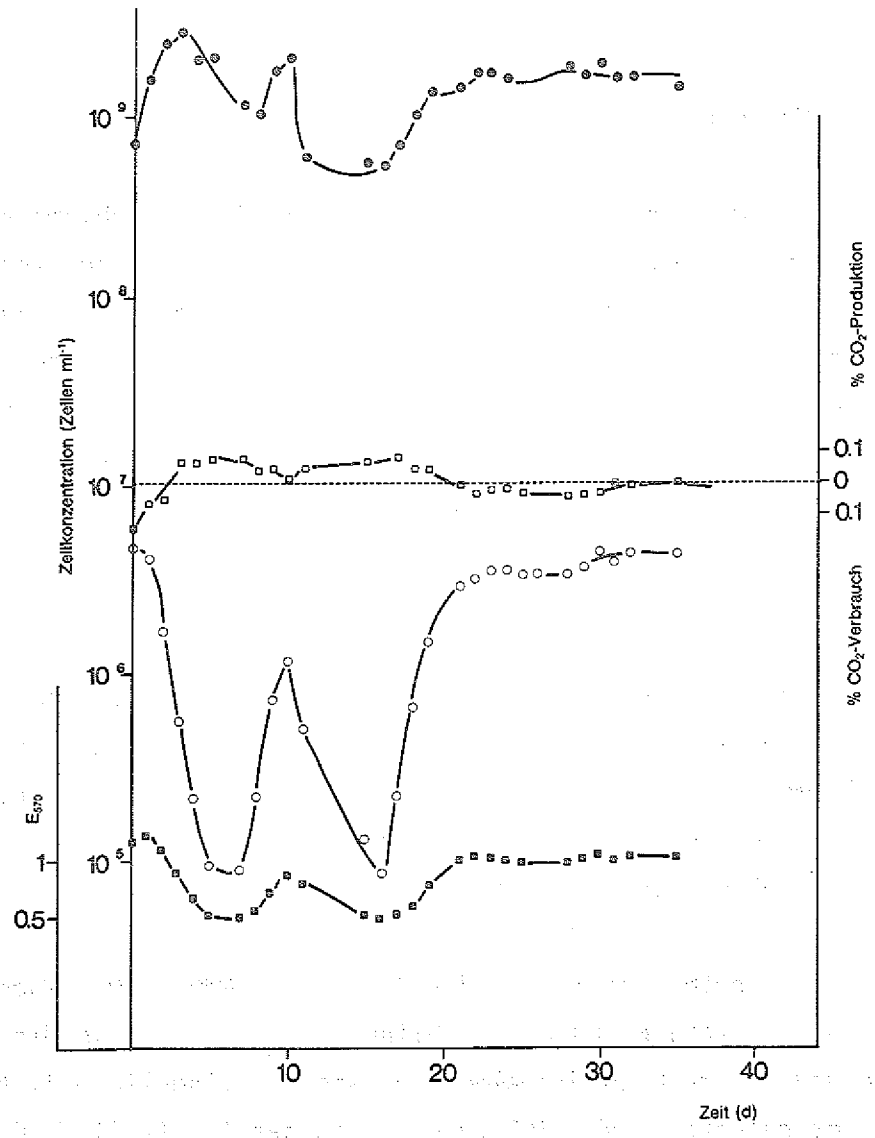


Abb. 52: Wachstum einer begasten Mischkultur von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa im Chemostaten bei einer Verdünnungsrate von D = 0,056 h^{-1}.

Begasung: 1 % (v/v) CO_2 in Luft (12,5 l h^{-1})

●—● Zellkonzentration von Pseudomonas aeruginosa

○—○ Zellkonzentration von Scenedesmus falcatus

■—■ Extinktion der Mischkultur (Wellenlänge 570 nm)

□—□ CO_2-Entwicklung (Differenz zwischen Zu- und Abluft als % CO_2 in Luft)

Im Steady State war eine leichte Erhöhung der CO_2-Konzentration um 0,01 % (v/v) im Abgas feststellbar. Dies entsprach einer CO_2-Produktion der Organismen von 162 mg C l^{-1} pro Aufenthaltszeit.

4.2.3.2.1. Kohlenstoffbilanz

Eine ausreichende Trennung der Bakterien- von der Algenbiomasse wurde durch einen einfachen Zentrifugationsschritt erzielt. Nach Zentrifugation (5 min, 5500 UpM) befanden sich im Überstand ausschließlich Bakterien. Eine mikroskopische Kontrolle der abzentrifugierten Biomasse zeigte allerdings eine geringe Verunreinigung der Algenfraktion mit Bakterien (nach Schätzungen < 1 % der Gesamtbakterienzellzahl). Es gab keine Biomasseverluste beim Trennvorgang, da die Summe der Biomasse aus beiden Fraktionen identisch war mit der Gesamtbiomasse, die zusätzlich als Kontrolle mitbestimmt wurde.

Die einzelnen Werte der C-Bilanz sind Mittelwerte von 2 Proben, die zum gleichen Zeitpunkt genommen wurden. Aufgrund der benötigten Volumina (~120 ml) war es nicht möglich, Proben zu verschiedenen Zeiten zu nehmen, da nach jeder Probenentnahme das Steady State gestört wurde. Dies gilt für alle untersuchten Mischkulturen.

Von dem pro Aufenthaltszeit mit der CO_2-freien Nährlösung zugegebenem Acetat-Kohlenstoff (691 mg C) gingen bilanzmäßig 176 mg C in die bakterielle Biomasse und 173 mg C in die Algenbiomasse ein (Tabelle 7). Als CO_2 fand sich in der gelösten Phase 248 mg C und in der Abluft 11 mg C wieder. Als DOC (kein Acetat) waren im Medium 40 mg C gelöst. Es wurden somit in der Bilanz vom eingesetzten Kohlenstoff 93,8 % analytisch erfaßt.

Die Kohlenstoffverluste waren wahrscheinlich bedingt durch die Summierung von Meßungenauigkeiten bei der Bestimmung der vielen Parameter. Ein Ausblasen von meßbaren Mengen an Acetat konnte bei einem pH Wert von 8,1 im Steady State durch entsprechende Ausgasungsversuche ausgeschlossen werden. Geruchsintensive Substanzen wurden in der Abluft nicht festgestellt. Da allerdings keine exakte Analyse auf organische Substanzen in der Abluft vorgenommen wurde, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß ein Teil des C-Defizits von solchen Substanzen herrührt. Die Bilanzen der Reinkulturen

gingen allerdings gut auf, so daß es nicht wahrscheinlich ist, daß das C-Defizit der Mischkultur durch flüchtige Organika verursacht wurde.

4.2.3.2.2. Kohlenstoff-Fluß

Die Kohlenstoffbilanz der Mischkultur ist eine Nettobilanz des Gesamtsystems und gibt keinerlei Auskunft über die Aktivitäten der beiden Organismentypen. Da diese Aktivitäten in der Mischkultur nicht direkt gemessen werden konnten, wurden Bilanzen bei $D = 0.056\ h^{-1}$ von axenischen Kontrollkulturen erstellt. Daraus wurden dann die möglichen Kohlenstoff-Flüsse in der Mischkultur abgeleitet. Weil die Ernährungsweise der Algen in der Mischkultur zunächst unbekannt war, wurden sowohl photoautotroph als auch photomixotroph wachsende Reinkulturen bilanziert.
Die Kontrollen wurden pH-statisch bei einem pH-Wert von 8,1 kultiviert, der sich in der Mischkultur im Fließgleichgewicht eingestellt hatte.

Die Biomassekonzentration der photoautotroph wachsenden Algenkontrolle war identisch mit der der Algen in Mischkultur, während die der photomixotroph wachsenden Algenkontrolle bei ausreichender Versorgung mit Acetat ca. 3mal höher war. Ich schließe daraus, daß die Algen in der begasten Mischkultur photoautotroph wuchsen trotz des kontinuierlich zufließenden Acetats. Argumente für die Richtigkeit dieser Folgerung finden sich im folgenden sowie in der Diskussion.

Tab. 7: Kohlenstoffnettobilanzen im Steady State

	Festgelegter Kohlenstoff (mg C) pro Aufenthaltszeit (τ = 17,86 h ± 0,32 h) und Fermenternutzvolumen (1600 ml)			
	Mischkultur	photoautotrophe Algen	photomixotrophe Algen	Bakterien
Biomasse – Algen	173	172	555	
Biomasse – Bakterien	176			149
DOC (ohne Acetat)	40	40	52	37
produziertes CO_2	259	-	-	479
	648	212	607	665
aufgenommenes Acetat	691	0	553	691
assimiliertes CO_2 aus der Zuluft	0	204	48	0
	691	204	601	691
Wiederauffindrate (%)	93,8	103,9	101	96,2

Die DOC-Menge der Mischkultur (40 mg C) war geringer als die Summe der DOC-Mengen (77 mg C) aus den beiden Kontrollen (photoautotrophe Algenkultur und Bakterienreinkultur). Ein Teil der extrazellulären organischen Substanz wurde von den Bakterien offenbar aufgenommen und in die Biomasse eingebaut.

Tatsächlich war die Biomassekonzentration der Bakterien in der Mischkultur um 18 % höher als in der Reinkultur.

Aus diesen Daten und gemäß ihrer Interpretation wurde der Kohlenstoff-Fluß in der Mischkultur pro Aufenthaltszeit unter Steady State-Bedingungen rekonstruiert (Abb. 53).

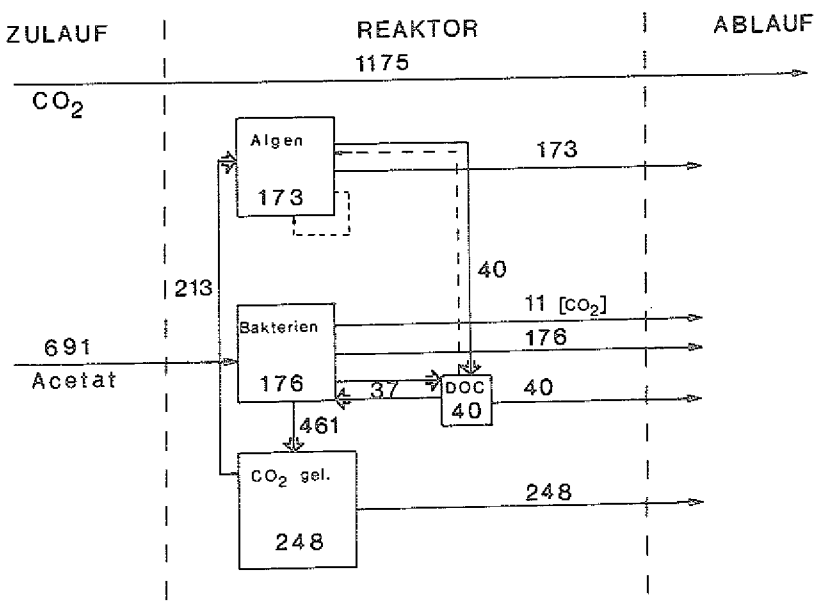


Abb. 53: Kohlenstoffluß pro Aufenthaltszeit (τ = 17,85 h) durch eine begaste Mischkultur von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa im Chemostaten (1600 ml Fermenter). Angaben in mg C/τ und Fermenternutzvolumen (1600 ml)
- - - - → nicht meßbare C-Flüsse
Begasung: 1 % (v/v) CO_2 in Luft (12,5 lh^{-1})
Die Angaben sind Mittelwerte aus 2 Proben, die dem gleichen Chemostaten zum gleichen Zeitpunkt entstammten.

Die angebotene Menge an Acetat (691 mg C) wurde von den Bakterien vollständig aufgenommen. Als zusätzliche C-Quelle stand ihnen ein DOC-Pool von 40 mg C zur Verfügung. Sie entnahmen ihm etwa die gleiche Menge wie sie ihm zuführen (37 mg C).
Ein Teil des aufgenommenen Kohlenstoffs (472 mg C) wurde von den Bakterien veratmet, 11 mg C wurden davon dem System mit der Abluft entzogen. Von den restlichen 461 mg C nahmen die Algen 213 mg C auf, 248 mg C verblieben als anorganischer Kohlenstoff im Medium. Die Algen bauten von den 213 mg C 173 mg C in ihre Biomasse ein. Der Rest von 40 mg C fand sich als DOC im

Medium wieder. Ob ein kleiner Teil des DOC von den Algen wieder aufgenommen wurde, ist nicht bekannt. Die Respirationsleistung (Dunkel- und Photorespiration) der Algen ist ebenfalls unbekannt.

Der Mischkultur wurde mit der Begasung 1175 mg C als CO_2 zugeführt, die nicht in die Bilanz eingehen. Es konnte nicht geklärt werden, woher das CO_2 stammte, das die Algen letztlich aufnahmen. Das Fließschema soll vor allem veranschaulichen, daß das System bei diesem pH-Wert auch ohne extern zugeführtes CO_2 funktionieren muß, da die Bakterien erheblich mehr CO_2 produzierten als die Algen benötigten. Das Medium war zudem CO_2-gesättigt, da mehr CO_2 das System über die Abluft verließ, als über die Zuluft zugeführt wurde.

4.2.3.2.3. Modellierung und Simulation

Bei der Modellierung des Kohlenstoff-Flusses in der Mischkultur wurde der in Form von CO_2 extern zugeführte Kohlenstoff nicht berücksichtigt, da er bilanzmäßig für die Funktion des Systems keine Bedeutung hat.

Aus der Strukturmatix, die man durch Normalisierung der Rohmatrix, Substraktion der Rohmatrix von der Einheitsmatrix und anschließender Inversion erhält (s. Abschnitt 2.14.1.), wurde die Bedeutung der Einzelkomponenten für das System ermittelt. Dabei gibt die Summe der Elemente (S_{ij}) einer jeden Reihe der Strukturmatrix die Wichtigkeit der Einzelkomponenten an. Für die belüftete Mischkultur wurde folgende Rangordnung mit abnehmender Bedeutung festgestellt: Acetat-Bakterien-CO_2-Algen-DOC. Der "Cycling Index" (CI) betrug 0,027. Die rezyklierte Kohlenstoffmenge machte also nur 2,7 % des Gesamtkohlenstofflusses aus.

Dem berechneten Wert von CI lag nur der tatsächlich gemessene Kohlenstofffluß zugrunde. Die in meiner Untersuchung nicht meßbaren Kohlenstoffflüsse (DOC-Aufnahme durch die Algen, deren Dunkel- und Photorespiration) könnten aber den CI-Wert entscheidend beeinflussen.
Es wurde deshalb am Beispiel fiktiv steigender Respirationsrationsraten der Algen eine Simulation mit Hilfe des Matrixmodells durchgeführt. Da der C-Output des Systems exakt bestimmt werden konnte, wurde vorausgesetzt, daß die Algen diesen Kohlenstoff wieder aufnahmen.

Wie zu erwarten war, nahm der CI-Wert mit steigenden Respirationsraten linear zu.
Am Beispiel einer Respirationsrate von 10 % ist die geänderte Rohmatrix mit der resultierenden Strukturmatrix dargestellt (Abb. M2; vergleiche mit Abb. M1, S. 31).

Der aus den Werten der Strukturmatrix berechnete Wert für CI betrug in diesem Fall 0,041. Es wurde also etwa 50 % mehr Kohlenstoff rezykliert als mit meinem ursprünglichen Modell errechnet. Relativ kleine Mengen an zusätzlich in das Modell eingebrachten rezykliertem Kohlenstoff hatten somit einen bedeutenden Einfluß auf den CI-Wert, da dieser im ursprünglichen Modell relativ klein war. Dennoch spielte die Respiration (Dunkel-plus Photorespiration) selbst bei einer Rate von 20 % (CI = 0,055) für das Gesamtsystem keine große Rolle, da die rezyklierte Kohlenstoffmenge nur von 2,7 auf 5,5 % anstieg. Nimmt man neben einer Respirationsrate von 10 % noch eine DOC-Aufnahmerate von 50 % (% des pro Aufenthaltszeit produzierten DOC) an, so veränderte sich der CI-Wert auf 0,049. Auch in diesem Fall war die Menge des rezyklierten Kohlenstoffs gering. Alle für die belüftete Mischkultur wichtigen Kohlenstoffflüsse sind somit in der ursprünglichen Rohmatrix erfaßt. Die mittels der Simulation in die Matrix eingebrachten, nicht direkt meßbaren Flüsse spielten für das System nur eine untergeordnete Rolle.

Abb. M2: Rohmatrix und Strukturmatrix für eine belüftete Algen-Bakterien-Mischkultur. Die Werte der Rohmatrix stellen den C-Fluß in mg C γ^{-1} dar.

Rohmatrix

	CO_2	Acetat	Algen	Bakterien	DOC	output	Summe e_i
CO_2	-	-	234	-	-	259	493
Acetat	-	-	-	691	-	-	691
Algen	21	-	-	-	40	173	234
Bakterien	471	-	-	-	37	176	684
DOC	-	-	-	37	-	40	77
Input	-	691	-	-	-		
e_j	492	691	234	728	77		

Strukturmatrix

	CO_2	Acetat	Algen	Bakterien	DOC
CO_2	1.074	0.000	1.704	0.029	0.572
Acetat	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Algen	0.074	0.000	1.074	0.029	0.572
Bakterien	1.054	0.000	1.054	1.054	1.054
DOC	0.054	0.000	0.054	0.054	1.054

Das System stellt praktisch ein Durchflußsystem dar, wobei der Kohlenstoff von Systemkomponente zu Systemkomponente unter Aufbau eines Komponentenpools weitergereicht wird.

4.2.3.2.4. N- und P-Elimination

Die N- und P-Elimination war gegenüber der der axenischen Kontrollen erheblich verbessert.

Die N-Elimination der Mischkultur betrug 66,3 % gegenüber 32,3 % der photoautotrophen Algenkontrolle und 35,6 % der Bakterienkontrolle. Sie entsprach damit in etwa der Summe aus beiden Reinkulturen.

Die P-Elimination betrug in der Mischkultur 99,4 % gegenüber 42,9 % der photoautotrophen Algenkontrolle und 71,1 % der Bakterienkontrolle. Das angebotene Phosphat wurde in der Mischkultur praktisch vollständig aus dem Medium entfernt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten:

a) Im Hinblick auf die Anwendung in der Abwasserbehandlung ist eine begaste Algen-Bakterien-Mischkultur den axenischen Kulturen überlegen. Das Acetat wurde wie in den Bakterienreinkulturen vollständig aus dem Medium entfernt. Die P- und N-Elimination ist gegenüber den axenischen Algenkulturen (photomixotrophe und photoautotrophe Kontrolle) und Bakterienkulturen deutlich gesteigert.

b) Die Algen wachsen in der begasten Mischkultur strikt photoautotroph. Bei ausreichender O_2-Versorgung reicht die CO_2-Produktion der Bakterien für das photoautotrophe Wachstum der Algen aus. Die einzige feststellbare Interaktion zwischen Algen und Bakterien bestand in einer Vergrößerung des bakteriell nutzbaren C-Pools durch von Algen produzierten extrazellulären Substanzen und damit verbunden einer Erhöhung der bakteriellen Biomassekonzentration.

c) Die Mischkultur stellt bezüglich des Kohlenstoffs ein Durchflußsystem dar. Der Anteil des rezyklierten Kohlenstoffs ist gering.

4.2.3.3. Unbegaste Mischkulturen von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa im Chemostaten

Eine energieaufwendige Belüftung läuft dem Prinzip der "photosynthetischen Abwasserbehandlung" zuwider. Daher wurde in unbegasten Mischkulturen überprüft, in wieweit Oswald's Arbeitshypothese für solche Kulturen zutrifft. Reichen die Gasaustauschraten der Organismen für eine Eliminierung der mit der Nährlösung angebotenen Laststoffe im Hinblick auf eine Anwendung des Systems in der Abwasserbehandlung aus?

Unter dem Mikroskop wurde bei allen unbegasten Mischkulturen beobachtet, daß sich, im Gegensatz zu der begasten Mischkultur, der größte Teil der Bakterien (nach Schätzung > 80 %) dicht an die Algenzellen anlagerten (Photo 2). Die Bakterien wurden offenbar aerotaktisch durch den photosynthetisch gebildeten Sauerstoff der Algen angelockt (Engelmann zit. in Strasburger et al. 1967). Dieses Phänomen deutete an, daß die O_2-Konzentration für die Bakterien im Medum nicht optimal waren. Es kann davon ausgegangen werden, daß im Medium mikroaerobe Bedingungen herrschen (siehe Abschnitt 2.2.7.).

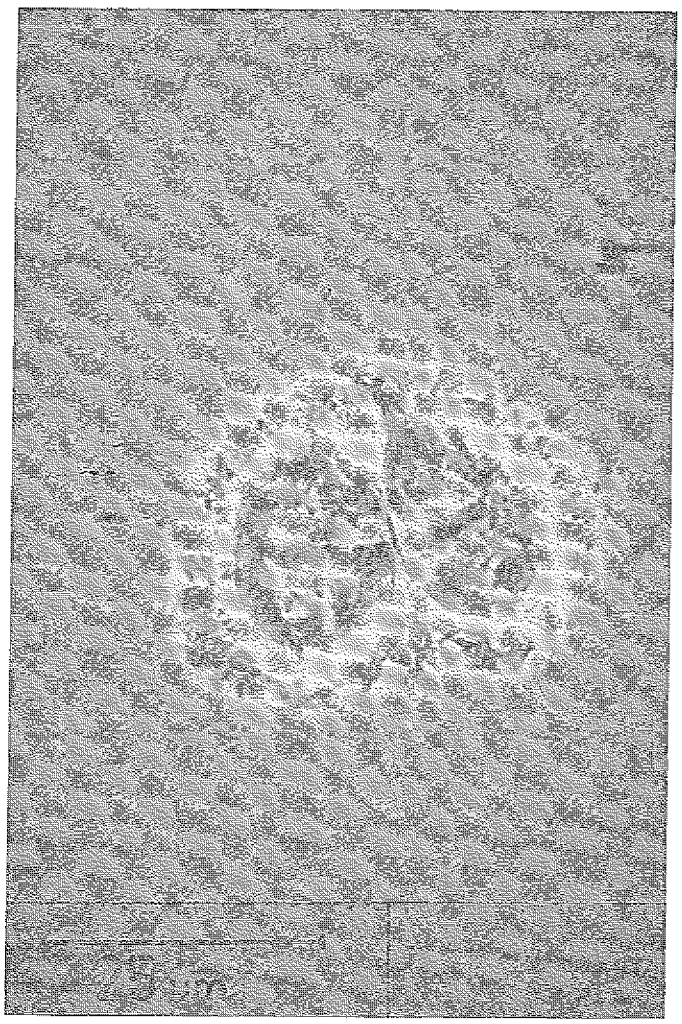


Photo 2: Unbegaste Mischkultur von Pseudomonas aeruginosa und Scenedesmus falcatus.

Zur differentiellen Biomassebestimmung mußten die Organismen voneinander getrennt werden. Die Suspension einer entnommenen Probe wurde deshalb eine halbe Minute bei 100 Watt mit Ultraschall (Fa. Branson, Sonic Power Company, Modell W 185 E) behandelt. Diese Ultraschallbehandlung bewirkte nur ein Abheften der Bakterien von den Algen, zerstörte aber die Zellen nicht (Kontrolle mit ausgeplatteten Reinkulturen). Die weiteren Schritte zur Biomassebestimmung entsprachen denen für begaste Mischkulturen (s. Seite 108).

4.2.3.3.1. Mischkultur bei einer eingestellten Verdünnungsrate von 0,056 h^{-1} und einer Acetatkonzentration von 18 mmol l^{-1}

Eine belüftete axenische Algenkultur, die sich im Steady State befand, wurde mit Bakterien angeimpft. Die Inokulumsgröße wurde so ausgewählt, daß sich sofort ein Zellzahlverhältnis Bakterien : Algen von 30 : 1 einstellte (Bakterienzahl ml^{-1}: $4,9 * 10^7$, Algenzahl ml^{-1}: $1,6 * 10^6$). Anschließend wurde die Belüftung abgestellt und das noch gelöste O_2 bzw. CO_2 mit N_2 (20 Min) ausgetrieben. Um zu verhindern, daß Luft während des Versuchs in den Fermenter eindringen konnte, wurde in den Ablauf ein Siphon gelegt, in dem sich immer eine gewisse Menge Kultursuspension befand, die eine Barriere für die Luft bildete, die über die Auffangflasche in den Fermenter hätte eindringen können.

Erst nach 30 Tagen (40 Aufenthaltszeiten) stellte sich ein Steady State ein (Abb. 54). Diese lange Einschwingzeit war bedingt durch 2 Betriebspannen am 13. und 23. Tag, bei denen der Zufluß unterbrochen war (siehe Abschnitt 4.2.3.3.1.1.).

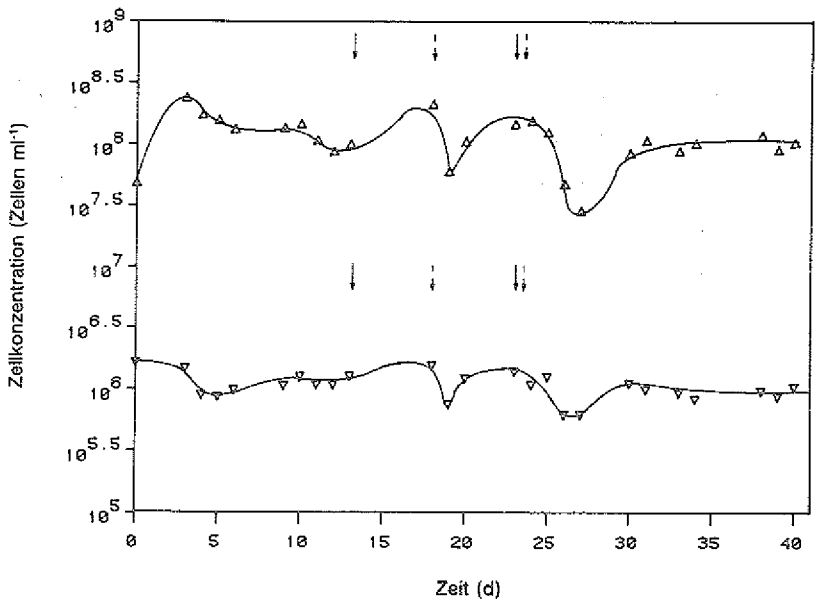


Abb. 54: Populationsdynamik einer unbegasten Mischkultur von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa im Chemostaten bei einer Verdünnungsrate von D = 0,056 h^{-1}.

△ —— △ Pseudomonas aeruginosa

▽ —— ▽ Scenedesmus falcatus

↓ —— ↓ kontinuierlicher Zufluß der Nährlösung unterbrochen

Im Steady State betrug die Algenzellkonzentration 0,91 * 10^6 Zellen pro ml ± 2,5 %, die Bakterienzellkonzentration 1,0 * 10^8 Zellen pro ml ± 12 %, die Extinktion (E_{570}) als Gesamtbiomasseparameter 0,26 ± 15 % und die im Fermenter verbleibende Acetatkonzentration 13,7 mmol l^{-1} ± 1,5 %. Die Zellkonzentrationen beider Organismen waren damit erheblich niedriger als in begasten Mischkulturen (Bakterien: 1,5 * 10^9 Zellen pro ml, Algen: 0,43 * 10^7 Zellen pro ml).

4.2.3.3.1.1. Demonstration der Oszillationsphänomene zwischen dem 13. und 30. Tag

Während der Einschwingzeit des Systems wurde der Zulauf der Nährlösung zweimal unterbrochen, am 13. Tag für 5 Tage und am 23. Tag für 12 Stunden. Die Oszillationen der Mischpopulation zwischen dem 13. und 30. Tag sind aus der Einschwingphase des Systems herausgegriffen worden und in Abb. 55 dargestellt. Diese Kurvenabschnitte wurden jeweils einer Fourieranalyse unterzogen.

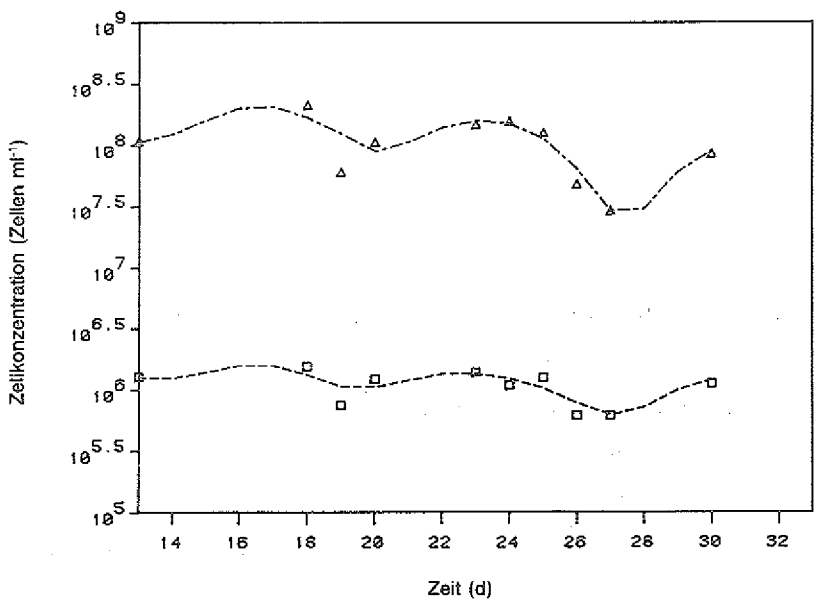


Abb. 55: Fourier-Transformation: Ausschnitt aus der Einschwingphase einer unbegasten Mischkultur von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa im Chemostaten bei einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}056\ h^{-1}$.

△—△ Pseudomonas aeruginosa

□—□ Scenedesmus falcatus

Am 13. Tag des Versuchs wurde zum ersten Male der Zufluß der Nährlösung unterbrochen. Die Organismen wuchsen für 5 Tage unter Batch-Bedingungen. Nach diesem Ereignis nahm die Zellzahl beider Organismen zu. Nach der Umstellung auf Chemostat-Betrieb (die Nährlösung wurde wieder kontinuierlich zudosiert) wurde sofort ein Teil der Organismen ausgespült. Bei der 2. Un-

terbrechung des Zuflusses reagierten die Organismen ähnlich. Zunächst wurde eine Zunahme der Zellkonzentration beobachtet, die aufgrund der nur 12-stündigen Zuflußunterbrechung nicht so hoch ausfiel wie bei der 1. Unterbrechung. Der anschließende Ausspüleffekt war aber größer und infolgedessen die Amplitude der Schwingung vergrößert.

Jede beobachtete Zunahme der Bakterienkonzentration ging einher mit einer Zunahme der Algenkonzentration. Aufgrund der höheren Zellkonzentrationen profitierten die Algen von dem zusätzlich produzierten CO_2, die Bakterien von dem O_2. Mit steigender Zellkonzentration nahm auch die im Fermenter gemessene Acetatkonzentration ab. Eine vollständige Assimilation des Acetats ist offensichtlich dann erreichbar, wenn die Aufenthaltszeit im Fermenter groß genug ist. Die Zellkonzentration beider Organismen stellte sich im Steady State auf das Niveau ein, auf das sie vor den Ereignissen zuzustreben schien. Dies war zunächst erstaunlich, da bei dieser Form der Interaktion der Organismen erwartet wurde, daß sich die Inokulumsgröße auf das sich schließlich einstellende Niveau im Steady State auswirkt. Da aber das 2. Ereignis in die Schwingungen des 1. fiel, reagierte das System mit einem verstärkten Ausspüleffekt, der wahrscheinlich den Effekt der Inokulumsgröße kompensierte.

4.2.3.3.1.2. Kohlenstoffbilanz

Eine Differenzierung zwischen Algen- und Bakterienbiomasse der unbegasten Mischkultur war sehr schwierig, da die bakterielle Biomassekonzentration sehr niedrig war.

Im Kohlenstoffanalysator wurde nach Abtrennung der Algenbiomasse für die Bakterienbiomasse ein Wert von 5 mg C l^{-1} ermittelt. Dieser gemessene Wert liegt aber schon im methodischen Fehlerbereich der Analyse, da die verbleibende DOC-Konzentration von 381 mg C l^{-1} (davon 329 mg C l^{-1} als Acetat) sehr hoch war. Deshalb wurde versucht, die bakterielle Biomassekonzentration über die Zellkonzentration zu bestimmen.

Unter der Annahme, daß die Zellmasse der Bakterien unter mikroaeroben und aeroben Bedingungen in etwa gleich war, ergab sich für die Konzentration der Bakterienbiomasse ein Wert von 5,3 mg C l^{-1}. Als Berechnungsgrundlage diente die Zellkonzentration ($1,8 \times 10^9$ Zellen ml^{-1}) und die ermittelte Biomassekonzentration (95 mg C l^{-1}) von belüfteten Reinkulturen bei $D = 0,056\ h^{-1}$. Trotz der beschriebenen Unsicherheiten der verschiedenen Methoden führen beide zum gleichen Ergebnis.

Die Bakterien legten demnach pro Aufenthaltszeit ca. 8 mg C in ihrer Biomasse fest.

Tab. 8: C-Bilanz der unbegasten Mischkultur unter Steady State-Bedingungen (τ = 17,85 h)

	Festgelegter Kohlenstoff (mg C) pro Aufenthaltszeit und Fermenternutzvolumen (1600 ml)
Biomasse der Mischpopulation	101
Extrazelluläre Substanzen (ohne Acetat)	52
IC im Medium	16
$\sum$	169
Aufgenommenes Acetat	165

Von dem pro Aufenthaltszeit eingesetzten Acetat (691 mg C) wurden von den Organismen insgesamt 165 mg C aufgenommen (Tabelle 8). Davon wurden 101 mg in der Biomasse festgelegt. Der Anteil der Algenbiomasse betrug über 90 %. 52 mg des Kohlenstoffs wurden als organische Verbindungen und 16 mg als CO_2 ins Medium abgegeben.

Da beide Organismen in dem hier verwendeten Medium nicht ohne CO_2 und O_2 in axenischer Kultur wachsen konnten, konnten die Kohlenstoff-Flüsse nicht ermittelt werden.
Es scheint aber ausgeschlossen, daß die Algen ausschließlich photoautotroph wuchsen, da in diesem Fall der Ertragskoeffizient der Bakterien nur einen Wert von < 0,05 hätte.

4.2.3.3.1.3. N- und P-Eliminierung

Trotz eines pH-Wertes von 8,65 wurden aus dem System nur 12,6 mg N l^{-1} entfernt. Da der N-Anteil der Gesamt-Biomasse 9 % (TG: 146 mg l^{-1}) ausmachte, müssen 13,1 mg N in die Biomasse eingebaut werden. Die N-Elimination des Systems beruhte also ausschließlich auf einer N-Assimilation durch die Organismen.

Die P-Elimination war mit 85,4 % bemerkenswert hoch. Setzt man wieder voraus, daß die Organismen keine nennenswerten Mengen an mit der Methode (Abschnitt 2.13.3.) nicht bestimmbaren organischen P-Verbindungen ausscheiden, so muß der P-Anteil an der Biomasse 6,1 % ausmachen.

4.2.3.3.2. Mischkultur bei 2 verschiedenen Verdünnungsraten und einer Acetatkonzentration von 10 mmol l^{-1}

Zur Untersuchung des Einflusses der Acetatbelastung auf die Abbauleistung der unbegasten Mischkultur wurde die Acetatkonzentration in der Nährlösung von 18 mmol l^{-1} auf 10 mmol l^{-1} herabgesetzt (D = 0,056 h^{-1}). Außerdem wurde überprüft, ob die unbegaste Mischkultur, wie sich schon in Abschnitt 4.2.3.3.1.1. andeutete, in der Lage ist, bei einer Herabsetzung der Verdünnungsrate auf 0,036 h^{-1} die zugeführten Laststoffe (Acetatkonzentration 10 mmol l^{-1}) besser zu verwerten.

Als Ausgangskultur diente die in 4.2.3.3.1. beschriebene unbegaste Mischkultur. Die Verdünnungsrate wurde zunächst beibehalten und die Acetatkonzentration von 18 auf 10 mmol l^{-1} vermindert.
Nach Erreichen eines Steady States wurde die Verdünnungsrate auf 0,036 h^{-1} verringert. In Tabelle 9 sind die Kohlenstoffbilanzen der Mischkultur

unter Steady State-Bedingungen aufgezeigt.

Tab. 9: Kohlenstoffbilanzen unbegaster Mischkulturen bei 2 verschiedenen Aufenthaltszeiten

	Pro Aufenthaltszeit und Fermentervolumen (1600 ml) festgelegter Kohlenstoff (mg C)	
	τ = 17,85 h	τ = 27,78 h
Biomasse der Mischpopulation	66	118
Von den Organismen ins Medium abgegebene organische Substanzen	18	22
IC im Medium	20	27
$\sum$	104	167
aufgenommenes Acetat	131	178

Die Berechnung aus der Zellkonzentration ergab für die bakterielle Biomasse bei D = 0,056 h^{-1} (Bakterienzellzahl pro ml: 0,8 * 10^8 ± 13 %, Algenzellzahl pro ml: 0,9 * 10^6 ± 15 %) einen Wert von 4,3 mg C l^{-1}. Für die Kultur bei D = 0,036 h^{-1} (Bakterienzellzahl pro ml: 0,7 * 10^8± 13 %, Algenzellzahl pro ml: 1,0 * 10^6 ± 4 %) errechnete sich im Steady State eine bakterielle Biomassekonzentration von 3,9 mg C l^{-1}. Demnach wurden in die bakterielle Biomasse pro Aufenthaltszeit 6,9 mg C (τ= 17,85 h) bzw. 6,2 mg C (τ= 27,78 h) eingebaut. Während die C-Bilanz bei einer Aufenthaltszeit von 27,78 h mit einem Wert von 93,7 % ausgeglichen war, wurden bei τ = 17,85 h nur 79,4 % des aufgenommenen Kohlenstoffs analytisch erfaßt. Da mit Ausnahme der im Fermenter verbleibenden Acetatkonzentration (tägliche Messung) alle anderen Werte der Bilanz aus einer Doppelprobe vom gleichen Tag stammten, wurde als Vergleich zu der anderen Kultur (τ= 27,78 h) nur die Acetataufnahme bewertet.

Bei einer Verdünnungsrate von D = 0,036 h^{-1} wurden von den aufgenommenen 178 mg C 118 mg C in die Biomasse der Mischkultur, davon wie berechnet 6,2 mg C in die bakterielle Biomasse und 112 mg C in die Algenbiomasse eingebaut. Die Organismen gaben 22 mg C als organische Verbindungen und 27 mg C als CO_2 ins Medium ab.

Der Ertragskoeffizient der Bakterien für Acetat unter mikroaeroben Bedingungen konnte wie in Abschnitt 4.2.3.3.1.2. nicht ermittelt werden. Somit konnte keine Unterscheidung zwischen der Acetataufnahme der Bakterien und der der Algen gemacht werden. Aufgrund der gemessenen Biomasseverhältnisse müssen sich die Algen aber zum großen Teil photomixotroph ernähren.

Mit zunehmender Aufenthaltszeit wurde, wie erwartet, die C-Elimination durch die Mischkultur besser, von 34 % bei τ = 17,85 h auf 44 % bei τ = 27,78 h. Die Gasaustauschraten der Organismen reichten auch bei einer Aufenthaltszeit von 27,78 Stunden nicht aus, um die eingesetzten 10 mmol Acetat l^{-1} vollständig aufzunehmen.

Die Auswirkung der unterschiedlichen Acetatbelastung (18 mmol l^{-1} bzw. 10 mmol l^{-1}) bei einer Verdünnungsrate von 0,056 h^{-1} kann nicht abschließend beurteilt werden. Von den eingesetzten 18 mmol Acetat l^{-1} wurden 4,3 mmol l^{-1} und von den eingesetzten 10 mmol l^{-1} nur 3,4 mmol l^{-1} assimiliert.

N- und P-Elimination

Die N-Elimination beider Kulturen war aufgrund der niedrigen Biomassekonzentration sehr klein. Sie betrug nur 5,3 % (D = 0,056 h^{-1}) bzw. 11,5 % (D = 0,036 h^{-1}). Da wie bei den anderen unbegasten Kulturen ein NH_3-Austrag aus dem System ausgeschlossen werden konnte, berechnete sich ein N-Gehalt der Biomasse von 8,3 % (D = 0,036 h^{-1}).
Die N-Elimination nahm also mit längeren Aufenthaltszeiten und dadurch bedingt höheren Biomassekonzentrationen zu.

Die P-Elimination betrug 86,1 % (D = 0,056 h^{-1}) bzw. 52,3 % (D = 0,036 h^{-1}). Daraus ergab sich ein P-Gehalt der Biomasse von 2,3 % (D = 0,036 h^{-1}). Die N- und P-Gehalte der Organismen bei einer Verdünnungsrate von D = 0,056 h^{-1} wurden wegen der unzulänglichen C-Bilanz und damit möglicherweise ungenauen Biomassekonzentration nicht errechnet.

Zusammenfassend läßt sich für die unbegasten Mischkulturen feststellen:

a) Die O_2- bzw. CO_2-Produktion der Organismen reichte bei den eingestellten Verdünnungsraten nicht aus, um eine befriedigende Elimination des angebotenen Acetats (18 mmol l^{-1} bzw. 10 mmol l^{-1}) zu erreichen. Die Elimination wurde aber mit längeren Aufenthaltszeiten besser. Es sollte daher bei der hier angebotenen Acetatkonzentration der Nährlösung möglich sein, bei erheblich verlängerten Aufenthaltszeiten eine vollständige Entfernung des Acetats mit der Nährlösung zu erzielen.

b) Die Ernährungsweise der Algen konnte nicht exakt bestimmt werden, da keine Markierungsversuche vorgenommen wurden. Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß sich die Algen ebenso wie in begasten Kulturen ausschließlich photoautotroph ernährten. Dies wäre nur möglich, wenn die Ertragskoeffizienten der Bakterien für Acetat < 0,10 wären. Die Algen wuchsen wahrscheinlich überwiegend photomixotroph.

c) Die N-Elimination hing ausschließlich von der Biomassekonzentration ab, da das gebildete NH_3 nicht aus dem System ausgeblasen wurde.

d) Die P-Elimination war trotz der niedrigen Biomassekonzentrationen bemerkenswert gut. Dies war bedingt durch einen gegenüber den begasten Kulturen erhöhten P-Anteil der Biomasse.

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung von Scenedesmus falcatus

Die Verwertung von Acetat durch Mikroalgen ist in der Literatur gut dokumentiert (Nielson & Lewin 1974, Droop 1975, Wiessner 1979). Einige Algen, unter ihnen auch verschiedene Stämme aus der Familie der Scenedesmaceae, nutzen Acetat als C- und Energiequelle, sie wachsen also heterotroph (Droop 1975). Andere hingegen benötigen Licht als zusätzliche Energiequelle.

Die von mir erstmals physiologisch charakterisierte und in kontinuierlichen Kulturen untersuchte chlorokokkale Grünalge Scenedesmus falcatus konnte unter den in dieser Arbeit gewählten Kulturbedingungen nicht mit Acetat im Dunkeln wachsen.
Fast alle in der Literatur beschriebenen Algen, die nicht mit Acetat heterotroph wachsen können, nehmen in Kurzzeitversuchen mit markiertem Substrat etwas Acetat auf (u.a. Palmer & Togasaki 1971). Dies konnte von mir nicht beobachtet werden. Möglicherweise war die von mir verwendete Methode (Acetatbestimmung mit Hilfe der Isotachophorese) dafür zu unempfindlich, um eine geringfügige Aufnahme und Verwertung dieses Substrats nachzuweisen.

Scenedesmus falcatus wuchs unter den von mir vorgegebenen Bedingungen in dem Acetat-Medium photomixotroph. Die Alge benötigte nämlich zum Wachstum neben Acetat Licht und CO_2. Ohne extern zugeführtes CO_2 war das Wachstum stark verlangsamt und kam schließlich ganz zum Stillstand, obwohl der Alge noch genügend Acetat zur Verfügung stand. Die Biomasse konnte sich lediglich vervierfachen. Da Scenedesmus falcatus sich über Autosporen vermehrt, deren Anzahl unter Batch-Bedingungen in der Regel 4 betrug, deutet dies darauf hin, daß die Algen nach Vorkultur unter photomixotrophen Bedingungen nur einen Generationszyklus durchlaufen konnten. Scenedesmus falcatus ist offenbar nicht in der Lage, alle essentiellen C-Verbindungen allein aus dem Acetat mit Licht als zusätzlicher Energiequelle aufzubauen. Scenedesmus falcatus verhielt sich somit bezüglich des Wachstums auf Acetat ähnlich wie verschiedene Stämme der Kieselalge Phaeodactylum (Cooksey 1974) und der Grünalge Pandorina (Palmer & Togasaki 1971).
Nach Wiessner (1969) lassen sich die Algen bezüglich der Hauptstoffwechsel-

wege des Acetateinbaus in die Kohlenhydrate in zwei große Gruppen einteilen:

1. Direkte Acetatassimilation:
   Der Acetateinbau läuft über den Zitronensäurezyklus in Kooperation mit dem Glyoxylatzyklus und schließlich über die Gluconeogenese. Der für die Acetat-Verwertung bestehende ATP-Bedarf wird offenbar durch die Photophosphorylierungsreaktionen des Photosystems I gedeckt.

2. Indirekte Acetatassimilation:
   Das Acetat wird hauptsächlich über den Zitronensäurezyklus oxidiert. Das entstehende CO_2 kann dann mit Hilfe der normalen Photosynthesereaktionen in Kohlenhydrate überführt werden.
   Gleichwohl sind in dieser Gruppe im Gegensatz zu 1. nicht die Kohlenhydrate und Aminosäuren die Hauptassimilationsprodukte, sondern Lipide und Aminosäuren (Wiessner 1979).

Bei Scenedesmus spec. sind die Hauptassimilationsprodukte Lipide (Calvin, zitiert in Schlegel 1956). Nach den Untersuchungen von Wiessner (1969) und Piskunkova und Pimenova (1971) lassen sich Scenedesmus spec. und Scenedesmus quadricauda der 2. Gruppe zuordnen.

Sollte Scenedesmus falcatus wie die anderen untersuchten Scenedesmus-Arten zu der 2. Gruppe der Acetat-assimilierenden Algen gehören, was zahlreiche physiologische Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Scenedesmus-Arten nahelegen (Kessler 1982), so kann offenbar nur ein kleiner, zum normalen Wachstum nicht ausreichender Teil des Acetats zu CO_2 aufoxidiert werden. Da zudem nach Wiessner's Definition der Glyoxylat-Zyklus für die Bildung von Kohlenhydraten in dieser Gruppe nur eine untergeordnete Rolle spielt, ist Scenedesmus falcatus offenbar zur Synthese ausreichender Mengen an Kohlenhydraten auf die Fixierung von exogenem CO_2 angewiesen.
Aufgrund des Wachstumsverhaltens kann Scenedesmus falcatus aber keinem der beiden Typen der Acetatnutzung eindeutig zugeordnet werden. Dazu müßten durch Markierungsversuche und verschiedene Hemmstoffe die beteiligten Reaktionen am Acetateinbau bestimmt werden.

Vor allem in Taiwan und Japan wird Essigsäure schon seit Jahren zur photomixotrophen Kultivierung von Chlorella für die Biomasseproduktion kommerziell eingesetzt (Kawaguchi 1980).

Das photomixotrophe Wachstum von Chlorella auf Acetat setzt sich nach Endo et al. (1977) aus den nicht kompetitiven Prozessen des photoautotrophen und heterotrophen Wachstums zusammen. Beide Ernährungsweisen ergänzen sich danach beim photomixotrophen Wachstum additiv, wobei eine deutlich höhere maximale Wachstumsrate erreicht wird als bei reiner Photoautotrophie. Diese Befunde und ihre Interpretation stehen in deutlichem Gegensatz zu Follmann et al. (1978), die das photomixotrophe Wachstum eines anderen Chlorella-Stamms in Turbidostaten mit Glucose als Substrat untersuchten. Dabei näherte sich die Wachstumsrate photomixotropher Chlorella-Kulturen (Substrat: Glucose) schon bei geringem Lichtangebot pro Gramm Biomasse der maximalen Wachstumsrate photoautotropher Kulturen an und war durch eine weitere Erhöhung des Lichtangebots pro Gramm Biomasse nicht mehr zu steigern. Die maximale Wachstumsrate ist also nach Follmann bei beiden Ernährungstypen gleich.
Nach meinen Untersuchungen verhält sich Scenedesmus falcatus in sofern ähnlich wie die von Follmann beschriebenen Chlorella-Kulturen, als sich die maximale Wachstumsrate photomixotropher Kulturen mit dem μ_{max} photoautotropher Kulturen deckt. Sie wird ebenfalls schon bei niedrigerem Lichtangebot erreicht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Follmann gibt es aber auch für den photomixotroph wachsenden Scenedesmus falcatus einen Kompensationspunkt (Lichtangebot, bei dem die C-Assimilation gleich der Respiration ist), da er im Gegensatz zu Chlorella nicht heterotroph wachsen kann.

Alle weiteren in diesem Abschnitt diskutierten Versuche wurden mit begasten Reinkulturen (1 % (v/v) CO_2 in Luft) durchgeführt.

Die von mir in Batch-Versuchen ermittelte maximale Wachstumsrate von Scenedesmus falcatus von $\mu_{max} = 0{,}079\ h^{-1}$ stimmte mit der im Chemostaten ermittelten Wachstumsrate bei D_{crit} überein. Sie war bei den beiden verwendeten Chemostatsystemen gleich. Dies wurde auch erwartet, da eine Starklichthemmung bei den in diesen Versuchen verwendeten Quantenflußdichten nicht beobachtet wurde.

Die maximale Wachstumsrate sollte aber definitionsgemäß etwas höher sein als die kritische Verdünnungsrate im Chemostaten. Eine oft angewandte Methode zur Bestimmung von μ_{max} ist die Auswaschtechnik (s. Abschnitt 4.2.1.1.1.). Allerdings haben einige Autoren bei verschiedenen Organismen in der ersten Auswaschphase, je nachdem wie krass sich das Nährstoffangebot mit der Umstellung der Verdünnungsrate auf $D > D_{crit}$ änderte, Wachstumsraten bestimmt, die weit unter den μ_{max}-Werten lagen (u.a. Karagouni & Slater 1978, Jannasch 1969). Diese Phase wurde als Umstellungsphase der Organismen auf die neuen Bedingungen gedeutet. Dies trifft auch auf die hier diskutierten Experimente mit Scenedesmus falcatus zu.

In Batch-Versuchen zeigte sich nämlich, daß die lag-Phase des Wachstums von Scenedesmus falcatus mit zunehmenden Acetatkonzentrationen größer wurde. Dieser Effekt wirkt sich offenbar auch auf die Auswaschkinetik aus. Bevor sich Scenedesmus falcatus auf die neue, höhere Acetatkonzentration einstellen konnte, wurde er ausgespült. Erst eine Verringerung der Acetatkonzentration in der zufließenden Nährlösung ließ die Algen sofort mit annähernd der Geschwindigkeit wachsen, wie sie in Batch-Versuchen als μ_{max} ermittelt wurde. Mit Hilfe der üblichen Auswaschtechnik ist also nicht immer exakt die maximale Wachstumsgeschwindigkeit von Organismen zu bestimmen.

Der Quotient von Biomasseproduktion/ Acetataufnahmerate stieg mit dem Lichtangebot pro Gramm Biomasse (s. Abb. 21). Die Acetataufnahmerate von Scenedesmus falcatus ist also umgekehrt proportional zum Lichtangebot. Die Kohlenstoffbilanz einer Kultur bei einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}054\ h^{-1}$ (Tab. 7) zeigt, daß der Anteil des fixierten CO_2 im Vergleich zum assimilierten Acetat bei dem vorgegebenen relativ niedrigen Lichtangebot sehr gering war (ca. 8 %; Quotient 0,98). Bei einem größeren Lichtangebot wurde der Anteil des fixierten CO_2 erheblich größer (> 50 %; Quotient > 2).

Dem kinetischen Modell des photomixotrophen Wachstums von Scenedesmus falcatus lagen die in Abschnitt 4.2.1.1.6. gemachten Annahmen zugrunde, die aus experimentellen Befunden (Abschnitt 4.1.1.) abgeleitet und bereits grundsätzlich diskutiert wurden. Dieses Modell kann sicherlich nicht generell zur Beschreibung des photomixotrophen Algenwachstums verwendet werden, da die Abhängigkeit der Wachstumsrate von den verschiedenen Substraten (Licht, Art der organische C-Quelle, CO_2) bei verschiedenen Algen un-

terschiedlich sein dürfte. Dies hängt unter anderem damit zusammen, daß die Assimilation der organischen C-Quelle über verschiedene Stoffwechselwege verlaufen kann. Das in dieser Arbeit entwickelte Modell kann also nur für Algen gelten, die das organische Substrat in gleicher Weise verwerten wie Scenedesmus falcatus. Die schon erwähnten Beispiele der Photomixotrophie (Endo et al. 1977, Follmann 1978) werden mit diesem Modell nicht beschrieben.
Scenedesmus falcatus scheint im Gegensatz z.B. zu Chlorella (K_s = 0.22 mmol l^{-1} (Endo et al. 1977)) und Aphanocapsa (K_s = 0.18 mmol l^{-1} (Ihlenfeld & Gibson 1977)) ein relativ schlechter Acetatverwerter zu sein. Der mit Hilfe der nichlinearen Regression berechnete K_s-Wert betrug 50 mmol Acetat l^{-1}. Ohmann (1964) fand für eine gereinigte Acetatkinase, dem ersten Enzym der Acetataktivierung in Scenedesmus sp., sogar einen k_m-Wert von 160 mmol l^{-1}.

Die N-Elimination eines biologischen Systems hängt ab von der N-Aufnahme der Organismen und der NH_3-Freisetzung infolge des sich durch die Aktivität der Mikroorganismen einstellenden pH-Wertes. Mit Hilfe von N-Bilanzen konnte gezeigt werden, daß maximal 1/5-tel der in dieser Arbeit eingesetzten NH_4^+-Menge durch Strippung als NH_3 aus dem System entfernt (d.h. ausgeblasen) wurde. Der größte Teil des NH_4^+ wurde von Algen assimiliert. Mit steigenden Biomassekonzentrationen und damit steigender Acetataufnahme wurde der in dieser Arbeit verwendete Acetatpuffer in einem solchen Maße durch Aufnahme verbraucht, daß der pH-Wert anstieg. Es bestand also eine positive Korrelation zwischen der Biomassekonzentration von Scenedesmus falcatus, dem sich einstellenden pH-Wert und der durch Stripping eliminierten NH_3-Menge (s. Tab. 4).

Das mit der Nährlösung in das System eingebrachte Phosphat konnte von Scenedesmus falcatus nicht vollständig assimiliert werden. Obwohl die Biomassekonzentration bei niedrigen Verdünnungsraten (Versuchsreihe A: stärker beleuchtete Kulturen) weiter zunahm, konnte ein Teil des angebotenen Phosphats offenbar nicht aufgenommen werden. Dadurch bedingt, fiel der prozentuale P-Gehalt der Biomasse auf 0,7 % ab. Obwohl für Scenedesmus acutus ein P-Mindestgehalt von 0,8 % festgestellt worden ist (Paelinck 1978), ist Scenedesmus falcatus auch unter diesen Bedingungen nicht P-limitiert (s. Abschnitt 4.2.1.5.)
Der P-Mindestgehalt sollte allerdings besser in Masseeinheiten pro Zelle

angegeben werden, da auch bei Entzug der P-Quelle die Masse einer Zelle weiter zunehmen kann, ohne daß diese teilungsfähig ist. Nach Soeder (1970) beträgt der minimale P-Gehalt ca. $1 * 10^{-13}$ g P je Zelle. Für Scenedesmus falcatus ergibt sich bei einem prozentualen P-Gehalt von 0,7 % ein Wert von ca. $4,4 * 10^{-13}$ g P/Zelle. Obwohl er etwa 5mal niedriger war als der schnell wachsender Algen ($D > 0,07\ h^{-1}$), war auch bei den längsten Aufenthaltszeiten ($\tau = 40$ h) der P-Gehalt einer Zelle von Scenedesmus falcatus noch etwas größer als die in der Literatur beschriebenen minimalen P-Gehalte anderer Algen.

Die im Medium verbliebene nicht unerhebliche P-Konzentration ($1,3$ mg P l^{-1}) ist insofern überraschend, da allgemein für Algen sehr niedrige K_m-Werte (im µg-Bereich) für reaktives Phosphat gefunden wurden (Müller 1972, Fuhs et al. 1972, Rhee 1973).
Algen können zwar in bestimmten Stadien ihrer Zellentwicklung Phosphate ins Medium abgeben (Overbeck 1962, Soeder 1970), jedoch erscheint es unwahrscheinlich, daß die gefundene Restkonzentration von ~1,3 mg P l^{-1} Ausscheidungsprodukte der Algen sind. Wahrscheinlich war die Phosphatmenge in dieser Restkonzentration aus nicht bekannten Gründen für die Algen nicht verfügbar.

5.2. Charakterisierung von Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa ist ein bezüglich des Nährstoffbedarfs recht gut untersuchtes Bakterium. Die Stoffwechselwege für die Verwertung von Acetat sind weitgehend bekannt. Für die Auffüllung des Zitronensäurezyklus während des Wachstums mit Acetat ist die anaplerotische Sequenz des Glyoxylsäurezyklus zuständig (Clarke & Ornston 1975). Im folgenden wird der Einfluß von Acetat, das auf der einen Seite ein quantitativ bedeutender Abwasserinhaltsstoff sein kann, auf der anderen Seite aber bekanntermaßen einen toxischen Effekt auf das mikrobielle Wachstum ausübt (s. Hueting & Tempest 1977), auf das Wachstum von Pseudomonas aeruginosa im Chemostaten diskutiert.

Der Einfluß der Verdünnungsrate auf die Biomassekonzentration von Pseudomonas aeruginosa läßt sich in meinen Versuchen nicht mit der ursprünglichen Chemostatentheorie von Monod beschreiben.

An der in Abb. 37 dargestellten Kurve fällt zweierlei auf:

a) Bei hohen Verdünnungsraten kurz vor dem Auswaschpunkt war kein plötzlicher, sondern ein allmählicher Abfall der Biomassekonzentration festzustellen.

b) Die Biomassekonzentration blieb nicht, wie gefordert, über einen weiten Bereich von Verdünnungsraten konstant. Sie wurde vielmehr mit abnehmender Verdünnungsrate geringer.

zu Punkt a:

Bei mikroskopischer Betrachtung der Kultur bei $D = 0{,}451\ h^{-1}$ fiel auf, daß sich Pseudomonas aeruginosa zu Zellaggregaten zusammenlagerte. Die damit einhergehende physiologische Änderung der Zellen muß für diese Abweichung von der Monod-Theorie verantwortlich sein, zumal Aufwuchs an der Fermenterwand, der einen ähnlichen Kurvenverlauf ergeben könnte (Topiwala & Hamer, 1971) ausgeschlossen werden konnte (s. Abschnitt 4.2.2.1.).

zu Punkt b:

Eine ähnliche starke Abnahme der Biomassekonzentration stellten Hueting und Tempest (1977) bei acetatlimitierten Candida-Kulturen fest. Andererseits fanden Dijkhuizen und Harder (1979) bei Pseudomonas oxalaticus (ebenfalls acetatlimitiert) erst bei sehr niedrigen Verdünnungsraten eine entsprechende Abnahme der Biomassekonzentration. Eine weitgehende Unabhängigkeit der Biomassekonzentration von der Verdünnungsrate setzt einen konstanten Ertragskoeffizienten voraus. Viele Autoren haben aber bei unterschiedlichster Substratlimitierung einen Einfluß der Wachstumsrate auf den Ertragskoeffizienten festgestellt (s. Tempest, 1978). Auch der Ertragskoeffizient von Pseudomonas aeruginosa änderte sich mit der Verdünnungsrate (s. Abb. 38). Er wurde um so kleiner, je niedriger die Verdünnungsrate war. Das limitierende Substrat (Acetat) wurde von Pseudomonas aeruginosa sowohl zur Synthese von Zellmaterial als auch zur Bereitstellung von Energie verwendet. Das Verhältnis der beiden Nutzungsmöglichkeiten des Acetats kann aber nicht unabhängig von der Verdünnungsrate bzw. der Wachstumsrate der Organismen sein. Der sich ändernde Ertragskoeffizient wurde von vielen Autoren als ein Hinweis für einen Bedarf an "maintenance

energy" gedeutet (Marr et al. 1963; Dawes & Ribbons 1964; Pirt 1965, 1975).

Mit Hilfe der von Pirt entwickelten Formel (s. Abschnitt 4.2.2.1.2.) kann die "maintenance rate" und der "wahre Ertragskoeffizient", der sich zusammensetzt aus dem Energiebedarf für die Synthese von Zellmaterial plus dem Energiebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel, bestimmt werden. Pirt setzt voraus, daß die "maintenance rate" m ebenso wie der "wahre Ertragskoeffizient" Y_G eine Konstante ist.
Für Pseudomonas aeruginosa bestand zwischen den Kehrwerten der Ertragskoeffizienten und denen der Verdünnungsrate keine lineare Beziehung (s. Abb. 39). Die ermittelte "maintenance rate" war somit nicht, entsprechend dem Ansatz von Pirt, von der Wachstumsrate unabhängig.

Eine ähnliche nichtlineare Beziehung, abgeleitet aus den Daten von Tempest et al., wurde allerdings auch von Pirt (1972) für glycerin-limitierte Klebsiella-Kulturen festgestellt. Er interpretierte diese Daten mit der Unterschreitung der "minimalen Wachstumsrate" und den einhergehenden stark abnehmenden DNS- und RNS-Konzentrationen der Zellen. Bei Unterschreitung dieser durch die Verdünnungsrate in Chemostaten vorgegebenen "minimalen Wachstumsrate" stellt definitionsgemäß eine Population oder ein Teil einer Population das Wachstum ein.

Diese Interpretation des Kurvenverlaufs kann aber für Pseudomonas aeruginosa in meiner Untersuchung nicht zutreffen, da die "minimale Wachstumsrate" (von Pirt (1972) für Bakterien definiert als $\mu_{min} \approx 0{,}06\mu_{max}$) nicht unterschritten wurde. Meine Ergebnisse lassen sich eher mit der von Stouthamer (1979) gegebenen Interpretation über die Entkopplungswirkung von undissoziierter Essigsäure erklären. Undissoziierte Essigsäure durchdringt durch passive Diffusion biologische Membranen (Klingenberg 1970). Sie könnte wie Dinitrophenol als Entkoppler wirken (Stouthamer 1979), denn nach Zugabe von Dinitrophenol wurde bei Aerobacter aerogenes ein erhöhter Wert für die "maintenance rate" festgestellt. Die Zelle ist offenbar in der Lage, durch eine erhöhte "Maintenance-Atmung" den Entkopplungseffekt zu kompensieren. Die Umsetzung des restlichen Substrates erfolgt dann bei normalen Ertragskoeffizienten.

Der pH-Wert der von mir untersuchten Pseudomonas-Kulturen nahm mit zunehmenden Verdünnungsraten und steigenden unverbrauchten Restacetatkonzentrationen im Fermenter von pH 9 auf pH 8,3 ab. Damit wurde der Anteil der undissoziierten Essigsäure im Medium bei steigenden Verdünnungsraten größer.

Eine Störung der Atmungskettenphosphorylierung durch die undissoziierte Essigsäure würde den in Abb. 39 dargestellten Kurvenverlauf erklären, denn mit zunehmenden Verdünnungsraten und damit einer höheren Konzentration an undissozierter Essigsäure wurde die "maintenance rate" höher.

Die in Abb. 39 dargestellte Kurve konnte ich aber auch vereinfacht durch 2 Geraden unterschiedlicher Steigung beschreiben. Damit wurden die Bakterien in langsam und schnell wachsende mit verschiedenen Werten für m und Y_G eingeteilt. Diese künstliche Trennung (der Übergang ist fließend) machte eine Bestimmung der Biomassekonzentration nach dem von Pirt (1975) angegebenen Berechnungsverfahren möglich.
Der größte von mir experimentell ermittelte Ertragskoeffizient betrug 0,4. Dieser Wert liegt damit im Rahmen der Werte, die andere Autoren für verschiedene Mikroorganismen mit Acetat als limitierendes Substrat fanden (Tab. 10).

Tab. 10: Ertragskoeffizienten für verschiedene aerobe Mikroorganismen in Minimalmedien

Organismen	Substrat	Y (mg $C_{Biomasse}$/ mg $C_{Substrat}$)	Referenz (umgerechnet)
Pseudomonas $C_{12}B$	Acetat	0,47	in Payne (1970)
Pseudomonas aeruginosa	Acetat	0,34	in Payne (1970)
Pseudomonas aeruginosa	Acetat	0,40	vorliegende Arbeit
Pseudomonas fluorescens	Acetat	0,34	Hernandez & Johnson (1967)
Pseudomonas oxalaticus OX1	Acetat	0,43	Dijkhuizen & Harder (1979)
Candida utilis	Acetat	0,43	Hernandez & Johnson (1967)

Werte für Y_G sind in der Literatur rar. Linton und Stephenson (1978) ermittelten aber für Pseudomonas sp. einen Wert von 0,46. Er ist somit vergleichbar mit dem in dieser Arbeit für Pseudomonas aeruginosa ermittelten von 0,49. Die im Vergleich zu anderen Substraten (z.B. Glucose) relativ niedrigen Ertragskoeffizienten für Acetat lassen sich dadurch erklären, daß die Synthese von Monomeren, z.B. Kohlenhydraten, aus Acetat mehr ATP aus der oxidativen Phosphorylierung erfordert als z.B. bei der Assimilierung von Glucose (Stouthamer & Bettenhausen 1973). Zudem benötigen die Organismen wahrscheinlich eine höhere "maintenance rate", um die Entkopplungswirkung von undissoziierter Essigsäure zu kompensieren.

Höfle (1982) stellte fest, daß Cytophaga johnsonae keinen einheitlichen K_s-Wert für Glucose im Chemostaten besitzt. Der K_s-Wert von Pseudomonas aeruginosa für Acetat war in dem in dieser Arbeit verwendeten System ebenfalls nicht konstant (s. Abschnitt 4.2.2.1.4.). Je höher die im Fermenter verbleibende Acetatkonzentration war, desto größer wurde der K_s-Wert.
Da sich außerdem der pH-Wert mit der Verdünnungsrate änderte (s. Abb. 43), untersuchte ich in pH-statisierten Batch-Kulturen den Einfluß des pH-Wertes auf den K_s- und den μ_{max}-Wert von Pseudomonas aeruginosa. Es stellte sich heraus, daß der pH-Wert (7,5 - 8,5) keinen Einfluß auf den K_s-Wert hatte, aber die maximale Wachstumsrate bei pH 7,5 größer war als bei pH 8,5. Der K_s-Wert hingegen wurde von der Substratkonzentration beeinflußt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Jackson et al. (1970), die die Aufnahme verschiedener organischer Säuren (u.a. Essigsäure) durch Gerstenwurzeln untersuchten.
Die üblichen Modelle zur Bestimmung der Substratkonzentration, in die der K_s- und der μ_{max}-Wert als Konstante eingehen, sind deshalb für dieses System ungeeignet.

Die N-Elimination durch Pseudomonas aeruginosa blieb über den Bereich der eingestellten Verdünnungsraten konstant bei ~ 45 % (s. Abschnitt 4.2.2.3.). Die beiden bei den Algen positiv korrelierten Prozesse, hoher pH-Wert (NH_3-Stripping) und hohe Biomassekonzentration, waren in Reinkulturen von Pseudomonas aeruginosa negativ korreliert. In den Pseudomonaskulturen aber blieb die Summe der beiden gegenläufigen N-elimi-

nierenden Prozesse bei allen Verdünnungsraten gleich.
Einige Autoren (MacKelvie et al. 1968, Gronlund & Campbell 1963) berichten, daß Pseudomonas aeruginosa unter Hungerbedingungen, die zweifelsohne bei den niedrigen Verdünnungsraten gegeben waren, Ribosomen und Proteine mangels anderer Reservestoffe degradieren und den überschüssigen Stickstoff als NH_4^+ ins Medium abgeben. Es bleibt ungeklärt, ob diese NH_4^+-Abgabe mengenmäßig eine Rolle spielt und somit die Eliminationsleistung des hier untersuchten Systems negativ beeinflußt.

Die P-Elimination läßt sich durch den P-Einbau in die Biomasse erklären. Sie war bei hohen Biomassekonzentrationen > 99 % (s. Abschnitt 4.2.2.4.).

5.3. Charakterisierung der Mischpopulationen

Definierte kontinuierliche Mischkulturen von Mikroalgen und Bakterien wurden bislang nur selten untersucht. Die wenigen einschlägigen Arbeiten beschäftigen sich zudem ausschließlich mit Populationen in anorganischem Medium, wo das bakterielle Wachstum von extrazellulären Produkten der Algen abhängt (Bell et al. 1974, Lee & Pirt 1981, Lee 1981).

In der von mir untersuchten belüfteten Mischkultur bei $D = 0{,}056\ h^{-1}$ in acetathaltigem Medium war die Biomassekonzentration von Pseudomonas aeruginosa gegenüber der Reinkultur um 18 % erhöht, während die von Scenedesmus falcatus identisch mit der der photoautotrophen Reinkultur war.
Das Acetat wurde in der Mischkultur wie in der Bakterienkontrolle vollständig assimiliert. Als weitere oxidierbare Substanzen standen den Bakterien nur die von den Algen abgegebenen organischen Substanzen zur Verfügung. In der Mischkultur wurde ein DOC-Pool von 25 mg C l^{-1} gemessen. Die Summe der DOC-Konzentrationen aus den Algen- und Bakterienreinkulturen (25 mg C l^{-1} bzw. 23 mg C l^{-1}) ergäbe aber eine Konzentration von 48 mg C l^{-1}. Da eine Charakterisierung des DOC nicht möglich war, konnte die Herkunft des DOC in der Mischkultur nicht exakt nachgewiesen werden. Es ist aber wahrscheinlich, daß ausschließlich der Algen-DOC Pseudomonas aeruginosa als zusätzliche C-Quelle diente. Von dieser Annahme ausgehend, muß man sich vorstellen, daß die Zunahme der bakteriellen Biomasse in der belüfteten Mischkultur auf die Verwertung extrazellulärer Algenprodukte

zurückzuführen ist (s. Abb. 53).
Verschiedene Autoren haben festgestellt, daß Bakterien die von Algen gebildete extrazelluläre organische Substanz als C- und Energiequelle zu nutzen vermögen (Chrost 1978, Bell et al. 1974, Nalewajko et al. 1980, Lee & Pirt 1981a, b, Berman & Kaplan 1984). Nach Chrost (1978) verwertete Pseudomonas in Batchkulturen die gelösten Produkte, die Chlorella vulgaris in den ersten Stunden des Wachstums in das Kulturmedium abgab. Mit zunehmendem Kulturalter gaben die Algen vermehrt Substanzen mit höherer Molmasse ins Medium ab, die Pseudomonas nur schlecht verwerten konnte. Die bisher charakterisierten extrazellulären organischen Algenprodukte umfassen ein weites Spektrum nieder- und höhermolekularer Substanzen von einfachen Zuckern und Säuren bis zu Polysacchariden und Peptiden, ja sogar Vitaminen (Hellebust 1974, Weinmann 1970).

Wegen des in Gegenwart von Scenedesmus falcatus verbesserten Wachstums von Pseudomonas aeruginosa nehme ich an, daß in der hier verwendeten Mischkultur die Algen offensichtlich nur oder doch bevorzugt Substanzen ins Medium abgeben, die von den Bakterien leicht assimiliert werden.

Scenedesmus falcatus hingegen wuchs trotz des kontinuierlichen Zuflusses an Acetat strikt photoautotroph und war nicht in der Lage, erfolgreich mit Pseudomonas aeruginosa um das organische Substrat zu konkurrieren. Wie von definierten Bakterienmischkulturen bekannt (Veldkamp 1976, Matin & Veldkamp 1978), muß ein erfolgreicher Konkurrent durch einen günstigeren K_s- oder μ_{max}-Wert, je nach der eingestellten Verdünnungsrate, gekennzeichnet sein. Nach meinen Untersuchungen hing der K_s-Wert von Pseudomonas aeruginosa für Acetat von der im Fermenter verbleibenden Acetatkonzentration ab, die bei $D < 0{,}16\ h^{-1}$ unter der Nachweisgrenze lag ($< 0{,}1$ mmol l^{-1}). Je niedriger die Acetatkonzentration war, desto kleiner wurde der K_s-Wert. Der kleinste, auf die Wachstumsrate bezogene, ermittelte K_s-Wert betrug 59 μmol l^{-1} (s. Abschnitt 4.2.2.1.4.). Er war damit praktisch um den Faktor 10^3 niedriger als der durch die nichtlineare Regression für Scenedesmus falcatus bestimmte (s. Abscnitt 4.2.1.1.6.). Da der μ_{max}-Wert für Pseudomonas aeruginosa ($\mu_{max} \sim 0{,}45$) etwa um das 5 - 6-fache größer war als der für Scenedesmus falcatus ($\mu_{max} = 0{,}079\ h^{-1}$), konnte Scenedesmus falcatus bei keiner Verdünnungsrate mit Pseudomonas aeruginosa in mit O_2 und CO_2 ausreichend versorgten Mischkulturen um das organische Substrat konkurrieren.

Dieser Befund stimmt mit den Schlußfolgerungen überein, die schon Wright und Hobbie (1966) aus Kurzzeitmessungen der ^{14}C-Glucoseaufnahme von natürlichem Plankton zogen. Dannach sind die meisten Planktonalgen wegen weitaus höherer K_s-Werte nicht in der Lage, mit den Bakterien um organische Substrate zu konkurrieren. Andererseits aber gibt es Hinweise, daß Algen eine Rolle beim Umsatz von Acetat in einem See unter lichtlimitierenden Bedingungen spielen können (Vincent & Goldman 1980). Einige Algenspezies können offenbar unter bestimmten Bedingungen durchaus erfolgreich mit den Bakterien um bestimmte organische Substrate konkurrieren.
In der in meiner Arbeit untersuchten, mit O_2 und CO_2 ausreichend versorgten Mischkultur scheint das Oswald'sche Modell in leicht modifizierbarer Form (Nutzung des DOC) anwendbar zu sein.

Aus dem Schema (Abb. 53), das den Kohlenstoffluß in der mit 1 Vol. % CO_2 in Luft begasten Mischkultur beschreibt, lassen sich unter Einbeziehung von Literaturangaben Massenbilanzgleichungen für das Wachstum von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa unter Steady State-Bedingungen bei dieser Aufenthaltszeit aufstellen. Da ich die chemische Zusammensetzung der Biomasse nicht selbst bestimmen konnte, griff ich auf Werte aus der Literatur zurück (Buhr & Miller 1983). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die chemische Zusammensetzung der Organismen von den Wachstumsbedingungen abhängt. Es gibt also keine Standardsummenformel für die Biomasse. Die von mir verwendeten Summenformeln können somit nur in grober Annäherung die chemische Zusammensetzung der Organismen in der von mir untersuchten Mischkultur wiederspiegeln.
Die in der Literatur beschriebenen Massenbilanzen für das Wachstum von Algen und Bakterien in Algengräben berücksichtigen nicht die von den Organismen produzierten extrazellulären Substanzen (Goldman 1979, Buhr & Miller 1983, Shelef et al. 1976). Diese sind aber ebenso wie die chemische Zusammensetzung der Biomasse dafür ausschlaggebend, wieviel CO_2 bzw. O_2 die Organismen in einer Mischkultur tatsächlich produzieren können, ja sogar dafür, wie ich im Anschluß in zwei Rechenbeispielen darlegen werde, ob eine Mischkultur von Algen und Bakterien unter Einbeziehung einer bakteriellen Verwertung des von den Algen produzierten DOC in der von Oswald vorgeschlagenen Weise funktioniert, daß sich also die beiden Organismen-Typen gegenseitig mit CO_2 und O_2 weitgehend selbst versorgen.
Da ich die chemische Natur der extrazellulären Produkte nicht untersucht habe (nur als DOC gemessen), setze ich als Rechenbeispiel stellvertretend

für die Kohlenhydrate die Summenformel von Glucose (für beide Organismen), bzw. stellvertretend für organische Säuren die von Glykolat (für Scenedesmus falcatus) und wiederum die Summenformel von Glucose (für Pseudomonas aeruginosa) in die Massenbilanzgleichungen ein.
Als eine auf die genannten Angaben gestützte Arbeitshypothese ergibt sich folgende Stöchiometrie des Organismenwachstums pro Aufenthaltszeit (τ = 17,85 h) und Fermenternutzvolumen (1600 ml) in der begasten Mischkultur (extrazelluläre Algen- und Bakterienprodukte: Glucose).

Wachstum von Scenedesmus falcatus:

$$1{,}89\ NH_3 + 17{,}72\ CO_2 + 8{,}18\ H_2O \xrightarrow{\text{Licht}} 1{,}89\ C_{7,6}H_{8,1}O_{2,5}N + 0{,}56\ C_6H_{12}O_6 + 17{,}77\ O_2$$

Wachstum von Pseudomonas aeruginosa:

$$2{,}93\ NH_3 + 43{,}25\ O_2 + 28{,}8\ CH_3COOH + 0{,}56\ C_6H_{12}O_6 \quad 2{,}93\ C_5H_7O_2N + 0{,}51\ C_6H_{12}O_6 + 43{,}25\ CO_2 + 52{,}04\ H_2O$$

Aus der Gleichung für das Wachstum von Scenedesmus falcatus läßt sich errechnen, daß die Algen pro Gramm Biomasse rund 1,9 g O_2 produzieren. Dieser Wert liegt im Rahmen der Werte, die in der Literatur für die O_2-Produktion der Algen in Algengräben angegeben werden (Shelef et al. 1976, Groeneweg pers. Mitteilung). Andererseits folgt aus der angenommenen Massenbilanz für Pseudomonas aeruginosa, daß die Bakterien bei dieser Acetatbelastung (28,8 mmol τ^{-1}) zur vollständigen Elimination des eingesetzten Acetats ~2,4mal so viel O_2 benötigen wie die Algen produzieren. Aufgrund der angegebenen Stöchiometrie können die Bakterien mit dem von den Algen produzierten O_2 nach dieser Formel maximal 11,8 mmol Acetat pro Aufenthaltszeit assimilieren.
Der für die Funktion vieler Enzyme notwendige O_2-Partialdruck ist unbekannt und geht natürlich nicht in die Massenbilanz mit ein. Aus den angenommenen Massenbilanzen für begaste Mischkulturen kann somit nicht auf die tatsächliche Abbauleistung von unbegasten Mischkulturen geschlossen werden, selbst wenn die Ernährungsweise der Algen photoautotroph bliebe, was aber in höchstem Maße unwahrscheinlich ist (s. Abschnitt 4.2.3.3.). Auch bei photoautotropher Ernährungsweise der Algen wäre die Abbauleistung der unbegasten Mischkultur wahrscheinlich weitaus geringer als die stöchiometrisch mögliche von 11,8 mmol Acetat τ^{-1}.
Wie sich die Abgabe von Glykolat (Menge berechnet aus dem in der Kultur ge-

messenen DOC) auf die O_2 Produktion und damit auf das Wachstum von Pseudomonas aeruginosa auswirkt, ist am folgenden Beispiel darstellt. Glykolat ist eine häufig von den Algen ins Medium abgegebene Substanz, die schnell von Pseudomonas metabolisiert werden kann (Nalewajko et al. 1980).

Stöchiometrie des Organismenwachstums pro Aufenthaltszeit (τ= 17,85 h) und Fermenternutzvolumen (1600 ml) in der begasten Mischkultur (extrazelluläre Produkte: Glykolat (Algen), Glucose (Bakterien)):

Wachstum von Scenedesmus falcatus:

$$1{,}89\ NH_3 + 17{,}72\ CO_2 + 7{,}34\ H_2O \xrightarrow{\text{Licht}} 1{,}89\ C_{7,6}H_{8,1}O_{2,5}N + 1{,}68\ CHOHCOOH + 16{,}5\ O_2$$

Wachstum von Pseudomonas aeruginosa:

$$2{,}93\ NH_3 + 41{,}99\ O_2 + 28{,}8\ CH_3COOH + 1{,}68\ CHOHCOOH \longrightarrow 2{,}93\ C_5H_7O_2N + 0{,}51\ C_6H_{12}O_6 + 43{,}25\ CO_2 + 5{,}12\ H_2O$$

Auch hier wurde überprüft, ob die Selbstversorgung der Mischkultur mit O_2 und CO_2 zur Aufrechterhaltung eines Steady States stöchiometrisch bei einer geringeren Acetatbelastung möglich wäre.

Wachstum von Pseudomonas aeruginosa mit dem von Scenedesmus falcatus in der Mischkultur produzierten O_2:

$$1{,}15\ NH_3 + 16{,}5\ O_2 + 11{,}32\ CH_3COOH + 0{,}66\ CHOHCOOH \longrightarrow 1{,}15\ C_5H_7O_2N + 0{,}2\ C_6H_{12}O_6 + 17{,}0\ CO_2 + 20{,}12\ H_2O$$

Da die Algen pro Mol assimiliertem CO_2 nur 0,93 mol O_2 produzieren, reicht die CO_2-Produktion der Bakterien (1 mol CO_2 l^{-1} pro 0,97 mol O_2 l^{-1}), unabhängig von der zugegebenen Acetatmenge, stöchiometrisch nicht aus, eine stabile unbegaste Mischpopulation aufrechtzuerhalten.

Zusammenfassend läßt sich für die von mir untersuchte Mischkultur feststellen, daß die Zusammensetzung der extrazellulären Algenprodukte (s. Hellebust 1974), die in der Regel verschiedene organische Komponenten enthalten, deren Verwertung durch die Bakterien, sowie der chemische Aufbau der Biomasse beider Organismen dafür entscheidend sind, ob die Algen-Bakterien-Mischpopulation gemäß der von Oswald aufgestellten Hypothese

funktionieren kann. Die extrazellulären Substanzen bakteriellen Ursprungs, die in der hier untersuchten Mischkultur von den Organismen vermutlich nicht weiter verwertet werden können, haben bei einem gegebenen Ertragskoeffizienten Einfluß darauf, wieviel CO_2 die Bakterien freisetzen, bzw. wieviel O_2 sie konsumieren.

Aus der Analyse des C-Flusses der begasten Mischkultur von Pseudomonas aeruginosa und Scenedesmus falcatus geht hervor, daß die Organismen bei photoautotropher Ernährungsweise der Algen nicht in der Lage sind, bei einer Aufenthaltszeit von 17,85 h die eingegebene Acetatmenge (18 mmol l^{-1}) ohne extern zugeführtes O_2 vollständig zu verwerten.

Wie sich, basierend auf dem C-Fließschema (Abb. 53), anhand des Cycling Index (CI), der den Anteil des recyklierten am insgesamt umgesetzten Kohlenstoff angibt, nachweisen ließ (s. Abschnitt 4.2.3.2.3.), stellt die begaste Mischkultur ein System dar, in dem der Kohlenstoff von Systemkomponente zu Systemkomponente weitergegeben wird. Der Anteil des rezyklierten Kohlenstoffs war gering (CI = 0,027). Mit Hilfe einer Simulationsanalyse (s. Abschnitt 4.2.3.2.3.) konnte gezeigt werden, daß nicht direkt meßbare Kohlenstoffflüsse (Respiration der Algen, DOC-Aufnahme durch die Algen) für das System mengenmäßig nur von untergeordneter Bedeutung sind. Der CI erhöhte sich nur geringfügig. Dabei wurde eine mögliche Reassimilation von CO_2 durch Pseudomonas aeruginosa nicht berücksichtigt.

In allen von mir untersuchten unbegasten Mischkulturen wurde das eingesetzte Acetat (18 mmol l^{-1}) nicht vollständig umgesetzt. Dies konnte auch, bei photoautotropher Ernährungsweise der Algen aus den oben angeführten Massenbilanzen, trotz der geschilderten Unsicherheitsfaktoren, zumindest für die Kulturen mit vergleichbaren Aufenthaltszeiten (τ = 17,85 h) erwartet werden. Es ist bemerkenswert, daß sich bei gleichen Aufenthaltszeiten und gleicher Acetatbelastung das Verhältnis Algenbiomasse : Bakterienbiomasse von ~1 : 1 in begaster Mischkultur auf ~10 : 1 in unbegaster Mischkultur veränderte. Würde Scenedesmus falcatus auch in unbegaster Mischkultur photoautotroph wachsen, würde dies für Pseudomonas aeruginosa einen extrem niedrigen Ertragskoeffizient von ~0,05 (unter Vernachlässigung einer möglichen, in diesem Fall nicht meßbaren, Aufnahme extrazellulärer Substanzen) voraussetzen. Dies aber erscheint höchst unwahrscheinlich. Es ist vielmehr zu vermuten, daß Scenedesmus falcatus seine Ernährungsweise

von photoautotroph auf photomixotroph umstellt. Da Acetat im Überschuß vorliegt, spielt der hohe K_s-Wert von Scenedesmus falcatus für Acetat keine Rolle, die Algen können Acetat als zusätzliche C-Quelle nutzen.

Scenedesmus falcatus kann aber ohne externes CO_2 nicht wachsen (s. Abschnitt 4.1.1.1.). Es bedarf also einer gewissen bakteriellen Atmungsaktivität. Da den Bakterien bei photomixotropher Ernährungsweise der Algen aber weniger O_2 aus der Photosyntheseleistung der Algen zur Verfügung steht als bei photoautotropher Ernährungsweise, muß die bakterielle Aktivität geringer sein. Bei gleicher Biomasseproduktion benötigen die Algen zum photomixotrophen Wachstum allerdings erheblich weniger CO_2 als zum photoautotrophen (z.B. Tab. 3, der aus dem CO_2 stammende Kohlenstoff betrug nur 8 % des insgesamt aufgenommenen). Dennoch war die Biomasseproduktion von Scenedesmus falcatus in der unbegasten Mischkultur geringer als in begasten photomixotrophen axenischen Kulturen, vermutlich weil O_2- und CO_2-Partialdruck niedriger waren.

Eine Verlängerung der Aufenthaltszeit der unbegasten Mischkultur von 17,85 Stunden auf 27,78 Stunden führte bei gleicher Acetatkonzentration in der Nährlösung (10 mmol l^{-1}) zu einer Erhöhung der Algenbiomassekonzentration, während die Bakterienbiomassekonzentration etwas geringer wurde. Wegen der nicht ausgeglichenen C-Bilanz der Mischkultur bei $\tilde{\tau}$ = 17,85 h, (Berechnung der Biomassekonzentrationen aus den Zellkonzentrationen; s. Abschnitt 4.2.3.3.2.). Mit zunehmender Aufenthaltszeit nahm auch der Anteil des asssimilierten Acetats zu. Dies würde bei photoautotropher Ernährungsweise von Scenedesmus falcatus einen Ertragskoeffizienten von Pseudomonas aeruginosa für Acetat < 0,04 voraussetzen. Auch dieses Ergebnis scheint mir eher für eine Umstellung der Ernährungsweise von Scenedesmus falcatus zu sprechen.
Den Beweis für meine Hypothese, daß Scenedesmus falcatus in unbegasten Mischkulturen photomixotroph wächst, konnte ich letztlich mit meiner Versuchsanordnung aber nicht erbringen. Dazu müßte z.B. der Mischkultur kurzzeitig markiertes Acetat zugegeben werden. Über die Aufnahme von markiertem Acetat durch die Organismen könnte dann wie bei der begasten Mischkultur eine differenziertere C-Bilanz erstellt werden, die den Anteil jeder Spezies an der Gesamtelimination der Mischkultur wiedergibt.

In meinen Versuchen stand Pseudomonas aeruginosa ausschließlich NH_4^+ als N-Quelle zur Verfügung. Dies schloß aus, daß das Bakterium anaerob wachsen konnte (Bergey 1974). Mit NO_3^- als zusätzlicher N-Quelle könnten Teile der Population bei O_2-Mangel NO_3^- als terminalen H-Acceptor benutzen. Welche Auswirkungen dies auf die Ernährungsweise von Scenedesmus falcatus hätte, wurde aber in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die N-Elimination der unbegasten Mischkulturen war trotz des hohen pH-Wertes (pH = 8,65) gering. Sie konnte ausschließlich auf die N-Aufnahme durch die Organismen zurückgeführt werden. Das entstehende Ammoniak konnte also nicht aus dem System entweichen.

Die P-Elimination der beiden unbegasten Mischkulturen bei D = 0,056 h^{-1} war trotz der niedrigen Biomassekonzentration erstaunlich hoch (86 %). Dies könnte auf einer verstärkten Bildung von Polyphosphaten in Algenzellen beruhen (Kuhl 1974), wurde aber nicht näher untersucht. Nach Untersuchungen von Ulrich (1970) produzieren photoautotroph wachsende Algen unter CO_2-limitierenden Bedingungen mittels ihres Photosyntheseapparats mehr Reduktionsäquivalente und ATP als zur Reduktion des fixierten CO_2 benötigt werden. Das überschüssige ATP scheint der Synthese anorganischer Polyphosphate zuzufließen.
Trotz einer höheren Biomassekonzentration war bei einer Verdünnungsrate von D = 0,036 h^{-1} die P-Elimination (52,3 %) geringer als bei D = 0,056 h^{-1} (Acetatkonzentration der Nährlösung jeweils 10 mmol l^{-1}) (s. Abschnitt 4.2.3.3.2.)
Durch die längere Aufenthaltszeit bedingt, können die Algen wahrscheinlich mehr O_2 produzieren, der auch den Bakterien zugute kommt. Obwohl die Biomassekonzentration der Bakterien bei der längeren Aufenthaltszeit etwas niedriger war (3,9 statt 4,3 mg C l^{-1}), konnte in den Versuchen eine leicht erhöhte Konzentration an gelöstem CO_2 im Medium (17 mg C l^{-1} gegenüber 12 mg C l^{-1}) gemessen werden. Offenbar wird bei dieser CO_2-Konzentration, die Synthese von Polyphosphaten weitestgehend eingeschränkt (nicht untersucht).

Meine in kontinuierlichen Algen-Bakterien-Mischkulturen gewonnenen Ergebnisse lassen sich natürlich nur bedingt auf die Verhältnisse in abwasserbelasteten natürlichen Gewässern übertragen. Dennoch zeigen sie, so glaube ich, einige wichtige Prinzipien des Zusammenwirkens von Algen und Bakterien auf.

In Zonen ausreichenden O_2-Gehalts, also in der Regel dem Epilimnion eines mit organischen Abwässern belasteten Sees, ernähren sich die Algen photoautotroph, während die Bakterien (und Pilze) die organischen Substanzen eliminieren. Inwieweit dabei die O_2- bzw. CO_2-Produktion durch die Organismen zur Selbstreinigung der Gewässer ausreicht, hängt weitgehend von den beteiligten Organismenpopulationen, den organischen Substraten und den anderen in diesem Abschnitt schon diskutierten Faktoren ab. Zudem besteht ein Gasaustausch mit der Atmosphäre, so daß in den obersten Schichten eines Sees O_2 und CO_2 nicht limitierend sind. Für diese Schichten erweist sich Oswald´s Hypothese mit der Einschränkung als richtig, daß die Bakterien zusätzlich zu den extern dem See zugeführten organischen Substraten auch die von den Algen ins Wasser abgegebenen organischen Substanzen aufnehmen. Den Algen fällt also in diesen Zonen die Rolle zu, den bakteriellen Abbau der organischen Substanzen durch ihre O_2-Produktion zu fördern und zusätzlich anorganische Substanzen (N-, P-Verbindungen) zu eliminieren.
In tieferen Schichten eines Sees, etwa am Boden der euphotischen Zone könnte die Rollenverteilung von Algen und Bakterien anders aussehen. Neben den ohnehin an diese Bedingungen angepaßten Algenspezies (z.B. Acetat-Flagellaten) können Mikroalgen unter O_2- und CO_2-limitierenden Bedingungen sehr wahrscheinlich ihre Ernährungsweise von photoautotroph auf photomixotroph umstellen. Sie können dann, wenn der aerobe bakterielle Stoffwechsel nur langsam verläuft, zu direkten Konkurrenten der Bakterien zumindest für relativ leicht abbaubare organische Substanzen werden. Ob dies für Mikroalgen generell oder nur für einige Species gilt und inwieweit dies von den organischen Substraten abhängt, kann nach dem heutigen Erkenntnisstand nicht beurteilt werden.
Vincent und Goldman (1980) fanden jedenfalls bei Planktonalgen aus tiefen Schichten eines Sees eine heterotrophe Aktivität. Welchen Anteil Algen an der Elimination der organischen Verbindungen letztlich in situ in einem See haben, kann nicht beurteilt werden. Erschwerend kommt hinzu, daß in einem See unter O_2-limitierenden Bedingungen neben obligat aeroben auch

fakultativ anaerobe Bakterien (z.B. Denitrifikanten) und Pilze vorkommen, die ebenfalls an der C-Elimination beteiligt sind.
Es bleibt festzuhalten, daß Algen in belasteten Gewässern bei der Elimination organischer Substanzen durchaus eine wichtige Rolle spielen können. Das gleiche gilt natürlich auch für Fließgewässer, die ein vertikales O_2-Gefälle aufweisen.

5.4. Diskussion der Daten unter dem Aspekt der Abwasserreinigung durch Algen-Bakterien-Mischkulturen

Die untersuchte Mischkultur von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa war bei ausreichender Versorgung mit O_2 und CO_2 in der Lage, im Sinne einer kombinierten 2. und 3. Reinigungsstufe zu wirken, vorausgesetzt, die anfallende Biomasse wird abgetrennt. Die Leistung des Systems hängt bei vorgegebenen Laststoffkonzentrationen weitgehend von der eingestellten Verdünnungsrate ab.
Bei einer Verdünnungsrate von $D = 0{,}056\ h^{-1}$ wurde das zugegebene Acetat ebenso wie das Phosphat von den Organismen in der Mischkultur praktisch vollständig aufgenommen (Elimination > 99 %).

Während die P-Elimination von axenischen Algenkulturen bei jeder eingestellten Aufenthaltszeit unvollständig war (P-Schwellenkonzentration = $1{,}3\ mg\ P\ l^{-1}$), war eine vollständige Acetatelimination erst bei längeren Aufenthaltszeiten möglich. Die Bakterien hingegen konnten beide Substrate nur bei kürzeren Aufenthaltszeiten ($\tau < 6{,}7$ h) vollständig aufnehmen.

Die N-Elimination der Mischkultur (66 %) war trotz niedrigerer Biomassekonzentration im Vergleich zur photomixotrophen Algenkultur (74 %) nur geringfügig schlechter. Dies lag zum einen an dem sich einstellenden höheren pH-Wert (NH_3-Stripping erhöht) und zum anderen an einem höheren N-Gehalt der Bakterienbiomasse im Vergleich zur Algenbiomasse. Im Vergleich zu den Bakterienkulturen mit einer konstanten N-Elimination von ~45 % bei allen eingestellten Verdünnungsraten war dies eine deutliche Verbesserung.
Die N-Elimination der Mischkultur könnte sicherlich durch eine Verlängerung der Aufenthaltszeit und damit einer höheren Algenbiomassekonzentration gesteigert werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei einer Aufenthaltszeit von 17,85 h die begaste Mischkultur die vorgenannten

Vorzüge von Algen- bzw. Bakterienreinkulturen in sich vereinigte. Sie war damit in ihrer Leistung bezüglich der N-, P-und C-Elimination den Reinkulturen der Organismen überlegen.

Der im Vergleich zu den Bakterienreinkulturen scheinbar bestehende Nachteil einer verlängerten Aufenthaltszeit (in der Regel $\tau = 4 \pm 2$ d, Shelef et al. 1978) bewirkt einen niedrigen Ertragskoeffizienten der Bakterien (s. Abschnitt 4.2.2.1.2.). Dies macht sich in einer erhöhten CO_2-Produktion bemerkbar. Dadurch aber wird das System zumindest bei der untersuchten Aufenthaltszeit ($\tau = 17{,}85$ h) für CO_2 autark. Eine kostspielige Begasung mit CO_2 erübrigt sich. Inwieweit dies auch bei weiter verlängerten Aufenthaltszeiten und damit besserer N-Elimination zutrifft, wurde in dieser Arbeit nicht überprüft.
Aus den aufgestellten Massenbilanzen (s. Abschnitt 5.3) geht hervor, daß dem System bei der eingestellten Aufenthaltszeit extern O_2 zugeführt werden muß, um die maximale Leistung der Bakterien bei der eingestellten Verdünnungsrate zu gewährleisten. Das System kann also nicht in dem von Oswald geforderten Sinne mit maximaler Leistung funktionieren.

In unbegasten Mischkulturen wurde überprüft, zu welcher Leistung die Organismen unter O_2- und CO_2-limitierenden Bedingungen fähig sind. Mit der Änderung der limitierenden Faktoren änderte sich höchstwahrscheinlich die Ernährungsweise der Algen von photoautotroph auf photomixotroph, d.h. sie konnten offenbar erfolgreich mit dem Bakterien um das organische Substrat konkurrieren (s. Abschnitt 5.3). Durch die strenge Limitierung bedingt, war aber die Eliminationsleistung deutlich geringer als in begasten Systemen.

Durch eine Verlängerung der Aufenthaltszeit konnte allerdings, wie die Versuche zeigen, die Elimination pro Aufenthaltszeit gesteigert werden. Es sollte daher möglich sein, bei einer Aufenthaltszeit von der Größenordnung mehrerer Tage, eine vollständige Entfernung der in diesen Versuchen angebotenen Laststoffe zu erzielen, ohne zu begasen. Dies geschieht zum Teil schon in der Praxis bei der Abwasserbehandlung durch unbelüftete Teiche. Allerdings ist hier zu berücksichtigen, daß in solch offenen Systemen ein Gasaustausch mit der Atmosphäre stattfindet, so daß eine so starke O_2 und CO_2-Limitierung wie in meinem System wahrscheinlich nicht gegeben ist.

Aus meinen Ergebnissen ergeben sich für die Betriebsweise eines HIRAPs (High Rate Algal Pond) folgende Konsequenzen:
Durch die schwache Belastung (B_R < 0,1 kg BSB_5/m^3 * Tag) eines HIRAPs und die relativ starke Umwälzung der Suspension bedingt, metabolisieren die Bakterien alle organischen Verbindungen, soweit sie biologisch abbaubar sind, während die Algen photoautotroph wachsen. Dabei wird durch das Umwälzen der Suspension schon ein Großteil des von den Bakterien benötigten O_2 aus der Atmosphäre ins wässrige Medium eingetragen (Groeneweg 1985). Die Algen haben unter solchen Betriebsbedingungen hauptsächlich die Funktion, die anorganischen Nährstoffe zu eliminieren.

Durch diese Verfahrensweise bedingt, sind die Kosten für die Umwälzung und damit die des O_2-Eintrags in die Suspension entsprechend hoch. Sie könnten gesenkt werden, wenn der Ernährungsweise der Algen besser Rechnung getragen wird.

Durch intermittierendes Umwälzen der Suspension könnten Zeitfolgen hoher und niedriger O_2-Konzentration in dem zu behandelnden Abwasser entstehen. Wie sich aus meinen Untersuchungen ergibt, könnten die Algen bei dieser Verfahrensweise besser als O_2-Produzenten für die Bakterien in der Zeit eingesetzt werden, in der die O_2-Konzentration in der Suspension relativ hoch ist und die Algen photoautotroph wachsen, da sie unter solchen Bedingungen nicht mit den Bakterien um die organischen Substrate konkurrieren können. In Phasen niedrigerer O_2-Konzentrationen könnten die Algen photomixotroph wachsen, d.h. sie könnten mit den Bakterien um organische Substrate konkurrieren und so an der Elimination der organischen Substanzen des Abwassers mitwirken. Es bleibt zu überprüfen, bis zu welchem Grenzwert die O_2-Konzentration absinken darf, ohne daß die Eliminationsleistung der Anlage nachläßt. Über die Länge der Intervalle zwischen den Umwälzungen ließe sich dann die O_2-Konzentration in der Suspension regeln. Wie sich möglicherweise einsetzende Gärprozesse in Phasen niedriger O_2-Konzentration auf die Eliminationsleistung der Anlage auswirken, müßte ebenfalls noch untersucht werden. Eine weitere, allerdings technisch aufwendigere Möglichkeit, die O_2-Zudosierung weiter zu verringern, ließe sich wahrscheinlich durch eine oxygenostatische Steuerung der Anlage verwirklichen.
Es müßte die niedrigst mögliche O_2-Konzentration in der Mischkultur ermittelt werden, bei der die gleiche Eliminationsleistung der Anlage erzielt

wird, wie bei O_2-Sättigung. Durch eine konsequente Ausnutzung des photomixotrophen Wachstumspotentials der Algen, die unter solchen Bedingungen zusammen mit den Bakterien den organischen Kohlenstoff umsetzen, könnte die O_2-Zugabe gegenüber dem 1. Vorschlag weiter verringert werden.

Inwieweit sich diese Vorstellungen, die auf Laborversuchen mit zwei ausgewählten Spezies bei konstanten Lichtverhältnissen, konstanter Temperatur und Turbulenz basieren, in der Praxis auf offene Systeme übertragen lassen, müßte durch Messungen an bestehenden Pilotanlagen (u.a. Californien, Singapur) überprüft werden.

Trotz der vorgeschlagenen verbesserten Betriebsweise und der guten CSB-, N-, P-Elimination in einem Verfahrensschritt sehe ich in den gemäßigten Breiten für einen ausschließlich zur Abwasserbehandlung eingesetzten HIRAP keinen Anwendungsbedarf. Die altbekannten Nachteile dieser Systeme gegenüber den hier weit verbreiteten Belebtschlammverfahren bleiben nach wie vor bestehen:

1. hoher Raumbedarf wegen der geringen Raumbelastung (B_R < 0,1 kg BSB_5/m^3 * Tag)
2. Lichtabhängigkeit (Tag-Nacht-Rhythmus)
3. Temperaturabhängigkeit (Betrieb im Winter nicht möglich)
4. teure Biomasseabtrennung (in der Regel schlechtes Absetzverhalten)

In günstigeren Klimazonen jedoch, wo ein HIRAP das ganze Jahr über betrieben werden könnte, erscheint mir das relativ wartungsarme System in der vorgeschlagenen verbesserten Betriebsweise einsetzbar. Dies umso mehr, wenn die Kosten für die Biomasseabtrennung dadurch relativiert werden, daß die als Nebenprodukt der Abwasserreinigung produzierte Biomasse, die eine hochwertige Proteinquelle darstellt (Mokady et al. 1980) zu Fütterungszwecken verwendet wird.

Unbelüftete Teiche dagegen werden auch in unseren Breiten wegen ihres minimalen Wartungsaufwands trotz des hohen Raumbedarfs vor allem in ländlichen Gebieten zur Abwasserbehandlung kleiner Kommunen (< 1000 EGW) eingesetzt. Allein in Bayern wurden in den letzten 20 Jahren über 1300 Teichanlagen errichtet (Bucksteeg & Schleypen 1982).

Unbelüftete Teiche erscheinen mir beim momentanen Stand der Technik in unseren Klimazonen die einzig sinnvolle Nutzung des Zusammenwirkens von Algen und Bakterien in der Abwasserbehandlung zu sein, während in günstigeren Klimazonen sowohl unbelüftete Teiche als auch HIRAPs als relativ wartungsarme Systeme einsetzbar sind.

6. Zusammenfassung

Die chlorokokkale Grünalge Scenedesmus falcatus und das gram-negative Bakterium Pseudomonas aeruginosa wurden in Rein- und Mischkulturen unter definierten Bedingungen in Chemostaten in acetathaltigem Modellabwasser gehalten, um Stoffwechselaktivitäten beider Organismentypen in dem komplexen System "Mischkultur" im Hinblick auf eine Abwasserbehandlung zu quantifizieren.

Reinkulturen

Die mit 1 Vol. (%) CO_2 belüfteten, lichtlimitierten Reinkulturen von Scenedesmus falcatus wuchsen in acetathaltigem Medium photomixotroph, d.h. sie nutzten neben CO_2 Acetat als zusätzliche C-Quelle. Dabei wurde der Anteil des aus dem Acetat stammenden Kohlenstoffs am insgesamt aufgenommenen Kohlenstoff mit abnehmendem Lichtangebot pro Gramm Biomasse größer.

Mit Hilfe eines für das photomixotrophe Wachstum von Scenedesmus falcatus entwickelten Modells ergab sich ein K_s-Wert für Acetat von 50 mmol l^{-1}.

Als maximale Wachtumsrate wurde für Scenedesmus falcatus in kontinuierlichen Kulturen und in Batchkulturen ein Wert von 0,079 h^{-1} gemessen. Die maximale Wachstumsrate photomixotropher und photoautotropher Kulturen war dabei gleich. Allerdings war die Wachstumsrate photomixotropher Kulturen bei stärker lichtlimitierenden Verhältnissen deutlich höher als die photoautotropher Kulturen.

Der in kontinuierlichen, acetatlimitierten Reinkulturen von Pseudomonas aeruginosa bestimmte K_s-Wert für Acetat veränderte sich mit der eingestellten Verdünnungsrate. Er wurde beeinflußt von der im Fermenter im Steady State verbleibenden Restacetatkonzentration. Mit abnehmender Konzentration (also mit abnehmenden Verdünnungsraten) wurde ein niedrigerer K_s-Wert bestimmt. Der kleinste ermittelte Wert betrug 59 μmol l^{-1}. Der μ_{max}-Wert hingegen wurde vom pH-Wert beeinflußt, der in meinen Versuchen mit zunehmenden Verdünnungsraten abnahm. Die höchste im Chemostaten erzielte Wachstumsrate betrug 0,451 h^{-1}. Bei D = 0,48 h^{-1} wurde Pseudomonas aeruginosa ausgespült.

Mischkulturen

In einer mit O_2 und CO_2 ausreichend versorgten Mischkultur von Scenedesmus falcatus und Pseudomonas aeruginosa ($D = 0{,}056\ h^{-1}$) wurde das eingesetzte Acetat vollständig von den Bakterien verwertet. Die Zunahme der bakteriellen Biomasse, im Vergleich zur Reinkultur, konnte auf die Verwertung der von den Algen ins Medium abgegebenen organischen Substanzen zurückgeführt werden.
Die Algen hingegen ernährten sich trotz des kontinuierlich zufließenden Acetats und ihrer Befähigung zum photomixotrophen Wachstum photoautotroph. Wegen ihres weitaus höheren K_s-Wertes für Acetat, konnten sie in belüfteten Mischkulturen nicht mit den Bakterien erfolgreich um das organische Substrat konkurrieren. Dies wurde in einem C-Fließschema dargestellt.

Mit Hilfe einer Matrixanalyse konnte das System "begaste Mischkultur" bezüglich des Kohlenstoffflusses charakterisiert werden. Der in dem System recyklierte Kohlenstoffanteil am Gesamtkohlenstofffluß war gering (2,7 %). Mittels einer Simulationsanalyse wurden nicht direkt meßbare C-Flüsse (u.a. Respiration und Reassimilation des CO_2 durch die Algen) analysiert. Der recyklierte Kohlenstoffanteil erhöhte sich nur geringfügig. Er war somit für die Charakterisierung des Systems ohne große Bedeutung.

Die begaste Algen-Bakterien-Mischkultur verhielt sich entsprechend der Arbeitshypothese von Oswald, mit der Einschränkung, daß den Bakterien mit den von den Algen ins Medium abgegebenen organischen Substanzen eine zusätzlich nutzbare C-Quelle zur Verfügung stand. Aus dem C-Fließschema und den aufgestellten Massenbilanzen ergab sich, daß die O_2-Produktion der Algen in diesem Fall nicht ausreichte, alles angebotene Acetat zu eliminieren. Die Bakterien waren in der untersuchten Mischkultur dazu auf das zusätzlich extern zugeführte O_2 angewiesen.

In den unbegasten Mischkulturen wurde das eingesetzte Acetat von den Organismen auch bei verringerter Verdünnungsrate und Belastung nicht vollständig aufgenommen. Mit verlängerter Aufenthaltszeit nahmen die Organismen mehr Acetat auf, wobei sich die Biomassekonzentration der Algen erhöhte und die der Bakterien erniedrigte. Es erscheint sehr unwahrscheinlich, daß sich die Algen wie in begasten Mischkulturen photoautotroph ernähren, da der Ertragskoeffizient der Bakterien für Acetat in diesem Fall $< 0{,}04$ sein

müßte. Es ist eher anzunehmen, daß die Algen trotz eines höheren K_s-Wertes mit den Bakterien erfolgreich um das Acetat konkurrieren, da es im Überschuß vorlag. Meine Ergebnisse deuten an, daß Scenedesmus falcatus in unbegasten Mischkulturen höchstwahrscheinlich seine Ernährungsweise von photoautotroph auf photomixotroph umstellte.

Literaturverzeichnis

Abeliovich, A. & Azov, Y. (1976): Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. Appl. Environ. Microbiol. 31 (6), 801 - 806

Accorinti, J. (1964): Completencia interspecifica e inhibidores anti-bacterianos de microalgas marinas. Phyton (Buenos Aires) 21, 95 - 101

Allen, M.D.B. & Garett, M.K. (1977): Bacteriological changes occurring during the culture of algae in the liquid phase of animal slurry. J. Appl. Bact. 42, 27 - 43

Arthur, J.P. (1982): Notes on the design and operation of waste stabilization ponds in warm climates of developing countries. Urban Development Departement, Technical Paper No. 6, The World Bank, Washington D.C.

Azad, H.S. & Borchardt, J.H. (1969): A method for predicting the effects of light intensity on algal growth and phosphorus assimilation. J. Water Pollution Control 41/11, Part 2, R 392 - R 404

Azov, Y., Shelef, G., Moraine, R. & Levy, A. (1980): Controlling algal genera in high rate wastewater oxidation ponds. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, S. 245 - 255

Beale, S.I. & Appleman, D. (1971): Chlorophyll synthesis in Chlorella: Regulation by degree of light limitation of growth. Plant Physiol. 47, 230 - 235

Beijerinck, M.W. (1890): Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niedrigen Algen. Bot. Ztg. 48, 725 - 785

Bell, W.H., Lang, J.M. & Mitchell, R. (1974): Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. Limnol. Oceanogr. 19, 833 - 839

Berger, P.S., Jinnque, R. & Gunner, H.B. (1979): Bacterial suppression of Chlorella by hydroxylamine production. Water Res. 13, 267 - 273

Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology, 8. Edition (1974): R.E. Buchanan & N.E. Gibbons (Co-Herausg.). The Williams and Wilkins Company, Baltimore

Berman, T. & Kaplan, B. (1984): Diffusion chamber studies of carbon flux from living algae to heterotrophic bacteria, Hydrobiologia 108, 127 - 134.

Bongers, L.H.J. (1956): Aspects of nitrogen assimilation by cultures of green algae. Mededelingen an de Landbouwhogeschool te Wageningen/ Niederlande 56 (15), 1 - 52

Bucksteeg, K. & Scheypen, P. (1982): Abwasserreinigung in unbelüfteten Teichen und in Pflanzenanlagen. 15. Essener Tagung "Abwasser- und Schlammbehandlung - Fortschritte und Probleme", Aachen

Buhr, H.O. & Miller, S.B. (1983): A dynamic model of the high rate algal-bacterial wastewater treatment pond. Water Res. 17, 29 - 37

Chrost, R.J. (1972): Growth of bacteria in Chlorella vulgaris culture. Acta Microbiol. Polon. Ser. 6 (4), 171 - 174

Chrost, R.J. (1978): Extracellular release in Chlorella vulgaris culture and the role of bacteria accompanying-algae in this process. Acta Microbiol. Polon. 27 (1), 55 - 62

Clarke, P.H. & Ornston, L.N. (1975): Metabolic pathways and regulation. I. in: "Genetics and Biochemistry of Pseudomonas" eds.: P.H. Clarke & M.H. Richmond, Wiley, London 1975, 191 - 261

Cloete, T.E. & Toerien, D.F. (1981): Bacterial-algal interactions. U.O.F.S. Publ. Ser. C, 3, 110 - 115

Cooksey, K.E. (1974): Acetate metabolism by whole cells of Phaeodactylum tricornutum Bohlin. J. Phycol. 10, 253 - 257

Dennis, J.E. jr., Gay, D.M. & Welsch, R.E. (1981): Algorithm 573 NL2SOL - An adaptive nonlinear least-squares algorithm (E4). ACM Transactions On Mathematical Software 7/3, 369 - 383

Dijkhuizen, L. & Harder, W. (1979): Regulation of autotrophic and heterotrophic metabolism in Pseudomonas oxalaticus OX1: Growth on mixtures of acetate and formate in continuous culture. Arch. Microbiol. 123, 47 - 53

Dor, I. (1978): Effect of the green algae Scenedesmus obliquus and Chlorella vulgaris on heterotrophic bacteria in polluted waters. Verh. Int. Verein. Angew. Limnol. 20, 1930 - 1933

Dor, I., Schecter, H. & Shuval, H.I. (1976): Biological and chemical succession in the flowing wastewater of Jerusalem. J. Appl. Ecol. 13, 475 - 489

Droop, M.R. (1974): Heterotrophy of carbon. In: W.D.P. Stewart (Herausg.), Algal Physiology and Biochemistry". Blackwell Sci. Publ., S. 530 - 559

Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E. & Thurston, R.V. (1975): Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effect of pH and temperature. J. Fish. Res. Board Can. 32, 2379 - 2383

Endo, H., Sansawa, H. & Nakajima, K. (1977): Studies on Chlorella regularis, heterotrophic fast-growing strain. II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration. Plant Cell Physiol. 18, 199 - 205

Eppley, R.W. & Dyer, D.L. (1965): Predicting production in light-limited continuous cultures of algae. Appl. Microbiol. 13 (6), 833 - 837

Fiolitakis, E.: Persönliche Mitteilung

Follmann, H., Märkl, H. & Vortmeyer, D. (1978): Kontinuierliche Produktion von Mikroalgen unter mixotrophen Bedingungen. Chem. Ing. Tech. 50 (4), 319

Fott, B. (1971): Algenkunde. S. 301 ff. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Fuhs, G.W., Demmerle, S.D., Canelli, E. & Chen, M. (1972): Characterization of phosphorus-limited plankton algae. Soc. Limnol. Oceanogr. Spec. Symp. 1, 113 - 133

Galloway, R.A., Rolle, I. & Soeder, C.J. (1974): CO_2-fixation and biosynthetic activity of darkened synchronous Chlorella fusca, Arch. Hydrobiol. 73/1, 1 - 13

Goldman, J.C. (1979a): Outdoor algal mass cultures. II. Photosynthetic yield limitations. Water Res. 13, 119 - 136

Goldman, J.C. (1979b): Outdoor algal mass cultures. I. Applications. Water Res. 13, 1 - 19

Gons, H.J. (1977): On the light-limited growth of Scenedesmus protuberans Fritsch. Thesis, Universiteit van Amsterdam, Niederlande

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

Groeneweg, J., Klein, B., Mohn, F.H., Runkel, K.H. & Stengel, E. (1980): First results of outdoor treatment of pig manure with algal-bacterial systems. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. S. 255 - 264

Groeneweg, J. (1985): Untersuchungen zur Behandlung von Schweineflüssigmist in Algengräben. Dissertation, Universität Essen

Gronlund, A.F. & Campbell, J.J.R. (1963): Nitrogenous substrates of endogenous respiration in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 86, 58 - 66

Hannon, B. (1973): The structure of ecosystems. J. theor. Biol. 41, 535 - 546

Hellebust, J.A. (1974): Extracellular products. In: W.D.P. Stewart (Herausg.), Algal Physiology and Biochemistry. Botanical Monogr. Vol. 10. Blackwell Sci. Publ.

Herbert, D. (1961): The chemical composition of microorganisms as a function of their environment. In: G.G. Meynell & H. Gooder (Herausg.), Microbial Reaction to Environment. Cambridge University Press, S. 391 - 416

Herbert, D. (1976): Stoicheiometric aspects of micobial growth. In: Dean et al. (Herausg.), Continuous Culture. 6. Applications and New Fields.

Herbert, D., Elsworth, R. & Telling, R.C. (1956): The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. J. gen. Microbiol. 14, 601 - 622

Hernandez, E. & Johnson, M.J. (1967): Energy supply and cell yield in aerobically grown microorganisms. J. Bact. 94 (4), 996 - 1001

Hill, D.T. & Lincoln, E.P. (1981): Development and validation of a comprehensive model of large-scale production of microalgae. Agricultural Waters 3, 43 - 64

Höfle, M.G. (1982): Glucose of Cytophaga jahnsonae studied in batch and chemostat culture. Arch. Microbiol. 133, 289 - 294

Hueting, S. & Tempest, D.W. (1977): Influence of acetate on the growth of Candida utilis in continuous culture, Arch. Microbiol. 115, 73 - 78

Iehana, M. (1983): Kinetic analysis of the growth of Spirulina sp. on continuous culture. J. Ferment. Technol. 61 (5), 457 - 466

Ihlenfeld, M.J.A. & Gibson, J. (1977): Acetate uptake by the unicellular cyanobacteria Synechococcus and Aphanocapsa, Arch. Microbiol. 113, 231 - 241

Jackson, P.C., Taylor, J.M. & Hendricks, S.B. (1970): Entry of organic acid anions into roots. Proc. Nat. Acad. Sci. 65 (1), 176 - 183

Jannasch, H.W. (1969): Estimation of bacterial growth rates in natural waters. J. Bact. 99 (1), 156 - 160

Karagouni, A.D. & Slater, J.H. (1978): Growth of the blue-green alga Anacystis nidulans during washout from light- and carbon dioxide-limited chemostats. FEMS Microbial Lett. 4, 295 - 299

Kawaguchi, K. (1980): Microalgae production systems in Asia. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, S. 25 - 33

Kessler, E. (1982) Chemotaxonomy in the Chlorococcales, Progress in Phycology Research 1, 112 - 135

Klingenberg, M. (1970): Metabolite transport in mitochondria: An example for intracellular membrane function. In: F. Dickens & P.N. Campbell (Herausg.), Essays in Biochemistry, Vol. 6. Academic Press, London, S. 119 - 159

Komarek, J. & Ruzicka, J. (1969): Effect of temperature on the growth and variability of Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb. In: Fott (Herausg.), Studies in Phycology. E. Schweizerbart´sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, S. 262 - 292

Kuhl, A. (1974): Phosphorus. In: W.D.P. Stewart (Herausg.), Algal Physiology and Biochemistry. Blackwell Sci. Publ. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, S. 636 - 654

Kuhl, A. & Lorenzen, H. (1964): Handling and culturing of Chlorella In: D.M. Prescott (Herausg.), Methods in Cell Physiology, Vol. 1, S. 159 - 188

Lange, W. (1971): Enhancement of algal growth in cyanobacteria systems by carbonaceous compounds. Can. J. Microbiol. 17, 303 - 314

Lee, Y.-K. (1981): The use of algal-bacterial mixed cultures in the photosynthetic production of biomass. In: M.E.Bushell & J.H. Slater (Herausg.), Mixed Culture Fermentation. Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, S. 151 - 172

Lee, Y.-K. & Pirt, S.J. (1981): Interactions between an alga and three bacterial species in a consortium selected for photosynthetic biomass and starch production. J. Chem. Tech. Biotechnol. 31, 295 - 305

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

Ludwig, H.F., Oswald, W.J., Gootaas, H.B. & Lynch, V. (1951): Algae symbiosis in Oxidation Ponds: I. Growth characteristics of Euglena gracilis cultured in sewage. Sewage and Industrial Wastes, Vol. 23, No. 11, 1337 - 1355

Mac Kelvie, R.M., Campbell, J.J.R. & Gronlund, A.F. (1968): Survival and intracellular changes in Pseudomonas aeruginosa during prolonged starvation. Can. J. Microbiol. 14, 639 - 645

Malina, J.F. jr. & Yousef, Y.A. (1964): The fate of coliform organisms in waste stabilization ponds. J. Water Pollut. Control Fed. 36, 1432 - 1442

Matin, A. & Veldkamp, H. (1978): Physiological basis of the selective advantage of a Spirillum sp. in a carbon-limited environment. J. gen. Microbiol. 105, 187 - 197

Melzer, A. & Steinberg, C. (1983): Nutrient cycling in freshwater ecosystems. In: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler (Herausg.) Physiological Plant Ecology IV, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 12 D. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Michaelis, L. & Menten, M.L. (1913): Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49, 333 - 369

Mokady, S., Yannai, S., Einav, P. & Berk, Z. (1980): Protein nutritive value of several microalgae species for young chickens and rats. In: G. Shelef, C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, S. 655 - 661

Monod, J. (1942): Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Hermann et Cie., Paris

Monod, J. (1950): La technique de culture continue: théorie et application. Ann. Inst. Pasteur 79, 390 - 410

Müller, H. (1972): Wachstum und Phosphatbedarf von Nitzschia actinastroides (Lemm.) v. Goor in statischer und homokontinuierlicher Kultur unter Phosphatlimitierung. Arch. Hydrobiol./Suppl. 38 (4), 399 - 484

Nalewajko, L., Lee, K. & Fay, P. (1980): Significance of algal extracellular products to bacteria in lakes and in cultures. Microb. Ecol. 6, 199 - 207

Neilson, A.H. & Lewin, R.A. (1974): The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. Phycologia 13 (3), 227 - 264

Nusch, E.A. (1980): Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 14, 14 - 36

Ohmann, E. (1964): Acetataktivierung in Grünalgen. II. Die Bildung von Acetylphosphat in Stichococcus bacillaris und anderen Arten der Chlorococcales. Biochim. Biophys. Acta 90, 249 - 259

Ohle, W. (1953): Phosphor als Initialfaktor der Gewässereutrophierung. Vom Wasser 20, 11 - 23

Ohle, W. (1955): Die Ursachen der rasanten Seeneutrophierung. Verh. Internat. Ver. Limnól. 12, 373 - 382

Oswald, W.J. (1963): High rate pond in waste disposal. Developments in Industrial Microbiol. 4, 112 - 119

Oswald, W.J. (1970): Growth characteristics of microalgae cultured in domestic sewage: environmental effects on productivity. In: Prediction and Measurements of Photosynthetic Productivity. Proc. IBP/PP Technical Meeting Trebon. Centre for Agric. Publ. and Documentation, Wageningen, Niederlande

Oswald, W.J. & Gotaas, H.B. (1957): Photosynthesis in sewage treatment. Trans. Am. Soc. Liv. Engy 122, 73 - 105

Overbeck, J. (1962): Untersuchungen zum Phosphathaushalt von Grünalgen. I. Phosphathaushalt und Fortpflanzungsrhythmus von Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb. am natürlichen Standort. Arch. Hydrobiol. 58, 162 - 209

Paelinck, H. (1978): Groei en nutrientenopname van het groenwier Scenedesmus acutus Meyen met betrekking tot de tertiaire uivering van afvalwater. Promotionsarbeit Rijksuniversiteit Gent

Palmer, E.G. & Togasaki, R.K. (1971): Acetate metabolism by an obligate phototrophic strain of Pandorina morum. J. Protozool. 18 (4), 640 - 644

De Pauw, N. & Van Vaerenbergh, E. (1981): Microalgal wastewater treatment systems: Potentials and limits. Paper presented at the "Conference

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

Payne, W.J. (1970): Energy yields and growth of heterotrophs. Ann. Rev. Microbiol. 24, 17 - 52

Pfau, J. & Senger, H. (1972): Über die Länge der Entwicklungszyklen in homokontinuierlichen Kulturen von Scenedesmus obliquus, Ber. Deutsch. Bot. Ges. 85(7/9), 409 - 413

Pfennig, N. & Jannasch, H.W. (1962): Biologische Grundfragen bei der homokontinuierlichen Kultur von Mikroorganismen. Ergebn. d. Biologie 25, 93 - 135

Pirt, S.J. (1965): The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proc. R. Soc. London, Ser. B 163, 224 - 231

Pirt, S.J. (1972): Introductory lecture: Prospects and problems in continuous flow culture of microorganisms. J. appl. Chem. Biotechnol. 22, 55 - 64

Pirt, S.J. (1975): Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Sci. Publ.

Piskunkova, N.F., Pimenova, M.N. & Baklashova, T.G. (1971): Some data on the role of photosynthesis in the utilization of acetate and pyruvate by Scenedesmus quadricauda. Mikrobiologiya USSR 40 (3), 337 - 339

Rhee, G.-Y. (1973): A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in Scenedesmus sp. J. Phycol. 9, 495 - 506

Richey, J.E. et al. (1978): Carbon flow in four lake ecosystems: A structural approach. Science 202, 1183 - 1186

Sartory, D.P. (1982): Spectrophotometric analysis of chlorophyll a in freshwater phytoplankton. Technical Report TR MS, Department of Environmental Affairs, Hydrological Research Institute, Pretoria

Schiefer, G.E. & Caldwell, D.E. (1982): Synergistic interaction between Anabaena and Zoogloea spp. in carbon dioxide-limited continuous culture. Appl. Environm. Microbiol. 44 (1), 84 - 87

Shamala, T.R., Drawert, F. & Leupold, G. (1982): Studies on Scenedesmus acutus growth. II. Effect of autotrophic and mixotrophic growth on the amino acid and the carbohydrate composition of Scenedesmus acutus. Biotech. Bioeng. 14, 1301 - 1317

Shelef, G, Schwarz, M. & Schechter, H. (1972): Prediction of photosynthetic biomass production in accelerated algal-bacterial wastewater treatment systems. In:S.H. Jenkins (Herausg.), Advances in Water Pollution Research. Pergamom Press, Oxford

Shelef, G., Moraine, R., Meydan, A. & Sandbank, E. (1976): Combined algae production - wastewater treatment and reclamation systems. In: H.G. Schlegel & J. Barnea (Herausg.), Microbial Energy Conversion, Proc. Seminar. Pergamon Press, Oxford, S. 427 - 442

Shelef, G., Azov, Y., Moraine, R. & Oron, G. (1980): Algal mass production as an integral part of a wastewater treatment and reclamation system. In: G. Shelef & C.J. Soeder (Herausg.), Algae Biomass: Production and Use. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, S. 163 - 191

Slater, J.H. (1975): The control of carbon dioxide assimilation and ribulose 1,5-diphosphate carboxylase activity in Anacystis nidulans grown in a light-limited chemostat. Arch. Microbiol. 103, 45 - 49

Soeder, C.J. (1970): Zum Phosphat-Haushalt von Chlorella fusca SH. et KR. Arch. Hydrobiol./Suppl. 38, 1 - 17

Soeder, C.J. (1972): Möglichkeiten zur Verwendung von Mikroalgen bei der Reinigung von Abwässern. Wasser/Abwasser 12, 583 - 590

Soeder, C.J. (1984): Aquatic bioconversion of excrements in ponds. Proc. Wageningen Symp. 1983, Wageningen, Niederlande (in press)

Soeder, C.J., Schulze, G. & Thiele, D. (1967): Einfluß verschiedener Kulturbedingungen auf das Wachstum in Synchronkulturen von Chlorella fusca SH. et KR. Arch. Hydrobiol., Suppl. 33, 127 - 171

Soeder, C.J., Shelef, G. & Groeneweg, J. (1980): Einsatz von Algen-Bakterien-Mischkulturen zur kombinierten Abwasserreinigung und Proteinerzeugung. Vortragsveranstaltung "Forschung zum Gewässerschutz" der AGF

Soeder, C.J., Shelef, G., Groeneweg, J., Mohn, F.H., Stengel, E. & Moraine, R. (1982): Gewinnung mikrobieller Biomasse als Nebenprodukt der Abwasserbehandlung in Algengräben. In: P. Präve, K. Schügerl & H. Zucker (Herausg.), Mikrobielle Proteingewinnung und Biotechnologie, 2. Symposium 1980. Verlag Chemie, Weinheim, S. 61 - 66

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1975): 14. Ausgabe, APHA-AWWA-WPCF

Steinberg, Ch. (1977): Schwer abbaubare, stickstoffhaltige gelöste organische Substanzen im Schöhsee und in Algenkulturen. Arch. Hydrobiol./ Suppl. 53, 48 - 158

Stouthamer, A.H. (1979): The search for correlation between theoretical and experimental growth yields. In: J.R. Quale (Herausg.), Microbial Biochemistry, Vol. 21. Univ. Park Press, Baltimore, S. 1 - 47

Stouthamer, A.H. & Bettenhaussen, C. (1973): Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 301, 53 - 70

Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H. & Schimper, A.F.W. (1967): Lehrbuch der Botanik. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 234 - 235 (Versuch nach Engelmann)

Tamiya, H., Iwamura, T., Shibata, K., Hase, E. & Nihei, T. (1953): Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of Chlorella. Biochim. Biophys. Acta 12, 23 - 40

Tempest, D.W. (1970): The continuous cultivation of microorganisms. In: J.R. Norris & D.W. Ribbons (Herausg.), Methods in Microbiology, Vol. 2. Academic Press, New York, London, S. 259 - 276

Tempest, D.W. (1978): The biochemical significance of microbial growth yields: a reassessment, TIBS, August 1978

Topiwala, H.H. & Hamer, G. (1971): Effect of wall growth in steady-state continuous cultures. Biotech. Bioeng. 13, 919 - 924

Ulrich, W. (1970): Die Wirkung von O_2 und CO_2 auf die ^{32}P-Markierung der Polyphosphate von Ankistrodesmus braunii bei der Photosynthese. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 83 (9/10), 435 - 437

Veldkamp, H. (1976): Mixed culture studies with the chemostat. In: A.C.R. Dean et al. (Herausg.), Continuous Culture 6: Applications and New Fields. S. 315 - 328

Vincent, W.F. & Goldman, C.R. (1980): Evidence for algal heterotrophy in Lake Tahoe, California-Nevada. Limnol. Oceanogr. 25 (1), 89 - 99

Weinmann,G. (1970): Gelöste Kohlenhydrate und andere organische Stoffe in natürlichen Gewässern und in Kulturen von Scenedesmus quadricauda. Arch. Hydrobiol./Suppl. 37, 927 - 931

Wiessner, W. (1969): Effect of autotrophic or photo-heterotrophic growth conditions on in vivo absorption of visible light by green algae. Photosynthetica 3 (3), 225 - 232

Wiessner, W. (1979): Photoassimilation of organic compounds. In: M. Gibbs & E. Latzko (Herausg.), Photosynthesis II. Photosynthetic Carbon Metabolism and Related Processes. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 181 - 187

Wright, R.T. & Hobbie, J.E. (1966): Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. Ecology 47, 447 - 464

Anhang

Chemische Kinetik des photomixotrophen Wachstums von Scenedesmus falcatus

nach Dr. E. Fiolitakis :

Ausgangshypothese :

1. $[I] + [\text{Chlorophyll}] + [Z] \rightleftharpoons [\text{Chlorophyll}] + [Z^*]$

   $[Z^*]$ = Konzentration der aus den Photosynthesereaktionen stammende Energie

2. $[Ac] + [Z^*] \rightleftharpoons [AcZ^*]$

   $[AcZ^*] + O_2 \longrightarrow$ Biomasse

3. $[Co_2] + [Z^*] \rightleftharpoons [CO_2Z^*]$

   $[CO_2Z^*] + O_2 \longrightarrow$ Biomasse

4. $[Z^*] + [Z] + [AcZ^*] + [CO_2Z^*] = [Z_{max}]$

im Gleichgewicht :

$$[Z^*] = k_i * [I] * [Z]$$

$$[AcZ^*] = k_a * [Ac] * [Z^*]$$

$$[CO_2Z^*] = k_c * P_{CO_2} * [Z^*]$$

$$[Z] + k_i * [I] * [Z] + (k_a * [Ac] + k_c * P_{CO_2}) * [Z^*] = [Z_{max}]$$

$$[Z] * (1 + k_i * [I] + k_i * [I] * (k_a * [Ac] + k_c * P_{CO_2})) = [Z_{max}]$$

$$[Z] = \frac{[Z_{max}]}{1 + k_i * [I] * (1 + k_a * [Ac] + k_c * P_{CO_2})}$$

Die Wachstumsrate μ setzt sich zusammen aus:

$$\mu = R_2 + R_3$$

$$R_2 = k_2 * P_{O_2} * [AcZ^*] = \frac{(k_2 * P_{O_2} * k_a * k_i * [Z_{max}]) * [Ac] * [I]}{1 + k_i * [I] * (1 + k_a * [Ac] + k_c * P_{CO_2})}$$

$$k_2 * P_{O_2} * k_a * k_i * [Z_{max}] = k_{2eff}$$

$$R_3 = k_3 * P_{O_2} * [CO_2Z^*] = \frac{(k_3 * k_c * P_{CO_2} * P_{O_2} * k_i * [Z_{max}]) * [I]}{1 + k_i * [I] * (1 + k_a * [Ac] + k_c * P_{CO_2})}$$

$$k_3 * k_c * P_{CO_2} * P_{O_2} * k_i * \left[Z_{max} \right] = k_{3eff}$$

$$\mu = \frac{[I]}{1 + k_i * [I] * (1 + k_a * [Ac] + k_c * P_{CO_2})} * (k_{3eff} + k_{2eff} * [Ac])$$

$$= k_{3eff} * \frac{[I]}{1 + k_i * [I] (1 + k_a * [Ac] + k_c * P_{CO_2})} * (1 + \frac{k_{2eff}}{k_{3eff}} * [Ac]$$

$\mu = f ([Ac] , [I])$, da P_{Co_2} und P_{o_2} in den Experimenten ausreichend groß waren.

$$k_b = 1 + k_c * P_{CO_2}$$

$$k_s = k_b / k_a$$

$$\mu = k_{3eff} * \frac{[I]}{1 + k_i * [I] * (k_b + k_a * [Ac])} * (1 + \frac{k_{2eff}}{k_{3eff}} * [Ac]) \qquad (I$$

Herleitung einer trennbaren Kinetik : Man kann die Gleichung (I) durch eine Taylor - Entwicklung approximieren und die Terme zweiter und höherer Ordnung wie folgt vernachlässigen :

<u>Definitionen :</u>

$$y = \frac{[Ac]}{k_s + [Ac]} \qquad 1 / y = \frac{k_s}{[Ac]} + 1 \qquad \frac{k_s}{[Ac]} = \frac{1}{y} - 1$$

$$\frac{k_s}{[Ac]} = \frac{1 - y}{y} \qquad [Ac] = \frac{k_s * y}{1 - y} \qquad k_s + [Ac] = \frac{k_s}{1 - y}$$

$$\mu = \frac{k_{3eff}}{k_a} * \frac{[I]}{1 / k_a + k_i * [I] * (k_s + [Ac])} * (1 + \frac{k_{2eff}}{k_{3eff}} * [Ac])$$

$$\mu = \frac{k_{3eff}}{k_a} * \frac{[I]}{\frac{1}{k_a} + k_i * [I] \frac{k_s}{1 - y}} * (1 + \frac{k_{2eff}}{k_{3eff}} * \frac{k_s * y}{1 - y})$$

Taylor - Entwicklung :

$$\mu(y) = \mu(0) + \mu'(0) * y + 0(y^2)$$

$$\mu(0) = k_{3eff} * \frac{[I]}{1 + k_i * k_b * [I]}$$

$$= \frac{k_{3eff}}{k_i * k_b} * \frac{[I]}{\frac{1}{k_i * k_b} + [I]}$$

$$\mu'(y) = \frac{k_{3eff}}{k_a} * [I] * \left(\frac{-1}{\frac{1-y}{k_a} + k_i * k_s * [I]} + \frac{1-y}{k_a} * \frac{1}{\left(\frac{1-y}{k_a} + k_i * k_s * [I]\right)^2} \right)$$

$$+ \frac{k_{2eff} * k_s [I]}{k_a} * \left(\frac{1}{\frac{1-y}{k_a} + k_i * k_s * [I]} + \frac{\frac{y}{k_a}}{\left(\frac{1-y}{k_a} + k_i * k_s * [I]\right)^2} \right)$$

$$\mu'(0) = \frac{k_{3eff}}{k_a} * [I] * \left(\frac{-1}{\frac{1}{k_a} + k_i * k_s * [I]} + \frac{1}{k_a} * \frac{1}{\left(\frac{1}{k_a} + k_i * k_s * [I]\right)^2} \right)$$

$$+ \frac{k_{2eff} * k_s * [I]}{k_a} * \left(\frac{1}{\frac{1}{k_a} + k_i * k_s * [I]} \right)$$

$$= \frac{\left(-\frac{k_{3eff}}{k_a} + \frac{k_{2eff} * k_s}{k_a} \right) * [I]}{\frac{1}{k_a} + k_i * k_s * [I]} + \frac{k_{3eff} * [I]}{k_a^2} * \frac{1}{\left(\frac{1}{k_a} + k_i * k_s * [I]\right)^2}$$

$$= \frac{(k_{2eff} * k_s - k_{3eff}) * [I]}{1 + k_a * k_s * k_i * [I]} + k_{3eff} * \frac{[I]}{(1 + k_a * k_s * k_i * [I])^2}$$

$$\mu'(0) = \frac{(k_{2eff} * k_s - k_{3eff}) * [I]}{1 + k_a * k_s * k_i * |I|} * \left(1 + \frac{k_{3eff}}{k_{2eff} * k_s - k_{3eff}} * \frac{1}{1 + k_a * k_s * k_i * [I]}\right)$$

$$\varepsilon = \frac{k_{3eff}}{k_{2eff} * k_s - k_{3eff}} * \frac{1}{1 + k_a * k_s * k_i * [I]}$$

$\varepsilon \ll 1 \longrightarrow$ z. B. bei Lichtsättigung

$$\mu'(0) = \frac{(k_{2eff} * k_s - k_{3eff}) * [I]}{1 + k_a * k_s * k_i * [I]} * (1 + \varepsilon)$$

$$\mu'(0) = \frac{\left(\frac{k_{2eff} * k_s - k_{3eff}}{k_a * k_s * k_i}\right) * [I]}{\frac{1}{k_a * k_s * k_i} + [I]} * (1 + \varepsilon) \qquad (II)$$

vergleiche Formel (II) mit Formel (12) im Hauptteil der Dissertation

Ich danke Herrn Prof. Dr. C.J. Soeder für die Bereitstellung von Thema, Sachmitteln und Arbeitsplatz an seinem Institut, sowie für seine wissenschaftliche Unterstützung mit vielen richtungsweisenden Ratschlägen.

Mein weiterer Dank gilt:

Herrn J. Groeneweg für die vielen ergiebigen Diskussionen sowie seine Ratschläge zum Aufbau der Apparaturen.

Herrn Prof. Dr. P. Präve für die bereitwillige Übernahme der Vertretung der Arbeit als Korreferent.

Herrn M. Schlüter für die gute Zusammenarbeit, insbesondere bei der Konstruktion der Versuchsanlagen.

Herrn Dr. H. Kneifel für seine Unterstützung bei der Einarbeitung in die Acetat-Analytik.

Herrn Dr. E. Fiolitakis für die Unterstützung bei mathematischen Problemen.

Frau D. Leißner, Frau G. Neumann und Frau E. Schölgens für die Durchführung der vielen chemischen Analysen sowie dem ZCH der Kernforschungsanlage Jülich für die C : H : N-Bestimmungen,

der Infrastruktur des IBT, besonders der Werkstatt und dem Fotolabor,

allen übrigen Mitarbeitern des IBT-3 für praktische Hilfestellungen,

last not least Frau D. Schröder und Frau M. Schmitz für die umfangreichen Schreibarbeiten.