

Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
AG Angewandte Biochemie: Prof. Dr. M. Sernetz

---

Kontinuierliche Co-Kultur von  
*Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida*  
in einem Bioreaktor

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
naturwissenschaftlichen Fachbereiche  
(Fachbereich 08: Biologie, Chemie und Geowissenschaften)  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

Vorgelegt von  
Dipl.-Biol. Ulla Hauptmann  
aus Gießen

Gießen 2000

---

Dekan: Prof. Dr. Rainer Renkawitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Friedrich Jauker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Sernetz

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2000

---

*In Erinnerung an meine Großeltern*

*Liesi und Horst Lück*



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG: PROBLEM UND AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN .....</b>	<b>5</b>
2.1	CHARAKTERISTIKA DER EINGESETZTEN ORGANISMEN.....	5
2.1.1	<i>Tetrahymena thermophila</i> .....	5
2.1.2	<i>Pseudomonas putida</i> .....	10
2.2	MIKROBIELLE LEBENSGEMEINSCHAFTEN .....	12
2.3	RÄUBER-BEUTE-SYSTEME .....	14
2.4	KONTINUIERLICHE KULTUREN .....	17
2.4.1	<i>Kinetik des Zellwachstums</i> .....	17
2.4.2	<i>Kontinuierliche Bioreaktoren</i> .....	19
2.4.3	<i>Vergleich von Bioreaktoren und Organismen</i> .....	21
2.5	MATHEMATISCHE MODELLE ZUR ANALYSE VON RÄUBER-BEUTE-BEZIEHUNGEN.....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>
3.1	ORGANISMEN UND STAMMKULTUREN .....	29
3.2	STERILITÄT .....	29
3.3	MEDIEN .....	29
3.3.1	<i>Langzeitkultur auf Kichererbsen</i> .....	29
3.3.2	<i>PPY-Medium</i> .....	30
3.3.3	<i>BC-Medium</i> .....	30
3.3.4	<i>Standard 1-Agarplatten</i> .....	31
3.3.5	<i>Standard 1-Nährmedium</i> .....	31
3.4	BESTIMMUNG MIKROBIOLOGISCHER GRUNDGRÖßEN .....	32
3.4.1	<i>Norris-Powell-Lösung</i> .....	32
3.4.2	<i>Zählung von Tetrahymena thermophila</i> .....	32
3.4.3	<i>Zählung von Pseudomonas putida</i> .....	33
3.4.4	<i>Plattenkeimzahl (CFU)</i> .....	33
3.4.5	<i>Kontrolle der Bakterienkultur</i> .....	34
3.4.6	<i>Kryokonservierung von Pseudomonas putida</i> .....	34
3.5	MIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ZELLEN .....	34
3.5.1	<i>Lichtmikroskopie</i> .....	34
3.5.2	<i>Rasterelektronenmikroskopie</i> .....	37
3.6	BIOCHEMISCHE ANALYSEN .....	39
3.6.1	<i>DNA-, RNA- und Protein-Analyse nach Schmidt-Tannhauser</i> .....	39
3.6.2	<i>Proteinbestimmung nach Lowry</i> .....	41
3.6.3	<i>Glucosebestimmung</i> .....	42
3.7	WARBURG-TECHNIK (MANOMETRIE).....	43

3.8	METHODIK ZUR TRENNUNG VON TETRAHYMENA THERMOPHILA UND PSEUDOMONAS PUTIDA	45
3.9	KULTURTECHNIK	45
3.9.1	Bioreaktor	45
3.9.2	Vorkulturen	47
3.9.3	Probennahme und Probenaufbereitung	47
3.10	COMPUTERGESTÜTZTE AUSWERTUNG	48
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
4.1	BATCH-KULTUR VON TETRAHYMENA THERMOPHILA IN PPY-MEDIUM	49
4.1.1	Zellwachstum (TBK-1 und TBK-2)	49
4.1.2	O <sub>2</sub> -Gehalt und pH-Wert im Medium	50
4.1.3	DNA-, RNA- und Proteingehalte (Methode nach Schmidt-Tannhauser)	50
4.1.4	O <sub>2</sub> -Verbrauch (Warburg-Manometrie)	52
4.2	KONTINUIERLICHE KULTUR VON PSEUDOMONAS PUTIDA IN BC-MEDIUM	53
4.2.1	Zellwachstum (PKK-1)	53
4.2.2	O <sub>2</sub> -Gehalt und pH-Wert im Medium	55
4.2.3	Glucosekonzentration im Medium	56
4.2.4	Proteingehalt	57
4.3	CO-KULTUR VON TETRAHYMENA THERMOPHILA AUF PSEUDOMONAS PUTIDA IN BC-MEDIUM (BATCH-KULTUREN)	58
4.3.1	Zellzahlen (CoBK-1 und CoBK-2)	58
4.3.2	O <sub>2</sub> -Gehalt und pH-Wert im Medium	59
4.3.3	Glucosekonzentration	60
4.4	CO-KULTUR VON TETRAHYMENA THERMOPHILA AUF PSEUDOMONAS PUTIDA IN BC-MEDIUM (KONTINUIERLICHE KULTUR)	61
4.4.1	Populationswachstum (CoKK-1, CoKK-2 und CoKK-3)	62
4.4.2	O <sub>2</sub> -Gehalt und pH-Wert im Medium	66
4.4.3	Glucosekonzentration im Medium	67
4.4.4	Proteingehalt	68
4.5	MATHEMATISCHES MODELL DER WACHSTUMSKINETIK EINES MIKROBIELLEN RÄUBER-BEUTE-SYSTEMS	70
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>73</b>
5.1	KINETIK DES WACHSTUMS	73
5.2	CO-KULTUREN VON TETRAHYMENA THERMOPHILA UND PSEUDOMONAS PUTIDA	75
5.3	DIE ÖKOLOGISCHE BEDEUTUNG VON MIKROBIELLEN RÄUBER-BEUTE-SYSTEMEN	84
5.4	MATHEMATISCHE MODELLIERUNG EINES LABORÖKOSYSTEMS	86
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>

<b>7</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>91</b>
8.1	DIE SYSTEMATIK DER PROTOZOA.....	91
8.2	FORMELZEICHENERKLÄRUNG .....	93
<b>9</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>95</b>





## 1 Einleitung: Problem und Aufgabenstellung

Das Studium von mikrobiellen Ökosystemen in vivo ist auf Grund der Vielzahl der einwirkenden biotischen und abiotischen Parameter extrem schwierig. Neben den abiotischen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Wind oder Niederschlag stellt auch die Vielfalt der zum Teil schwer bestimmbaren Mikroorganismen den Betrachter vor komplexe Probleme. In den meisten Fällen sind die inter- und intraspezifischen Wechselbeziehungen zwischen den Organismen, die Vernetzung innerhalb der Nahrungskette und die Wechselwirkung mit ihrer unbelebten Umwelt nur unvollständig geklärt. Um Theorien überprüfen zu können, bedarf es kontrollierter und kontrollierbarer Versuchsansätze unter definierten Bedingungen. Diese Möglichkeit bietet die Biotechnologie durch die Verknüpfung von biologischen Fragestellungen mit moderner Reaktortechnologie. Unter definierten Kulturbedingungen und mit definierten Organismen ist es möglich, ein mikrobielles in-vitro-Ökosystem im Labormaßstab zu etablieren und zu studieren. Der Begriff Ökosystem beschreibt eine biologische Lebensgemeinschaft zusammen mit ihrer physikalischen Umwelt. Bei dem mikrobiellen Ökosystem der vorliegenden Arbeit handelt es sich daher um ein sehr vereinfachtes System, das im wesentlichen aus zwei bekannten Mikroorganismen und dem Kulturmedium besteht.

Bereits 1934 befasste sich G. F. Gause mit der Frage nach den elementaren Prozessen, die das Überleben zweier bekannter Mikroorganismen, des Ciliaten *Paramecium aurelia* und seines Räubers *Didinium nasutum*, in Laborkulturen ermöglichen. Seither haben sich zahlreiche Studien zur mikrobiellen Prädation mit den zeitlichen Veränderungen von einfachen Laborsystemen, bestehend aus Räubern, Beute und abiotischem Medium, beschäftigt. Und auch heute noch ist diese Fragestellung längst nicht komplett aufgeklärt. Dass die Untersuchung von biotechnischen Laborökosystemen, wie dem der vorliegenden Arbeit, nicht isoliert betrachtet werden sollte, ergibt sich aus den vielfältigen anderen Forschungsgebieten, in denen Mikroorganismen untersucht werden. Sie werden in toxikologischen Studien eingesetzt (LARSEN, 1989; FERNANDEZ-LEBORANS UND NOVILLO, 1995; BEARDEN UND SCHULTZ, 1997; GILRON UND LYNN, 1998; BAMDAD et al., 1999; GILRON et al., 1999), in Biotests verwendet (WEGENER, 1992; SCHLIMME et al., 1999) und die Erforschung der Auswirkungen der Bakterien-Prädation durch Protozoen ist ein wichtiger Bestandteil von Untersuchungen in Abwasserreinigungsanlagen (CURDS UND VANDYKE, 1966; CURDS, 1982; HANTULA UND BAMFORD, 1991; RATSAK et al., 1996; BONNET et al., 1999).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem grundlegenden Thema, der Kinetik eines mikrobiellen Räuber-Beute-Systems in einem kontinuierlichen Bioreaktor.

Bei der Kultur von Säugerzellen in Bioreaktoren handelt es sich in der Regel um Zellen, die aus Geweben oder Organen entnommen wurden und hochdifferenziert und hochspezialisiert sind. Deshalb verfügen sie nur über eine begrenzte Adaptationsfähigkeit an veränderte Umweltbedingungen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Protozoen um einzellig organisierte Organismen, die in einer Zelle fast alle Prozesse durchführen können, die bei Metazoa auf zahlreiche Zellen in verschiedenen differenzierten Geweben und Organen verteilt sind. Da jedes Protozoon ein "Individuum" verkörpert, verfügen diese Zellen auch in Kultur über ein hohes Potential an Anpassungsmöglichkeiten.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, die Kinetik eines mikrobiellen Räuber-Beute-Systems zu untersuchen. Als Testorganismen wurden der Ciliat *Tetrahymena thermophila* und das Bakterium *Pseudomonas putida* gewählt. Ein kontinuierliches Kultursystem, das eine dauerhafte Co-Kultivierung beider Organismen mit Hilfe eines Bioreaktors ermöglicht, soll etabliert werden. Das betriebene Laborsystem basiert auf den Entwicklungen und Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Sernetz (KEINER, 1991; OH, 1993; GIESE, 1999). Der Bioreaktor wurde zunächst als stationäres System nur mit *Tetrahymena thermophila* und dann in Co-Kultur mit *Pseudomonas putida* betrieben. Aufbauend auf den Batch-Kulturen, erfolgte eine Co-Kultivierung beider Organismen im Fed-Batch-Verfahren. Es wurde schnell deutlich, dass den Organismen nur in einer kontinuierlichen Kultur dauerhaft konstante Milieubedingungen gewährleistet werden können. Bei der Modifikation der Versuchsansätze von der Batch-Kultur über die Fed-Batch-Betriebsweise hin zur kontinuierlichen Kultur stellt jedes Experiment eine Erweiterung des vorhergehenden Versuchsansatzes dar.

In einer kontinuierlichen Kultur wird mit einer konstanten Rate Substrat in Form von frischem Medium zugeführt und mit verschiedensten Stoffwechselprodukten angereichertes Medium aus dem Reaktor entfernt. In einem solchen offenen System, das durch kontinuierliche Energieflüsse aus seiner Umgebung hinein und in seine Umgebung hinaus gekennzeichnet ist, kommt es nicht, wie in diskontinuierlichen Systemen, zu einer möglicherweise toxischen Anreicherung von Produkten. Offene Systeme spielen in der Biologie generell eine bedeutende Rolle, da jeder Organismus als ein offenes System mit kontinuierlichen Energie- und Materieflüssen angesehen werden kann.

Mikrobielle Räuber-Beute-Systeme sind Bestandteil vieler Ökosysteme mit einem zum

Teil erheblichen Einfluss auf deren Dynamik und Leistungsfähigkeit. Im Gegensatz zu klassischen Räuber-Beute-Systemen zweier Säugetiere haben mikrobielle Systeme wesentlich höhere Umsatzraten und kürzere Generationszeiten. Während für das zyklische Auftreten von Kanadaluchs (*Lynx canadensis*) und Schneeschuhhase (*Lepus americanus*) in Kanada, einem sehr bekannten Räuber-Beute-Systeme, eine Zyklusdauer von etwa 10 Jahren ermittelt wurde (BEGON et al., 1997; TAYLOR, 1984), liegen die Generationszeiten für Mikroorganismen im Bereich von Stunden. Auch ihre hohen Fressraten unterscheiden mikrobielle Räuber-Beute-Systeme erheblich von den zuvor genannten klassischen Systemen.

Prozesse wie Nahrungsselektion, Nährstofftransfer und Recycling von Nährstoffen durch Protozoen sind noch immer kaum quantifizierbar. In Hinblick auf Vorgänge wie Algenblüten, Abbau von Toxinen und Reinigungsleistung von Klärprozessen ist ein detaillierteres Verständnis der elementaren Vorgänge wünschenswert. Die vorliegende Arbeit versucht dazu beizutragen.



## 2 Grundlagen

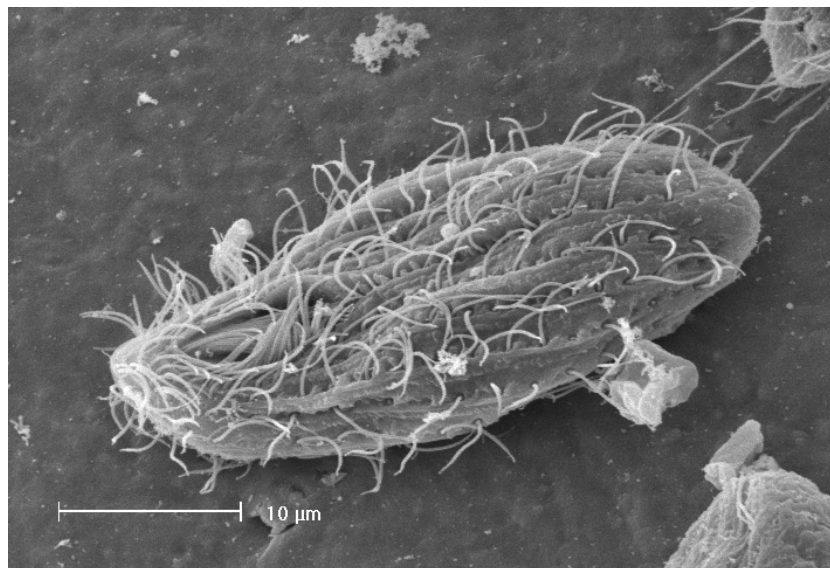
### 2.1 Charakteristika der eingesetzten Organismen

Bei den ausgewählten Kulturorganismen handelt es sich um einen eukaryotischen Organismus, den Ciliaten *Tetrahymena thermophila* und um ein prokaryotisches Lebewesen, das Bakterium *Pseudomonas putida*. Die beiden Einzeller werden im Folgenden näher charakterisiert.

#### 2.1.1 *Tetrahymena thermophila*

*Tetrahymena thermophila* wird als Ciliat systematisch dem Taxon der einzelligen Eukaryoten zugeordnet (siehe auch 8.1). Organismen der Gattung *Tetrahymena* sind seit Jahren Bestandteil zahlreicher Untersuchungen. Neben einer Vielzahl freilebender Arten finden sich innerhalb dieser Gattung auch parasitische Formen (CORLISS, 1973; JEROME et al., 1996a). Die exakte taxonomische Gliederung der Gattung *Tetrahymena* ist noch immer Diskussionspunkt und wird dank moderner Labormethoden wie der Polymerasekettenreaktion (PCR) stetig verfeinert (JEROME et al., 1996b).

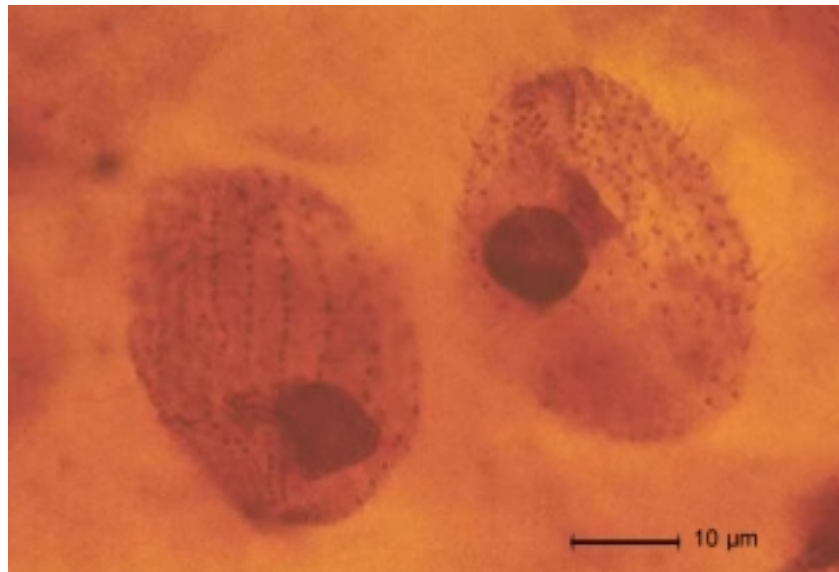
Eine typische Zelle von *Tetrahymena thermophila* ist in Abbildung 2-1 dargestellt.



**Abbildung 2-1: Einzelzelle von *Tetrahymena thermophila* in der Aufsicht, links das gut sichtbare Mundfeld. Rasterelektronenmikroskopische (REM)- Aufnahme (Primärvergrößerung: 2641-fach).**

Charakteristisch ist die birnenförmige Gestalt, die eine gewisse Variation aufweisen kann. Die Zellen sind 30-100  $\mu\text{m}$  lang und durchschnittlich von 23 Kinetiden überzogen (Abbildung 2-1). Diese Cilienreihen dienen zum einen der Mobilität, zum anderen erzeugen sie mit der Ciliatur des Mundfeldes zusammen den zur Nahrungsfiltration

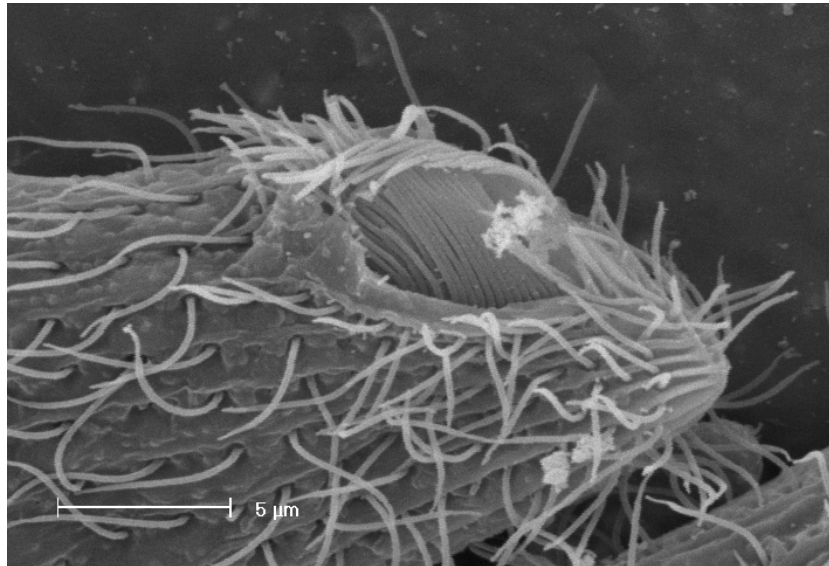
benötigten Flüssigkeitsstrom.



**Abbildung 2-2: Morphologie von *Tetrahymena thermophila*. Gut sichtbar sind die in Reihen (Kinetiden) angeordneten Cilien sowie der große Makronucleus. Lichtmikroskopische Aufnahme im Hellfeld nach Protargolfärbung (Primärvergrößerung: 1000-fach).**



**Abbildung 2-3: Einzelzelle von *Tetrahymena thermophila* nach Silbernitratfärbung. Bei dieser lichtmikroskopischen Aufnahme im Hellfeld sind die Cilienreihen (Kinetiden) als dunkle Strukturen gut zu erkennen (Primärvergrößerung: 1000-fach).**



**Abbildung 2-4: Detailaufnahme des Mundfeldes von *Tetrahymena thermophila* mit der undulierenden Membran am rechten Rand des Cytostom-Cytopharynx-Komplexes. Sichtbar ist ebenfalls eine der drei Membranellen. REM-Aufnahme (Primärvergrößerung: 5000-fach).**

Das Mundfeld von *Tetrahymena* liegt im anterioren Viertel des Tieres und bezeichnet die ventrale Seite der Zelle. Am rechten äußeren Rand des Cytostom-Cytopharynx-Komplexes befindet sich eine undulierende Membran, links davon drei Membranellen (Abbildung 2-4). Vom Cytopharynx werden die aufgenommenen Partikel in Nahrungsvakuolen eingeschlossen. Lysosomen, die Verdauungsenzyme enthalten, verschmelzen mit ihnen. Es wird ein Digestionszyklus durchlaufen. Dieser Zyklus endet nach etwa 2 Stunden mit dem Ausscheiden von unverdauten Nahrungsresten an der Cytopyge am posterioren Ende der Zelle. Der Ausscheidungsprozess scheint somit zufälliger Natur zu sein und sich nicht nach dem Ende der Verdauung zu richten (NILSSON, 1977).

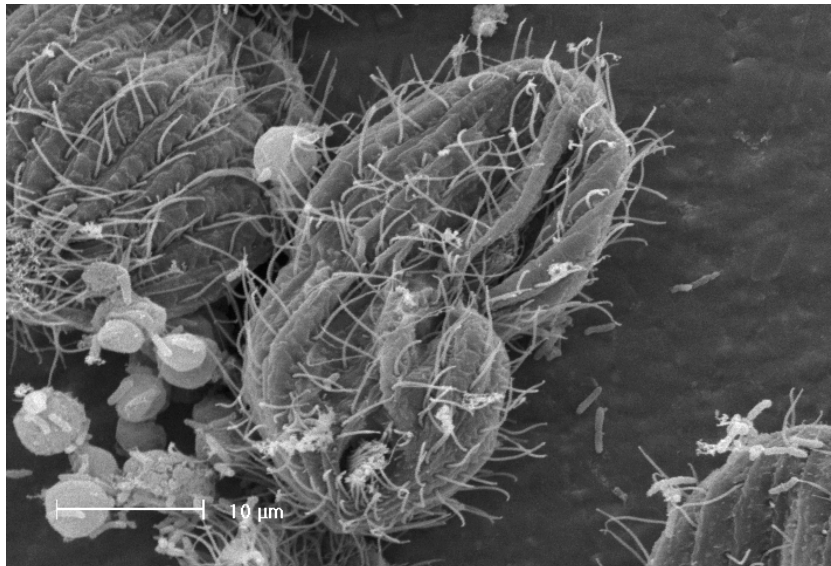
*Tetrahymena* besitzt alle für heterotrophe einzellige Eukaryoten typischen Zellstrukturen wie Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum (ER), Dictyosomen, Lysosomen, Peroxisomen, Ribosomen, Mikrofilamente und Mikrotubuli. Eine Besonderheit ist der bei Ciliaten auftretende Kerndimorphismus. Die Zellen von *Tetrahymena* verfügen über einen großen vegetativen Makronucleus mit einem hochamplifizierten Genbestand (Abbildung 2-5) und einen kleinen generativen Mikronucleus, der diploid ist. Die Aufgabe des Makronucleus ist die Bereitstellung des benötigten genetischen Materials während der Phase vegetativen Wachstums (Ort der RNA-Synthese). Der Mikronucleus dient der Speicherung und Neukombination des genetischen Materials.

Neben der Zweiteilung, einem ungeschlechtlichen Vorgang, kann es auch zu einer Konjugation zwischen unterschiedlichen Paarungstypen kommen, die dem Austausch von Genmaterial dient (MARTINDALE et al. 1982).



**Abbildung 2-5:** Charakterisierung des Makronucleus und des Cytoplasmas nach Färbung mit Toluidinblau. Lichtmikroskopische Aufnahme im Hellfeld (Primärvergrößerung: 1000-fach).

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen von *Tetrahymena thermophila* gehören zu einem Paarungstyp und können sich nur durch Teilung vermehren (Abbildung 2-6).



**Abbildung 2-6:** Einschnürung von *Tetrahymena thermophila* während des Teilungsvorgangs (M-Phase). Am unteren Ende der sich teilenden Zelle ist das Mundfeld der Mutterzelle zu sehen, kurz oberhalb der Einschnürung das neu gebildete Mundfeld der Tochterzelle. REM-Aufnahme (Primärvergrößerung: 2130-fach).



Der Teilungsvorgang resultiert im anterioren Teil in einer Mutterzelle (Proter) und im posterioren Bereich in einer Tochterzelle (Opisthe). Bei diesem Vorgang erfolgt vor der Einschnürung der Zelle eine mitotische Teilung des Mikronucleus, eine Teilung des Makronucleus sowie die Ausbildung eines neuen Mundfeldes. Da die Teilung des Makronucleus nicht immer exakt verläuft, kann es zu Schwankungen im DNA-Gehalt des Makronucleus kommen. Dieses Ungleichgewicht kann innerhalb weniger Zellzyklen ausgeglichen werden (CLEFFMANN 1968, 1980; SEYFERT UND CLEFFMANN, 1982).

Die Zellteilungsrate ist von den Kulturbedingungen abhängig. Von SWIFT et al. (1982b) wird berichtet, dass bei der Übertragung von *Tetrahymena* in eine nahrungsreichere Kultur (shift-up) die Zellteilung verzögert wurde. Das Überimpfen der Zellen in nahrungsrärmeres Medium (shift-down) führt dagegen zu einer Beschleunigung der Zellteilung.

Als bakterivore Spezies findet man *Tetrahymena* in allen limnischen Ökosystemen, die ausreichend Nahrung bieten. In Abhängigkeit vom Nahrungsangebot kommt es zu starken Schwankungen der Populationsdichte, mit einem Maximum in den Sommermonaten, wenn gerade in eutrophen Gewässern ein rapider Anstieg der Bakterienzeldichte festzustellen ist.

In Laborkulturen konnte die Abgabe von lysosomalen, hydrolytischen und proteolytischen Enzymen in das Kulturmedium nachgewiesen werden (BANNO et al., 1983; TIEDTKE UND RASMUSSEN, 1988; KIY UND TIEDTKE, 1991; SUZUKI et al., 1997). Die Abgabe von Exoenzymen legt die Vermutung nahe, dass diese Enzyme extrazelluläre Verdauungsprozesse sowie das Eindringen in Wirte ermöglichen. Sie sind ebenfalls wichtig für die Zellen, die saprozoisch in Insektenkadavern leben und für jene *Tetrahymena*-Arten, die als fakultative oder als obligate Parasiten von Insektenlarven vorkommen (CORLISS, 1973). Interessant ist in diesem Zusammenhang ebenfalls das chemotaktische Verhalten von *Tetrahymena* in Richtung verschiedener Proteine, Peptide oder Aminosäuren, zum Beispiel der Peptidmischung Proteose Pepton (LEICK et al., 1994, 1996). Zusammen mit den wolkenartigen Schwimmustern, die in Tetrahymenakulturen auftreten (WILLE UND EHRET, 1968; LEVANDOWSKY, 1975), können so möglicherweise effektive Konzentrationen von Exoenzymen aufgebaut werden (FLORIN-CHRISTENSEN et al., 1989).

*Tetrahymena thermophila* lässt sich gut in stationären, axenischen Laborkulturen halten und ist daher auch einer der am besten untersuchten Ciliaten.

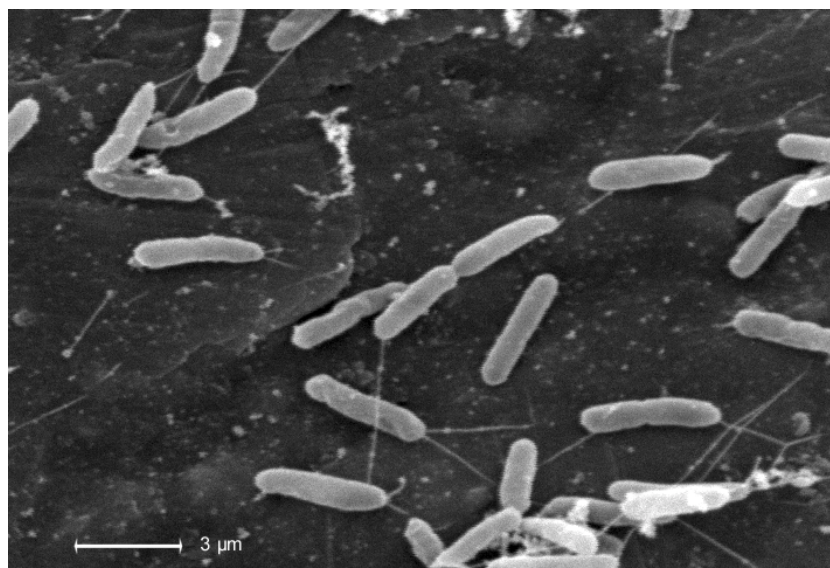
Zur Biologie von *Tetrahymena* gibt es zahlreiche Beiträge, z. B. von ELLIOTT, 1973;

FENCHEL, 1987; HAUSMANN UND BRADBURY, 1996; HAUSMANN UND HÜLSMANN, 1996; WESTHEIDE UND RIEGER, 1996.

### 2.1.2 *Pseudomonas putida*

Zur Familie der Pseudomonaceae gehören die Gattungen *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Frateuria* und *Zoogloea*. Morphologische Charakteristika aller Mitglieder dieser großen und wichtigen Bakteriengruppe sind stäbchenförmige Zellen, eine oder mehrere Flagellen, eine gram-negative Färbereaktion sowie das Fehlen von Sporen. Die Pseudomonaceae sind wichtiger Bestandteil der Mikroflora frei lebender Saprophyten in Böden, limnischen und marinen Habitaten und Abwässern. Vertreter dieser Gruppe findet man aber auch als Erreger von Tier- und Pflanzenkrankheiten.

Die Gattung *Pseudomonas* verkörpert den Prototyp der Familie und lässt sich durch stoffwechselphysiologische Merkmale charakterisieren. So erfolgt die Energiegewinnung durch aerobe Atmung, Gärung tritt in der gesamten Familie nicht auf. Pseudomonaden sind chemoorganotroph und zeichnen sich zusätzlich durch die Fähigkeit aus, eine große Zahl von organischen Verbindungen, darunter auch heterozyklische und aromatische Verbindungen, verwerten zu können. Einige Vertreter sind fakultativ chemolithotroph und können  $H_2$  oder  $CO$  als Energiequelle verwenden. Ein weiteres Merkmal der Pseudomonaden ist die aktive schwimmende Fortbewegung, die durch Flagellen ermöglicht wird. Die Zellen sind  $0,5 - 1 \mu m$  breit und  $1,3 - 5 \mu m$  lang. Sie treten in der Regel einzeln, in Paaren oder in sehr kurzen Ketten auf.



**Abbildung 2-7: Zellen von *Pseudomonas putida* in REM-Aufnahme. Gut zu erkennen sind die stäbchenförmige Gestalt der Zellen sowie die beiden polaren Flagellen. (Primärvergrößerung: 8219-fach).**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Spezies *Pseudomonas putida* ist in Abbildung 2-7 dargestellt. Die Zellen sind etwa 0,7 - 1,1 µm breit, 2,0 - 4,0 µm lang und besitzen meist mehr als ein Flagellum. *Pseudomonas putida* verfügt über mehrere hochinteressante Fähigkeiten. So bilden die Zellen, wenn Eisensalze in begrenzter Menge vorliegen, gelb-grün fluoreszierende Pigmente, sogenannte Siderophoren, deren Aufgabe die Bindung und der Transport von Eisen in die Zelle ist. Außerdem ist *Pseudomonas putida* in der Lage, Trichlorethylen mit einer Toluol-Deoxygenase abzubauen (FRITSCH, 1998). Dies ist gerade in Hinblick auf die Reinigung von Grundwässern, die mit solchen Lösungsmitteln belastet sind, von großem Interesse.

Die klinische Bedeutung von *Pseudomonas putida* ist unklar. Da *Pseudomonas putida* nicht in der Lage ist bei Körpertemperatur zu wachsen, scheint die Gefahr gering zu sein, dass dieses Bakterium ein bedeutendes opportunistisches Pathogen werden kann. Doch auch wenn ihre Virulenz gering ist, sollte *Pseudomonas putida* als potentiell pathogen betrachtet werden (VON GRAEVENITZ UND WEINSTEIN, 1971).

In der Literatur wurde *Pseudomonas* unter anderem von MURRAY et al. 1984; BALOWS et al., 1992; SCHLEGEL, 1992; MADIGAN et al., 1997 beschrieben.

## 2.2 Mikrobielle Lebensgemeinschaften

Mikrobielle Biozöosen mit unterschiedlichem Artenreichtum finden sich in aquatischen und terrestrischen Ökosystemen. Es handelt sich dabei nicht um statische Lebensgemeinschaften, sondern vielmehr um dynamische Systeme, die durch abiotische und biotische Faktoren beeinflusst werden und mit anderen Ökosystemen vernetzt sind.

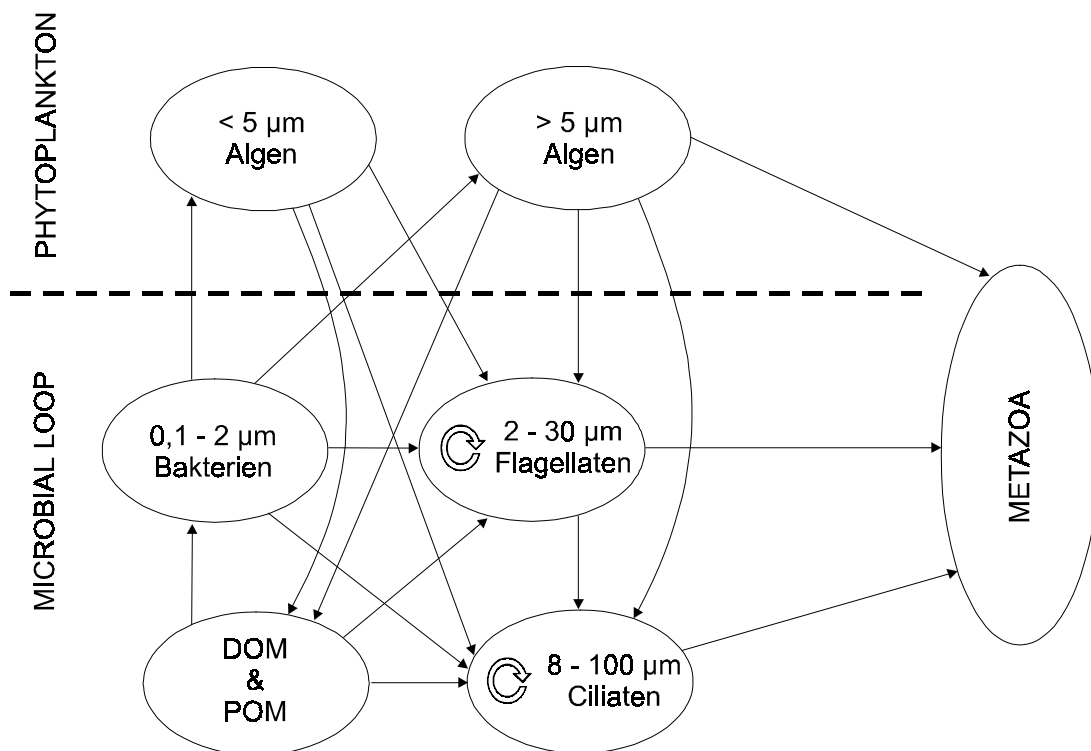
Ebenso wie bei höheren Organismen finden sich in mikrobiellen Lebensgemeinschaften eine Vielzahl von Wechselbeziehungen, die in Tabelle 2-1 dargestellt sind. Es ist möglich, dass die Arten der gegenseitigen Beeinflussung unter verschiedenen Bedingungen oder während aufeinanderfolgender Entwicklungsstufen wechseln (ODUM, 1999).

Typ der Wechselwirkung	Arten		Allgemeine Natur der Wechselwirkung
	A	B	
Neutralismus	o	o	beide Populationen üben keinen direkten Einfluss aufeinander aus
Kommensalismus	o	+	eine Population wird durch eine andere gefördert, ohne dass jene dadurch gehemmt wird
Amensalismus	o	-	eine Population wird durch eine andere gehemmt, ohne dass jene dadurch gefördert wird
Parasitismus, Räuber-Beute-Beziehung	+	-	eine Population wirkt durch direkte Angriffe negativ auf eine andere Population, ist aber nicht abhängig von ihr
Konkurrenz	-	-	beide Populationen beeinträchtigen sich gegenseitig (z.B. Kampf um knappe Ressourcen)
Mutualismus	+	+	Wachstum und Fortbestand beider Populationen sind begünstigt, und keine Population kann unter natürlichen Bedingungen ohne die andere leben

**Tabelle 2-1: Typen der Wechselbeziehungen zwischen zwei Arten A und B. o: ohne Relevanz, +: positiver Einfluss, -: negativer Einfluss (verändert nach CYPIONKA, 1999).**

Symbiose (gr. symbiosis) bedeutet wörtlich Zusammenleben. Dieser bekannte Begriff wird gelegentlich in demselben Sinn wie Mutualismus verwendet, manchmal gleichbedeutend mit Kommensalismus und Parasitismus. Nach ODUM (1999) tendiert man heute eher dazu, Symbiose zur Bezeichnung gegenseitig förderlicher Beziehungen zu verwenden.

Die Wechselbeziehungen spielen eine wichtige Rolle in Hinblick auf die Nahrungsketten in Ökosystemen. Bei der Betrachtung von Fraßnahrungsketten aquatischer Lebensgemeinschaften stand lange Zeit die klassische Nahrungskette im Vordergrund der Betrachtungen: Phytoplankton als Primärproduzenten, Zooplankton als Herbivore, Fische als Carnivore und Top-Carnivore. Diese einfache Betrachtungsweise wird zunehmend durch komplexe mikrobielle Nahrungsnetze ersetzt. Der Begriff des "Microbial Loop" bekommt eine zunehmende Bedeutung bei dem Verständnis der Struktur und Funktion aquatischer Ökosysteme. Unter dem "Microbial Loop" versteht man die Stoff- und Energieflüsse aus Detritus (Particular Organic Matter = POM) und gelöster organischer Substanz (Dissolved Organic Matter = DOM). POM, bestehend aus totem tierischem und pflanzlichem Material, wird von Detritusfressern im Sediment eines Gewässers aufgenommen und gelangt so in die Detritusnahrungskette. Das vom Phytoplankton ausgeschiedene DOM wird von Bakterien in feste bakterielle Biomasse umgewandelt. Bakterien werden von pelagischen Flagellaten oder Ciliaten gefressen (LAMPERT UND SOMMER, 1993; SCHWOERBEL, 1993; ODUM, 1999). Die trophischen Interaktionen sind in Abbildung 2-8 dargestellt.



**Abbildung 2-8: Trophische Wechselwirkungen innerhalb des mikrobiellen Nahrungsnetzes, aufgetrennt in Phytoplankton und "Microbial Loop". Der Pfeil innerhalb der Gruppe der Flagellaten und der Ciliaten weist auf weitere Räuber-Beute-Beziehungen innerhalb dieser umfangreichen Organismengruppen hin (verändert nach SHERR UND SHERR, 1988).**

Bei der Untersuchung der Rolle und Auswirkung von Bakterienfraß auf aquatische Systeme müssen zwei zentrale Aspekte in Betracht gezogen werden:

1) Von einem funktionellen Standpunkt aus betrachtet ist Bakterienfraß einer der Hauptmechanismen zur Nährstoffregeneration (AZAM et al., 1983) und dient dem Transfer von Energie in höhere Trophieebenen, die dem Nahrungsnetz sonst verloren gehen würde (SHERR UND SHERR, 1988).

2) Von einem strukturellen Standpunkt aus betrachtet könnte Bakterienfraß einen der Haupteinflüsse auf die phäno- und genotypische Zusammensetzung einer Bakterienpopulation darstellen (JÜRGENS UND GÜDE, 1994). Begründet ist diese Hypothese durch die Tatsache, dass Bakterien zu den ältesten Lebensformen auf der Erde zählen, und sich Räuber-Beute-Beziehungen vermutlich sehr früh in der Geschichte der Bakterien und ihrer Prädatoren entwickelt haben. Untersuchungen stützen die Vermutung, dass der Fressdruck von Bakterivoren einen starken Einfluss auf die Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften hat (GÜDE, 1979).

Die Dynamik des "Microbial Loop" ist von mehreren interagierenden ökologischen Wechselwirkungen geprägt: Kommensalismus, Konkurrenz und Prädation. Kommensalismus tritt auf bei der DOM-Produktion durch Phytoplankton und dessen Konsum durch Bakterien, Konkurrenz um Mineralstoffe zwischen Phytoplankton und Bakterien und Prädation von Bakterien durch Protozoen (AZAM et al., 1983).

Auch in den Laborkulturen, die in der Regel nur einen Ausschnitt des "Microbial Loop" widerspiegeln, treten diese Wechselwirkungen auf. In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Laborökosystem ist mit Konkurrenz um Mineralstoffe zwischen Bakterien und Ciliaten zu rechnen, und die Prädation von *Pseudomonas putida* durch *Tetrahymena thermophila* ist Hauptuntersuchungsgegenstand der Arbeit.

Neben der Konkurrenz zwischen zwei Arten ist die innerartliche Konkurrenz ein wichtiges Phänomen, das gerade bei sehr dicht gewachsenen Laborkulturen zu beachten ist.

### **2.3 Räuber-Beute-Systeme**

Räuber-Beute-Wechselwirkungen zwischen freilebenden aquatischen Bakterien und bakterivoren Protozoen haben sich über einen Zeitraum von mehr als einer Milliarde Jahren entwickelt. Dieser lange Entwicklungszeitraum und die kurzen Generationszeiten beider Organismengruppen legen die Vermutung nah, dass sich ein hoher Grad an evolutiver Adaptation auf beiden Seiten herausgebildet hat. Bakterien haben möglicherweise Abwehrmechanismen entwickelt, die einen Fraßschutz

darstellen (preingestional strategies) oder eine Verdauung durch ihre protozoischen Räuber verhindern (postingestional strategies). Die Protozoen werden vermutlich ihrerseits Strategien entwickelt haben, diese Mechanismen zu umgehen (HAHN UND HÖFLE, 1998). Genauere Informationen über diese Strategien gibt es bisher noch nicht. Felduntersuchungen haben aber gezeigt, dass Bakterienpopulationen oft die stabilste Komponente in planktonischen Lebensgemeinschaften sind. Sowohl in limnischen als auch in marinen Habitaten gibt es Hinweise auf sogenannte "grazing-resistant bacteria" (GRB), die durch morphologische und chemische Veränderungen sowie Verhaltensänderungen und durch Wachstum in räumlichen Nischen ihre Überlebenschancen erhöhen. Die Zellgröße scheint bezüglich der Fraßwahrscheinlichkeit ein wichtiger Faktor zu sein, da Zellen im unteren und oberen Größenbereich der Bakteriengrößenverteilung in geringerem Maße gefressen werden (JÜRGENS UND GÜDE, 1994). Je nachdem um welchen Räuberorganismus es sich handelt, kann auch die Aggregation von Bakterien als Fraßschutz dienen. Es gibt aber auch Prädatoren (z. B. Arten von Mikroflagellaten), die aggregierte Bakterien als Beute bevorzugen (SIBBALD UND ALBRIGHT, 1988). HAHN et al. (1999) haben gezeigt, dass die Fadenbildung bei fakultativ fädigen Bakterienspezies von der Wachstumsrate abhängt. Sie wird indirekt durch Prädatoren stimuliert, indem die Reduktion der Biomasse zu einer erhöhten Wachstumsrate und damit zu einer verstärkten Fadenbildung führt. In Abhängigkeit von den eingesetzten Bakterienstämmen ist die Wachstumsrate von bakterivoren Protozoen sehr unterschiedlich. So konnten CURDS UND VANDYKE (1966) zeigen, dass es in Abhängigkeit von den eingesetzten Bakterienstämmen nicht nur zu einem verminderten Protozoenwachstum kommt, sondern dass sogar auf die Bakterien zurückzuführende toxische Effekte auftraten. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass Protozoen bei Eintrag eines alternativen Beuteorganismus ihre Präferenz wechseln und eine Beutespezies stärker dezimieren als eine andere (GURIJALA UND ALEXANDER, 1990). Die Wachstumsrate einzelner Bakterienspezies ist essentiell für ihre Überlebenschance. Bakterien überleben dann, wenn ihre Verdopplungsrate größer ist als die Eliminationsrate durch Prädation. Zu einer Eliminierung einer nicht wachsenden Bakterienspezies kann es innerhalb einer Kultur dann kommen, wenn gleichzeitig eine zweite schnellwachsende Art vorhanden ist (MALLORY et al., 1983). FENCHEL (1980a, 1980b) hat gezeigt, dass die Fress- und Wachstumsraten von Protozoen von der Zelldichte verfügbarer Beuteorganismen abhängen. Unterhalb einer Beutezelldichte zwischen  $10^6$  und  $10^7$  Zellen pro ml Ciliaten findet keine Vermehrung der Protozoen mehr statt. FENCHEL UND JØRGENSEN (1977) weisen in ihrer Arbeit darauf hin, dass die

Detritusumsetzung durch Bakterien in Anwesenheit von räuberischen Protozoen mit einer höheren Umsatzrate erfolgt. Als Ursache vermuten sie eine Stimulation der Bakterien durch von Ciliaten ausgelöste Mikroturbulenzen oder eine erhöhte Freisetzung löslicher Nährstoffe und hydrolysierten organischen Materials aus Detrituspartikeln auf Grund einer geringeren Bakterienbesiedlung dieser Partikeln.

Alle oben genannten Feststellungen leiten auch schon zu der zentralen Frage über, die sich bei der Untersuchung von Räuber-Beute-Systemen stellt: Kommt es zu einer Koexistenz der Organismen oder zur Extinktion? Werden beide Organismen, Räuber und Beute, im System überleben, oder wird der Räuber den Beuteorganismus eliminieren und sich damit selbst ruinieren? Werden die Räuber aussterben, und wird die Beute alleine gedeihen? Falls beide Organismen nebeneinander vorkommen, stellt sich zudem die Frage, ob die Zelldichten eines solchen Systems konstant bleiben oder schwingen.

Das Studium mikrobieller Räuber-Beute-Systeme in der Natur gestaltet sich auf Grund der Einwirkung vielfältiger abiotischer und biotischer Faktoren extrem schwierig. Daher versucht man in Laborexperimenten die abiotischen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und Nährstoffversorgung definiert und konstant zu halten und die Zahl der im System lebenden unterschiedlichen Organismen zu kontrollieren. Meistens wurden solche mikrobiellen Laborökosysteme mit zwei oder drei unterschiedlichen Mikroorganismen betrieben.

Neben den klassischen Studien von Gause (GAUSE, 1934 in FREDRICKSON, 1977) haben sich zahlreiche andere Arbeiten mit der Thematik der mikrobiellen Räuber-Beute-Systeme in Laborkulturen befasst (unter anderem: VAN DEN ENDE, 1973; JOST et al., 1973; CURDS UND BAZIN, 1977; FREDRICKSON, 1977; FENCHEL, 1980a, 1980b; SWIFT et al., 1982a; MALLORY et al., 1983; GLASER, 1988; SAMBANIS UND FREDRICKSON, 1988; GURIJALA UND ALEXANDER, 1990).

Laborsysteme unterscheiden sich in vielen Faktoren von natürlichen Systemen, und es bleibt zu bedenken, dass sich die Organismen in solchen idealisierten Systemen nur bedingt so verhalten wie in ihrer natürlichen Umgebung. Aus diesem Grund sollte das primäre Ziel von Studien zur mikrobiellen Ökologie anhand von Laborsystemen die Aufklärung von biologischen Gesetzmäßigkeiten zur Kontrolle der Fressraten, des Wachstums und der Reproduktion der kultivierten Populationen sein (SWIFT et al., 1982).

Die teilweise nur geringe Analogie zwischen Laborsystemen und der natürlichen Umgebung wird häufig kritisiert. Dennoch sind Bioreaktoren die beste verfügbare

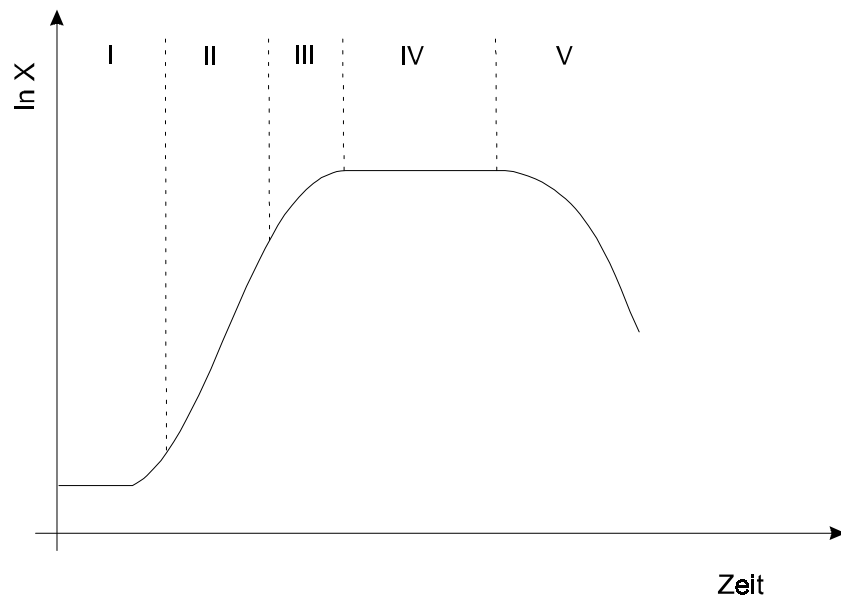


Methode, um die Interaktion mikrobieller Populationen unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen, denn sie bieten definierte und daher auch diskutierbare Kulturbedingungen (FREDRICKSON, 1977).

## 2.4 Kontinuierliche Kulturen

### 2.4.1 Kinetik des Zellwachstums

Wird ein Reaktor, dessen Medium alle notwendigen Komponenten zunächst im Überschuss enthält, mit Zellen beimpft, so wachsen die Zellen in charakteristischer Weise heran. Nach einer anfänglichen Adaptationsphase (lag-phase) wachsen die Zellen mit einer maximalen Verdopplungsrate heran. Je mehr Biomasse vorhanden ist, desto größer ist die Wachstumsgeschwindigkeit. Diese exponentielle Phase wird auch als logarithmische Phase (log-phase) bezeichnet, weil die Messdaten bei halblogarithmischer Auftragung auf einer Geraden liegen. In einem geschlossenen System wird durch die abnehmende Substratkonzentration oder Akkumulation inhibitorischer Produkte eine kurze Übergangsphase eingeleitet, die nach dem Erreichen einer maximalen Zelldichte in die stationäre Phase übergeht. Ihr schließt sich eine Absterbephase an, in der die Zelldichte abnimmt (Abbildung 2-9).



**Abbildung 2-9:** Die Wachstumsphasen einer mikrobiellen Batch-Kultur, Logarithmus der Zelldichte gegen die Zeit. Phase I: Adaptationphase oder lag-phase, Phase II: Phase des exponentiellen Wachstums oder log-phase, Phase III: Übergangsphase, Phase IV: stationäre Phase, Phase V: Absterbephase.

Mathematisch kann das Zellwachstum in der exponentiellen Phase (Abbildung 2-9, Phase II) mit folgender Differentialgleichung beschrieben werden:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

**Gl. 1**

mit der Anfangsbedingung  $X = X_0$  und  $t = t_{\text{Ende der Adaptationsphase}}$

Dabei ist  $X$  die Zelldichte und  $\mu$  die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit. Wenn das Medium alle benötigten Wachstumskomponenten enthält, dann ist die Wachstumsgeschwindigkeit ( $dX/dt$ ) der Zelldichte proportional.

Lösung der Gleichung Gl. 1 (mit  $\mu = \text{konstant}$ ) führt zu:

**Gl. 2**

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Mit Hilfe der Logarithmengesetze wird Gl. 2 umgeformt zu:

**Gl. 3**

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \quad \text{bzw.} \quad \ln \frac{X}{X_0} = \mu \cdot t$$

Da  $X_0$  die Zelldichte zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase ist, kann man daraus die Zeit berechnen, die zur Verdopplung der Zellkonzentration benötigt wird. Die Verdopplungszeit  $t_D$  erhält man aus Gleichung Gl. 3 mit  $X = 2 \cdot X_0$ :

**Gl. 4**

$$t_D = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Die Verdopplungszeit  $t_D$  und die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\text{max}}$  sind Parameter, die organismenspezifisch sind und sich daher von Spezies zu Spezies unterscheiden. Gl. 4 setzt voraus, dass jede Zelle potentiell teilungsfähig ist. Diese Annahme ist durchaus zulässig, aus biologischer Sicht sollte dennoch erwähnt werden, dass sich nicht alle Zellen einer Kultur gleich verhalten. Sie lassen sich in eine Fraktion sich teilender Zellen und einer Fraktion ruhender Zellen aufspalten.

Die Absterbephase der Zellen (Abbildung 2-9, Phase V) folgt ebenso wie die Wachstumsphase einem exponentiellen Verlauf. Analog zum Zellwachstum gilt folgende Differentialgleichung:

$$\frac{dX}{dt} = -k \cdot X$$

**Gl. 5**

mit der Anfangsbedingung  $X = X_A$  und  $t = t_{\text{Ende der stationären Phase}}$

Dabei ist  $X$  die Zelldichte und  $k$  die spezifische Sterbegeschwindigkeit.

Lösung der Gleichung Gl. 5 (mit  $k = \text{konstant}$ ) führt zu:

**Gl. 6**

$$X = X_A \cdot e^{-k \cdot t}$$

Da  $X_A$  die Zelldichte zu Beginn der exponentiellen Absterbephase ist, kann man daraus die Zeit berechnen, die zur Halbierung der Zellkonzentration benötigt wird. Die Halbwertszeit  $t_H$  erhält man, indem man in Gleichung Gl. 6  $X = \frac{1}{2} X_A$  einsetzt:

**Gl. 7**

$$t_H = \frac{\ln 2}{k}$$

#### 2.4.2 Kontinuierliche Bioreaktoren

Stationäre Kulturen (Batch-Kulturen) sind das einfachste Verfahren, um Zellen oder Mikroorganismen auf einem Nährboden oder in einem Bioreaktor wachsen zu lassen. In einem Medium, das alle notwendigen Nährstoffe enthält, wachsen die Zellen heran, bis ein essentieller Nahrungsbestandteil verbraucht ist, oder es zu einer toxischen Anreicherung von Stoffwechselprodukten kommt. Die diskontinuierliche Betriebsweise ist dadurch gekennzeichnet, dass der Bioreaktor nach dem Animpfen mehr oder weniger sich selbst überlassen wird. Es kommt zu einer ständigen Änderung von Milieuparametern, da zu Beginn eines solchen Experiments hohe Substratkonzentrationen vorliegen, die zunehmend verringert werden, wohingegen die Produkt- und Nebenproduktkonzentrationen ständig ansteigen. Lediglich die Sauerstoffzufuhr erfolgt in Batch-Prozessen kontinuierlich, ansonsten handelt es sich um ein abgeschlossenes System.

Semikontinuierliche Zulaufverfahren (Fed-Batch-Kultur) sind teiloffene Systeme, bei denen eine abgezogene Volumenmenge ersetzt oder ein Volumen im Laufe der Kulturzeit erhöht wird. In der Fed-Batch-Betriebsweise lässt sich die Substratlimitierung durch die diskontinuierliche Zugabe von frischem Medium verbessern. Dennoch kommt es auch unter diesen Kulturbedingungen zu einer Anreicherung von

Endprodukten mit negativen Auswirkungen auf das Zellwachstum.

Dagegen wird in kontinuierlichen Kulturen konstant frisches Medium zu- und verbrauchtes Medium abgeführt. Diese Systeme sind mit der Gas- und Flüssigkeitsphase nach außen hin offen. Es tritt ständig flüssiges Medium in das System ein und es wird laufend Kulturflüssigkeit aus dem System entfernt.

Der Fluss des Mediums durch das System wird durch die Durchflussgeschwindigkeit  $\dot{V}$  (oder Flussrate) angegeben, die definiert ist als:

$$\text{Gl. 8} \quad \dot{V} = \frac{\text{Volumen Lösung}}{\text{Zeit}} \left[ \frac{\text{ml}}{\text{h}} \right]$$

In der kontinuierlichen Kultur wird sie immer in Beziehung zu dem Reaktorvolumen  $V$  betrachtet, was zur spezifischen Verdünnungsgeschwindigkeit  $D$  führt:

$$\text{Gl. 9} \quad D = \frac{\dot{V}}{V} \left[ \frac{1}{\text{h}} \right]$$

Die zeitliche Änderung der Zelldichte  $dX/dt$  in einer kontinuierlichen Kultur ergibt sich aus der Differenz zwischen Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen  $\mu \cdot X$  und ihrer Austragsgeschwindigkeit  $D \cdot X$ . Die Biomassebilanz in einem kontinuierlichen System lautet daher:

$$\text{Gl. 10} \quad \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X = (\mu - D) X$$

Im Fließgleichgewicht stellt sich eine konstante Zelldichte im Reaktor ein,  $dX/dt = 0$ . Diese erreichte konstante Zelldichte ist bei Experimenten mit *Tetrahymena* sp., trotz Variation der Verdünnungsrate, immer gleich. Nach Gleichung Gl. 10 ist die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  in diesem Fall gleich der Verdünnungsrate  $D$ :

$$\text{Gl. 11} \quad \mu = D$$

Aus Gleichung Gl. 11 geht als besonderer Vorteil der kontinuierlich betriebenen Kultur die Möglichkeit hervor, eine biologische Größe ( $\mu$ ) durch eine physikalische Größe ( $D$ ) einstellen zu können. Dies ist in Batch-Kulturen nicht und in Fed-Batch-Kulturen nur schwer und zeitlich eng begrenzt realisierbar (CHMIEL, 1991).

Es werden zwei Betriebsweisen von kontinuierlichen Bioreaktoren unterschieden: der Turbidostat und der Chemostat.

Beim Turbidostatenverfahren wird die Biomassekonzentration geregelt, indem man zum Beispiel die Trübung der Kultur misst und die Flussrate durch das System entsprechend reguliert. Da die Wachstumsrate in diesem System nicht substratlimitiert ist, wachsen die Zellen mit ihrer maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit.

**Gl. 12** 
$$D = \mu_{\max}$$

Bei einem Chemostaten wird die Verdünnungsrate des Systems geregelt und so die Konzentration einer wachstumslimitierenden chemischen Substanz konstant gehalten. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit wird durch externe Faktoren bestimmt und die Zellen wachsen mit einer spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu < \mu_{\max}$ .

**Gl. 13** 
$$D < \mu_{\max}$$

Durch ihre höhere Produktivität gegenüber Batch-Verfahren sind kontinuierliche Kulturverfahren auch in der Industrie von großem Interesse. Sie bieten die verfahrenstechnische Möglichkeit, Mikroorganismen über längere Zeit bei einer gegebenen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit zu halten. Sie ermöglichen außerdem eine zeitlich konstante Produktqualität, den Betrieb bei kleinen Reaktorvolumina und eine vermehrte Möglichkeit zur Automatisierung.

Die Technik kontinuierlicher Kulturen wird in industriellen Prozessen seit über fünfzig Jahren angewendet. Zu den ersten Anwendungen zählten die Essigherstellung, die Vermehrung von Hefen und die Abwasserbehandlung in Tropffiltern und Belebtschlammverfahren (BROWN, 1990).

### **2.4.3 Vergleich von Bioreaktoren und Organismen**

Es gibt enge konstruktive Entsprechungen zwischen kontinuierlichen Bioreaktoren und Organismen bezüglich ihrer Struktur und Funktion. In beiden Fällen handelt es sich um offene energiedissipative Mehrphasensysteme, die sich im Fließgleichgewicht befinden. In beiden Systemen gibt es eine stationäre Phase als Träger der katalytischen Eigenschaft (Zellen im Organismus, Mikroorganismen im Reaktor) und eine mobile Phase, die dem Transport der Substrate dient. Die Umsätze in Organismen wie auch in Bioreaktoren können mit den Gesetzmäßigkeiten der heterogenen Katalyse analysiert werden (SERNETZ et al., 1985, 1986). Bei Säugetieren

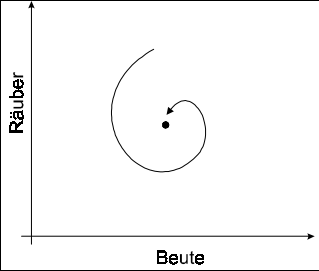
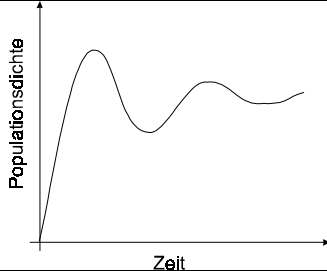
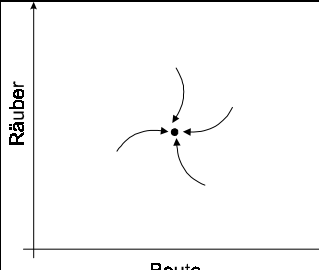
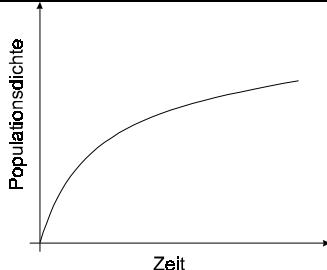
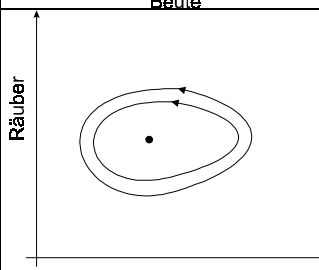
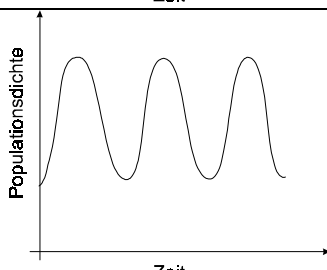
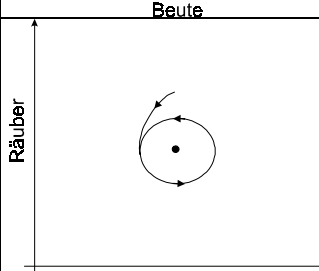
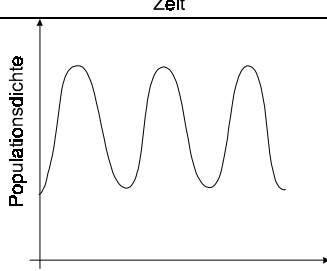
wird zum Beispiel die Versorgung der Gewebe (stationäre Phase) über ein sehr effizientes Kreislaufsystem gewährleistet. Durch das fraktal strukturierte Blutgefäßsystem wird das Blut (mobile Phase) von einem mit niedrigem Energieaufwand pumpenden Herzen angetrieben und so eine quasi-turbulente Strömung erzeugt. Durch die fraktale Struktur der Gewebe und somit auch der Grenzflächen zwischen flüssiger und fester Phase werden die Diffusionsstrecken, die die maximalen Umsatzraten limitieren, reduziert.

Die fraktale Struktur des Blutgefäßsystems ist das strukturelle Äquivalent der turbulenten Strömung in einem turbulent durchmischten kontinuierlichen Rührkessel (Continuous Stirred Tank Reactor - CSTR). Um diese Strömung zu erzeugen, muss im Reaktor ein hoher Energieeintrag durch den Rührer erfolgen, um so den Zellen (feste Phase) einen optimalen Stoffaustausch mit dem Kulturmedium (flüssige Phase) zu gewährleisten.

Zum Themenbereich Biotechnologie wurden die Lehrbücher folgender Autoren genutzt: EINSELE et al., 1985; MCNEIL UND HARVEY, 1990; CHMIEL, 1991; TREVAN et al., 1993; STORHAS, 1994.

## **2.5 Mathematische Modelle zur Analyse von Räuber-Beute-Beziehungen**

Die Analyse mathematischer Modelle zur Beschreibung von Räuber-Beute-Beziehungen stellt einen Versuch dar, Einblicke in mögliche Mechanismen eines gegebenen Systems zu gewinnen. CURDS UND BAZIN (1977) beschreiben vier prinzipiell unterschiedliche stabile Gleichgewichtszustände für die Koexistenz von Räubern und Beute. Die Gleichgewichtszustände werden erreicht durch 1. eine asymptotische Annäherung an eine Gleichgewichtsdichte, 2. eine gedämpfte Schwingung, 3. das Hineinlaufen in eine ungedämpfte Schwingung und 4. durch eine ungedämpfte Schwingung in Abhängigkeit von den Startbedingungen. Die theoretisch möglichen stabilen Gleichgewichtszustände eines Räuber-Beute-System sind in Tabelle 2-2 dargestellt.

Art des Gleichgewichtspunktes	Phasendiagramm	Experimentelle Beobachtung (es ist nur die Reaktion der Räuber dargestellt)	erwartete Veränderung
stabiler Fokus			gedämpfte Schwingung
stabiler Knoten			asymptotische Annäherung an einen Gleichgewichtszustand
Grenzyklus			ungedämpfte Schwingung, abhängig von Ausgangsbedingungen
Vortex			ungedämpfte Schwingung, unabhängig von Ausgangsbedingungen

**Tabelle 2-2: Möglichkeiten von stabilen Räuber-Beute-Beziehungen (verändert nach CURDS UND BAZIN, 1977).**

Experimentelle Batch-Kulturen von Mikroorganismen können analog einem geschlossenen Ökosystem betrachtet werden. Eines der bekanntesten mathematischen Modelle zur Beschreibung eines solchen Systems ist das nichtlineare Differentialgleichungsmodell von Lotka und Volterra. Für zwei Spezies lauten die Gleichungen (nach CANALE et al., 1973; CURDS UND BAZIN, 1977):

Gl. 14 
$$\frac{dB}{dt} = \alpha_1 B - \beta_1 B R$$

**Gl. 15** 
$$\frac{dR}{dt} = -\alpha_2 R + \beta_2 BR$$

Dabei ist  $t$  die Zeit,  $B$  die Zelldichte der Beute,  $R$  die Zelldichte der Räuber,  $\alpha_1$  die spezifische Wachstumsrate der Beute,  $\alpha_2$  die spezifische Absterberate der Räuber,  $\beta_1$  die spezifische Fressrate,  $\beta_2$  die spezifische Wachstumsrate der Räuber.

Der Ansatz des Lotka-Volterra-Modells bezieht sich auf stationäre Kulturen. Die Lösung der Gleichungen ergibt eine ungedämpfte Schwingung der Räuber- und Beutepopulation und ein Koexistenzgleichgewicht vom Vortex Typ (siehe Tabelle 2-2). Das Lotka-Volterra-Modell suggeriert außerdem ein exponentielles Wachstum der Beute in Abwesenheit des Räubers und ein unbeschränktes Wachstum der Räuber bei hohen Beutezellichten. Diese Annahmen sind für ein mikrobielles Räuber-Beute-System nicht realistisch.

Für die meisten theoretischen Arbeiten, die sich mit der Analyse von Räuber-Beute-Beziehungen auseinandersetzen, dienen noch immer das Lotka-Volterra-Modell oder Modifikationen dieses Modells als Grundlage. Da die einfachen Annahmen, die in dem Modell von Lotka und Volterra gemacht wurden, die komplexeren Vorgänge in der Natur nur bedingt simulieren, ist das Ziel aller Modifikationen dieses Gleichungssystems, es den natürlichen Gegebenheiten realistischer anzupassen (JÜRGENS UND GÜDE, 1994).

Eine Modifikation des Lotka-Volterra-Modells ist der Ansatz von Monod. In diesem Modell wird der Gleichungsansatz von Lotka und Volterra (Gl. 14, Gl. 15) um eine Gleichung für die Substratkonzentration erweitert, und die konstanten Wachstums- und Fressraten werden durch einen kinetischen Term ersetzt. Diese Kinetik entspricht dem Ansatz von Michaelis und Menten zur Enzymkinetik und lautet (nach CANALE, 1970) für die Wachstumsrate der Beute:

**Gl. 16** 
$$\alpha_1 = \frac{\mu_{\max B} S}{K + S}$$

und für die Wachstumsrate der Räuber:

**Gl. 17** 
$$\beta_2 = \frac{\mu_{\max R} B}{L + B}$$



Das Modell von Monod berücksichtigt außerdem die Durchflussrate des Systems und ist damit auch auf kontinuierliche Versuchsansätze anwendbar. Die Differentialgleichungen des Monod-Modells lauten (nach CANALE, 1970; CURDS UND BAZIN, 1977):

$$\text{Gl. 18} \quad \frac{dB}{dt} = \frac{\mu_{\max B} S}{K + S} B - \frac{1}{Y_R} \frac{\mu_{\max R} B}{L + B} R - D B$$

$$\text{Gl. 19} \quad \frac{dR}{dt} = \frac{\mu_{\max R} B}{L + B} R - D R$$

$$\text{Gl. 20} \quad \frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_B} \frac{\mu_{\max B} S}{K + S} B + D (S_Z - S)$$

Dabei ist  $t$  die Zeit,  $B$  die Zelldichte der Beute,  $R$  die Zelldichte der Räuber,  $\mu_{\max R}$  die maximale spezifische Wachstumsrate der Räuber,  $\mu_{\max B}$  die maximale spezifische Wachstumsrate der Beute,  $K$  die Halbsättigungskonstante der Wachstumskinetik der Beute,  $L$  die Halbsättigungskonstante der Wachstumskinetik der Räuber,  $Y_R$  der Ausbeutekoeffizient zur Umrechnung von Wachstums- in Fressraten,  $Y_B$  der Ausbeutekoeffizient zur Umrechnung von Wachstums- in Aufnahmezeiten,  $S$  die Substratkonzentration,  $S_Z$  die Substratkonzentration im Zulauf und  $D$  die Verdünnungsrate.

Laborstudien kontinuierlicher Kulturen von *Tetrahymena pyriformis* und *Escherichia coli* oder *Azotobacter vinelandii* (JOST et al., 1973a) haben gezeigt, dass bei Schwingungen des Räuber-Beute-Systems die im Monod-Modell vorhergesagten minimalen Beutezellichten zu gering waren und die Restkonzentration des limitierenden Substrats deutlich größer war als im Modell angenommen. JOST et al. (1973b) vermuten, dass Unterschiede zwischen den theoretischen Annahmen des Monod-Modells und den Versuchsergebnissen im Labor darin zu suchen sind, dass sich die Verteilung der Zellgrößen der Räuber-Population in dynamischen Situationen, also während Räuber-Beute-Schwingungen, verschiebt. Das Modell von Monod sagt außerdem ein Aussterben der Beutepopulation voraus, was in Laborexperimenten jedoch nicht auftritt (SAMBANIS et al., 1987).

Verschiedene Autoren untersuchten Modifikationen des Monod-Modells. Es wurden Erweiterungen für das Wachstum der Bakterien auf autochthonen Substanzen

eingeführt (SAMBANIS et al., 1987) und das Wachstum der Bakterien an der Gefäßwand berücksichtigt (TOPIWALA UND HAMER, 1971; BONOMI UND FREDRICKSON, 1976; SAMBANIS UND FREDRICKSON, 1989).

Das Modell von PAVLOU (1985) beschreibt die Dynamik eines Chemostaten, in dem sich eine Räuberpopulation von einer Beutepopulation ernährt, die wiederum durch einen Mangelfaktor im Medium limitiert wird, mit drei einfachen Differentialgleichungen. Details des Fressprozesses werden dabei außer Acht gelassen:

$$\text{Gl. 21} \quad \frac{dR}{dt} = -DR + v(B)R$$

$$\text{Gl. 22} \quad \frac{dB}{dt} = -DB + \mu(S)B - \frac{1}{X} v(B)R$$

$$\text{Gl. 23} \quad \frac{dS}{dt} = D(S_z - S) - \frac{1}{Y} \mu(S)B$$

Dabei ist  $t$  die Zeit,  $B$  die Zelldichte der Beute,  $R$  die Zelldichte der Räuber,  $v(B)$  die spezifische Wachstumsrate der Räuber,  $\mu(S)$  die spezifische Wachstumsrate der Beute,  $X$  der Ausbeutekoeffizient der Produktion der Räuberpopulation,  $Y$  der Ausbeutekoeffizient der Produktion der Beutepopulation,  $S$  die Substratkonzentration,  $S_z$  die Substratkonzentration im Zulauf und  $D$  die Verdünnungsrate.

In diesem Ansatz werden für  $v(B)$  und  $\mu(S)$  keine speziellen Funktionen angenommen, sondern es wird nur vorausgesetzt, dass es sich um streng monoton wachsende Funktionen handelt, die gleich Null sind, wenn ihre Argumente gleich Null sind, und die zu Werten von  $v_{\max}$  und  $\mu_{\max}$  tendieren, wenn ihre Argumente in Richtung unendlich gehen.

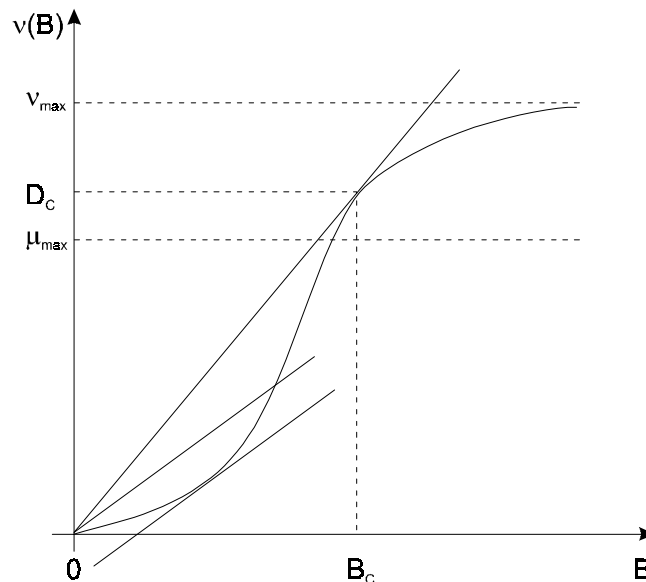
Nach PAVLOU (1985) gibt es für dieses Differentialgleichungssystem drei Fließgleichgewichte:

- 1) Auswaschung beider Populationen:  $R = 0$ ;  $B = 0$ ;  $S = S_z$ ;
- 2) Auswaschung der Räuberpopulation:  $R = 0$ ;  $B > 0$ ;  $S_z > S > 0$  und
- 3) Koexistenz beider Populationen:  $R > 0$ ;  $B > 0$ ;  $S_z > S > 0$ .

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte eine Koexistenz der Räuber- und der Beutepopulation nachgewiesen werden. Die eingesetzten Verdünnungsraten waren mit  $D = 0,07/d$ ,  $D = 0,16/d$  und  $D = 0,27/d$  so gering, dass eine Auswaschung der Räuber oder beider Populationen auszuschließen war. Daher wird im Folgenden auch nur auf den 3. Fall eingegangen und auf die mathematischen Bedingungen, die zur Untersuchung der Stabilität des Systems im Fall einer Koexistenz zu beachten sind. Der Wert für  $B$  für dieses Fließgleichgewicht ergibt sich aus:

$$\text{Gl. 24} \quad B = v^{-1}(D)$$

$v^{-1}$  ist die zu  $v$  eindeutig definierte inverse Funktion. Voraussetzung für die Gültigkeit der Gleichung Gl. 24 ist, dass  $D < v_{\max}$  ist.

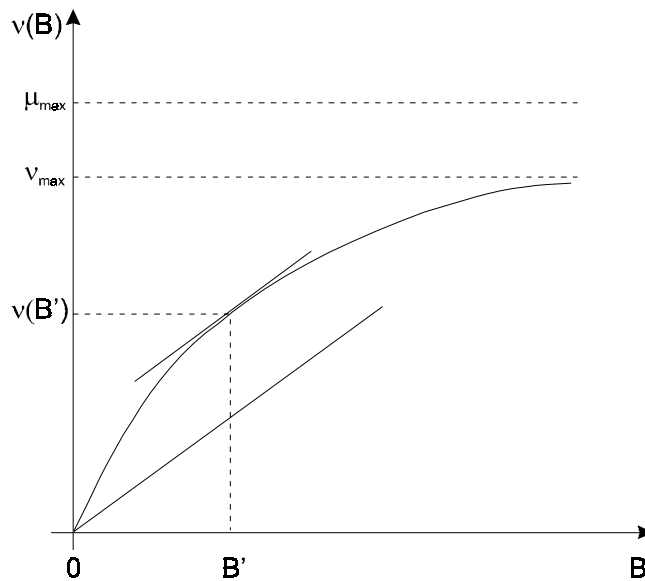


**Abbildung 2-10: Beispiel einer Kurve der spezifischen Wachstumsrate für den Fall, dass  $F(B) \leq 0$  für alle  $B$  bei denen gilt:  $D < \mu_{\max} < v_{\max}$ , verändert nach PAVLOU (1985).**

Die Funktion  $F(B)$  gilt für jedes  $B$  aus Gleichung Gl. 24, mit der Bedingung, dass  $D < \min(\mu_{\max}, v_{\max})$ :

$$\text{Gl. 25} \quad F(B) \equiv v - \frac{dv}{dB} B$$

Daraus ergeben sich zwei Fälle, die zu betrachten sind:  $F(B) \leq 0$  und  $F(B) > 0$ . Die geometrische Auswertung dieser beiden Möglichkeiten ist in Abbildung 2-10 und Abbildung 2-11 dargestellt.



**Abbildung 2-11: Beispiel einer Kurve der spezifischen Wachstumsrate für den Fall, dass  $F(B) > 0$  für alle  $B$  bei denen gilt:  $D < \min(\mu_{\max}, v_{\max})$ , verändert nach PAVLOU (1985).**

Zeichnet man für den Fall, dass  $F(B) \leq 0$  eine Tangente an die Kurve der spezifischen Wachstumsrate  $v(B)$  für Werte von  $B$  und zieht die Parallele dazu durch den Koordinatenursprung, dann muss diese Gerade oberhalb der Kurve der spezifischen Wachstumsrate liegen. Dies trifft zu für alle  $B$  aus Gleichung Gl. 24 mit  $D < \min(\mu_{\max}, v_{\max})$ . Eine notwendige Bedingung für das Eintreten dieses Falles ist, dass die Kurve  $v(B)$  in der Nähe des Ursprungs konvex verläuft (siehe Abbildung 2-10). Ferner gibt es einen Wert  $D_C$  für die Verdünnungsrate, entsprechend  $B_C = v^{-1}(D_C)$ , von wo an die Parallele durch den Ursprung zu der Kurventangente unterhalb der Kurve  $v(B)$  liegt. Notwendige Bedingung für das Eintreten eines Fließgleichgewichts ist also nicht nur  $\mu_{\max} < v_{\max}$ , sondern auch  $\mu_{\max} \leq D_C$ .

Eine Kurve der spezifischen Wachstumsrate  $v(B)$  für den Fall  $F(B) > 0$  für jedes  $B$  aus Gleichung Gl. 24 mit  $D < \min(\mu_{\max}, v_{\max})$  ist in Abbildung 2-11 dargestellt. Die Kurve  $v(B)$  verläuft konkav, und die Parallele zur Tangente durch den Ursprung liegt unterhalb der Kurve. Dies gilt für alle Werte von  $B$  aus Gleichung Gl. 24 mit  $D < \min(\mu_{\max}, v_{\max})$ .

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Organismen und Stammkulturen

*Tetrahymena thermophila* 1768 A II; 17. Inzuchtkreuzung des Stammes A (1968), Paarungstyp II, wurde von Herr Prof. Dr. F. Jauker vom Institut für Tierphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

*Tetrahymena thermophila* wurde bei Raumtemperatur in Reagenzgläsern mit PPY-Medium (siehe 3.3.2) kultiviert und wöchentlich in frisches Medium überimpft. Außerdem erfolgte, ebenfalls bei Raumtemperatur, eine Dauerkultivierung in Reagenzgläsern auf Kichererbsen (siehe 3.3.1). Dieser Ansatz wurde nur alle 3 Monate überimpft.

*Pseudomonas putida* wurde von Frau Prof. Dr. G. Klug vom Institut für Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

*Pseudomonas putida* wurde auf Standard 1-Agarplatten (siehe 3.3.4) kultiviert und alle vier Wochen auf eine frische Platte überimpft.

### 3.2 Sterilität

Medien, Kulturgefäße, Pipettenspitzen und alle weiteren zum sterilen Arbeiten notwendigen Geräte wurden 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Das Überimpfen von *Tetrahymena* erfolgte in der Regel halbsteril unter einer Haube mit Bunsenbrenner. Bakterien und auch die Kulturen für die Reaktorläufe wurden unter einer Sterilbank überimpft.

### 3.3 Medien

#### 3.3.1 Langzeitkultur auf Kichererbsen

Die Dauerkultur von *Tetrahymena thermophila* erfolgte bei 25 °C in Reagenzgläsern auf autoklavierten Kichererbsen. Dazu wurde eine Kichererbse in 10 ml Aqua dest. pro Reagenzglas eingesetzt und anschließend autoklaviert. Das Überimpfen der Dauerkulturen erfolgte alle 3 Monate.

### 3.3.2 PPY-Medium

PPY-Medium wurde für *Tetrahymena thermophila* Stammkulturen mit folgender Zusammensetzung verwendet:

10 g	Pepton aus Sojabohnen (Sigma)
1 g	Hefeextrakt (Sigma)
0,1 g	EDTA Eisen-Natriumsalz $C_{10}H_{12}N_2O_8FeNa$ (Sigma)
ad 1000 ml	Aqua dest.

Das Medium wurde direkt nach der Herstellung 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

### 3.3.3 BC-Medium

Das BC-Medium wurde als definiertes Kulturmedium speziell für die Co-Kultivierung von *Tetrahymena* und *Escherichia coli* Stämmen entwickelt (WILHELM, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde es für die Co-Kultur von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* eingesetzt.

Das BC-Medium muss in 4 Chargen autoklaviert werden, um unerwünschte temperaturabhängige Nebenreaktionen der Komponenten auszuschließen.

Zusammensetzung des Mediums, ad 1000 ml Aqua dest.:

#### Charge 1:

0,335 g	$KH_2PO_4$ (Merck)
2,19 g	$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ (Merck)

#### Charge 2:

1,25 g	$(NH_4)_2SO_4$ (Merck)
0,1 g	$MgSO_4 + 7 H_2O$ (Merck)
1,0 ml	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ (Merck), Stammlösung à 1 g/l

#### Charge 3:

1,0 ml	NaCl (Merck), Stammlösung à 10 g/l
2,0 ml	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (Merck), Stammlösung à 13,24 g/l
1,0 ml	$Na_2(EDTA) \cdot 2 H_2O$ (Merck), Stammlösung à 2,8 g/l
1,0 ml	$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ (Merck), Stammlösung à 1,0 g/l, lichtgeschützt aufbewahrt

#### Charge 4:

0,55 g	D(+)Glucose Monohydrat (Merck)
10 Tropfen	Antifoam 204 organic (Sigma)

Das Medium wurde direkt nach der Herstellung 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Die einzelnen Chargen wurden nach dem Abkühlen unter einer Sterilbank zusammengeführt.

### 3.3.4 Standard 1-Agarplatten

Für die *Pseudomonas putida* Stammkulturen und zur Bestimmung der CFU wurde Standard 1-Agar verwendet.

#### Reagenzien:

15 g	Pepton aus Sojabohnen (Sigma)
3 g	Hefeextrakt (Sigma)
6 g	NaCl (Merck)
1 g	D(+)Glucose Monohydrat (Merck)
15 g	Agar Agar reinst, gepulvert (Merck)
ad 1000 ml	Aqua dest.

Der Standard 1-Agar wurde 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde der Standard 1-Agar unter einer Sterilbank in Einweg-Petrischalen aus Kunststoff (Greiner) gegossen. Die ausgehärteten Platten wurden in sterile Beutel verpackt und bei 8 °C gelagert.

### 3.3.5 Standard 1-Nährmedium

Für die *Pseudomonas* Flüssigkulturen wurde Standard 1-Nährmedium verwendet.

#### Reagenzien:

15 g	Pepton aus Sojabohnen (Sigma)
3 g	Hefeextrakt (Sigma)
6 g	NaCl (Merck)
1 g	D(+)Glucose Monohydrat (Merck)
ad 1000 ml	Aqua dest.

Das Medium wurde 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

### 3.4 Bestimmung mikrobiologischer Grundgrößen

Die Zählung der Zellen wurde mit Hilfe von Zählkammern durchgeführt. Die Vorteile dieser Methode werden in der Diskussion (Kapitel 5, Seite 73) besprochen.

#### 3.4.1 Norris-Powell-Lösung

Die Norris-Powell-Lösung (KOCH, 1994) hat als Abtötungslösung zur Zellzählung mehrere Vorteile. Sie stoppt Wachstum und Beweglichkeit der Zellen, wird gepuffert durch  $K_2HPO_4$ , und Natriumdodecylsulfat als Detergens verhindert eine Aggregation. Durch die Zugabe von HCl erhält die Zelloberfläche eine positive Ladung, so dass sich die Zellen am Glas der Zählkammer anheften.

#### Reagenzien:

5 ml	Formaldehydlösung, mind. 37%, Formalin (Merck)
ad 1000 ml	Aqua dest.
	Natriumdodecylsulfat $C_{12}H_{25}NaO_4S$ (Merck)
	$K_2HPO_4$ (Merck)
0,1 N	HCl (Merck)

Der pH-Wert der Lösung wurde mit  $K_2HPO_4$  auf 7,2 - 7,4 eingestellt. Anschließend wurden wenige Milligramm Natriumdodecylsulfat so lange zugegeben, bis Luftblasen, die mit einer Pasteurpipette eingeblasen wurden, nicht zerplatzen. Zur Zellzählung wurde dieser Ansatz im Verhältnis von 1 : 2 mit HCl vermischt.

#### 3.4.2 Zählung von *Tetrahymena thermophila*

*Tetrahymena thermophila* wurden mit einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer gezählt. Dabei wurden pro Kammer 20  $\mu$ l einer gut durchmischten Zellsuspension aufgetragen. Bis zur Zählung wurde eine Minute gewartet, um ein Sedimentieren der Zellen zu ermöglichen.

Die Fuchs-Rosenthal Zählkammer weist 4 x 4 Großquadrate auf. Sie unterscheidet sich von den üblichen Kammern zur Blutzellenzählung nicht nur durch den größeren Flächeninhalt (16  $mm^2$ ), sondern auch durch die größere Kammertiefe (0,2 mm) und damit durch den größeren Rauminhalt (3,2  $\mu$ l).

Mit jeder Probennahme wurden jeweils zwei Kammern mit jeweils 16 Großquadraten ausgezählt. Dabei wurde die Zellsuspension so verdünnt, dass etwa 10 - 30 Zellen pro



Großquadrat auftraten. Auf diesem Weg konnte der zeitliche Aufwand für jede Zählung annähernd konstant gehalten werden.

### 3.4.3 Zählung von *Pseudomonas putida*

*Pseudomonas putida* wurden mit Hilfe einer Zählkammer nach Thoma gezählt. Dabei wurden pro Kammer 20 µl einer gut durchmischten Zellsuspension aufgetragen. Auch hier wurde eine Minute gewartet, bis mit dem Zählen begonnen wurde.

Zunächst erfolgte die Zählung mit einer Thoma Zählkammer mit einer Kammertiefe von 100 µm. Sie ist in kleine Quadrate eingeteilt, wobei je 16 Kleinquadrate ein größeres "Gruppenquadrat" bilden, das durch besondere Liniensysteme abgegrenzt ist. Die Seitenlänge eines kleinen Quadrates misst 50 µm, seine Fläche beträgt  $50\ \mu\text{m} \cdot 50\ \mu\text{m} = 2500\ \mu\text{m}^2$ . Da die Höhe der Kammer 100 µm beträgt, entspricht das Volumen über einem kleinen Quadrat  $2500\ \mu\text{m}^2 \cdot 100\ \mu\text{m} = 2,5 \cdot 10^{-4}\ \mu\text{l}$ .

Später konnte für die Zählung der Bakterien eine Thoma Zählkammer mit einer verringerten Kammertiefe verwendet werden. Diese, speziell zur Bakterienzählung entwickelte Kammer verfügt über das gleiche Gitternetz wie die reguläre Thoma Zählkammer, also auch über eine Fläche von  $2500\ \mu\text{m}^2$  jedes Kleinquadrats. Durch die verringerte Kammertiefe von 20 µm beträgt das Volumen über einem kleinen Quadrat nur  $2500\ \mu\text{m}^2 \cdot 20\ \mu\text{m} = 5 \cdot 10^{-5}\ \mu\text{l}$ .

Auch zur Bakterienzählung wurde die Zellsuspension verdünnt. Die Verdünnung wurde so gewählt, dass pro Großquadrat etwa 40 - 60 Zellen erwartet wurden. Mit jeder Probennahme wurde jeweils eine Kammer mit jeweils 16 Großquadraten ausgezählt.

### 3.4.4 Plattenkeimzahl (CFU)

Neben der Zählung der Bakterien wurde die Plattenkeimzahl (CFU - colony forming units) auf Standard 1-Nähragar ermittelt, um die Übereinstimmung mit den Zellzählungen zu überprüfen. Dazu wurden Aliquots der Proben so verdünnt, dass zwischen 100 und 300 Kolonien pro Platte zu erwarten waren. Die Inkubation der Platten, bei denen Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden, erfolgte im Wärmeschrank bei 30 °C über 24 Stunden. Anschließend wurden die Kolonien ausgezählt.

### **3.4.5 Kontrolle der Bakterienkultur**

Die Bakterienkulturen wurden zur Kontrolle der taxonomischen Zuordnung des Stammes sowie zu der Prüfung der Reinheit untersucht. Als mikrobiologisches Standardverfahren wurde eine Gramfärbung durchgeführt. Zudem erfolgte eine Untersuchung mittels API 20 NE (bioMérieux). Dabei handelt es sich um ein standardisiertes System mit 8 konventionellen und 12 Assimilations-Reaktionen zur Identifizierung nicht anspruchsvoller gramnegativer Stäbchen, die nicht zur Familie der Enterobacteriaceae gehören.

### **3.4.6 Kryokonservierung von *Pseudomonas putida***

Um eine Veränderung des Bakterienstammes bei einer Aufbewahrung auf Agarplatten bei 8 °C auszuschließen und um für jeden Reaktorlauf frische Bakterienkulturen heranziehen zu können, wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurden 1000 µl einer in Standard 1-Medium dicht gewachsenen Flüssigkultur abzentrifugiert (5 Minuten bei 800 g) und das Pellet in 500 µl einer 15 % wässrigen Glycerinlösung (Sigma) suspendiert. Die Proben wurden dann bei -70 °C tiefgefroren. Zum Animpfen einer frischen Kultur wurde mit Hilfe einer Impföse eine Pseudomonaskultur auf einer Standard 1-Agarplatte angelegt.

## **3.5 Mikroskopische Charakterisierung der Zellen**

### **3.5.1 Lichtmikroskopie**

Zur histologischen Untersuchung der Zellen wurde ein Labormikroskop (Leitz-Dialux, Vergrößerung 100 - 1000-fach) verwendet.

#### *3.5.1.1 Färbung mit Toluidinblau*

Die Färbung mit Toluidinblau dient als Übersichtsfärbung der Darstellung von Zellen. Sie ist keine differentielle Färbung zur Darstellung cytoplasmatischer Bestandteile. Durch Kontrastierung werden mit Hilfe von Toluidinblau Zellkerne (blau) und das Cytoplasma (violett) sichtbar gemacht.

#### Reagenzien:

#### Alkohol-Eisessig-Lösung

96 % Ethanol (Merck); Eisessig (Merck) im Verhältnis 3:1

0,25 % Toluidinblau-Färbelösung

0,63 g	Toluidinblau (Sigma)
0,17 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)
0,44 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)
250 ml	Aqua dest.

Die Zellen wurden auf Objektträger ausgestrichen und getrocknet, anschließend 20 Minuten mit Alkohol-Eisessig-Lösung fixiert, 2 mal 10 Minuten in 96 % Alkohol entwässert und 30 Sekunden bis 1 Minute in Toluidinblau gefärbt. Die Präparate wurden 2 mal mit 96 % Alkohol gewaschen und getrocknet.

3.5.1.2 Protargolfärbung

Die Protargolfärbung eignet sich besonders zur Darstellung von Cilien, Kinetiden und zur Charakterisierung des Mundfeldes. Die Mikrotubuli der Cilien werden schwarz angefärbt und sind so auf dem helleren Untergrund deutlich sichtbar.

Reagenzien:

30, 50, 70, 95, 100 %	Ethanol (Merck) Xylol (Merck)
--------------------------	----------------------------------

Meyer's Albumin

Eiweiß eines Hühnereies, gleiches Volumen Glycerin; dick auf Objektträger auftragen

1 %	Kaliumpermanganat (Merck)-Lösung
1 %	Oxalsäure (Merck)-Lösung
1 g/50 ml	Protargol (Merck)

Hydrochinon-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung

1 %	Hydrochinon (Merck)-Lösung
5 %	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (Merck)-Lösung
4 %	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Merck)-Lösung
5 %	Natriumthiosulfat (Merck)-Lösung

Durchführung:

Die Zellen wurden abzentrifugiert, in wenig Flüssigkeit suspendiert und in 4 Volumenteilen 1 % wässriger Osmiumsäure fixiert. Nach 2 ½ Minuten wurden sie für 30 Sekunden abzentrifugiert (190 g) und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in 50, 70, 95 und 100 % Ethanol jeweils gewaschen, abzentrifugiert, dekantiert und zuletzt in wenig Alkohol suspendiert.

Deckgläser wurden mit Meyer's Albumin imprägniert, die Zellen mit einer Pasteurpipette in Linien aufgebracht oder 25 µl aufgetropft. Die Zellen wurden kurz (20-30 s) angetrocknet, danach in 95, 70, 50 % Ethanol und schließlich in Aqua dest. gewaschen. Die Präparate wurden 1 Minute in 1 % Kaliumpermanganat-Lösung gefärbt und verblieben 1 - 2 Minuten in 1 % Oxalsäure. Sie wurden 3 mal je 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Die Färbung in Protargol erfolgte über Nacht. Möglich ist auch eine Färbung über 1 - 2 Stunden bei 60 °C. Nach dem Abtrocknen mit Fließpapier wurden die Zellen danach sofort 5-10 Minuten in frisch bereiteter Hydrochinon-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung entfärbt, 2 mal in Aqua dest. gewaschen, und in 30, 50, 70, 95, 100 % Ethanol und Xylol entwässert.

#### 3.5.1.3 Silberimprägnierung (Klein'sches Silberliniensystem)

Nach dieser einfachen Methode von Klein ist es möglich, die Pellikularstrukturen durch Versilberung gut sichtbar zu machen.

#### Reagenzien:

2 % wässrige Lösung von Silbernitrat (Merck)

*Tetrahymena thermophila* wurde auf Deckgläser ausgestrichen, getrocknet und 5 - 8 Minuten in 2 % wässrige Silbernitratlösung gefärbt. Anschließend wurden die Präparate mehrmals mit Aqua dest. abgespült. Die Präparate wurden nun in Aqua dest. in einer Glasschale auf weißem Untergrund diffusem Tageslicht ausgesetzt. Nach 3 bis 4 Stunden wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, dass die Pellikularstrukturen schwarz imprägniert waren. Die Präparate wurden dann getrocknet.

Färbungen für die Lichtmikroskopie werden bei BURCK (1988) und ROMEIS (1989) beschrieben.

### 3.5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Für die rasterelektronische Mikroskopie wurden die Zellen zunächst fixiert und in einer speziellen Trocknungskammer, die am Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen entwickelt wurde, einer Kritische-Punkt-Trocknung unterzogen.

Die Kritische-Punkt-Trocknung wird als schonendes Trocknungsverfahren biologischer Präparate angewendet. Dabei nutzt man die Eigenschaft von Flüssigkeiten, dass bei bestimmten Werten von Druck und Temperatur die Phasengrenze flüssig - gasförmig verschwindet. Oberhalb des kritischen Punktes ist die Dichte der Flüssigkeit und des Gases gleich. Die Phasengrenze flüssig - gasförmig existiert nicht mehr. Da der kritische Punkt für H<sub>2</sub>O bei 374 °C und 22,1 MPa liegt, ist es für eine Kritische-Punkt-Trocknung ungeeignet. Die Proben werden daher zunächst entwässert und dann mit CO<sub>2</sub> vollständig getrocknet, dessen kritischer Punkt bei 31,1 °C und 7,4 MPa liegt.

#### Reagenzien zur Fixierung:

0,1 M	Kakodylat (Sigma) in 2 % Glutaraldehyd (Sigma)
	PBS
50, 70, 90, 96, 100 %	Iso-Propanol (Merck)
4:1, 2:1, 1:4	Iso-Propanol : Iso-Amylacetat (Merck)

1000 µl Zellsuspension wurden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (4 Minuten, 4000 U/min), das Pellet mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µl PBS suspendiert. Diese Zellsuspension wurde mit 900 µl Kakodylat-Puffer fixiert. Die fixierten Zellen wurden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (4 Minuten, 4000 U/min) und das Pellet in etwa 100 µl Überstand suspendiert.

Die Trocknungskammer, bestehend aus drei Metallplatten mit jeweils fünf Bohrungen im Durchmesser von 6 mm, wurde nach unten durch einen Papierfilter verschlossen. In die Bohrungen wurden 5 mm große Aluminiumfolieplättchen gegeben, auf welche 50 µl der fixierten Zellen aufgetropft wurden. Auch nach oben wurden die Bohrungen mit einem Papierfilter verschlossen.

Die Zellen wurden jeweils 10 Minuten in Iso-Propanol und Iso-Propanol/Iso-Amylacetat, sowie 2 mal in reinem Iso-Amylacetat entwässert.

Die Trocknungskammer wurde dann in ein Kritische-Punkt-Trocknungsgerät (Balzers

Union) überführt und dieses mit flüssigem CO<sub>2</sub> gefüllt. Nach dreimaligem CO<sub>2</sub>-Wechsel, der dem vollständigen Austausch von Überführungsflüssigkeit (Iso-Amylacetat) gegen Trocknungsflüssigkeit (CO<sub>2</sub>) dient, wurde das Gas bei einem Druck von 8,6 Pa auf 40 °C geheizt und nach Erreichen des kritischen Punktes aus dem Gerät abgelassen.

Die Präparate wurden sogleich auf Präparatehalter aufgebracht und für 2 Stunden bei 40 °C aufbewahrt. In einem Sputter-Gerät (Polaron, Watford) wurden die Zellen anschließend mit einer dünnen Goldschicht bedampft.

Die Untersuchung der Präparate erfolgte auf einem Philipps Rasterelektronenmikroskop XL 20. Die Aufnahmen wurden direkt digitalisiert.

### **3.6 Biochemische Analysen**

#### **3.6.1 DNA-, RNA- und Protein-Analyse nach Schmidt-Tannhauser**

Die Analyse nach Schmidt-Tannhauser (MUNRO und FLECK, 1966) ermöglicht die Bestimmung der RNA-, DNA- und Proteingehalte nacheinander aus einem Probenansatz. Die Analyse soll mit der Biomasse von  $2 \cdot 10^6$  Zellen durchgeführt werden.

##### Reagenzien:

0,3 N	KOH (Merck)
0,2 N	Perchlorsäure (Merck)
0,5 N	Perchlorsäure (Merck)
0,6 N	Perchlorsäure (Merck)
1 N	NaOH (Merck)

##### Durchführung:

Die Zellen wurden auf Eis gekühlt. Durch Zugabe von konzentrierter Perchlorsäure wurden Makromoleküle ausgefällt. Die zugegebene Menge an Perchlorsäure sollte einer Endkonzentration von 0,2 N Perchlorsäure entsprechen, d.h. es wurden 17,2  $\mu$ l/ml zugegeben. Nach Zugabe der Säure wurden die Proben gut durchmischt und 20 Minuten bei 4 °C und 2900 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde, um Medienrückstände zu beseitigen, mit 5 ml 0,2 N Perchlorsäure gewaschen. Die Probe wurde anschließend 20 Minuten bei 4 °C und 2900 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Pellet wurde in 4 ml 0,3 N KOH suspendiert (an dieser Stelle ist es möglich, den Trennungsgang zu unterbrechen und die Proben bei -20 °C einzufrieren). Die Proben wurden eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad hydrolysiert. Dabei nutzt man die Alkalilabilität der RNA zur Trennung von den Nukleinsäuren. Unter diesen Bedingungen wird die RNA hydrolysiert, die DNA aber nicht angegriffen.

Die Proben wurden nun 10 Minuten im Eisbad abgekühlt, mit 4 ml 0,5 N Perchlorsäure angesäuert, gut durchmischt und 15 Minuten bei 4 °C und 3700 g abzentrifugiert. Der Überstand ( $\ddot{U}_1$ ) wurde aufbewahrt. Das Pellet wurde mit 8 ml 0,2 N Perchlorsäure gewaschen und 15 Minuten bei 4 °C und 3700 g zentrifugiert. Auch dieser Überstand ( $\ddot{U}_2$ ) wurde aufbewahrt. Aus  $\ddot{U}_1 + \ddot{U}_2$  wurde der RNA-Gehalt der Proben bestimmt. Die Messung der Absorption der Proben erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 310 nm gegen 0,2 N Perchlorsäure.

Berechnung der RNA-Gehalte

$$(E_{260 \text{ nm}} - E_{310 \text{ nm}}) \cdot F = E_{\text{gesamt}}$$

$$1 E \hat{=} 35 \mu\text{g/ml RNA}$$

Diese Beziehung ergibt sich aus der Messung einer Eichgeraden. Als Eichlösung wurde eine äquimolare Mischung der vier RNA-Nukleosid-Monophosphate verwendet.

$$E_{\text{gesamt}} \cdot \frac{35 \mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot V = \frac{1}{2} \frac{\mu\text{g RNA}}{10^6 \text{ Zellen}}$$

F = Verdünnungsfaktor

V = Gesamtvolumen [ml]

Das Pellet wurde in 250  $\mu\text{l}$  0,6 N Perchlorsäure suspendiert. Ein Standard wurde aus 1 mg/ml DNA aus Kalbsthymus (Serva) hergestellt und eine Verdünnungsreihe von 0, 2, 4, 6, 10, 20, 40, 60  $\mu\text{g}/250 \mu\text{l}$  0,6 N Perchlorsäure angesetzt. Proben und Standard wurden 20 Minuten bei 70 °C inkubiert. Dabei wird die DNA hydrolysiert und geht in Lösung, während die Proteine ungelöst bleiben. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und 15 Minuten bei 4 °C und 3700 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur DNA-Bestimmung mit dem Diphenylamin-Test, das Pellet für die Proteinbestimmung nach Lowry verwendet.

Reagenzien für den Diphenylamin-Test:

wässriger Acetaldehyd: 2 ml konz. Acetaldehyd (Merck) + 96 ml H<sub>2</sub>O  
 Diphenylamin-Stammlsg: 1,5 g Diphenylamin (Merck)  
 Gebrauchslösung: 20 ml Diphenylamin-Stammlösung + 0,1 ml wässriger Acetaldehyd

Durchführung:

250  $\mu\text{l}$  DNA-Hydrolysat (bzw. Standard) wurden mit 500  $\mu\text{l}$  Diphenylamin-Gebrauchslösung vermischt und über Nacht (16 - 20 Stunden) bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Die DNA-Gehalte wurden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

Das Pellet wurde mit 4 ml 1 N NaOH suspendiert. In dem alkalischen Medium werden die Proteine über Nacht (18 Stunden) bei 30 °C im Wasserbad gelöst.

Lösungen zur Proteinbestimmung nach Lowry:

2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck); Lösung A  
 0,5 % CuSO<sub>4</sub> in 1 % Na<sub>3</sub>Citrat (Merck); Lösung B



Lösung AB: 10 ml Lösung A + 200 µl Lösung B  
Folin-Lösung: Folin (Fluka) 1 + 2 mit H<sub>2</sub>O verdünnt

#### Eichkurve:

Ein Standard wurde aus 1 mg/ml Lysozym aus Hühnereiweiß (Merck) hergestellt und mit 1 N NaOH eine Verdünnungsreihe von 0, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 40, 60, 70 µg/100 µl angesetzt. Die große Zahl der Standards wurde verwendet, da die Eichgerade im Bereich hoher Proteinkonzentrationen abflacht. Die Probenverdünnung wurde daher so gewählt, dass die Proteinkonzentrationen im unteren Bereich der Eichgeraden lagen.

#### Durchführung:

Die Lösung wurde gemischt und 15 Minuten bei 4 °C und 3700 g abzentrifugiert. 100 µl der Proteinlösung sowie der Standards wurden mit 1 ml Lösung AB vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Alle Proben wurden mit 100 µl Folin-Lösung versetzt und sofort gut durchmischt. Die Proben wurden eine Stunde lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute in einer Tischzentrifuge zentrifugiert um eventuell auftretende Schwebstoffe zu sedimentieren. Die Absorption jeder Probe wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt.

### **3.6.2 Proteinbestimmung nach Lowry**

Bei der Methode zur Proteinbestimmung nach Lowry (LOWRY et al., 1951) handelt es sich um eine Erweiterung der Biuret-Methode. Mit einer Nachweisgrenze von 5 µg Protein ist sie jedoch wesentlich empfindlicher. In einem ersten Schritt wird in alkalischer Lösung ein Protein-Kupfer-Komplex gebildet. Dieser Komplex reduziert ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Ciocalteus Reagenz), wobei eine intensiv blaue Färbung entsteht. Diese Reduktion erfolgt bei einem pH-Wert von 10, das Folin-Reagenz ist aber nur im Sauren beständig. Aus diesem Grunde muss man, sobald das Folin-Reagenz zur alkalischen Kupfer-Protein-Lösung zugefügt wird, sofort kräftig mischen, damit die Reduktion vor der Zersetzung des Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz stattfindet.

Die Versuchsdurchführung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in eine Mikromethode umgewandelt, um die Proteinbestimmung mit kleineren Probenvolumina durchführen zu können.

Lösungen:

100 g/l	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Merck)
1 g/l	CuSO <sub>4</sub> (Merck)
1 mg/l	Folin-Ciocalteus-Reagenz (Merck), 1 : 3 mit Aqua dest. verdünnt
	Lysozym aus Hühnereiweiß (Merck) gelöst in 1N NaOH (Merck)

Eichkurve:

Die Erstellung der Eichkurve erfolgte wie bei der Proteinbestimmung nach Schmidt-Tannhauser (siehe S. 41).

Durchführung:

100 µl Probe mit 100 µl Aqua dest., 700 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 100 µl CuSO<sub>4</sub>-Lösung vermischen und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. 100 µl Folin-Reagenz zugeben, sofort gut durchmischen und 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Der Farbstoff ist anschließend etwa 45 - 60 Minuten stabil.

Die Absorption jeder Probe wurde bei 546 nm bestimmt. Zusätzlich können noch Absorptionen bei 660 nm und 750 nm gemessen werden, da die Proben eine größere Absorption im Bereich höherer Wellenlängen zeigen.

### 3.6.3 Glucosebestimmung

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgt während des Reaktorlaufs mit Hilfe von Glucoseteststäbchen (Haemo-Glukotest, Boehringer Mannheim). Diese Bestimmung dient dazu, eine grobe Einschätzung der Zuckerkonzentration im Medium zu erhalten. Die Nachweisgrenze dieses Tests liegt zwischen 1 und 44 mmol/l. Mit jeder Probennahme wurden außerdem Proben zur späteren enzymatischen Glucosebestimmung in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (4 Minuten, 4000 U/min) und bei -20 °C eingefroren. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit Hilfe eines Automaten (Epos Analyzer 5060, Eppendorf-Netheler-Hinz).

Die tiefgefrorenen Proben wurden 15 Minuten bei 80 °C im Wasserbad aufgetaut und darin enthaltene Proteine denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und die unlöslichen Probenbestandteile durch Zentrifugation (10 Minuten bei 11000 U/min) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.

Die Bestimmung der Glucose erfolgt mittels eines gekoppelten Enzymtests. Dabei wird die Glucose im ersten Schritt durch die Hexokinase in Glucose-6-Phosphat, im zweiten Schritt durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphoglucono-d-Lacton

umgesetzt. Bei dieser zweiten Reaktion wird das Co-Substrat  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}$  reduziert und dessen Konzentration bei einer Wellenlänge von 334 nm photometrisch bestimmt. Die Nachweisgrenze dieses Testverfahrens liegt zwischen 0,1 und 9,8 mM Glucose.

### **3.7 Warburg-Technik (Manometrie)**

Das Prinzip der Warburg-Technik ermöglicht die Messung kleiner Gasmengenänderungen. Eine Warburg-Apparatur besteht aus einem Reaktionsgefäß und einem Warburg-Manometer, die über einen Schliff miteinander verbunden sind. Das Volumen des Reaktionsgefäßes wird durch den Meniskus der Sperrflüssigkeit (Brodiesche Lösung) in der rechten Manometerkapillare begrenzt. Bei Versuchsbeginn wurde der Meniskus der rechten Manometerkapillare bei geöffnetem Manometerhahn auf die Marke "15" der Manometerskala (= Mitte der Skala) eingestellt. Wurde nun nach Schließen des Manometerhahns im Reaktionsgefäß eine kleine Gasmenge verbraucht, so entstand ein Unterdruck im System. Dadurch stieg die Sperrflüssigkeit in der mit dem Gefäß verbundenen Kapillare, während sie in der nach oben offenen Kapillare sank.

Manometrie beruht auf der Messung einer Druckdifferenz durch Gasmengenänderung bei konstantem Volumen. Da sich das Systemvolumen durch die Verschiebung der Sperrflüssigkeit verringert hatte, musste der Meniskus der Sperrflüssigkeit in der rechten Manometerkapillare wieder auf die Marke "15" abgesenkt werden. Die Differenz zur Ausgangsmarke konnte dann am linken Manometerschenkel abgelesen werden. Aus dieser Differenz kann mit Hilfe der Gefäßkonstanten  $K$  die Gasmengenänderung berechnet werden. Die Messung erfolgte bei konstanter Temperatur des Reaktionssystems.

Der linke Manometerschenkel steht mit dem Außenmedium in Verbindung, daher führen Schwankungen des atmosphärischen Luftdrucks zu Veränderungen des Manometerstandes. Um diese Änderungen des Barometerstandes während eines Versuchs zu berücksichtigen, wird die Druckanzeige in einem Leergefäß (Thermobarometer) ermittelt. Diese Anzeige hängt nur vom äußeren Luftdruck und von möglichen Temperaturschwankungen im Thermostatenbad ab und ist unabhängig von Gasmengenänderungen einer Reaktion. Die Angaben des Thermobarometers werden als Korrekturwert bei der Auswertung berücksichtigt.

Durchführung:

Die Zelldichte der Zellsuspension wurde bestimmt und die Gefäße wie folgt beschickt:

Gefäß	Thermo- barometer	Kontrolle	Probe 1a	Probe 1b	Probe 1c
Hauptraum, 3,4 ml	—	Medium	Zell- suspension	Zell- suspension	Zell- suspension
Einsatz, 200µl	—	10 % KOH	10 % KOH	10 % KOH	10 % KOH
Birne	—	—	—	—	—

Bei einer Versuchstemperatur von 30 °C wurden die Gefäße zum Temperatenausgleich zunächst mit geöffneten Manometerhähnen 15 Minuten lang geschüttelt. Dann wurden alle Manometerhähne geschlossen und der Meniskus der Sperrflüssigkeit im rechten Schenkel wieder auf "15" eingestellt. Der Manometerausschlag h [mm] wurde am linken Schenkel abgelesen. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs erfolgte über 60 Minuten (jeweils im Abstand von 15 Minuten), nachdem der Manometerschenkel vor dem Ablesen auf die Ausgangsmarke "15" eingestellt wurde.

Berechnung:

Die Gasmengenänderung X in Mikrolitern bezogen auf Normalbedingungen (0 °C und 760 mm Hg) errechnet sich nach der Formel:

$$X [\mu\text{l}] = h [\text{mm}] \cdot K [\text{mm}^2]$$

h = abgelesener und je nach Thermobarometer korrigierter Manometerausschlag in mm Brodie-Lösung

K = Gefäßkonstante

Die Gefäßkonstante K eines Systems für O<sub>2</sub> wird berechnet nach:

$$K = \frac{V_g \cdot 273 / T + V_f \cdot \alpha}{P_0}$$

V<sub>g</sub> = Gesamtvolumen [µl] des Reaktionssystems (Vol. Gefäß + Vol. Manometer - Vol. eingefüllte Flüssigkeit)

T = Absolute Temperatur (° Kelvin) des Reaktionssystems

V<sub>f</sub> = Gesamtvolumen der eingefüllten Flüssigkeiten [µl]

α = Bunsen'scher Absorptionskoeffizient; der Koeffizient α gibt die Löslichkeit des entwickelten oder verbrauchten Gases in der im Reaktionsgefäß vorhandenen Flüssigkeit bei Normaldruck (760 mm Hg) und einer bestimmten Temperatur an. Für O<sub>2</sub> bei 30 °C = 0,0261.

P<sub>0</sub> = Normaldruck, gemessen in mm Brodie (das spez. Gewicht der als Sperrflüssigkeit gewählten Brodie'schen Lösung ist so gewählt, dass 760 mm Hg = 10000 mm Brodie entsprechen)

In der stationären Phase beträgt die Masse von *Tetrahymena* 2 mg/1·10<sup>6</sup> Zellen. Diese Angabe wurde bei der Berechnung des Verbrauchs von O<sub>2</sub>/g·h zu Grunde gelegt.

### **3.8 Methodik zur Trennung von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida***

Die Trennung von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* erfolgte durch eine zweistufige Filtration (WILHELM, 1993). Dazu wurde die Probe zunächst durch einen 5 µm Filter, anschließend durch einen 3 µm Filter (beide Filter: Cellulosenitrat, Sartorius) filtriert. Für die Membranfilter mit einem Durchmesser von 50 mm wurden Polycarbonat-Filterhalter (Sartorius) verwendet. Das Filtrationsvolumen betrug etwa 10 ml, und die Filtration erfolgte ausschließlich durch hydrostatischen Druck. Zwar kommt es auch bei dieser Trennmethode zu Zellverlusten, diese sind aber, verglichen mit anderen Methoden, zum Beispiel der Trennung durch Unterdruckfiltration, gering. Eine Trennung durch Dichtegradienten-Zentrifugation wurde verworfen, da mit dieser Methode zu geringe Volumina der Fraktionen gewonnen werden.

### **3.9 Kulturtechnik**

#### **3.9.1 Bioreaktor**

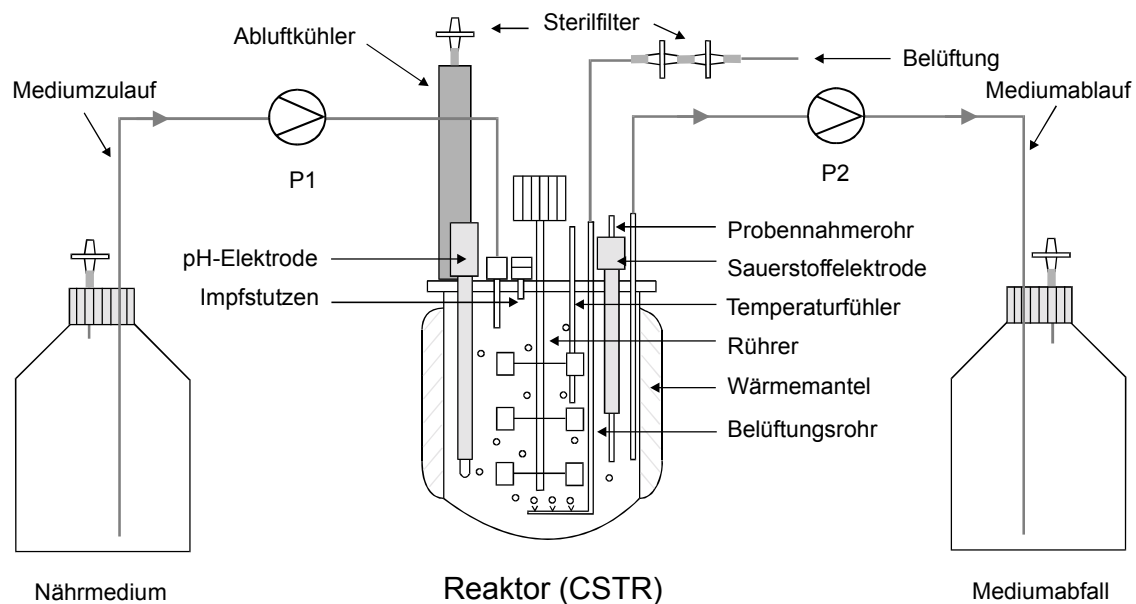
Die Experimente wurden in einem Bioreaktor der Firma B. Braun (Modell Biostat M) durchgeführt, dessen maximales Füllvolumen 2 l beträgt. Der Bioreaktor besteht aus einem doppelwandigen Glasgefäß mit einem temperierbaren Wärmemantel und einem separat aufsetzbaren Mess- und Regelaufsatz. Dieser Aufsatz besteht aus Edelstahl und enthält 12 Öffnungen mit Gewinde, in denen Elektroden und Sonden mit Hilfe von Überwurfmuttern befestigt werden können. Zur Abdichtung werden leicht gefettete O-Ringe verwendet. Der Deckel wird mit einer Schnellverschlussschelle auf dem Reaktorgefäß befestigt.

Für die hier beschriebenen Versuche wurden ein Abluftkühler, ein Temperaturfühler, eine Sauerstoffelektrode (Ingold), eine pH-Elektrode (Mettler-Toledo), ein Impfstutzen, ein Kontrollthermometer, ein Gaseinblasring und zwei Probennahmerohre im Deckel befestigt. Auf der Rührwelle wurden drei 4-Blatt-Scheibenrührer befestigt.

Zu- und Abluft wurden durch Teflon-Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße (Midisart, Sartorius) geleitet, um Sterilität zu gewährleisten.

Die Verbindungsschläuche bestehen aus Silikon (Innendurchmesser 3 mm,

Wanddicke 2 mm, IDL-Silikon, Roth) und autoklavierbaren Verbindungsstücken (PP, Teflon; Brand, Bohlender), die Pumpenschläuche aus Isoversinic (Innendurchmesser 4 mm und 1 mm, Abimed).



**Abbildung 3-1: Schema des Bioreaktors (CSTR) mit Mediumzulauf, Mediumablauf, Abluftkühler, Temperaturfühler, Sauerstoffelektrode, pH-Elektrode, Impfstutzen, Belüftungsrohr, Probennahmerohre und Scheibenrührer.**

Der Bioreaktor ist mit allen Bestandteilen in zusammengebautem Zustand autoklavierbar. Das Medium wurde separat in Duran-Glasflaschen (Schott) autoklaviert und diese unter einer Sterilbank mit Hilfe von GL45 Bola-Flaschen-Mehrfachverteilern (Bohlender) an den Reaktor angeschlossen.

Der Reaktor wurde in allen Versuchen in autoklaviertem Zustand mit 1,5 l Medium befüllt, indem dieses über eine peristaltische Pumpe (Minipuls 3, Abimed) in das Reaktorgefäß gepumpt wurde. Die Mediumflasche stand während dieses Vorgangs auf einer digitalen Waage (Mettler-Toledo, max. 4000 g), und die Einfüllmenge wurde so kontrolliert.

Im kontinuierlichen Betrieb des Reaktors wurde eine konstante Durchflussgeschwindigkeit durch zwei peristaltische Pumpen (Minipuls 3, Abimed) gewährleistet. Zur Kontrolle der Durchflussgeschwindigkeit diente eine digitale Waage (Sartorius, max. 4200 g).



**Abbildung 3-2: Aufbau des kontinuierlichen Bioreaktors mit den Flaschen für den Mediumzulauf und der Mediumablaufflasche jeweils auf einer Digitalwaage und den beiden peristaltischen Pumpen.**

### 3.9.2 Vorkulturen

Vor den jeweiligen Versuchen wurden beide Organismen in Flüssigkulturen vorkultiviert. Kryokonservierte *Pseudomonas putida* wurden zunächst auf Platten mit Standard 1-Nähragar angezüchtet, anschließend in einen Kolben mit 200 ml Standard 1-Medium überimpft und bei 30 °C für 24 Stunden im Schüttelwärmeschrank inkubiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurde ein definiertes Volumen für den Versuch entnommen. Die Startzelldichte für *Pseudomonas putida* lag in allen Versuchen bei  $1 \cdot 10^9$  Zellen/l.

Für die Vorkultur von *Tetrahymena thermophila* wurden 10 ml einer PPY-Kultur in 200 ml PPY-Medium überimpft und analog der Bakterienkultur inkubiert. Im Anschluss an die Bestimmung der Zelldichte wurde ein Teil der Zellsuspension für den Versuchsansatz entnommen. Die Startzelldichte für *Tetrahymena* lag bei allen Versuchen bei  $1 \cdot 10^6$  Zellen/l. Unter einer Sterilbank wurden die Probenvolumina beider Vorkulturen in eine sterile Spritze aufgezogen und über eine Durchstechmembran in den Reaktor überführt.

### 3.9.3 Probennahme und Probenaufbereitung

Die Entnahme der Proben aus dem Reaktor erfolgte durch ein Steigrohr unter Nutzung

des hydrostatischen Drucks. Die Probenvolumina lagen zwischen 8 ml und 25 ml. Die Bestimmung der Zelldichten, CFU-Ansatz und Trennung der Organismen durch Filtration erfolgte sofort, Aliquots der Proben zur Glucose- und Proteinbestimmung wurden bei -20 °C eingefroren.

### **3.10 Computergestützte Auswertung**

Die Auswertung und grafische Darstellung der Messdaten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel (Version 7.0, Microsoft Corporation) sowie Microcal Origin (Version 4.1, Microcal Software Inc.). Zur statistischen Auswertung wurde die Software SPSS (Version 6.0.1, SPSS Inc.) verwendet. Die Grafiken wurden mit Hilfe von Corel Draw (Version 4, Corel Corporation), Adobe Photoshop (Version 5.5, Adobe Systems Inc.) und Paint Shop Pro (Version 5.01, Jasc Software Inc. ) erstellt.



## 4 Ergebnisse

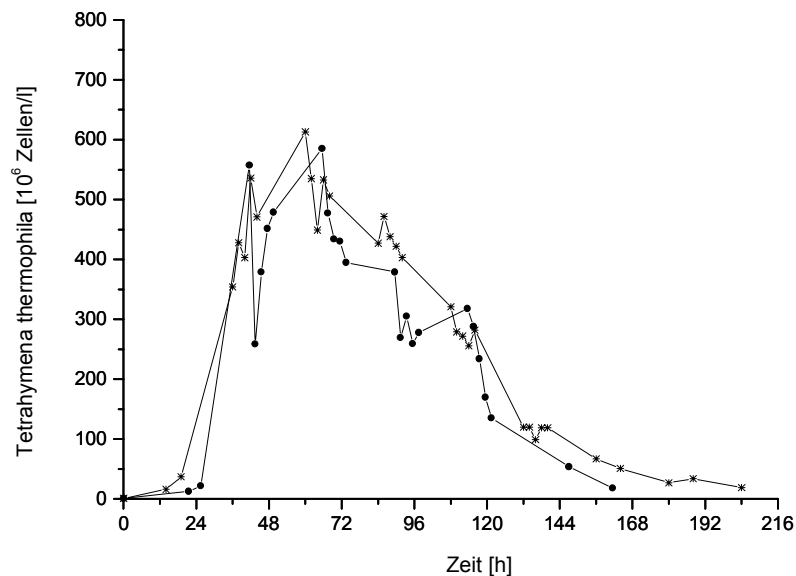
Um die verschiedenen Versuchsansätze einfach unterscheiden zu können, wurden diese mit Abkürzungen benannt. Dabei steht T für *Tetrahymena thermophila*, P für *Pseudomonas putida*, Co für Co-Kultivierungen, BK für Batch- und Fed-Batch-Kulturen und KK für kontinuierliche Kulturen. Die Nummerierung entspricht der Reihenfolge der experimentellen Durchführung.

### 4.1 Batch-Kultur von *Tetrahymena thermophila* in PPY-Medium

Im Folgenden sind zwei Experimente beschrieben, die das Wachstum von *Tetrahymena thermophila* in einem Voll-Medium (PPY-Medium) zeigen. Diese Reaktorläufe erfolgten als Fed-Batch-Kulturen. Dabei wurde das dem Reaktor durch Probenahmen entzogene Volumen als frisches Medium wieder zugeführt. Die Kulturdauer der Versuche betrug 161,5 Stunden (TBK-1) und 204 Stunden (TBK-2).

#### 4.1.1 Zellwachstum (TBK-1 und TBK-2)

Typische Wachstumskurven von *Tetrahymena thermophila* sind in Abbildung 4-1 dargestellt.



**Abbildung 4-1: Wachstum von *Tetrahymena thermophila* in PPY-Medium in Batch-Kultur, Reaktorläufe TBK-1 (Kreise) und TBK-2 (Sterne). Aufgetragen ist die Zelldichte von *Tetrahymena thermophila* [10<sup>6</sup> Zellen/l] gegen die Zeit [h].**

Das Wachstum durchlief mehrere charakteristische Phasen. Auf eine Adaptationsphase folgte eine Phase des exponentiellen Wachstums (log-phase) bis zum Erreichen einer maximalen Zelldichte, die bei beiden Experimenten bei etwa  $6 \cdot 10^8$  Zellen/l lag.

#### 4.1.2 O<sub>2</sub>-Gehalt und pH-Wert im Medium

Da das PPY-Medium zwar gepuffert war, der pH-Wert jedoch nicht auf einen Sollwert reguliert wurde, kam es im Verlauf der Kultur zu einem Anstieg des pH-Wertes von einem Anfangswert von 6,8 bzw. 6,9 zu einem Endwert von 8,3 bzw. 8,4 (Abbildung 4-2). Die Sauerstoffzufuhr war während der gesamten Versuchsdauer gleich. Belüftet wurde mit einer Rate von 0,6 vvm (TBK-1) und 0,8 vvm (TBK-2). Ein deutlicher Abfall des Sauerstoffgehalts im Medium war mit Erreichen der maximalen Zelldichte festzustellen (Abbildung 4-2).

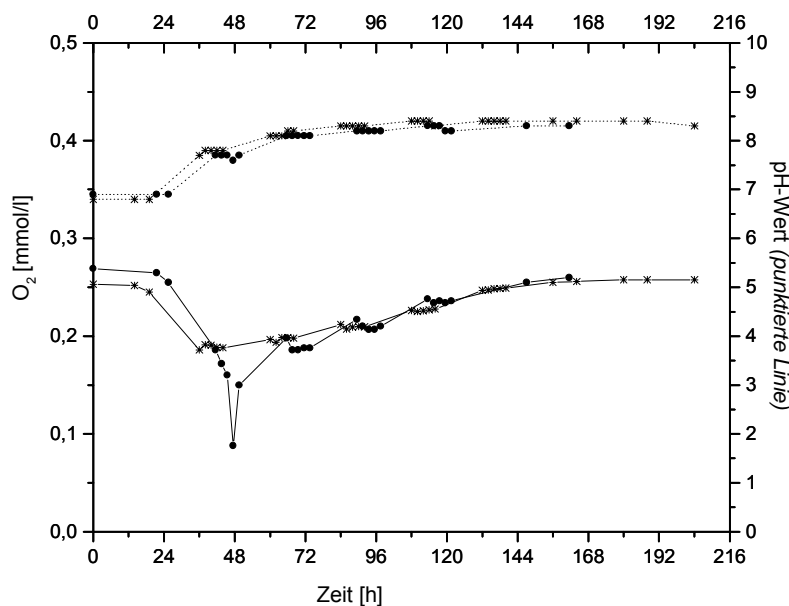


Abbildung 4-2: Auftragung der O<sub>2</sub>-Gehalte (linke Ordinate) und der pH-Werte (rechten Ordinate) der Reaktorläufe TBK-1 (Kreise) und TBK-2 (Sterne) von *Tetrahymena thermophila* in Batch-Kultur (PPY-Medium) gegen die Zeit. Die O<sub>2</sub>-Gehalte sind mit einer durchgehenden Linie, die pH-Werte mit einer gepunkteten Linie verbunden.

#### 4.1.3 DNA-, RNA- und Proteingehalte (Methode nach Schmidt-Tannhauser)

Die Bestimmung der DNA-, RNA- und Proteingehalte nach der Methode von Schmidt-Tannhauser (siehe 3.6.1) wird im Folgenden dargestellt.

Die DNA-Gehalte schwankten im Laufe der Kulturdauer zwischen 2  $\mu\text{g}$  und 8  $\mu\text{g}$  DNA/ $10^6$  Zellen, wobei sich kein Zusammenhang zwischen der Zelldichte und dem DNA-Gehalt ergab.

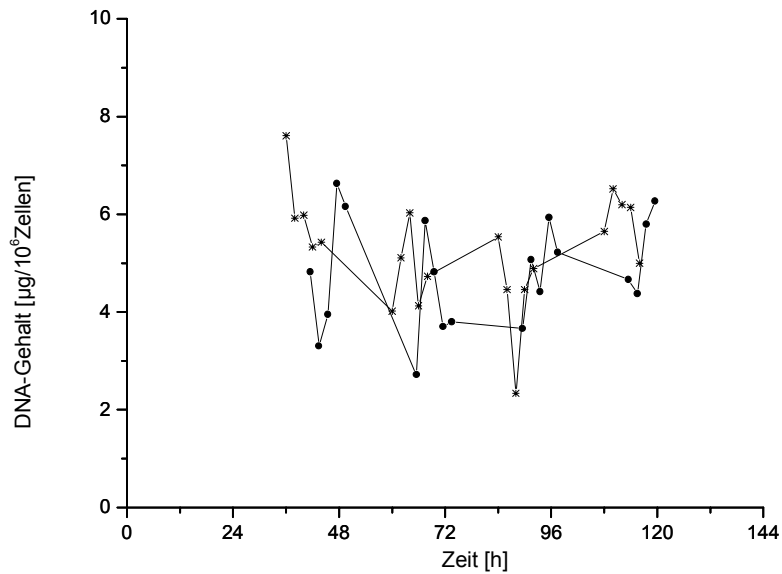


Abbildung 4-3: Darstellung der DNA-Gehalte in  $10^6$  Zellen *Tetrahymena thermophila*, in Batch-Kultur (PPY-Medium), Reaktorläufe TBK-1 (Kreise) und TBK-2 (Sterne) über der Reaktorlaufzeit.

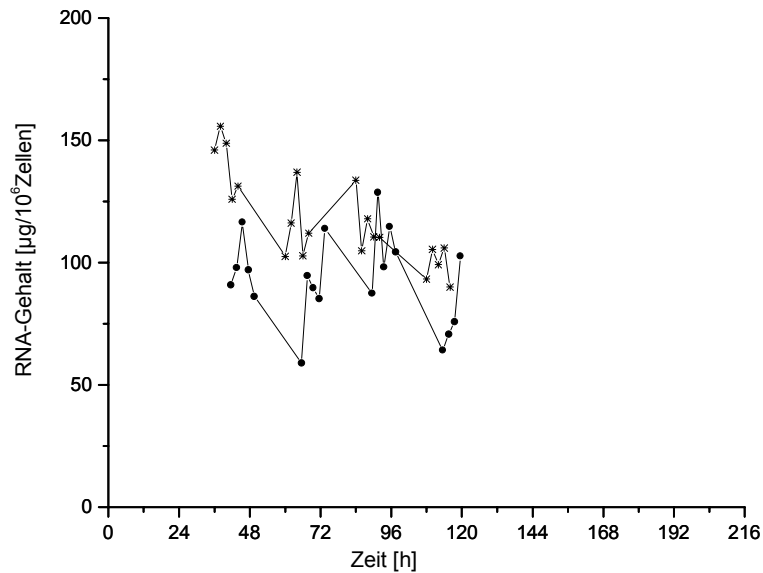
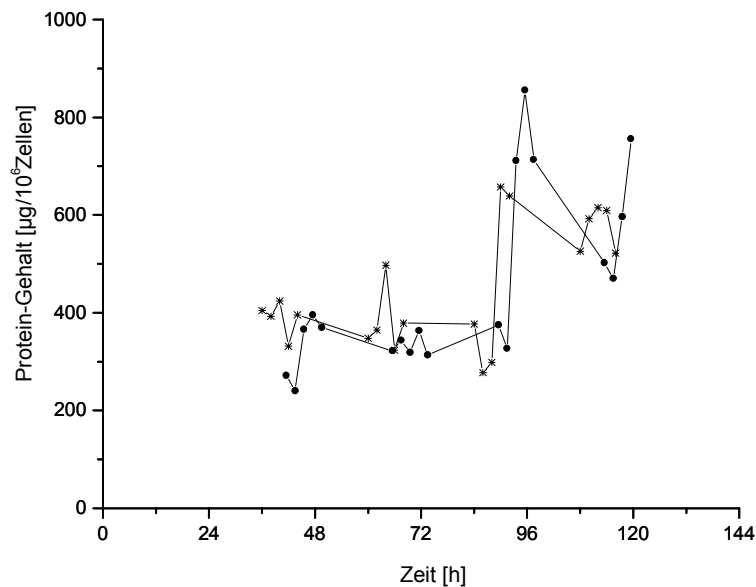


Abbildung 4-4: Auftragung der RNA-Gehalte in  $10^6$  Zellen *Tetrahymena thermophila*, in Batch-Kultur (PPY-Medium), Reaktorläufe TBK-1 (Kreise) und TBK-2 (Sterne) gegen die Zeit.

Der RNA-Gehalt im Kulturmedium varrierte während des Reaktorlaufs zwischen 59  $\mu\text{g}$  und 156  $\mu\text{g}$  RNA/ $10^6$  Zellen. Im Versuch TBK-1 ist keine Tendenz der Veränderung des RNA-Gehaltes zu erkennen, im Versuch TBK-2 zeigt sich eine leichte Abnahme der RNA-Gehalte in  $10^6$  Zellen mit der Abnahme der Zelldichte im Kulturgefäß.



**Abbildung 4-5: Auftragung der Protein-Gehalte in  $10^6$  Zellen *Tetrahymena thermophila*, in Batch-Kultur (PPY-Medium), Reaktorläufe TBK-1 (Kreise) und TBK-2 (Sterne) gegen die Laufzeit des Reaktors.**

Mit zunehmender Reaktorlaufzeit war deutlich eine Zunahme der Proteingehalte im Medium festzustellen. Der Gehalt stieg von 271  $\mu\text{g}$  bzw. 404  $\mu\text{g}$  Protein/ $10^6$  Zellen auf 756  $\mu\text{g}$  bzw. 522  $\mu\text{g}$  Protein/ $10^6$  Zellen. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass es während eines Reaktorlaufs im Batch-Betrieb mit zunehmender Laufzeit zu einer Anhäufung von Produkten und Detritus kommt.

#### 4.1.4 O<sub>2</sub>-Verbrauch (Warburg-Manometrie)

Der Verbrauch von Sauerstoff wurde nach dem Verfahren von Warburg (siehe 3.7) als Gasmengenänderung in einem Manometer ermittelt. Die pro Stunde verbrauchte Sauerstoffmenge wurde in der Auswertung auf die Biomasse bezogen, die sich mit Hilfe der Zelldichte ermitteln ließ. Wie das Ergebnis zeigt, ist diese Methode in ihrer Auflösung exakt genug, um eine Änderung im O<sub>2</sub>-Verbrauch mit steigender Zelldichte belegen zu können. Die Sauerstoffverbrauchsrate ist in der Phase der größten

Populationsdichte erwartungsgemäß am höchsten und sinkt wieder mit Abnahme der Biomasse im Reaktor.

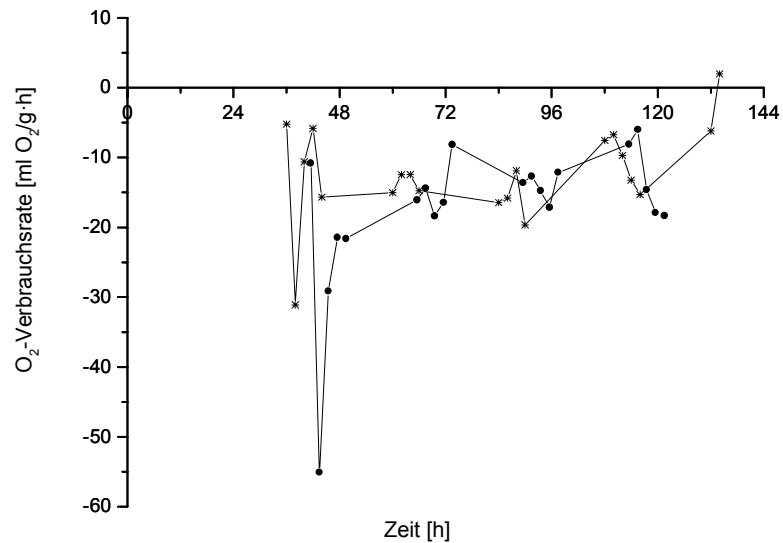


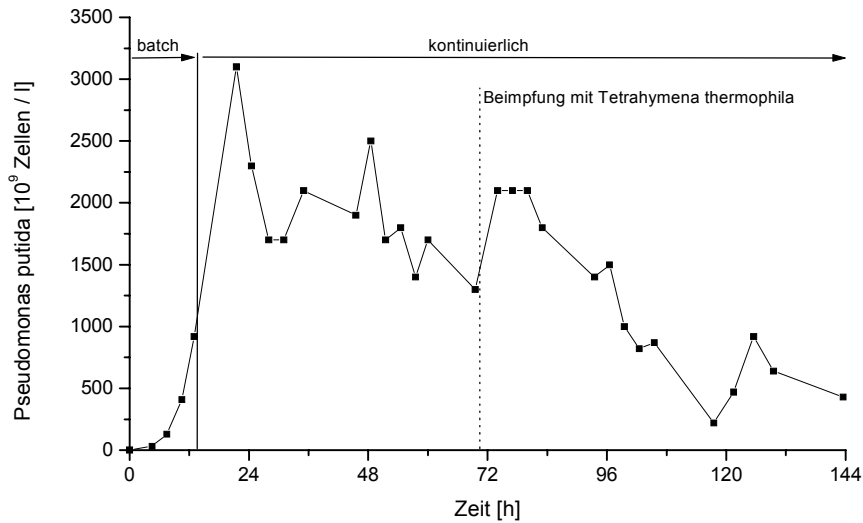
Abbildung 4-6: Darstellung der O<sub>2</sub>-Verbrauchsrate von *Tetrahymena thermophila* im Warburg-Manometer in Batch-Kultur (PPY-Medium), Reaktorläufe TBK-1 (Kreise) und TBK-2 (Sterne), gegen die Zeit.

#### 4.2 Kontinuierliche Kultur von *Pseudomonas putida* in BC-Medium

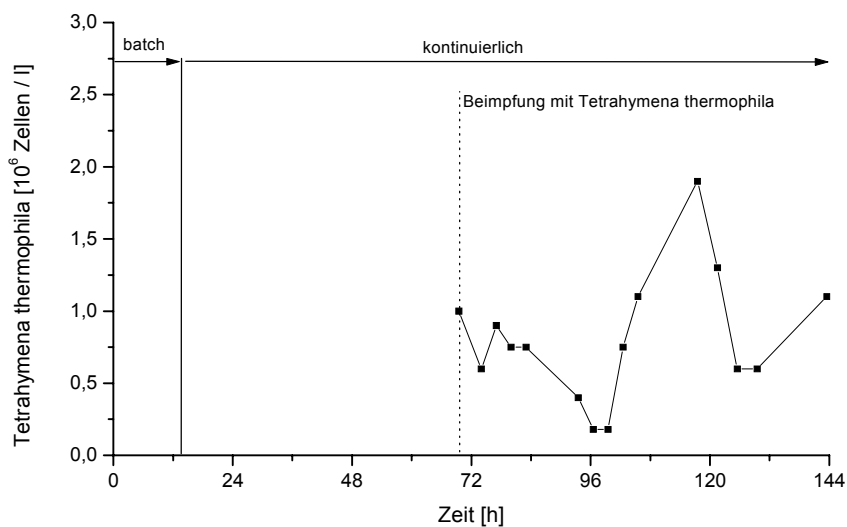
Um den Wachstumsverlauf einer kontinuierlichen Kultur von *Pseudomonas putida* mit dem Verlauf der Wachstumskinetik einer Co-Kultur von *Pseudomonas putida* und *Tetrahymena thermophila* vergleichen zu können, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Dazu wurde der mit BC-Medium gefüllte Reaktor mit *Pseudomonas putida* einer Startzelldichte von  $1 \cdot 10^9$  Zellen/l beimpft und über 70,5 Stunden kultiviert. Im Anschluss daran wurde *Tetrahymena thermophila* dem System mit einer Startzelldichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/l zugeführt. Die Gesamtlaufzeit dieses Versuchs (PKK-1) betrug 143,5 Stunden. Nach 13 Stunden wurde von Batch-Kultur auf kontinuierlichen Betrieb mit einer Verdünnungsrate von  $D = 0,3/d$  umgeschaltet. Gestartet wurde das Experiment mit einer Glucosekonzentration von 5,5 g/l. Die Glucosekonzentration des Nachfüllmediums lag bei 11 g/l.

##### 4.2.1 Zellwachstum (PKK-1)

Die Zelldichte von *Pseudomonas putida* liegt in diesem Experiment (Abbildung 4-7) etwa 6 mal höher als in Co-Kultur mit *Tetrahymena thermophila* (siehe 4.4.1).



**Abbildung 4-7: Verlauf des Wachstums von *Pseudomonas putida* [Ordinate,  $10^9$  Zellen/l] in kontinuierlicher Kultur (Versuch PKK-1). Nach 13 Stunden wurde von Batch-Kultur auf kontinuierlichen Betrieb umgeschaltet (Verdünnungsrate  $D = 0,3/d$ ). Nach 70,5 Stunden Beimpfung mit  $1 \cdot 10^6$  Zellen/l *Tetrahymena thermophila*.**

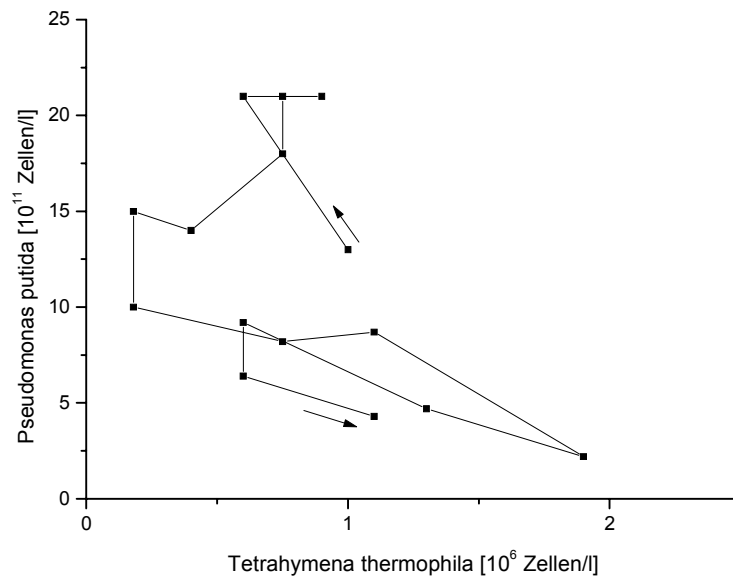


**Abbildung 4-8: Verlauf des Wachstums von *Tetrahymena thermophila* [Ordinate,  $10^6$  Zellen/l] in kontinuierlicher Kultur (Versuch PKK-1). Nach einer Reaktorlaufzeit von 70,5 Stunden wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen/l *Tetrahymena thermophila* zu einer Zelldichte von *Pseudomonas putida* von  $1,3 \cdot 10^{12}$  Zellen/l zugeimpft.**

*Tetrahymena thermophila* wurde in diesem Experiment nach einer Reaktorlaufzeit von 70,5 Stunden mit einer Startzelldichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/l beimpft. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Zelldichte von *Pseudomonas putida*  $1,3 \cdot 10^{12}$  Zellen/l. Vermutlich auf Grund

der extrem hohen Bakterienzeldichte, die unter anderem zu einem starken Absinken des pH-Wertes durch Ansäuerung führte, veränderte sich die Dichte der Ciliatenpopulation nur unwesentlich (Abbildung 4-8).

Bei der Betrachtung der Phasenebenen für den Verlauf des Zellwachstums von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* (Abbildung 4-9) wird deutlich, dass das System in diesem Experiment keinen stabilen Zustand erreicht hat.



**Abbildung 4-9:** Darstellung der Phasenebene für den Verlauf des Populationswachstums von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* (Reaktorlauf PKK-1). Auftragung der Zelldichte von *Pseudomonas putida* [ $10^{11}$  Zellen/l] gegen die Zelldichte von *Tetrahymena thermophila* [ $10^6$  Zellen/l].

#### 4.2.2 O<sub>2</sub>-Gehalt und pH-Wert im Medium

Bereits nach 13 Stunden Reaktorlaufzeit kam es, bedingt durch ein exponentielles Bakterienwachstum, zu einem starken Absinken des O<sub>2</sub>-Gehaltes (von 0,29 mmol/l auf 0,03 mmol/l) sowie durch Ansäuerung zum Absinken des pH-Wertes von anfänglich 7,0 auf 4,5.

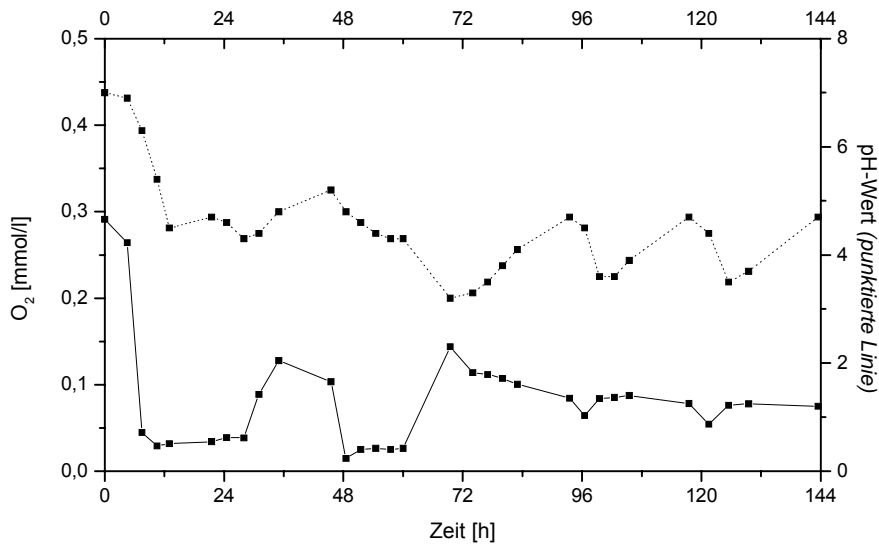


Abbildung 4-10: Darstellung des O<sub>2</sub>-Gehaltes (linke Ordinate, durchgehende Linie) und des pH-Wertes (rechte Ordinate, punktierte Linie) während des Reaktorlaufs PKK-1.

#### 4.2.3 Glucosekonzentration im Medium

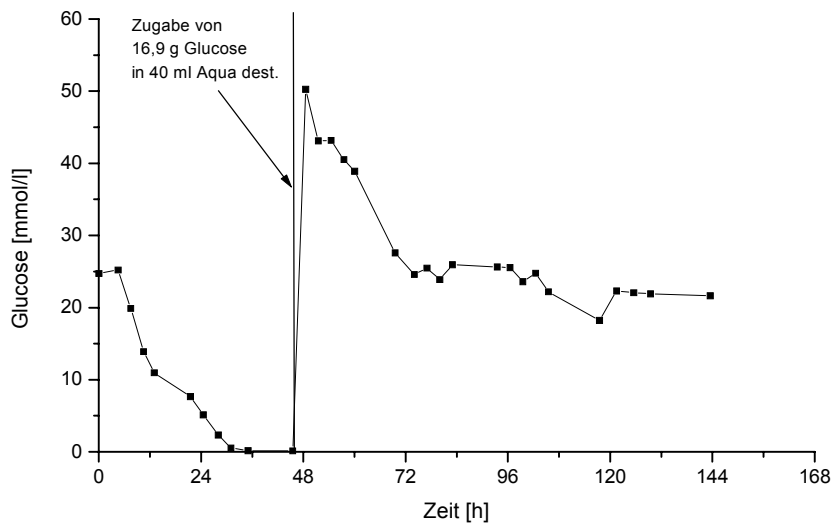


Abbildung 4-11: Darstellung des Verlaufs der Glucosekonzentration während des Reaktorlaufs PKK-1. Nach einer Reaktorlaufzeit von 46,5 h erfolgte eine sterile Injektion von 16,9 g Glucose gelöst in 40 ml Aqua dest..

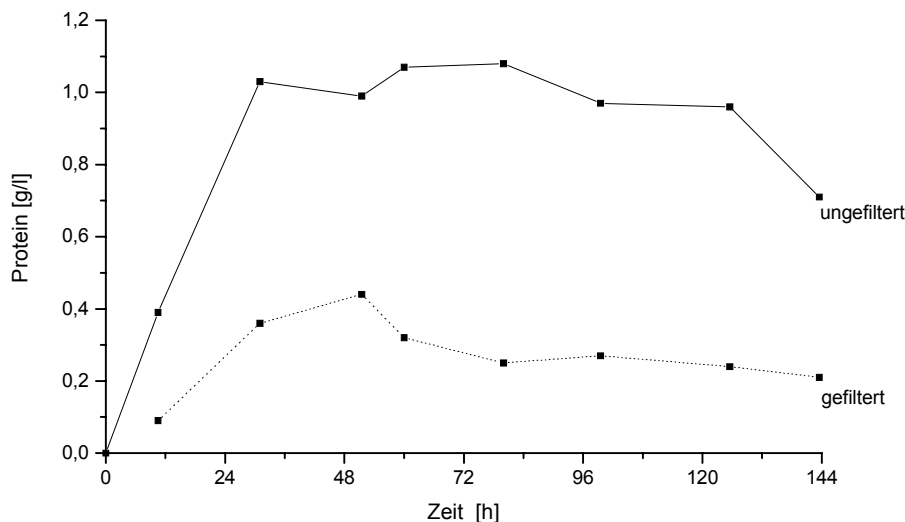
Der Glucosegehalt des Kulturmediums fiel innerhalb von 36 Stunden stark ab auf Werte unter 0,5 mmol/l, obwohl die Glucosekonzentration im Zulauf 11 g/l betrug. Um Glucose in ausreichender Menge verfügbar zu machen, erfolgte zum Zeitpunkt 46,5 h



eine sterile Injektion von 16,9 g Glucose gelöst in 40 ml Aqua dest., welche die Glucosekonzentration im Reaktor auf 11 g/l erhöhte. Nach 48,5 h wurde im Kulturgefäß ein Glucosegehalt von 50,3 mmol/l gemessen, der in der gesamten folgenden Kulturdauer auf etwa 22 mmol/l absank.

#### 4.2.4 Proteingehalt

Die folgende Darstellung zeigt die Proteinkonzentration in filtrierten und unfiltrierten Proben (je 100 µl) aus dem Reaktor während des Laufs PKK-1. Da *Tetrahymena thermophila* erst nach 70,5 Stunden zugeimpft wurde, sind die ersten drei Proben Filtrate einer reinen *Pseudomonas putida* Kultur, die deutlich höhere Zelldichten aufwies als in den Co-Kultivierungsexperimenten (siehe 4.4.1). Nach der Filtration nahm der Proteingehalt in den Proben extrem ab. Der Unterschied zwischen den einzelnen Proben lag teilweise über 0,7 g/l Probe. Der Verlust von Bakterien durch die Filtration bei sehr hohen Zelldichten wird hier deutlich. Bei der Proteinbestimmung in allen anderen Experimenten ist der Zellverlust durch Filtration auf Grund der geringeren Zelldichte von *Pseudomonas putida* nicht so groß, wie auch Vorversuche zeigen konnten. Ein geringer Zellverlust durch die Filtration ist aber in allen Experimenten zu berücksichtigen.



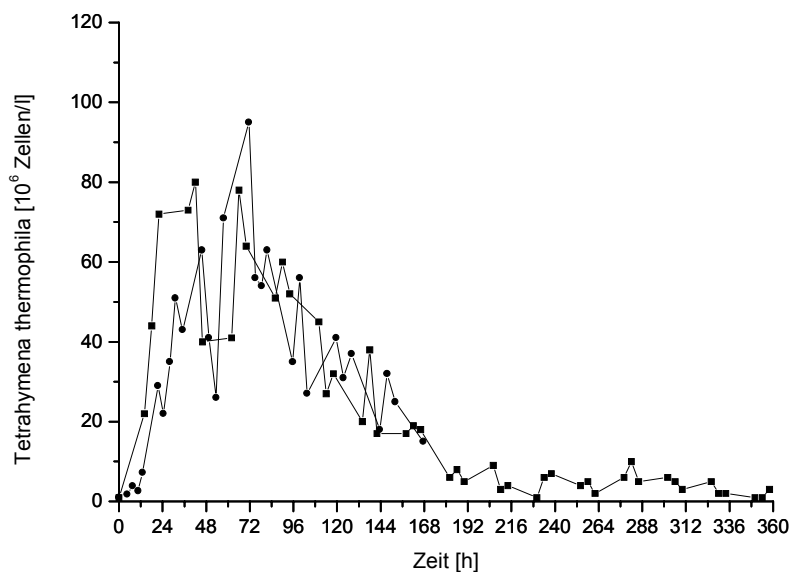
**Abbildung 4-12: Darstellung der Proteingehalte von ungefilterten Proben (durchgehende Linie) und filtrierten Proben (punktierte Linie) während des Versuchs PKK-1.**

### 4.3 Co-Kultur von *Tetrahymena thermophila* auf *Pseudomonas putida* in BC-Medium (Batch-Kulturen)

In den folgenden Experimenten erfolgte eine Co-Kultivierung von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* in BC-Medium. Die Kultur wurde als Fed-Batch-Kultur betrieben; das zur Probennahme entnommene Volumen wurde sogleich durch frisches BC-Medium ersetzt. Für den Versuch CoBK-1 betrug die Kulturdauer 358 Stunden. Das Experiment CoBK-2 lief über einen Zeitraum von 167,5 Stunden. Die Glucosekonzentration des Nachfüllmediums lag bei CoBK-1 bei 0,55 g/l und entsprach damit der Glucosekonzentration des Startmediums; bei CoBK-2 war die Glucosekonzentration im Nachfüllmedium auf 5,5 g/l erhöht, um eine längere Glucoseverfügbarkeit im Reaktor zu gewährleisten.

#### 4.3.1 Zellzahlen (CoBK-1 und CoBK-2)

Die Startzelldichte von *Tetrahymena thermophila* betrug  $1 \cdot 10^6$  Zellen/l. Für *Pseudomonas putida* wurde eine Startzelldichte von  $1 \cdot 10^9$  Zellen/l gewählt.

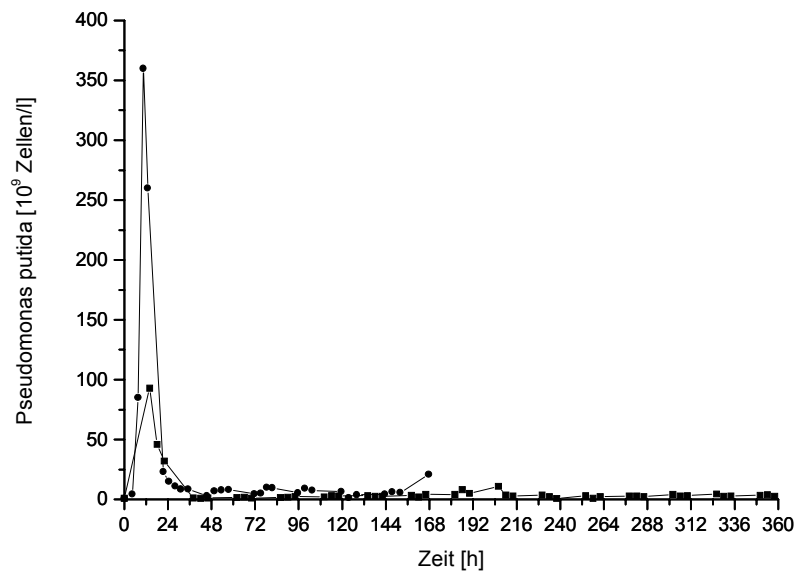


**Abbildung 4-13: Verlauf des Wachstums von *Tetrahymena thermophila* [ $10^6$  Zellen/l] in Co-Kultur mit *Pseudomonas putida*. Experimente im Fed-Batch-Verfahren (Versuch CoBK-1 als Quadrate, Versuch CoBK-2 als Kreise).**

In beiden Experimenten ist der Verlauf der Wachstumskurve von *Tetrahymena thermophila* nahezu identisch, die Erhöhung der Glucosekonzentration im

Nachfüllmedium scheint sich nicht auf das Wachstum der Ciliatenpopulation auszuwirken.

Die maximale Zelldichte der *Pseudomonas putida* Population wird in beiden Experimenten im gleichen zeitlichen Verlauf erreicht, liegt aber im Experiment CoBK-2 etwa 3,5-fach höher als im Experiment CoBK-1. Die verbesserte Versorgung mit Glucose als Kohlenstoffquelle (siehe Abbildung 4-16) führte zu einem gesteigerten Bakterienwachstum.



**Abbildung 4-14:** Verlauf des Wachstums von *Pseudomonas putida* [ $10^9$  Zellen/l] in Co-Kultur mit *Tetrahymena thermophila*. Experimente im Fed-Batch-Verfahren (Versuch CoBK-1 als Quadrate, Versuch CoBK-2 als Kreise).

#### 4.3.2 O<sub>2</sub>-Gehalt und pH-Wert im Medium

Sowohl der O<sub>2</sub>-Gehalt im Medium als auch der pH-Wert blieben im Verlauf dieser Experimente stabil. Ein deutliches Absinken des O<sub>2</sub>-Gehaltes zeigt sich nur mit dem Erreichen der maximalen Zelldichte der Bakterienpopulation.

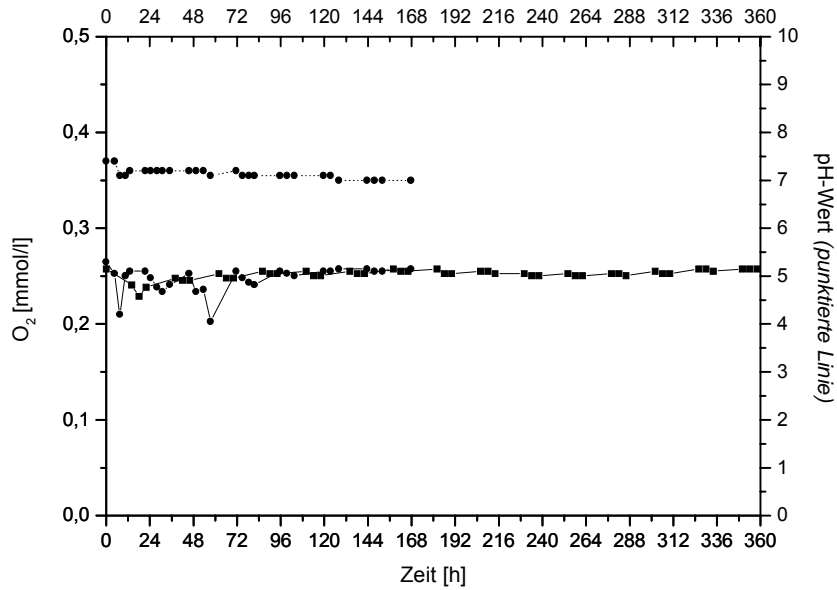


Abbildung 4-15: Verlauf des O<sub>2</sub>-Gehaltes (durchgehende Linie) und pH-Wertes (punktierter Linie) im Medium bei der Co-Kultivierung von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* in Fed-Batch-Kultur (Versuch CoBK-1 als Quadrate, Versuch CoBK-2 als Kreise). Auftragung des O<sub>2</sub>-Gehaltes auf der linken und des pH-Wertes auf der rechten Ordinate.

#### 4.3.3 Glucosekonzentration

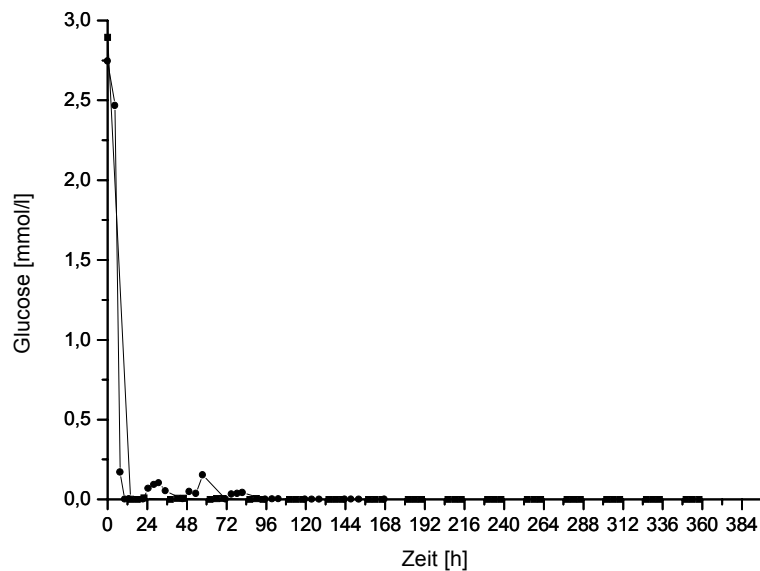


Abbildung 4-16: Verlauf der Glucosekonzentration im Medium bei der Co-Kultivierung von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* in Fed-Batch-Kultur (Versuch CoBK-1 als Quadrate, Versuch CoBK-2 als Kreise).

Der Verlauf der Glucosekonzentration im Medium der Experimente CoBK-1 und CoBK-2 zeigt, dass die zehnfache Erhöhung der Glucosekonzentration im Nachfüllmedium des Versuchs CoBK-2 zu einer längeren Verfügbarkeit von Glucose im Reaktor geführt hat. Glucose ist somit nicht mehr limitierender Faktor des Kultursystems.

#### **4.4 Co-Kultur von *Tetrahymena thermophila* auf *Pseudomonas putida* in BC-Medium (Kontinuierliche Kultur)**

Die folgenden Experimente zeigen die kontinuierliche Co-Kultivierung von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* in BC-Medium. Während des Experiments CoKK-1 wurde von Versuchsbeginn an kontinuierlich frisches Medium mit einer Glucosekonzentration von 5,5 g/l zugeführt. Die binnen 24 Stunden zugeführte Menge an frischem Medium entsprach dem innerhalb dieses Zeitraums entnommenen Probenvolumen. Der Auslauf des Systems wurde diskontinuierlich betrieben, d. h. es wurde nur mit jeder Probennahme Medium abgeführt. Der Reaktor lief über 335,5 Stunden mit einer mittleren Verdünnungsrate von  $D = 0,07/d$ .

Die beiden anderen Kulturexperimente (CoKK-2 und CoKK-3) wurden als Fed-Batch-Kultur begonnen. Nach 13 Stunden bei CoKK-2 und 23 Stunden bei CoKK-3 wurde auf kontinuierlichen Betrieb umgeschaltet. Die Glucosekonzentration im Nachfüllmedium betrug für den Versuch CoKK-2 5,5 g/l. Bei CoKK-3 lag die Glucosekonzentration bei 11 g/l. Das Experiment CoKK-2 lief über 455,5 Stunden mit einer mittleren Verdünnungsrate von  $D = 0,16/d$ . Für den Versuch CoKK-3 betrug die Kulturdauer 335,5 Stunden bei einer mittleren Verdünnungsrate von  $D = 0,27/d$ .

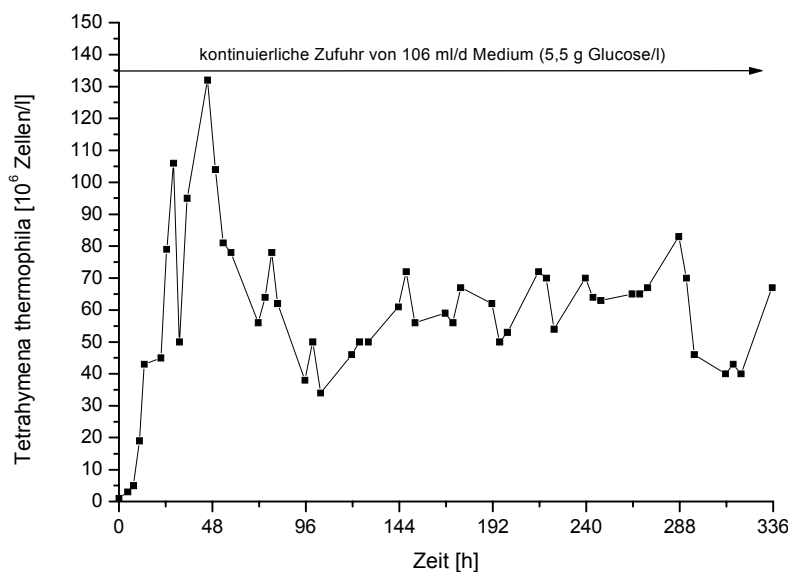
Die Startzelldichte von *Tetrahymena thermophila* betrug in allen Experimenten  $1 \cdot 10^6$  Zellen/l. Für *Pseudomonas putida* wurde eine Startzelldichte von  $1 \cdot 10^9$  Zellen/l eingesetzt.

#### 4.4.1 Populationswachstum (CoKK-1, CoKK-2 und CoKK-3)

Um einen besseren Überblick zu gewährleisten, sind die Zelldichten der Organismen im Folgenden für jedes Experiment gesondert aufgetragen.

##### 4.4.1.1 Populationswachstum CoKK-1

Die Startzelldichte für *Tetrahymena thermophila* betrug auch in diesem Experiment  $1 \cdot 10^6$  Zellen/l. Für *Pseudomonas putida* wurden  $1 \cdot 10^9$  Zellen/l eingesetzt. Der zeitliche Verlauf beider Wachstumskurven zeigt im Vergleich zu den Reaktorläufen im Fed-Batch-Betrieb keine großen Unterschiede. Im kontinuierlichen Betrieb fällt auf, dass die Population von *Tetrahymena thermophila* (Abbildung 4-17) im Maximum größere Zelldichten erreicht ( $1,3 \cdot 10^8$  Zellen/l) und über etwa 150 Stunden einen stabilen Zustand mit etwa  $6 \cdot 10^7$  Zellen/l einnimmt. Auch die Population von *Pseudomonas putida* erreicht in kontinuierlicher Kultur (Abbildung 4-18) über den gleichen Zeitraum wie die Ciliatenpopulation eine stabile Phase mit einer Zelldichte von etwa  $3 \cdot 10^{10}$  Zellen/l, was deutlich über den Zelldichten liegt, die im Fed-Batch-System erreicht wurden.



**Abbildung 4-17: Populationswachstum von *Tetrahymena thermophila* [ $10^6$  Zellen/l] während des Versuchs CoKK-1 (Versuchsdauer = 335,5 h,  $D = 0,07/d$ ). Es erfolgte eine kontinuierliche Zufuhr von Medium (Glucosekonzentration im Nachfüllmedium = 5,5 g/l).**

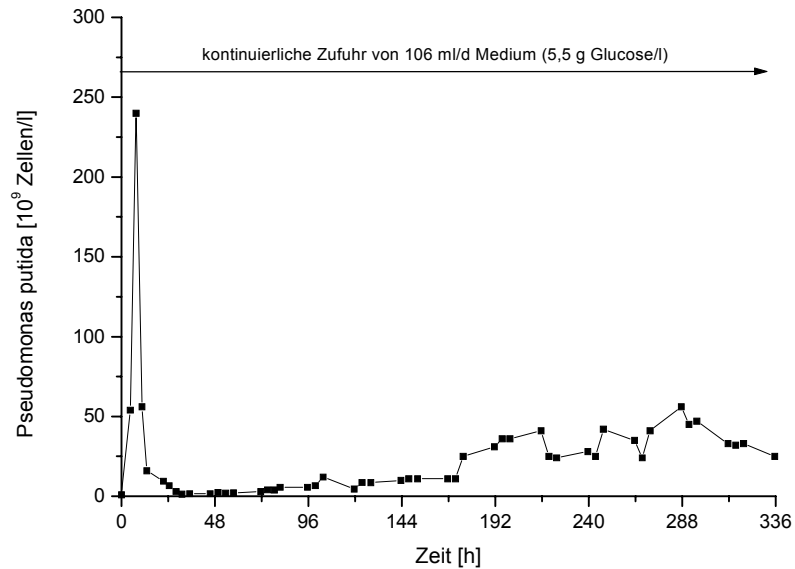


Abbildung 4-18: Populationswachstum von *Pseudomonas putida* [ $10^9$  Zellen/l] während des Versuchs CoKK-1 (Versuchsdauer = 335,5 h,  $D = 0,07/d$ ,) mit einer kontinuierlichen Zufuhr von Medium (Glucosekonzentration im Nachfüllmedium = 5,5 g/l).

#### 4.4.1.2 Populationswachstum CoKK-2

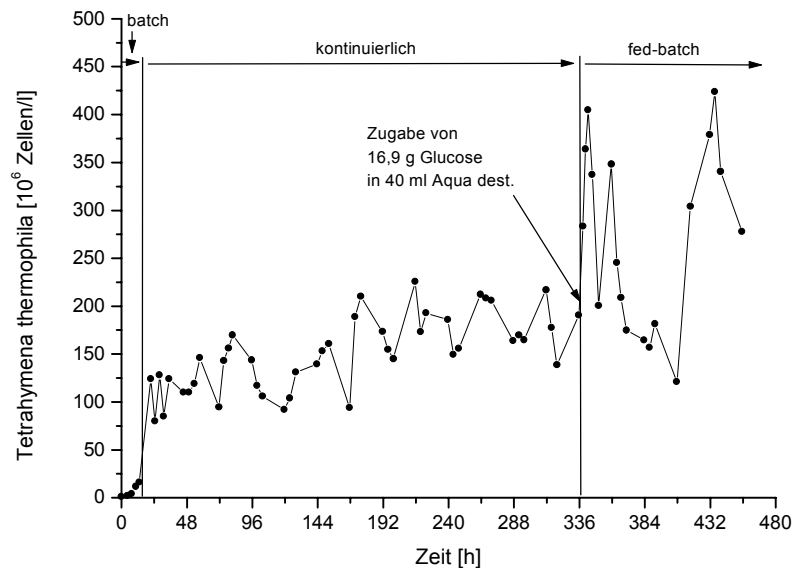
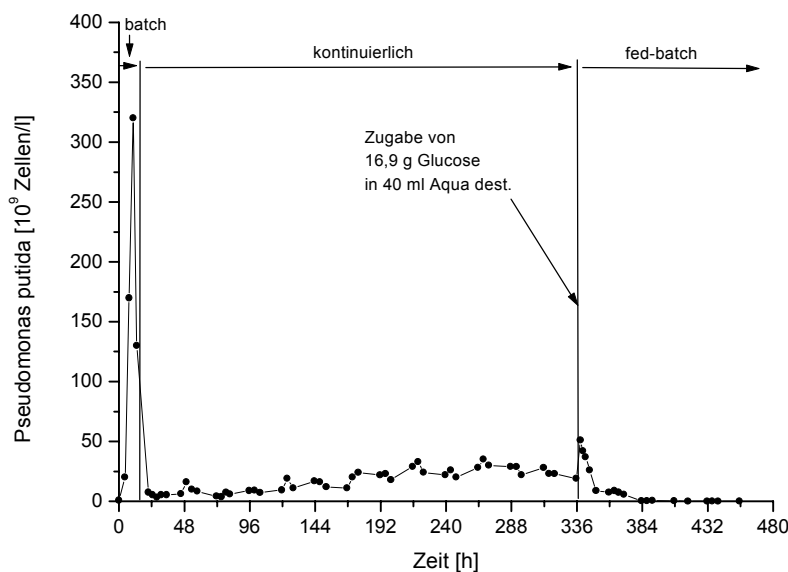


Abbildung 4-19: Populationswachstum von *Tetrahymena thermophila* [ $10^6$  Zellen/l] während des Versuchs CoKK-2 (Versuchsdauer = 455,5 h). Der Reaktor wurde nach 15 h von einer Batch-Kultur auf kontinuierlichen Betrieb umgeschaltet ( $D = 0,16/d$ , Glucosekonzentration im Nachfüllmedium = 5,5 g/l). Nach 337 h erfolgte eine sterile Injektion von 16,9 g Glucose gelöst in 40 ml Aqua dest. und ein Umschalten auf die Fed-Batch-Betriebsweise.

Im Experiment CoKK-2 (Abbildung 4-19) befand sich die Population von *Tetrahymena thermophila* nach einer exponentiellen Wachstumsphase über etwa 200 Stunden in einem stabilen Gleichgewicht mit der *Pseudomonas putida* Population (Abbildung 4-20). Bewusst gestört wurde dieser Gleichgewichtszustand nach einer Reaktorlaufzeit von 337 Stunden durch eine sterile Injektion von 16,9 g Glucose gelöst in 40 ml Aqua dest.. Dadurch erhöhte sich die Glucosekonzentration von 6  $\mu\text{mol/l}$  auf etwa 40  $\text{mmol/l}$  (Abbildung 4-26). Es kam zu einem schnellen Anwachsen der Population von *Pseudomonas putida* (Abbildung 4-20) sowie etwas später zu einem Anstieg der Zelldichte von *Tetrahymena thermophila* (Abbildung 4-19).

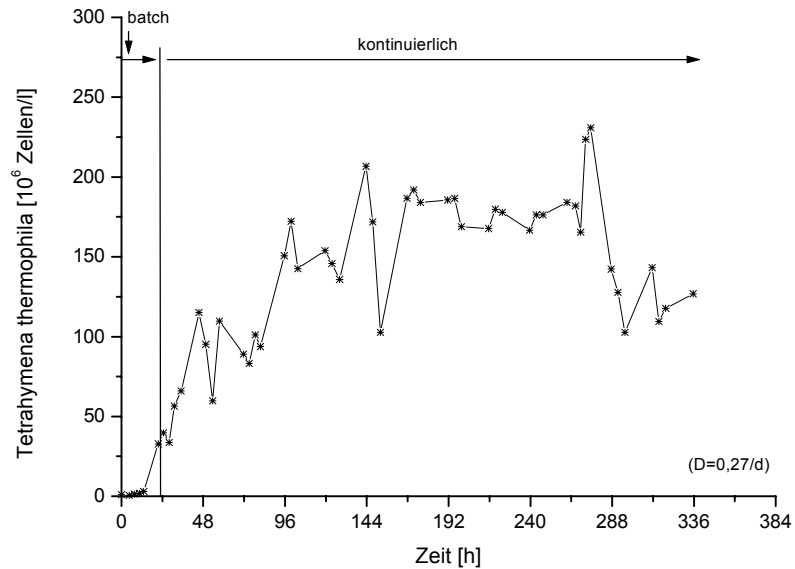


**Abbildung 4-20: Populationswachstum von *Pseudomonas putida* [ $10^9$  Zellen/l] während des Versuchs CoKK-2 (Versuchsdauer = 455,5 h). Der Reaktor wurde nach 15 h von einer Batch-Kultur auf kontinuierlichen Betrieb umgeschaltet ( $D = 0,16/\text{d}$ , Glucosekonzentration im Nachfüllmedium = 5,5 g/l). Nach 337 h erfolgte ein Umschalten auf die Fed-Batch-Betriebsweise und eine sterile Injektion von 16,9 g Glucose gelöst in 40 ml Aqua dest..**

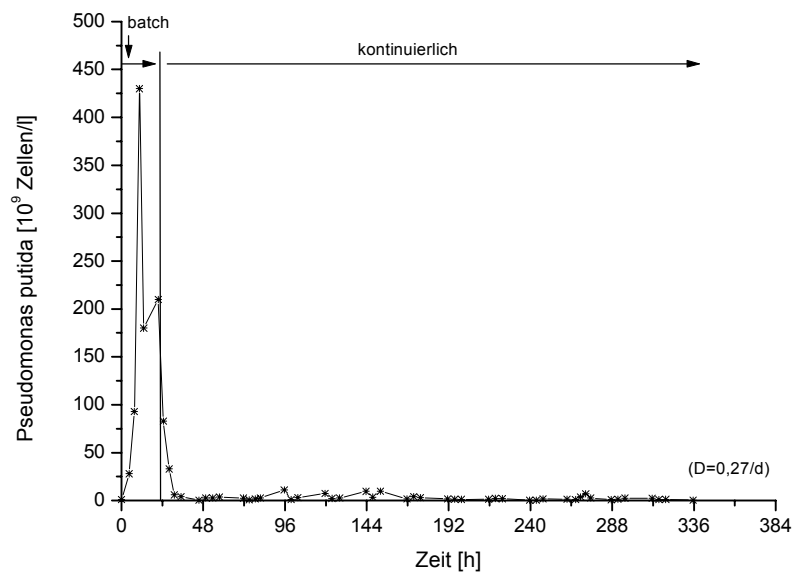
#### 4.4.1.3 Populationswachstum CoKK-3

Im Verlauf des Experiments CoKK-3 wurde nach einer 23-stündigen Batch-Phase kontinuierlich Medium mit einer Glucosekonzentration von 11 g/l zugeführt. Die Wachstumskurve von *Tetrahymena thermophila* (Abbildung 4-21) entspricht vom Verlauf und den erreichten Zelldichten nahezu der Kurve des Versuchs CoKK-2.





**Abbildung 4-21: Populationswachstum von *Tetrahymena thermophila* [ $10^6$  Zellen/l] im Versuch CoKK-3 (Versuchsdauer = 335,5 h). Nach 22,5 h wurde vom Batch-Verfahren auf kontinuierlichen Betrieb ( $D = 0,27/d$ , Glucosekonzentration im Nachfüllmedium = 11 g/l) umgeschaltet.**



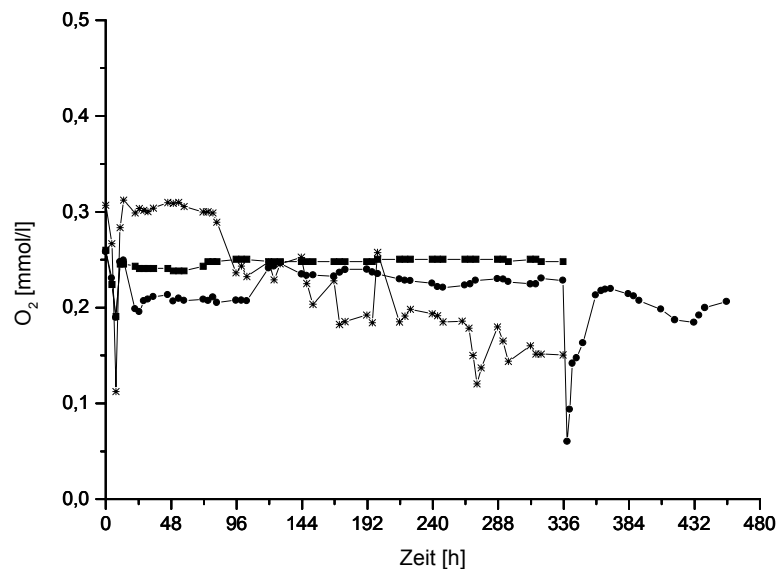
**Abbildung 4-22: Populationswachstum von *Pseudomonas putida* [ $10^9$  Zellen/l] im Versuch CoKK-3 (Versuchsdauer = 335,5 h). Die Umstellung vom Batch-Verfahren auf kontinuierlichen Betrieb ( $D = 0,27/d$ , Glucosekonzentration im Nachfüllmedium = 11 g/l) erfolgte nach 22,5 h.**

Der Wachstumsverlauf der Bakterienpopulation von *Pseudomonas putida* im Experiment CoKK-3 (Abbildung 4-22) stimmt im zeitlichen Verlauf mit den

vorhergehenden Experimenten überein, zeigt aber eine deutlich höhere maximale Populationsdichte am Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Diese liegt bei  $4,3 \cdot 10^{11}$  Zellen/l (CoKK-3) gegenüber  $3,2 \cdot 10^{11}$  Zellen/l (CoKK-2).

#### 4.4.2 O<sub>2</sub>-Gehalt und pH-Wert im Medium

Bei allen dargestellten Experimenten (Abbildung 4-23) wurde dem System sterile Raumluft mit einer Rate von 0,8 vvm (CoKK-1, CoKK-3) und 0,6 vvm (CoKK-2) zugeführt, so dass stets eine sehr gute O<sub>2</sub>-Versorgung der Zellen sichergestellt werden konnte. Eine deutliche Abnahme des O<sub>2</sub>-Gehaltes im Medium stand immer mit einem massiven Anwachsen der Bakterienpopulation in Zusammenhang.



**Abbildung 4-23: Auftragung der O<sub>2</sub>-Gehalte im Medium für die Versuche CoKK-1 (Quadrate), CoKK-2 (Kreise) und CoKK-3 (Sterne).**

Der pH-Wert im Verlauf der Versuche CoKK-1, CoKK-2 und CoKK-3 ist in der Abbildung 4-24 dargestellt. Durch das extreme Anwachsen der Bakterienpopulation zu Beginn des Reaktorlaufs CoKK-3 (Sterne) kommt es zu einem starken Abfall des pH-Wertes. Dies ist auch nach Glucosezugabe während des Reaktorlaufs CoKK-2 (Quadrate) festzustellen. Das Absinken des pH-Wertes tritt jeweils bei hohen Glucosekonzentrationen im Medium auf.

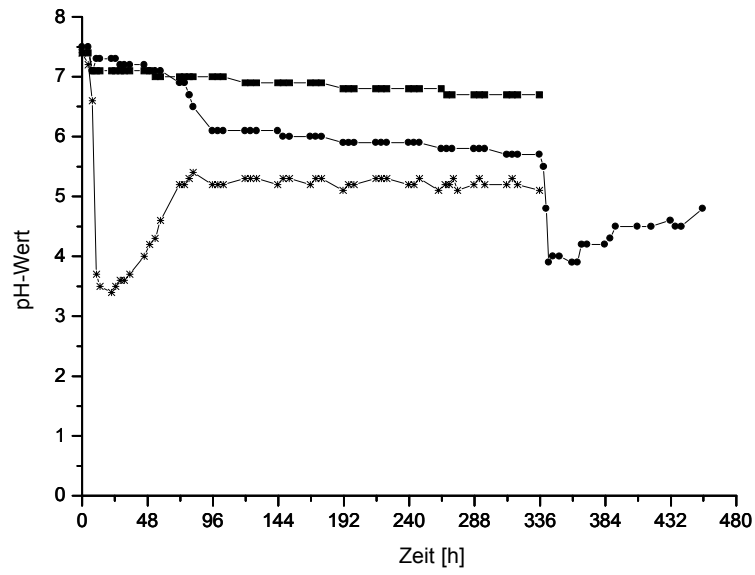


Abbildung 4-24: Verlauf der Änderung des pH-Wertes im Medium während der Versuche CoKK-1 (Quadrate), CoKK-2 (Kreise) und CoKK-3 (Sterne).

#### 4.4.3 Glucosekonzentration im Medium

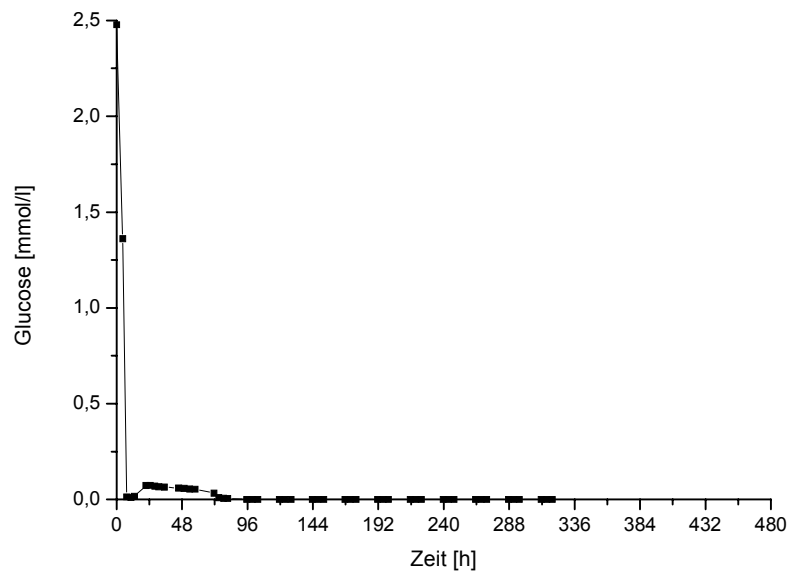
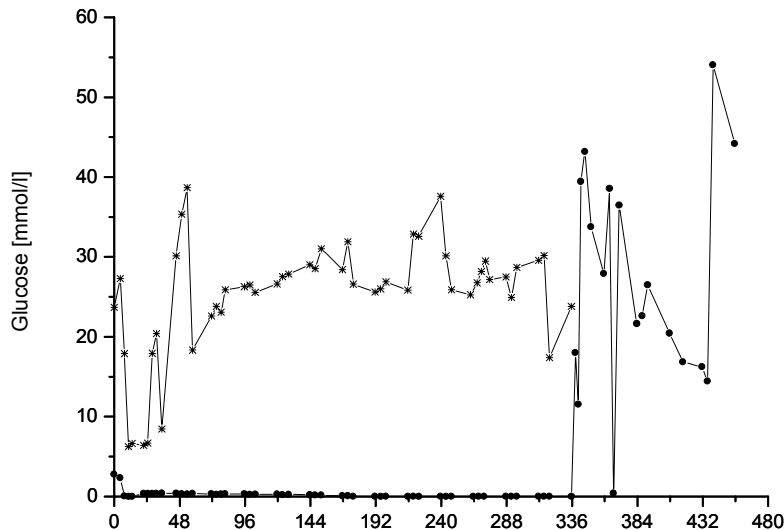


Abbildung 4-25: Auftragung der Glucosekonzentration im Medium gegen die Laufzeit des Reaktors für den Versuch CoKK-1.



**Abbildung 4-26: Darstellung Glucosekonzentration im Medium im zeitlichen Verlauf der Versuche CoKK-2 (Kreise) und CoKK-3 (Sterne).**

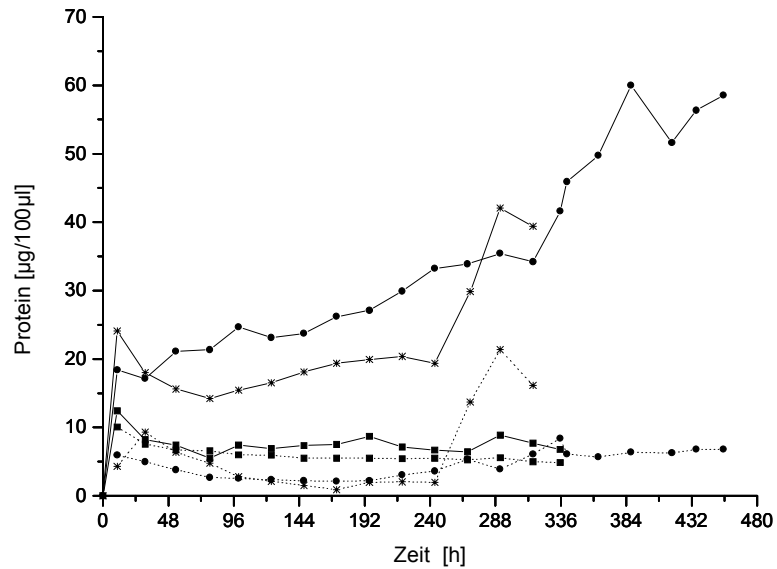
In den dargestellten Experimenten CoKK-1 (Abbildung 4-25) und CoKK-2 (Abbildung 4-26, Punkte) wurde die zu Beginn der Versuche vorgegebene Glucosemenge innerhalb der ersten 24 Stunden nach Versuchsbeginn größtenteils verbraucht. Die hohe Glucosekonzentration im Experiment CoKK-2 wurde durch eine nachträgliche sterile Glucoseinjektion (16,9 g Glucose in 40 ml Aqua dest.) zum Zeitpunkt 337 Stunden erreicht.

Die im Experiment CoKK-3 (Abbildung 4-26, Sterne) bereits zu Beginn vorgelegte hohe Glucosekonzentration von 5,5 g/l sowie die Glucosekonzentration von 11 g/l im Nachfüllmedium haben eine hohe Verfügbarkeit von Glucose während der gesamten Versuchsdauer gewährleistet. Während keiner Phase dieses Reaktorlaufs war Glucose als Substrat limitiert.

#### 4.4.4 Proteingehalt

Im Versuch CoKK-1 verändern sich die Proteingehalte der Proben während der gesamten Versuchsdauer kaum. Auch die Unterschiede zwischen den unfiltrierten Proben, die sowohl *Tetrahymena thermophila* als auch *Pseudomonas putida* enthalten und den filtrierten Proben, aus denen *Tetrahymena thermophila* entfernt wurde, sind gering. Im Gegensatz dazu zeigen die Proteinbestimmungen der Versuche CoKK-2 und CoKK-3 einen Anstieg der Proteinkonzentration mit zunehmender Versuchsdauer. In den unfiltrierten Proben kommt es im Versuchsverlauf des Experiments CoKK-2 zu

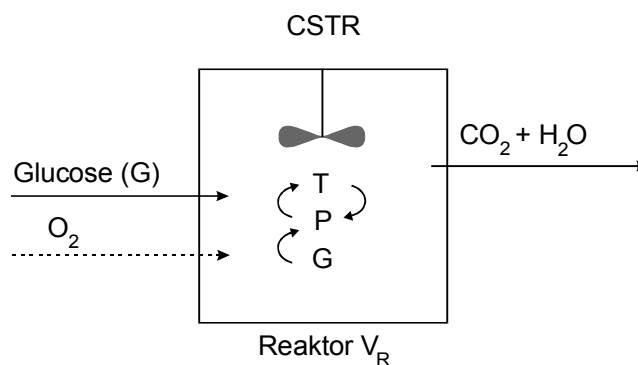
einer Verdreifachung des Proteingehaltes, im Versuch CoKK-3 verdoppelt sich der Proteingehalt. Die Proteingehalte in den filtrierten Proben sind in diesen beiden Reaktorläufen nur etwa halb so hoch wie die der unfiltrierten Proben.



**Abbildung 4-27: Auftragung der Proteingehalte im Medium bei filtrierten (durchgehende Linie) und unfiltrierten Proben (gestrichelte Linie) gegen die Reaktorlaufzeit der Versuche CoKK-1 (Quadrate), CoKK-2 (Kreise) und CoKK-3 (Sterne).**

#### 4.5 Mathematisches Modell der Wachstumskinetik eines mikrobiellen Räuber-Beute-Systems

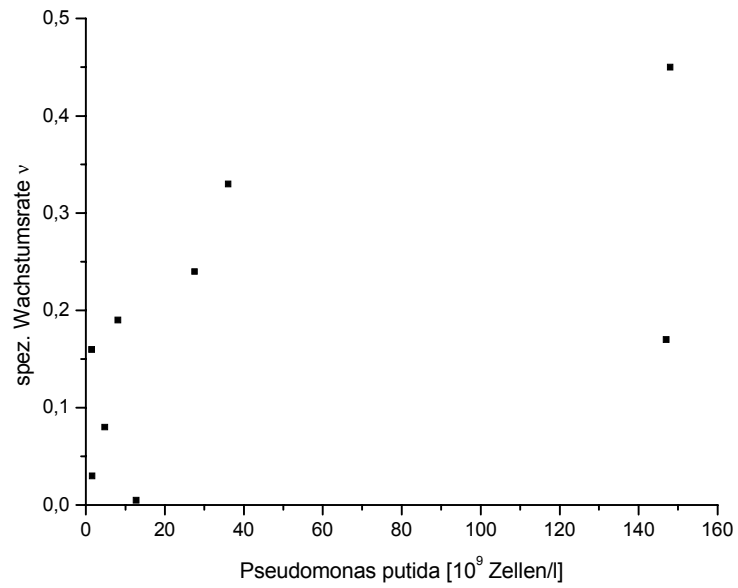
Zur Veranschaulichung der wichtigen Parameter, die in einem mathematischen Modell zur Simulation eines mikrobiellen Räuber-Beute-Systems berücksichtigt werden sollten, sind die Zu- und Abflüsse eines kontinuierlichen gerührten Bioreaktors sowie die Wechselwirkungen der Komponenten innerhalb des Systems in Abbildung 4-28 vereinfacht dargestellt.



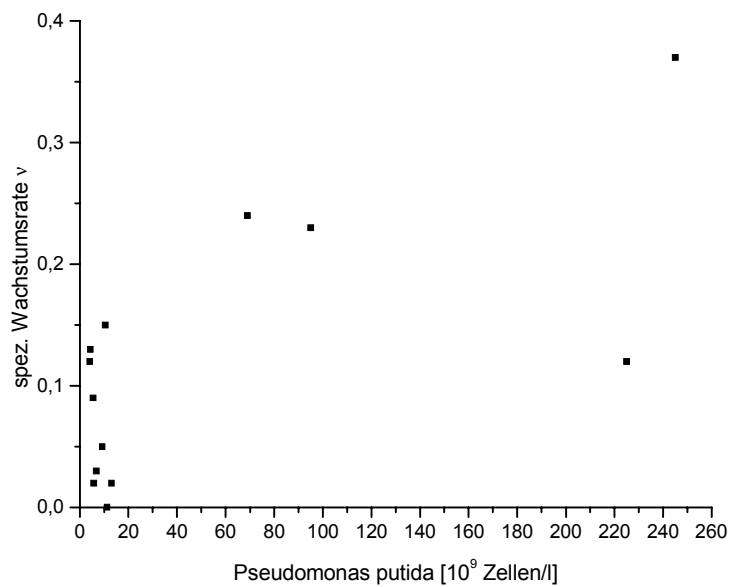
**Abbildung 4-28:** Schema des kontinuierlichen Bioreaktors (CSTR) mit den Zu- und Abflüssen und den Wechselwirkungen der Komponenten untereinander. T = *Tetrahymena thermophila*, P = *Pseudomonas putida*, G = Glucosegehalt des Mediums im Reaktor.

Der Modellansatz von Pavlou (1985) wurde zur Analyse des mikrobiellen Räuber-Beute-Systems der vorliegenden Arbeit verwendet. Das Differentialgleichungssystem und die dazugehörigen mathematischen Überlegungen sind im Kapitel 2.5, S. 26ff. näher erläutert.

Die Anwendbarkeit des Modells auf die experimentellen Ansätze der kontinuierlichen Co-Kulturen der Experimente CoKK-1, CoKK-2 und CoKK-3 wurde überprüft. Die spezifische Wachstumsrate  $\nu$  der Räuberpopulation wurde aus der Geradensteigung zweier aufeinanderfolgender Messpunkte ermittelt und gegen den Mittelwert der Populationsdichte von *Pseudomonas putida* zum gleichen Zeitpunkt aufgetragen. Sie wurde für den Versuch CoKK-1 für den Zeitraum 0 - 45,5 h und für den Versuch CoKK-2 für den Zeitraum 0 - 81,5 h ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-29 und Abbildung 4-30 dargestellt.



**Abbildung 4-29:** Auftragung der spezifischen Wachstumsrate der Population von *Tetrahymena thermophila* ( $v$ ) über der Zelldichte von *Pseudomonas putida* in  $10^9$  Zellen/l des Reaktorlaufs CoKK-1.



**Abbildung 4-30:** Auftragung der spezifischen Wachstumsrate der Population von *Tetrahymena thermophila* ( $v$ ) über der Zelldichte von *Pseudomonas putida* in  $10^9$  Zellen/l des Reaktorlaufs CoKK-2.





## 5 Diskussion

Zu Beginn werden einige Bemerkungen zur Vorgehensweise bei der Quantifizierung der Organismen, zur Zellzählung, gemacht. Zellzählungen mit Hilfe von Zählkammern sind ein altes und bewährtes Verfahren, das neben der Bestimmung der Zelldichte auch eine optische Beurteilung der Zellen bei jeder Probennahme ermöglicht. Die Zellzählung ebenso wie die Verdünnung der Zellsuspension zum Abtöten der Zellen beinhalten Fehler. Dieser Fehler wurde mit Hilfe von Vergleichszählungen mit gleicher Verdünnung einer Probe ermittelt. Unter der Annahme, dass die Werte normalverteilt sind, wurde die Standardabweichung errechnet. Der Fehler 1. Art für die jeweilige Zellzählung lag unterhalb 5 %, und damit deutlich innerhalb des Toleranzbereiches.

### 5.1 Kinetik des Wachstums

Wie eingangs erwähnt (siehe 2.4.1), bietet die mathematische Beschreibung des Zellwachstums in der exponentiellen Phase die Möglichkeit zur Bestimmung der maximalen spezifischen Wachstumsrate und zur Berechnung der Verdopplungszeit aus der größten Steigung der Kurve.

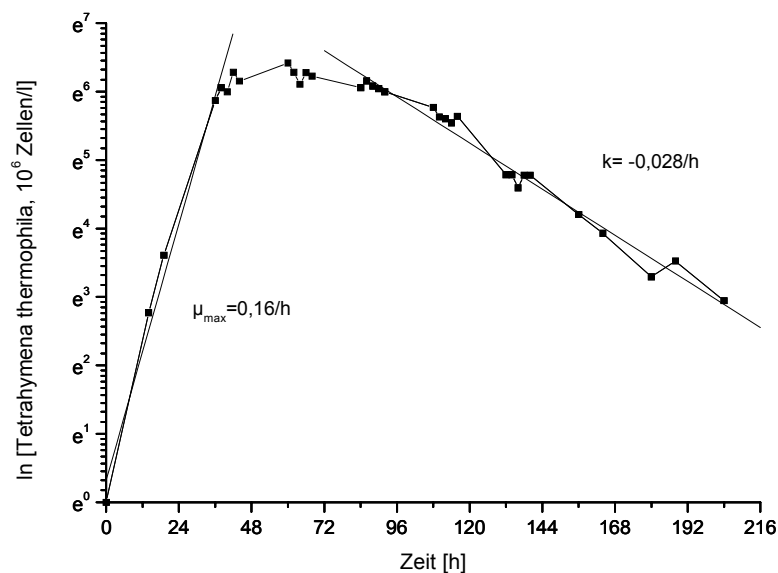
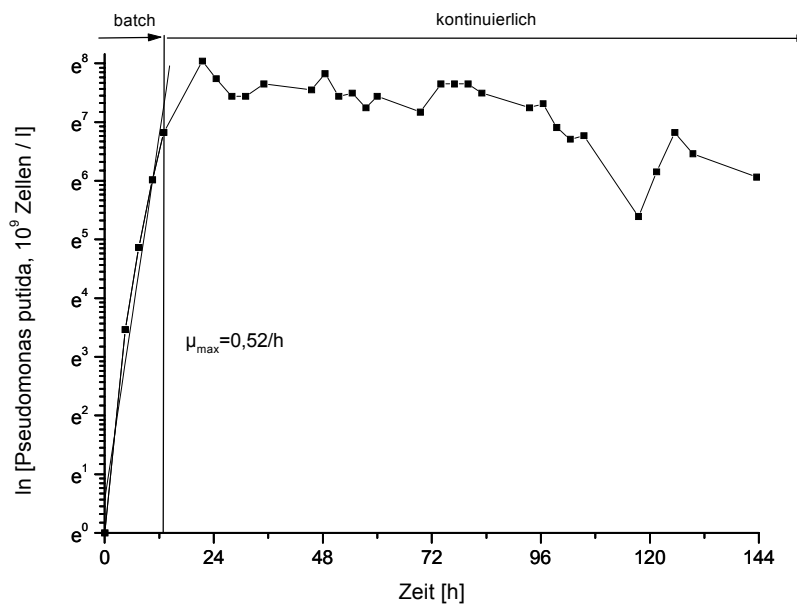


Abbildung 5-1: Darstellung der grafischen Ermittlung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max} = 0,16/h$  und spezifische Sterbegeschwindigkeit  $k = -0,028/h$  aus einer Wachstumskurve von *Tetrahymena thermophila* (logarithmische Ordinate) bei der Kultur im Batch-Verfahren (Reaktorlauf TBK-2).

Aus einer typischen Wachstumskurve von *Tetrahymena thermophila* im Batch-Verfahren (Versuch TBK-2, Abbildung 5-1) wurde eine spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max} = 0,16/h$  mit einer Verdopplungszeit von  $t_D = 4,3$  Stunden ermittelt. Diese Werte liegen unterhalb der von HÜNSELER et al. (1987) angegebenen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von  $\mu_{\max} = 0,35/h$  und der maximal erreichten Verdopplungszeit von  $t_D = 2$  Stunden. Die erreichten maximalen Zelldichten von  $6 \cdot 10^8$  Zellen/l liegen im Größenbereich der Literaturangabe dieser Autoren von  $10^9$  Zellen/l für Kulturen in PPY-Medium.

Die Phase des Absterbens der Zellen folgt ebenso wie die Wachstumsphase einem exponentiellen Verlauf. Die mathematische Beschreibung der Absterbephase ermöglicht die Bestimmung der spezifischen Sterberate und die Berechnung der Halbwertszeit aus der negativen Steigung der Kurve. Aus der Wachstumskurve von *Tetrahymena thermophila* im Experiment TBK-2 (Abbildung 5-1) wurde eine spezifische Sterbegeschwindigkeit  $k = -0,028/h$  mit einer Halbwertszeit von  $t_H = 25$  Stunden ermittelt.



**Abbildung 5-2: Grafische Ermittlung der maximalen spezifischen Wachstumsrate  $\mu_{\max} = 0,52/h$  von *Pseudomonas putida* in der Batch-Phase eines kontinuierlichen Reaktorlaufs (PKK-1), Darstellung mit logarithmischer Ordinate.**

Die kinetischen Parameter für das Wachstum von *Pseudomonas putida* wurden aus der Batch-Phase des Reaktorlaufs PKK-1 ermittelt (Abbildung 5-2). Die Bakterien wuchsen mit einer maximalen spezifischen Zuwachsrate von  $\mu_{\max} = 0,52/h$  und damit

einer Verdopplungszeit von  $t_D = 80$  min.

Für die Kulturen von *Tetrahymena thermophila* im Batch Verfahren und für die Standkulturen wurde ein Proteose-Pepton-Hefeextrakt-Medium (PPY-Medium) verwendet. PPY-Medium als sehr einfaches Vollmedium mit Pepton als Proteinquelle und Hefeextrakt als Quelle für Nukleinsäuren, Vitamine und Aminosäuren (ETHUIN UND DE CONINCK, 1996) ist ein bewährtes Medium zur Kultivierung von *Tetrahymena*. Die in diesem Medium erreichten Zelldichten und Zuwachsraten werden nur von Kulturen in Magermilchmedien überboten, bei denen die Verdopplungszeit nur 1,4 Stunden beträgt (KIY UND TIEDTKE, 1992). Sehr hohe Zelldichten ( $2 \cdot 10^9$  Zellen/l) wurden auch mit einem sehr einfachen Medium, bestehend aus Hefeextrakt und Glucose, erreicht (ETHUIN et al., 1995). Gerade im industriellen Maßstab ist die Verwendung der beiden zuletzt genannten Medien von Interesse, da neben den hohen Zelldichten und kurzen Verdopplungszeiten auch geringere Kosten zu erwarten sind.

### **5.2 Co-Kulturen von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida***

Zur Co-Kultivierung von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* wurde ein synthetisches Medium sowohl im Fed-Batch- als auch im kontinuierlichen Verfahren eingesetzt. Synthetische Medien können in ihrer Zusammensetzung variiert werden und bieten so die Möglichkeit, Einblicke in die Biologie von Fressmechanismen zu gewinnen (TIEDTKE UND RASMUSSEN, 1988). Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde nur der Glucosegehalt des Mediums variiert, alle anderen Komponenten des BC-Mediums wurden in ihren Konzentrationen konstant gehalten.

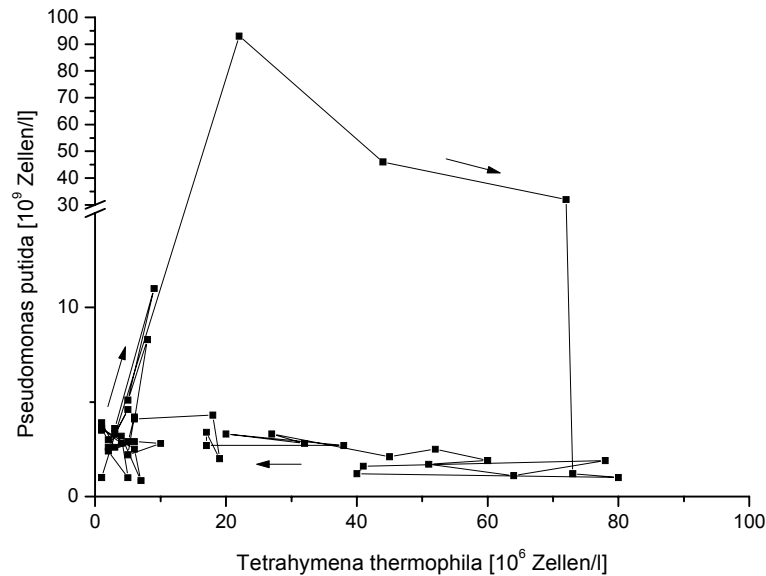
Da das verwendete BC-Medium in axenischer Kultur kein Anwachsen von *Tetrahymena thermophila* ermöglicht, ist es besonders gut zur Co-Kultivierung geeignet. Das Wachstum der Ciliaten lässt sich in diesem Medium in Co-Kultur mit einem Beuteorganismus auf dessen Populationsdichte zurückführen.

SZABLEWSKI et al. (1991) haben in ihren Experimenten gezeigt, dass die Glucosekonzentration im Kulturmedium dann einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum hat, wenn die Verfügbarkeit von Aminosäuren reduziert wird. Wenn nur essentielle Aminosäuren verfügbar sind, dann erfolgt die Zellteilung in Abwesenheit von Glucose nur sehr langsam. In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Variation von Glucose im Kulturmedium in niedrigen Konzentrationen (10 g/l - 40 g/l) einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum von *Tetrahymena* hat, da in Batch-Kulturen mit einer erhöhten Glucosekonzentration eine längere stationäre Phase

beobachtet wurde. Zellen in einem Kulturmedium mit 60 g/l Glucose starben jedoch ab (KIY UND TIEDTKE, 1992). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Glucosekonzentrationen lagen zwischen 0,55 g/l und 11 g/l. Mit einer Erhöhung der Konzentration von Glucose wurde eine verbesserte Kohlenstoffversorgung gewährleistet und damit auch Glucose als Mangelfaktor ausgeschlossen. Mit dieser verbesserten Versorgungssituation ging ein erhöhtes Zellwachstum einher. Dies gilt sowohl für *Pseudomonas putida* als auch für *Tetrahymena thermophila*. Begründet ist das gesteigerte Wachstum der Bakterien durch die verbesserte Energieversorgung, und die erhöhte Beutezellichte führt zu gesteigerten Zelldichten der Räuberpopulation von *Tetrahymena thermophila*. Eine Förderung des Zellwachstums der Protozoenpopulation durch die erhöhte Glucosekonzentration im Kulturmedium lässt sich aus den vorliegenden Experimenten nicht ableiten.

Neben der Mediumzusammensetzung kommt einem weiteren abiotischen Faktor bezüglich des Zellwachstums eine zentrale Bedeutung zu. Die Zellen zeigen eine positive Aerotaxis und eine negative Gravitaxis (KRISTIANSEN et al., 1996). Die Sauerstoffverfügbarkeit ist für die Kultur von großer Wichtigkeit (HELLUNG-LARSEN, 1988). Vor diesem Hintergrund wurde in allen Experimenten mit Raumluft in einer Rate von 0,6 vvm bis 0,8 vvm begast, um auch in den Phasen exponentiellen Wachstums eine bestmögliche Versorgung sicherzustellen. In der Wachstumsphase einer Kultur muss eine physikalisch begrenzte Sauerstoffmenge im Kulturmedium unter einer steigenden Anzahl von Zellen aufgeteilt werden, daraus resultiert eine Konstanz des Produkts aus  $O_2$ -Verbrauch und Zellzahl (JAUKE et al., 1986). Die Drehzahl des Scheibenrührers von 300 U/min sorgte für eine gleichmäßige Verteilung der eingetragenen Gasblasen. Höhere Begasungsraten und Rührerdrehzahlen wurden nicht gewählt, um mögliche zellschädigende Effekte durch zu hohe Scherkräfte ausschließen zu können.

Das dynamische Verhalten eines Systems kann sehr gut mit Hilfe von Phasenebenen erläutert werden. In Abbildung 5-3 sind die Zelldichten von *Tetrahymena thermophila* (Abszisse) und *Pseudomonas putida* (Ordinate) aufgetragen.



**Abbildung 5-3:** Darstellung der Phasenebene für den Verlauf der Zelldichte von *Tetrahymena thermophila* [Abszisse,  $10^6$  Zellen/l] und *Pseudomonas putida* [Ordinate,  $10^9$  Zellen/l] in Fed-Batch-Kultur, Experiment CoBK-1.

Die Darstellung zeigt entlang der Phasenkurve den Verlauf eines dynamischen Prozesses hin zu einem stabilen Punkt. Ausgehend von geringen Zelldichten zu Beginn des Versuchs durchläuft das System während der Wachstumsphase einen Zyklus, der als schleifenförmige Bahn im Phasendiagramm erkennbar wird. Nach dem Erreichen der maximalen Zelldichte der Bakterienpopulation wächst auch die Ciliatenpopulation zu ihrer maximalen Populationsdichte heran. Danach stellt sich im System ein stabiler Zustand ein, der in diesem Fall nahe am Ausgangszustand liegt.

Bei den kontinuierlichen Co-Kulturen von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* wurde die Verdünnungsrate von  $D = 0,07/d$  über  $D = 0,16/d$  zu  $D = 0,27/d$  erhöht und die Glucosekonzentration im Nachfüllmedium von 5,5 g/l (CoKK-1 und CoKK-2) auf 11 g/l (CoKK-3) verdoppelt. Die erhöhte Verfügbarkeit von Glucose führte, bei gleicher Startzelldichte, zu einem vermehrten Bakterienwachstum, das zu einer maximalen Zelldichte von  $240 \cdot 10^9$  Zellen/l (CoKK-1) über  $320 \cdot 10^9$  Zellen/l (CoKK-2) zu  $430 \cdot 10^9$  Zellen/l (CoKK-3) gesteigert werden konnte (Abbildung 5-4). Mit dieser größeren Beutezelldichte konnte auch die Zelldichte der Räuberpopulation (Abbildung 5-5) erhöht werden.

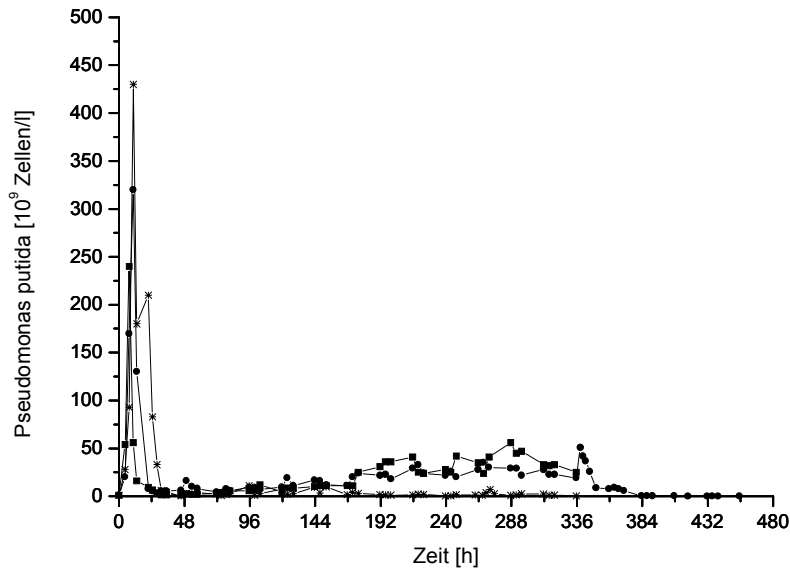


Abbildung 5-4: Auftragung der Zelldichten von *Pseudomonas putida* [ $10^9$  Zellen/l] über der Versuchsdauer. Dargestellt sind die Experimente der kontinuierlichen Co-Kultivierung CoKK-1 (Quadrate), CoKK-2 (Kreise), CoKK-3 (Sterne).

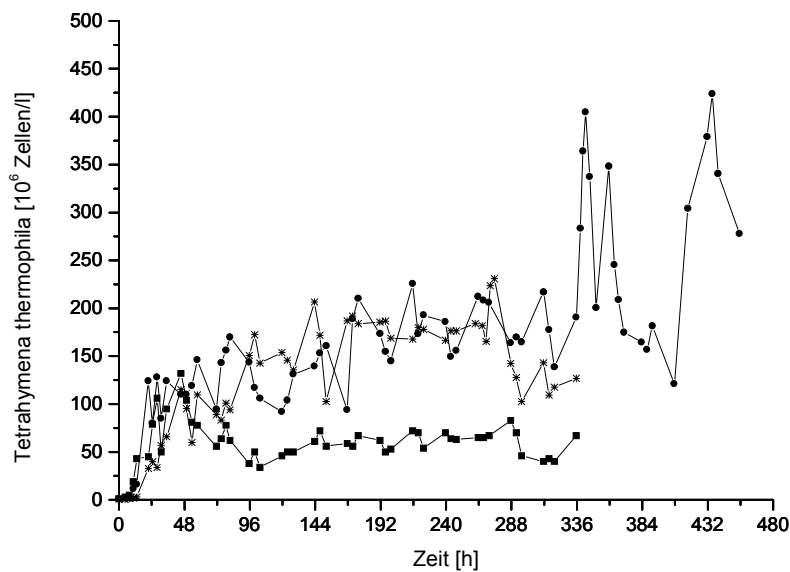


Abbildung 5-5: Auftragung der Zelldichten von *Tetrahymena thermophila* [ $10^6$  Zellen/l] gegen die Reaktorlaufzeit. Dargestellt sind die Experimente der kontinuierlichen Co-Kultivierung CoKK-1 (Quadrate), CoKK-2 (Kreise), CoKK-3 (Sterne).

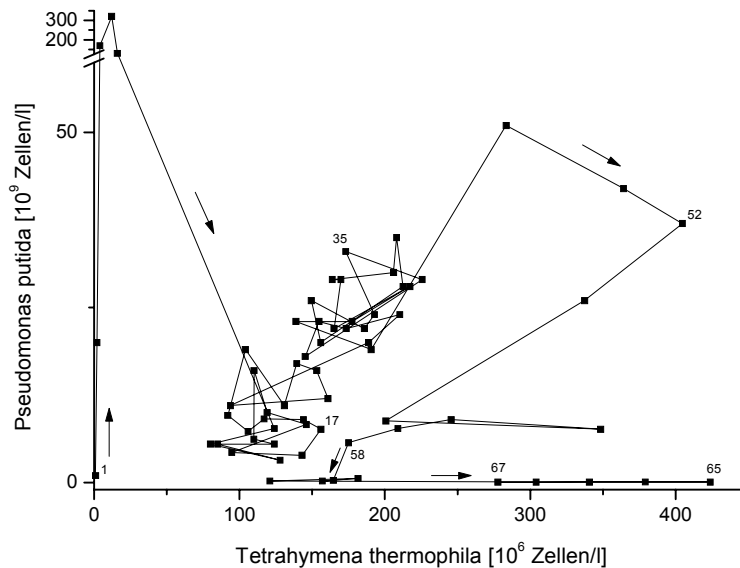
Die Maxima der Zelldichten von *Tetrahymena thermophila* lagen bei etwa  $110 \cdot 10^6$  Zellen/l (CoKK-1),  $180 \cdot 10^6$  Zellen/l (CoKK-2) und  $115 \cdot 10^6$  Zellen/l (CoKK-3). Diese Erhöhung der Zelldichte beruht im Wesentlichen auf dem gesteigerten

Nahrungsangebot für die Ciliaten. Ob die Erhöhung der Glucosekonzentration im Kulturmedium einen Einfluss auf die Tetrahymenapopulation hat, lässt sich aus den vorliegenden Experimenten nicht klar schließen. Dagegen spricht zumindest die Tatsache, dass sich die Kulturen beider Organismen im zeitlichen Verlauf nahezu entsprechen, die Maxima aber deutlich voneinander abweichen.

In der Phase des exponentiellen Wachstums teilen sich die Einzeller sehr schnell und erreichen minimale Verdopplungszeiten. Die Reproduktionsrate verlangsamt sich dann. Die Generationszeiten werden länger, und die Zelldichte stabilisiert sich schließlich in der stationären Phase. Neben dem Nahrungsangebot spielen intraspezifische Wechselwirkungen eine wichtige Rolle. Diskutiert wird die Abgabe inhibitorischer Substanzen durch die Ciliaten in das Kulturmedium, was zu einem reduzierten Wachstum führt. Ebenso scheinen Kollisionen zwischen Ciliaten, die diese inhibitorischen Stoffe besitzen, und ihren Artgenossen einen hemmenden Einfluss auszuüben (SAITOH UND ASAI, 1980).

Während die individuelle Fressrate der Ciliaten mit steigender Populationsdichte abnimmt, so steigt die Fressrate der gesamten Ciliatenpopulation mit deren Dichte (CURDS AND COCKBURN, 1968). Die Prädation steigt so lange an, bis sehr hohe Zelldichten von *Tetrahymena* und sehr geringe Populationsdichten der Bakterien erreicht sind. Durch das nun abgesenkte Nahrungsangebot und den daraus resultierenden geringeren metabolischen Umsatz der Ciliaten kann sich die Bakterienpopulation leicht erholen (siehe Abbildung 5-4).

Die Darstellung der Phasenebenen für das Experiment CoKK-2 (Abbildung 5-6) verdeutlicht noch einmal den Kulturverlauf nach der Injektion von Glucose. Nach einer anfänglichen Phase, die durch eine extrem hohe Bakterienzeldichte gekennzeichnet war, ging das System in eine Phase mit stabilen Zellzahlen über. Ausgelöst durch eine bewusste Störung des Systems verließ dieses den stabilen Zustand. Die sterile Injektion von Glucose führte dazu, dass das System eine Schleife durchlief. Dem Anstieg der Bakterienzeldichte folgte ein Anstieg der Protozoenpopulation. Im Anschluss fiel die Konzentration von *Pseudomonas putida* wieder stark ab und blieb auf diesem niedrigen Niveau. Innerhalb der Tetrahymenapopulation schwankte die Zelldichte und das System konnte keine eindeutig stabile Phasenlage mehr erreichen.



**Abbildung 5-6: Auftragung der Phasenebene für den Verlauf der Zelldichte von *Tetrahymena thermophila* [Abszisse,  $10^6$  Zellen/l] und *Pseudomonas putida* [Ordinate,  $10^9$  Zellen/l] in kontinuierlicher Kultur (Experiment CoKK-2).**

Die anfangs (siehe 2.4) herausgestellten Vorteile von kontinuierlichen Kulturen gegenüber Batch-Kulturen lassen sich auch mit den experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit unterstreichen. Durch die kontinuierliche Zufuhr von frischem und durch das kontinuierliche Abführen von verbrauchtem Medium konnten die Zelldichten für *Tetrahymena thermophila* von maximal  $8 \cdot 10^7$  Zellen/l bei Kulturen im Batch-Betrieb auf  $4 \cdot 10^8$  Zellen/l erhöht werden. Hohe Zelldichten von etwa  $1,7 \cdot 10^8$  Zellen/l konnten außerdem über einen Zeitraum von mehr als 100 Stunden aufrecht erhalten werden.

Zu beachten ist aber nicht nur das Wachstumsverhalten bei besonders hohen Zelldichten, sondern auch das Teilungsvermögen in Bereichen sehr geringer Populationsdichten. Um den Ciliaten gute Ausgangsbedingungen zu geben, wurden die Kulturen mit relativ großen Zelldichten von  $10^6$  Zellen/l beimpft. In axenischer Kultur benötigt *Tetrahymena* das Zusammenspiel mehrerer Faktoren zur Zellteilung. Auch frei lebende Organismen benötigen zum Wachstum und zur Vermehrung Wechselwirkungen untereinander und mit dem Kulturmedium. Dies geschieht durch die Exkretion von Komponenten unbekannter Zusammensetzung, inklusive Wachstumsfaktoren, in das Kulturmedium (GHILADI et al., 1992). In Kultur ermöglicht die Addition von Lipiden und Alkoholen zum Medium ein Überleben der Zellen sowie



Zellteilungen auch bei geringeren Ausgangszelldichten (SCHOUSBOE UND RASMUSSEN, 1994).

Wie bereits erwähnt (siehe 2.1.1, Seite 9) zeigten *Tetrahymena* unterschiedliche Zellteilungsraten in Abhängigkeit vom Nährstoffreichtum des Mediums. Während bei Shift-up-Experimenten, dem Überimpfen in nahrungsreiches Medium, der Zellteilungsbeginn verzögert ist, beginnen die Zellen bei Shift-down-Experimenten, dem Überimpfen in nahrungsärmeres Kulturmedium, sofort mit der Teilung. Dieses Wachstumsverhalten, das für *Tetrahymena* unter anderem WATSON et al. (1981) und SWIFT et al. (1982b) nachgewiesen haben, wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt. Wohlgenährte Zellen von *Tetrahymena thermophila* aus PPY-Kultur, die sich etwa am Ende der log-Phase befanden, wurden in BC-Medium überimpft. *Tetrahymena* sind nicht in der Lage, sich ohne Bakterien in diesem Medium zu vermehren. Da die Bakterienzeldichte bei Versuchsbeginn nur bei  $10^9$  Zellen/l lag, können diese Bedingungen als Shift-down bezeichnet werden. Nach der Verzögerungsphase, die durch das Überimpfen ausgelöst wurde, konnte so mit schnell einsetzender Zellteilung der Ciliaten gerechnet werden. In homogenen Laborkulturen wird dieses Wachstumsverhalten nicht unbedingt als Überlebensvorteil benötigt. Anders ist die Situation in natürlichen Habitaten, in denen Ciliaten zeitlich und räumlich fleckenhaft auftretende Ressourcen (FENCHEL, 1980b) auf diese Weise bestmöglich nutzen können.

In Co-Kulturen hat zudem die Beutezelldichte einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Räuberpopulation. Die experimentellen Ansätze von HABTE UND ALEXANDER (1978b) haben das unterschiedliche Prädationsverhalten von *Tetrahymena* in Abhängigkeit von der Beutezelldichte herausgestellt. Eine sehr dichte Bakterienpopulation ( $2 \cdot 10^{12}$  -  $3 \cdot 10^{12}$  Zellen/l) wurde innerhalb von 48 Stunden auf  $2 \cdot 10^{10}$  -  $3 \cdot 10^{10}$  Zellen/l reduziert und blieb dann konstant. Bei kleineren Populationsdichten der Beuteorganismen wurden diese in geringerem Maße gefressen. Ab einer Zelldichte von  $\approx 10^8$  Zellen/l kam es zu keiner Reduktion des Bakterienvorkommens durch die Räuberpopulation. In Kultur mit einem Beuteorganismus sind Protozoen nicht in der Lage, diesen vollständig zu eliminieren (DANSO et al., 1975). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Beobachtung bestätigt werden, dass es in monoxenischen Kulturen von *Tetrahymena* und einer Bakterienspezies nicht zu einer Ausrottung des Beuteorganismus kommt. Die Population von *Pseudomonas putida* wurde in keinem der Versuche unter eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^7$  Zellen/l reduziert. Es erscheint einleuchtend, dass *Tetrahymena* so lange Bakterien jagt, so lange der Energieaufwand während der Suche nach Beute

den Energieeintrag durch deren Verzehr nicht überschreitet. Ein wichtiger Aspekt im Überleben der Beutepopulation ist deren Teilungsvermögen. Bakterienbestände können nur fortbestehen, wenn ihr Multiplikationsvermögen in Anwesenheit von aktiv fressenden *Tetrahymena* kontinuierlich größer ist als die Fressrate (HABTE UND ALEXANDER, 1978a). Zur Ausrottung von Bakterien einer Spezies kann es nur dann kommen, wenn gleichzeitig ein oder mehrere alternative Beuteorganismen anwesend sind. Es kommt nur dann zur Elimination einer Bakterienspezies, wenn ihre Wachstumsrate geringer ist als die Fressrate der Räuber und die Zelldichte des alternativen Beuteorganismus oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes liegt (MALLORY et al., 1983; GURIJALA UND ALEXANDER, 1990).

In natürlichen Ökosystemen wird die Koexistenz von Organismen auf Grund der Heterogenität der Umwelt begünstigt. Durch die Besetzung unterschiedlicher Nischen sind die gemeinsam vorkommenden Spezies partiell separiert. In einem kontinuierlich gerührten Bioreaktor sind die Organismen homogen verteilt. Doch auch dieses System kann eine ökologische Nische bieten. Wenn die Prädation in der flüssigen Phase auftritt, dann kann die Wand des Kulturgefäßes, die für den Räuber schlecht zugänglich ist, ein Zufluchtsort für die Bakterien sein, in dem sie sich unbeschadet vermehren können (VAN DEN ENDE, 1973). Es werden zwei Typen von adhärent wachsenden Bakterienfilmen unterschieden: Der eine ist charakterisiert durch eine dicke Schichtung, bei der die Bakterienzellen aneinander haften, der andere Typ besteht aus einem Monolayer, bei dem sich die Zellen nur am Glas festheften (MUNSON UND BRIDGES, 1964). Ein solcher einschichtiger Film ist normalerweise mit bloßem Auge nicht sichtbar, und sein Auftreten während des Kulturverlaufs kann daher auch nicht ausgeschlossen werden.

Da sich *Tetrahymena thermophila* in der flüssigen Phase des Systems befindet und sich als Filtrierer frei schwimmend ernährt, ist für sie die Wand des Kulturgefäßes schwer zugänglich und bietet *Pseudomonas putida* dadurch einen gewissen Fraßschutz. Es erscheint unwahrscheinlich, dass *Tetrahymena* in der Lage ist, eine so starke Strömung zu erzeugen, dass Bakterien dadurch von der Wand gelöst werden. Wird diese dünne Bakterenschicht reduziert, was durch Aufbringen von Silikonöl auf die Glaswand möglich ist, wirkt sich das stärkere Absinken der Bakterienzeldichte destabilisierend auf das gesamte Kultursystem aus (RATNAM et al., 1982).

Es hat sich gezeigt, dass das Vorhandensein von Partikeln im Kulturmedium zu einem gesteigerten Wachstum von Tetrahymenapopulationen führt. Das haben RASMUSSEN UND KLUDT (1970) mit ihren Experimenten bewiesen. Dabei ist es nebensächlich, ob es sich bei den Partikeln um Nahrungsbestandteile, Bakterien oder unverdauliche

Substanzen wie Quarzkügelchen handelt. Die Bildung von Nahrungsvakuolen, ausgelöst durch das Vorhandensein von Partikeln, ist eine Voraussetzung für ein schnelles Wachstum von *Tetrahymena*. Diese Erklärung scheint auch unter dem Gesichtspunkt sinnvoll, dass in der Natur eher partikuläre Bestandteile als Nahrung in Frage kommen als gelöste organische Substanzen (CURDS UND COCKBURN, 1968). Die Aufnahme gelöster Substrate ist möglich, partikuläre Nahrung wird jedoch bevorzugt. Diesem Sachverhalt wird in der vorliegenden Arbeit zum einen dadurch Rechnung getragen, dass partikuläre Beute (Bakterien) angeboten wird, zum anderen dadurch, dass das Kulturmedium nicht zusätzlich filtriert wird.

*Tetrahymena* erzeugt mit ihrer in drei parallelen Reihen angeordneten Ciliatur des Mundfeldes einen Flüssigkeitsstrom, der Nahrungspartikeln in das Mundfeld hineinstrudelt. Die Aufnahme von Partikeln ist für holotriche Ciliaten innerhalb eines Größenbereichs von  $\sim 0,3 \mu\text{m}$  bis  $\sim 1 \mu\text{m}$  am effizientesten. Die Effektivität des Filterapparates sinkt mit einem Abweichen der Partikelgröße vom Optimum (FENCHEL, 1980a). *Pseudomonas putida* liegt innerhalb dieses optimalen Größenbereichs, stellt also einen sehr guten Beuteorganismus für *Tetrahymena thermophila* dar.

Es treten mitunter Aggregationen von Bakterien auf, durch welche die Prädation durch kleinere Protozoen reduziert wird (siehe 2.3). Durch Flockenbildung entziehen sie sich dem Zugriff von Ciliaten, können in dieser größeren Formation aber zur Nahrungsquelle von größeren Protozoen, wie Mikroflagellaten, werden (SIBBALD UND ALBRIGHT, 1988). Auch bei *Pseudomonas putida* tritt eine Flockenbildung in geringem Maße auf, was jedoch nur in Phasen maximaler Populationsdichte festzustellen ist.

Als kompletter einzelliger Organismus verfügt *Tetrahymena thermophila* über die Fähigkeit, sich schnell an veränderte Umweltbedingungen anpassen zu können. Damit unterscheidet sich die Kultur von Einzellern deutlich von der Kultivierung hochspezialisierter Säugerzellen, deren Adaptationspotential sehr gering ist. Diese Anpassungserscheinungen treten auch in Laborkulturen auf. Während in der Batch-Kultur die DNA-Gehalte über den gesamten Kulturverlauf gleich blieben und auch die RNA-Gehalte keine deutliche Veränderung zeigten, fiel mit zunehmender Kulturdauer eine Erhöhung der Proteingehalte auf. Dies galt sowohl für Experimente von *Tetrahymena thermophila* im Batch-Verfahren in PPY-Medium, als auch für Co-Kultivierungen von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* in BC-Medium. Bei einer Kulturdauer von mehr als 100 Stunden erscheint es durchaus möglich und wahrscheinlich, dass Individuen von *Tetrahymena*, die besonders gut an die Bedingungen im Bioreaktor angepasst waren, herausselektiert wurden. Außerdem ist denkbar, dass nach einer längeren Reaktorlaufzeit die überlebenden Zellen von der

Lysis der abgestorbenen Zellen profitieren und sich dadurch ein shift-up-ähnlicher Zustand im Reaktor ergibt. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass ein Teilungsstopp nicht automatisch einen Wachstumsstopp der Zellen beinhaltet. Auch wenn in der Absterbephase keine Zellteilungsaktivität mehr festzustellen ist, kann es dennoch zu einem Zellwachstum kommen.

### **5.3 Die ökologische Bedeutung von mikrobiellen Räuber-Beute-Systemen**

Ciliaten kontrollieren das bakterielle Vorkommen in unterschiedlichsten aquatischen Ökosystemen. FENCHEL (1980a) hat ihre opportunistischen Eigenschaften beschrieben. Immer dort wo sich nahrungsreiche Nischen bilden, wie z.B. ein dichter Bakterienbestand an totem pflanzlichen Material, finden sich Ciliaten ein und reduzieren die Bakterienpopulation. Ihrerseits dienen sie wiederum als Beute für detritivore Ciliaten oder größere Protozoen. Ihre große Mobilität, kurze Generationszeiten, die Fähigkeit sich bei Nahrungsknappeit zu enzystieren und die Möglichkeit, durch Verschiebung von Zellteilungen ihre Zellgröße so lange zu erhöhen, bis Nahrungsreserven aufgebraucht sind, zeigen die deutliche Adaptation der Ciliaten an ihren Lebensraum. Die Prädation von Bakterien durch Ciliaten ist kein jahreszeitliches Phänomen. Die saisonale Konstanz der Bakterienzeldichte wird daher auf den konstanten Ausgleich der bakteriellen Produktion durch Protozoenprädation zurückgeführt (AZAM et al., 1983).

Bei der Betrachtung der möglichen Interaktionen zweier Populationen eines Ökosystems (siehe 2.2) stellt sich die Frage, welche der möglichen Wechselwirkungen in dem Laborökosystem der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielen können. Die Räuber-Beute-Beziehung ist sicherlich die zentrale und wichtigste Wechselwirkung innerhalb dieses Systems, mit *Tetrahymena thermophila* als Räuber- und *Pseudomonas putida* als Beuteorganismus. Aber auch Konkurrenz, Kommensalismus und Amensalismus kommen als Interaktionen zweier Organismen in einem Laborökosystem in Betracht. Konkurrenz tritt auf, besonders auch als innerartliche Konkurrenz, im Kampf um einen knappen Nährstoff. Ebenso kann das Wachstum der Bakterienpopulation durch die Ciliatenpopulation gefördert werden, ohne dass diese dadurch gehemmt wird, was als Kommensalismus bezeichnet wird. Dieses Phänomen tritt durch die Abgabe sogenannter autochthoner Substanzen in das Kulturmedium auf. Darunter versteht man die Abgabe von Produkten aus Lysis und Metabolismus der Ciliaten in das umgebende Medium (SAMBANIS et al., 1987). Von Bakterien können aber auch Substanzen in das Medium abgegeben werden, z. B. Toxine, die sich negativ auf die Tetrahymenapopulation auswirken, ohne die Bakterien zu schädigen

(Amensalismus). In industriellen Prozessen, bei denen das Überleben aller eingesetzter Spezies angestrebt wird, ist es von Interesse, positive Interaktionen zu fördern und negative Wechselwirkungen zu minimieren. Die Untersuchung eines mikrobiellen Laborökosystems mit zwei verschiedenen Spezies kann nur einen Ausschnitt aus dem mikrobiellen Nahrungsnetz darstellen. Die vielfältigen Interaktionen, die innerhalb dieses recht einfachen Systems auftreten, weisen bereits auf seine Komplexität hin.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Ciliatenpopulation einen erheblichen Einfluss auf die Zelldichte der vorkommenden Bakterien ausübt. Eine Frage, die sich daraus ergibt ist, inwiefern Ciliaten am Energietransfer in höhere trophische Ebenen beteiligt sind, ob sie nur als Vermittler oder sogar Rangierer von Energie agieren (BEAVER UND CRISMAN, 1989).

Bei der Interpretation mikrobieller Interaktion ist es sehr wichtig zu beachten, dass sich die Zellen der eingesetzten Populationen nicht alle gleich verhalten, sondern ihren vielfältigen Aktivitäten nachgehen und dies in unterschiedlichen Raten. Die Stadien und Raten der Bakterienpopulation sind ebenso verteilt wie die der Ciliatenpopulation, da beide verschiedene Phasen des Zellzyklus durchlaufen. Dieser wichtige, und doch oft übersehene Punkt ist zum Verständnis der Interaktion mikrobieller Populationen untereinander sowie mit ihrer abiotischen Umwelt unerlässlich (FREDRICKSON, 1991).

In welchem Maße aber die Ergebnisse aus Laborökosystemen mit natürlichen Gewässern verglichen werden können, ist noch immer unklar. Bei Anlagen zur Klärung von Abwässern, wie Tropffilteranlagen oder Belebtschlammssystemen, ist die Übertragbarkeit groß. Die Analogie solcher Systeme, die partiell geschlossen und kontrolliert sind, zu Laborexperimenten ist überzeugend (STOUT, 1980). Und auch JÜRGENS (1992) hat bei seinen Experimenten mit heterotrophen Nanoflagellaten (HNF) die kontinuierliche Kultivierung von bakterivoren Protozoen als eine nützliche Methode bezeichnet. Gerade die Kombination von Laborexperimenten und in situ Untersuchungen an Gewässern mit vergleichbarer Organismenstruktur bieten die Möglichkeit zum direkten Vergleich der gewonnenen Daten und der Beurteilung ihrer Übertragbarkeit.

#### **5.4 Mathematische Modellierung eines Laborökosystems**

Die Anwendbarkeit des Modells von PAVLOU (1985) auf die Experimente der kontinuierlichen Co-Kultivierung von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* der vorliegenden Arbeit wurde geprüft. Dieses Modell ist vielversprechend, da es nicht eine spezielle Gestalt der spezifischen Wachstumsraten fordert, sondern nur deren strenge Monotonie. Die einfache geometrische Interpretation ist am Kurvenverlauf leicht erkennbar. So gibt der Verlauf der spezifischen Wachstumsraten der Räuberpopulation gegen die Zelldichte der Beutepopulation, wie auch in Kapitel 2.5, Seite 26 erläutert, wichtige Hinweise auf die Stabilität des Systems. Es ist ein stabiles Fließgleichgewicht zu erwarten, wenn die Funktion im ersten Teil konvex und später konkav verläuft.

Ein solcher Kurvenverlauf geht aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig hervor. Aus experimenteller Sicht lassen sich dafür mehrere Gründe angeben. Als wichtigster Parameter ist hier die Verdünnungsrate zu nennen, die in den Experimenten 0,27/d nicht überschreitet. Durch diesen relativ geringen Eintrag von frischem Medium und die langsame Abfuhr von verbrauchtem Medium kann es auch bei Glucosekonzentrationen von 5,5 g/l im Nachfüllmedium zu einem starken Abfall der Glucosekonzentration im Reaktor kommen (siehe Kapitel 4.4.3). Diese wirkt sich limitierend auf das Bakterienwachstum aus. Darin liegt auch die größte Diskrepanz zwischen dem Modell und den vorliegenden Experimenten. Das starke Absinken der Beutezelldichte verhindert ein Fließgleichgewicht bei hohen Zelldichten von *Pseudomonas putida*. Zudem wird die Bedingung  $v_{\max} > \mu_{\max}$  nicht erfüllt. Dennoch bleibt das Modell von PAVLOU (1985) eine gute Grundlage für weitergehende Untersuchungen. Eine Modifikation des Versuchsansatzes mit einer erhöhten Verdünnungsrate könnte möglicherweise bereits zu experimentell gewonnenen Ergebnissen führen, deren Daten eine mathematische Simulation mit Hilfe dieses Differentialgleichungsmodells ermöglichen.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein mikrobielles Ökosystem in einem kontinuierlich betriebenen gerührten Bioreaktor (CSTR) im Labormaßstab etabliert und seine Wachstumskinetik untersucht. In diesem *in vitro* Räuber-Beute-System wurden der Ciliat *Tetrahymena thermophila* und das Bakterium *Pseudomonas putida* über einen Zeitraum von mehr als 400 Stunden gemeinsam kultiviert. Die Interaktion von Bakterien und Protozoen stellt einen elementaren Prozess in der Ökologie nahezu jedes Gewässers dar.

Den Fraß von Bakterien, einzelligen Algen und Protozoen durch andere Protozoen kann man als Prädation im mikroskopischen Maßstab bezeichnen. Protozoen stellen ein Glied innerhalb des mikrobiellen Nahrungsnetzes dar und sind daher ein wichtiger Bestandteil aquatischer Ökosysteme. Da Protozoen partikuläres Material sammeln, konzentrieren und die Konkurrenz zwischen den Populationen von Zersetzern regulieren, spielen sie eine wichtige Rolle in der Abwasserbehandlung. Die vorliegende Arbeit hat diesen elementaren Prozess aus der Natur isoliert und unter kontrollierten Laborbedingungen studiert.

Als kinetische Parameter für das Wachstum von *Tetrahymena thermophila* im Batch-Verfahren wurden eine spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max} = 0,16/\text{h}$  und eine Verdopplungszeit von  $t_D = 4,3$  Stunden ermittelt. Die maximal erreichten Zelldichten lagen bei  $6 \cdot 10^8$  Zellen/l. *Pseudomonas putida* wuchs in Batch-Kultur mit einer maximalen spezifischen Zuwachsrate von  $\mu_{\max} = 0,52/\text{h}$  und einer Verdopplungszeit von  $t_D = 80$  min und erreichte eine maximale Populationsdichte von  $3 \cdot 10^{12}$  Zellen/l.

Die Co-Kultivierung von *Tetrahymena thermophila* und *Pseudomonas putida* wurde sowohl im Fed-Batch- als auch in kontinuierlichen Verfahren durchgeführt. Zur Co-Kultivierung wurde ein synthetisches Medium (BC-Medium) verwendet. Die Glucosekonzentrationen wurden zwischen 0,55 g/l und 11 g/l variiert. Durch die Erhöhung der Konzentration von Glucose wurde eine verbesserte Kohlenstoffversorgung gewährleistet und Glucose als Mangelfaktor ausgeschlossen.

Die Experimente mit kontinuierlichem Reaktorbetrieb, bei denen kontinuierlich frisches Medium zu- und verbrauchtes Kulturmedium abgeführt wurde, lieferten Zelldichten von *Tetrahymena thermophila* von maximal  $4 \cdot 10^8$  Zellen/l. Hohe Zelldichten von etwa  $1,7 \cdot 10^8$  Zellen/l konnten außerdem über einen Zeitraum von mehr als 100 Stunden aufrecht erhalten werden. Bei Co-Kulturen im Batch-Verfahren wurden  $8 \cdot 10^7$  Zellen/l erreicht. Wie in der Literatur beschrieben, konnte auch mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Räuberorganismus *Tetrahymena thermophila* seine Beute,

die Bakterienpopulation, nicht vollständig ausgerottet. Die Zelldichte von *Pseudomonas putida* wurde in keinem der Experimente unter einen Wert von  $10^9$  Zellen/l reduziert.

Es werden verschiedene mathematische Modelle zur Beschreibung mikrobieller Räuber-Beute-Systeme vorgestellt und ihre Anwendbarkeit auf die Versuchsergebnisse diskutiert.

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie sinnvoll eine Verknüpfung von biologischen Fragestellungen, moderner Technologie und mathematischer Modellbildung sein kann.



## 7 Summary

The intention of this thesis was the establishment of a microbial ecosystem in a laboratory-scale, continuous stirred tank reactor (CSTR) and the measurement of growth kinetics. *Tetrahymena thermophila* and *Pseudomonas putida* were cultivated together in this in vitro predator-prey system for a duration of more than 400 hours. The interaction of bacteria and protozoa is an elementary process in the ecology of almost every aquatic habitat.

Predation of bacteria, unicellular algae and protozoa through other protozoa can be described as predation in a microscopic scale. Protozoa are part of the microbial food web and therefore an important component of aquatic ecosystems. Since they collect and concentrate particles and regulate the competition between populations of destruents, they are an important part in activated sludge treatment. Within this thesis the elementary process has been isolated from nature and studied under controlled laboratory conditions.

As kinetic parameters for growth of *Tetrahymena thermophila* in batch-culture, the specific growth rate  $\mu_{\max} = 0,16/\text{h}$  and the doubling time  $t_D = 4,3$  were determined. The maximum cell density was  $6 \cdot 10^8$  cells/l. *Pseudomonas putida* grew in batch-culture with a specific growth rate of  $\mu_{\max} = 0,52/\text{h}$  and a doubling time of  $t_D = 80$  min reaching maximum cell densities of  $3 \cdot 10^{12}$  cells/l.

Fed-batch and continuous fermentation has been used to co-cultivate *Tetrahymena thermophila* and *Pseudomonas putida*. For co-cultivation experiments a synthetic medium (BC-medium) was used. The concentration of glucose was varied between 0,55 g/l and 11 g/l. Increase of glucose concentration ensured a better supply with carbon and glucose was excluded as a limiting factor.

Experiments of continuous fermentation with constant supply of fresh medium and constant removal of used medium showed cell densities for *Tetrahymena thermophila* of  $4 \cdot 10^8$  cells/l. High cell densities of  $1,7 \cdot 10^8$  cells/l were maintained over a time period of more than 100 hours. During co-cultivation in batch-culture, cells reached densities of  $8 \cdot 10^7$  cells/l. As reported in literature it could be shown that the predator *Tetrahymena thermophila* did not eliminate the bacterial population completely. In none of the experiments the population density of *Pseudomonas putida* was reduced below  $5 \cdot 10^7$  cells/l.

Different mathematic models describing microbial predator-prey systems are presented and their applicability on the experiments are being discussed.

This thesis illustrates how biological disciplines can be used with modern technology and mathematical models to answer biological questions.

## 8 Anhang

### 8.1 Die Systematik der Protozoa

Es erschien mir sinnvoll, dem Leser im Anhang dieser Arbeit einen Überblick über die systematische Einordnung der Protozoa zu geben. Dieses Vorhaben wirkte anfänglich auch problemlos, doch je intensiver ich mich mit der Thematik befasst habe, desto klarer wurde mir, wie komplex diese Systematik ist. Sie ist von ständigen, zum Teil ganz grundlegenden Veränderungen betroffen. Die Einteilung der Protozoa kann auch heute nur als vorübergehende Systematik betrachtet werden. Sie wird ständigen Modifikationen unterliegen, wenn apomorphe Kennzeichen erkannt und molekulare Übereinstimmungen etabliert werden. Neue phylogenetische Erkenntnisse führen dazu, dass die bisher getrennten Nomenklaturen der Zoologen und Botaniker zusammengeführt und bekannte Spezies umbenannt werden (HAUSMANN UND HÜLSMANN, 1996).

Vor 20 Jahren stellte das Komitee für Systematik und Evolution in der Gesellschaft für Protozoologie einen komplett überarbeiteten Vorschlag der Systematik der Protozoa vor (LEVINE et al., 1980). Von diesem Ansatz bin ich ursprünglich ausgegangen. Dort werden Protozoen als einzellige, eukaryotische Organismen willkürlich zusammengefasst. Die Protozoa werden dem Reich der Protista zugerechnet und in sieben Phyla unterteilt: Sarcomastigophora, Labyrinthomorpha, Apicomplexa, Microspora, Ascetospora, Myxospora und Ciliophora.

Durch die Lektüre von "Spezielle Zoologie, Teil 1: Einzeller und wirbellose Tiere" (WESTHEIDE UND RIEGER, 1996) wurde mir klar, dass man heute bei der Rekonstruktion der Phylogenese davon ausgeht, dass sich alle eukaryotischen Lebewesen auf eine Stammart zurückführen lassen und damit das monophyletische Taxon der Eukaryota bilden. Aus phylogenetisch-systematischer Sicht gibt es daher kein Taxon Protista. Da es sich bei Protozoa ("tierische Einzeller") und bei Protophyta ("pflanzliche Einzeller") nicht um Monophyla sondern um paraphyletische Gruppierungen handelt, ist diese Einteilung nicht länger sinnvoll. Demnach spricht man in der Phylogenetik heute von einzelligen Eukaryota, einem Paraphylum, das durch ein plesiomorphes Merkmal, die Einzelligkeit, gekennzeichnet ist.

Neugierig geworden, habe ich versucht, den aktuellsten Stand der Systematik zu erkunden und bin auf die Lehrbücher "Ciliates - Cells as organisms" (HAUSMANN UND BRADBURY, 1996) und "Protozoology" (HAUSMANN UND HÜLSMANN, 1996) gestoßen. Dort wird ein Überblick über die verschiedenen historischen und aktuellen Ansätze der

systematischen Gliederung der Protozoen gegeben. Durch die persönliche Korrespondenz mit Prof. Dr. K. Hausmann habe ich die Bestätigung bekommen, dass die hier vorgestellte systematische Gliederung der einzelligen Eukaryota dem aktuellen Stand der Forschung entspricht, und dass mit Spannung das Erscheinen des Lehrbuches "Guide to the Protozoa" erwartet wird.

Auch wenn der Begriff "Protozoa" für systematische Zwecke nicht mehr verwendet wird, ist es nach HAUSMANN UND HÜLSMANN (1996) dennoch zulässig, bei der Benennung von Organismen basierend auf ihrem Bauplan und dem plesiomorphen Bauplan ihrer eukaryotischen Zellorganisation von "Protozoa" zu sprechen.

Innerhalb der einzelligen Eukaryota sind die Ciliaten eine monophyletische Gruppe von Organismen, deren systematische Einteilung mit Hilfe von Gensequenzierungen und Ultrastrukturanalysen der Morphogenese immer größere Genauigkeit bekommt (LYNN, 1996).

Nach WESTHEIDE UND RIEGER (1996) ergibt sich für *Tetrahymena* sp. folgende systematische Gliederung:

Einzellige Eukaryota

Alveolata

Dinoflagellata

Apicomplexa

Ciliophora

Oligohymenophorea

Hymenostomatia

Hymenostomatida

Tetrahymenina

*z.B. Colpidium, Tetrahymena*

**8.2 Formelzeichenerklärung**

Formelzeichen	Erklärung
X	Zelldichte
$X_0$	Zelldichte zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase
$X_A$	Zelldichte zu Beginn der exponentiellen Absterbephase
$t_H$	Halbwertszeit
$t_D$	Verdopplungszeit
$\mu$	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
$\mu_{max}$	maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
k	spezifische Sterbegeschwindigkeit
D	Verdünnungsrate
V	Reaktorvolumen
$\dot{V}$	Durchflussgeschwindigkeit
t	Zeit
B	Zelldichte der Beute
R	Zelldichte der Räuber

Modell von Lotka und Volterra	
$\alpha_1$	spezifische Wachstumsrate der Beute
$\alpha_2$	spezifische Absterberate der Räuber
$\beta_1$	spezifische Fressrate
$\beta_2$	spezifische Wachstumsrate der Räuber

Modell von Monod	
$\mu_{max R}$	maximale spezifische Wachstumsrate der Räuber
$\mu_{max B}$	maximale spezifische Wachstumsrate der Beute
K	Halbsättigungskonstante der Wachstumskinetik der Beute
L	Halbsättigungskonstante der Wachstumskinetik der Räuber
$Y_R$	Ausbeutekoeffizient zur Umrechnung von Wachstums- in Fressraten
$Y_B$	Ausbeutekoeffizient zur Umrechnung von Wachstums- in Aufnahmeraten
S	Substratkonzentration
$S_Z$	Substratkonzentration im Zulauf

---

Modell von Pavlou	
$v(B)$	spezifische Wachstumsrate der Räuber
$v_{\max}$	Maximalwert von $v(B)$
$\mu(S)$	spezifische Wachstumsrate der Beute
$\mu_{\max}$	Maximalwert von $\mu(S)$
$X$	Ausbeutekoeffizient der Produktion der Räuberpopulation
$Y$	Ausbeutekoeffizient der Produktion der Beutepopulation
$S$	Substratkonzentration
$S_z$	Substratkonzentration im Zulauf
$D_c$	Wert für $D$ an einer Kurventangente zur Kurve $v(B)$
$B_c$	Wert für $B$ an einer Kurventangente zur Kurve $v(B)$
$F(B)$	definiert durch Gleichung Gl. 25

## 9 Literatur

AZAM, F.; FENCHEL, T.; FIELD, J. G.; GRAY, J. S.; MEYER-REIL, L. A.; THINGSTAD, F.: *The ecological role of water-column microbes in the sea*. In: Mar. Ecol. Prog. Ser. 1983, 10, S. 257-263

BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.-H.: *The Prokaryotes; Second edition; A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1992

BAMDAD, M.; BROUSSEAU, P.; DENIZEAU, F.: *Identification of a multidrug resistance-like system in Tetrahymena pyriformis: evidence for a new detoxication mechanism in freshwater ciliates*. In: FEBS Letters 1999, 456, S. 389-393

BANNO, Y.; YANO, K.; NOZAWA, Y.: *Purifikation and charakterization of a secreted protease from Tetrahymena pyriformis*. In: Eur. J. Biochem. 1983, 132, S. 563-568

BEARDEN, A. P.; SCHULTZ, T. W.: *Structure-Activity relationships for Pimephales and Tetrahymena: a mechanism of action approach*. In: Environ. Toxicol. Chem. 1997, 6, S. 1311-1317

BEAVER, J. R.; CRISMAN, T. L.: *The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems*. In: Microb. Ecol. 1989, 17, S. 111-136

BEGON, M.; MORTIMER, M.; THOMPSON, D. J.: *Populationsökologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1997

BONNET, J. L.; BOGAERTS, P.; BOHATIER, J.: *Biological treatment of whey by Tetrahymena pyriformis and impact study on laboratory-scale wastewater lagoon process*. In: Chemosphere 1999, 38 (13), S. 2979-2993

BONOMI, A.; FREDRICKSON, A. G.: *Protozoan feeding and bacterial wall growth*. In: Biotech. Bioeng. 1976, 18, S. 239-252

BROWN, A.: *Fed-batch and continuous culture*. In: McNeil, B.; Harvey, L. M. (Hrsg.): *Fermentation: a practical approach*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1990

BURCK, H.-C.: *Histologische Technik*. 6. Aufl. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag, 1988

CANALE, R. P.: *An analysis of models describing predator-prey interaction*. In: *Biotech. Bioeng.* 1970, 7, S. 353-378

CANALE, R. P.; LUSTIG, T. D.; KEHRBERGER, P. M.; SALO, J. E.: *Experimental and mathematical modeling studies of protozoan predation on bacteria*. In: *Biotech. Bioeng.* 1973, 15, S. 707-728

CHMIEL, H. (Hrsg.): *Bioprozeßtechnik 1, Einführung in die Bioverfahrenstechnik*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1991

CLEFFMANN, G.: *Chromatin elimination and the genetic organisation of the macronucleus in Tetrahymena thermophila*. In: *Chromosoma* 1980, 78, S. 313-325

CLEFFMANN, G.: *Regulierung der DNS-Menge im Makronucleus von Tetrahymena*. In: *Exp. Cell Res.* 1968, 50, S. 193-207

CORLISS, J. O.: *History, ecology, taxonomy, and evolution of Tetrahymena*. In: A. M. Elliott (ed.): *Biology of Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, Pa. 1973, S. 1-55

CURDS, C. R.: *The ecology and role of protozoa in aerobic sewage treatment processes*. In: *Ann. Rev. Microbiol.* 1982, 36, S. 27-46

CURDS, C. R.; BAZIN, M. J.: *Protozoan predation in batch and continuous culture*. In: *Adv. Aquatic Microbiol.* 1977, 1, S. 115-176

CURDS, C. R.; COCKBURN, A.: *Studies on the growth and feeding of Tetrahymena pyriformis in axenic and monoxenic culture*. In: *J. Gen. Microbiol.* 1968, 54, S. 343-358



CURDS, C. R.; VANDYKE, J. M.: *The feeding habits and growth rates of some freshwater ciliates found in activated-sludge plants*. In: J. appl. Ecol. 1966, 3, S. 127-137

DANSO, S. K. A.; KEYA, S. O.; ALEXANDER, M.: *Protozoa and the decline of Rhizobium populations added to soil*. In: Can. J. Microbiol. 1975, 21, S. 884-895

EINSELE, A.; FINN, R. K.; SAMHABER, W.: *Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1985

ELLIOTT, A. M. (Hrsg.): *Biology of Tetrahymena*. Stroudsburg: Dowden, Hutchinson and Ross, 1973

ETHUIN, P.; DE CONINCK, J.: *Scaling up for mass cultivation of the temperature-sensitive mutant Tetrahymena thermophila SJ180*. In: Biotechnology Techniques 1996, 10 (7), S. 507-512

ETHUIN, P.; DE CONINCK, J.; DHULSTER, P.; GUILLOCHON, D.; THOMAS, D.: *Comparison of complex organic media for the cultivation of the temperature-sensitive mutant Tetrahymena thermophila SJ180*. In: Enzyme and Microbiol Technology 1995, 17, S. 998-1002

FENCHEL, T.: *Ecology of Protozoa*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1987

FENCHEL, T.: *Suspension feeding in ciliated protozoa: Functional response and particle size selection*. In: Microb. Ecol. 1980a, 1, S. 1-11

FENCHEL, T.: *Suspension feeding in ciliated protozoa: Feeding rates and their ecological significance*. In: Microb. Ecol. 1980b, 6, S. 13-25

FERNANDEZ-LEBORANS, G.; NOVILLO, A.: *The effects of cadmium on the successional stages of a freshwater protozoa community*. In: Ecotoxicol. Environ. Safety 1995, 31, S. 29-36

FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; TIEDTKE, A.; RASMUSSEN, L.: *New aspects of extracellular hydrolytic enzymes in lower eukaryotes*. In: Eur. J. Cell. Biol. 1989, 48, S. 1-4

FREDRICKSON, A. G.: *Behavior of mixed cultures of microorganisms*. In: Ann. Rev. Microbiol. 1977, 31, S. 63-87

FREDRICKSON, A. G.: *Segregated, structured, distributed models and their role in microbial ecology: A case study based on work done on the filter-feeding ciliate Tetrahymena pyriformis*. In: Microb. Ecol. 1991, 22, S. 139-159

FRITSCH, W.: *Umweltmikrobiologie, Grundlagen und Anwendungen*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1998

Ghiladi, M.; Christensen, S. T.; Schousboe, P.; Rasmussen, L.: *Compounds stimulating growth and multiplication in ciliates*. In: Naturwissenschaften 1992, 79, S. 234-235

Giese, C.: *Langzeitkultur primärer Lutealzellen des bovinen Corpus luteum in einem kontinuierlichen Bioreaktor und Untersuchung der Progesteronproduktion in vitro*. Diss. Universität Gießen, 1999

Gilron, G. L.; Lynn, D. H.: *Ciliated protozoa as test organisms in toxicity assessments*. In: Wells, P. G.; Lee, K.; Blaise (eds.): *Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practise*. CRC Press, 1998, S. 323-336

Gilron, G.; Gransden, S. G.; Lynn, D. H.; Broadfoot, J.; Scroggins, R.: *A behavioral toxicity test using the ciliated protozoan Tetrahymena thermophila. I. Method description*. In: Environ. Toxicol. Chem. 1999, 18 (8), S. 1813-1816

Glaser, D.: *Simultaneous consumption of bacteria and dissolved organic matter by Tetrahymena pyriformis*. In: Microb. Ecol. 1988, 15, S. 189-201

Güde, H.: *Grazing by protozoa as selection factor for activated sludge bacteria*. In: Microb. Ecol. 1979, 5, S. 225-237

GURIJALA, K. R.; ALEXANDER, M.: *Effect of growth rate and hydrophobicity on bacteria surviving protozoan grazing*. In: Appl. Environ. Microbiol. 1990, 56 (6), S. 1631-1635

HABTE, M.; ALEXANDER, M.: *Mechanisms of persistence of low numbers of bacteria preyed upon by protozoa*. In: Soil Biol. Biochem. 1978a, 10, S. 1-6

HABTE, M.; ALEXANDER, M.: *Protozoan density and the coexistence of protozoan predators and bacterial prey*. In: Ecology 1978b, 59 (1), S. 140-146

HAHN, M. W.; HÖFLE, M. G.: *Grazing pressure by a bacterivorous flagellate reverses the relative abundance of Comamonas acidovorans PX54 and Vibrio strain CB5 in chemostat cocultures*. In: Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64 (5), S. 1910-1918

HAHN, M. W.; MOORE, E. R. B.; HÖFLE, M. G.: *Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla*. In: Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65 (1), S. 25-35

HANTULA, J.; BAMFORD, D. H.: *The efficiency of the protein-dependent flocculation of Flavobacterium sp. is sensitive to the composition of growth medium*. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991, 36, S. 100-104

HAUSMANN, K.; BRADBURY, P. C. (Hrsg.): *Ciliates - Cells as organisms*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1996

HAUSMANN, K.; HÜLSMANN, N.: *Protozoology*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1996

HELLUNG-LARSEN, P.: *Parameters affecting the maximum cell concentration of Tetrahymena*. In: Experientia 1988, 44, S. 58-60

HÜNSELER, P.; SCHEIDGEN-KLEYBOLDT, G.; TIEDTKE, A.: *Isolation and characterization of a mutant of Tetrahymena thermophila blocked in secretion of lysosomal enzymes*. In: J. Cell Sci. 1987, 88, S. 47-55

JAUKER, F.; LADES, S.; NOWACK, T.: *The energy budget of Tetrahymena and the material fluxes into and out of the adenylat pool*. In: Exp. Cell Res. 1986, 166, S. 161-170

JEROME, CHERYL A.; LYNN, DENIS H.: *Identifying and distinguishing sibling species in the Tetrahymena pyriformis complex (Ciliophora, Oligohymenophorea) using PCR/RLFP analysis of nuclear ribosomal DNA*. In: J. Euk. Microbiol. 1996a, 43 (6), S. 492-497

JEROME, CHERYL A.; SIMON, ELLEN M.; LYNN, DENIS H.: *Description of Tetrahymena empidokyrea n.sp., a new species in the Tetrahymena pyriformis sibling species complex (Ciliophora, Oligohymenophorea), and an assessment of its phylogenetic position using small-subunit rRNA sequences*. In: Can. J. Zool. 1996b, 74, S. 1898-1906

JOST, J. L.; DRAKE, J. F.; FREDRICKSON, G.; TSUCHIYA, H. M.: *Interactions of Tetrahymena pyriformis, Escherichia coli, Azotobacter vinelandii, and glucose in a minimal medium*. In: J. Bacteriol. 1973a, 113 (2), S. 834-840

JOST, J. L.; DRAKE, J. F.; TSUCHIYA, H. M.; FREDRICKSON, A. G.: *Microbial Food Chains and Food Webs*. In: J. Theor. Biol. 1973b, 41, S. 461-484

JÜRGENS, K.: *Is there plenty of food for bacterivorous flagellats in eutrophic waters?* In: Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol. 1992, 37, S. 195-205

JÜRGENS, K.; GÜDE, H.: *The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems*. In: Mar. Ecol. Prog. Ser. 1994, 112, S. 169-188

KEINER, K.: *Analyse der Sauerstoff-Umsatzrate und dispersive impulscytometrische Bestimmungen der Zelldichte an einem kontinuierlichen Zellreaktor mit suspendierten Säugerzellen*. Diss. Universität Gießen, 1991

KIY, T.; TIEDTKE, A.: *Lysosomal enzymes produced by immobilized Tetrahymena thermophila*. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991, 35, S. 14-18

- KIY, T.; TIEDTKE, A.: *Mass cultivation of Tetrahymena thermophila yielding high cell densities and short generation times*. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992, 37, S. 576-579
- KOCH, A. L.: *Growth measurement*. In: Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Wood, W. A.; Krieg, N. R. (eds.): *Methods for general and molecular biology*. American Society for Microbiology, 1994, S. 248-277
- KRISTIANSEN, T. B.; HAGEMASTER, J. J.; GRAVE, M.; HELLUNG-LARSEN, P.: *Surface mediated death of unconditioned Tetrahymena cells: Effect of physical parameters, growth factors, hormones and surfactants*. In: J. Cell. Physiol. 1996, 169, S. 139-148
- LAMPERT, W.; SOMMER, U.: *Limnoökologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1993
- LARSEN, J.: *The influence of growth phase and culture conditions of Tetrahymena on effects of cadmium*. In: Toxicology 1989, 58, S. 211-223
- LEICK, V.; BØG-HANSEN, T. C.; CHRISTENSEN, S. T.; KAUFMAN, S. J.: *Concanavalin A receptors and the chemosensory behavior of Tetrahymena thermophila*. In: Exp. Biol. Online ([http://science.springer...6/4-96c/ftc96\\_4.htm](http://science.springer...6/4-96c/ftc96_4.htm)), 1996
- LEICK, V.; KOPPELHUS, U.; ROSENBERG, J.: *Cilia-mediated oriented chemokinesis in Tetrahymena thermophila*. In: J. Euk. Microbiol. 1994, 41 (6), S. 546-553
- LEVANDOWSKY, M.; CHILDRESS, W. S.; SPIEGEL, E. A.; HUTNER, S.H.: *A mathematical model of pattern formation by swimming microorganisms*. In: J. Protozool. 1975, 22 (2), S. 296-306
- LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G.: *A newly revised classification of the Protozoa*. In: J. Protozool. 1980, 1, S. 37-58

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.: *Folin-Ciocalteu (Lowry) Test*. In: Journal of biological chemistry 1951, 193, S. 264-275

LYNN, D. H.: *Systematics of Ciliates*. In: Hausmann, K.; Bradbury, P. C. (Hrsg.): Ciliates - Cells as organisms. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1996, S. 51-72

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J.: *Brock, Biology of microorganisms*. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, 1997

MALLORY, L. M.; YUK, C.-S.; LIANG, L.-N.; ALEXANDER, M.: *Alternative prey: A mechanism for elimination of bacterial species by protozoa*. In: Appl. Environ. Microbiol. 1983, 46 (5), S. 1073-1079

MARTINDALE, D. W.; ALLIS, C. D.; BRUNS, P. J.: *Conjugation in Tetrahymena thermophila*. In: Exp. Cell Res. 1982, 140, S. 227-236

MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. (Hrsg.): *Fermentation: a practical approach*. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1990

MUNRO, H. N.; FLECK, A.: *The determination of nucleic acids*. In: D. Glick (ed.): Methods of Biochemical Analysis 1966, S. 114-176

MUNSON, R. J.; BRIDGES, B. A.: *"Take-over" - an unusual selection process in steady-state cultures of Escherichia coli*. In: J. Gen. Microbiol. 1964, 37, S. 411-418

MURRAY, R. G. E.; BRENNER, D. J.; BRYANT, M. P.; HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; MOULDER, J. W.; PFENNIG, N.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.: *Bergeys manual of systematic bacteriology; Vol. 1*. Baltimore, London: Williams and Wilkins, 1984

NILSSON, J. R.: *On Food Vacuoles in Tetrahymena pyriformis GL*. In: J. Protozool. 1977, 24 (4), S. 502-507

ODUM, E. P.: *Ökologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1999

OH, N.-S.: *Entwicklung und reaktionskinetische Analyse des Umsatzes eines kontinuierlichen mikrobiellen Bioreaktors mit der Bildung von L-Lysin*. Diss. Universität Gießen, 1993

PAVLOU, S.: *Dynamics of a chemostat in which one microbial population feeds on another*. In: *Biotech. Bioeng.* 1985, 27, S. 1525-1532

RASMUSSEN, J.; KLUDT, T. A.: *Particulate material as a prerequisite for rapid cell multiplication in Tetrahymena cultures*. In: *Exp. Cell Res.* 1970, 59, S. 457-463

RATNAM, D. A.; PAVLOU, S.; FREDRICKSON, A. G.: *Effects on attachment of bacteria to chemostat walls in a microbial predator-prey relationship*. In: *Biotech. Bioeng.* 1982, 24, S. 2675-2694

RATSAK, C. H.; MAARSEN, K. A.; KOOIJMAN, S. A. L. M.: *Effects of Protozoa on Carbon Mineralization in Activated Sludge*. In: *Wat. Res.* 1996, 1, S. 1-12

ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. 16. Aufl. München, Wien: R. Oldenbourg Verlag, 1968

SAITOH, T.; ASAI, H.: *Growth-controlling factors produced during the logarithmic and stationary phase of Tetrahymena pyriformis*. In: *Experientia* 1980, 36, S. 1375-1376

SAMBANIS, A.; FREDRICKSON, A. G.: *Effect of addition of wall growth to a model of ciliate-bacterial interactions*. In: *Biotech. Bioeng.* 1989, 34, S. 875-881

SAMBANIS, A.; FREDRICKSON, A. G.: *Persistence of bacteria in the presence of viable, nonencysting, bacterivorous ciliates*. In: *Microb. Ecol.* 1988, 16, S. 197-211

SAMBANIS, A.; PAVLOU, S.; FREDRICKSON, A. G.: *Coexistence of bacteria and feeding ciliates: Growth of bacteria on autochthonous substrates as a stabilizing factor for coexistence*. In: *Biotech. Bioeng.* 1987, 29, S. 714-728

SCHLEGEL, H. G.: *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1992

SCHLIMME, W.; MARCHIANI, M.; HANSELMANN, K.; JENNI, B.: *BACTOX, a rapid bioassay that uses protozoa to assess the toxicity of bacteria*. In: Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65 (6), S. 2754-2757

SCHOUSBOE, P.; RASMUSSEN, L.: *Survival of Tetrahymena thermophila at Low Initial Cell Densities. Effects of Lipids and Long-Chain Alcohols*. In: J. Euk. Microbiol. 1994, 4 (3), S. 195-199

SCHWOERBEL, J.: *Einführung in die Limnologie*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1993

SERNETZ, M.; BITTNER, H. R.; WILLEMS, H.: *Organismen als Bioreaktoren: Fraktale Strukturen und heterogene Katalyse*. In: Umschau 1986, 11, S. 582-587

SERNETZ, M.; GELLERI, B., HOFMANN, J.: *The organism as bioreactor. Interpretation of the reduction law of metabolism in terms of heterogenous catalysis and fractal structure*. In: J. theor. Biol. 1985, 117, S. 209-230

SEYFERT, H.-M.; CLEFFMANN, G.: *Mean macronuclear DNA contents are variable in the ciliate Tetrahymena*. In: J. Cell. Sci. 1982, 58, 211-223

SHERR, E.; SHERR, B.: *Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept*. In: Limnol. Oceanogr. 1988, 5, S. 1225-1227

SIBBALD, M. J.; ALBRIGHT, L. J.: *Aggregated and free bacteria as food sources for heterotrophic microflagellates*. In: Appl. Environ. Microbiol. 1988, 54 (2), S. 613-616

STORHAS, W.: *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*. Braunschweig: Vieweg, 1994

STOUT, J. D.: *The role of protozoa in nutrient cycle and energy flow*. In: Adv. Microb. Ecol. 1980, 4, S. 1-50

SUZUKI, K.-M.; HOSOYA, N.; TAKAHASHI, T.; KOSAKA, T.; HOSOYA, H.: *Release of a newly-identified cysteine protease, tetrain, from Tetrahymena into cultur medium during cell growth*. In: J. Biochem. 1997, 121, S. 642-647



SWIFT, S. T.; NAJITA, I. Y.; OHTAGUCHI, K.; FREDRICKSON, A. G.: *Continuous culture of the ciliate Tetrahymena pyriformis on Escherichia coli*. In: Biotech. Bioeng. 1982a, 24, S. 1953-1964

SWIFT, S. T.; NAJITA, I. Y.; OHTAGUCHI, K.; FREDRICKSON, A. G.: *Some physiological aspects of the autecology of the suspension-feeding protozoan Tetrahymena thermophila*. In: Microb. Ecol. 1982b, 8, S. 201-215

SZABLEWSKI, L.; HOVE ANDREASSEN, P.; TIEDTKE, A.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; RASMUSSEN, L.: *Tetrahymena thermophila: Growth in synthetic nutrient medium in the presence and absence of glucose*. In: J. Protozool. 1991, 1, S. 62-65

TAYLOR, R. J.: *Predation*. New York; London: Chapman and Hall, 1984

TIEDTKE, A.; RASMUSSEN, L.: *Lysosomal enzymes in extracellular digestion in the unicellular eukaryote Tetrahymena*. In: J. Cell. Physiol. 1988, 136, S. 554-556

TOPIWALA, H. H.; HAMER, G.: *Effect of wall growth in steady-state continuous cultures*. In: Biotech. Bioeng. 1971, 13, S. 919-922

TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, P.: *Biotechnologie: Die biologischen Grundlagen*. Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag, 1993

VAN DEN ENDE, P.: *Predator-Prey interactions in continuous culture*. In: Science 1973, 181, S. 562-564

VON GRAEVENITZ, A.; WEINSTEIN, J.: *Pathogenic significance of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida*. In: Yale Journal of Biology and Medicine 1971, 44, S. 265-273

WATSON, P. J.; OHTAGUCHI, K.; FREDRICKSON, A. G.: *Kinetics of growth of the ciliate Tetrahymena pyriformis on Escherichia coli*. In: J. Gen. Microbiol. 1981, 122, S. 323-333

WEGENER, I.: *Einsatzmöglichkeiten von Biotests zur Abschätzung des Gefährdungspotentials von Grundwasser aus dem Altlastenbereich*. In: Schr.-Reihe Verein WaBoLu 1992, 89, S. 451-457

WESTHEIDE, W.; RIEGER, R. (Hrsg.): *Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1996

WILHELM, R.: *Dynamik und Persistenz eines mikrobiellen Räuber-Beute-Systems*. Diss. Universität Gießen, 1993

WILLE, J. J.; EHRET, C. F.: *Circadian rhythm of pattern formation in populations of a free-swimming organism, Tetrahymena*. In: J. Protozool. 1968, 15 (4), S. 792-795

## **Bedanken möchte ich mich sehr herzlich bei**

meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Manfred Sernetz für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für viele interessante und fachübergreifende Diskussionen;

Herrn Prof. Dr. Fritz Jauker für die Zweitbegutachtung dieser Arbeit, für die "Starthilfe" zu Beginn der Studie, für sein Interesse und seine stete Gesprächsbereitschaft;

Frau Dr. Ursula Richter und Herrn Dr. Martin Hardt von der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit sowie Prof. Dr. Eberhard Burkhardt und Herrn Gerhard Pierson vom Institut für Veterinärpathologie für Ihre Hilfe bei der Anfertigung der REM-Aufnahmen;

Frau Magret Hündt und Frau Christa Schwarz für ihre freundliche Art und für ihre Hilfe bei den Arbeiten im Tierhaus;

Herrn Gerd Herber, der immer sofort hilfreich zur Stelle war, wenn technische Probleme auftraten;

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Angewandte Biochemie" für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Arbeitsatmosphäre und viele nette Kaffeepausen;

Daniela Hild für ihre zahlreichen Unterstützungen bei Laborarbeiten, ihre aufmunternden Worte und ihre Freundschaft;

meiner Familie, die immer für mich da war: bei meinem Bruder und ganz besonders bei meinen Eltern, die mir mein Studium überhaupt ermöglicht haben;

bei Alex für sein Verständnis, seine Unterstützung und den kostbaren LINUX-Support!