

Vergleichende kalorimetrische Untersuchungen zur Ermittlung der mikrobiellen
Aktivitäten von *Pseudomonas putida*

Von der Fakultät für Chemie und Physik
der Technischen Universität Bergakademie Freiberg
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von Diplom-Chemiker Andreas Lißner

geboren am 26. Oktober 1980 in Dresden

Gutachter: Prof. Dr. Florian Mertens Freiberg
 Prof. Dr. Jochen Büchs Aachen

Tag der Verleihung 16.12.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung.....	1
2	Grundlagen und Literaturübersicht.....	4
2.1	Mikrobielle Aktivität	4
2.2	Kalorimetrische Detektion mikrobieller Aktivität	8
2.3	Mikrobielle Aktivität unter Stressbedingungen	14
2.3.1	<i>Pseudomonas putida</i> und Stress.....	16
2.3.2	Mikrobielle Aktivität in einer Hungerphase.....	17
2.4	Mikrobielle Massebilanz, Thermodynamik und Kinetik	19
3	Experimentelles	24
3.1	Verwendete Kalorimeter.....	24
3.1.1	Thermal Activity Monitor 2277	24
3.1.2	Micro-DSC II (MDSC)	27
3.1.3	IC-Chip FCC22.....	29
3.2	Mikrobielle Kultivierung	31
3.2.1	<i>Pseudomonas putida</i> DSM 12753.....	31
3.2.2	Belebtschlamm.....	31
3.2.3	Kulturansatz	31
3.2.4	Kultivierung	32
3.3	Mikrobielle Methoden	33
3.3.1	Bestimmung der Optischen Dichte	33
3.3.2	Bestimmung der Biomassekonzentration.....	33
3.3.3	Bestimmung der Lebendkeimzahl (cfu).....	33
3.3.4	Bestimmung der Enzymaktivität.....	34
4	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1	Erarbeitung des Mess- und Auswerteregimes.....	35
4.1.1	TAM-20ml	35
4.1.2	TAM-4ml	36
4.1.3	Chip-Kalorimeter	38
4.1.4	Micro-DSC II.....	39
4.2	Abhängigkeit der Wärmeleistung von der Biomassekonzentration.....	41
4.2.1	TAM-4ml	41
4.2.2	Micro-DSC II.....	43
4.3	Wachstum von <i>Pseudomonas putida</i> auf Natriumbenzoat	46
4.3.1	Messungen der Optischen Dichte.....	46
4.3.2	Bilanzierung	48
4.3.3	Kalorimetrische Messungen.....	49
4.4	Wachstum von <i>Pseudomonas putida</i> auf Glucose	61
4.5	Wachstum von <i>Pseudomonas putida</i> auf Phenol	67
4.6	Mikrobielle Aktivität nach einer Hungerphase	73
4.6.1	Hungerphase bei <i>Pseudomonas putida</i>	73
4.6.2	<i>Pseudomonas putida</i> Hungerstress auf Natriumbenzoat.....	77
4.6.3	<i>Pseudomonas putida</i> Hungerstress auf Glucose	83
4.6.4	<i>Pseudomonas putida</i> Hungerstress auf Phenol	87
4.6.5	Mikrobiologische Betrachtungen	90
4.6.6	Mathematische Beschreibung der zweiten Wachstumsphase	92
4.7	Mikrobielle Aktivität in Abhängigkeit des Substrates	94
4.7.1	Mikrobielle Aktivität bei konstantem physiologischen Zustand.....	94

4.7.2	Mikrobielle Aktivität bei veränderlichem physiologischem Zustand	97
4.8	Ausgewählte Anwendungsbeispiele der kalorimetrischen Bestimmung der mikrobiellen Aktivität	103
4.8.1	Mikrobielle Aktivität einer natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft	103
4.8.2	Mikrobielle Reaktion auf erhöhte Natriumchloridkonzentration	107
4.8.3	Mikrobielle Reaktion auf Silberionen	108
4.8.4	Mikrobielle Leistung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration	109
4.8.5	Zusammenfassung.....	112
5	Zusammenfassung.....	113
	Literaturverzeichnis	118
	Abbildungsverzeichnis.....	128
	Tabellenverzeichnis	133
	Symbol- und Abkürzungsverzeichnis.....	134
	Anhang.....	136
	Versicherung	145

1 Einleitung und Zielstellung

Mikroorganismen spielen in unserem Leben eine wesentliche Rolle. Ihre positive Wirkung wird u. a. bei der Produktion von Nahrungsmitteln, Pharmaka, Chemikalien oder in der Abfallbeseitigung (März 2009, Juteau et al. 2004, Renneberg 2007, Walsh 2007) genutzt. Demgegenüber stehen die negativen Erscheinungsformen von Mikroorganismen, die für das Verderben von Nahrungsmitteln verantwortlich sind, als Krankheitserreger auftreten oder bei der Biokorrosion von technischen Anlagen zu erheblichen Schäden führen. Durch gezielte Veränderung der Umweltbedingungen kann direkt Einfluss auf die Mikroorganismen genommen werden. Ziel kann die Steigerung (Nahrungsmittelproduktion) oder Verringerung (Krankheitserreger) der mikrobiellen Produktivität sein.

Die Beeinflussung von Mikroorganismen erfolgt in verschiedenen Phasen des mikrobiellen Lebens. Im Allgemeinen kann man fünf Phasen unterscheiden: die Anlaufphase (Anpassung an neue Umweltbedingung), die exponentielle Phase (exponentielles Wachstum), die Übergangsphase (Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit), die stationäre Phase (konstante Mikroorganismenanzahl) und die Absterbephase (Abnahme der Mikroorganismenanzahl). Der Ablauf der Phasen beginnt mit einer Nährstoffzugabe in das mikrobielle System oder dem Erschließen einer neuen Nährstoffquelle durch die Mikroorganismen. Eine Steigerung der mikrobiellen Produktivität kann sowohl die Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit in der exponentiellen Phase oder des maximalen Ertrags (Biomasse, Produkt) bewirken. Eine Verringerung der Produktivität führt zur vollständigen Verhinderung der exponentiellen Wachstumsphase (in Lebensmitteln oder Wunden) oder zur Abnahme der Anzahl an Mikroorganismen in der stationären Phase.

Eine gezielte Beeinflussung von Mikroorganismen erfordert insbesondere Kenntnisse über ihren physiologischen Zustand. Dieser wird durch die „Gesamtheit der physiologischen, zytologischen, biochemischen und aller anderen Eigenschaften bestimmt“ (Glombitza et al. 1984). Auf Grund der Vielzahl von Eigenschaften wird häufig nur ein Teil der Beobachtungen zur Beschreibung verwendet. Eine umfassende Größe ist die mikrobielle Aktivität – verstanden als mikrobieller Stoffumsatz pro Zeiteinheit. Sie liefert qualitative wie quantitative Aussagen über den Verlauf chemischer Reaktionen im biologischen System.

Je nach verwendeter Methodik zur Erfassung der mikrobiellen Aktivität sind Interpretationen allgemeiner oder spezifischer Natur zugänglich. Während die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Ausgangskonzentration des Substrates einen groben Überblick über den Ablauf des mikrobiellen Wachstums liefert, erhält man durch die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs

eines Metabolits des mikrobiellen Systems (z.B. Lactat bei der Milchsäuregärung) einen detaillierteren Einblick. Für Übersichtsuntersuchungen, die den Einfluss von Stressfaktoren auf den ganzheitlichen Metabolismus als Ziel haben, sind unspezifische Methoden ausreichend. Für oxidative Prozesse ist die Sauerstoffzehrung und für homogene Systeme die Bestimmung der Lichttrübung geeignet. Demgegenüber ist allen biologischen Systemen gemeinsam, dass auf Grund des Stoffumsatzes, durch den Ablauf einzelner chemischer Reaktionen, eine Wärmetönung auftritt. Diese Wärmetönung wird mit der Messmethode Kalorimetrie aufgezeichnet. Bei über 1000 gleichzeitig ablaufenden Reaktionen in einer Bakterienzelle liefern kalorimetrische Messungen ein unspezifisches, integrales aber charakteristisches Signal. Die Kalorimetrie weist keine Einschränkungen bezüglich der Beschaffenheit des Systems wie Heterogenität, Farbe oder Viskosität auf, und stellt als nicht-invasive Methode ein kontinuierliches, schnelles Signal – die Wärmeleistung (Wärme pro Zeiteinheit) – zur Verfügung. Diese verhält sich über die Reaktionsenthalpie (Wärme pro Mol Formelumsatz) proportional zum mikrobiellen Stoffumsatz.

Für die Aufzeichnung der Wärmeleistung stehen verschiedene kalorimetrische Systeme zur Verfügung, jedoch wurde davon nur eine kleine Anzahl speziell für biologische Systeme entwickelt. Viel häufiger werden bestehende Kalorimeter unter Einschränkungen (z. B. keine Sauerstoffzuführung) verwendet, oder durch Modifikationen an die mikrobiologischen Notwendigkeiten (Sterilität) angepasst. Von wenigen Nanolitern bis mehreren Kubikmetern, von zwei Thermometern bis hin zu hochkomplexen mehrstufig thermisch abgeschirmten Silizium-Chip-Sensoren, decken die kalorimetrischen Systeme einen weiten Bereich ab. Die variablen Volumina, große Unterschiede bei der Messauflösung und in den Detektionsgrenzen machen es häufig schwierig, einen direkten Vergleich zwischen den Anordnungen durchzuführen. Weiterhin sind die untersuchten biologischen Systeme (Pilze – Bakterien, anaerob – aerob, Bodenproben – genmanipulierte Labormikroorganismus) überaus vielfältig. Für vergleichende kalorimetrische Untersuchungen der mikrobiellen Aktivität unter variablen Wachstumsbedingungen ist eine geschickte Wahl des mikrobiellen Systems notwendig. Spezielle Anforderungen (z. B. Zugabe von Aminosäuren) oder die Fähigkeit zu anaerobem Wachstum sind problematisch für die thermodynamische Bilanzierung. Für die vorliegende Arbeit wurde *Pseudomonas putida* DSM 12735 (Gattung *Pseudomonas*, *P. putida*), ein überaus robustes Bakterium, ausgewählt. Es erfolgt keine Fermentation, eine Kultivierung auf vollsynthetischen Minimalmedien ist möglich und verschiedene Stressarten (Hunger, Temperatur, Salz) führen zu detektierbaren Änderungen in der mikrobiellen Aktivität.

In der natürlichen Umgebung von Pseudomonaden, den Pfützen (so genannte Pfützenkeime) sind sie dem Hungerstress – einem Merkmal der stationären Phase – häufig ausgeliefert. Eine Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in der stationären Phase erscheint auf Grund der Definition - Stoffumsatz pro Zeiteinheit - konträr. Durch das gezielte Auslösen einer neuen Wachstumsphase in der mikrobiellen Kultur sollte es möglich sein auf einen mikrobiellen Stoffumsatz zurück zu greifen. Änderungen des physiologischen Zustandes der Mikroorganismen innerhalb der Hungerdauer sind an den Veränderungen der mikrobiellen Aktivität in der provozierten Wachstumskurve erkennbar. Durch Variation der Dauer der Hungerphase sollte der zeitliche Verlauf der mikrobiellen Aktivität zugänglich sein.

Ziel dieser Dissertation ist es, die Vor- und Nachteile verschiedener kalorimetrischer Systeme an Hand eines mikrobiellen Systems und klassischem Batch-Wachstum herauszuarbeiten. Zur Verfügung stehen dafür: der Thermal Activity Monitor 2277 (TAM) der Firma Thermometric, (Schweden, jetzt TA-Instruments, USA) mit den Kalorimetern Micro Reaction System 2250-4 ml und 2250-20 ml (kurz: TAM-4ml, TAM-20ml), weiterhin das IC-Chip-Kalorimeter FCC22 – eine Entwicklung des Institutes für Physikalische Chemie (TU Bergakademie Freiberg) unter PD Lerchner (Lerchner et al. 2008a) – und das Kalorimeter Micro-DSC II der Firma Setaram (Caluire, Frankreich). Die erhaltenen Wachstumskurven sind anhand geeigneter Modelle (Monod, Andrews) mathematisch zu beschreiben.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht in der Erarbeitung einer kalorimeterübergreifenden Methodik zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität. Dabei soll besonders auf die Charakterisierung in der Hungerphase Wert gelegt werden. Die Methode ist an einem konstanten physiologischen Zustand (Chemostat) unter Einwirkung von verschiedenen Stressarten (Schwermetallionen, Salz) und Substraten zu testen. Weiterhin ist auch die mikrobielle Aktivität von *Pseudomonas putida* in der stationären Phase, bei konstantem oder sich zeitlich veränderndem physiologischen Zustand, mit der ausgearbeiteten Methode zu bestimmen.

Als ein erstes Anwendungsbeispiel der ausgearbeiteten Methode zur kalorimetrischen Bestimmung der mikrobiellen Aktivität ist die substratabhängige mikrobielle Aktivität einer komplexen Lebensgemeinschaft in einer Abwasseraufbereitungsanlage zu erfassen.

2 Grundlagen und Literaturübersicht

2.1 Mikrobielle Aktivität

Der Begriff ‚mikrobielle Aktivität‘ besitzt keine feste Definition. Er wird in vielen Bereichen der Forschung und Technologie verwendet, um das mikrobielle System zu charakterisieren. Der Begriff Aktivität steht allgemein für Leben bzw. für den Ablauf von Lebensprozessen. Als mikrobielle Aktivität ist die Stoffwechselaktivität zu verstehen. Die Stoffwechselaktivität wird quantitativ als Stoffumsatz pro Zeiteinheit oder qualitativ in Form verschiedener Stoffwechselstadien angegeben. Sie können zwischen dem aktivem Stoffwechsel („lebend“) bis hin zum vollständigem Verlust der Reproduktion und Einstellung des Metabolismus („tot“) verschiedene Zwischenstadien einnehmen. Die Abbildung 1 nach Pepper et al. gibt eine Übersicht physiologischer Stadien von Mikroorganismen wieder.

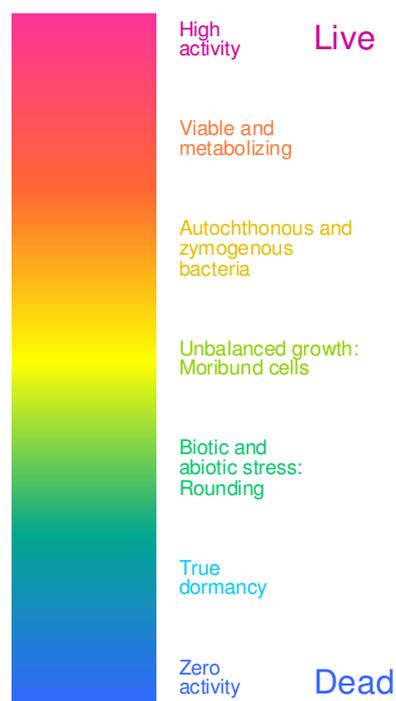


Abbildung 1: Physiologische Stadien von Mikroorganismen, nach Pepper et al. 1996.

Neben den von Pepper et al. 1996 angebrachten Zuständen gibt es weitere, so z. B. der viable-but-not-culturable Zustand (VBNC). Bei diesem Zustand wird eine metabolische Aktivität nachgewiesen, aber eine Kultivierung mit Standardkultivierungsmethoden ist nicht möglich. Dies ist insbesondere bei Krankheitserregern problematisch, da spätere

Wiederbelebungsprozesse nicht ausgeschlossen sind (Xu et al. 1982, Oliver 2005, Coutard et al. 2007). Unter Laborbedingungen ist es bei einer großen Anzahl von Mikroorganismen, auch ohne gesundheitsgefährlichem Potential, nicht möglich diese zu kultivieren d. h. die vorhandene mikrobielle Aktivität, Wachstum in ihrer natürlichen Umgebung, zu nutzen (Hugenholtz 2002, Rappé und Giovannoni 2003).

Der Zugang zur mikrobiellen Aktivität und den Schlussfolgerungen daraus sind nicht immer einfach und klar. Im Folgenden werden einige Beispiele von verschiedenen analytischen Methoden zur Aufnahme der mikrobiellen Aktivität aufgezeigt.

Die Grenzen ‚lebend‘ und ‚tot‘ lassen sich zum Beispiel mit Hilfe der Lebendkeimzahl (colony forming units, cfu) bestimmen. Eine Zelle wird auf Festmedium aufgebracht und die Bildung einer Kolonie, d. h. die Vermehrung durch Wachstum auf dem Festmedium, zeigt den lebenden, aktiven Zustand dieser Zelle an. Keine sichtbare Kolonie ist dann als Verlust der Reproduzierbarkeit (‚tot‘) zu werten. So verwendeten Cassidy und Irvine (1999) die Lebendkeimzahl als Beweis für den positiven Effekt einer Calciumperoxidzugabe bei der mikrobiellen Bodensanierung. Glandorf et al. (2001) verfolgten die Aktivität ihres genetisch veränderten Bakteriums *Pseudomonas putida* anhand der Lebendkeimzahl auf Weizenkörnern. Ziel war es, den fungiziden Effekt auf die Umgebung zu untersuchen.

Der Nachteil dieses Ansatzes ist der große Zeitbedarf. Bis sich die Mikroorganismen zu einer sichtbaren Kolonie entwickelt haben, vergehen bis zu 48 Stunden.

Mit Hilfe von ‚Färbemethoden‘ ist im Vergleich zur obigen Methode ein schnellerer Nachweis von ‚lebend‘ und ‚tot‘ möglich. Mit den Färbetechniken wird nicht mehr die Möglichkeit der Reproduktion untersucht, sondern die Membranintegrität. Eine zerstörte Membran ist nicht mehr in der Lage, lebensnotwendige Protonen- oder Alkaligradienten aufrecht zu erhalten bzw. den Zu- und Abfluss von Substanzen in und aus der Zelle zu kontrollieren. Der Tod der Zelle durch den Verlust der Membranintegrität wird mittels Anfärben der Zelle sichtbar gemacht. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid durchdringt defekte Zellmembranen und lagert sich an die DNA an. Mit der Verwendung von Fluoreszenzmikroskopen ist dann eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen möglich. Für Messungen mit hohem Durchsatz und im Bereich der Automatisierung findet die Durchflusszytometrie Anwendung.

Zotta et al. (2009) untersuchten mit der Durchflusszytometrie die Stressreaktion von *Lactobacillus curvatus* auf Säure und oxidativen Stress. Sie wiesen einen kompletten Verlust

der Membranintegrität nach. Wahman et al. (2009) untersuchten die desinfizierende Wirkung von Monochloramin auf *Nitrosomonas europaea* mit Hilfe der Färbemethode und ermittelten dafür kinetische Parameter. Hoefel et al. (2005) verwendeten die Methode, um einen schnellen Nachweis auf lebende Bakterien in Trinkwasser durchzuführen.

Neben der Verwendung von Farbstoffen besteht die Möglichkeit der Bestimmung der mikrobiellen Aktivität auf Basis einzelner Enzyme. Sowohl der qualitative Nachweis einzelner Enzyme, als auch die quantitative Erfassung der Enzymaktivität, ermöglichen Rückschlüsse auf die mikrobielle Aktivität und damit auf den physiologischen Zustand. Die Aktivität von Esterasen wird z. B. mit Fluoresceindiacetat (FDA, löslich, farblos) bestimmt. Intrazelluläre Esterasen hydrolysieren diesen Stoff zum unlöslichen, fluoreszierenden Fluorescein innerhalb der Zelle, die somit markiert ist. Anhand der FDA Esteraseaktivität zeigten Asagi und Ueno (2008) den stark positiven Effekt von Klärschlammzusätzen auf die mikrobielle Aktivität von Böden im Vergleich mit und ohne Zusatz von chemischen Düngern.

Mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) wird die mikrobielle Aktivität charakterisiert. Bei dieser Methode binden selektive Sonden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen verknüpft sind, an rRNA-Abschnitte innerhalb der Zelle. Damit sind spezifische Aussagen über die qualitative und quantitative Aktivität der Proteinsynthese möglich. Zellen die eine aktive Proteinsynthese zeigen sind nicht als ‚tot‘ anzusehen.

Stein et al. (2005) zeigten mit Hilfe von FISH auf, dass sich im Resultat einer Wasserstoffbehandlung von Böden die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ändert. Baskar et al. (2006) nutzten die FISH-Methode bei ihren Experimenten zur mikrobiell induzierten Calcit-Kristallisation, um den aktiven Anteil der Zellen zu ermitteln.

Auch Proteine, die in einer Zelle synthetisiert werden oder die aktivierten Gene werden zur Beschreibung der mikrobiellen Aktivität herangezogen. Mit Hilfe der Proteomik (Bestimmung der Gesamtheit der Proteine zu einem definierten Zeitpunkt) zeigten Tam et al. (2006) wie unterschiedlich *Bacillus subtilis* auf verschiedene Stressarten reagiert. Allein 159 Proteine wurden dem Hungerstress zugeordnet. Syn et al. (2004) untersuchten die Expression der Gene bei verschiedenen Nährstoffverarmungen wie Glucose, Nitrat, Phosphat oder auch bei niedriger Sauerstoffkonzentration.

Aussagen zur mikrobiellen Aktivität werden auch über die klassischen kinetischen Ansätze realisiert. Es wird der Umsatz innerhalb einer bestimmten Zeit gemessen oder eine Endpunktbestimmung vorgenommen. Sowohl der zeitliche Verlauf des Substratverbrauchs als auch die Bildung von Metaboliten bzw. Produkten wird herangezogen. Zum Einsatz kommen dabei die klassischen analytischen Methoden zur Bestimmung in Flüssig- und Gasphasen wie z. B.: HPLC, GC, UV-VIS, FT-IR.

So zeigten Steven et al. (2008) anhand des Abbaus von ^{14}C markierter Glucose und Acetat, verfolgt durch die Bildung von CO_2 , die unterschiedliche mikrobielle Aktivität von Permafrost-Proben bei verschiedenen Temperaturen. Genovese et al. (2008) verwendeten die Methode der Sauerstoffzehrung, um die mikrobielle Aktivität von Erdproben bei der Verstoffwechslung von Kohlenwasserstoffen wie z. B. Benzen, Toluol, Ethylbenzen, Xylen nachzuweisen.

Für aerobes mikrobielles Wachstum ist die Sauerstoffverbrauchsrate ein wichtiges Signal. Sie dient als universelle Größe für die Bestimmung der Aktivität des biologischen Systems (Anderlei et al. 2004). Seletzky et al. (2007) stellen dabei die Vor- und Nachteile verschiedener Systeme gegenüber. Die Sauerstoffkonzentration, die abhängig von der Sauerstoffverbrauchsrate ist, diente Anderson et al. (2001) als Messgröße für die Aufzeichnung der oszillierenden mikrobiellen Aktivität von *E. coli* während der Produktion von rekombinanten Proteinen.

Ein Stoffumsatz durch Mikroorganismen ist die Grundlage für die quantitative Bestimmung der mikrobiellen Aktivität. Dieser Stoffumsatz wird mit direkten oder indirekten Techniken verfolgt. Der Stoffumsatz ist dabei immer mit einer Wärmetönung verbunden, welche sich über kalorimetrische Methoden detektieren lässt. Demgemäß wird in dieser Arbeit der kalorimetrisch erfasste Stoffumsatz pro Zeiteinheit als Maß für die mikrobielle Aktivität verwendet (siehe dazu auch Braissant et al. 2009).

Über den Stand der Literatur zur kalorimetrischen Untersuchung der mikrobiellen Aktivität wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

2.2 Kalorimetrische Detektion mikrobieller Aktivität

Die Wärmeleistung als auch die insgesamt ausgetauschte Wärme stellen Kenngrößen für die Charakterisierung mikrobieller Systeme dar. Von besonderem Interesse für die Erfassung der mikrobiologischen Aktivität ist die Wärmeleistung. Für die Bestimmung der beiden Kenngrößen wird mit unterschiedlichen Kalorimetern gearbeitet. Dabei sind verschiedene technische Lösungen hinsichtlich Detektion, Arbeitsvolumina und Handhabung der mikrobiellen Kultivierungen im Einsatz. Eine Übersicht zu Anwendungen der Kalorimetrie an mikrobiellen Systemen wird in den Arbeiten von Hüttl et al. (2009), Maskow und Harms (2006), Zogg et al. (2004), Hansen und Russel (2006) bzw. Krell (2007) gegeben.

Für Untersuchungen in der Größenordnung biotechnologischer Prozesse eignen sich insbesondere großvolumige Kalorimeter. M. Türker (2004) stellte für diese Zwecke das bisher größte System vor. Es handelt sich dabei um einen 100 m³ fassenden Reaktor, der für die kalorimetrische Detektion mit erweiterter Temperaturerfassung ausgestattet wurde. Damit war es ihm möglich eine gute Übereinstimmung zwischen der metabolischen Wärmeproduktion und der Sauerstoff-Aufnahme-Rate bei der Fermentation von Melasse durch *Saccharomyces cerevisiae* zu zeigen.

Derartige Systeme sind auf Grund hoher Substratverbräuche nicht geeignet, um Untersuchungen oder Optimierungen an mikrobiellen Systemen durchzuführen. Dafür sind kleinere Systeme wie das Reaktionskalorimeter RC1 (Reaktionsvolumen: 0.03-18 Liter, typisch 0.5-5 Liter) von Mettler Toledo vorteilhafter. Insbesondere die Gruppe um Prof. von Stockar arbeitete an der Weiterentwicklung und Verwendung des Bio-RC1 mit verbesserter kalorimetrischer Detektion (Marison et al. 1998, Liu et al. 1999). Die Modellkulturen bilden vielfach Hefekulturen, die im Rahmen biotechnologischer Produktionen eingesetzt wurden (Voisard et al. 1998, Stark et al. 2003). Anderson et al. (2002) nutzten das Wärmesignal als on-line Indikator für die Produktion des Biopestizides von *Bacillus thuringiensis*. Eine weitere spezifische Entwicklung stellt die neue Photobiokalorimetrie dar, mit der eine kalorimetrische Detektion des Wachstums von Algen wie beispielsweise *Chlorella* mit den Substraten Licht und CO₂ möglich ist (Janssen et al. 2007, Patino et al. 2007).

Schubert et al. (2007) nahmen sich das RC1 zum Vorbild, als sie einen Standard-Bioreaktor mit kleinen Veränderungen in ein Bio-Kalorimeter mit vergleichbarer oder besserer Detektionsqualität wie etablierte Reaktionskalorimeter umarbeiteten. Ihre Lösung stellt eine

preiswerte und eine gut nutzbare Alternative zu teuren kalorimetrischen Systemen im Liter-Maßstab dar. Biener et al. (2010) setzten erfolgreich eine verbesserte Temperaturmessung in ihrem 30 Liter Bioreaktor ein, um Hochzell-Fermentationen kalorimetrisch zu kontrollieren.

Ein weiteres etabliertes Kalorimeter für die mikrobielle Anwendung ist der Thermal Activity Monitor (TAM). Das Kalorimeter TAM bietet eine sehr stabile Umgebungstemperatur für verschiedene kalorimetrische Einsätze mit einem Volumen von 2 bis 100 ml. Titrations-Kalorimeter wie auch Kalorimeter mit Ampullen-Technik oder Durchflusskalorimeter stehen zur Verfügung. Diese lassen sich damit für die verschiedenen mikrobiellen Kultivierungsarten einsetzen: einmalig (Batch), mehrmalige (Fed-Batch) oder kontinuierlich (Chemostat) Substratzugabe.

Die Ampullen-Technik bietet die Möglichkeit, ohne größeren Aufwand die Wärmeentwicklung mikrobieller Kultivierungen aufzuzeichnen. Dieser kalorimetrische Aufbau ist für die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Substanzen auf das Wachstum von Mikroorganismen gebräuchlich. Beispielweise wurde die toxische Wirkung von Nisin (Wang et al. 2005), Schiff-Basen (Li-Xia et al. 2005) und Derivaten von Selenmorpholin (Xi et al. 2001) auf *Staphylococcus aureus* mit Hilfe dieser Methode untersucht. Dabei zeigte sich deutlich, dass mit der Zunahme der Konzentration des toxischen Stoffes der exponentielle Anstieg der Wärmeleistung (mikrobielle Aktivität) verringert wird. Entsprechend nimmt dazu ebenfalls die maximal erreichbare Wärmeleistung ab.

Maskow und Babel (2003) nutzen das TAM (mit 4 ml Ampullen) zur Aufzeichnung von vollständigen Wachstumskurven von *Halomonas halodenitrificans*. Sie bestimmten zusätzlich die Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit. Yao et al. (2004) untersuchten die mikrobielle Aktivität von Erdproben und Reinkulturen unter dem Einfluss von Cadmium und Chrom. Sie bestimmten die Inhibierungskonzentration IC_{50} , bei der nur noch 50 % der originalen Aktivität vorhanden ist, anhand der Abnahme des exponentiellen Anstieges der mikrobiellen Leistung. Weitere Interpretationen z. B. bezüglich der Gesamtwärme sind dabei, als problematisch zu betrachten. Scheinbar negative Wärmeleistungswerte sind für mikrobielle Kultivierungen nicht zu erwarten.

In einer Vielzahl von Arbeiten wird das TAM für die Untersuchung von Umweltproben bzw. der mikrobiellen Aktivität von Bodenproben eingesetzt. Barros et al. (2007, 2010) beschäftigten sich mit der Frage des Potentials der Mikrokolorimetrie zur Charakterisierung von Umweltproben. Nunez et al. (1993) und Barja und Nunez (1998) untersuchten den

Einfluss von Glucose auf die mikrobielle Aktivität des Bodens. Bis 15 mg Glucose pro g Bodenprobe wurde eine stetige Steigerung der mikrobiellen Aktivität bestimmt. Eine größere Glucosekonzentration erzeugte keine höhere Aktivität im Boden.

Im Bereich der Medizin sind ebenso Anwendungen dieses kalorimetrischen Systems zu finden. So verwendeten Baldoni et al. (2009) die Kalorimetrie, um die Methicillinresistenz in klinischen Isolaten von *Staphylococcus aureus* nachzuweisen. Braissant et al. (2010) beschäftigten sich mit dem schnellen Nachweis von *Mycobacterien* einschließlich *M. tuberculosis* mit Hilfe der Mikrokalorimetrie.

Ein weiteres Kalorimeter, das im Rahmen der Dissertation eingesetzt wurde, ist das Kalorimeter Micro-DSC II der Firma Setaram. Es handelt sich dabei um ein vielseitiges Kalorimeter mit vornehmlichem Einsatz bei Raumtemperatur bis zu einer Temperatur von 100 °C und bei kleinen Probenmengen (verschlossene Ampullen bis 1 ml). Das Kalorimeter ist zur Detektion der mikrobiellen Aktivität bisher nur sehr wenig eingesetzt worden. Wie Schäffer et al. (2004, 2010) zeigten, lässt sich dieses Kalorimeter dennoch gut für die Untersuchungen an z. B. probiotischen Kulturen mit Milch als Wachstumssubstrat verwenden. Dabei ordneten sie die verschiedenen Anteile einer Wachstumskurve einer Mischkultur den einzelnen Mikroorganismen zu.

Biokalorimetrische Untersuchungen auf Basis integrierter Schaltkreise (IC) haben sich in den letzten Jahren stark entwickelt. Technisch weit entwickelt und durch Anpassungen vielseitig und flexibel einsetzbar ist dabei das in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Lerchner entwickelte Chip-Kalorimeter (Lerchner et al. 2008a).

Die Chip-Kalorimetrie hat den großen Vorteil mit kleinen Volumina (6 bis 26 µl) zu arbeiten. Dies ermöglicht ein stark verringertes Probenvolumen und damit einhergehend Kosteneinsparungen. Ein weiterer entscheidender Vorteil des Systems ist die kleine Zeitkonstante und die dadurch bedingte schnelle Ansprechzeit. Dies ermöglicht eine größere Anzahl an Einzelexperimenten im Gegensatz zu höher volumigen Kalorimetern wie dem RC1 oder auch dem TAM.

Während das Chip-Kalorimeter auf Grund der begrenzten Sauerstoffversorgung keine Batchkultivierung in der kleinen Messzelle gestattet, hat sich der Einsatz des Systems für die Untersuchung der Wärmeleistung einzelner mikrobieller Proben oder die Untersuchung an Biofilmen bewährt.

Lerchner et al. (2008b) beschreiben die Verwendung des Chip-Kalorimeters für die Detektion der mikrobiellen Aktivität eines Biofilmes. Als Signal dient die Spannung der Thermosäule, die der Wärmeleistung proportional ist. Wird die Substratzugabe gestoppt kommt es zum raschen Einbrechen des Signals. Ohne die Verstoffwechslung eines Substrates wird keine mikrobielle Aktivität aufgezeichnet.

Für die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität einzelner Proben werden die Proben aus externen Kultivierungen gewonnen. Die Quelle ist dabei äußerst verschieden wie Schüttelkolbenkulturen, Miniaturchemostate, medizinische Proben oder auch große Bioreaktoren. Hierbei ist es von großem Vorteil zusätzliche Analytik zur Charakterisierung des mikrobiellen Systems zu verwenden. Ein Beispiel dafür gibt unter anderem Maskow et al. (2006). Die experimentell ermittelte Leistung stimmt mit den Daten aus der Substratanalytik und der Modellierung des mikrobiellen Wachstums, des Substratverbrauchs und der Wärmeentwicklung überein. Regestein et al. (2009) zeigten den Vorteil der Kombination eines Reaktorkalorimeters mit dem Chip-Kalorimeter für die Aufzeichnung der Stoffwechselaktivität in einem breiten Spektrum an Biomassekonzentrationen auf.

Weitere IC-Systeme und Mehrkanalsysteme sind und waren in der Entwicklung. Higuera-Guisset et al. (2005) entwickelten ein System, was eine größere Kammer (600 μ l) als das oben genannte Chip-Kalorimeter einsetzt. Auch dieses System wird für die Detektion des mikrobiellen Wachstums verwendet. Torres et al. (2004) gehen über die Grenze eines Einkanalsystems hinaus und stellten diesbezüglich ein 96-Kanal System und erste biologische Anwendungen (Protein-Wechselwirkung, Mitochondrienatmung) vor.

Tabelle 1: Übersicht über einige Daten zu den verwendeten Kalorimetern

Kalorimeter	Volumen	Max. Leistung	Rauschen	Zwillingssystem bzw. Gasphase
TAM – 20 ml	20 ml	3 mW	3 μ W	Ja
TAM – 4 ml	4 ml	3 mW	0.5 μ W	Ja
Chip	6 μ l	1 mW	10 nW	Nein
MDSC	1 ml	45 mW	0.75 μ W	Ja

Die bisher vorgestellten Kalorimeter stellen die Systeme mit der weitesten Verbreitung bei der Detektion der mikrobiellen Aktivität dar. Die im Rahmen der Dissertation verwendeten Kalorimeter sind in Tabelle 1 mit einigen wichtigen Größen zusammengefasst. Dabei ist der

teilweise große Wertebereich der einzelnen Parameter der kalorimetrischen Systeme, z. B. das Volumen (zwischen 6 μ l und 20 ml), zu erkennen. Prinzipiell ergeben sich dadurch Einschränkungen in der Verwendung der Systeme. So ist beim Chip-Kalorimeter auf Grund der fehlenden Gasphase frühzeitig mit einer Sauerstofflimitierung zu rechnen. Während beim TAM-20ml mit der kleinsten maximalen Volumenleistung von 150 mW/l schnell die Messgrenze erreicht wird.

Neben den oben genannten Kalorimetern werden weitere Geräte für die Untersuchungen an mikrobiellen Systemen eingesetzt. Bei diesen lassen sich häufig Ähnlichkeiten zu den in Tabelle 1 aufgeführten Kalorimetern finden. Beispielsweise untersuchten Gardea et al. (2002) das mikrobielle Wachstum in Milch mit einem dem Kalorimeter MDSC II (1 ml Ampullen) ähnlichen Kalorimeter (CSC 4100). Sie konnten dabei die schnellere mikrobielle Belastung in unbehandelter Rohmilch im Gegensatz zur behandelten Milch kalorimetrisch aufzeigen.

Gordon et al. (1982) verwendeten zwei verschiedene Kalorimeter (ein Tronac 550 – und ein LKB-Mischungskalorimeter), um den Glucosemetabolismus des Marinebakteriums *Vibrio alginolyticus* zu untersuchen. Sie konnten die gute Reproduzierbarkeit kalorimetrisch aufgezeichneter Wachstumskurven d. h. die Übereinstimmung des exponentiellen Anstieges der Wärmeleistung, dem Maximum und der bei diesem Mikroorganismus aufgetretenen zweiten Wachstumsphase, darstellen. Weiterhin untersuchten sie die Abhängigkeit der Wärmeleistung und der ausgetauschten Wärme von der Ausgangskonzentration des Wachstumssubstrates Glucose und konnten den vermuteten linearen Zusammenhang bestätigen.

Die Kultivierung und die Detektion der Wärmeleistung erfolgten bei den meisten Beispielen in Kombination. Die Untersuchungen mikrobieller Kultivierungen mit kalorimetrischen Systemen können auch mit einer Trennung zwischen Kultivierung und kalorimetrischer Detektion, wie beim Chip-Kalorimeter, erfolgen. Weitere Anordnungen sind Durchflusskalorimeter. Hierbei erfolgt die Kultivierung extern. Über ein Pumpensystem wird die Probe dem kalorimetrischen System zugeführt. Guan et al. (1998, 1999) nutzten eine modifizierte Durchflusszelle für das Kalorimeter TAM in Verbindung mit einem Biorektor. Die Trennung beider Systeme bietet den Vorteil neben dem hochsensitiven Kalorimeter zusätzliche Analytik zu nutzen. Maskow et al. (2004) zeigten die Verwendung einer solchen Anordnung zum Nachweis der Umwandlung von Phenol in Polyhydroxyalkanoate durch *Variovorax paradoxus* DSM 4065.

Ullrich et al. (2005) und Hüttl et al. (2008) zeigten ebenso die Bedeutung zusätzlicher Analytik für die Interpretation kalorimetrisch erfasster Wachstumskurven. Dabei erfolgte im Gegensatz zum obigen Beispiel die Analytik mittels on-line Sensorik direkt im Kalorimeter. Der nächste Schritt auf diesem Weg war die Entwicklung eines Miniatur-Sensor-Kalorimeters (Held et al. 2007).

Weitere Arbeiten, die am Institut für Physikalische Chemie der TU Bergakademie Freiberg zu diesem Thema durchgeführt wurden, zeigen deutlich den Nutzen und den Vorteil der Kalorimetrie gegenüber klassischen mikrobiellen Methoden. Insbesondere in heterogenen Systemen wie *Rhodococcus opacus* 1CP auf *n*-Alkanen (Winkelmann et al. 2009) zeigt sich die Unabhängigkeit der Kalorimetrie von den Systemparametern. Die gute Reproduzierbarkeit der kalorimetrisch erfassten Wachstumskurve trotz des heterogenen Systems und des Auftretens von Zellaggregaten ist ein überzeugender Befund.

Die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) kann mit verschiedenen Kalorimetern durchgeführt werden. Diese thermodynamischen Untersuchungen dienen der Bestimmung der Enthalpie ΔH , der Gleichgewichtskonstanten K^+ und der Freien Enthalpie ΔG . Der experimentelle Ablauf erfolgt dabei durch sequentielle Zugabe eines Reaktionspartners. Wird diese Methode auf mikrobielle Untersuchungen angewendet, werden in schneller Abfolge Wachstumskurven kalorimetrisch aufgenommen. Der Aus- und Einbau entfällt zwischen den einzelnen Experimenten.

Daverio et al. (2003) zeigten, dass mit jeder weiteren Glucosezugabe die mikrobielle Aktivität steigt (Erhöhung der Wärmeleistung) bei gleichzeitiger Verkürzung der Zeitdauer zum vollständigen Verstoffwecheln der Glucose. Dieser Effekt wird als Anpassung der mikrobiellen Kultur an das Wachstumssubstrat Glucose angesehen.

Bei Hölzel et al. (1995) wurde diese Methode verwendet, um den Zusammenhang zwischen eingebrachter Substratmenge und ausgetauschter Wärme aufzuzeigen. Sie tätigten mehrere Zugaben mit steigender Substratmenge in eine mikrobielle Kultur. Sie zeigten damit in weniger als vier Stunden den lineareren Zusammenhang. Mariana et al. (2010) konnten mit der Titrationsmethode die kinetischen Parameter für den mikrobiellen Abbau von Umweltschadstoffen ermitteln.

2.3 Mikrobielle Aktivität unter Stressbedingungen

Für mikrobielles Wachstum bedeuten verschiedenste Faktoren Stress. Der Stress wirkt sich sowohl positiv als auch negativ auf das Wachstum bzw. das Überleben des Mikroorganismus aus. Stressfaktoren sind unter anderem Temperatur-, pH- oder Salzgehaltänderungen, sowie die Anwesenheit von Schwermetallionen oder die bloße Abwesenheit eines Wachstumssubstrates (Hungern). Negative Stressauswirkungen sind im Allgemeinen durch verlangsamte Abbauraten und damit einhergehend die Abnahme der mikrobiellen Aktivität gekennzeichnet. Die Ursachen dessen sind vielseitig, beispielsweise durch Deaktivierung einzelner Enzyme, Störung der Proteinsynthese, Inaktivierung der ganzen Zelle oder Zerstörung der Zelle.

Beispiele für gezielten Stress zur Minimierung der mikrobiellen Aktivität finden sich in der Lebensmittelindustrie. Hierbei ist mikrobielles Wachstum in der Regel unerwünscht, um die Haltbarkeit der Produkte zu gewährleisten. Das Pasteurisieren ist eine gezielte Methode zur Erhöhung der Haltbarkeit von Lebensmitteln. Chung et al. (2006) geben in ihrem umfassenden Review einen Einblick über die Stressantwort von *Escherichia coli* auf Wärme, Säure, Hunger und Kältestress. Sie gehen dabei sowohl auf die molekulare Auswirkung als auch auf Kreuzeffekte verschiedener Stressfaktoren ein. Browne und Dowds (2001) geben einen Einblick in das Stressverhalten von dem lebensmittelpathogenen Mikroorganismus *Bacillus cereus* bei Wärme und Salzstress. Hecker et al. (1996) geben eine Übersicht über die Hitzeschock und allgemeine Stressantwort von *Bacillus subtilis*. Für das gleiche Bakterium geben Tam et al. (2006) einen Einblick in die komplexe und stark situationsbedingte Proteinproduktion bedingt durch fünf verschiedene Stressfaktoren wie Substratverarmungen, Wärme oder Peroxideinfluss.

Im Rahmen medizinischer Versorgung ist das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Für diesen Zweck sind silberhaltige Verbandmaterialien gegen aerobe, anaerobe und Antibiotikums-resistente Mikroorganismen wirkungsvoll (Jones et al. 2004). Silber-Ionen haben eine denaturierende Wirkung auf schwefelhaltige Proteine, DANN/RNA oder können Zentralionen in Enzymen ersetzen. Dieser Stress wurde z. B. bei *E. coli* (Ghandour et al. 1988), *Legionella pneumophila* oder *Pseudomonas aeruginosa* (Hwang et al. 2007) untersucht. Eine Silberkonzentration größer als $2.5 \cdot 10^{-6}$ mol/l inhibiert das Wachstum von *E. coli* vollständig.

Insbesondere zur Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen ist die Kenntnis der Abhängigkeiten der mikrobiellen Aktivität von den verschiedenen Einflussgrößen wie Temperatur, pH-Wert, Konzentration von Nährstoffen (Kohlenstoffquelle, Sauerstoff, Phosphat) notwendig. Stressfaktoren wie Temperatur oder Sauerstoffkonzentration können dadurch auch einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen haben.

Deeb und Alvarez-Cohen (1999) untersuchten den Einfluss der Kultivierungstemperatur auf eine Anreicherungskultur bei der Verstoffwechslung von Benzen, Toluol, Ethylbenzen, Xylen. Im Bereich von 20 bis 35 °C wurde eine lineare Steigerung der Stoffwechselaktivität beobachtet. Eine weitere Erhöhung der Temperatur verringert stark die Abbauleistung.

Shehata und Marr (1971) untersuchten den Einfluss verschiedener Nährstoffe auf das Wachstum von *E. coli*. Bei niedriger Konzentration konnten sie eine starke Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von der Konzentration aufzeigen. Für die untersuchten Nährstoffe (z. B. Glucose, Phosphat, Tryptophan) stellte sich eine dem Monod-Modell ähnliche Abhängigkeit mit einem konstanten Wert bei höheren Konzentrationen ein.

Für den oxidativen Stoffwechsel ist Sauerstoff neben der Kohlenstoffquelle ein limitierendes Wachstumssubstrat. Um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden ist eine ausreichende Versorgung zu gewährleisten. Onken und Liefke (1989) zeigten indes, dass ein zuviel an Sauerstoff das Wachstum auch hemmen kann.

Der physiologische Zustand (Zustand der enzymatischen Abbauelemente) spielt für die Frage des Stresses eine entscheidende Rolle. In der Arbeitsgruppe von Prof. von Stockar entstand die Arbeit von C. Jungo (Jungo et al. 2007). Sie beschäftigt sich mit den verschiedenen Parametern auf die Wachstumsstöchiometrie, der Produktion von Avidin und der Regulation der Alkoholoxidase bei *Pichia pastoris* Mut⁺. Ein besonderer Punkt ist dabei die Verwendung von Methanol als Substrat. Da Methanol grundsätzlich als toxisch gilt, bedarf es einer Vorkultivierung auf Glycerol, um dieses Substrat in größeren Konzentrationen zu verwenden. Nach einer Zugabe von Methanol zu einer kontinuierlichen Kultivierung auf Glycerol wird das Methanol mit einer einhergehenden zusätzlichen Wärmeentwicklung abgebaut. Nach einer Zugabe von Methanol zu einer Kultur, bei der Methanol das originale Wachstumssubstrat war, kommt es zur schnellen Anhäufung von stark toxischen Intermediaten. Diese verhindern wiederum das weitere Wachstum von *P. pastoris* vollständig (keine weitere Wärmeentwicklung). Dies zeigt deutlich, dass auch wenn der Mikroorganismus fähig ist toxische Substanzen zu verstoffwechseln, sowohl das

Zugaberegime des Substrates als auch die mikrobielle Vorgeschichte (aktivierte Enzyme) einen entscheidenden Einfluss haben.

2.3.1 *Pseudomonas putida* und Stress

Der Mikroorganismus *Pseudomonas putida* kann verschiedenste Substrate verstoffwechseln (Reardon et al. 2000, Rodrigues et al. 2004). Von besonderem Interesse sind hierbei die aromatischen Vertreter wie Benzen, Toluol oder Phenol, da ein natürlicher Abbau dieser Umweltgifte wünschenswert ist.

Für den Abbau dieser Stoffe benötigt das Bakterium spezielle Enzyme. Der Abbau von Phenol bzw. Benzoesäure erfolgt dabei entweder über den *ortho* oder den *meta* Stoffwechselweg (Feist und Hegeman 1969, Abbildung 2). Neben der grundsätzlichen Veranlagung zum Abbau der oben genannten Stoffe sind weitere Umstände zu beachten. Auf Grund der Vorgeschichte ist es möglich, dass die benötigten Enzyme noch nicht aktiv sind oder durch genetische Selektion (Mutation) diese Fähigkeit verloren gegangen ist. Bayly und Wigmore (1972) zeigten, dass nicht nur das Wachstumssubstrat, sondern auch der genetische Zustand (Klon, Mutation) für die Abbaufähigkeit von enormer Bedeutung sind.

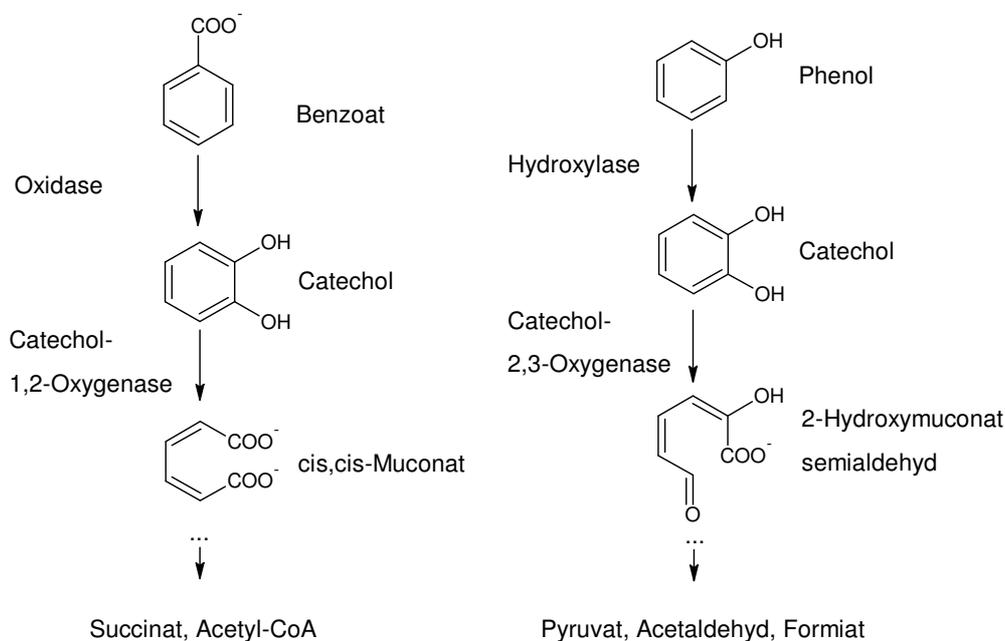


Abbildung 2: Unterschiedlicher Abbau von Catechol im Aromatenstoffwechsel, links – ortho Ringspaltung, rechts – meta Ringspaltung, nach Feist und Hegeman (1969)

Wissenschaftliche Untersuchungen richteten sich nicht nur auf das komplette Bakterium, sondern auch auf die einzelnen Enzyme des Abbauweges. Bertinit et al. (1994) untersuchten

die Inhibitorwirkung verschiedener aromatischer und aliphatischer Verbindungen auf die Catechol-2,3-Dioxygenase. Fujita et al. (1991) nutzten eine durch *E. coli* produzierte Catechol-2,3-Dioxygenase, um Catechol auf einfache Weise photometrisch nachzuweisen. Es konnte dabei sogar eine Aktivitätssteigerung gegenüber dem Spender *P. putida* BH festgestellt werden.

Auch bei diesem Mikroorganismus wird über die positive Wirkung (exponentielle Steigerung) einer Temperaturerhöhung auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *P. putida* Q5 auf Phenol (Onysko et al. 2000) berichtet. Polymenakou und Stephanou (2005) zeigten, dass aber eine Erhöhung über 40 °C den Abbau des Phenols stark negativ beeinflusst.

Wang et al. (1996) untersuchten den Abbau von Phenol, Glucose und den Mischungen aus beiden Stoffen durch *P. putida*. Sie fanden jedoch keine Steigerung der Abbauraten bei einer Mischung, vielmehr eine gegenseitige Behinderung der Abbauraten. Insbesondere Glucose behindert den Abbau von Phenol (unkompetitive Kreuzinhibierung).

2.3.2 Mikrobielle Aktivität in einer Hungerphase

Substratmangel stellt für Mikroorganismen in ihrer natürlichen Umgebung einen wiederholten Stressfaktor dar. Eine Anpassung an diesen Stress kann die Erschließung neuer Substrate sein oder das Eintreten in die stationäre Phase und dem damit verbundenen Erhaltungsstoffwechsel und Zellerhaltung (Hoffmann 1999). Die Anpassung wird dann anhand der Änderung der mikrobiellen Aktivität erkannt.

Syn et al. (2004) charakterisierten die Gene von *P. putida* nach einer Hungerphase auf u. a. Phosphat, Nitrat und Sauerstoff. Scott et al. (2007) bestimmten die Proteinzusammensetzung für eine Schwefellimitierung. Givskov et al. (1994) verdeutlichten, dass neben der Zellgröße auch der DANN- und Ribosomen-Gehalt abnimmt. Weiterhin konnten sie feststellen, dass der untersuchte *P. putida* KT2442 bei Kohlenstoff- oder Stickstoff-Verarmung lange Zeit (30 Tage) überlebt. Bei einer Sulfat- oder Phosphat-Verarmung verkleinerte sich die Überlebensrate um den Faktor 1000.

Roslev und King (1994, 1995) untersuchten den Einfluss von Sauerstoff auf das Hungerverhalten von methanotrophen Bakterien. Anaerobe Überdauerung zeigte gegenüber dem aeroben Überdauern weniger Veränderungen in der Morphologie und Proteinmenge. Anaerobes Hungern weist zudem größere Überlebensraten auf.

Jenkins und Heald (1996) stellten fest, dass die Temperatur, bei der die Nährstofflimitierung auftritt, entscheidend für den Erhalt der Abbaufähigkeit eines Substrates ist. Bei 30 °C verlor

der *P. putida* NCIMB 11767 vollständig die Fähigkeit Toluol abzubauen, während er bei 4 °C die Fähigkeit behält. Gleiches konnten Lim et al. (2001) für *P. putida* PaW164 zeigen. Die Abbaurate für Toluol innerhalb von 10 Stunden hängt entscheidend von der Hungerdauer ab, während die Abbaurate für Glucose nahezu konstant bleibt. Johnson et al. (2007) geben eine kleine Übersicht zu Toluol abbauenden Mikroorganismen und den Deaktivierungsraten bezüglich des Toluolabbaus dar. Die Deaktivierungsraten sind zwar abhängig vom Mikroorganismus, aber weniger von den Vorbedingungen (Konzentration von Toluol oder Cosubstrat). Beispielsweise werden bei einem 95 %igen Vertrauensintervall die Deaktivierungsraten der Toluolabbauaktivität mit (2.19 d⁻¹) und ohne (2.46 d⁻¹) Lactatzusatz bei *Burkholderia cepacia* G4 als nahezu gleichwertig betrachtet.

Die hierbei verwendete Gleichung zur Beschreibung der Abnahme der Abbauraten beruht auf einem exponentiellen Zusammenhang.

$$r = r_0 \cdot e^{-k_D \cdot t} \quad (1)$$

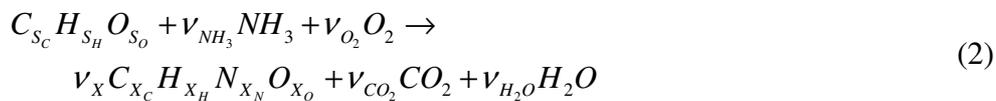
Watanabe et al. (2000) zeigten in ihren Untersuchungen, dass die Deaktivierung der Phenolabbaurate in der Hungerphase viel größer ist als die Deaktivierung der Dehydrogenaseaktivität oder der Atmungsrate bei *Ralstonia eutropha* E2 in einer Schlammumgebung. Dabei zeigt sich, dass die beiden letztgenannten Aktivitätsparameter denselben Verlauf nehmen. Dies offenbart deutlich den komplexen Sachverhalt der Nährstoffverarmung bei Mikroorganismen.

Seletzky et al. (2006) untersuchten verschiedene Stressfaktoren auf die metabolische Aktivität von *Corynebacterium glutamicum* gewachsen auf L-Milchsäure. Der Mikroorganismus konnte eine Hungerdauer von bis zu 19 Stunden überdauern ohne jeglichen Verlust an Aktivität. Auch spielte eine Sauerstofflimitierung während der Wachstumsphasen keine Rolle bezüglich der mikrobiellen Aktivität.

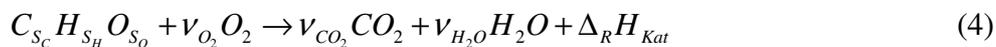
2.4 Mikrobielle Massebilanz, Thermodynamik und Kinetik

Mikrobielle Stoffumsätze lassen sich in Analogie zu chemischen Stoffumsätzen mit Reaktionsgleichungen beschreiben. Die Anzahl der möglichen chemischen Reaktionen überschreiten dabei schnell mehrere Hundert. Eine gute Übersicht bietet hierfür die KEGG-Datenbank (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) mit der Unterabteilung Stoffwechselwege (KEGG PATHWAY). Chassagnole et al. (2002) verwendeten mit ca. 100 grundlegenden Reaktionen zur Beschreibung des Kohlenstoffmetabolismus von *E. coli* eine große Anzahl. Mit nur 2 Reaktionsgleichungen kamen Maskow et al. (2006) aus, um das Wachstums von *E. coli* auf Glycerol zu beschreiben.

Eine vollständige Beschreibung ist schwierig und erfordert eine aufwendige Analytik. Ein einfacherer Weg ist die Aufstellung einer Bruttoreaktionsgleichung, die alle Stoffumsätze in einer umfassenden Gleichung beschreibt. Diese wiederum umfasst nur den Umsatz der mengenmäßig wichtigsten chemischen Elemente des mikrobiellen Systems (Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff). Gleichung (2) gibt ein allgemeines Beispiel (S – Substrat, X – Biomasse) für ein Mol Substrat ($v_S = 1$) an.



Zur Beschreibung der mikrobiellen Kenngrößen, wie beispielsweise den Ertragsfaktoren, ist eine Zerlegung der Gleichung (2) in Anabolismus (Aufbau von Biomasse) und Katabolismus (Abbau von Substrat) von Vorteil. Damit stehen die Reaktionsenthalpien ($\Delta_R H_{Ana}$, $\Delta_R H_{Kat}$) für die Teilreaktionen fest.



Die Aufteilung in Anabolismus (3) und Katabolismus (4) erfolgt so, dass in jeder Teilreaktion aus einem Mol Substrat eine entsprechende Menge Produkt entsteht. Die Verwendung von Mol Kohlenstoff (C-mol) zeigt dabei den vollständigen Umsatz des Substrat in Biomasse bzw. Kohlenstoffdioxid (allg.: $v_S S_C = v_X X_C = v_{CO_2}$) an.

Für den anabolen Teilprozess wurden auch andere Gleichungen vorgeschlagen. Hansen et al. (2004) führen zu dieser Problematik eine intensive Diskussion aus. Die in der Dissertation verwendete Aufteilung hat den Vorteil der schnellen Berechnung der gesamten

Reaktionsenthalpie aus den Teilreaktionsenthalpien ($\Delta_R H_{Ana}$, $\Delta_R H_{Kat}$) und dem Ertragsfaktor des mikrobiellen Prozesses.

Der molare Ertragsfaktor $Y_{X/S}$ für Kohlenstoff für die Gleichung (2) berechnet sich entsprechend der Gleichung (5):

$$Y_{X/S} = \frac{v_X X_C}{S_C} \quad (5)$$

Der molare Ertragsfaktor gibt damit den Anteil an einem C-mol Substrat für den Anabolismus an. $1 - Y_{X/S}$ ist dann der Anteil an einem C-mol Substrat der im Katabolismus umgesetzt wird.

Um einen Zusammenhang zwischen dem molaren Ertragsfaktor und der bei dem Gesamtprozess frei werdenden Wärme zu finden, kann die Reaktionsenthalpie für den gesamten mikrobiellen Prozess nach Gleichung (6) einfach, unter zu Hilfenahme der Reaktionsenthalpien für die aufgestellten Gleichungen für Anabolismus (3) und Katabolismus (4), berechnet werden.

$$\Delta_R H = Y_{X/S} \Delta_R H_{Ana} + (1 - Y_{X/S}) \Delta_R H_{Kat} \quad (6)$$

Den umgekehrten Zusammenhang, d. h. Berechnung des molaren Ertragsfaktors aus der Reaktionsenthalpie, beschreibt die Gleichung (7).

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta_R H - \Delta_R H_{Kat}}{\Delta_R H_{Ana} - \Delta_R H_{Kat}} \quad (7)$$

Neben dem molaren Ertragsfaktor $Y_{X/S}$ wird der Ertragsfaktor $Y_{X/S,g}$ bezogen auf g Biomasse pro g Substrat verwendet. Die Beziehung zwischen beiden Faktoren ist in Gleichung (8) dargestellt.

$$Y_{X/S,g} = Y_{X/S} \frac{v_X M_X}{M_S} \quad (8)$$

Die Reaktionsenthalpien für Anabolismus (3) und Katabolismus (4), die für Berechnungen nach Gleichungen (6) und (7) benötigt werden, werden mithilfe der Bildungsenthalpien der beteiligten Stoffe berechnet. Nicht immer sind die Bildungsenthalpien für alle beteiligten Stoffe bekannt oder können über experimentelle Untersuchungen (z. B. Verbrennungsenthalpie) einfach zugänglich gemacht werden. Für diesen Fall eignet sich insbesondere die Arbeit von Thornton (1917). Er hat den Zusammenhang zwischen dem Reduktionsgrad γ einer Kohlenstoffverbindung, berechnet aus deren Summenformel, und ihrer Verbrennungsenthalpie $\Delta_C H$ aufgezeigt. Der Proportionalfaktor ist das Oxykalorische Äquivalent (O_A) (Gleichung (9)).

$$\Delta_C H = O_A \cdot \gamma \cdot X_C \quad (9)$$

Die Verknüpfung des Reduktionsgrades mit der Summenformel der chemischen Verbindung gibt Gleichung (10) an.

$$\gamma = 4 + X_H / X_C - 2X_O / X_C \quad (10)$$

Bei der Auswertung der Literatur zum Oxykalorischen Äquivalent ($O_{\ddot{A}}$) konnte diese Größe in einem Bereich von -110 bis -120 kJ/mol belegt werden. Beispielsweise stützen Ho und Payne (1979) und Roels (1983) diesen Wertebereich. Cordier et al. (1987) verwendeten erfolgreich dieses Konzept für die Berechnung der Verbrennungsenthalpie von Biomassen von verschiedenen Mikroorganismen aus deren Summenformel und bestätigten dies durch experimentelle Bestimmung.

Für die Ermittlung der mikrobiellen Aktivität wird der zeitliche Verlauf des mikrobiellen Stoffwechsels benötigt. Für die kinetische Beschreibung mikrobieller Wachstumsvorgänge ist es nicht praktikabel jede einzelne Reaktion kinetisch zu erfassen. In der hier vorliegenden Arbeit soll daher nur eine ‚einfache‘ formale Kinetik eingesetzt werden. Dabei wird von der Beschreibung der Biomassebildung (11) und des Verbrauches des zugehörigen Substrats (12) ausgegangen.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (11)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/S,m}} X \quad (12)$$

Die Geschwindigkeitskonstante μ wird in diesem Zusammenhang als spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bezeichnet. Verschiedene mathematische Gleichungen stehen für die Beschreibung der Abhängigkeit des mikrobiellen Wachstums sowohl von der Substratkonzentration als auch von der Art des Substrates zur Verfügung.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (13)$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S + S^2 / K_I} \quad (14)$$

Die Gleichung (13), benannt nach J. L. Monod (1949), stellt das einfachste und das am häufigsten angewendete Wachstumsmodell dar. Sie beinhaltet einen maximalen Wert μ_{\max} und eine Sättigungskonstante K_S , bei der die halbmaximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit erreicht wird. Damit wird konstantes exponentielles Wachstum bei hoher Substratkonzentration und substratlimitiertes Wachstum bei niedriger Konzentration mathematisch beschrieben.

Die Andrews-Gleichung ((14), 1968) ist eine Erweiterung der Monod-Gleichung durch einen Term (S^2/K_I) , der die Erniedrigung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit durch höhere Substratkonzentrationen beschreibt. Eine derartige Substratinhibierung wird insbesondere bei toxischen Substraten (z. B. Phenol) diskutiert.

In Tabelle 2 sind weitere Modelle zusammengefasst. Sie stehen beispielhaft für die große Vielfalt der verschiedenen mathematischen Ansätze zur Beschreibung des mikrobiellen Wachstums. Einige weisen starke Ähnlichkeiten zum Modell nach Monod auf.

Tabelle 2: Auswahl an mathematischen Modellen zur Beschreibung der Abhängigkeit μ von S

Gleichung	Zusatzparameter	
(15) $\mu = (\mu_{\max} + m) \frac{S}{K_S + S} - m$	m zur Beschreibung des Grundmetabolismus	Lendenmann et al. (2000)
(16) $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - k_D$	k_D als Absterberate	Schirmer et al. (1999)
(17) $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - i(S - S_\theta)$	Inhibierungsmodell für $S \geq S_\theta$	Wayman und Tseng 1976
(18) $\mu = \mu_{\max} - mX$	m zur Beschreibung der Inhibierung der Zellen – Verhulst-Pearl-Modell	Maskow und Babel (2003)

In der Dissertation wird das weit verbreitete Modell nach Monod eingesetzt. Für die toxischen Substrate wie z. B. Phenol wird das Modell nach Andrews verwendet.

Die formulierten Differentialgleichungen (11) und (12) werden mithilfe numerischer Methoden mit Computerprogrammen z. B. Matlab gelöst. Die Lösungen sind die zeitlichen Verläufe der Biomasse und der Substratkonzentration. Aus der Substratkonzentration lässt sich der zeitliche Verlauf der Wärmeentwicklung berechnen.

$$q(t) = \Delta_R H \cdot (S_0 - S(t)) \tag{19}$$

Um den Zusammenhang zwischen der Wärmeleistung \dot{q} , die die Messgröße der verwendeten Kalorimeter ist, und der kinetischen Beschreibung des mikrobiellen Substratabbaues herzustellen wird die Gleichung (20) benötigt.

$$\dot{q} = \frac{dq}{dt} = \frac{d(S_0 - S(t))}{dt} \tag{20}$$

Maskow und Babel (2003) geben eine durch Vereinfachungen gewonnene Lösung für die exponentielle Wachstumsphase an:

$$\dot{q} = X_0 e^{\mu_{\max} t} \Delta_R H_X \mu_{\max} . \quad (21)$$

Insbesondere die Gleichung (21) verdeutlicht den direkten Zusammenhang zwischen Biomassekonzentration und Wärmeleistung. Die Wärmeleistung zu Beginn einer Wachstumsphase, bezeichnet als Startwärmeleistung P_0 , ergibt sich damit zu:

$$P_0 = \dot{q}_0 = X_0 \Delta_R H_X \mu_{\max} . \quad (22)$$

Durch die in diesem Kapitel aufgestellten Gleichungen lassen sich mikrobielle Kultivierungen mit Hilfe kalorimetrischer Methoden bezüglich der Aktivität untersuchen, beschreiben und interpretieren.

3 Experimentelles

Im Nachfolgenden werden die verwendeten experimentellen Aufbauten, wie Kalorimeter oder mikrobielle Kultivierung, dargestellt. Weitere Angaben, insbesondere weiterführende Programme für das Softwarepaket Matlab (Mathworks), sind im Anhang zu finden.

3.1 Verwendete Kalorimeter

3.1.1 Thermal Activity Monitor 2277

Für den Thermal Activity Monitor (TAM) 2277 der Firma Thermometric, (Schweden, jetzt TA-Instruments, USA) stehen verschiedene Kalorimereinsätze zur Verfügung. Die in dieser Arbeit verwendeten Einsätze sind das Thermometric 2250-series Micro Reaction System mit 20 ml (TAM-20ml) Zellvolumen als Perfusionseinheit und das Micro Reaction System mit 4 ml Zellvolumen in der Ampullentechnik (TAM-4ml). Beide Kalorimeter sind Wärmeflusskalorimeter, aufgebaut als Zwillingssystem mit einer Proben- und einer Referenzseite. Die Referenzseite ist jeweils mit einer verschlossenen Ampulle mit destilliertem Wasser bestückt. Die Abbildung 3 zeigt die Messzelle, Kalorimeternaufsatz und das Kalorimeter.

Neben den unterschiedlichen Volumina der beiden Kalorimeter liegt der wesentliche Unterschied des 20 ml Systems in der Möglichkeit einer Rührung, Gaseinleitung (Sauerstoff, Ein- und Auslass) und Flüssigkeitszugabe (Spritzenpumpe mit Kapillaren). Das kleinere Kalorimeter (4 ml) wird dagegen nur mit einer verschlossenen Ampulle verwendet.

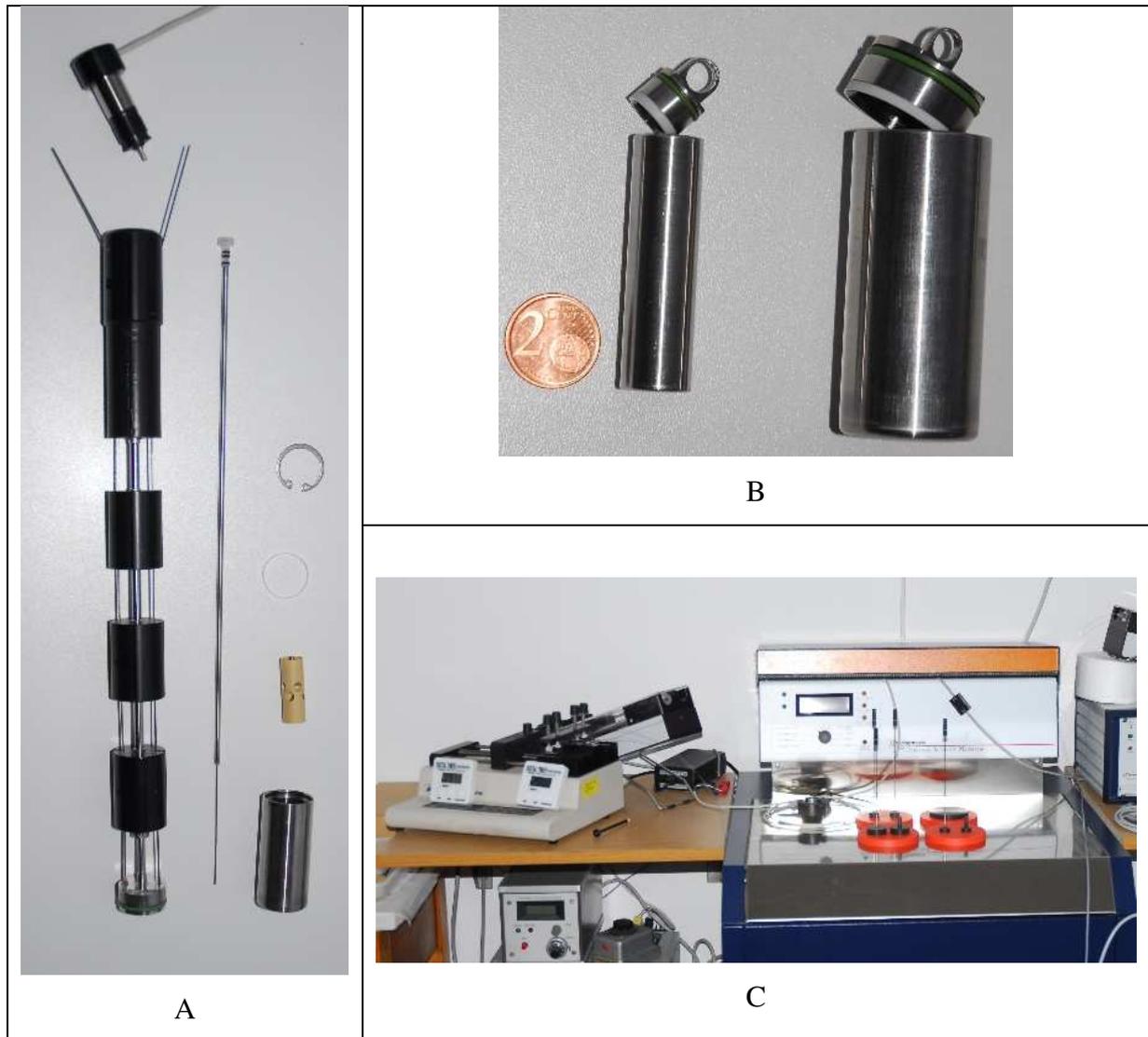


Abbildung 3: A) Kompletter Kalorimereinsatz (20 ml) mit: Rührmotor, Kalorimeterzellenaufsatz, Rührerwelle, Sicherungsring, Teflondichtung, Rührer, Kalorimeterzelle; B) 4 ml Kalorimetergefäß und 20 ml Kalorimetergefäß; C) TAM mit vier Kalorimereinsätzen (orange) mit zwei Spritzenpumpen (links).

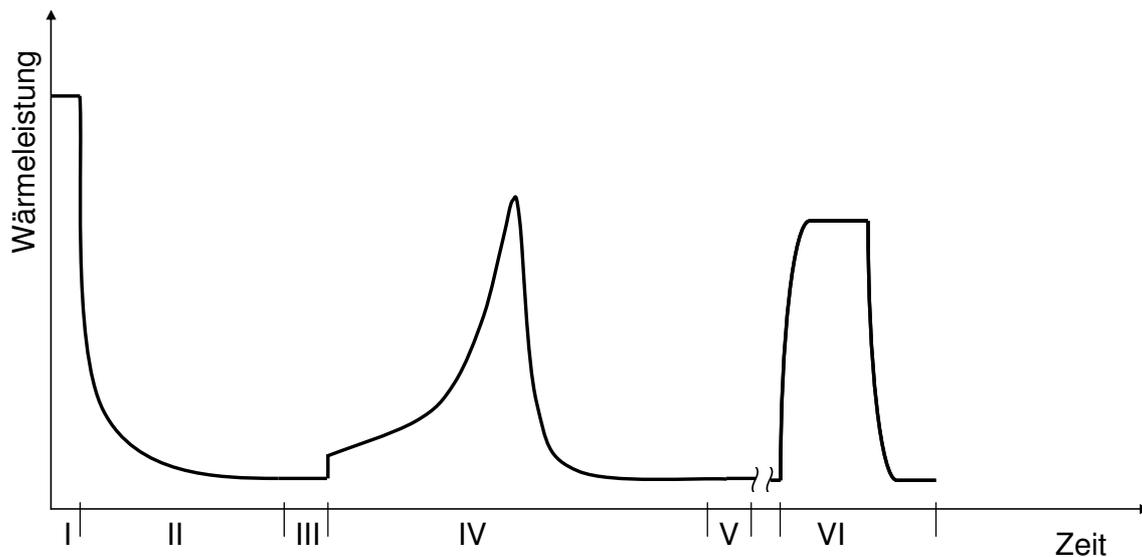


Abbildung 4: Messprogramm mit dem TAM-20 ml anhand einer schematischen Messkurve, I Probeneinbau, II Temperierphase, III Basislinie, IV Hauptphase, V Basislinie, VI elektrische Kalibrierung.

Das Messprogramm für die Experimente mit dem Kalorimeter TAM-20ml folgt der schematischen Messkurve in Abbildung 4. Vor der Messung wird die Kalorimeterzelle mit der Probenlösung steril befüllt. Je nach Bedarf wird mit Minimalmedium auf 15 ml aufgefüllt (Referenzzelle enthält 15 ml dest. Wasser). Anschließend wird die Zelle mit dem Kalorimetaraufbau verschlossen und in das Kalorimeter eingebracht (Phase I).

Daran schließt sich eine Temperierphase (II) von bis zu 7 Stunden an, in welcher eine konstante Basislinie erreicht werden soll. Diese Basislinie wird in der nächsten Phase (III) aufgezeichnet.

Zum Beginn der Phase IV erfolgt die Substratzugabe über eine Spritze mit Kapillare unter Verwendung einer Spritzenpumpe. Nach dem Abklingen des thermischen Effektes schließt sich eine weitere Basislinie (V) an. Durch wiederholte Zugaben von Substrat werden weitere Wachstumsphasen ausgelöst.

An die letzte Basislinie schließt sich eine elektrische Kalibrierung an. Diese dient zur Korrektur des thermischen Signals durch Bestimmung der Zeitkonstanten und anschließender Entschmierung der Messkurve. Die Zeitkonstante, die für diesen experimentellen Aufbau ermittelt wurde beträgt 180 ± 4 Sekunden.

Während des gesamten Messvorgangs wird die Lösung mit einem Rührer (Turbinenrührer aus PEEK) mit 100 rpm gerührt und mit Sauerstoff (100 ml h^{-1}) versorgt.

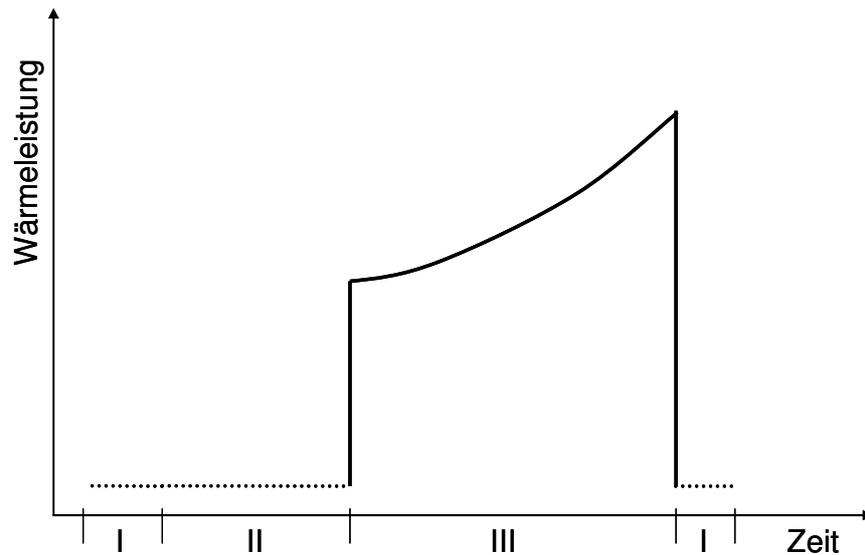


Abbildung 5: Messprogramm mit dem TAM – 4 ml anhand einer schematischen Messkurve, I Probenpräparation und –einbau, II Temperierphase, III Messphase.

Das Messprogramm für die Experimente mit dem Kalorimeter TAM-4ml folgt der schematischen Messkurve in Abbildung 5. Die erste Phase umfasst die Präparation der Probe in das Kalorimetergefäß. Dabei wird die eigentliche Probe eingefüllt, wenn vorgesehen mit Substrat versetzt und mit Minimalmedium aufgefüllt. Um eine ausreichende Gasphase zu gewährleisten wurde nur 1 ml Gesamtflüssigkeitsmenge angestrebt (Referenzzelle mit 1 ml dest. Wasser befüllt). Anschließend werden die Lösung und die darüber befindliche Gasphase mit Sauerstoff gesättigt (30-60 s mit $5 \text{ ml min}^{-1} \text{ O}_2$). Danach wird die Zelle verschlossen und in das Kalorimeter eingebracht.

Nach 20 Minuten Temperierzeit (Phase II) wird die Zelle weiter abgesenkt bis zur Messzone. Die Wärmefreisetzung wird 30 Minuten lang detektiert (III). Danach wird die Zelle aus dem Kalorimeter entnommen, gereinigt, getrocknet und ist bereit für den nächsten Messeinsatz.

Die erhaltenen Daten werden mit Hilfe der Zeitkonstante ($90 \pm 1.5 \text{ s}$), die über die elektrische Kalibrierung erhalten wurde, entschmiert.

3.1.2 Micro-DSC II (MDSC)

Die Micro-DSC II der Firma Setaram (Caluire, Frankreich) ist wie die TAM-Kalorimeter ein Zwillingswärmeflusskalorimeter. Das zur Verfügung stehende Volumen ist jedoch kleiner, es beträgt maximal 1 ml. Anwendungsseitig liegt der Vorteil dieses Systems in der einfachen Möglichkeit das Kalorimeter als Durchflusskalorimeter zu verwenden.

Die originale Durchflusszelle wurde modifiziert, um ein besseres Durchflussverhalten und größeres thermisches Volumen zu ermöglichen.

In der Abbildung 6 ist das Schema für den experimentellen Aufbau mit Rückfluss in den kleinen Bioreaktor (250 ml Doppelmantelglasgefäß mit Gummistopfen und Kapillaren) dargestellt. Diese Anordnung wurde für die Untersuchungen zum Batch-Wachstum von Mikroorganismen verwendet. Der Bioreaktor wurde steril mit Minimalmedium (100 ml) befüllt und mit Mikroorganismen aus einer Vorkultur beimpft. Die Rührung erfolgt über einen Magnetrührer. Sowohl der Bioreaktor als auch der kontinuierliche Probenstrom ins Kalorimeter wurden mit Sauerstoff begast.

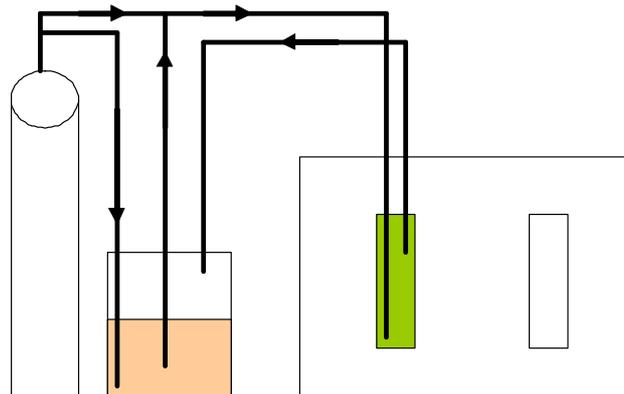


Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Rückflussanordnung, von links nach rechts: Sauerstoffversorgung, Bioreaktor, MDSC mit Probe- und Referenzzelle.

In der Abbildung 7 ist das Schema für den einmaligen Durchfluss durch die MDSC dargestellt. Der vereinigte Durchfluss von Sauerstoff, bakterieller Kultur und frischer Substratlösung erfolgt kontinuierlich, jedoch nicht wieder zurück in die bakterielle Kultur sondern in den Abfall (gelb). Diese Anordnung wurde für die Untersuchungen zum Hungerstress verwendet.

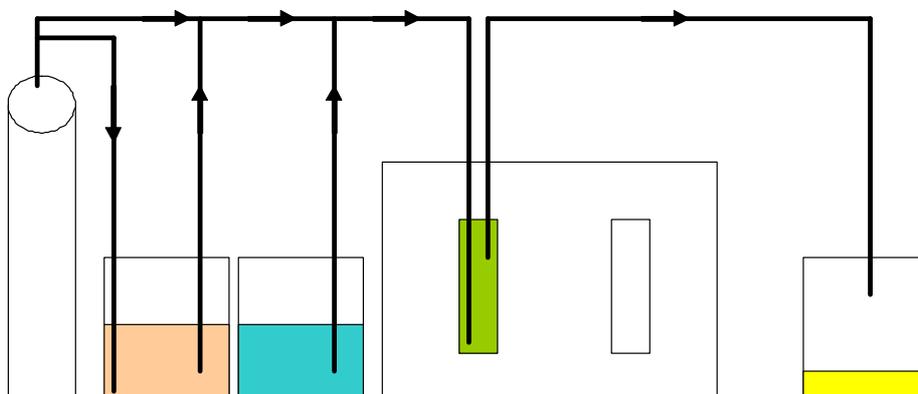


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Anordnung für einmaligen Durchfluss, von links nach rechts: Sauerstoffversorgung, bakterielle Kultur, frisches Nährmedium, MDSC mit Probe- und Referenzzelle, Abfallbehälter.

Die verwendete Bakterienkultur befindet sich am Ende der Wachstumsphase (stationäre Phase). Erst durch die Zugabe von neuem Substrat (blau) wird ein neues Wachstum und damit eine Wärmeproduktion ausgelöst. Die mikrobielle Kultur (orange) verbleibt in der stationären Phase und wird durch Probennahme nicht beeinflusst.

Die Betriebstemperatur sowohl des Bioreaktors als auch der MDSC war 30 °C.

Die MDSC lässt sich auch mit geschlossenen Ampullen mit einem Volumen von 1000 µl betreiben. Für eine ausreichende Gasphase wurden die Zellen mit maximal 500 µl Flüssigkeit gefüllt. Der experimentelle Ablauf folgt dem des TAM-4ml. Nach dem Befüllen der Zelle (Probe, zusätzliches Substrat, Minimalmedium) wurde die Flüssigphase mit Sauerstoff (30-60 s mit 5 ml min⁻¹ O₂) gesättigt, die Zelle verschlossen und in das Kalorimeter, direkt in die Messzone, eingebaut.

3.1.3 IC-Chip FCC22

Das FCC22 ist ein Kalorimeter basierend auf dem Wärmeflussprinzip. Aufgebaut ist dieses Miniaturkalorimeter auf der Silicium-Chip-Technologie mit integrierten Schaltkreisen (IC).

In Lerchner et al. (2008a) wird das verwendete Kalorimeter ausführlich beschrieben. Nachfolgend werden nur spezifische Details und das Messprogramm vorgestellt.

Das Kammervolumen bei der verwendeten experimentellen Anordnung beträgt 24 µl (Höhe 1.2 mm). Bezogen auf die vier Thermosäulen ergibt sich ein Reaktionsvolumen pro Thermosäule von 6 µl. Die Abbildung 8 zeigt das Kalorimeter und die Messzelle.

Der Ablauf eines kalorimetrischen Experimentes mit dem Chip-Kalorimeter erfolgt entsprechend der schematischen Messkurve in Abbildung 9. Es wird ca. 1 ml Probe für die Messung benötigt. Je nach Anforderung wurde diese Probe mit zusätzlichem Substrat versetzt. Mit Hilfe einer Membranpumpe wird damit die Probenschleife befüllt. Anschließend pumpt eine Kolbenpumpe die Probe in die Kammer (Phase II). Nach einer definierten Wartezeit (Phase III) wird die Probe mit Hilfe der Kolbenpumpe aus der Kammer befördert und gegen die Referenzlösung (Minimalmedium s.u.) ersetzt (Phase IV).

Es folgt die Bestimmung der Wärmeleistung der Probe anhand der Spannungsdifferenz zwischen der Thermospannung für die Referenzlösung und der Probe und unter Verwendung der Sensitivität (E in V/W) für die einzelnen Thermosäulen.

$$\dot{q} = \frac{\Delta U}{E} \quad (23)$$

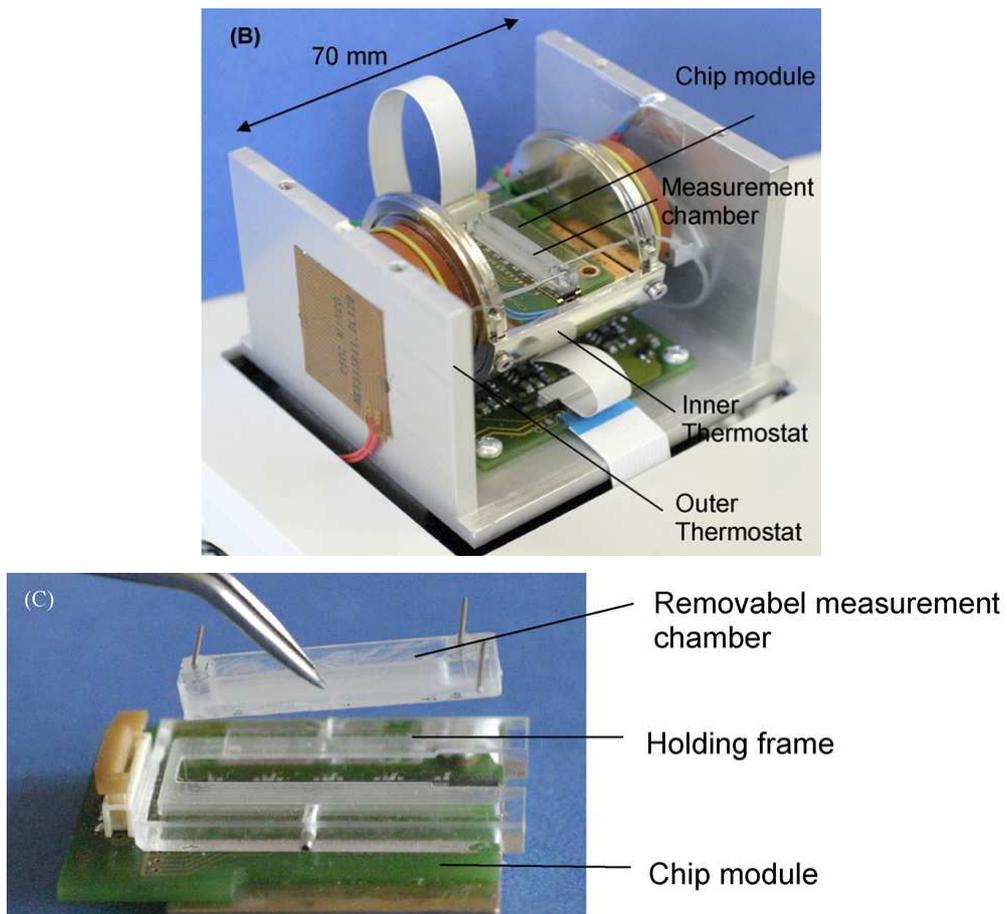


Abbildung 8: Chip-Kalorimeter (Lerchner et al. 2008a), B) Thermostat System, C) Messzelle.

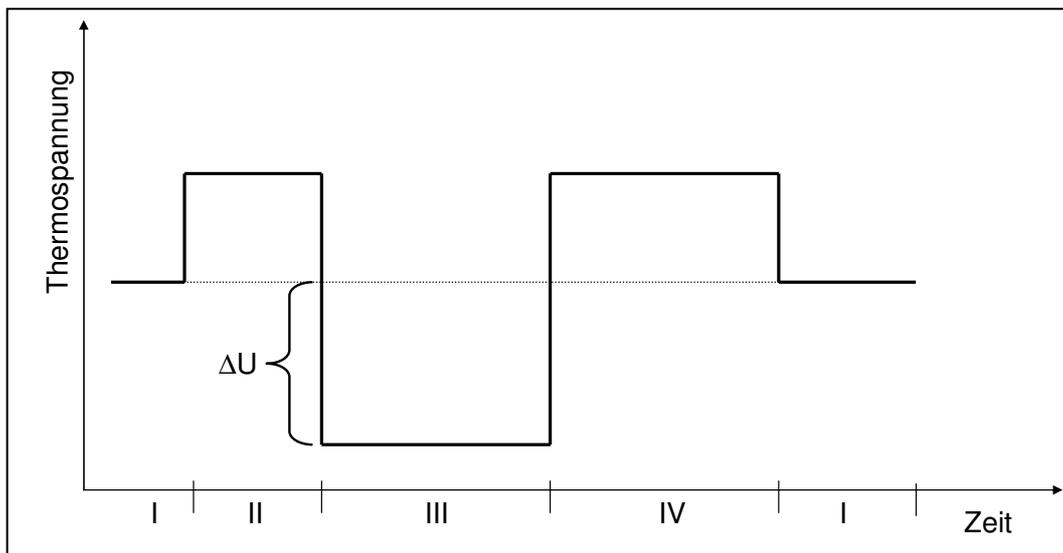


Abbildung 9: Messprogramm mit dem Chip-Kalorimeter anhand einer schematischen Messkurve, I Probenvorbereitung/Basislinie, II Kammerbefüllung, III Messphase, IV Kammerentleerung.

3.2 Mikrobielle Kultivierung

3.2.1 *Pseudomonas putida* DSM 12753

Der Mikroorganismus *Pseudomonas putida* DSM 12753 (DSMZ 2009) ist ein Gram-negatives Bakterium. *P. putida* ist in der Lage verschiedene im Allgemeinen für Mikroorganismen toxische Stoffe wie Phenol oder Benzoesäure zu verstoffwechseln (Wang et al. 1996, Rodrigues et al. 2005).

Die Lagerung von *P. putida* erfolgte auf Agar-Agar-Minimalmediumplatten mit Natriumbenzoat als Wachstumssubstrat bei 4 °C.

3.2.2 Belebtschlamm

Es wurden zwei Proben aus dem Belebungsbecken der Abwasseraufbereitungsanlage „Kläranlage Hohentanne“ des Abwasserzweckverbandes „Muldentale“ entnommen.

Probe 1: Belebungsbecken 1, 16.09.2009, 9:00, 200 ml in 250 ml Schottflasche

Probe 2: Belebungsbecken 2, 29.09.2009, 9:15 Uhr, 200 ml in 250 ml Schottflasche und
50 ml in 250 ml Schottflasche

3.2.3 Kulturansatz

Für die Kultivierung von *P. putida* diente der Kulturansatz nach Dorn et al. (1974). Zur Herstellung des Kulturmediums (Minimalmedium) wurde wie folgt vorgegangen.

Das **Minimalmedium** setzt sich aus

875 ml	Wasser
100 ml	Phosphatpuffer-Stammlösung
20 ml	Salzlösung
5 ml	1 mol l ⁻¹ Substratlösung

zusammen.

Für die Herstellung von **1 Liter Phosphatpuffer**-Stammlösung werden verwendet:

55.83 g Na₂HPO₄

20 g KH_2PO_4

Für die Herstellung von **0.5 Liter Salzlösung** werden verwendet:

25 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5.0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.25 g Ammoniumeisen(III)-citrat

25 ml SL-6-Lösung

25 ml $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -Lösung

Für die Herstellung von **1 Liter Spurenelement-Lösung** (SL-6-Lösung) nach der Vorgabe der DSMZ werden verwendet:

0.3 g H_3BO_3

0.2 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.03 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0.03 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.02 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.01 g $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Die SL-6-Lösung wird gekühlt aufbewahrt.

Wasser, Phosphatpuffer-Stammlösung und Salzlösung werden mit Wasserdampf bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 Minuten sterilisiert. Die Substratlösungen wurden durch einen Sterilfilter $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ filtriert. Anschließend wurden nach obiger Rezeptur die Lösungen steril vereinigt.

Für die Herstellung von Festmedium (Agar-Agar-Platten) wurde dem Wasser 15 g Agar-Agar pro Liter Gesamtansatz zugesetzt. Nach dem Autoklavieren wurde, vor dem vollständigen Erkalten und damit Erstarren des Ansatzes, das Festmedium steril in PP-Platten gegossen.

3.2.4 Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte in verschließbaren Erlenmeyerkolben aus Glas mit Schikanen. Um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden wurde mit einer Flüssigkeitsfüllung von 10 % gearbeitet. Für Vorkulturen wurden 250 ml Kolben verwendet. Die Kolben wurden mit sterilem Minimalmedium befüllt, mit Substrat versetzt und von einer Festmediumplatte

angepflegt. Die Kolben wurden in einen Schüttler bei 130 rpm und 25°C für 24 Stunden verbracht. Von dieser Schüttelkultur wurde wiederum ein neuer Kolben angeimpft. Dieser zweite Kolben dient dann als Startkultur für die mikrobiologischen Untersuchungen sowohl im Kalorimeter als auch in größeren Kolben.

Die kontinuierliche Kultivierung erfolgte ausschließlich im kleinen Bioreaktor, der unter Kapitel 3.1.2 (Seite 27) näher beschrieben wurde. Ausgehend von einer Batch-Kultur am Ende des Wachstums wurde der Zufluss von frischem Nährmedium gestartet. Der Zufluss erfolgte mit 10 ml/h mit dem Minimalmedium (siehe Kapitel 3.2.3).

3.3 Mikrobielle Methoden

3.3.1 Bestimmung der Optischen Dichte

Die Optische Dichte (OD) wurde standardmäßig mit dem UV/VIS-Spektrometer UNICAM 8625 gemessen. Dabei wurde die Wellenlänge 546 nm (OD_{546nm}) und 4 ml Einwegküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm der Firma Plastibrand verwendet.

Für einen schnellen Übersichtsscan der Optischen Dichte wurde das Photometer Cary 50 Bio der Firma Varian Inc. (Palo Alto, Kalifornien, USA) eingesetzt.

Für die kontinuierliche Aufzeichnung am Bioreaktor stand ein KNAUER Variable Wavelength Monitor mit einer Durchflusszelle mit 10 mm Schichtdicke zur Verfügung.

3.3.2 Bestimmung der Biomassekonzentration

Zur Bestimmung der Biomassekonzentration wurde eine definierte Flüssigkeitsmenge abgenommen, zentrifugiert, gewaschen, das Zellpellet getrocknet (24 h, 110 °C) und ausgewogen. Zur Berechnung der Biomassekonzentration wurde die Zelltrockenmasse auf das eingesetzte Probenvolumen bezogen.

Für die Zentrifugation sind die Zentrifugen Eppendorf ‚Centrifuge 5804 R‘ und ‚5415 D‘ mit den dazugehörigen Zentrifugationsröhrchen bzw. Reaktionsgefäßen verwendet worden.

3.3.3 Bestimmung der Lebendkeimzahl (cfu)

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl / colony forming units (cfu) wurden 100 µl der mikrobiellen Probe zu 900 µl sterilem Phosphatpuffer (Konzentration: 1/10 der obigen Stammlösung) in ein ebenfalls steriles Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Nach dem

Vermischen unter Verwendung eines Intensivrührers wurden 100 µl abgenommen und in 900 µl Phosphatpuffer in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Die Verdünnungsschritte wurden solange ausgeführt bis sechs Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:10⁶ erreicht wurden.

Es wurden anschließend die Verdünnungen 5 und 6 (jeweils als Doppelbestimmung) auf Agar-Agar-Platten (Natriumbenzoat als Substrat) aufgetragen (50 µl). Die Anzahl der Kolonien der Verdünnungsstufe 6 multipliziert mit 2·10⁷ ergibt die cfu pro ml (2·10⁶ für die Verdünnungsstufe 5).

3.3.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Im Rahmen der Arbeit wurde die Aktivität des Enzyms Catechol-2,3-Dioxygenase nach der Methode von Feist und Hegeman (1969) untersucht. Dazu erfolgte im ersten Schritt ein Aufschluss der Mikroorganismen. Dafür wurden 2 ml mikrobieller Probe abzentrifugiert (2 ml Eppendorfreaktionsgefäß, Zentrifuge 10 Minuten bei 16200 g) und mit Phosphatpuffer (Konzentration: 1/10 der obigen Stammlösung) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 300 µl Phosphatpuffer aufgenommen, mit 300 mg Zirkonia/Glas-Kügelchen (0.1 mm Biospec Products, 11079101z) versetzt und für 10 Minuten bei 30 Hz unter Verwendung einer Schwingmühle (MM 200 von Retsch, Düsseldorf, Deutschland) aufgeschlossen und erneut zentrifugiert. Der Aufschluss, das anschließende Zentrifugieren und das Lagern des Überstandes erfolgten bei 4 °C.

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte photometrisch bei 375 nm (Cary 50 Bio). Dazu wurde folgender Ansatz verwendet: 850 µl destilliertes Wasser, 25 µl 1 mol/l Tris-Puffer, 15 µl 1 mol/l Catechol-Lösung und 10 µl des Überstandes. Nach Zugabe des Überstandes startet die Messung. Als Aktivitätsgröße dient die lineare Extinktionsänderung pro Zeit bei 375 nm.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Erarbeitung des Mess- und Auswerteregimes

Für die Diskussion der Ergebnisse bedarf es einer einführenden Darstellung der Auswertung der unterschiedlichen kalorimetrischen Messkurven. Dies beinhaltet die Ermittlung eines geeigneten Zeitpunktes in einer kalorimetrischen Messkurve für die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität, die Erarbeitung des optimalen Probenvolumens, die Entschmierung der kalorimetrischen Messkurven der Kalorimeter TAM-4ml und TAM-20ml, und grundsätzliche Erläuterungen für die Detektion der mikrobiellen Aktivität.

Die erhaltenen kalorimetrischen Messkurven sind insbesondere bei den beiden Kalorimetern TAM-4ml und TAM-20ml zeitlich verfälscht (verschmiert). Für die summarische Auswertung (Wärme, Enthalpie) ist dies kein Problem, für die kinetische Auswertung ist es eine umso entscheidendere Fragestellung. Die Messdaten müssen, sollen diese für die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität herangezogen werden, mit Hilfe mathematischer Methoden auf die tatsächlichen Wärmeströme zurückgerechnet werden (Hemminger und Höhne 1980). Ein einfaches Modell für die Entschmierung von kalorimetrischen Daten ist die Tian-Gleichung (24). Mit dieser Gleichung ist es möglich aus konstanten (erster Term) als auch zeitlich veränderlichen (zweiter Term) Temperaturdifferenzen die tatsächlichen Wärmeströme (\dot{q}_e) zu berechnen.

$$\dot{q}_e = \frac{\Delta T}{R_{Th}} + c_p \cdot \frac{d\Delta T}{dt} \quad \text{mit} \quad R_{Th} = \frac{\tau}{c_p} \quad (24)$$

Für die vorliegenden kalorimetrischen Daten (\dot{q}_m) vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$P = \dot{q}_e = \dot{q}_m + \tau \cdot \frac{d\dot{q}_m}{dt} \quad (25)$$

Damit ist nur noch die Zeitkonstante τ der zu bestimmende Geräteparameter. Dieser wird bei der Auswertung eines Kalibrierungsexperimentes erhalten (siehe dazu im Anhang, Seite 139).

4.1.1 TAM-20ml

Für die kinetische Auswertung der Messdaten bezüglich der Startwärmeleistung ist eine Entschmierung notwendig. Diese wird entsprechend Kapitel 4.1 durchgeführt. Durch die

relativ lange Zeit für die Temperierung (bis zu 7 Stunden) ist ein definierter Ausgangszustand der Kultur für die Stressuntersuchungen notwendig. Dafür wird eine erste Substratzugabe durchgeführt und damit eine erste Wachstumsphase als Ausgangspunkt geschaffen. Als Indikation für eine erfolgreiche Messung dient sowohl die insgesamt ausgetauschte Wärme als auch der Verlauf der Wärmeleistung.

Die anfängliche Wärmeleistung, die nach der zweiten Zugabe des Substrates aufgezeichnet wird, ist die Startwärmeleistung P_0 für die Kultivierung im TAM-20ml.

Bei dem Kalorimeter TAM-20ml sind die kontinuierliche Rührung und Sauerstoffversorgung von Vorteil. Weiterhin erfolgt keine externe Kultivierung, sondern die Kultivierung wird innerhalb der Kalorimeterzelle durchgeführt und bedarf damit auch nicht einer störenden Probenahme und Überführung in das Kalorimeter.

Der Nachteil des TAM-20ml ist die maximale Wärmeleistungsaufzeichnung von 3 mW. D. h. hohe mikrobielle Aktivitäten durch hohe Substratanfangskonzentrationen können nicht aufgezeichnet werden. Folglich wurde bei den Versuchen nur mit Zugaben von 5 μmol (entspricht 0.33 mmol/l) Substrat z. B. Natriumbenzoat gearbeitet.

4.1.2 TAM-4ml

Die Bestimmung der Wachstumskurve erfolgt punktuell in definierten Zeitabständen an Proben aus einer externen Kultivierung z. B. einer Schüttelkultur. Eine interne Kultivierung ist durch fehlende kontinuierliche Sauerstoffversorgung in die Flüssigphase und fehlender Rührung auf Dauer nicht möglich. Die Verwendung des Kalorimeter TAM-4ml ermöglicht eine schnelle Anpassung an verschiedene mikrobielle Aktivitäten. Bei zu hohen Aktivitäten während des mikrobiellen Wachstums, erkennbar an einem konstanten und damit limitierten Wärmeleistungssignal (siehe Kapitel 4.2.1), kann für die folgende Messung eine Verdünnung hergestellt werden. Aus dem unlimitierten Wärmeleistungssignal kann mit dem Verdünnungsfaktor die Wärmeleistung der originalen Probe berechnet werden.

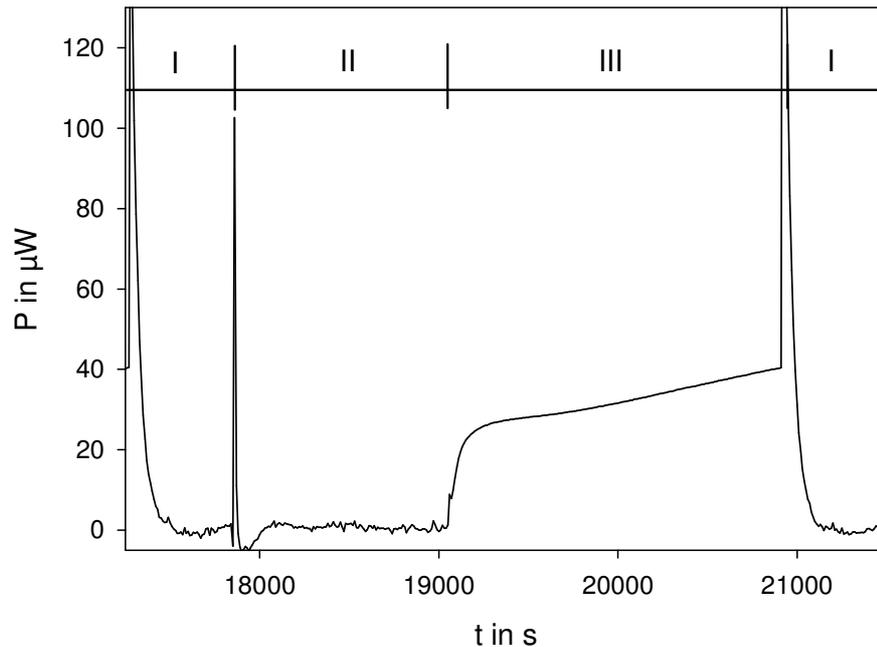


Abbildung 10: Einzelmessung mit dem Kalorimeter TAM-4ml, 100 µl mikrobiologische Probe, 900 µl Minimalmedium mit 5 mmol/l Natriumbenzoat, I Probenpräparation und -einbau, II Temperierphase, III Messphase.

In der Abbildung 10 ist eine exemplarische Messkurve mit dem TAM-4ml aufgezeigt. Im Gegensatz zu der schematischen Messkurve in Abbildung 5 sind experimentelle Gesichtspunkte hinzugekommen. Sowohl beim Einsetzen der Kalorimeterzelle als auch beim Absenken in die Messzone kommt es zu großen thermischen Effekten. Diese müssen bei der Bestimmung der Wärmeleistung beachtet werden. Erst nach dem Abklingen dieser thermischen Effekte kann die eigentliche Wärmeleistung der Probe bestimmt werden.

Durch die Entschmierung der gemessenen thermischen Daten erhält man die unverfälschte Wärmeleistung. Die dazugehörige Kurve (rot) ist zusammen mit den originalen Daten (schwarz) in der Abbildung 11 dargestellt. Hierbei erkennt man, dass insbesondere der Effekt durch das Herablassen der Ampulle in die Messzone störend auftritt. Eine Bestimmung der Wärmeleistung in diesem Zeitfenster ist wegen der sprunghaften Änderung der Wärmeleistung nicht möglich.

Eine Bestimmung der Wärmeleistung ist erst nach einem definierten Zeitpunkt möglich. Nach drei Minuten ist jegliche thermische Störung abgeklungen und dann kann der Wert (senkrechte grüne Linie in der Abbildung 11) abgelesen und für weitere Interpretationen verwendet werden.

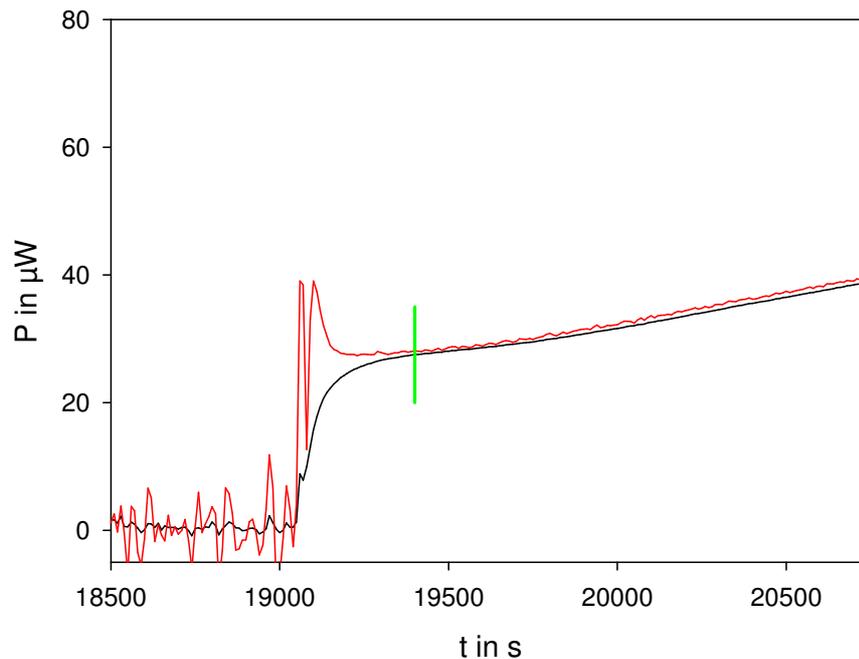


Abbildung 11: Einzelmessung mit dem Kalorimeter TAM-4ml, 100 µl mikrobiologische Probe 900 µl Minimalmedium mit 5 mmol/l Natriumbenzoat, schwarz – Originaldaten, rot – entschniarte Daten, grün – Zeitpunkt zur Erfassung der Wärmeleistung der Probe.

Die Differenz zwischen diesem Wert und dem Wärmeleistungswert, der ohne mikrobielle Probe (Minimalmedium, Blank) bestimmt wurde, wird im Folgenden als Wärmeleistung P im TAM-4ml bezeichnet.

Im Rahmen der Blankmessung erfolgte die elektrische Kalibrierung und damit die Bestimmung der Zeitkonstante τ des Systems.

Bezüglich der Problematik der optimalen Probenmenge sei auf das Kapitel 4.2.1 verwiesen.

4.1.3 Chip-Kalorimeter

Die Bestimmung der Wachstumskurve beim Chip-Kalorimeter erfolgt punktuell an einer ausgesprochen kleinen Probe. Diese Probe stammt aus einer externen Kultivierung wie z. B. einer Schüttelkultur.

Durch die fehlende Gasphase in der Messkammer des Chip-Kalorimeters kommt es bei hohen aeroben Stoffumsätzen während der Messung zu einer Verarmung an Sauerstoff, welches bei der Auswertung zu beachten ist. Die Sauerstoffverarmung verursacht während der Beobachtungszeit ein abnehmendes Signal. Bei hoher mikrobieller Aktivität (grüne Kurve, Abbildung 12) durchläuft das Messsignal somit ein Minimum, während bei geringer mikrobieller Aktivität ein nahezu konstantes Signal (schwarze Kurve) erhalten wird.

Bei Lerchner et al. (2008a) kann ausführlich zu diesem Sachverhalt nachgelesen werden.

Die Bestimmung der Wärmeleistung als Maß für die mikrobielle Aktivität erfolgt als Differenz zwischen dem Mittelwert aus den Basislinien vor und nach der Messung und dem Minimum innerhalb der aktiven Messung (Probe in Messkammer).

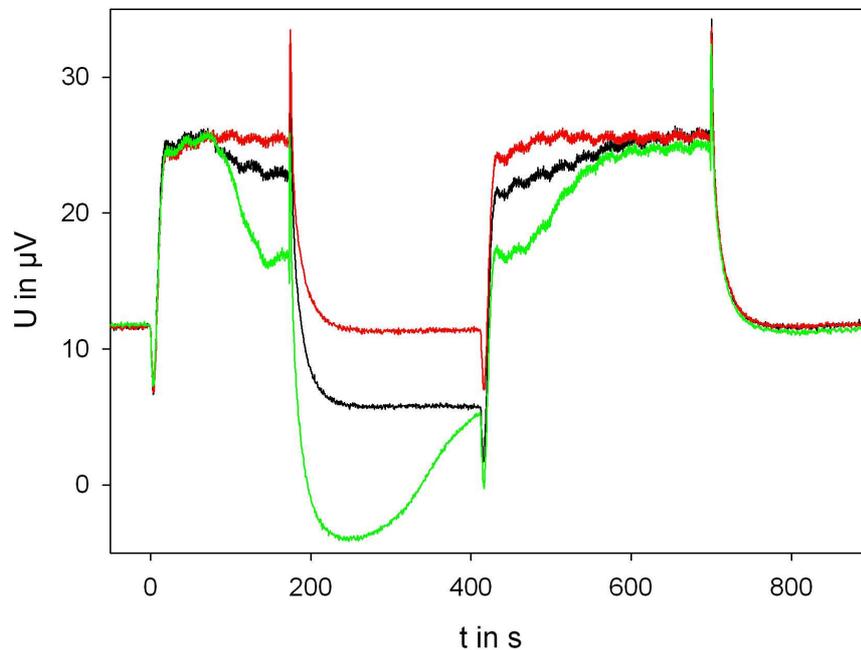


Abbildung 12: Messsignale des Chip-Kalorimeters bei verschiedenen Proben, rot – steriles Minimalmedium, schwarz – mittlere mikrobielle Aktivität, grün – hohe mikrobielle Aktivität.

4.1.4 Micro-DSC II

Die MDSC kann mit der Ampullentechnik und als Durchflusskalorimeter eingesetzt werden. Die Auswertung der Messdaten mit der Ampullentechnik erfolgt analog dem Kalorimeter TAM-4ml (Kapitel 4.2.2, Seite 43).

Die Verwendung der MDSC als Durchflusskalorimeter erfolgte in Kombination mit einem kleinen Bioreaktor. Findet die MDSC als Durchflusskalorimeter Verwendung muss das thermische Volumen der Anordnung bestimmt werden. Das thermische Volumen ist essentiell für die quantitative Auswertung. Diesbezüglich sind Hinweise in der Literatur (O'Neill et al. 2004) zu finden. Das durchflussabhängige thermische Volumen nimmt mit steigender Durchflussgeschwindigkeit ($v_{th} = 706 \mu\text{l} - 13.8 \mu\text{l h/ml} \cdot v_D$) ab (Abbildung 13).

Je höher das thermische Volumen ist, desto größer ist das entsprechende Wärmesignal des mikrobiellen Stoffwechsels. Eine niedrige Durchflussrate und dadurch bedingt ein höheres thermisches Volumen würde dem gerecht werden, aber das System träge machen. D. h. die

Messwerte würden deutlich verschmiert (verfälscht) werden. Aus diesen Überlegungen heraus wurde als Kompromiss eine Durchflussrate v_D von 10 ml/h für die Untersuchungen gewählt.

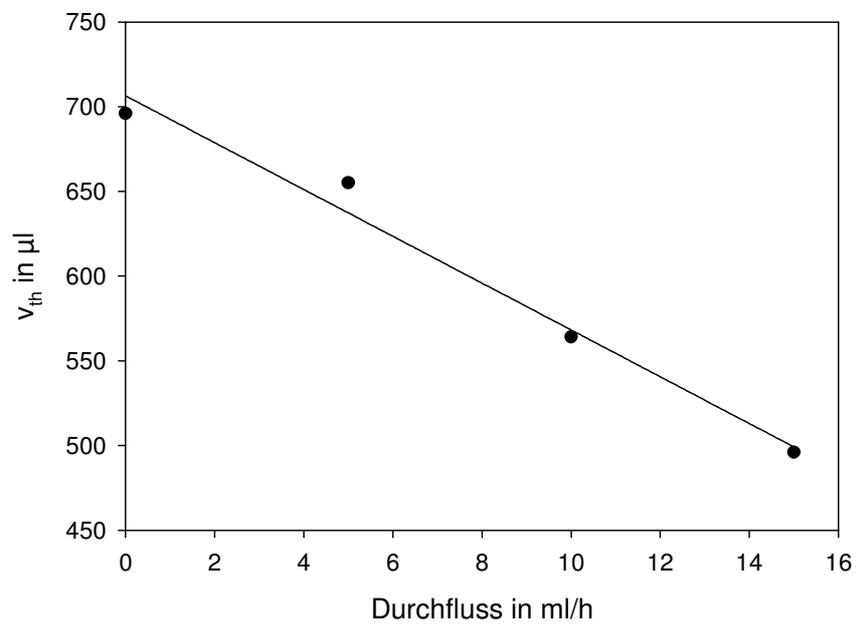


Abbildung 13: Abhängigkeit des thermischen Volumens v_{th} von der Durchflussgeschwindigkeit.

4.2 Abhängigkeit der Wärmeleistung von der Biomassekonzentration

Ziel war es den direkt proportionalen Zusammenhang zwischen Biomassekonzentration und Wärmeleistung zu zeigen. Dafür bietet sich die Verwendung einer kontinuierlichen Kultivierung an, um Änderungen der mikrobiellen Aktivität, durch mikrobielle Anpassung auf Grund von Substratverarmung, Wachstum oder anderen Stressarten die mit einer Batch-Kultur zusammenhängen, auszuschließen

Bei der Verwendung einer chemostatischen Kultur (5 mmol/l Natriumbenzoat im Zufluss, $F = 10 \text{ ml/h}$, $v_{\text{ges}} = 50 \text{ ml}$, $c_{\text{Bio}} = 0.34 \text{ g/l}$) kann im Abfluss auf eine konstante mikrobielle Aktivität zurückgegriffen werden.

4.2.1 TAM-4ml

Bei diesen Untersuchungen setzt sich der Probenansatz (1 ml) aus der mikrobiellen Probe und dem Minimalmedium mit Natriumbenzoat (Konzentration in dem Probenansatz: 5 mmol/l) zusammen.

Abbildung 14 zeigt den zeitlichen Verlauf der Wärmeleistungsentwicklung bei verschiedenen Biomassekonzentrationen. Die unterschiedlichen Biomassekonzentrationen werden durch Variation der mikrobiellen Volumina im Probenansatz realisiert. Eine Steigerung der mikrobiellen Volumenkonzentration in der Messprobe von 25 auf 250 $\mu\text{l/ml}$ (Volumenkonzentration c_{Mik}) führt zu einer Erhöhung der Startwärmeleistung. Weiterhin wird erwartungsgemäß durch das mikrobielle Wachstum ein Anstieg der thermischen Leistung mit der Zeit bewirkt. Dieser Anstieg ist umso stärker je höher die Biomassekonzentration ist. Der Anstieg erfolgt bis zur Verarmung eines Substrates. Sauerstoff ist hier das limitierende Substrat, da das Wachstumssubstrat Natriumbenzoat in einer ausreichend großen Konzentration vorlag. Ohne eine zusätzliche Sauerstoffversorgung und ohne Rührung stellt sich im Anschluss ein konstanter Wärmeleistungswert (grün, blau) ein, der von der Sauerstoffdiffusion von der Gasphase der kalorimetrischen Messzelle in die Flüssigphase abhängt. Je größer die Biomassekonzentration ist, desto früher wird auch der konstante Wert erreicht. Bei niedriger Konzentration kann im Zeitraum der Messung das Ende des ersten thermischen Effektes nicht beobachtet werden.

Bei hoher Konzentration (über 250 μl am Gesamtvolumen, dunkelblau und violett in Abbildung 14) stellt sich nur noch ein konstanter Wärmeleistungswert ein, der nahezu

unabhängig von der Biomassekonzentration ist. Da dieser Zustand kein gut definierter Zustand ist, ist es für die Messungen mit dieser Methode essentiell dies durch Verdünnen der Probe zu vermeiden.

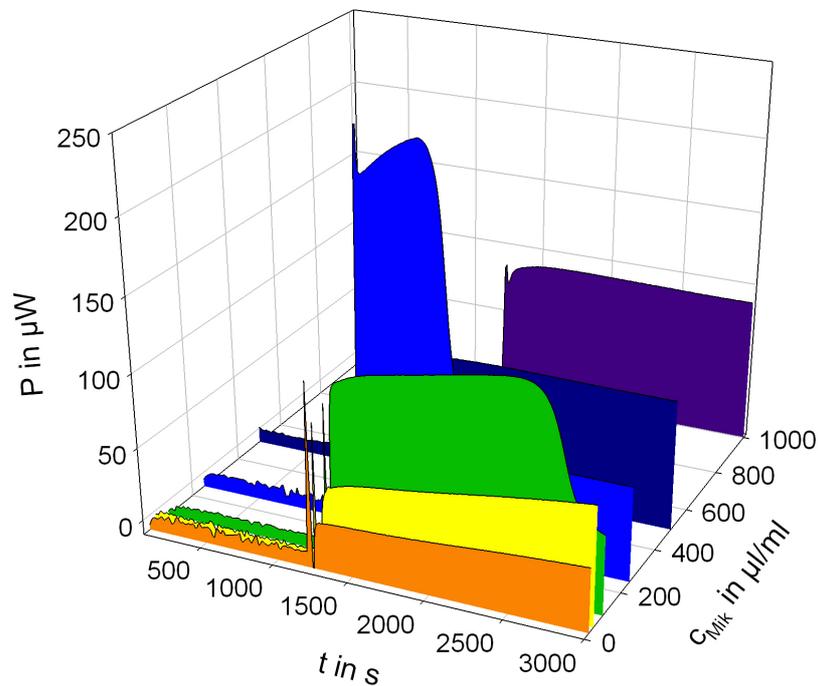


Abbildung 14: Zeitliche Wärmeleistungsentwicklung bei Variation der Biomassekonzentration ($c_{\text{Mik}} = 25, 50, 100, 250, 500$ und 1000 $\mu\text{l/ml}$).

Die Abbildung 15 zeigt deutlich den linearen Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Konzentration und der Wärmeleistung im nicht durch Sauerstoff limitierten Bereich:

$$P = 0.92 \mu\text{W ml}/\mu\text{l} \cdot c_{\text{Mik}} + 4.7 \mu\text{W}.$$

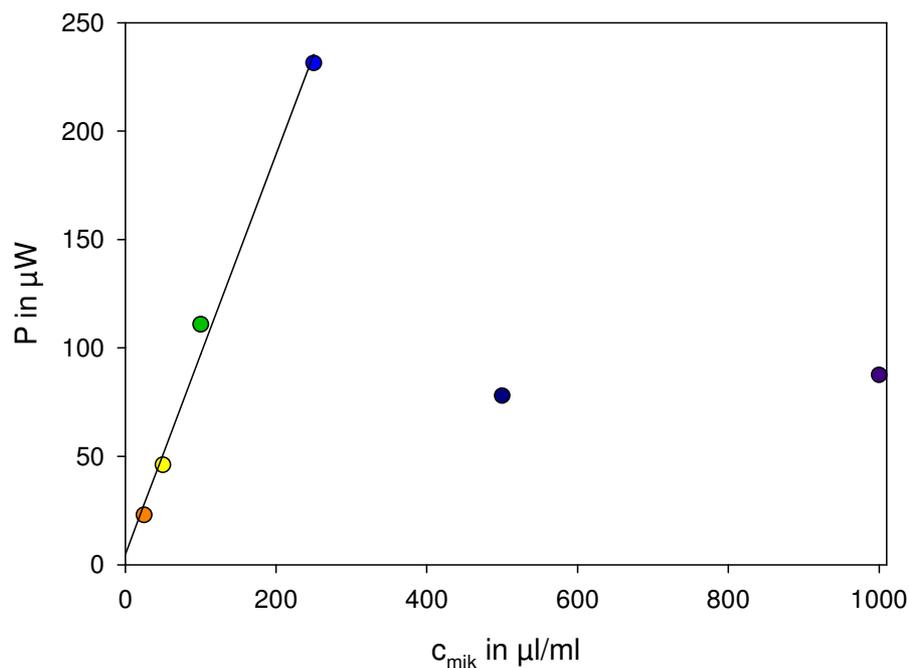


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen der Wärmeleistung und der Biomassekonzentration.

Dieser Zusammenhang kann nur im unlimitierten Bereich festgestellt werden. Höhere Biomassekonzentrationen sind deshalb nicht ohne Verdünnung mit dieser experimentellen Anordnung detektierbar.

4.2.2 Micro-DSC II

Für die Auswertung der Messungen mit der MDSC bei der Verwendung der Ampullentechnik gilt analoges wie für das TAM-4ml. Die MDSC bietet jedoch nicht wie das TAM eine Zwischenstufe für die Temperierung, sodass die Ampulle direkt in das Kalorimeter eingebracht wird (Zeitpunkt $t = 0$) und somit zu Beginn eine konstante große Wärmeleistung (45 mW, Detektionslimit) gemessen wird.

Ohne Stoffwechselleistung (orange Kurve) geht das Messsignal nach der Temperierung auf Basislinienniveau zurück. Bei Zugabe von Mikroorganismen wurde eine erhöhte thermische Leistung nach dem Temperiereffekt detektiert. Der weitere Verlauf der thermischen Leistung der einzelnen Messungen wird auch in diesem Kalorimeter vom Sauerstoff limitiert. Diese Limitierung ist sehr deutlich in Abbildung 16 durch den schnellen Abfall des zweiten thermischen Effektes (erzeugt durch mikrobielle Stoffwechselfvorgänge) zu erkennen. Mit der Zunahme der Bakterienmenge nimmt die Wärmeleistung zu, damit verbunden steigt der Sauerstoffbedarf. Die begrenzte Sauerstoffmenge reicht dadurch nur noch für eine immer kürzere Zeit (violette Kurve) für den Metabolismus aus. Die Unterscheidung der Effekte durch Einbau und Metabolismus wird zunehmend kritischer. Damit ist die Auswertung der Wärmeleistung bei hoher Biomassekonzentration unsicher.

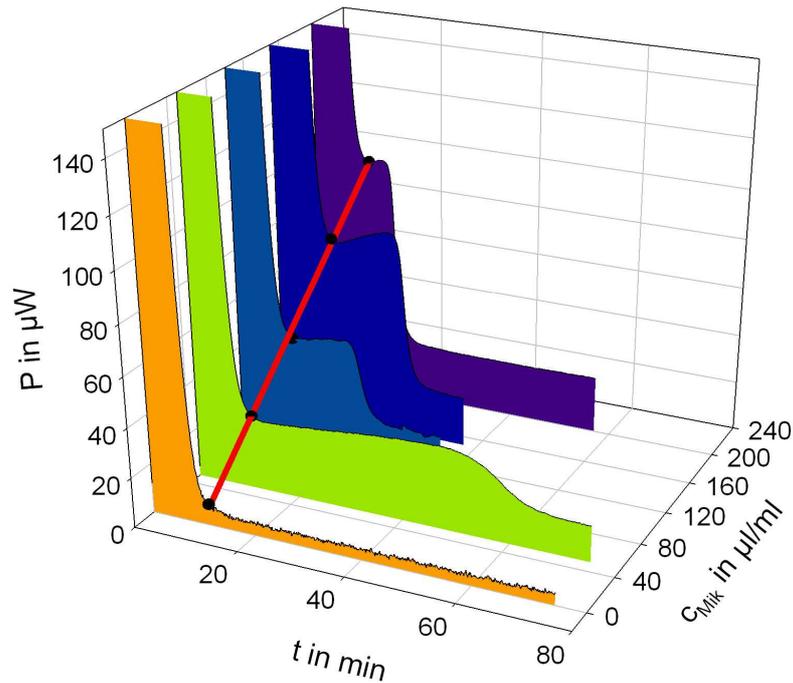


Abbildung 16: Zeitliche Wärmeleistungsentwicklung bei Variation des Volumens an mikrobieller Probe konstanter Aktivität ($c_{\text{Mik}} = 0, 50, 100, 150, 200 \mu\text{l/ml}$, 0.5 ml Gesamtvolumen, 5 mmol/l Natriumbenzoat), lineare Regression der Wärmeleistung bei 666 s (rote Linie).

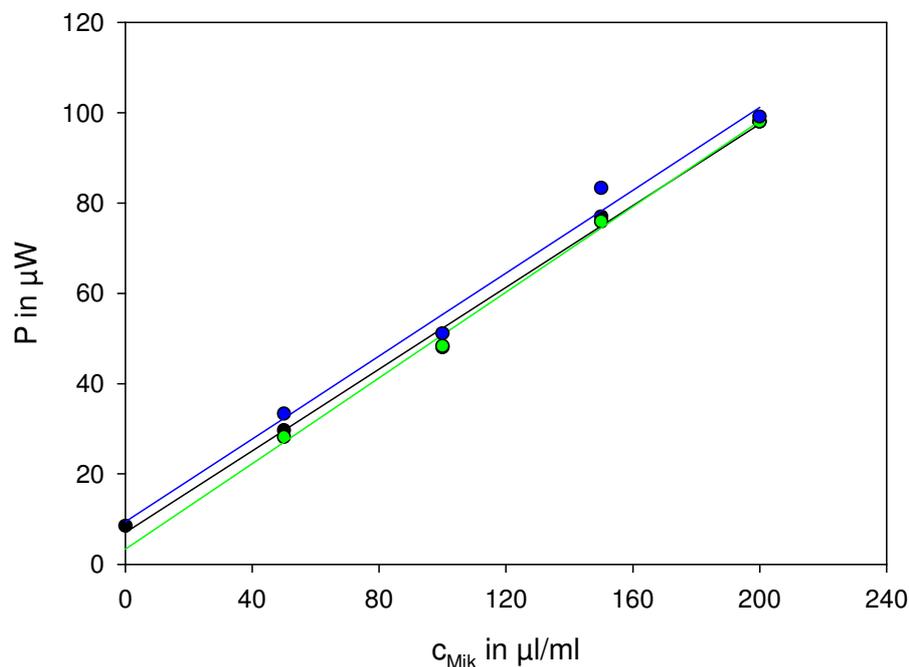


Abbildung 17: Zusammenhang zwischen der Wärmeleistung markanter Punkte der Messkurven (Abbildung 16) und der Konzentration der mikrobiellen Probe, schwarz – konstanter Zeitpunkt (666 Sekunden nach Einbringen der Kalorimeterzelle), grün – Minimum im ersten Wärmeeffekt, blau – Maximum des zweiten Wärmeeffektes.

Die Abbildung 17 zeigt, dass trotz der oben genannten Probleme ein linearer Zusammenhang zwischen der Biomassekonzentration und der Wärmeleistung besteht. Gleichzeitig sind in der Abbildung 17 die nahezu identischen Anstiege (Sensitivitäten, Tabelle 3) bei verschiedenen

Auswertestrategien (Wärmeleistung nach 666 Sekunden, das Minimum oder Maximum der thermischen Effekte) zu erkennen. Jedoch sollte für eine sichere und zügige Auswertung der gemeinsame Punkt bei 666 Sekunden bevorzugt werden.

Tabelle 3: Linearer Zusammenhang zwischen der Wärmeleistung und der Biomassekonzentration

Bestimmung der Wärmeleistung	Anstieg in $\mu\text{W ml}/\mu\text{l}$	Null-Wert in μW	Bestimmtheitsmaß r^2
Nach 666 Sekunden	1.810	6.98	0.9951
Am Minimum	1.897	3.3	0.9967
Am Maximum	1.836	9.4	0.9820

4.3 Wachstum von *Pseudomonas putida* auf Natriumbenzoat

Nach der Bestimmung der Wärmeleistung als Maß für die mikrobielle Aktivität einzelner Proben wird im folgenden Kapitel auf die mikrobielle Aktivität in den verschiedenen Wachstumsphasen eingegangen. Zu diesem Zweck wurden Batch-Wachstumskurven mit den vier vorgestellten Kalorimetern aufgezeichnet. Die Messung der Optischen Dichte dient hierbei als Vergleichsgröße.

4.3.1 Messungen der Optischen Dichte

Mit Hilfe der Optischen Dichte lässt sich das Wachstum von *P. putida* Batch-Kulturen verfolgen. Es erlaubt die qualitative Einschätzung der mikrobiellen Aktivität an Hand der zeitlichen Veränderung der Größe.

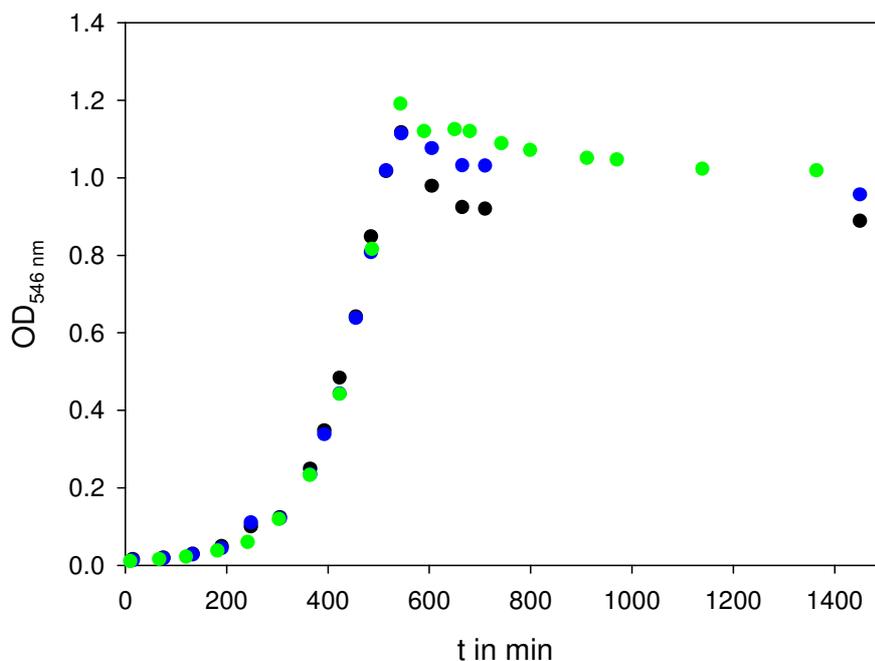


Abbildung 18: Dreifache Bestimmung der Wachstumskurve (Optische Dichte) von *P. putida* auf 5 mmol/l Natriumbenzoat an einer Schüttelkultur.

Die Abbildung 18 zeigt die dreifache Bestimmung des Wachstums von *P. putida* auf 5 mmol/l Natriumbenzoat durch Messung der Optischen Dichte bei 546 nm. Deutlich ist die gute Reproduzierbarkeit der exponentiellen Phase des Wachstums erkennbar. Der exponentielle Parameter des Anstieges ist: $\mu = 0.612 \pm 0.034 \text{ h}^{-1}$.

Die stationäre Phase zeigt eine größere Variationsbreite, wobei sich bei allen drei Messungen ein konstanter Wert mit leicht fallender Tendenz einstellt. Die Kulturen erreichen eine mittlere Optische Dichte von 1.0 ± 0.1 .

Im Rahmen der Untersuchungen des Wachstums wurden die Biomassekonzentration, der Ertragsfaktor und die Lebend-Keimzahl (cfu) in der stationären Phase der Wachstumskurve bestimmt.

$$C_{\text{Bio}} = 0.34 \pm 0.04 \text{ g/l}$$

$$Y_{\text{X/S,g}} = 0.55 \pm 0.053 \text{ g(Biomasse)/g(Benzoessäure)}$$

$$Y_{\text{X/S}} = 0.375 \pm 0.036 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Benzoessäure)}$$

$$\text{cfu} = (3.92 \pm 0.54) \cdot 10^8 \text{ Kolonien pro ml Kultur}$$

Eine über die exponentielle Phase hinausgehende mathematische Beschreibung der Wachstumskurve kann durch die in den Grundlagen genannten Modelle (Kapitel 2.4) erfolgen. Dabei wird insbesondere die Wachstumslimitierung (Übergang zu einer konstanten Biomassekonzentration) durch die Kohlenstoffquelle beachtet.

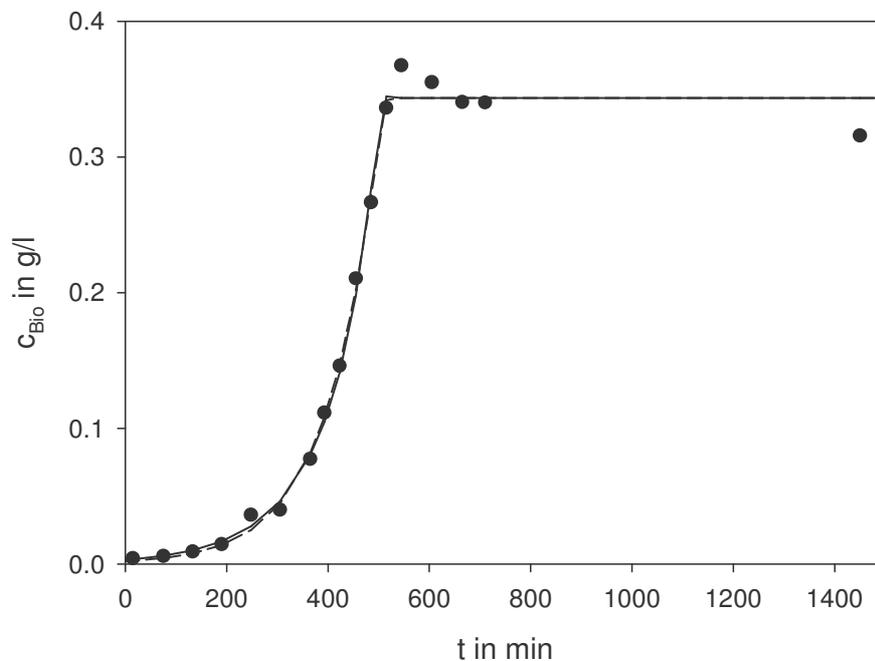


Abbildung 19: Mathematische Modellierung des Wachstums von *P. putida* auf Natriumbenzoat, Andrews-Modell – vollständige Linie, Monod-Modell – gestrichelte Linie.

Die Abbildung 19 zeigt das Ergebnis der mathematischen Modellierung (vollständige Linie) des mikrobiellen Wachstums von *P. putida* auf Natriumbenzoat. Exemplarisch wurde ein Datensatz (blaue Messpunkte) aus der Abbildung 18 ausgewählt. Es konnte dabei eine gute Beschreibung der exponentiellen Phase erreicht werden. Die kinetischen Parameter für die Beschreibung des mikrobiellen Wachstums, basierend auf den Mehrfachbestimmungen, sind:

$$\mu_{\text{max}} = 0.89 \pm 0.023 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 25.7 \pm 21 \text{ mg/l}$$

$$K_I = 1050 \pm 270 \text{ mg/l}$$

Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} ist bei der mathematischen Beschreibung durch die ausgeprägte exponentielle Phase der dominierende Parameter. Die beiden anderen Parameter zeichnen sich durch einen großen Fehler aus. Alle drei Parameter liegen in den in der Literatur üblichen Bereichen für *P. putida* und einem Wachstum auf aromatischen Verbindungen (Reardon et. al. 2000).

Reva et al. (2006) ermittelten für den *P. putida* KT2440 ein ungehemmtes Wachstum bis 45 mmol/l, also dem 9-fachen der in dieser Arbeit eingesetzten Konzentration. Im Gegensatz dazu berichten Loh und Chua (2002) für *P. putida* ATCC 49451 über eine Inhibierung schon ab 3 mmol/l. Für den hier verwendeten *P. putida* DSM 12735 ist eine Inhibierung möglicherweise erst bei höheren Konzentrationen zu finden. Daher können die Wachstumskurven mathematisch auch durch das einfachere Monod-Wachstumsmodell ohne Inhibierung beschrieben werden (Abbildung 19, gestrichelte Linie). Die mit dem Monod-Modell erhaltenen kinetischen Parameter für das Wachstum von *P. putida* auf Natriumbenzoat sind:

$$\mu_{\max} = 0.633 \pm 0.022 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 11.6 \pm 0.3 \text{ mg/l}$$

Der Vergleich beider Datensätze verdeutlicht, dass es möglich ist mit beiden Modellen das Wachstum zu beschreiben. Insbesondere die großen Unsicherheiten in der Sättigungskonstante K_S und der Inhibierungskonstante K_I (Andrews-Modell) sind bei der 2. Modellierung nicht mehr zu finden. Damit kann auch auf das Modell ohne Inhibierung zurückgegriffen werden.

4.3.2 Bilanzierung

Die elementare Zusammensetzung der Biomasse von *Pseudomonas putida* wird mit $CH_2O_{0.52}N_{0.23}$ angesetzt (Motzkus et al. 1993). Die für die Aufstellung der Reaktionsgleichungen benötigte Bildungsenthalpie berechnet sich nach der Regel von Thornton mit $-115 \text{ kJ / e}^- \text{ mol}$. Ausführlichere Berechnungen sind im Anhang angeführt. Für die Verwendung des Substrates Natriumbenzoat wird bei den Berechnungen auf Benzoesäure zurückgegriffen. Damit ergeben sich folgende Reaktionsgleichungen:

Katabolismus:



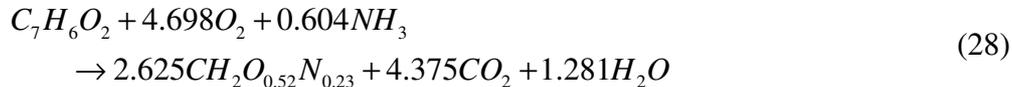
$$\Delta_R H_{Kat} = -3223 \text{ kJ / mol}$$

Anabolismus:



$$\Delta_R H_{Ana} = 248 \text{ kJ / mol}$$

Für den oben ermittelten Ertragsfaktor $Y_{X/S}$ ergibt sich die Gesamtreaktionsgleichung:



Die Reaktionsenthalpie der Reaktionsgleichung (28) berechnet sich nach Gleichung (6) zu:

$$\Delta_R H = -1920 \pm 120 \text{ kJ / mol} .$$

4.3.3 Kalorimetrische Messungen

4.3.3.1 TAM-20ml

Die Abbildung 20 zeigt eine kalorimetrisch aufgenommene Wachstumskurve. Die Messgröße Wärmeleistung ist schwarz dargestellt. Nach dem Einstellen des thermischen Gleichgewichtes (nach 6 Stunden) erfolgt die Substratzugabe. Es ist ein kleiner Sprung in der Wärmeleistung als Antwort auf die Substratzugabe zu erkennen. Anschließend steigt die Wärmeleistung an. Der linke Pfeil kennzeichnet den Wendepunkt in der Wärmeleistung. Nach ca. 6.75 h setzt das exponentielle Wachstum der Kultur ein. Nach dem Maximum (rechter Pfeil) fällt die Wärmeleistung zügig auf die Basislinie ab.

Für die Berechnung der Wärmekurve erfolgt eine lineare Basislinienkorrektur der Wärmeleistung (rote Kurve). Die Wärmekurve (grün) weist ebenso die exponentielle Wachstumsphase aus, die nach ca. 4 Stunden in einen konstanten Wert mündet. Ein Vergleich mit den Wachstumskurven aus den Messungen der Optischen Dichte (Abbildung 18) zeigt, dass die beiden summarischen Signale, die Wärme und die Optische Dichte, in ihrem zeitlichen Verlauf analog sind.

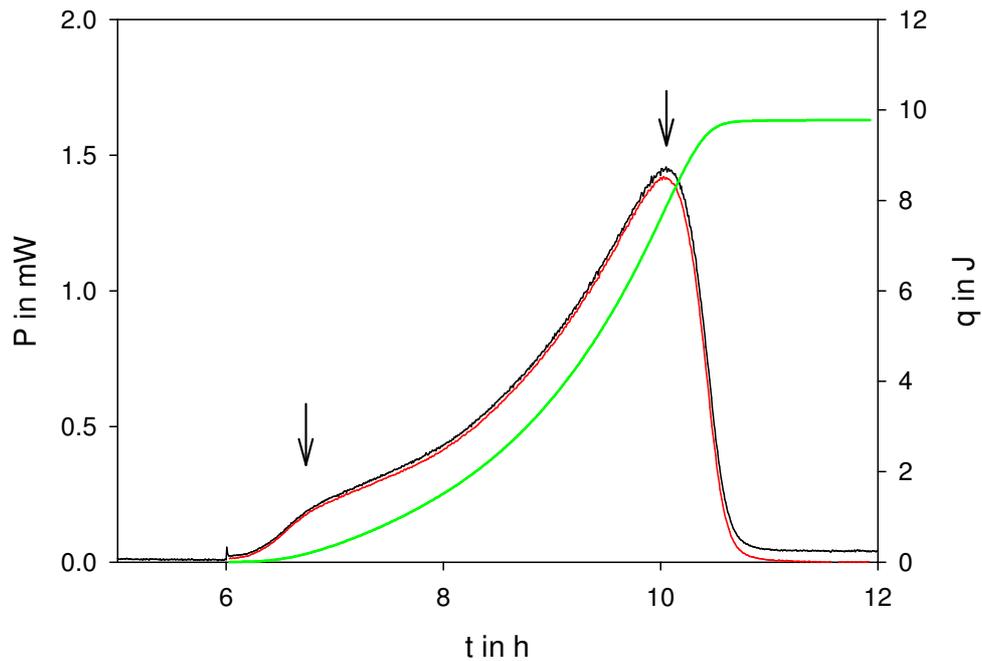


Abbildung 20: Kalorimetrisch (TAM-20ml) aufgenommene Wachstumskurve von *P. putida* auf Natriumbenzoat (0.33 mmol/l), schwarz – Wärmeleistung, rot – korrigierte Wärmeleistung, grün – Wärme, Pfeile kennzeichnen markante Punkte.

Aus der insgesamt ausgetauschten Wärme von 9.78 J lässt sich eine Reaktionsenthalpie pro mol Natriumbenzoat/Benzoesäure von:

$$\Delta_R H = -1955 \text{ kJ / mol}$$

errechnen. Daraus können dann die Ertragsfaktoren nach Gleichung (7) berechnet werden.

$$Y_{X/S} = 0.36 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Benzoesäure)}$$

$$Y_{X/S,g} = 0.53 \text{ g(Biomasse)/g(Benzoesäure)}$$

Diese Werte stimmen sehr gut mit dem Werten aus den Wachstumsexperimenten im Schüttelkolben überein (Kapitel 4.3.1, Seite 46).

Damit ergibt sich eine Reaktionsgleichung für die Bildung der Biomasse zu:

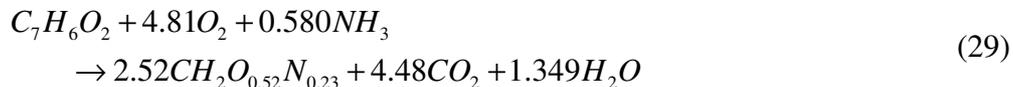


Abbildung 21 zeigt die gute Reproduzierbarkeit der kalorimetrischen Wachstumskurve in allen Phasen des mikrobiellen Wachstums für drei Batch-Kultivierungen.

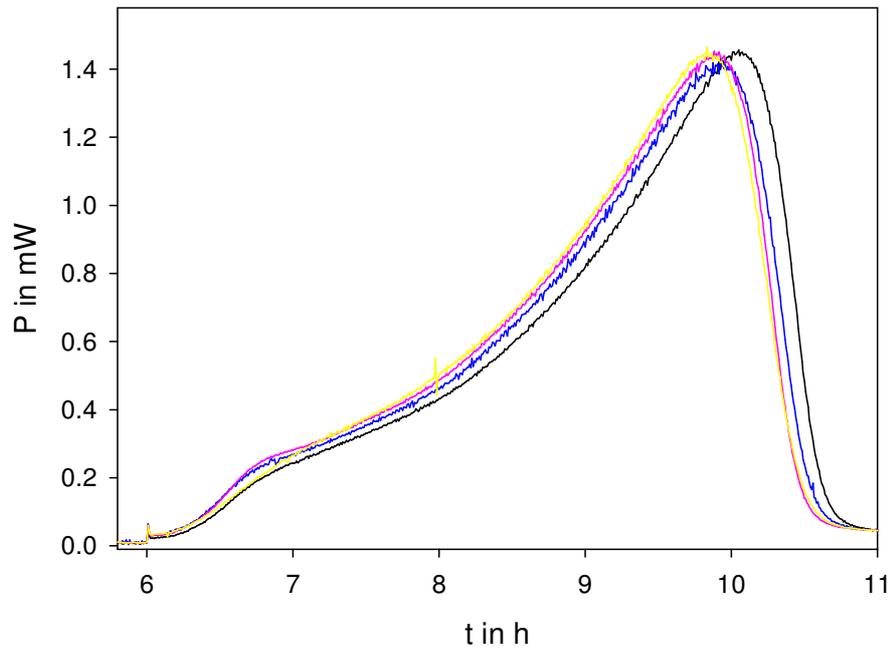


Abbildung 21: Kalorimetrische Mehrfachbestimmung (TAM-20ml) der Wachstumskurve von *P. putida* auf Natriumbenzoat (0.33 mmol/l).

Die Werte für die Mehrfachbestimmung sind:

$$\Delta_R H = -1970 \pm 30 \text{ kJ / mol}$$

$$Y_{X/S} = 0.36 \pm 0.02 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Benzoessäure)}$$

$$Y_{X/S,g} = 0.53 \pm 0.02 \text{ g(Biomasse)/g(Benzoessäure)}.$$

Auch die Mittelwerte passen gut mit den nicht kalorimetrischen Ergebnissen überein.

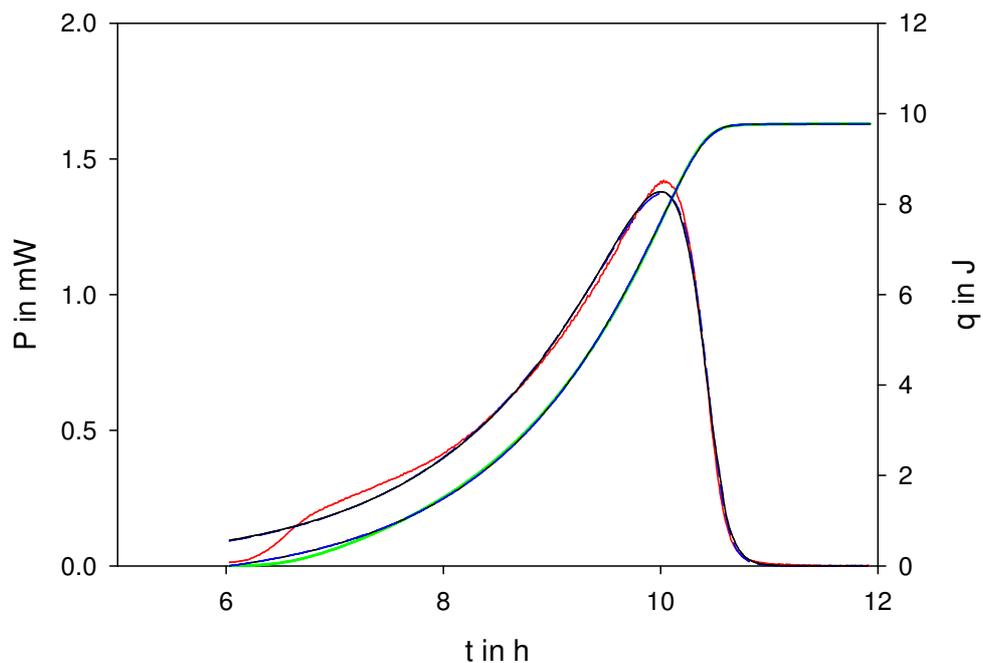


Abbildung 22: Mathematische Beschreibung der erfassten Wärmeleistungskurve (rot) und Wärmekurve (grün) von *P. putida* auf Natriumbenzoat, blau – Andrews-Modell, schwarz – Monod-Modell.

Für die mathematische Beschreibung der kalorimetrisch aufgenommenen Wachstumskurve wurde auf das Monod- und das Andrews-Modell zurückgegriffen.

Die Abbildung 22 zeigt die gute mathematische Beschreibung der kalorimetrisch erfassten Wachstumskurve. Ein signifikanter Unterschied ist zwischen beiden Modellen (blau – Andrews-Modell, schwarz – Monod-Modell) nicht zu finden. Beide Modelle haben Schwierigkeiten den Anfangsbereich der Wärmeleistungskurve korrekt zu beschreiben.

Die mathematische Beschreibung der Wärmeleistungsdaten ohne den Anfangsbereich zeigt eine viel bessere Korrelation (Abbildung 23). Die im Anfangsbereich umgesetzte Stoffmenge ist mit 3.5 % von der gesamten Menge sehr klein und wurde in den Berechnungen beachtet. Das Andrews-Modell zeigt eine leicht bessere Anpassung im Bereich des Maximums der Wärmeleistung. Jedoch ist in der exponentiellen Phase des Wachstums, der dominante und gewichtige Bereich der Messkurve, kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Anpassungen zu finden. Die nur kleinen Unterschiede zwischen den beiden Modellen (Abbildung 23, blau – Andrews-Modell, schwarz – Monod-Modell) zeigen deutlich, dass eine Inhibierung durch Natriumbenzoat in den gehandhabten geringen Konzentrationen bei dem verwendeten *P. putida* nicht vorliegt.

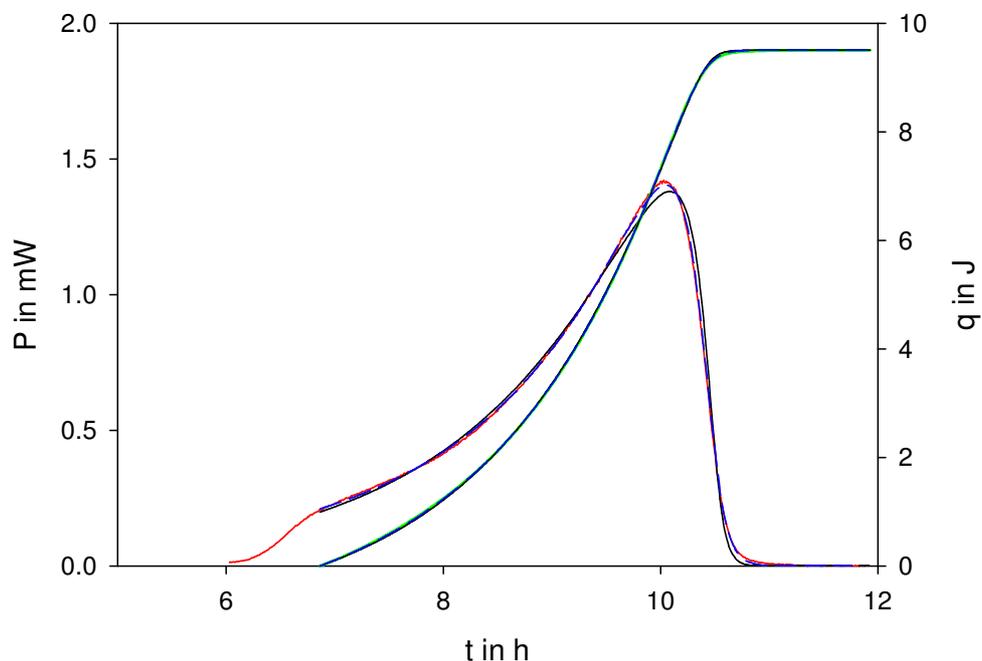


Abbildung 23: Mathematische Beschreibung der kalorimetrisch (TAM-20ml) erfassten Wachstumskurve von *P. putida* auf Natriumbenzoat ohne den Anfangsbereich, blau – Andrews-Modell, schwarz – Monod-Modell.

Die kinetischen Parameter für das Wachstum von *P. putida* auf Natriumbenzoat sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Beide Modelle können die Wachstumskurve beschreiben, dabei

ist die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ mit den Werten aus den Messungen der Optischen Dichte vergleichbar. Auf Grund der experimentellen Unterschiede (punktuelle / kontinuierliche Aufzeichnung) sind größere Abweichungen bei den anderen Parametern, die insbesondere den Übergang in die stationäre Phase beschreiben, festzustellen.

Tabelle 4: Kinetische Parameter des Wachstums von *P. putida* auf Natriumbenzoat, kalorimetrisch bestimmt und bezogen auf Benzoesäure

	Andrews-Modell	Monod-Modell
μ_{\max}	$0.84 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$	$0.72 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$
K_S	$3.4 \pm 0.3 \text{ mg/l}$	$2.6 \pm 0.3 \text{ mg/l}$
K_I	$129 \pm 26 \text{ mg/l}$	-

4.3.3.2 TAM-4ml

Entsprechend der beschriebenen Detektionsmethode (Kapitel 4.1.2) konnte das Wachstum von *P. putida* auf Natriumbenzoat in einer Schüttelkultur punktuell ermittelt werden. Bei dem in Abbildung 24 dargestellten Beispiel ist sichergestellt worden, dass es nicht zu einer Limitierung durch Sauerstoff während der Detektion der Wärmeleistung gekommen ist. Zusätzlich wurde auch das Signal der Optischen Dichte aufgezeichnet.

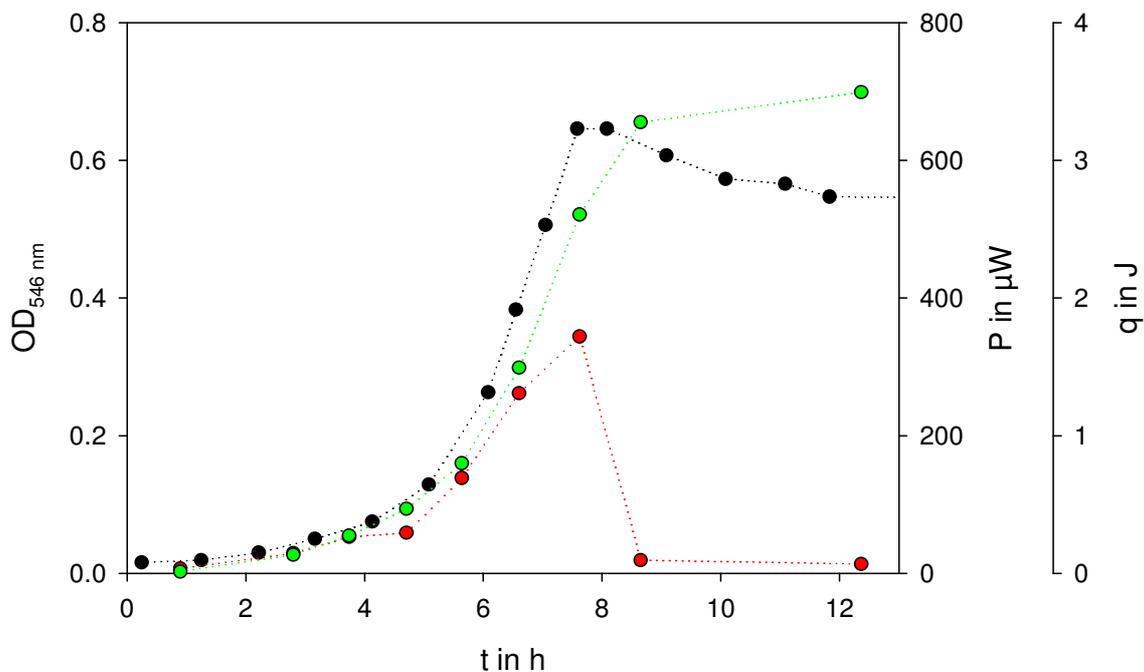


Abbildung 24: Wachstum von *P. putida* auf Natriumbenzoat (2.5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit TAM-4ml (rot), Wärme (grün).

Es ist gut zu erkennen, dass der exponentielle Anstieg der Wärmeleistung bis zum Beginn der stationären Phase in der Optischen Dichte dauert. Anschließend fällt der Wert der Wärmeleistung zurück auf die Basislinie. Gut ersichtlich ist auch hier der gleichartige zeitliche Verlauf der Messgrößen Wärme und Optische Dichte.

Als insgesamt ausgetauschte Wärme wurden 3.5 J ermittelt. Dieser Wert ergibt eine molare Enthalpie von

$$\Delta_R H = -1400 \text{ kJ / mol}$$

Dieser Wert weicht stark von dem Enthalpiewert von -1970 kJ/mol, der mit dem TAM-20ml ermittelt wurde, und dem Erwartungswert aus der Bestimmung des Ertragsfaktors ab. So ein niedriger Wert würde für einen hohen Ertragsfaktor sprechen.

$$Y_{X/S,g} = 0.77 \text{ g(Biomasse)/g(Benzoessäure)}$$

$$Y_{X/S} = 0.525 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Benzoessäure)}$$

Diese hohen Werte konnten aber nicht nachgewiesen werden.

Während die Absolutwerte eine große Differenz zeigen, konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Biomassekonzentration und der Wärmeleistung belegt werden (siehe Kapitel 4.2, Seite 41). Das lässt den Schluss zu, dass insgesamt zu niedrige Wärmeleistungen gemessen wurden. Insbesondere die Probenahme und die anschließende Probenvorbereitung scheinen dabei störende Effekte auf die Wärmeleistungsproduktion der mikrobiellen Probe darzustellen.

Grundsätzlich weist die Messung die exponentielle Zunahme der mikrobiellen Aktivität / Biomasse aus. Für die kinetische Beschreibung des Wachstums wurde daher mit dem aus den Schüttelkolben Wachstumsexperimenten ermittelten Ertragsfaktor ($Y_{X/S} = 0.55 \text{ g/g}$) gerechnet. Da die Reaktionsenthalpie bei der mathematischen Beschreibung nur als einfacher Proportionalitätsfaktor eingeht (Gleichung (19)) konnten die kinetischen Parameter, durch Verwendung eines Korrekturfaktors für die Reaktionsenthalpie, erhalten werden.

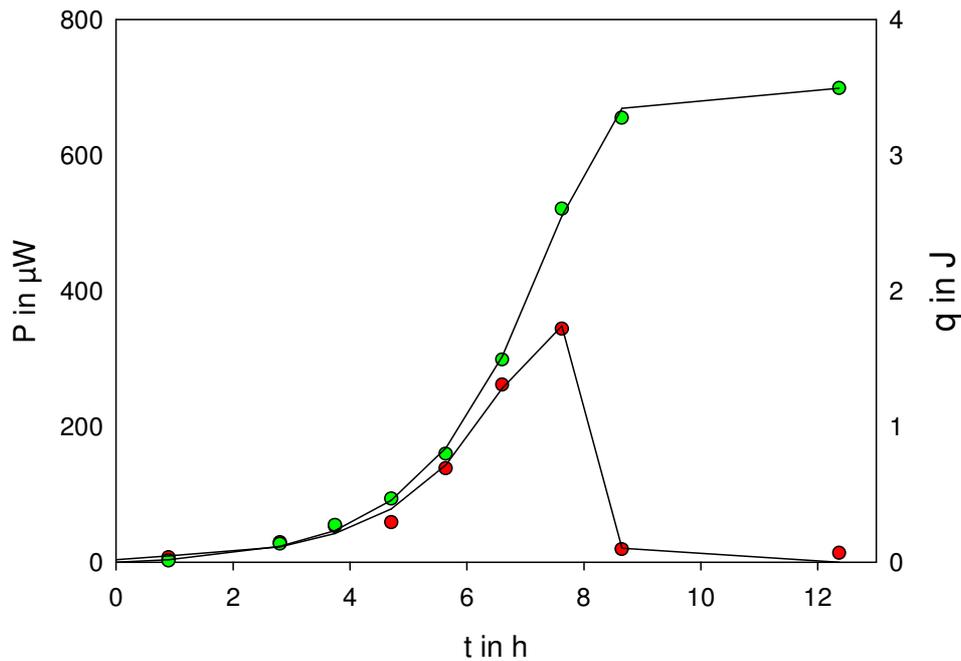


Abbildung 25: Mathematische Beschreibung (Monod-Modell) des kalorimetrisch (TAM-4ml) aufgezeichneten Wachstums von *P. putida* auf Natriumbenzoat, Wärmeleistung (rot), Wärme (grün).

Abbildung 25 zeigt die mathematische Beschreibung der Wachstumskurve von *P. putida* auf Natriumbenzoat bei der Detektion durch das Kalorimeter TAM-4ml. Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit wurde bestimmt:

$$\mu_{\max} = 0.76 \pm 0.16 \text{ h}^{-1}$$

Der Wert stimmt gut mit den Werten aus den Messungen der Optischen Dichte und den Messungen mit dem TAM-20ml überein. Eine Angabe der Sättigungskonstante ist auf Grund des schlecht definierten Übergangsbereiches nicht ausreichend sicher möglich.

Die niedrigen Wärmeleistungswerte können durchaus problematisch für die Bestimmung der kinetischen Parameter sein, jedoch scheint hier mehr das Problem der geringen Anzahl an Messpunkten zum Tragen zu kommen. Insbesondere im Bereich des Maximums, also im Übergang von der exponentiellen Phase in die stationäre Phase, ist die Anzahl der Messdaten zu gering für eine gesicherte Parameterbestimmung.

Eine Erhöhung der Anzahl an Messdaten ist schwierig möglich. Aufgrund der notwendigen Temperierzeit von 20 Minuten und der Detektionszeit ist eine Erhöhung des Probendurchsatzes nicht ohne Verlust an Signalqualität und –sicherheit möglich.

4.3.3.3 Chip-Kalorimeter

Die Verwendung des Chip-Kalorimeters ermöglicht grundsätzlich eine Messdatendichte von bis zu vier Werten pro Stunde. Die mikrobielle Basis ist wie beim Kalorimeter TAM-4ml eine Schüttelkultur. Aus dieser wird eine Probe entnommen und neben der Optischen Dichte die Wärmeleistung bestimmt.

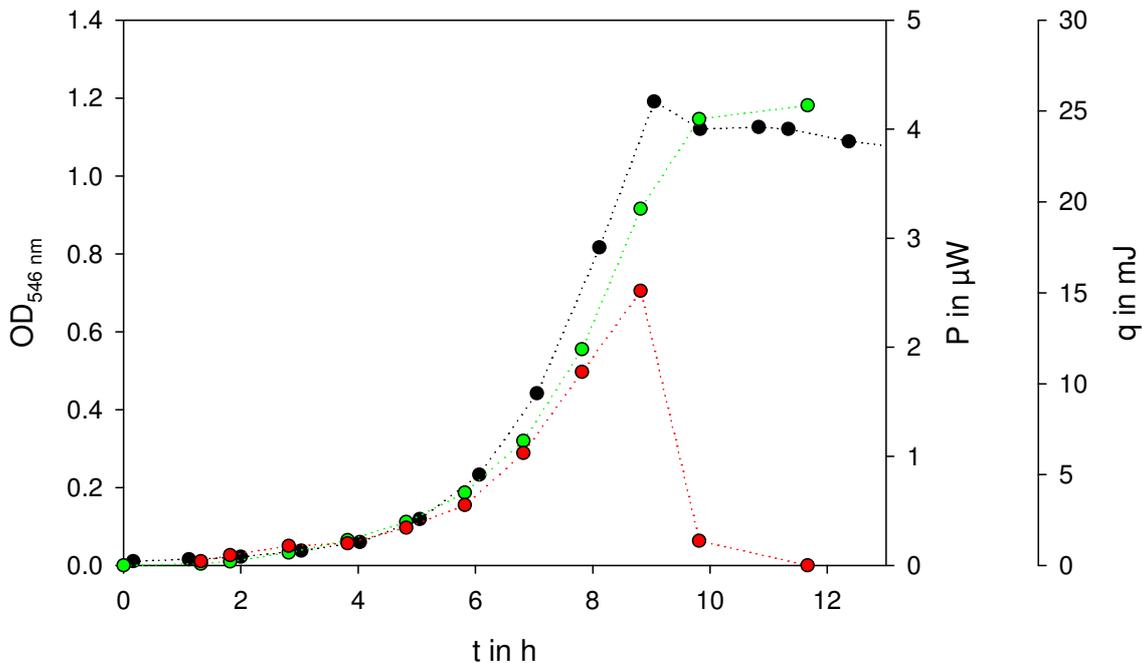


Abbildung 26: Wachstum von *P. putida* auf Natriumbenzoat (5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit Chip-Kalorimeter (rot), Wärme (grün).

In der Abbildung 26 ist die exponentielle Phase des mikrobiellen Wachstums in allen drei Kurven festzustellen. Auch ist wieder gut die schnelle Abnahme der Wärmeleistung beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase zu erkennen.

Die insgesamt ausgetauschte Wärme beträgt 25.3 mJ. Dieser Wert entspricht einer molaren Enthalpie von:

$$\Delta_R H = -845 \text{ kJ / mol}$$

Auch dieser Wert ist viel zu gering im Vergleich zu dem Wert, der mit dem TAM-20ml ermittelt wurde und den über die Biomassebestimmung ermittelten Erwartungswert. Aus der Reaktionsenthalpie lassen sich die folgende Ertragsfaktoren errechnen:

$$Y_{X/S,g} = 1.0 \text{ g(Biomasse)/g(Benzoessäure)}$$

$$Y_{X/S} = 0.685 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Benzoessäure)}$$

Diese Werte sind für das aufgezeichnete mikrobielle Wachstum viel zu hoch und experimentell nicht nachweisbar. Es zeigt sich wiederum, dass die punktuelle Bestimmung der Wärmeleistung bei dem verwendeten Bakterium mit Problemen verbunden ist.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde für die mathematische Beschreibung wie bei den Messdaten des TAM-4ml der Ertragsfaktor von $Y_{X/S,g} = 0.55$ g(Biomasse)/g(Benzoessäure) verwendet. Die Reaktionsenthalpie wurde mit einem Korrekturfaktor angepasst.

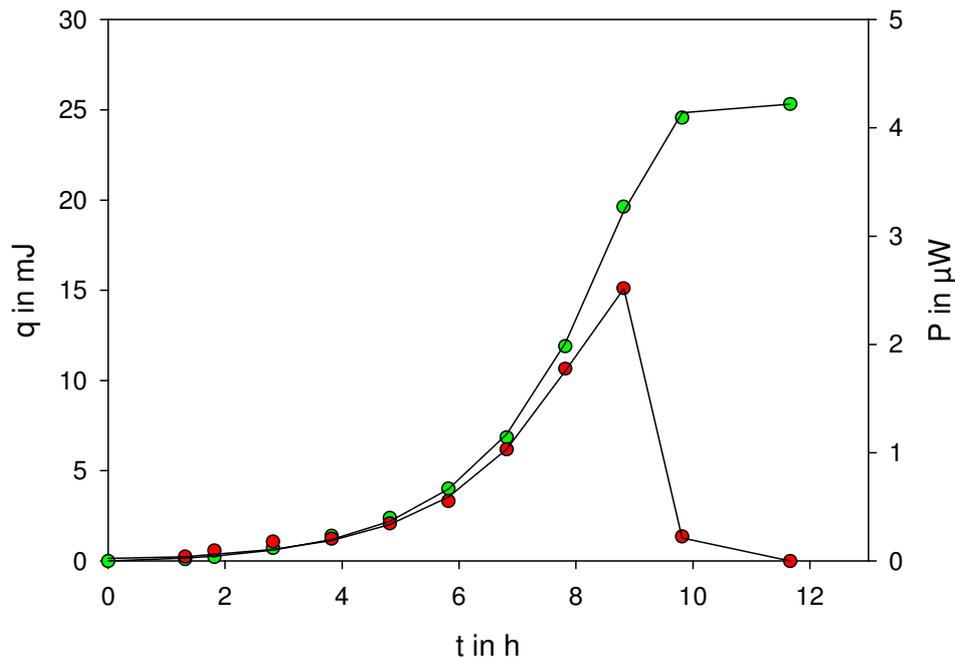


Abbildung 27: Mathematische Beschreibung (Monod-Modell) des kalorimetrisch (Chip-Kalorimeter) aufgezeichneten Wachstums von *P. putida* auf Natriumbenzoat.

In Abbildung 27 ist die gute Korrelation zwischen der mathematischen Beschreibung und den Messdaten des Wachstums von *P. putida* auf Natriumbenzoat zu sehen. Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bei dieser Bestimmung beträgt:

$$\mu_{\max} = 0.63 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$$

Im Rahmen des Fehlers sind mit den beiden vergleichbaren Kalorimetern (TAM-4ml und Chip) gleiche maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten ermittelt worden.

Durch die geringe Anzahl der Messpunkte insbesondere im Übergangsbereich ist die Bestimmung der kinetischen Parameter nicht sehr genau ausführbar. Die Angabe der Sättigungskonstante ist daher nicht möglich. Die zu erwartende Datendichte konnte trotz technischer Möglichkeiten nicht erreicht werden. Es zeigte sich, dass weitere Spülschritte, notwendig waren, um Ablagerung oder Anhaftung des *P. putidas* im kalorimetrischen System zu beseitigen, und so keine Messung in den 15 Minutenabständen realisierbar sind.

4.3.3.4 Micro-DSC II

Die Abbildung 28 zeigt eine exemplarische Wachstumskurve, die mit der Rückflussanordnung (Abbildung 6) aufgenommen wurde. Mit dem Anstieg der Optischen Dichte (schwarz) nimmt auch die Wärmeleistung (rot) der mikrobiellen Kultur zu. Deutlich ist zu erkennen, dass mit dem Beginn der stationären Phase die Wärmeleistung von ihrem Maximum zurück auf die Basislinie fällt.

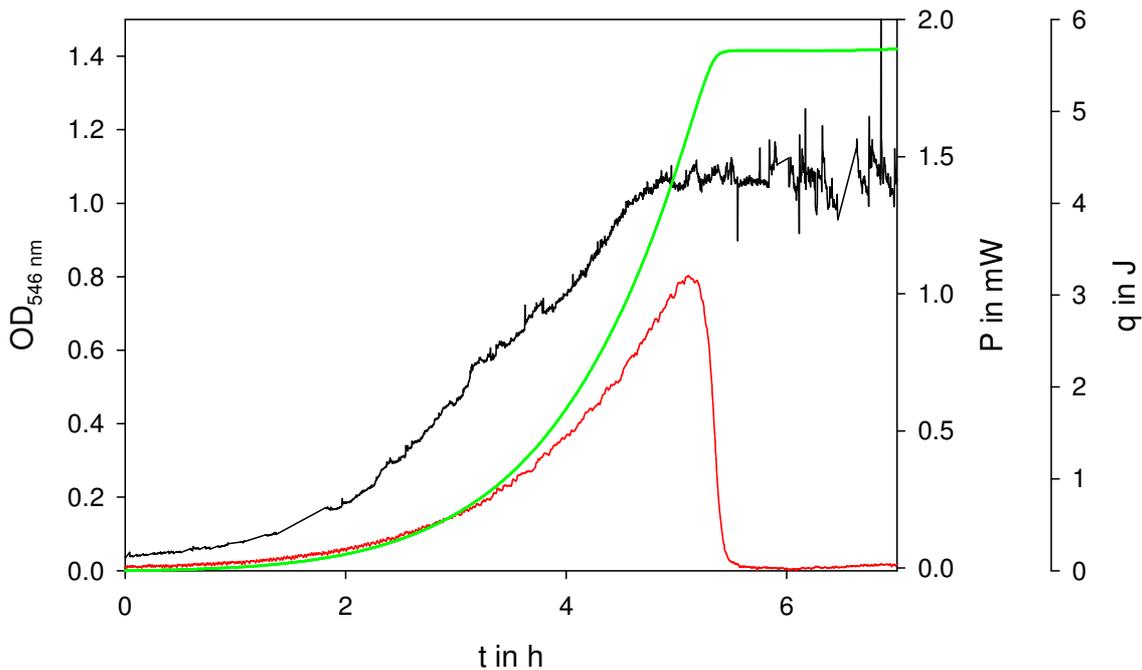


Abbildung 28: Wachstum von *P. putida* auf Natriumbenzoat (5 mmol/l) in einem Bioreaktor (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit der MDSC (rot), Wärme (grün).

Die molare Reaktionsenthalpie für eine Dreifachbestimmung beträgt:

$$\Delta_R H = -1940 \pm 200 \text{ kJ / mol .}$$

Die korrespondierenden Ertragsfaktoren sind:

$$Y_{X/S,g} = 0.54 \pm 0.08 \text{ g(Biomasse)/g(Benzoessäure)}$$

$$Y_{X/S} = 0.37 \pm 0.06 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Benzoessäure).}$$

Die obigen Werte stimmen mit den Werten aus der Biomassebestimmung und den Werten der Untersuchungen mit dem TAM-20ml sehr gut überein. Sie zeigen jedoch einen größeren Fehlerbereich als die Werte, die mit dem TAM-20ml bestimmt worden.

Die kinetischen Parameter wurden mit dem Monod-Modell (ohne Inhibierung) bestimmt. Die Abbildung 29 zeigt die gute Korrelation zwischen der mathematischen Beschreibung und den experimentellen Daten des Wachstums.

$$\mu_{\max} = 1.08 \pm 0.10 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 41 \pm 15 \text{ mg/l}$$

Auch die kinetischen Parameter zeigen einen relativ großen Fehler (37 %). Im Rahmen dieses Fehlers stimmt der Wert für die Sättigungskonstante mit dem Wert aus der mathematischen Beschreibung des Wachstums detektiert mit der Optischen Dichte und der Biomassebestimmung überein.

Der Wert für die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ist auf Grund der höheren Wachstumstemperatur gegenüber allen anderen Messungen deutlich erhöht (20 – 40 %). Die Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit mit der Temperatur konnten schon Deeb und Alvarez-Cohen (1999) dokumentieren.

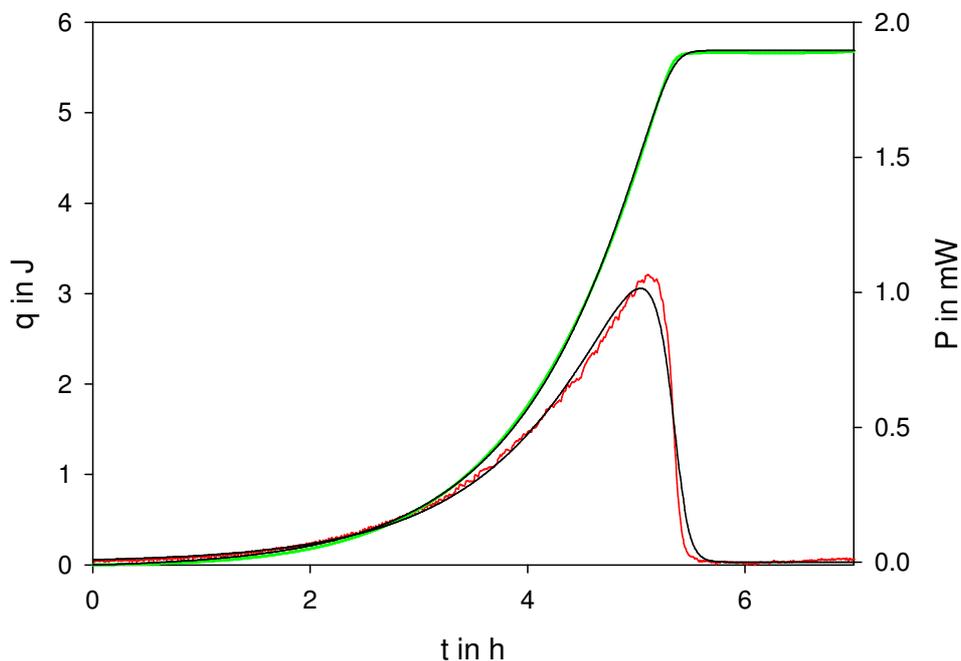


Abbildung 29: Mathematische Beschreibung (Monod-Modell) des kalorimetrisch (MDSC) aufgezeichneten Wachstums von *P. putida* auf Natriumbenzoat.

4.3.3.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der kalorimetrischen Untersuchungen des Wachstums von *Pseudomonas putida* auf Natriumbenzoat zeigen eindrucksvoll, dass mit Kalorimetern unterschiedlicher Bauart mikrobielle Wachstumskurven aufgezeichnet und interpretiert werden können. Dabei wurden die ermittelten Daten aus den klassischen Wachstumsexperimenten mit den kalorimetrisch ermittelten Werten bestätigt. Alle Methoden zeigten nur eine einzige Wachstumsphase. Insbesondere in den kalorimetrischen Messdaten kann dies anhand nur eines Maximums erkannt werden.

Ein Vergleich zwischen allen vier Kalorimetern lässt den Schluss zu, dass nur das Kalorimeter TAM-20ml, bei dem die Kultivierung innerhalb der Kalorimeterzelle erfolgt, verlässliche und gut reproduzierbare Absolutwerte liefert. Es hat jedoch den Nachteil der begrenzten Wärmeleistung. Hohe Zelldichten und hohe Substratumsätze können mit diesem System daher nicht aufgezeichnet werden.

Die anderen Kalorimeter eignen sich trotz der oben genannten Probleme sehr gut für die Erfassung der mikrobiellen Aktivität. Bei dem hier gewählten mikrobiellen Organismus scheint sich jedoch eine Störung des Wachstums durch die Probenahme negativ auf die Bestimmung der Wärmeleistung mit dem Kalorimeter TAM-4ml und dem Chip-Kalorimeter auszuwirken. Vorteilhaft ist für diese Kalorimeter wiederum, durch Verdünnung der mikrobiellen Probe auch eigentlich hohe mikrobielle Aktivitäten untersuchen zu können. Sie können daher sehr gut für punktuelle Messungen im Bereich Screening und für Inhibierungsuntersuchungen verwendet werden.

Mit der MDSC und dem experimentellen Mehraufwand (Bioreaktor, Ankopplung, gesicherte kontinuierliche Sauerstoffversorgung im Kalorimeter) lassen sich relativ hohe Wärmeleistungswerte kontinuierlich aufzeichnen.

4.4 Wachstum von *Pseudomonas putida* auf Glucose

Im Gegensatz zu Natriumbenzoat ist das Substrat Glucose für *P. putida* auch in höheren Konzentrationen nicht toxisch (Wang et al. 1996). Der Stoffwechselweg für den Abbau von Glucose ist zudem ein zentraler Bestandteil des Metabolismus.

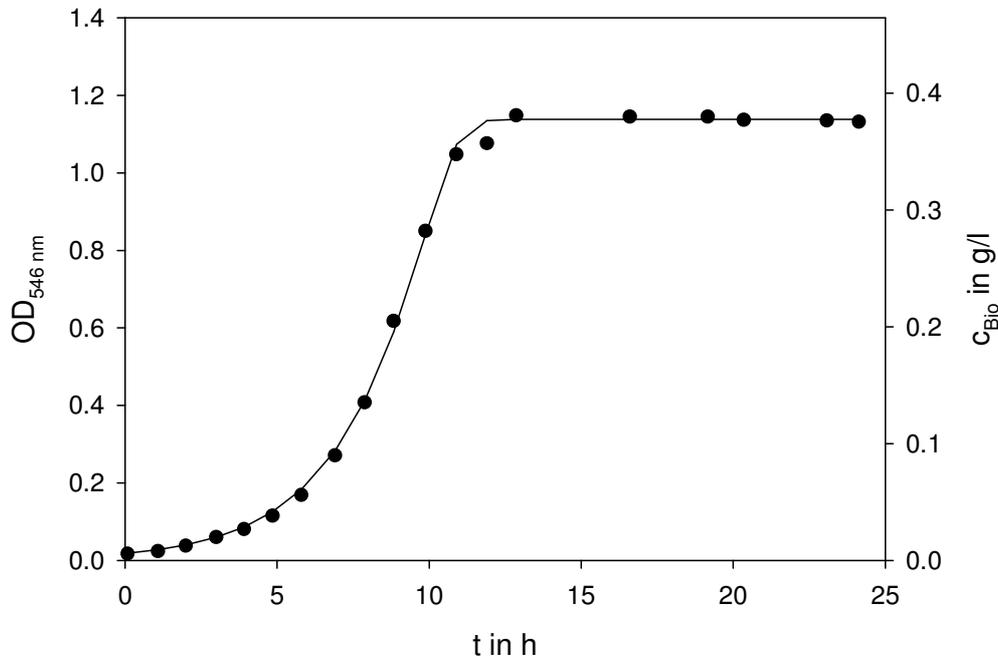


Abbildung 30: Wachstumskurve (Optische Dichte) von *P. putida* auf 5 mmol/l Glucose (Punkte) und mathematische Modellierung mit dem Monod-Modell (Linie).

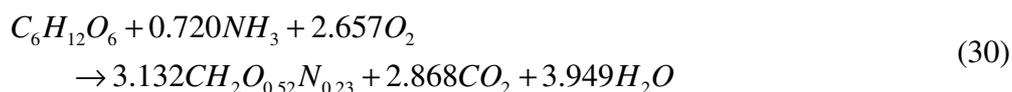
Die Abbildung 30 zeigt das Wachstum von *P. putida* auf 5 mmol/l Glucose anhand der Optischen Dichte. Nach der 11-stündigen exponentiellen Wachstumsphase schließt sich die stationäre Phase mit einer konstanten Optischen Dichte von 1.15 an. Für das Wachstum von *P. putida* konnten folgende Parameter ermittelt werden:

$$c_{\text{Bio}} = 0.40 \pm 0.02 \text{ g/l}$$

$$Y_{\text{X/S,g}} = 0.44 \pm 0.02 \text{ g(Biomasse)/g(Glucose)}$$

$$Y_{\text{X/S}} = 0.52 \pm 0.02 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Glucose)}.$$

Mit den Werten kann eine Gesamtreaktionsgleichung aufgestellt werden:



Die Reaktionsenthalpie der Reaktionsgleichung (30) lässt sich mit Gleichung (6) berechnen:

$$\Delta_{\text{R}}H = -1267 \pm 73 \text{ kJ / mol}$$

In der Abbildung 30 ist die mathematische Beschreibung des Wachstums mit dem Monod-Modell als durchgezogene Linie dargestellt. Die erhaltenen kinetischen Parameter sind:

$$\mu_{\max} = 0.456 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 113 \text{ mg/l.}$$

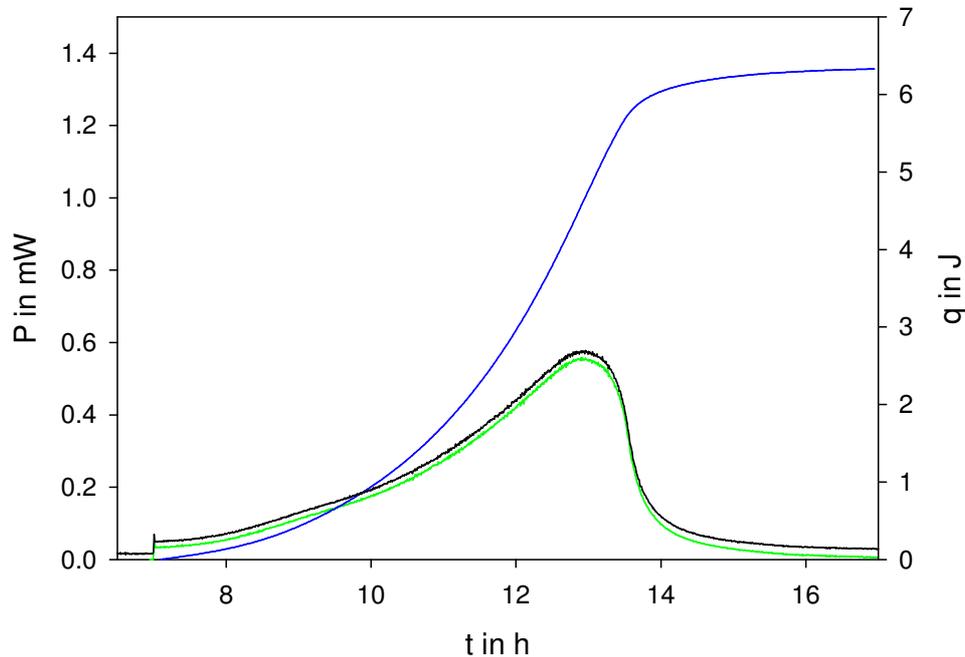


Abbildung 31: Kalorimetrisch (TAM-20ml) aufgenommene Wachstumskurve von *P. putida* auf Glucose (0.33 mmol/l), schwarz – Wärmeleistung, grün – korrigierte Wärmeleistung, blau – Wärme.

Die Abbildung 31 zeigt eine mit dem TAM-20ml aufgenommene Wachstumskurve. Die Messkurve ist schwarz dargestellt. Zur Bestimmung der ausgetauschten Wärme (blau) und der kinetischen Parameter wurde die basislinienkorrigierte Messkurve (grün) verwendet.

Die Glucosezugabe erfolgte nach sieben Stunden, deutlich erkennbar an dem Sprung in der Wärmeleistung. Diese Startwärmeleistung ist im Vergleich zu einer Natriumbenzoat-Kultur, wo nur ein zögerlicher Beginn (Abbildung 20) vorherrscht, gut zu erkennen. Anschließend erfolgen das exponentielle Wachstum bis zu einem Maximum (bei 13 Stunden) und der Leistungsabfall zurück auf die Basislinie.

Die gute Reproduzierbarkeit ist in Abbildung 51 (Kapitel 4.6.3) dargestellt. Aus den Messdaten lässt sich die Reaktionsenthalpie pro mol Glucose berechnen:

$$\Delta_r H = -1260 \pm 31 \text{ kJ / mol .}$$

Mit Gleichung (7) werden die Ertragsfaktoren ermittelt:

$$Y_{X/S,g} = 0.45 \pm 0.01 \text{ g(Biomasse)/g(Glucose)}$$

$$Y_{X/S} = 0.53 \pm 0.02 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Glucose).}$$

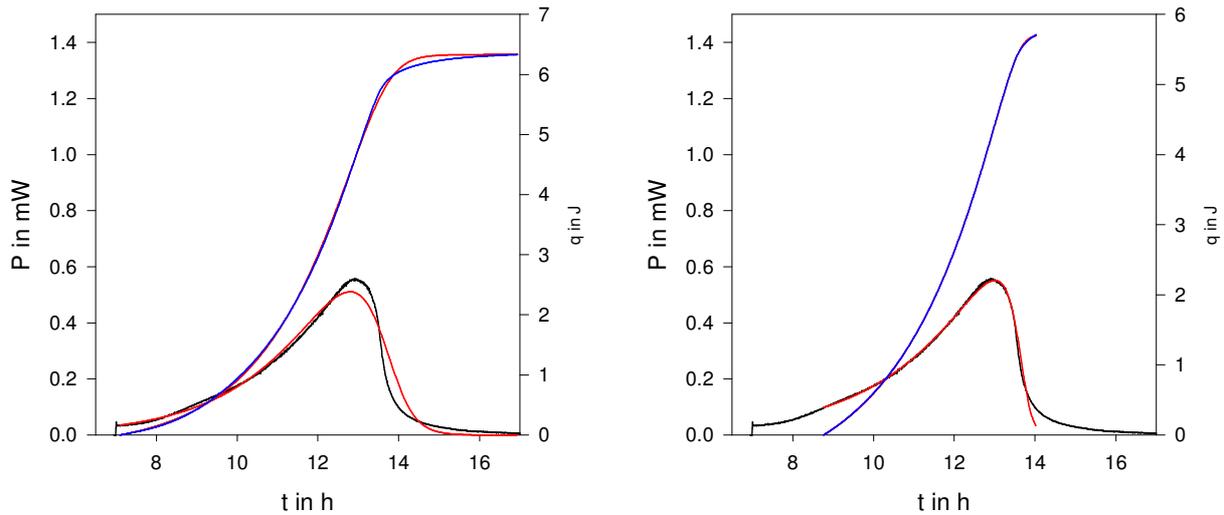


Abbildung 32: Mathematische Beschreibung der erfassten Wärmeleistungskurve (schwarz) und Wärmekurve (blau) von *P. putida* auf Glucose, rot – Monod-Modell.

Die Abbildung 32 zeigt die mathematische Beschreibung der Wachstumskurve aus Abbildung 31. Die linke Grafik stellt dabei die Beschreibung der kompletten Messkurve dar. Die modellierten Kurven (rot) zeigen insbesondere im Bereich des Maximums größere Abweichungen. Die Parameter des Wachstums wurden zu

$$\mu_{\max} = 0.758 \pm 0.088 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 15.4 \pm 3.8 \text{ mg/l}$$

bestimmt. Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ist mit einem hohen Fehler (12 %) behaftet. Erst bei der Beschreibung eines Ausschnittes der Messkurve (Abbildung 32, rechts) ergibt sich ein kleinerer Fehler von ca. 3 %.

$$\mu_{\max} = 0.516 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 3.5 \pm 0.8 \text{ mg/l}$$

Die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit, als wichtigste Größe für die mathematische Beschreibung, passt besser zu dem Wert aus den Messungen der Optischen Dichte. Die Sättigungskonstanten, hauptverantwortlich für den Übergang in die stationäre Phase, unterscheiden sich noch stark. Im Vergleich zum Wachstum auf Natriumbenzoat ist der Rückgang der Wärmeleistung auf Basislinienniveau wesentlich langsamer. Diese langgezogene Wärmeproduktion kann nicht durch das verwendete Modell beschrieben werden.

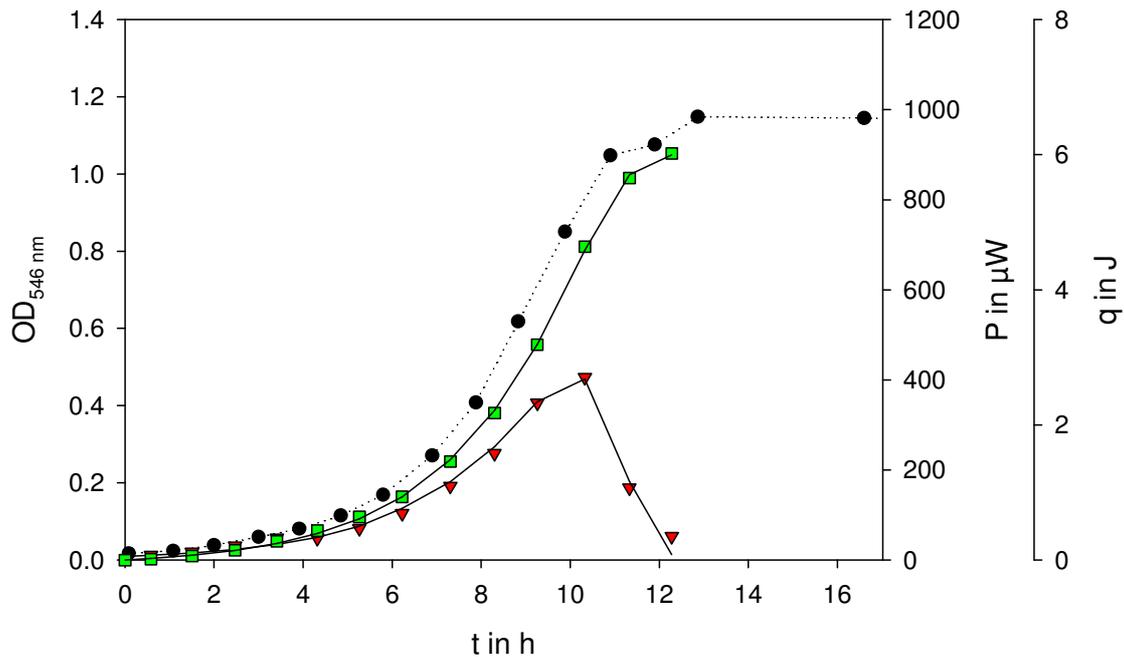


Abbildung 33: Wachstum von *P. putida* auf Glucose (5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit TAM-4ml (rot), Wärme (grün), durchgezogene Linie – mathematische Beschreibung (Monod-Modell).

In der Abbildung 33 ist das mit dem TAM-4ml aufgezeichnete Wachstum dargestellt. Die Wärmeleistung (rot) zeigt den erwarteten Verlauf mit einer deutlichen exponentiellen Phase, einem Maximum und dem Abfall auf die Basislinie. Der Abfall, ähnlich wie bei den Messungen mit dem TAM-20ml, erfolgt über einen längeren Zeitraum von 2 Stunden. Die beiden summarischen Signale, Wärme (grün) und Optische Dichte (schwarz), zeigen eine gute Übereinstimmung im Verlauf des Wachstums.

Aus den Messdaten lässt sich die Reaktionsenthalpie pro mol Glucose bestimmen:

$$\Delta_R H = -1266 \text{ kJ / mol .}$$

Mit Gleichung (7) werden die Ertragsfaktoren berechnet:

$$Y_{X/S,g} = 0.44 \text{ g(Biomasse)/g(Glucose)}$$

$$Y_{X/S} = 0.52 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Glucose).}$$

Die ermittelten Werte passen gut zu den Werten aus den Experimenten mit dem TAM-20ml und den Schüttelkulturen.

Die durchgezogenen Linien in der Abbildung stellen die Ergebnisse der mathematischen Beschreibung der Wachstumskurven dar. Die kinetischen Parameter aus dem kalorimetrischen Experiment sind:

$$\mu_{\max} = 0.473 \pm 0.044 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 118 \pm 28 \text{ mg/l.}$$

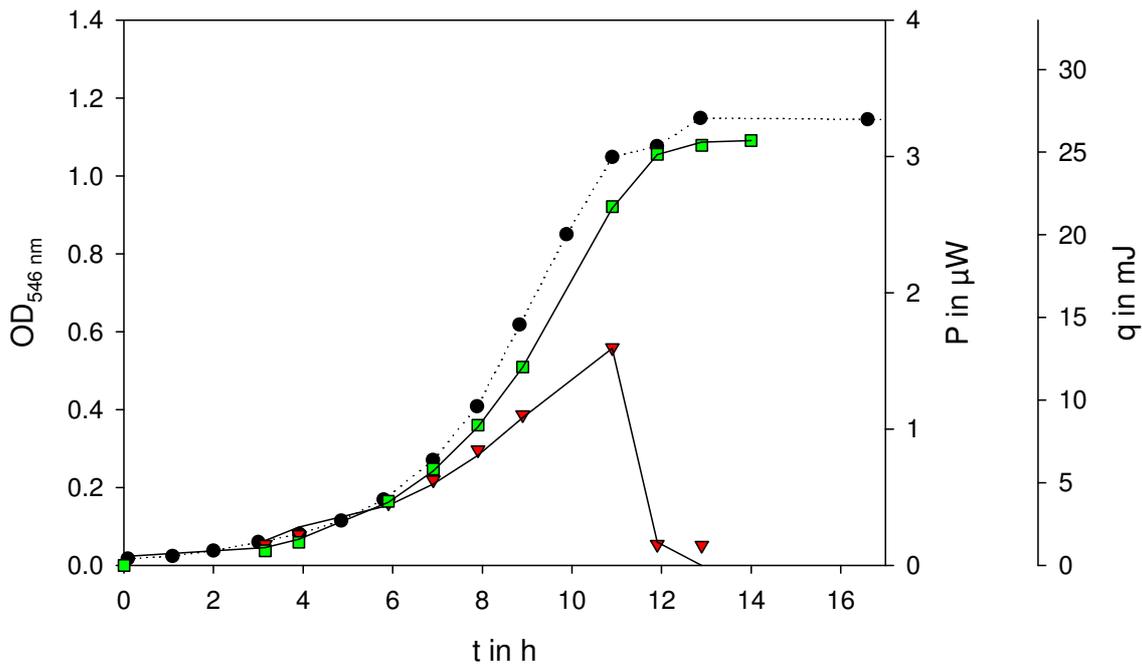


Abbildung 34: Wachstum von *P. putida* auf Glucose (5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit Chip-Kalorimeter (rot), Wärme (grün), durchgezogene Linie – mathematische Beschreibung (Monod-Modell).

Die Abbildung 34 zeigt das mit dem Chip-Kalorimeter aufgezeichnete Wachstum. Nach der 11-stündigen exponentiellen Wachstumsphase fällt die Wärmeleistung (rot) zurück auf die Basislinie. Wieder zeigen die beiden summarischen Signale, Wärme (grün) und Optische Dichte (schwarz), eine gute Übereinstimmung im zeitlichen Verlauf.

Aus den Messdaten lässt sich die Reaktionsenthalpie pro mol Glucose berechnen.

$$\Delta_R H = -857 \text{ kJ / mol}$$

Mit Gleichung (7) werden die Ertragsfaktoren berechnet:

$$Y_{X/S,g} = 0.66 \text{ g(Biomasse)/g(Glucose)}$$

$$Y_{X/S} = 0.78 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Glucose)}.$$

Die Reaktionsenthalpie und die Ertragsfaktoren weichen von den zuvor bestimmten Werten ab. Wie bei den Natriumbenzoat-Kulturen scheint insbesondere die punktuelle Probennahme und Behandlung beim Chip-Kalorimeter problematisch zu sein. Der prinzipiell erwartete Verlauf ist dennoch vorhanden. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde der Ertragsfaktor aus den vorangegangenen Bestimmungen verwendet.

Die durchgezogene Linie stellt die mathematische Beschreibung der kalorimetrisch erfassten Wachstumskurve dar. Die kinetischen Parameter aus den Chip-Messungen sind:

$$\mu_{\max} = 0.525 \pm 0.109 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 96 \pm 102 \text{ mg/l.}$$

Der ermittelte Ertragsfaktor von $Y_{X/S,g} = 0.44 \text{ g(Biomasse)/g(Glucose)}$ ist identisch mit dem Wert aus Wang et al. (1996). Die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit wurde bei Wang et al. mit 0.84 h^{-1} angegeben und ist damit größer als der in dieser Arbeit ermittelte Wert. Die erhöhte Temperatur ($28 \text{ }^\circ\text{C}$) bei Wang et al. kann den Unterschied zwischen beiden Werten erklären.

Die Sättigungskonstante, als weiterer kinetischer Parameter, konnte nicht auf einen konformen Wert bestimmt werden. Ein Vergleich mit dem Wert aus der Literatur bestätigt nur den Größenbereich.

Bei allen Wachstumskurven ist zu erkennen, dass eine perfekte Beschreibung der Messkurve nicht zu erreichen war. Insbesondere eine langgezogene Wärmeproduktion kann mit dem Modell nicht beschrieben werden.

4.5 Wachstum von *Pseudomonas putida* auf Phenol

Phenol hat eine stärkere toxische Wirkung als Natriumbenzoat (Reardon et al. 2000). Zudem erfolgt der Abbau durch *P. putida* auf einem anderen Stoffwechselweg (Kapitel 2.3).

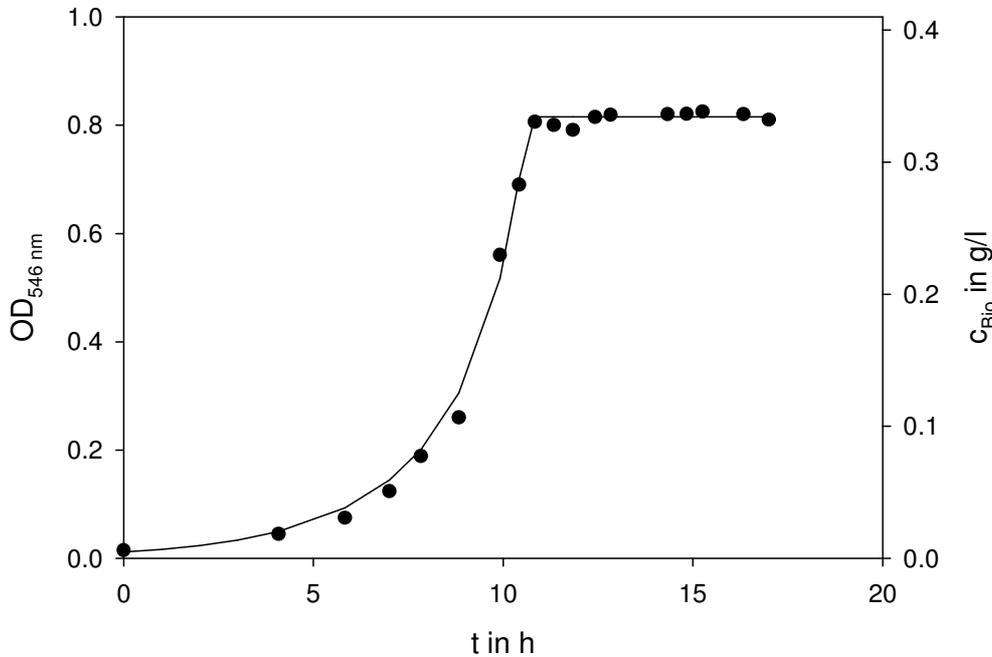


Abbildung 35: Wachstumskurve (Optische Dichte) von *P. putida* auf 5 mmol/l Phenol (Punkte) und mathematische Modellierung mit dem Andrews-Modell (Linie).

Die Abbildung 35 zeigt die Wachstumskurve von *P. putida* auf 5 mmol/l Phenol. Das Wachstum wurde durch die Messung der Optischen Dichte verfolgt. Nach einer zehn Stunden langen exponentiellen Phase schließt sich unverzüglich die stationäre Phase an.

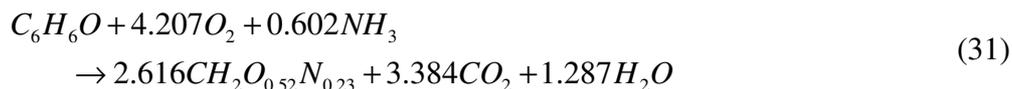
Für das Wachstum von *P. putida* wurden folgende Werte ermittelt:

$$c_{\text{Bio}} = 0.33 \pm 0.09 \text{ g/l}$$

$$Y_{\text{X/S,g}} = 0.71 \pm 0.19 \text{ g(Biomasse)/g(Phenol)}$$

$$Y_{\text{X/S}} = 0.44 \pm 0.11 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Phenol)}.$$

Mit den Werten lässt sich die Gesamtreaktionsgleichung aufstellen:



Die Reaktionsenthalpie dieser Reaktionsgleichung wurde nach Gleichung (6) berechnet:

$$\Delta_{\text{R}}H = -1770 \pm 335 \text{ kJ / mol}.$$

Die kinetischen Parameter des Wachstums wurden mit dem Andrews-Modell ermittelt:

$$K_{\text{S}} = 10.9 \pm 7.7 \text{ mg/l}$$

$$\mu_{\text{max}} = 0.878 \pm 0.023 \text{ h}^{-1}$$

$$K_I = 237 \pm 57 \text{ mg/l.}$$

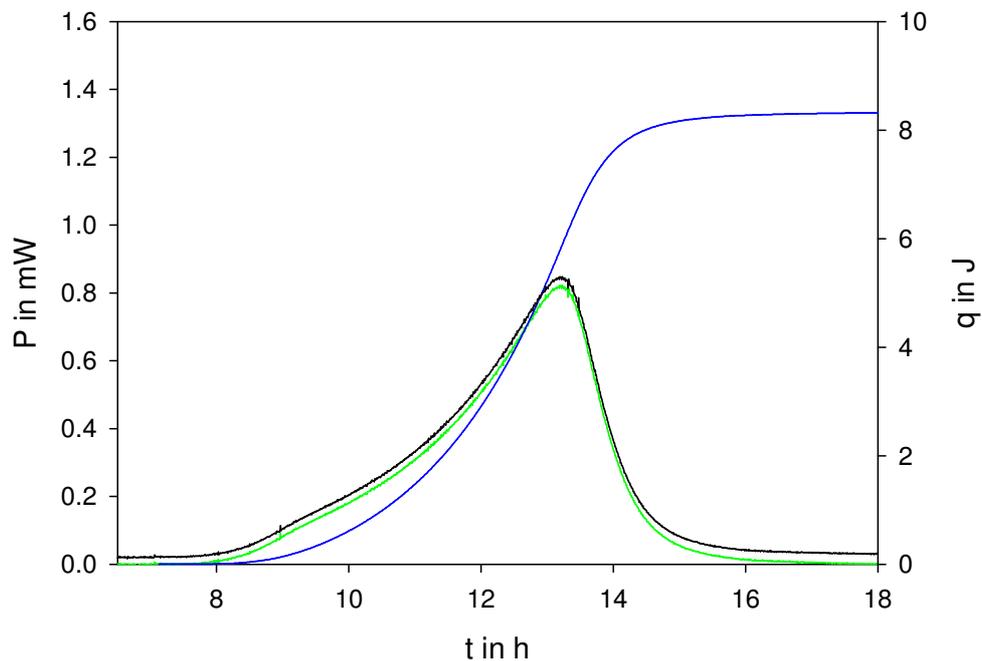


Abbildung 36: Kolorimetrisch (TAM-20ml) aufgenommene Wachstumskurve von *P. putida* auf Phenol (0.33 mmol/l), schwarz – Wärmeleistung, grün – korrigierte Wärmeleistung, blau – Wärme.

Die Abbildung 36 stellt die Wachstumskurve, aufgenommen mit dem TAM-20ml, von *P. putida* auf 0.33 mmol/l Phenol dar. Die Substratzugabe erfolgte nach sieben Stunden. Eine deutliche Startwärmleistung als Signalsprung wie bei Glucose ist nicht zu erkennen. Dennoch schließt sich nach der Zugabe eine exponentielle Wachstumsphase an. Sechs Stunden nach der Zugabe erreicht die Wärmeleistung (schwarz) ihr Maximum und fällt danach wieder auf die Basislinie zurück. Für die Berechnung der Wärme (blau) wurde die basislinienkorrigierte Leistungskurve (grün) verwendet.

In Abbildung 55 ist die gute Reproduzierbarkeit der Wachstumsphase dargestellt (Kapitel 4.6.4). Die Reaktionsenthalpie für das Wachstum auf Phenol ist:

$$\Delta_R H = -1685 \pm 99 \text{ kJ / mol .}$$

Daraus lassen sich die Ertragsfaktoren berechnen:

$$Y_{X/S,g} = 0.76 \pm 0.06 \text{ g(Biomasse)/g(Phenol)}$$

$$Y_{X/S} = 0.47 \pm 0.04 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Phenol).}$$

Der Wert für die Reaktionsenthalpie ist im Vergleich zu dem Erwartungswert aus den Schüttelkulturen leicht niedriger. Die Werte für die Ertragsfaktoren sind entsprechend größer. Im Rahmen des Fehlers stimmen die Werte überein.

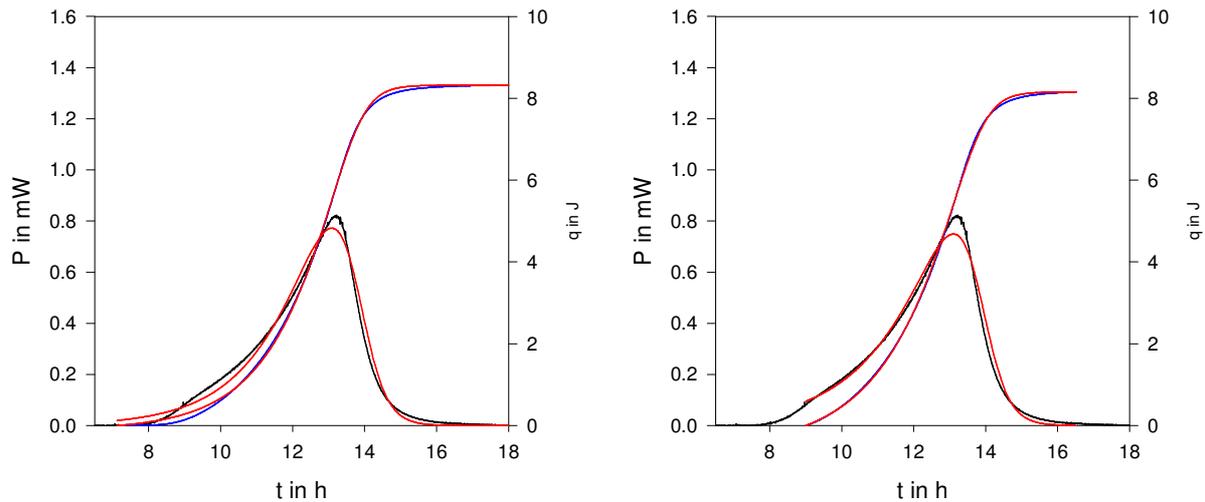


Abbildung 37: Mathematische Beschreibung der erfassten Wärmeleistungskurve (schwarz) und Wärmekurve (blau) von *P. putida* auf Phenol, rot – Andrews-Modell.

Die Abbildung 37 stellt die mathematische Beschreibung einer exemplarischen Wachstumskurve dar. Das linke Diagramm zeigt dabei die Darstellung der gesamten Messkurve und die entsprechende Modellierung.

Die kinetischen Parameter erhalten durch Mehrfachbestimmung sind:

$$K_S = 10.8 \pm 1.9 \text{ mg/l}$$

$$\mu_{\max} = 0.97 \pm 0.1 \text{ h}^{-1}$$

$$K_I = 171 \pm 37 \text{ mg/l.}$$

Das rechte Diagramm stellt die mathematische Beschreibung eines Ausschnittes der Messkurve dar.

$$K_S = 9.3 \pm 3.5 \text{ mg/l}$$

$$\mu_{\max} = 0.87 \pm 0.14 \text{ h}^{-1}$$

$$K_I = 145 \pm 62 \text{ mg/l}$$

Erfolgt die mathematische Beschreibung der Wachstumskurven ohne den Anfangsbereich konnte eine verbesserte Darstellung der exponentiellen Wachstumsphase erreicht werden. Jedoch sind immer noch große Abweichungen insbesondere beim Maximum zu erkennen. Im Rahmen des Fehlers haben sich die kinetischen Parameter nicht wesentlich verändert. Sie passen zu den ermittelten Werten aus den Schüttelkulturen.

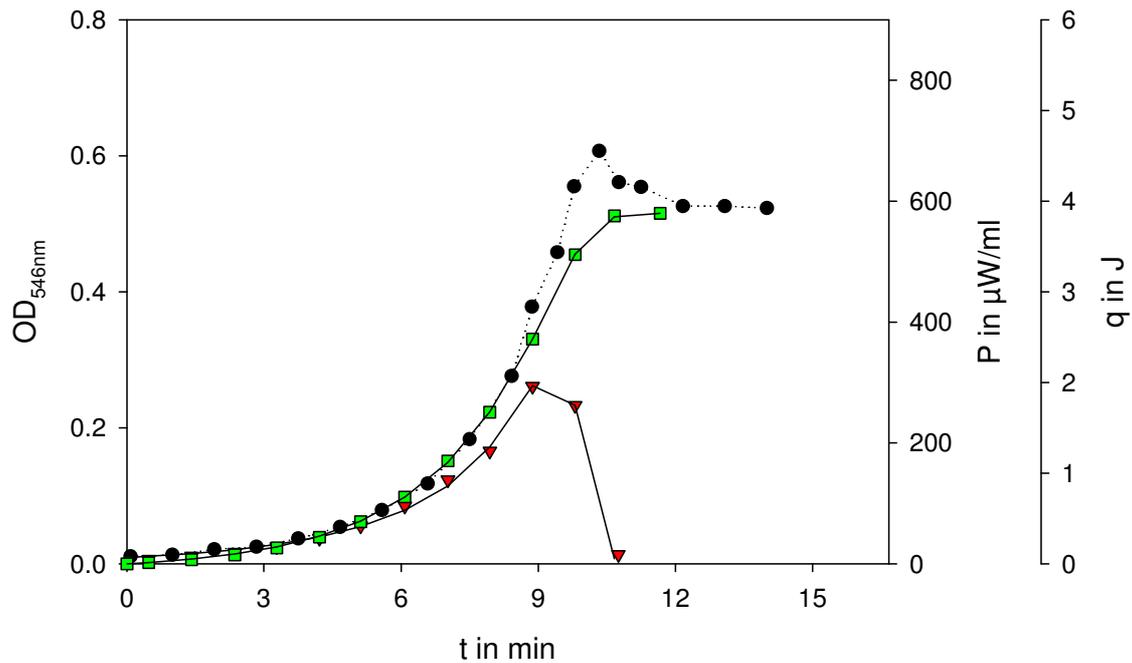


Abbildung 38: Wachstum von *P. putida* auf Phenol (2.5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit TAM-4ml (rot), Wärme (grün), durchgezogene Linie – mathematische Beschreibung (Andrews-Modell).

Abbildung 38 zeigt die Wachstumskurve von *P. putida* auf 2.5 mmol/l Phenol, aufgenommen mit dem TAM-4ml. Nach einer ausgeprägten exponentiellen Wachstumsphase und einem Maximum erreicht die Wärmeleistung (rot) wieder die Basislinie. Die berechnete Wärme (grün) hat einen mit der Optischen Dichte (schwarz) sehr gut übereinstimmenden Verlauf.

Die Reaktionsenthalpie für das Wachstum auf Phenol ist:

$$\Delta_R H = -1546 \text{ kJ / mol .}$$

Daraus lassen sich die Ertragsfaktoren errechnen:

$$Y_{X/S,g} = 0.83 \text{ g(Biomasse)/g(Phenol)}$$

$$Y_{X/S} = 0.51 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Phenol).}$$

Die Reaktionsenthalpie, bestimmt mit dem TAM-4ml, ist niedriger als die anderen zuvor genannten Werte. Der Wert liegt nicht mehr im Rahmen des Fehlers des TAM-20ml-Wertes.

Die durchgezogene Linie in der Abbildung stellt die mathematische Beschreibung der Wachstumskurve durch das Andrews-Modell dar.

Die kinetischen Parameter sind:

$$K_S = 20.4 \text{ mg/l}$$

$$\mu_{\max} = 0.697 \text{ h}^{-1}$$

$$K_I = 271 \text{ mg/l.}$$

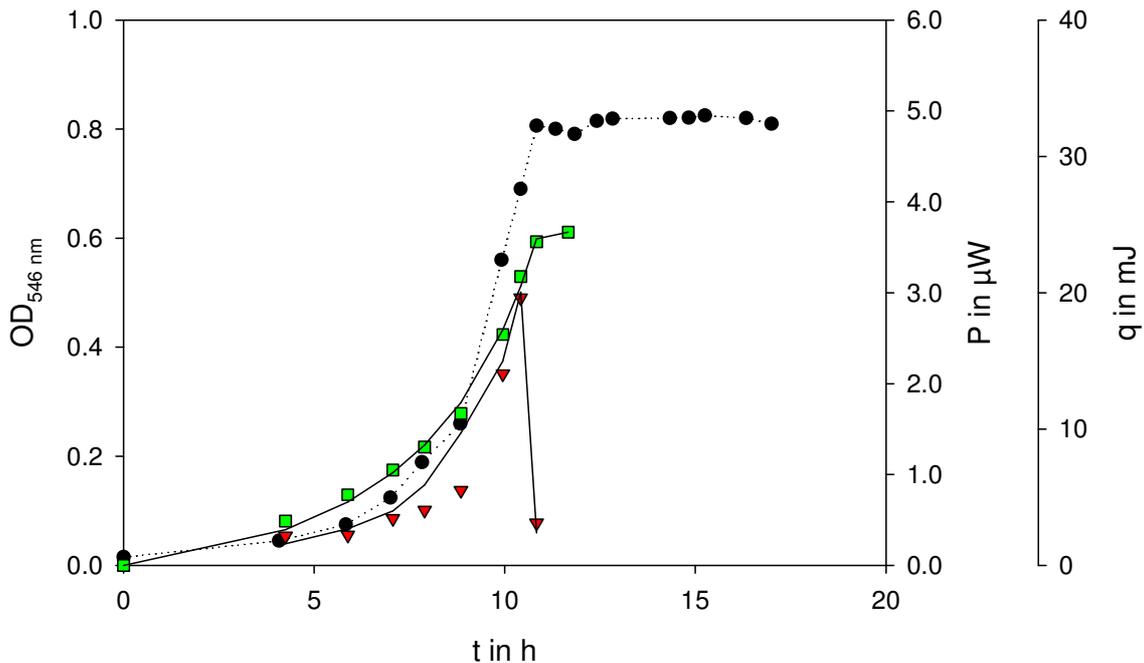


Abbildung 39: Wachstum von *P. putida* auf Phenol (5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit Chip-Kalorimeter (rot), Wärme (grün), durchgezogene Linie – mathematische Beschreibung (Andrews-Modell).

Die Abbildung 39 zeigt die Wachstumskurve von *P. putida* auf 5 mmol/l Phenol, aufgenommen mit dem Chip-Kalorimeter. Die Wärmeleistung (rot) zeigt nach der exponentiellen Wachstumsphase ein schnelles Abfallen der Leistung zurück auf die Basislinie. Der Verlauf der summarischen Signale, Wärme (grün) und Optische Dichte (schwarz) zeigen sowohl die exponentielle Wachstumsphase als auch die stationäre Phase an.

Die Reaktionsenthalpie für das Wachstum auf Phenol ist:

$$\Delta_R H = -815 \text{ kJ / mol .}$$

Die Reaktionsenthalpie ist nur halb so groß wie der Wert aus den Messungen mit dem TAM-20ml bzw. dem Erwartungswert aus den Schüttelkulturen. Aus der Reaktionsenthalpie lassen sich die Ertragsfaktoren errechnen:

$$Y_{X/S,g} = 1.24 \text{ g(Biomasse)/g(Phenol)}$$

$$Y_{X/S} = 0.76 \text{ C-mol(Biomasse)/C-mol(Phenol).}$$

Die berechneten Ertragsfaktoren sind viel zu groß und konnten praktisch nie ermittelt werden. Für die Berechnung der kinetischen Parameter wurde der Ertragsfaktor $Y_{X/S,g} = 0.7 \text{ g(Biomasse)/g(Phenol)}$ aus den Schüttelkulturen verwendet. Die kinetischen Parameter sind dann:

$$K_S = 1.4 \text{ mg/l}$$

$$\mu_{\max} = 0.56 \text{ h}^{-1}$$

$$K_I = 762 \text{ mg/l.}$$

Auch das Wachstum von *P. putida* auf Phenol konnte mit verschiedenen Kalorimetern nachvollzogen werden. Die ermittelten Ertragsfaktoren, aus den Schüttelkulturen bzw. dem TAM-20ml, von $Y_{X/S,g} = 0.71$ bzw. 0.76 g(Biomasse)/g(Phenol) stimmen im Fehlerbereich mit dem Wert aus Wang et al. (1996) überein. Die punktuellen Bestimmungen mit dem TAM-4ml bzw. Chip-Kalorimeter konnten den Wert nicht bestätigen.

Eine signifikante Verbesserung der mathematischen Beschreibung durch Verwendung des Monod-Modells konnte nicht erreicht werden. Sowohl beim Maximum als auch beim langsamen Ausklingen der Wärmeleistung kam es zu größeren Abweichungen.

Die kinetischen Parameter aus dem Andrews-Modell decken einen großen Wertebereich ab. Der Bereich passt zu den Werten aus Reardon et al. (2000) und Wang et al. (1996). Eine sichere Bestimmung war nicht möglich. Insbesondere im Bereich des Maximums (TAM-20ml) gab es größere Abweichungen zwischen der Messkurve und der mathematischen Beschreibung. Zudem ist dieser Bereich mit dem TAM-4ml und dem Chip-Kalorimeter nicht gut aufgelöst.

Ziel der Arbeit war ein Vergleich zwischen den verschiedenen Kalorimetern. Dennoch wurden weitere Modelle für die mathematische Beschreibung ausprobiert. Es zeigte sich teilweise eine bessere Übereinstimmung zwischen Experiment und Modellierung. Jedoch sind die zusätzlichen Parameter nicht mehr von biologischer Relevanz und wurden nicht weiter verfolgt.

4.6 Mikrobielle Aktivität nach einer Hungerphase

In den vorangegangenen Kapiteln (4.3 – 4.5) wurden die Ergebnisse einer einmaligen Zugabe eines Wachstumssubstrates aufgezeigt und diskutiert. Die Messgrößen thermische Leistung, aufgezeichnet durch verschiedene Kalorimeter, als auch die Optische Dichte, konnten die Wachstumskurve von *Pseudomonas putida* abbilden. Das Wachstum wurde anschließend mit mathematischen Modellen beschrieben.

Ein vorsätzlich hervorgerufener Stress lag im Rahmen der ersten Wachstumsphase nicht vor. Mit dem Übergang in die stationäre Phase (konstante Biomasse) tritt die Kultur bei Batch-Ansätzen immer in eine Hungerphase ein. Der Hunger-Stress stellt damit einen recht häufigen Fall von Stress in der mikrobiellen Umgebung dar. Auf Grund von unterschiedlichen Feuchtigkeitsgehalten, Niederschlägen, Nährstoffeintrag sind Bodenmikroorganismen mit wechselnder Nährstoffversorgung konfrontiert.

Im Rahmen der stationären Phase ist keine zeitliche Veränderung der Biomasse detektierbar. Sowohl die Optische Dichte als auch die Wärme verbleiben auf einem konstanten Niveau. Damit sind auch keine Aussagen bezüglich der mikrobiellen Aktivität beruhend auf der Gesamtbiomasse möglich. Es stellt sich dennoch die Frage nach einer möglichen Änderung der mikrobiellen Aktivität in dieser Phase. Für die Beantwortung der Frage muss eine zweite Substratzugabe erfolgen. Der darauf folgende Stoffumsatz kann für die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in der Hungerphase benutzt werden.

In der Optischen Dichte kann bei einer unveränderten mikrobiellen Aktivität (keine lag-Phase) nach einer Hungerphase ein sofortiger Anstieg registriert werden. Viel besser lässt sich aber die Wärmeleistung, als differentielles Signal, für das Erkennen der mikrobiellen Aktivität verwenden. Die Veränderung der Wärmeleistung geben Rückschlüsse auf das zu untersuchende System. Das Prinzip der Mehrfachzugaben von Substrat ist der Titrationskalorimetrie entlehnt.

4.6.1 Hungerphase bei *Pseudomonas putida*

Die Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse von zwei verschiedenen Wachstumsexperimenten von *P. putida* auf Natriumbenzoat. Gemeinsam haben die Experimente eine identische Gesamtsubstratkonzentration von Natriumbenzoat von 5 mmol/l. Der Unterschied liegt hierbei in der Anzahl der Substratzugaben: 1 oder 2. Das Angebot einer bestimmten Stoffmenge an Substrat realisiert die Bildung einer definierten Menge Bakterien

(Ertragsfaktor). Bei den blauen und grünen Messdaten (Doppelbestimmung) wurde die Konzentration je Zugabe halbiert (2.5 mmol/l). Dementsprechend erreichten diese Kulturen nur die halbe Optische Dichte nach der ersten Wachstumsphase. Die zweite Zugabe erfolgte nach 24.3 Stunden (Pfeil). Am Ende dieser Wachstumsphase wurde eine mittlere Optische Dichte erreicht, die der Optischen Dichte des Wachstumsexperimentes mit nur einer Substratzugabe entspricht. Dieses Ergebnis und die gute Reproduzierbarkeit zeigen, dass es summarisch keinen Unterschied zwischen einer und zwei Wachstumsphasen gibt. Der mikrobielle Ertrag ist damit identisch.

Im zeitlichen Verlauf ist zu erkennen, dass der zweite Anstieg der Optischen Dichte deutlich verzögert nach 3.4 Stunden stattfindet. Das verzögerte Wachstum der Kultur zeigt damit die verringerte mikrobielle Aktivität an.

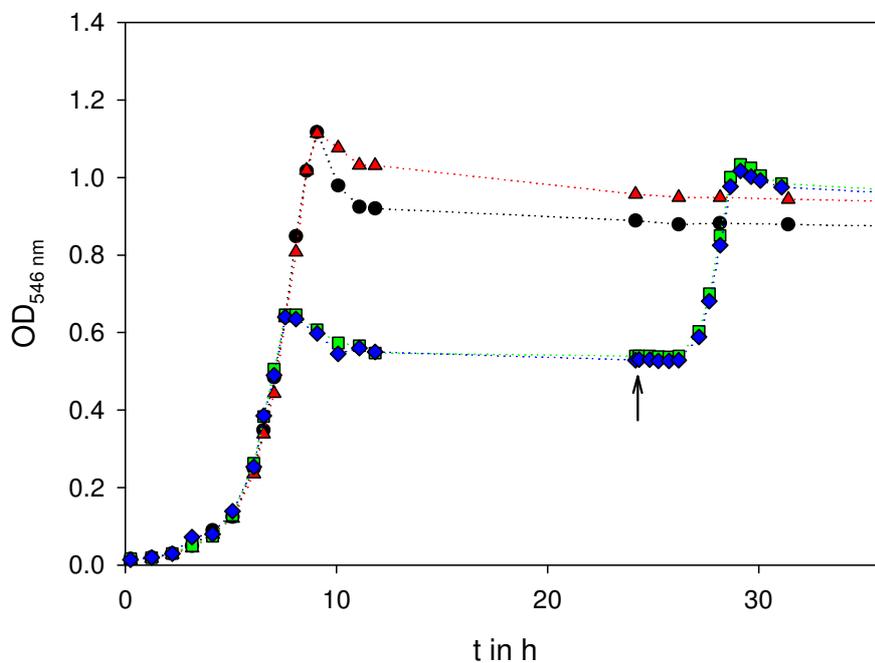


Abbildung 40: Wachstums von *P. putida* auf Natriumbenzoat (Doppelbestimmung), 5 mmol/l (rot, schwarz), zwei mal 2.5 mmol/l (blau, grün).

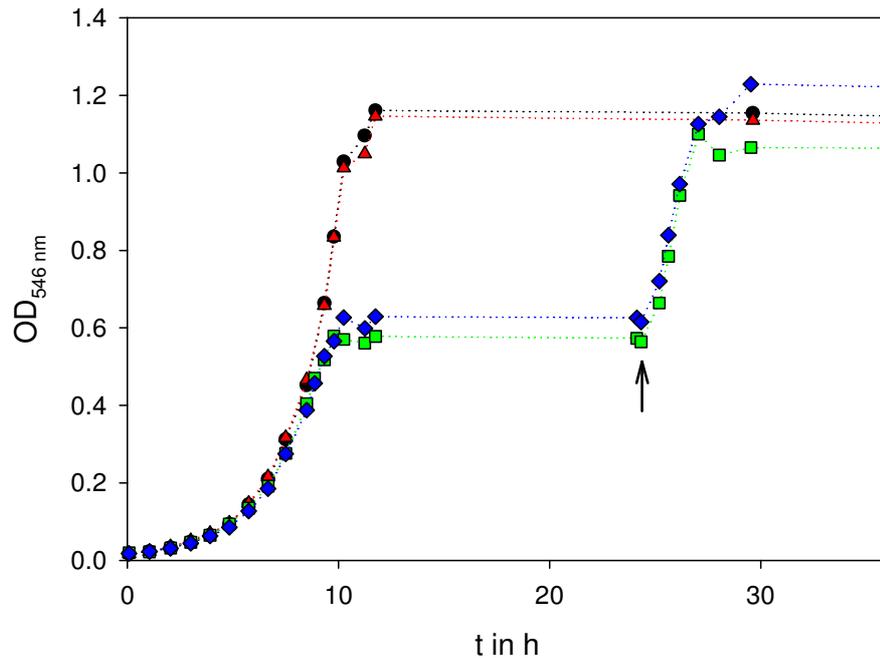


Abbildung 41: Wachstums von *P. putida* auf Glucose (Doppelbestimmung), 5 mmol/l (rot, schwarz), zwei mal 2.5 mmol/l (blau, grün).

Zum Vergleich wurde das Experiment mit Glucose wiederholt. Das Ergebnis ist in Abbildung 41 dargestellt. Auch bei diesem Experiment wurde nach 24.3 Stunden (Pfeil) die zweite Zugabe getätigt. Wieder zeigt sich, die gute Reproduzierbarkeit und dass das summarische Signal der Optischen Dichte am Ende der Wachstumsexperimente unabhängig ist von der Anzahl der Substratzugabe. Im Unterschied zu den Versuchen mit Natriumbenzoat ist sehr gut zu erkennen, dass die Optische Dichte nach der zweiten Zugabe unverzüglich ansteigt, damit trat kein Verlust an mikrobieller Aktivität während der Hungerphase ein.

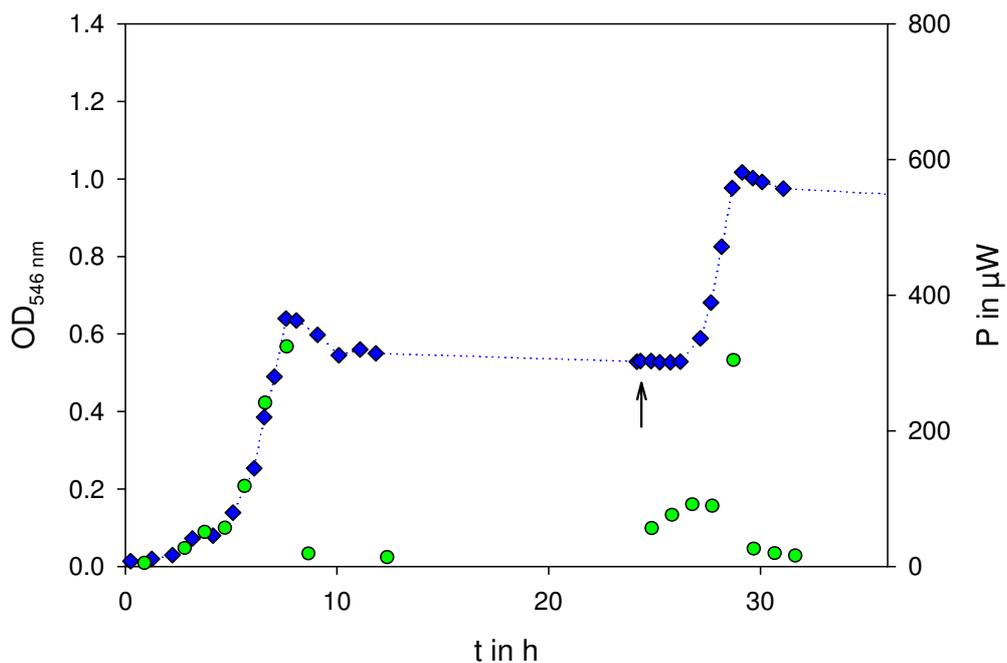


Abbildung 42: Wachstums von *P. putida* auf 2 mal 2.5 mmol/l Natriumbenzoat, blau – Optische Dichte, grün – Wärmeleistung (TAM-4ml).

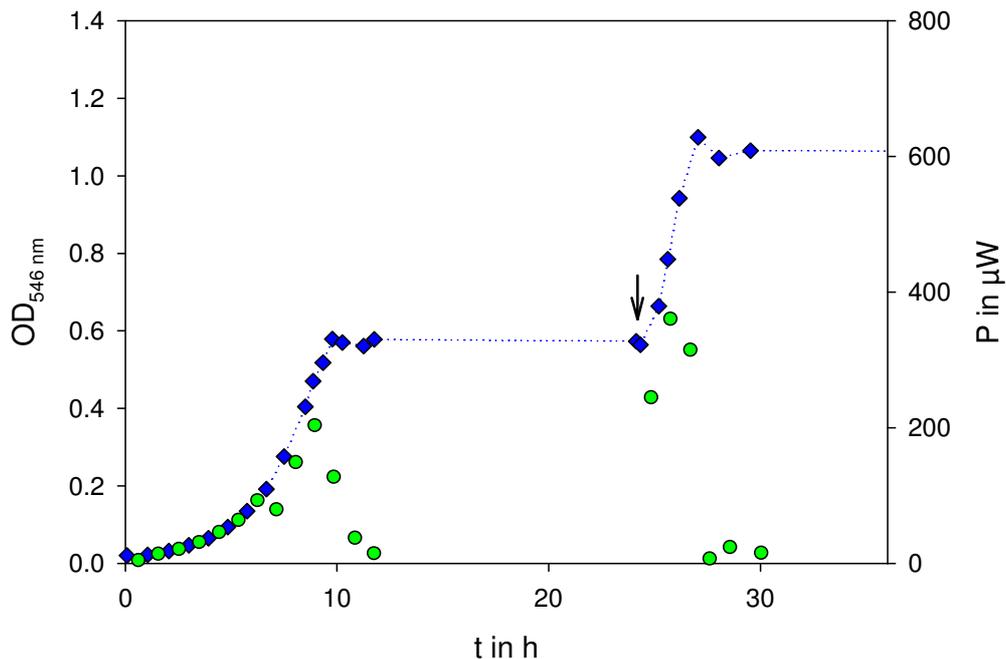


Abbildung 43: Wachstums von *P. putida* auf 2 mal 2.5 mmol/l Glucose, blau – Optische Dichte, grün – Wärmeleistung (TAM-4ml).

Das unterschiedliche Verhalten von *P. putida* auf den Hungerstress bei Einsatz verschiedener Wachstumssubstrate ist auch in den kalorimetrischen Messkurven (Abbildung 42 und Abbildung 43) ganz deutlich zu erkennen. Dafür wurde die mikrobielle Wärmeproduktion mit Hilfe des Kalorimeter TAM-4ml bei diesen Experimenten aufgenommen.

Die Wärmeleistungsproduktion der zweiten Wachstumsphase ist bei der Beurteilung der Entwicklung der mikrobiellen Aktivität entscheidend. Nach der Wärmeleistungsproduktion in der ersten Wachstumsphase fällt die Wärmeleistung bei beiden Wachstumssubstraten auf Null zurück. Nach einer Hungerphase erfolgt die zweite Substratzugabe und eine erneute Wärmeleistungsproduktion startet. Die Größe des Anstieges ist stark abhängig vom verwendeten Substrat. Während bei Glucose der Anstieg der Wärmeleistung sofort erfolgte (Abbildung 43), nimmt die Wärmeleistung bei Natriumbenzoat nur langsam zu. Ein deutlicher Anstieg erfolgt erst mit der Zunahme der Optischen Dichte (Abbildung 42). Das Ergebnis zeigt deutlich, dass die mikrobielle Aktivität auf Natriumbenzoat im Laufe der Hungerphase abnimmt, während die Aktivität auf Glucose konstant blieb.

Bei beiden Kurven korreliert das Wärmeleistungsmaximum mit dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Anschließend fällt die Wärmeleistung wie in der ersten Wachstumsphase auf Null ab.

Problematisch ist bei den Messungen mit dem TAM-4ml die punktuelle Erfassung der Wärmeleistung. Dennoch zeigt sich sehr deutlich, dass die Wärmeleistung zu Beginn der

zweiten Wachstumsphase ein entscheidendes Kriterium für die Beurteilung der Veränderung der mikrobiellen Aktivität in der Hungerphase ist. Die verwendeten Kalorimeter stellen dazu verschiedene Strategien für den Zugang zur Wärmeleistung nach der zweiten Substratzugabe zur Verfügung.

4.6.2 *Pseudomonas putida* Hungerstress auf Natriumbenzoat

4.6.2.1 TAM-20ml

Die Abbildung 44 zeigt das zweifache Wachstum von *P. putida* auf zwei Natriumbenzoat-Zugaben. Die erste Wachstumsphase wurde schon in Abbildung 20 beschrieben. Nach der ersten Wachstumsphase schließt sich nun eine Hungerphase an, bis durch eine zweite Substratzugabe eine weitere Wachstumsphase ausgelöst wird. Zum Start der zweiten Phase kann die Startwärmeleistung P_0 abgelesen werden. In der Grafik ist ein Ausschnitt aus den Messdaten abgebildet, der die Bestimmung der Startwärmeleistung noch einmal ausführlicher darstellt.

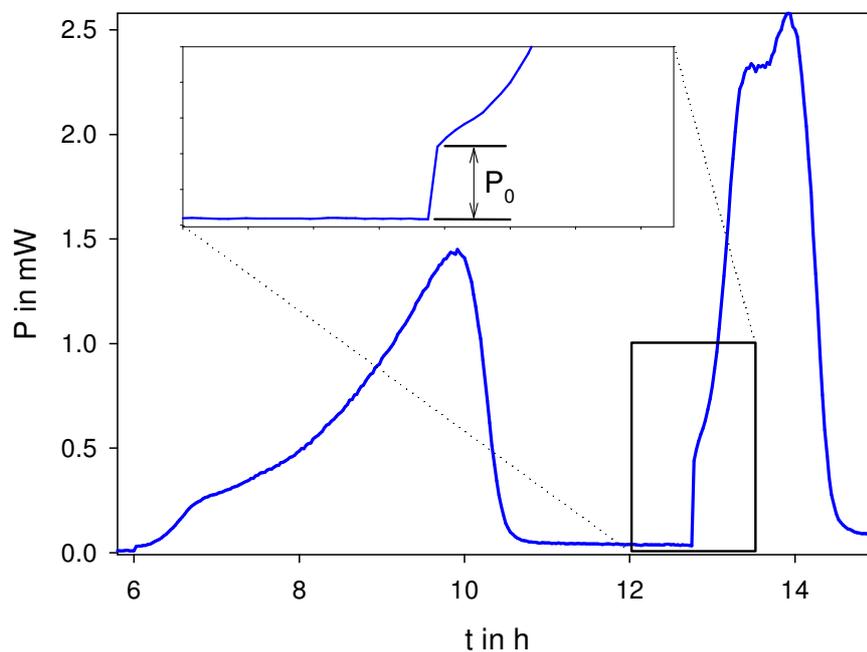


Abbildung 44: Zweifaches Wachstum von *P. putida* auf Natriumbenzoat (0.33 mmol/l bzw. 5 μ mol), Wärmeleistung aufgezeichnet mit TAM-20ml, Hungerdauer: 171 min, Ausschnitt von 12 bis 13.5 h.

Nach dem sprunghaften Anstieg P_0 erfolgt eine schnelle Zunahme der Wärmeleistung bis zu einem kurzen Plateau, um dann das Wärmeleistungsmaximum zu erreichen. Ohne weiteren thermischen Effekt wird darauffolgend der Basislinienwert erreicht.

Der Vergleich der beiden Wärmeleistungmaxima zeigt eine Erhöhung der Wärmeleistung und damit der mikrobiellen Aktivität in der zweiten Wachstumsphase an. Diese Zunahme kann mit der ansteigenden Biomasse während der zweiten Wachstumsphase im Vergleich zur ersten Wachstumsphase erklärt werden.

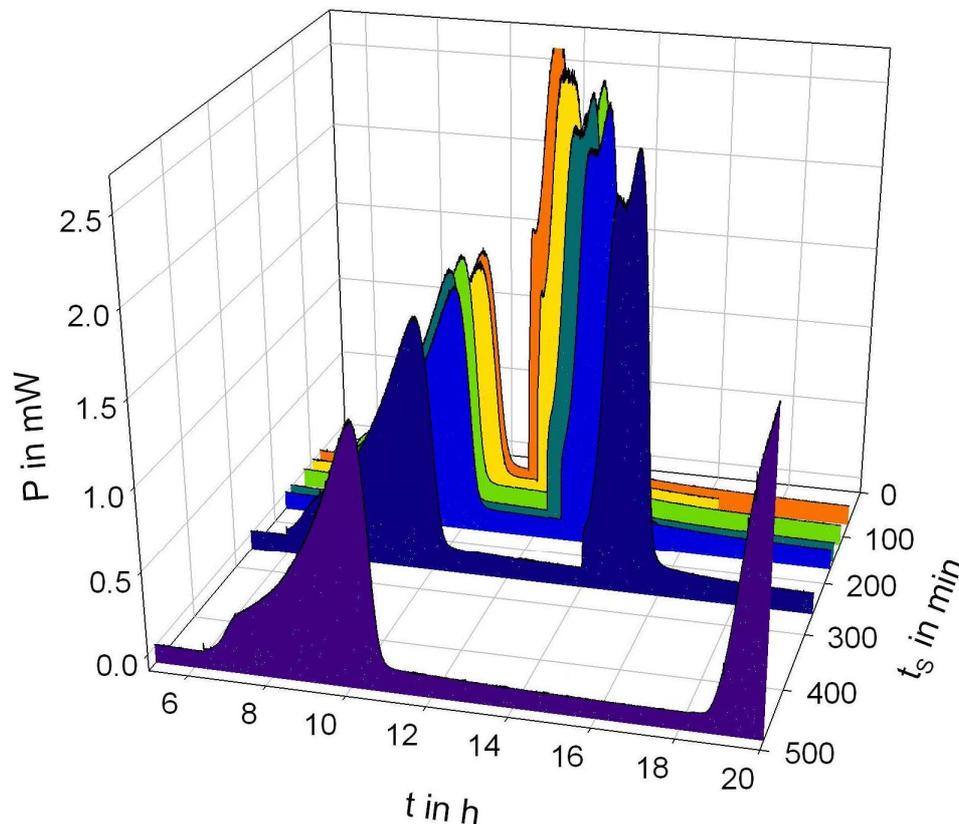


Abbildung 45: Zweifaches Wachstum von *P. putida* auf Natriumbenzoat (0.33 mmol/l bzw. 5 μ mol), Wärmeleistung aufgezeichnet mit TAM-20ml, Hungerphase: von 73 bis 485 min.

In der Abbildung 45 sind die Messdaten von sieben Wachstumsexperimenten zusammengestellt. Dabei erfolgte in jedem Experiment ein doppeltes Wachstum durch zwei Zugaben von Natriumbenzoat. Die Experimente unterscheiden sich in der Zeitdauer zwischen den Substratzugaben. Auf diese Weise ergaben sich unterschiedlich lange Hungerphasen im Bereich von 73 bis 485 Minuten. Die Hungerdauer t_s wurde dabei als Zeit zwischen dem Wärmeleistungsmaximum und der zweiten Zugabe definiert.

Die orange Messkurve mit der kürzesten Hungerphase zeigt einen Wert für die Startwärmeleistung P_0 der höher ist als der maximale Wärmeleistungswert der ersten Wachstumsphase. Hierbei ist also die mikrobielle Aktivität am Anfang der Wachstumsphase gleich bzw. leicht höher im Vergleich zur ersten Wachstumsphase.

Sehr deutlich kann man in dieser Abbildung erkennen, dass die Startwärmeleistung markant von der Dauer der Hungerphase (t_S) abhängt. Dies wird in der Abbildung 46 nochmals sehr anschaulich dargestellt (orange \rightarrow violett). Aufgetragen ist dabei die exponentielle Abnahme der Startwärmeleistung in Abhängigkeit von der Dauer der Hungerphase. Die Startwärmeleistungen sind analog den Messkurven der Abbildung 45 farblich dargestellt. Entsprechend Gleichung (1) konnte eine Deaktivierungsrate von

$$k_D = 0.55 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$$

ermittelt werden.

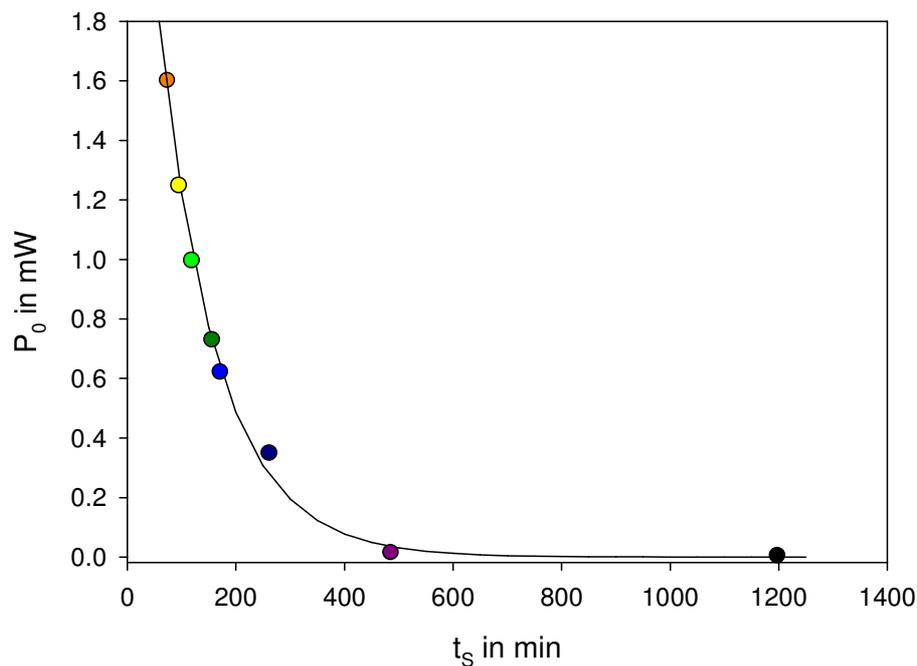


Abbildung 46: Exponentieller Zusammenhang zwischen Startwärmeleistung P_0 (TAM-20ml) und Zeitdauer der Hungerphase bei *P. putida* mit Natriumbenzoat als Wachstumssubstrat.

Die Aufnahme eines solchen Zusammenhanges im TAM-20ml benötigt einen großen Zeitrahmen. Dabei bilden der immer wieder notwendige erste Schritt der ersten Wachstumsphase und die Temperierzeit den größten zeitlichen Bedarf. Für jeden einzelnen Punkt in Abbildung 46 ist daher ein kalorimetrisches Experiment mit Vorkultivierung notwendig gewesen. Es wurde deshalb nach einer alternativen kalorimetrischen Messung gesucht.

4.6.2.2 TAM-4ml und Chip-Kalorimeter

Beide Kalorimeter messen die Wärmeleistung einer externen Kultivierung. Damit ist es möglich, an einer einzigen Kultivierung sowohl Wachstum, als auch den Hungerstress

aufzuzeichnen. Für diese Untersuchungen wurde eine Batch-Kultivierung (Schüttelkultur auf Natriumbenzoat) in der anschließenden stationären Phase verwendet. Die Kultivierung erzeugt in der stationären Phase keine Wärmeleistung. Durch Zugabe von Natriumbenzoat in die zu messende Probe wird ein weiteres Wachstum ausgelöst. Dieses Wachstum erfolgt nur in der Probe und nicht in der eigentlichen Kultur, sodass diese weiter hungert.

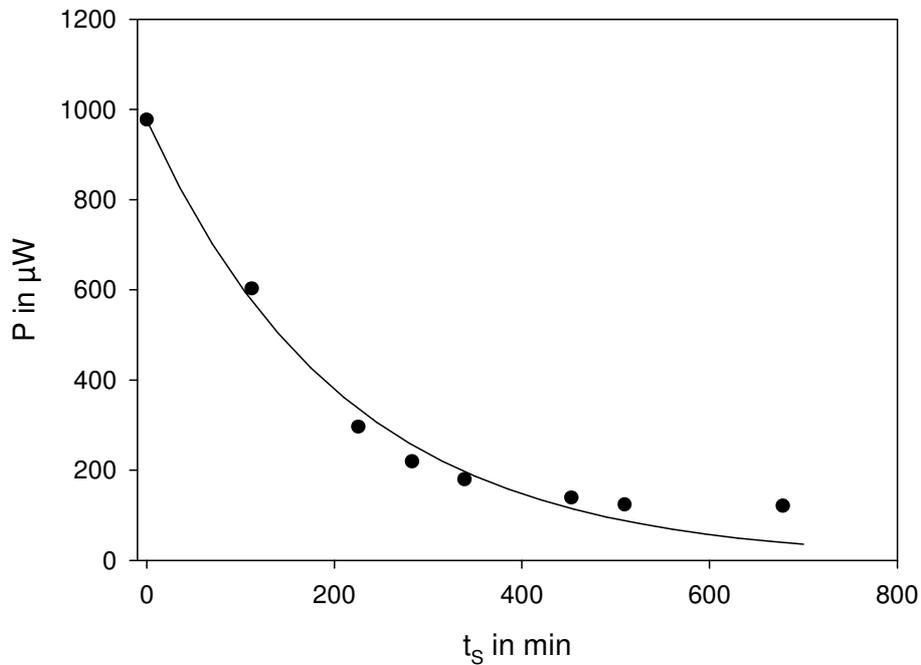


Abbildung 47: Exponentieller Zusammenhang zwischen Wärmeleistung (TAM-4ml) und Zeitdauer der Hungerphase bei *P. putida* mit Natriumbenzoat als Wachstumssubstrat.

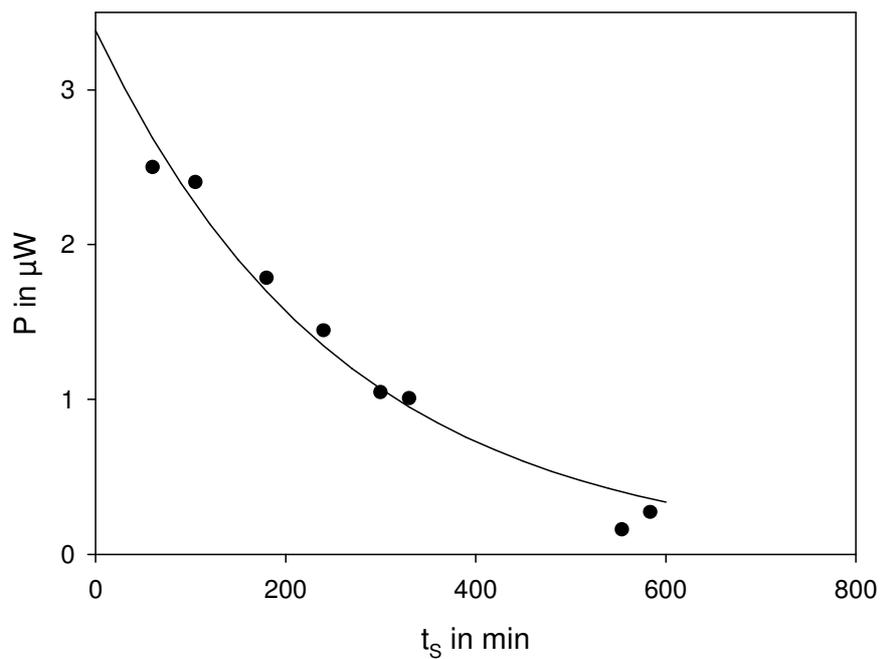


Abbildung 48: Exponentieller Zusammenhang zwischen Wärmeleistung (Chip-Kalorimeter) und Zeitdauer der Hungerphase bei *P. putida* mit Natriumbenzoat als Wachstumssubstrat.

Die Abbildung 47 zeigt die exponentielle Abnahme der Wärmeleistung, aufgenommen durch das Kalorimeter TAM-4ml in der Hungerphase durch Zugabe von Natriumbenzoat in die Messprobe. Der analoge Zusammenhang für Messdaten, die mit dem Chip-Kalorimeter aufgenommen wurden, ist in Abbildung 48 dargestellt.

Beide Kalorimeter konnten den Abfall der mikrobiellen Aktivität auf Natriumbenzoat in der Hungerphase detektieren. Die Werte für die Deaktivierungsraten sind:

$$\text{TAM-4ml: } k_D = 0.284 \pm 0.022 \text{ h}^{-1}$$

$$\text{Chip: } k_D = 0.231 \pm 0.023 \text{ h}^{-1}$$

Im Rahmen des Fehlers stimmen die beiden Werte gut überein.

4.6.2.3 Micro-DSC II

Unter der Verwendung der MDSC-Anordnung mit einmaligem Durchfluss (Kapitel 3.1.2) lässt sich generell eine Untersuchung der Deaktivierung in der Hungerphase durchführen. Dabei wurde die Probe nicht im Kreislauf geführt, sondern durch die kalorimetrische Zelle und in das Abfallgefäß gepumpt. Für die Aktivitätsmessung wurde die Probe außerhalb der Messzelle mit Natriumbenzoat angereichert. Damit wurde sichergestellt, dass die originale Kultur weiter hungert und nur die zu messende Probe das Substrat erhält.

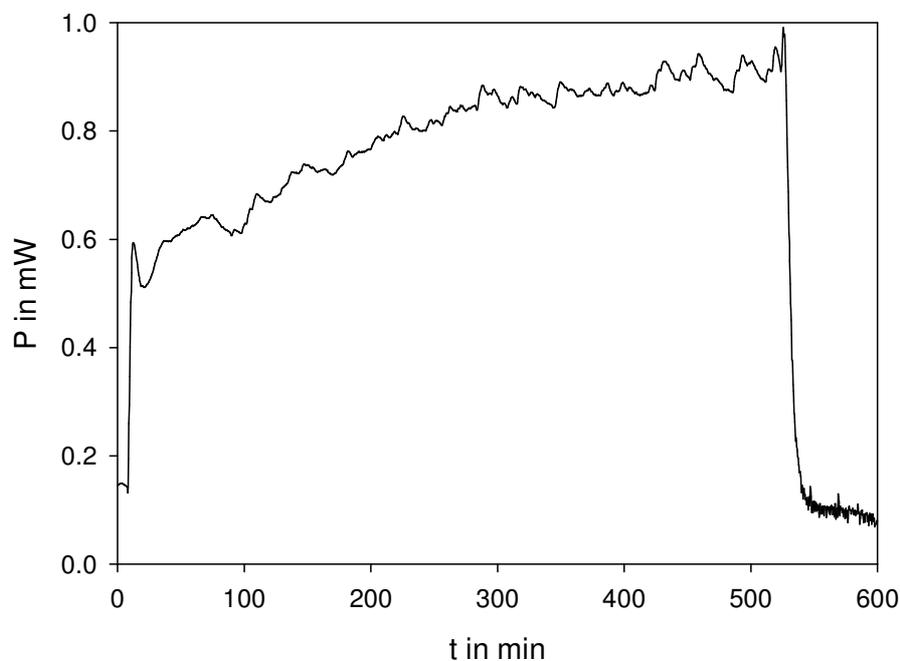


Abbildung 49: Zusammenhang zwischen Wärmeleistung (MDSC) und Zeitdauer der Hungerphase bei *P. putida* mit Natriumbenzoat als Wachstumssubstrat.

Die Abbildung 49 zeigt das Resultat des Experimentes. Wie zu erkennen ist, wurde über eine Zeitdauer von 500 Minuten eine leicht steigende Wärmeleistung detektiert. Anschließend fällt die Wärmeleistung auf Grund des abgestellten Substratzufusses auf Basisniveau ab. Wiederholungsmessungen bestätigten das Ergebnis. Dieses widerspricht aber den Resultaten der anderen Untersuchungen mit dem TAM-20ml, TAM-4ml und dem Chip-Kalorimeter, die eine Abnahme der mikrobiellen Aktivität in der Hungerphase anzeigen (Abbildung 46-Abbildung 48).

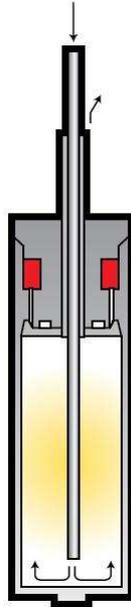


Abbildung 50: Schematischer Aufbau der Durchflusszelle der Micro-DSC II, aus der Produktbroschüre von Setaram.

Die Erklärung des Widerspruches bei der Verwendung der MDSC-Anordnung ist im Aufbau der kalorimetrischen Messzelle zu suchen. Der schematische Aufbau ist in der Abbildung 50 dargestellt. Das relativ große Volumen (bis zu 750 μl) und die Führung des Durchflusses durch die Zelle (unten Einlass, oben Auslass) sind positiv für die Detektion der Wärmeleistung mikrobieller Proben im Kreislauf (siehe Kapitel 4.1.4). Für örtlich sowie zeitlich sich verändernde mikrobielle Proben treten allerdings Probleme auf. Durch das Absetzen von Biomasse und die Rückvermischung (u. a. durch aufsteigende Gasblasen) kann kein konstanter laminarer Fluss der mikrobiellen Probe gewährleistet werden. Damit wird nicht die immer weiter deaktivierte mikrobielle Probe vermessen, sondern eine Mischung aus Mikroorganismen, die sich schon länger in der stationären Phase befinden und Mikroorganismen, die wiederum neues Substrat (Natriumbenzoat) zum verstoffwechseln haben. Damit fällt dieses Kalorimeter für weitere Untersuchungen der Aktivität in der Hungerphase in der Durchflussanordnung aus.

4.6.2.4 Zusammenfassung

Die Kalorimeter TAM-20ml, TAM-4ml und Chip-Kalorimeter sind für die Detektion der abnehmenden mikrobiellen Aktivität in der Hungerphase bestens einsetzbar. Alle Messungen mit den drei Kalorimetern konnten dieses Ergebnis bestätigen.

Das TAM-20ml liefert sehr akkurate Ergebnisse, die zudem noch mehr Informationen bieten können (vollständige zweite Wachstumsphase). Jedoch wird hierfür sehr viel Zeit und Kultivierungsaufwand benötigt. Durch die begrenzte Wärmeleistungsaufnahme (max. 0.2 W/l) und den damit verbundenen Einschränkungen bei den Experimenten (geringere Substratkonzentrationen) ist ein direkter Vergleich mit den anderen Kalorimetern problematisch.

Die Kalorimeter TAM-4ml und Chip-Kalorimeter haben den entscheidenden Vorteil der zügigen Detektion der Wärmeleistung. Damit war es möglich, die Abnahme der Aktivität mit nur einer Kultivierung durchzuführen. Jedoch sind weitere Auswertungen (Wärme q) durch das Fehlen der zweiten vollständigen Wachstumsphase nicht möglich.

Bei den Messungen mit der MDSC konnte auf Grund der Messzellenkonstruktion keine kontinuierliche Aufnahme der abnehmenden mikrobiellen Aktivität erreicht werden. Das oben beschriebene Problem ist nur im Rahmen der verwendeten Anordnung kritisch. Wird die Probe im Kreislauf geführt, ist die Rückvermischung unproblematisch, da von einer homogenen mikrobiellen Kultur im gesamten System ausgegangen werden kann.

Eine Deaktivierungsrate k_D für *Pseudomonas putida* und Natriumbenzoat ist nicht bekannt. Daher kann nur die Größenordnung von Deaktivierungsraten verglichen werden. Johnson et al. (2006) stellten Deaktivierungsraten für z. B. *P. putida* F1, *P. putida* mt2 und *Ralstonia pickettii* PKO1 auf Toluol vor. Diese liegen im Bereich von 0.02 bis 0.2 h⁻¹. Die Größenordnung für Deaktivierungsraten überdeckt einen weiten Bereich. Die kalorimetrisch erfassten Raten passen gut in diesen Rahmen.

4.6.3 *Pseudomonas putida* Hungerstress auf Glucose

Für diese Untersuchungen wurden die drei Kalorimeter TAM-20ml, TAM-4ml und Chip-Kalorimeter eingesetzt.

Die Abbildung 51 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Kalorimeter TAM-20ml. Jedes Experiment besteht wieder aus zwei Wachstumsphasen. Die gut reproduzierbare erste Wachstumsphase stellt dabei den Ausgangszustand für die anschließende Hungerphase her.

Die Dauer der Hungerphase umfasst eine weite Spanne von 5.4 bis 43.2 Stunden. Diese Phase wird durch die zweite Substratzugabe und damit anschließende Wachstumsphase beendet. Die Startwärmeleistung der zweiten Wachstumsphase wird für die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität am Ende der Hungerphase herangezogen. Die Startwärmeleistungen sind für die einzelnen Wachstumskurven durch einen roten Punkt markiert.

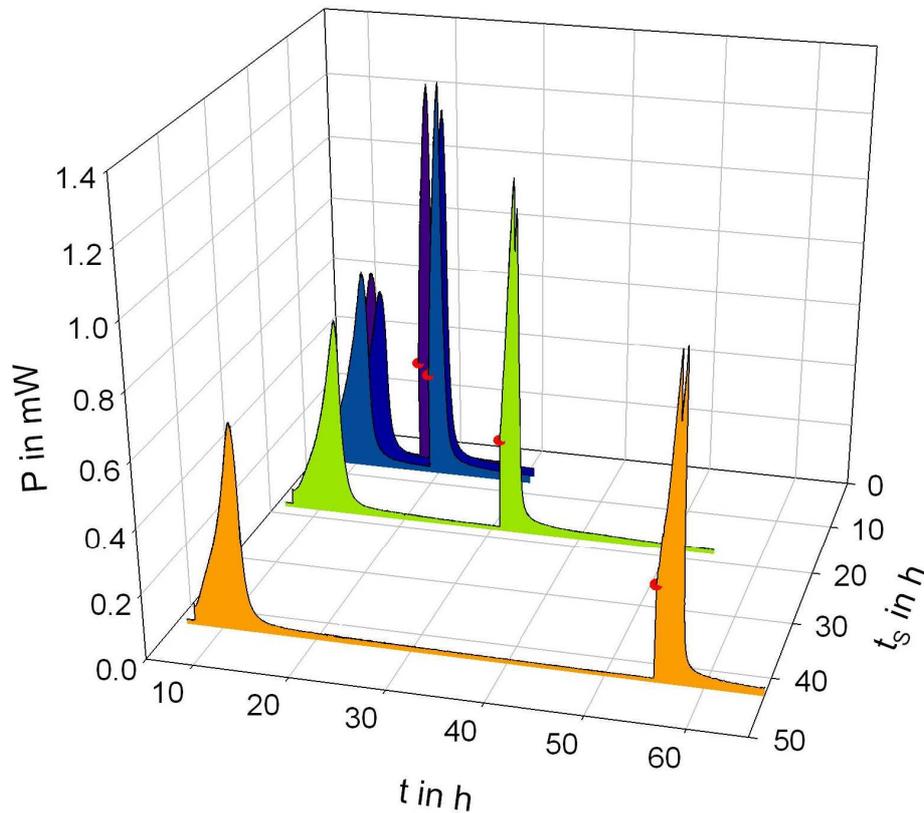


Abbildung 51: Zweifaches Wachstum von *P. putida* auf Glucose (0.33 mmol/l bzw. 5 μ mol), Wärmeleistung aufgezeichnet mit TAM-20ml, Hungerdauer: von 5.4 bis 43.2 h, Startwärmeleistung mit roten Punkt markiert.

Vergleicht man die Abbildung 51 mit der Abbildung 45 erkennt man sehr deutlich die Unterschiede zwischen den Substraten Glucose und Natriumbenzoat. Trotz der fünfmal längeren Dauer der Hungerphase ist keine entscheidende Abnahme der Aktivität bzw. der Startwärmeleistung festzustellen. Bei Glucose verbleibt der Wert bei etwa 300 μ W über einen Bereich von über 40 Stunden (rote Punkte).

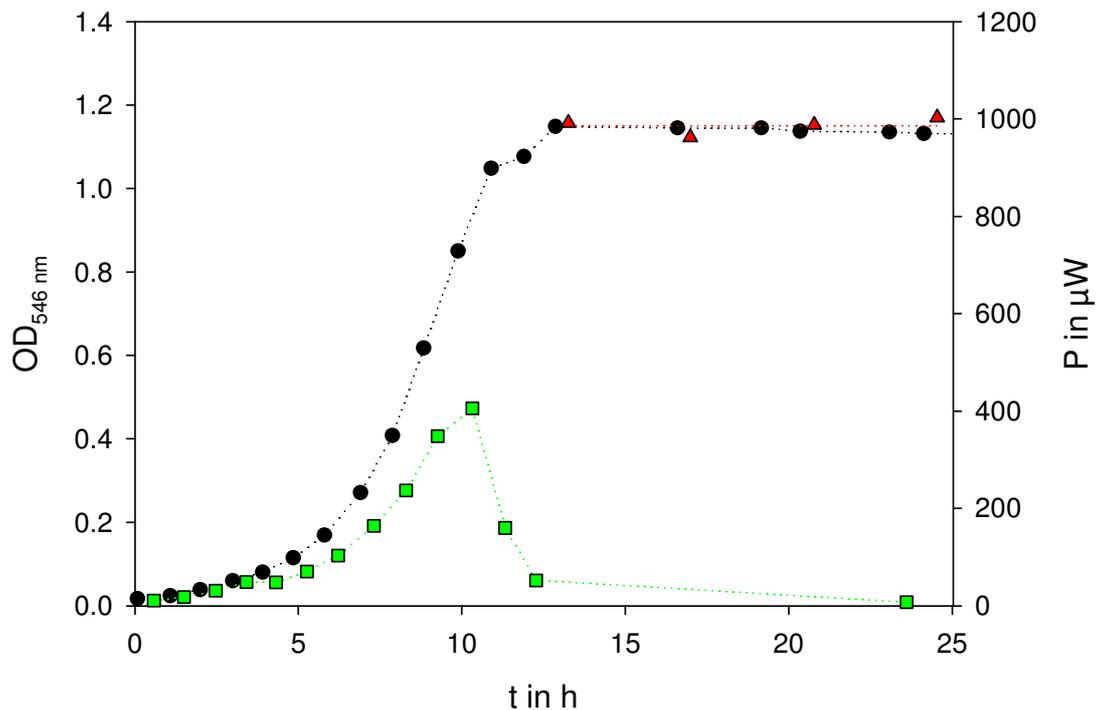


Abbildung 52: Wachstum und stationäre Phase von *P. putida* auf Glucose (5 mmol/l), Detektion der Wärmeleistung mit TAM-4ml, grün – Wärmeleistung der Kultur, rot – Wärmeleistung der Probe mit Glucosezusatz (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte.

Die Nutzung von den Kalorimetern TAM-4ml und Chip gestattet durch die externe Kultivierung und schnelle punktuelle Wärmeleistungsmessung sowohl die Untersuchung der externen Kultur, als auch die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität nach zweiter Substratzugabe. Die Abbildung 52 zeigt eine Wachstumskurve, detektiert durch die Optischen Dichte (schwarz) und die Wärmeleistung (TAM-4ml, grün). Nach dem Ende der ersten Wachstumsphase (nach 12 Stunden) konnte nur ein sehr niedriger Wärmeleistungswert in der externen Kultur gemessen werden. Nach 24 Stunden ist dieser Wert vom Wert der Basislinie nicht mehr zu unterscheiden.

Bei den roten Messpunkten wurde der Probe frische Glucoselösung zugesetzt (Endkonzentration $c_{\text{Glc}} = 5 \text{ mmol/l}$) und damit ein zweites Wachstum in der Probe ausgelöst. Dabei ist zu erkennen, dass der Wert über zehn Stunden nach dem Ende der ersten Wachstumsphase konstant bleibt. Im Vergleich zu den Werten mit Natriumbenzoat war in diesem Zeitraum schon ein Großteil der mikrobiellen Aktivität verloren gegangen (siehe Abbildung 47).

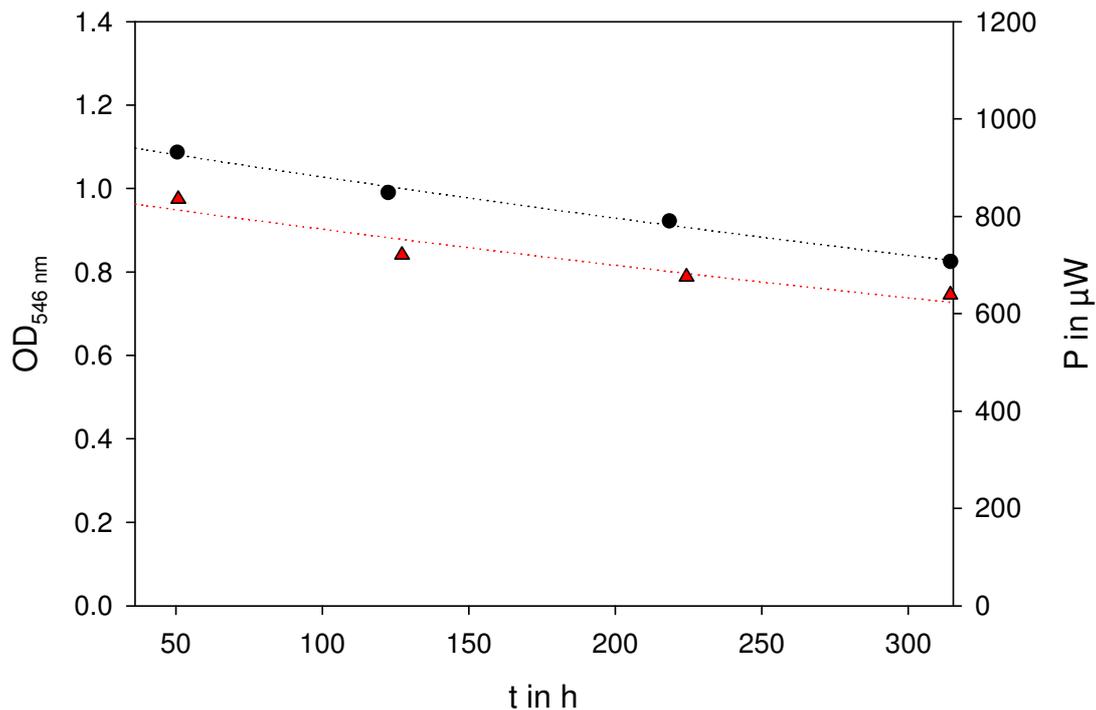


Abbildung 53: Fortsetzung der Messung aus Abbildung 52, Detektion der Wärmeleistung mit TAM-4ml, rot – Wärmeleistung der Probe mit erneutem Glucosezusatz (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte.

Die Messreihe wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen fortgeführt. Über diesen sehr großen Zeitraum sind sowohl die Optische Dichte, das summarische Signal für die Bakterienkonzentration, als auch das Signal der Wärmeleistung als Größe für die mikrobielle Aktivität nicht konstant. Beide zeigen einen nahezu gleichen abfallenden Verlauf. Die mathematische Beschreibung eines Abfalls (Gleichung (1)) ergab folgende Werte:

$$\text{Thermische Leistung: } k_D = 0.001 \pm 0.0002 \text{ h}^{-1} \quad r^2 = 0.92$$

$$\text{Optische Dichte: } k_D = 0.00101 \pm 0.000073 \text{ h}^{-1} \quad r^2 = 0.99$$

Die Werte passen sehr gut zueinander. Sowohl die Optische Dichte als auch die Wärmeproduktion sind proportional der mikrobiellen Konzentration. Der Unterschied ist, dass die Optische Dichte ein summarisches Signal über die Biomasse liefert, während die Wärmeleistung die Glucose abbauende Biomasse repräsentiert. Beide Werte zeigen deutlich einen langsameren Abfall im Vergleich zum schnellen Abfall der Natriumbenzoat-Aktivität an, was auf ein Überleben der Kultur mit verringerter Aromaten-Aktivität hinweist.

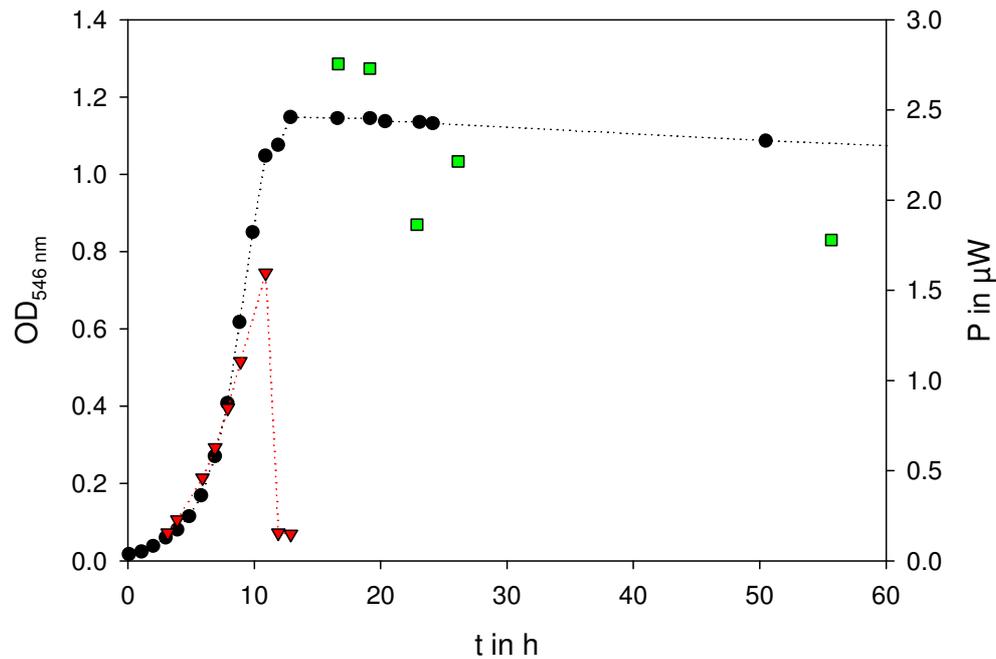


Abbildung 54: Wachstum und stationäre Phase von *P. putida* auf Glucose (5 mmol/l), Detektion der Wärmeleistung mit Chip-Kalorimeter, rot – Wärmeleistung der Kultur, grün – Wärmeleistung der Probe mit erneutem Glucosezusatz (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte.

Die Abbildung 54 zeigt das Wachstum und die mikrobielle Aktivität in der stationären Phase von *P. putida* auf Glucose, aufgenommen mit dem Chip-Kalorimeter. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Chip-Kalorimeter bestätigen ebenfalls eine nahezu konstante mikrobielle Aktivität während der Hungerphase auf Glucose.

Die Wärmeleistung am Ende der Wachstumsphase in der Probe fällt erwartungsgemäß zurück auf Basislinienniveau (rote Punkte). Erst mit der Zugabe von Glucose in die zu messende Probe (Endkonzentration $c_{\text{Glc}} = 5 \text{ mmol/l}$) ist die vorhandene mikrobielle Aktivität zu erkennen. Im Rahmen der circa 50 Stunden bleibt die mikrobielle Aktivität nahezu beständig. Die geringe Messpunktanzahl und die Streuung lassen eine mathematische Beschreibung des zeitlichen Verlaufes der mikrobiellen Aktivität nicht zu.

4.6.4 *Pseudomonas putida* Hungerstress auf Phenol

Für die Messung mit dem TAM-20ml wurde wieder auf die Untersuchungsmethode mit zwei vollständigen Wachstumsphasen zurückgegriffen. Die Abbildung 55 zeigt acht Wachstumsexperimente mit unterschiedlich langen Hungerphasen von 2.5 bis 16.6 Stunden. Die erste Wachstumsphase ist gut reproduzierbar und stellt damit gleichzeitig den Ausgang

für die anschließende Hungerphase dar. Die Startwärmeleistung P_0 ist stark abhängig von der Dauer der Hungerphase.

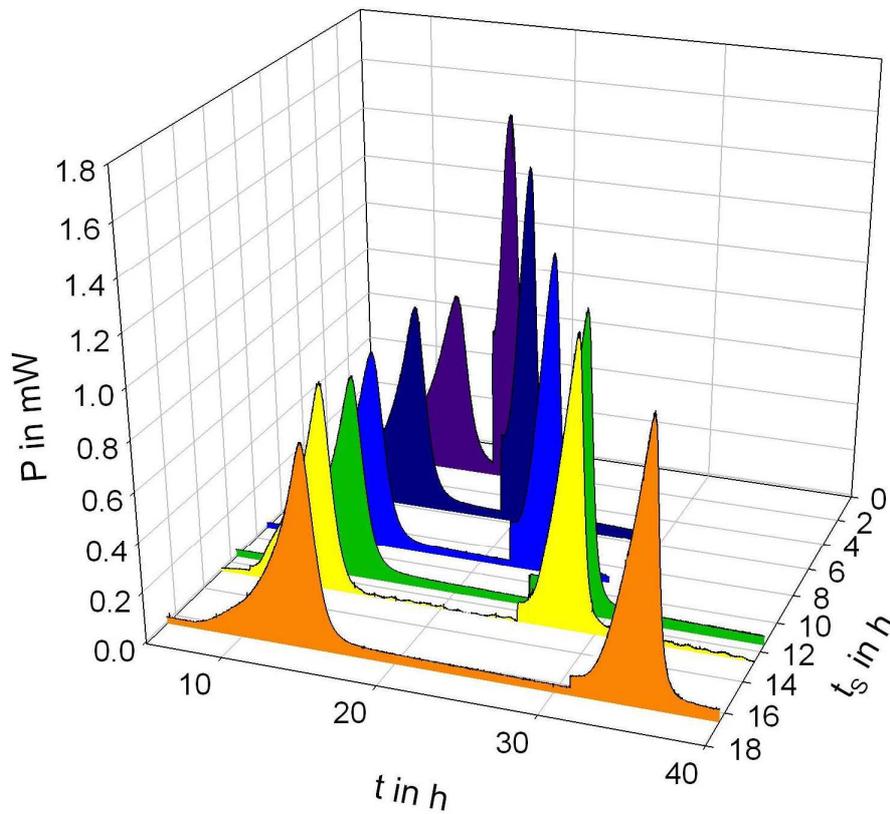


Abbildung 55: Zweifaches Wachstum von *P. putida* auf Phenol (0.33 mmol/l bzw. 5 μ mol), Wärmeleistung aufgezeichnet mit TAM-20ml, Hungerphase: von 2.5 bis 16.6 h.

Bei der kleinsten Dauer der Hungerphase (violett) ist die Startwärmeleistung nur minimal kleiner als das Maximum der Wärmeleistung in der ersten Wachstumsphase. Bei der größten Dauer der Hungerphase (orange) ist die Startwärmeleistung schon stark abgefallen. Der exponentielle Zusammenhang der Startwärmeleistung von der Hungerdauer, dargestellt in Abbildung 56, hat eine Deaktivierungsrate von:

$$k_D = 0.183 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}.$$

Zur Aufnahme dieses Zusammenhanges bedarf es für jeden Punkt eine einzelne vollständige Kultivierung im TAM-20ml. Die beiden Kalorimeter TAM-4ml und Chip-Kalorimeter bieten daher die schnellere Lösung für die Aufnahme des Zusammenhanges.

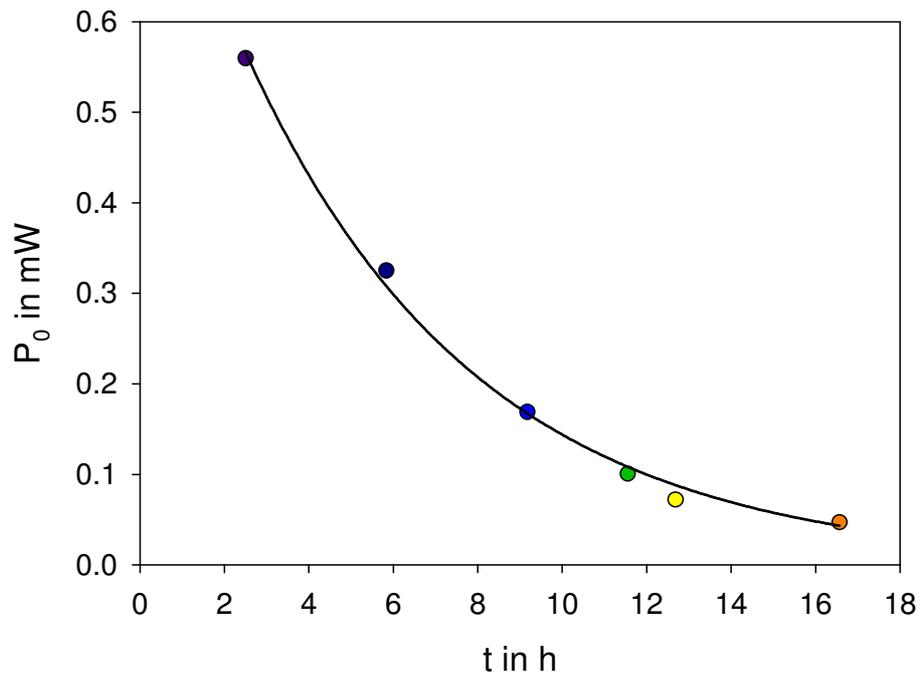


Abbildung 56: Exponentieller Zusammenhang zwischen Startwärmeleistung P_0 (TAM-20ml) und Zeitdauer der Hungerphase bei *P. putida* mit Phenol als Wachstumssubstrat.

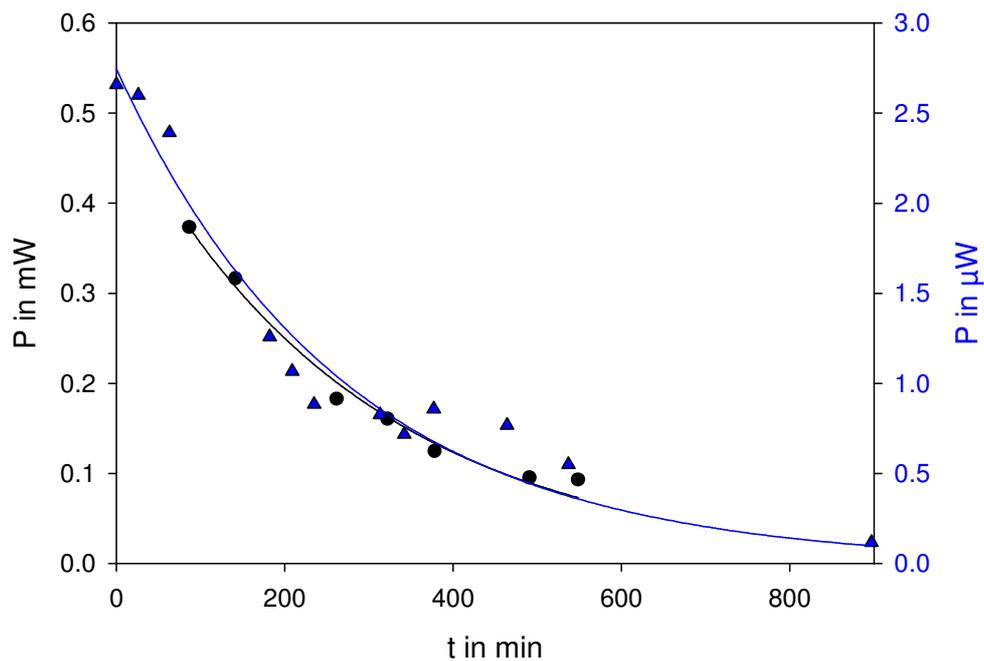


Abbildung 57: Exponentieller Zusammenhang zwischen Wärmeleistung P und Zeitdauer der Hungerphase bei *P. putida* mit Phenol als Wachstumssubstrat, schwarz – TAM-4ml, blau – Chip-Kalorimeter.

Abbildung 57 zeigt die Abnahme der mikrobiellen Aktivität von *P. putida* während der Hungerphase auf Phenol, aufgenommen durch das Kalorimeter TAM-4ml (schwarz) und Chip-Kalorimeter (blau). Die mathematische Beschreibung der Abnahme ergab Deaktivierungsraten von

$$k_D = 0.210 \pm 0.012 \text{ h}^{-1} \text{ (TAM-4ml)}$$

$$k_D = 0.222 \pm 0.018 \text{ h}^{-1} \text{ (Chip-Kalorimeter)}.$$

Alle drei Deaktivierungsraten sind gleich groß. Die Rate, die mit dem TAM-20ml bestimmt wurde, ist leicht kleiner, während die anderen beiden Werte sehr gut übereinstimmen.

Wie im Kapitel 4.6.2.4 schon besprochen wurde gibt es keine direkten Vergleichswerte in der Literatur, jedoch liegen die obigen Werte im publizierten Bereich für Deaktivierungsraten mikrobieller Systeme.

4.6.5 Mikrobiologische Betrachtungen

Die kalorimetrischen Untersuchungen konnten einen eindeutigen Nachweis erbringen, dass bei Bakterienkulturen unter Hungerstress eine Abnahme der mikrobiellen Aktivität auftreten kann. Dieses Phänomen hängt stark vom verwendeten Wachstumssubstrat ab. Während die kalorimetrischen Messungen nur ein summarisches Ergebnis bezüglich des Metabolismus erbringen, ist mikrobiologisch zu klären, ob die Abnahme der mikrobiellen Aktivität durch ein Absterben der Bakterien oder durch eine Deaktivierung essentieller Enzyme erfolgt. Es wurde die Lebendkeimzahl (cfu) herangezogen, um den Zelltod auszuschließen. Diese Bestimmung wurde mit Phenol als Substrat vorgenommen.

Während der stationären Phase, der Hungerphase, kann in Abbildung 58 erkannt werden, dass die vermehrungsfähige Anzahl an Bakterien nicht sinkt. Im Mittel konnten $1.96 \cdot 10^8$ Zellen bestimmt werden. Die Optische Dichte als summarisches Signal über die gesamte Bakterienmenge zeigt ebenso einen konstanten Wert.

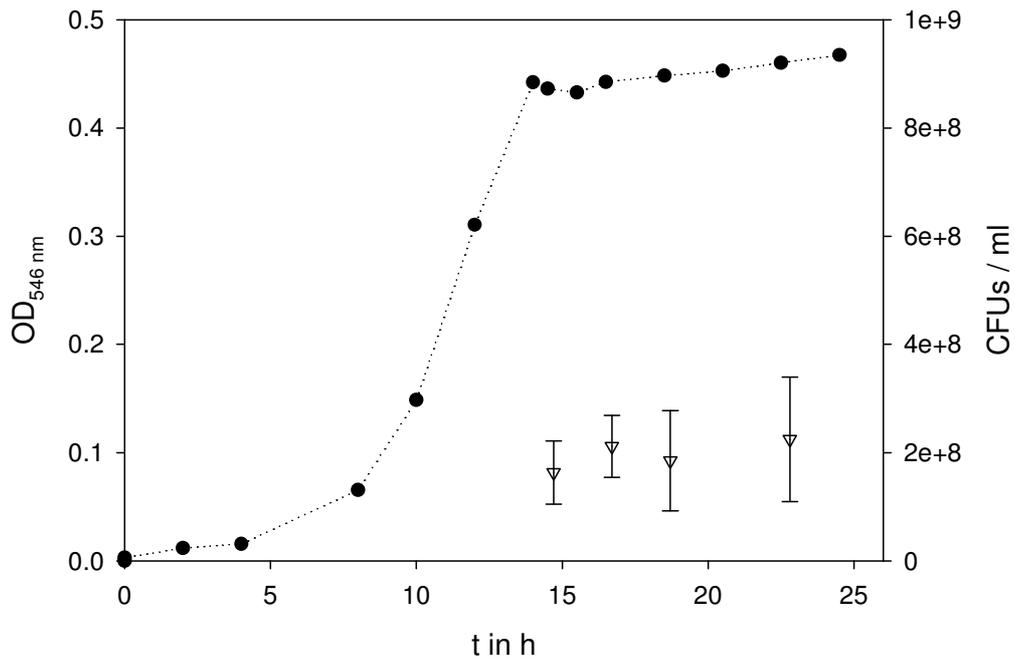


Abbildung 58: Wachstum und stationäre Phase von *P. putida* auf Phenol (2.5 mmol/l), Punkte – Optische Dichte, Dreiecke – cfu / Lebendkeimzahl pro ml.

In Abbildung 59 wird die relative Aktivität der Catechol-2,3-Dioxygenase während der Hungerphase des Bakteriums gezeigt. Sehr deutlich ist die Abnahme der Enzymaktivität zu erkennen. Die Optische Dicht bleibt im gleichen Zeitraum konstant.

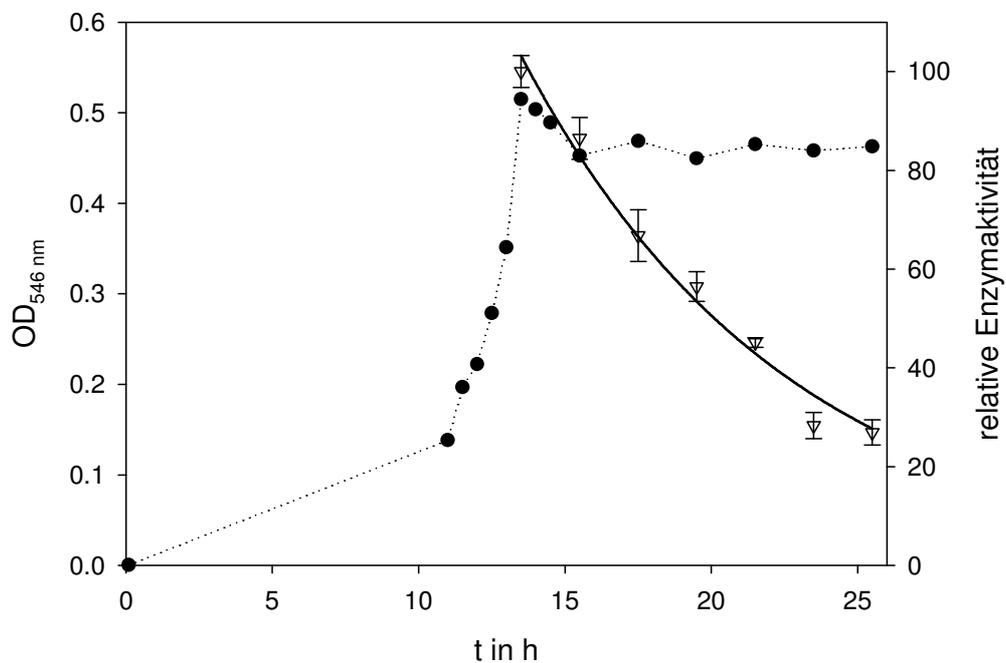


Abbildung 59: Wachstum und stationäre Phase von *P. putida* auf Phenol (2.5 mmol/l), Punkte – Optische Dichte, Dreiecke – relative Enzymaktivität (Catechol-2,3-Dioxygenase) in Prozent.

Die Catechol-2,3-Dioxygenase ist ein wichtiges Enzym aus dem Stoffwechselweg des Phenols (Abbildung 2). Während der Hungerphase stirbt *P. putida* nicht ab, stattdessen fährt das Bakterium die Abbauleistung der aromatischen Verbindungen auf nahezu Null zurück.

Die Deaktivierungsrate k_D gemessen anhand der Enzymaktivität ist:

$$k_D = 0.11 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}.$$

Dieser Wert ist kleiner als alle drei kalorimetrisch bestimmten Werte. Da der Metabolismus durch ein Zusammenspiel aus mehreren enzymatischen Reaktionen besteht, ist es denkbar, dass ein weiterer Schritt im Abbau des Phenols stärker deaktiviert wurde. Ebenso ist es wahrscheinlich, dass eine Kombination aus mehreren deaktivierten Abbauschritten die summarische Deaktivierungsrate, erfasst durch die kalorimetrischen Experimente, bestimmt. Die Kalorimetrie erlaubt durch ihren summarischen Charakter die Kombination von umfangreichen Einzeleffekten in einer Messung zu erfassen.

4.6.6 Mathematische Beschreibung der zweiten Wachstumsphase

Der Einfluss der Deaktivierungsrate auf die mathematische Beschreibung der zweiten Wachstumsphase wurde untersucht. Dafür wurde das Wachstum von *P. putida* auf Phenol (Kapitel 4.6.4) herangezogen. Das verwendete Kalorimeter war das TAM-20ml. Die Abbildung 60 zeigt neben der Wachstumskurve (schwarz) die mathematische Beschreibung (blau, rot) der ersten und zweiten Wachstumsphase.

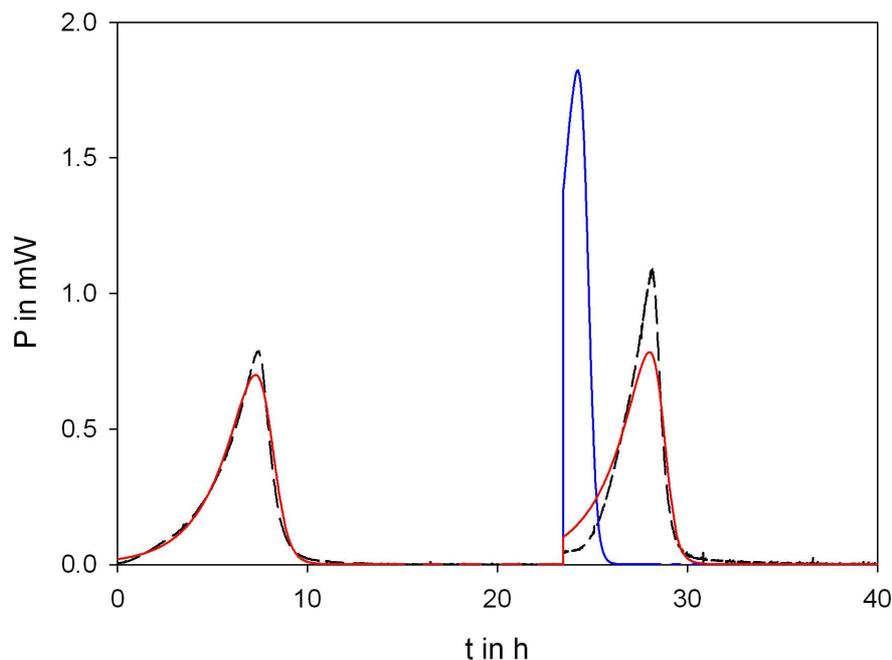


Abbildung 60: Mathematische Beschreibung der Wachstumskurve von *P. putida* auf Phenol, schwarz – Messkurve, blau – ohne Deaktivierungsterm, rot – mit Deaktivierungsterm

Für die blaue Kurve wurde auf die Gleichungen (11) und folgende (siehe Kapitel 4.5) zurückgegriffen. Die gute Beschreibung der ersten Phase ist schon aus diesem Kapitel bekannt (rote Kurve verdeckt die blaue Kurve). Bei der Beschreibung der zweiten Wachstumsphase sind größere Abweichungen zu erkennen. Die hohe Startwärmeleistung, die hohe maximale Wärmeleistung und die kurze Zeit des gesamten Wärmeeffektes zeigen deutlich, dass die zu Grunde gelegten Gleichungen nicht geeignet sind. Wird die Gleichung (11) um einen Deaktivierungsterm mit der Deaktivierungskonstante k_D erweitert ergibt sich die folgende Gleichung:

$$\frac{dX}{dt} = \mu' X - k_D X . \quad (32)$$

Mit der Gleichung (32) und der Deaktivierungsrate von 0.183 h^{-1} (Kapitel 4.6.4, Phenol-Hungerstress) wird die Parameterbestimmung noch einmal durchgeführt. Die erhalten Kenngrößen sind:

$$\begin{aligned} K_S &= 8.0 \text{ mg/l} \\ \mu_{\max}' &= 1.1 \text{ h}^{-1} \\ K_I &= 92 \text{ mg/l}. \end{aligned}$$

Den Zusammenhang zwischen den beiden Modellen gibt Gleichung (33) wieder

$$\mu = \mu' - k_D . \quad (33)$$

Für den Fall einer Unabhängigkeit von der Substratkonzentration, wie z. B. in der exponentiellen Phase, vereinfacht sich die Gleichung zu: $\mu_{\max} = \mu_{\max}' - k_D$. Im Rahmen des Fehlers der maximalen spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ_{\max} kann dieser Zusammenhang bestätigt werden.

In der Abbildung 60 stellt die rote Kurve das graphische Ergebnis der mathematischen Beschreibung mit dem Deaktivierungsterm dar. Die Beschreibung der ersten Wachstumsphase ist unverändert gut. Zusätzlich wird die zweite Wachstumsphase jetzt viel besser wiedergegeben. Sowohl Startwärmeleistung als auch der maximale Wert haben sich den Messwerten angenähert. Auch die Zeitdauer des Wärmeeffektes stimmt mit dem experimentellen Ergebnis überein. Eine weitere Verbesserung konnte nicht erreicht werden. Insbesondere die ca. eine Stunde dauernde Phase nahezu konstanter Wärmeleistung zu Beginn der zweiten Wachstumsphase ist hier als problematisch anzusehen. Dessen ungeachtet ist die Berücksichtigung der Deaktivierung notwendig, um die Wachstumskurve annähernd gut zu beschreiben.

4.7 Mikrobielle Aktivität in Abhängigkeit des Substrates

In den bisherigen Untersuchungen der mikrobiellen Aktivität einer Bakterienkultur wurde auf ein bestimmtes Substrat zurückgegriffen. Das Wachstumssubstrat diente für die Bestimmung der Aktivität in der Hungerphase. Die thermische Leistung als Messgröße zeigt deutlich den mikrobiellen Stoffumsatz an. Unter Verwendung des Phenols oder Natriumbenzoats als Substrat konnte eine deutliche Abnahme der thermischen Leistung innerhalb der Hungerphase detektiert werden, während ein ausgedehntes konstantes Signal bei dem Substrat Glucose auftrat. Dieses unterschiedliche Verhalten der Mikroorganismen in Abhängigkeit vom Substrat soll im Folgenden für die Charakterisierung von Kultivierungen genutzt werden.

4.7.1 Mikrobielle Aktivität bei konstantem physiologischen Zustand

Untersuchungen der mikrobiellen Aktivität auf verschiedenen Substraten an einer Kultur können Antworten zum physiologischen Zustand dieser erbringen. Durch die einzelnen Substrate lässt sich somit indirekt auf die aktivierten Stoffwechselwege schließen. Für die Unterscheidung des physiologischen Zustandes, der in den letzten Kapiteln verwendeten Kulturen, sind geeignete Substrate auszuwählen. Dazu dienten kontinuierliche Kultivierungen, die einen konstanten mikrobiellen Zustand gewährleisten. Es wurden die drei bisherigen Substrate (Natriumbenzoat, Glucose und Phenol) als Wachstumssubstrat für die kontinuierliche Kultur verwendet. Für die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität auf unterschiedlichen Substraten wurde neben diesen drei Substraten ein weiterer Zucker, die Fructose, verwendet. Ferner wurden zwei weitere Stoffe, die im Metabolismus eine wichtige Rolle spielen, Natriumpyruvat das Endprodukt der Glycolyse und Natriumsuccinat, eine Zwischenverbindung im Citratzyklus, verwendet.

Für die Aufzeichnung der thermischen Leistung wurde das Kalorimeter TAM-4ml eingesetzt. Es zeichnet sich durch eine schnelle, unkomplizierte Detektion der Wärmeleistung aus. Insbesondere die Sättigung mit Sauerstoff, die schnelle Substratzugabe und variable Probenmenge sind die Vorteile des Systems. Die Tabelle 5 zeigt eine Zusammenstellung der thermischen Leistung bei Angebot verschiedener Substrate. Als mikrobielle Proben dienten die kontinuierlichen Kulturen gewachsen auf Glucose, Natriumbenzoat oder Phenol. Auf Grund der toxischen Wirkung von Phenol wurde für die Aktivitätsbestimmung nur mit 1 mmol/l gearbeitet, alle anderen fünf Substrate wurden mit 5 mmol/l vermessen.

Tabelle 5: Mikrobielle Wärmeproduktion (TAM-4ml) bei Verwendung von verschiedenen Substraten, Wärmeleistungswerte in $\mu\text{W}/\text{ml}$

<i>P. putida</i>		Wachstum der Kultur auf		
		Glucose	Benzoat	Phenol
Aktivität auf	Glucose	1182	417	282
	Fructose	89	73	87
	Benzoat	86	1078	62
	Phenol	63	92	377
	Pyruvat	854	388	302
	Succinat	333	266	267

Für eine Glucose-Kultur ist die Aktivität auf Glucose mit $1182 \mu\text{W}$ am größten (grün hinterlegt). Natriumpyruvat erzeugt noch ein relativ großes Signal, während Natriumsuccinat ein deutliches, aber ein kleineres Signal liefert. Die thermische Leistung der Probe ohne Substratzusatz liegt im Bereich bis $100 \mu\text{W}$. Damit sind die Leistungswerte von Fructose, Phenol und Natriumbenzoat (grau hinterlegt) nicht als zusätzliche mikrobielle Aktivität auf dem jeweiligen Substrat zu werten.

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Kulturen auf den beiden aromatischen Wachstumssubstraten. Die Glucose und das Natriumpyruvat lieferten nach dem eigentlichen Wachstumssubstrat die höchsten Wärmeleistungswerte (grün hinterlegt). Zwischen den aromatischen Verbindungen ergibt sich ein sehr klares Bild. Sowohl die Natriumbenzoat-Aktivität einer Phenol-Kultur als auch die Phenol-Aktivität einer Natriumbenzoat-Kultur ist als nicht vorhanden zu bewerten. Es fehlt der Kultur die Fähigkeit der Anpassung an das jeweilige andere Substrat. Dies kann zum einen im fehlenden Aufnahmeweg (Ostergaard et al. 2001) oder in dem nicht aktivierten Abbauweg (siehe Abbildung 2) liegen.

Bei allen drei Wachstumssubstraten konnte keine Aktivität auf Fructose bestimmt werden. Es liegt nahe, dass die zugehörigen Aufnahme- bzw. Abbauwege fehlen. Die Wärmeproduktion nach der Zugabe der zentralen Bestandteile des Metabolismus, Natriumsuccinat und Natriumpyruvat, ist detektierbar, liegt aber niedriger als die Wärmeproduktion des originalen Wachstumssubstrates und ist vergleichbar mit der Wärmeproduktion auf Glucose.

Das Chip-Kalorimeter wurde für diese Untersuchungen ebenfalls verwendet. Es zeichnet sich durch das geringe Probenvolumen und schnelle Detektion der Wärmeleistung aus. Die Untersuchungen mit dem Chip-Kalorimeter haben die Ergebnisse in der Verteilung der

Aktivitäten mit dem TAM-4ml bestätigt. Die Glucose und das Natriumpyruvat weisen bei allen drei Wachstumssubstraten eine gut messbare thermische Leistung auf. Auch die eingeschränkte Aktivität der aromatischen Wachstumssubstrate, d. h. dass die Phenol-Aktivität nur bei einer Phenol-Kultur und die Natriumbenzoat-Aktivität nur bei einer Natriumbenzoat-Kultur gemessen werden konnte, bestätigte sich.

Tabelle 6: Mikrobielle Wärmeproduktion (Chip-Kalorimeter) bei Verwendung von verschiedenen Substraten, Wärmeleistungswerte in $\mu\text{W/ml}$

<i>P. putida</i>		Wachstum der Kultur auf		
		Glucose	Benzoat	Phenol
Aktivität auf	Glucose	406	208	192
	Fructose	92	31	3
	Benzoat	53	508	36
	Phenol	106	22	208
	Pyruvat	308	172	175
	Succinat	64	86	11

Aufgrund des unterschiedlichen experimentellen Ablaufes sind die absoluten Wärmeleistungswerte zwischen den beiden Kalorimetern nicht vergleichbar. Es lassen sich aber dennoch die tendenziellen Ergebnisse aus beiden Datenreihen ablesen. Für eine vereinfachte Betrachtung der Zusammenhänge zwischen den Wachstumssubstraten und den mikrobiellen Aktivitäten kann die Tabelle 7 verwendet werden.

Tabelle 7: Symbolischer Zusammenhang zwischen der substratabhängigen mikrobiellen Aktivität und dem Wachstumssubstrat, ++ sehr gut bis – nicht vorhanden

<i>P. putida</i>		Wachstum auf		
		Glucose	Benzoat	Phenol
Aktivität auf	Glucose	++	+-	+-
	Benzoat	--	++	--
	Phenol	--	--	++
	Fructose	--	--	--
	Pyruvat	+-	+-	+-
	Succinat	-+	-+	-+

Die stärkste mikrobielle Aktivität (höchste Wärmeleistung) innerhalb einer untersuchten Kultur erhält zwei Plus (grün hinterlegt). Keine Aktivität ist durch zwei Minus (grau

hinterlegt) ausgedrückt. Mittlere Aktivitäten sind entsprechend mit Plus bzw. Minus gekennzeichnet.

Für die Detektion der mikrobiellen Aktivität eignet sich sehr gut das Wachstumssubstrat, es erzeugt die höchsten Wärmeleistungswerte. Substratübergreifend erzeugen die Glucose und das Natriumpyruvat eine hohe wachstumssubstratunabhängige thermische Leistung. Mit verschiedenen Substraten ist der physiologischen Zustand gut zwischen den Kulturen zu unterscheiden. Insbesondere die Glucose lässt sich als übergreifendes Substrat für die Bestimmung des physiologischen Zustandes verschiedenster Kulturen einsetzen.

4.7.2 Mikrobielle Aktivität bei veränderlichem physiologischem Zustand

Die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in Abhängigkeit des Substrates bei nicht konstantem physiologischen Zustand wurde anhand der Hungerphase von *P. putida* auf Natriumbenzoat und Phenol durchgeführt.

Eine Schüttelkolben-Batch-Kultur am Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde dafür eingesetzt. Unter Verwendung des Kalorimeters TAM-4ml ist der Verlauf der mikrobiellen Aktivität in der Hungerphase auf Natriumbenzoat (grün) und Glucose (rot) bestimmt worden und in Abbildung 61 dargestellt. Ebenfalls in der Abbildung ist die Optische Dichte (schwarz) dargestellt. Deutlich ist die schnelle Abnahme der mikrobiellen Aktivität auf Natriumbenzoat zu erkennen. Die Aktivität auf Glucose dahingegen bleibt auf einem hohen Niveau. Im Rahmen der gemessenen 14 Tage nimmt diese Aktivität wie die Optische Dichte nur leicht ab. Beide Signale beruhen auf der direkten Proportionalität zur Biomasse. Die Optische Dichte zeigt die gesamte Biomasse an und die Glucose-Aktivität die Biomasse die metabolisch aktiv ist. Beide Signale nehmen einen gleichartigen Verlauf. Damit zeigt sich, dass der physiologische Zustand der Mikroorganismen lebend und aktiv ist und nur die Natriumbenzoat-Aktivität zurückgegangen ist.

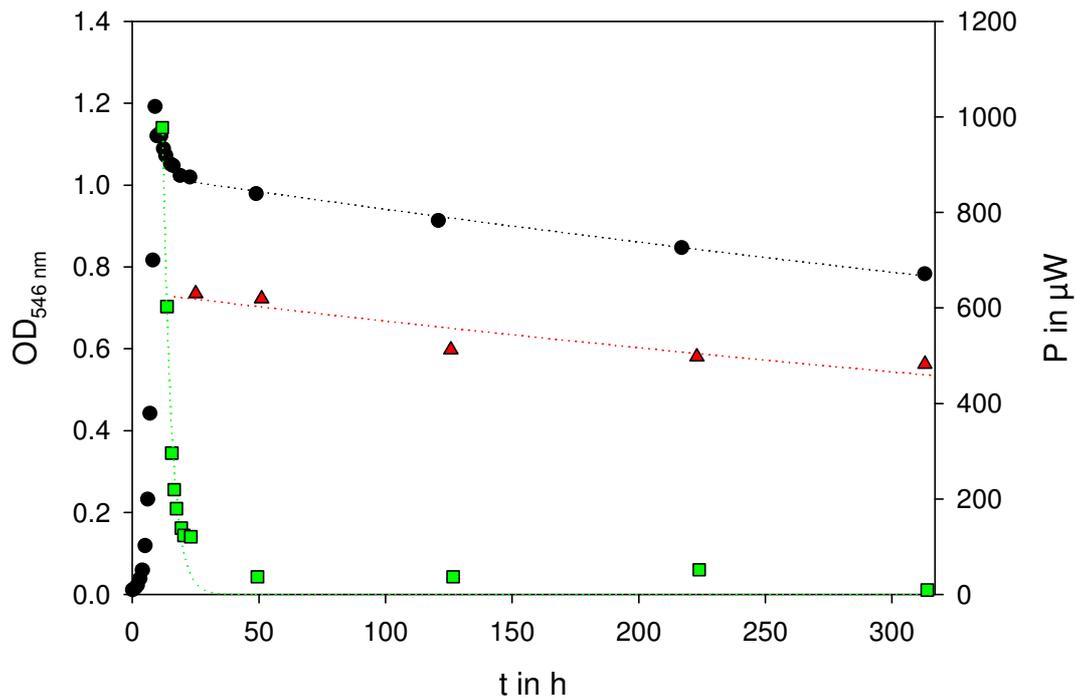


Abbildung 61: Wachstumsphase und Hungerphase von *P. putida* auf Natriumbenzoat (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, grün – Wärmeleistung auf jeweilige Natriumbenzoatzugabe, TAM-4ml.

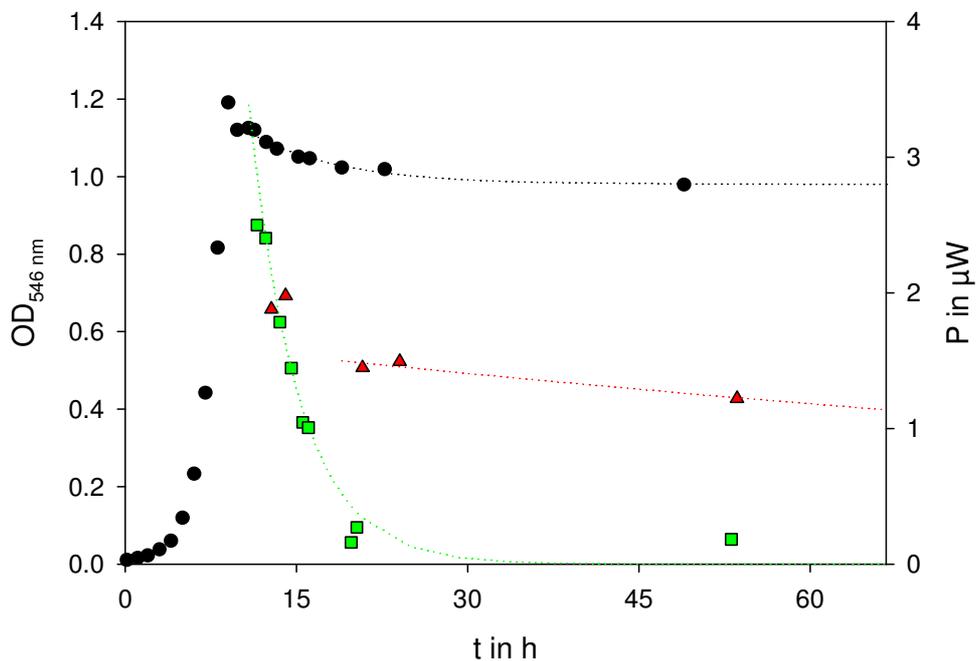


Abbildung 62: Wachstumsphase und Hungerphase von *P. putida* auf Natriumbenzoat (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, grün – Wärmeleistung auf jeweilige Natriumbenzoatzugabe, Chip-Kalorimeter.

Auch mit dem Chip-Kalorimeter lässt sich die anhaltende mikrobielle Glucose-Aktivität bei einer auf Natriumbenzoat gewachsenen Kultur bestimmen. Die Abbildung 62 zeigt in Grün die schnelle Abnahme der mikrobiellen Aktivität auf Natriumbenzoat und in Rot die

verhältnismäßig stabile Aktivität auf Glucose. Die Optische Dichte nimmt in den 50 Stunden nur leicht ab. Die Mikroorganismen nehmen einen physiologischen Zustand ein, bei dem sie lebend und aktiv (Glucose-Abbau) sind, aber die Abbaufähigkeit von Natriumbenzoat zurückgefahren haben.

Die Natriumpyruvat-Aktivität zeigt in der Tabelle 7 einen nahezu gleichgroßen Wärmeleistungswert wie die Glucose. Die Untersuchung mit den drei verschiedenen Substraten (Glucose, Natriumbenzoat, Natriumpyruvat) kann den physiologischen Zustand in der Hungerphase möglicherweise näher bestimmen. Die Kultur wurde von einem Natriumbenzoat-Chemostat abgenommen und in Eppendorfreaktionsgefäßen bei 25 °C schüttelnd gelagert. Bei den in Abbildung 63 dargestellten Signalen handelt es sich um die Wärmeleistung von *P. putida* auf verschiedenen Substraten: schwarz – Natriumbenzoat, grün – Natriumpyruvat, rot – Glucose. Sehr deutlich ist die schnelle Abnahme der mikrobiellen Aktivität auf Natriumbenzoat zu erkennen. Von einem anfänglichen Wert von fast 800 μW fällt das Wärmeleistungssignal sehr schnell auf Werte unter 100 μW ab. Die mikrobielle Aktivität auf den anderen Substraten ist wie erwartet am Anfang kleiner und nahezu identisch (ca. 400 μW).

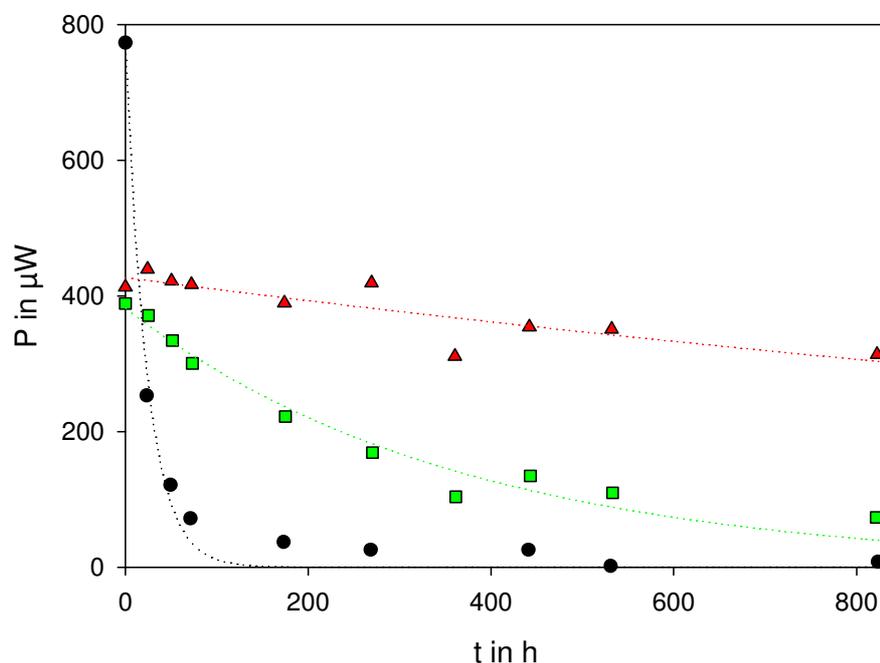


Abbildung 63: Hungerphase von *P. putida* auf Natriumbenzoat (5 mmol/l, Chemostat), grün – Wärmeleistung auf jeweilige Natriumpyruvatzugabe, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, schwarz – Wärmeleistung auf jeweilige Natriumbenzoatzugabe, aufgenommen mit TAM-4ml.

Im Laufe der fast 34 Tage nimmt die mikrobielle Aktivität auf Glucose nur leicht ab. Die Wärmeleistung bezogen auf eine Natriumpyruvatzugabe sinkt im Laufe der Messzeit. Die Abnahme ist jedoch eine Größenordnung langsamer als die Abnahme auf Natriumbenzoat.

Die mikrobielle Aktivität der Mikroorganismen nimmt damit nicht nur auf dem originalen Wachstumssubstrat, sondern auch auf Natriumpyruvat ab, aber nicht auf Glucose.

Für *P. putida* und Phenol als Wachstumssubstrat wurde wie für Natriumbenzoat eine Abnahme der mikrobiellen Aktivität festgestellt (siehe Abbildung 56). Für eine allgemeingültige Aussage bezüglich der indirekten Nachweismethode des physiologischen Zustandes mit Glucose wurden Untersuchungen mit dem TAM-4ml (Abbildung 64) und Chip-Kalorimeter (Abbildung 65) durchgeführt.

In den Abbildungen sind die Wachstumskurven *P. putida* auf Phenol mit anschließender Hungerphase dargestellt. In der Hungerphase bleibt die Optische Dichte (schwarz) nahezu konstant. Die mikrobielle Aktivität auf Phenol (grün) nimmt dahingegen sehr schnell ab. Die Wärmeleistung auf Glucose ist kleiner als die maximale Leistung auf Phenol. Sie zeigt tendenziell eine konstante mikrobielle Aktivität einer auf Phenol hungernden Kultur an. Es bestätigt sich damit, dass *P. putida* zwar seine mikrobielle Aktivität auf Phenol abbaut, aber dennoch die Hungerphase überlebt.

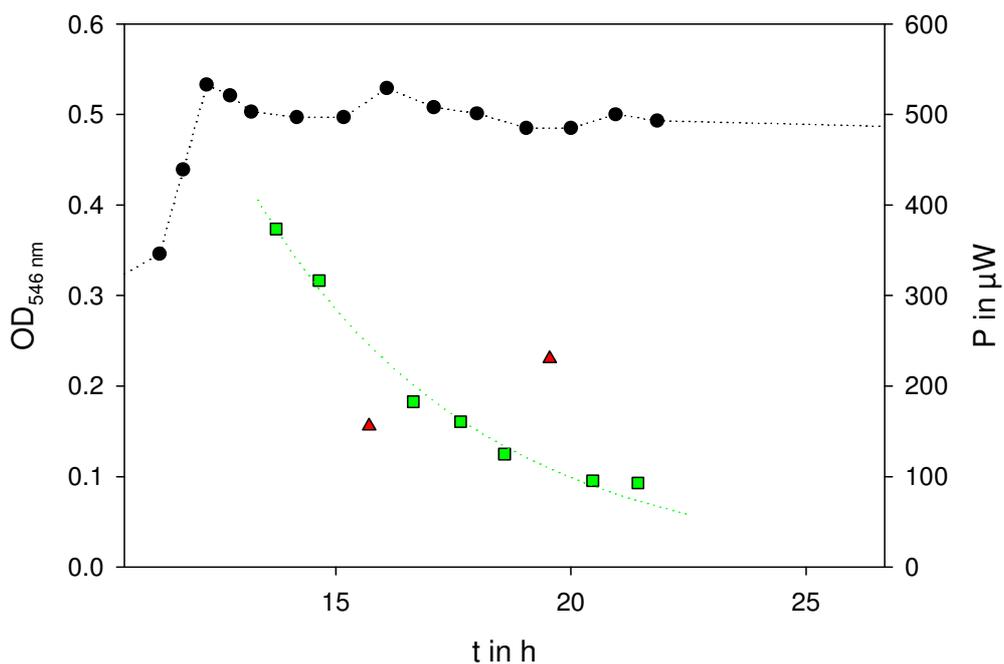


Abbildung 64: Wachstumsphase und Hungerphase von *P. putida* auf Phenol (2.5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, grün – Wärmeleistung auf jeweilige Phenolzugabe, TAM-4ml.

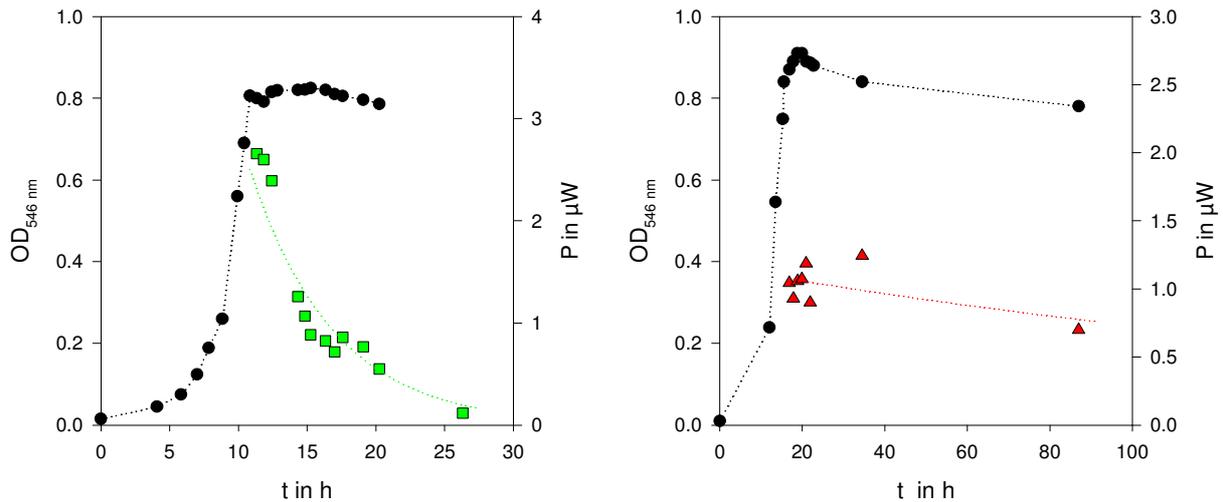


Abbildung 65: Wachstumsphase und Hungerphase von *P. putida* auf Phenol (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, grün – Wärmeleistung auf jeweilige Phenolzugabe, Chip-Kalorimeter.

Die mikrobielle Aktivität von *P. putida*, gewachsen auf Phenol, wurde auch mit dem TAM-20ml untersucht. Mit dem Kalorimeter TAM-20ml werden vollständige Wachstumskurven aufgezeichnet. Dadurch bedingt und durch die noch zusätzlich längere Temperierzeit kann kein hoher Probendurchsatz wie am Chip-Kalorimeter erreicht werden.

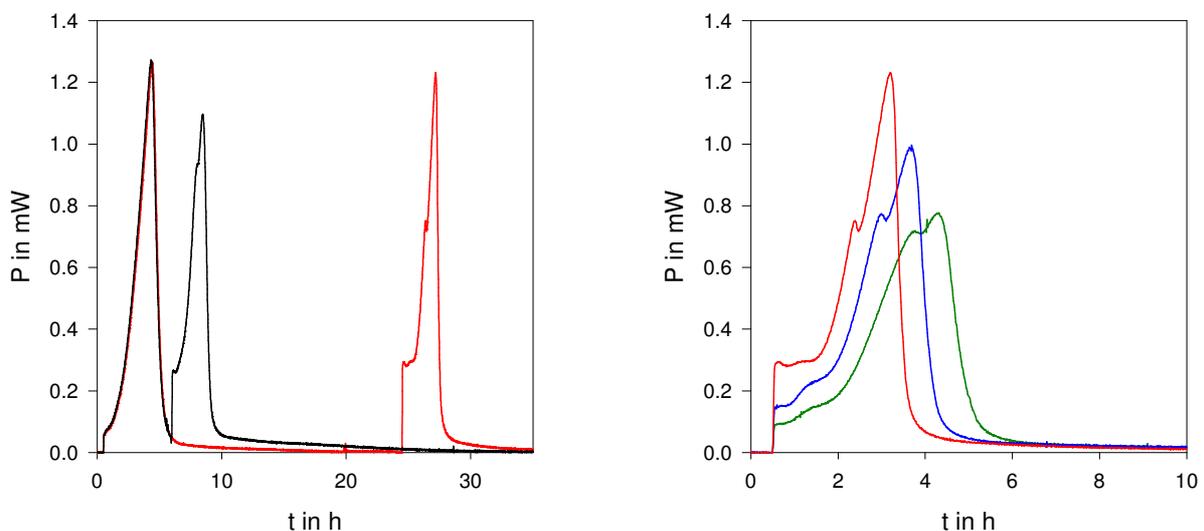


Abbildung 66: Wachstumskurven von *P. putida* aufgezeichnet mit dem TAM-20ml, links – 3. Phenol Wachstum (1. Wärmeeffekt), anschließend Wachstum auf Glucose (2. Wärmeeffekt) bei verschiedenen Zeiten, rechts – Wachstums auf Glucose nach einer (grün), zwei (blau) und drei (rot) Phenol-Wachstumsphasen.

Das folgende Beispiel beruht auf dem Batch-Wachstum von *P. putida* auf Phenol. In der Abbildung 66 (links) ist als erster Wärmeeffekt die dritte Wachstumsphase auf Phenol (0,3 mmol/l) dargestellt. Anschließend folgt eine Wachstumsphase auf Glucose. Diese wurde nach 1,65 Stunden (schwarz) und nach 20 Stunden (rot) ausgelöst. Dabei ist zu erkennen, dass sowohl die Startwärmeleistung, die Kurvenform als auch die Fläche beider Glucose-

Wachstumsphasen sehr gut übereinstimmen. Die Variation der Dauer der Hungerphase hat keinen Einfluss auf die drei Größen. Auch hiermit bestätigt sich die konstante Glucose-Aktivität einer Phenol-Kultur während einer Hungerphase.

In der Abbildung 66 (rechts) sind die Wachstumsphasen von *P. putida* auf Glucose dargestellt. Dabei erfolgte die Glucosezugabe nach einer (grün), zwei (blau) oder drei (rot) zuvor ausgelösten Phenol-Wachstumsphasen. Mit der Anzahl der Phenol-Wachstumsphasen ist zu erkennen, dass die Startwärmeleistung nach der Glucosezugabe zu nimmt. Aber auch die maximale Wärmeleistung nimmt entsprechend zu, während die Fläche konstant bleibt. Alle drei Sachverhalte deuten auf eine Steigerung der Biomassekonzentration, bei gleichbleibender Verwertung des Phenols, durch das Wachstum der Kultur auf Phenol hin. Dies kann aber nur durch die Verwendung von Glucose erkannt werden. Die Startwärmeleistung nach einer Phenolzugabe zeigt aufgrund des Aktivitätsverlustes in der Hungerphase keine Steigerung an (siehe Abbildung 55).

4.8 Ausgewählte Anwendungsbeispiele der kalorimetrischen Bestimmung der mikrobiellen Aktivität

Die vorangegangenen Kapitel zeigen deutlich, wie mit Kalorimetern der physiologische Zustand einer mikrobiellen Kultur bestimmt werden kann. Die Verwendung mehrerer Substrate erlaubt Aussagen über die aktiven enzymatischen Abbauewege zu treffen. Insbesondere bei einem komplexen mikrobiellen System, wie zum Beispiel Belebtschlamm, ist das Wissen über das Abbaupotenzial verschiedener Substanzen wichtig.

Gleichzeitig soll in diesem Kapitel gezeigt werden, wie mit kalorimetrischen Methoden die Aktivität auf einem einzelnen Substrat beim Einfluss von Inhibitoren, wie Silberionen, oder der Einfluss der Salzkonzentration auf die mikrobielle Aktivität nachweisbar ist.

4.8.1 Mikrobielle Aktivität einer natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft

Im Bereich der Abwasseraufarbeitung werden natürliche Systeme eingesetzt. Ein Belebtschlammbecken sorgt mit dem biologischen Prinzip für den Abbau von organischen Verunreinigungen. Diese Mischung aus organischen, anorganischen, festen wie flüssigen Bestandteilen soll im Folgenden mit dem TAM-4ml untersucht werden.

Dafür wurden jeweils 1 ml der Probe (Überstand bzw. komplette Probe) mit oder ohne Substratzusatz in die 4 ml Ampullen eingeschlossen und die Wärmeentwicklung aufgezeichnet. Eine Belebtschlammprobe enthält neben dem komplexen mikrobiellen System verschiedene organische Substrate. Durch die Verstoffwechslung der Substrate produziert die Probe von sich aus Wärme (Abbildung 67, „Probe, ohne“). Diese Wärmeproduktion ist an die festen Bestandteile der Probe gebunden. Nach kurzer Zeit (5 min) setzt sich ein großer Anteil des Belebtschlammes ab. Der klare Überstand nach 30 Minuten Absetzzeit produziert keine messbare Wärmeleistung mehr („Überstand, ohne“).

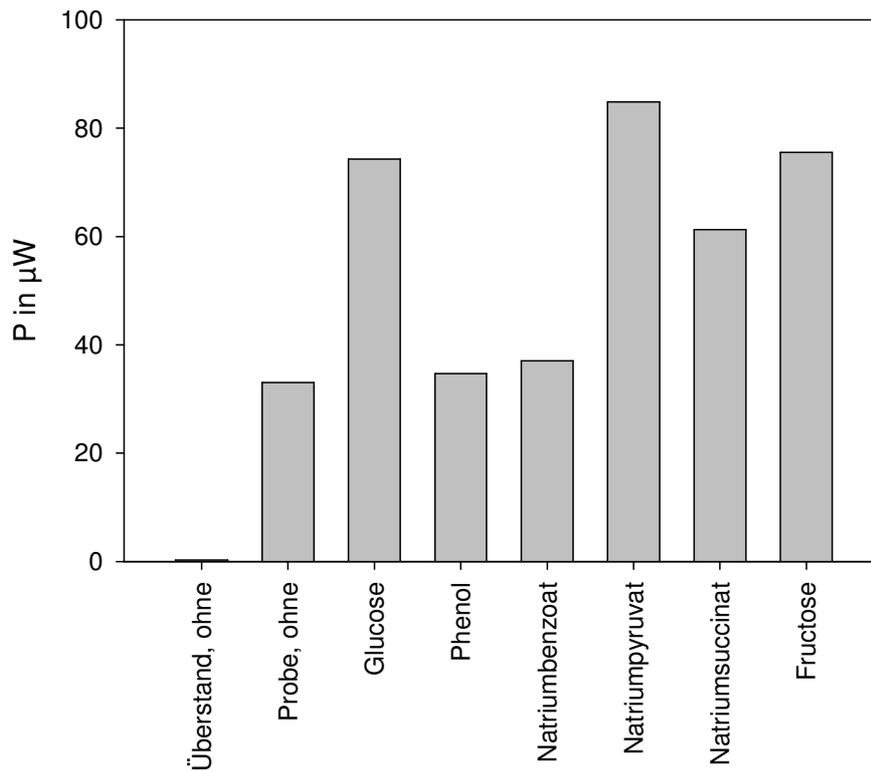


Abbildung 67: Thermische Leistung (TAM-4ml) einer Belebtschlammprobe in Abhängigkeit des zugegebenen Stoffes.

Durch Zugabe von verschiedenen Substraten zur Belebtschlammprobe kann die momentane mikrobielle Abbauleistung über die gemessene Wärmeleistung abgelesen werden. Natriumpyruvat, Glucose und Fructose liefern dabei die größten Signale. Natriumsuccinat liefert ein mittelgroßes Signal. Diese Substrate sind relativ einfach abbaubare Substrate, die eine wichtige Rolle im Metabolismus der meisten Mikroorganismen spielen.

Durch den Zusatz von Phenol oder Natriumbenzoat kommt es zu keinem Anstieg der Wärmeleistung. Dies zeigt an, dass diese Substrate nicht verstoffwechselt werden. Für den Abbau werden spezielle Enzyme benötigt, die innerhalb der Messzeit nicht aktiviert wurden. Die fehlende Aktivität lässt den Schluss zu, dass diese Substrate in der untersuchten Abwasserprobe bzw. im Abwasserzufluss nicht vorhanden waren.

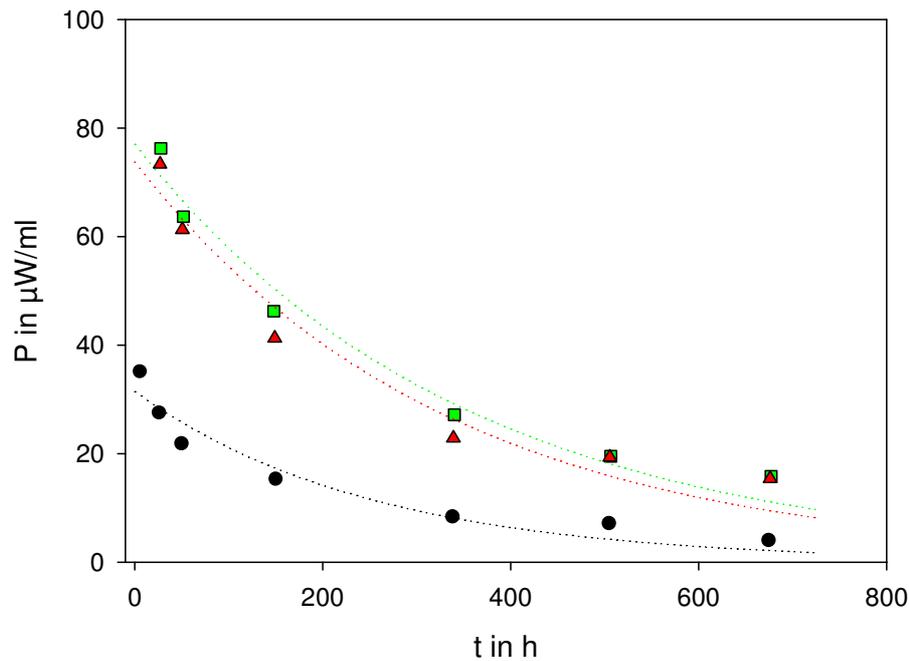


Abbildung 68: Thermische Leistung einer Belebtschlammprobe mit 200 ml Gasphase in 250 ml Schott-Duran-Flasche, schwarz – Leistung ohne Zusatz, grün – Zusatz von Natriumpyruvat (5 mmol/l), rot – Zusatz von Glucose (5 mmol/l).

In Abbildung 68 ist der Verlauf der Aktivität einer Belebtschlammprobe über einen Zeitraum von 30 Tagen zu sehen. Die Probe bestand aus 50 ml Material in einer 250 ml Schott-Flasche, die in einem Schüttler bei 25°C gelagert wurde. Sowohl die Wärmeleistung ohne Substratzusatz als auch die Wärmeleistungen bei Zugabe von Glucose bzw. Natriumpyruvat nehmen mit der Dauer der Untersuchungszeit ab. Durch Abbau der im Abwasser enthaltenen organischen Stoffe und deren Verarmung nimmt die Wärmeleistung mit fortschreitender Zeit ab. Weiterhin spielt der Abbau von Enzymketten als auch der Tod von Mikroorganismen eine wichtige Rolle.

Der Abbau der organischen Stoffe im Belebtschlammbecken erfolgt durch oxidative Prozesse. Es stellt sich daher die Frage, ob bei einer Reduzierung der angebotenen Sauerstoffmenge eine Veränderung der Wärmeleistung durch die Mikroorganismen eintritt. Eine weitere Belebtschlammprobe bestand daher aus 200 ml Material (gleiche Probe wie oben) in einer 250 ml Schott-Flasche. Bei dieser Probe ist die Gasphase damit stark reduziert worden. Für den aeroben Abbau steht nun nicht mehr ausreichend Sauerstoff zur Verfügung. Die 1 ml Proben wurden in der Reihenfolge: mit Natriumpyruvat-, Glucose- und ohne Zusatz, vermessen.

Ab dem 8. Tag wurden Faulgase festgestellt. Dieser Vorgang ist auch an den Wärmeleistungswerten zu erkennen. Alle drei Signalreihen sind durch den Verbleib auf einem

relativ konstanten Wärmeleistungsniveau gekennzeichnet. Diese Werte sind in der Tabelle 8 grau unterlegt.

Tabelle 8: Wärmeleistung der Belebtschlammprobe (200 ml) ohne und mit Natriumpyruvat bzw. Glucose-Zugabe, zum Vergleich die 50 ml Probe, grau unterlegte Werte – Faulgase festgestellt, n.b. – nicht bestimmt, ab 42. Tag mit ausreichend Sauerstoff

Tag	P in μ W Pyruvat-Zugabe	P in μ W Glucose-Zugabe	P in μ W ohne Zusatz	P in μ W Probe 50 ml
0	89.9	82.1	35.8	35.2
1	75.5	65.5	27.4	27.6
2	63.7	58.4	22.4	21.9
5	55.8	46.1	12.4	15.4
8	55.1	48.8	14.5	n.b.
14	61.7	74.8	19.5	8.4
21	49.5	50.7	14.9	7.1
28	57.9	50.9	13.2	4.0
41	n.b.	n.b.	44.2	-
42	n.b.	n.b.	9.6	-
45	29.6	21.7	7.6	-

Am 41. Tag wurden immer noch Faulgase festgestellt. Auf die Messungen mit Substratzugabe wurde verzichtet, um den deutlichen Effekt auf die Probe ohne Substratzusatz zu erkennen. Dabei zeigte sich, dass durch die anaeroben Prozesse und deren Produkte eine stark erhöhte Wärmeleistung ermittelt werden konnte. Die sich sonst hinter den zu erst detektierten Werten mit Substratzusatz verbirgt.

Anschließend wurde die Probe für eine Stunde mit reinem Sauerstoff begast (200 ml/h). Die anschließende Bestimmung der Wärmeleistung am 42. Tag zeigte eine Abnahme aller drei Signale. Auch wurden keine weiteren Faulgase festgestellt.

In dem komplexen System der mikrobiellen Gemeinschaft lässt sich der physiologische Zustand gut anhand der thermischen Leistung bei Zugabe unterschiedlicher Substrate ermitteln. Auch die zeitliche Veränderung der Probe nach Entnahme aus dem Belebtschlammbecken konnte anhand der Wärmeleistung aufgezeichnet werden.

Insbesondere durch den heterogenen Charakter der Probe und die geringe Volumenleistung ist das TAM-4ml für die Wärmeleistungsdetektion hervorragend geeignet. Das Chip-Kalorimeter

ist für heterogene Proben völlig ungeeignet, während das TAM-20ml eine zu lange Temperierzeit benötigt und die MDSC nicht die Volumenauflösung besitzt.

4.8.2 Mikrobielle Reaktion auf erhöhte Natriumchloridkonzentration

Eine hohe Salzkonzentration kann osmotischen Stress in Mikroorganismen auslösen. Bei Konzentrationen über 10 % spricht man von osmotoleranten Mikroorganismen. Für die Untersuchung wurde eine kontinuierliche Kultur von *P. putida*, gewachsen auf zwei verschiedenen Substraten (Glucose, Natriumbenzoat), verwendet. Die Abbildung 69 stellt die relative mikrobielle Aktivität in Abhängigkeit der Natriumchloridkonzentration dar. Sehr gut ist dabei zu erkennen, dass mit steigender Konzentration die Aktivität abnimmt. Bei einer Konzentration von 0.5 mol/l ist die Aktivität so klein, dass diese im Rahmen des Fehlers gleich Null gesetzt werden kann.

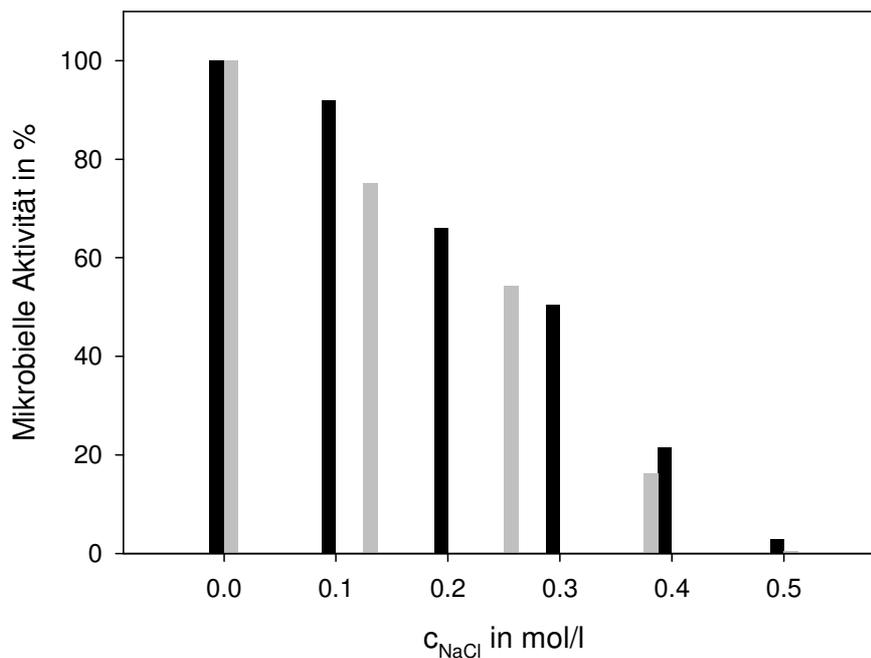


Abbildung 69: Relative mikrobielle Aktivität von *P. putida* in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration, schwarz – Natriumbenzoat-Kultur, grau – Glucose-Kultur.

Zur Einschätzung der Salztoleranz eignet sich die Inhibitionskonzentration die zu einer 50 %igen Inhibierung führt (IC_{50}). Aus den ermittelten Daten lassen sich die IC_{50} -Konzentrationen bestimmen:

$$IC_{50} = 0.27 \pm 0.02 \text{ mol/l (Natriumbenzoat)}$$

$$IC_{50} = 0.24 \pm 0.02 \text{ mol/l (Glucose).}$$

Der Unterschied zwischen beiden Werten ist minimal. Die Wirkung hoher Natriumchloridkonzentrationen auf den Metabolismus von *P. putida* ist damit unabhängig von dem Wachstumssubstrat. Der Salzstress hat einen universellen Effekt auf den Stoffwechsel. Die IC₅₀-Konzentrationen entsprechen ca. 1.5 % Salzgehalt. Mit diesem Wert gehört *P. putida* zu den gering halophilen Mikroorganismen (Hrenovic und Ivankovic 2009).

Für diese Untersuchungen eignete sich das TAM-4ml besonders auf Grund der schnellen Detektion der thermischen Leistung. Das Chip-Kalorimeter bedarf für solche Untersuchungen mehr Messaufwand. Die Referenzlösung zur Bestimmung der Basislinie muss der Salzkonzentration angepasst werden, um Effekte von Verdünnungsvorgängen zu vermeiden.

4.8.3 Mikrobielle Reaktion auf Silberionen

Silber inhibiert den mikrobiellen Stoffwechsel durch Wechselwirkung mit den DNS-Bestandteilen wie auch mit schwefelhaltigen Enzymen (Cervantes und Silver 1996, Modak und Fox 1973). Diese Inhibierung wird sich auf die mikrobielle Aktivität niederschlagen. Die Abbildung 70 stellt die mit der MDSC gemessene thermische Leistung von *P. putida* beim Wachstum auf Natriumbenzoat bei Zusatz von Silberionen dar. Als Silberquelle wurde Silbernitrat eingesetzt. Sehr deutlich zeigt sich die vollständige Inhibierung bei hohen Silberkonzentrationen (200, 2000 µg/l – braun, dunkelgrün). Im niedrigen Konzentrationsbereich (0 – 50 µg/l) kann die Abhängigkeit sehr genau beobachtet werden. Sowohl der Leistungswert nach ca. 11 Minuten (siehe Kapitel 4.2.2) als auch der maximale Wert nehmen mit erhöhter Silberkonzentration ab. Die Lage des Maximums, d. h. das Kennzeichen für die Sauerstoffverarmung, verschiebt sich erwartungsgemäß (Kapitel 4.2) mit steigender Silberionenkonzentration zu höheren Zeiten.

Die IC₅₀-Konzentration lässt sich auf einen Wert von 44 µg/l (0.41 µmol/l) abschätzen. *Escherichia coli* K12 zeigt ab einer Konzentration von 2.5 µmol/l eine vollständige Inhibierung (Ghandour et al. 1988). Kim et al. (2009) berichteten, dass ihre niedrigste Konzentration von 350 µg/l genügt, um Verbandsmaterial gegen den Bewuchs von *P. putida* zu schützen. Der in dieser Arbeit verwendete *P. putida* zeichnet sich durch eine Größenordnung niedrigere Toleranz gegenüber Silberionen aus. Jedoch können auch Resistenzen bis zu 500 µmol/l, die für einige Klinik-Isolate von *E. coli* aufgeführt werden (Li et al. 1997), auftreten.

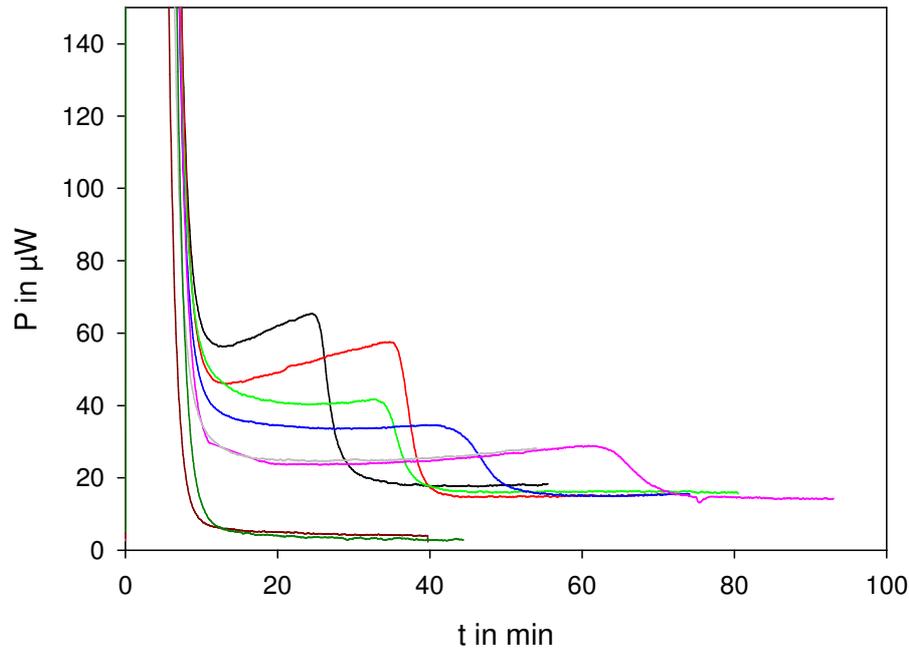


Abbildung 70: Thermische Leistung (MDSC) von *P. putida* (Natriumbenzoat, Probe aus einer 5 mmol/l Chemostat-Kultur) in Abhängigkeit von der Silber-Konzentration, schwarz, rot, grün, blau, rosa, grau, braun und dunkelgrün – 0, 20, 25, 35, 40, 50, 200 und 2000 µg/l.

4.8.4 Mikrobielle Leistung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

In Kapitel 2.4 wird die mathematische Beschreibung des Verlaufes von mikrobiellen Wachstumskurven vorgestellt. Die Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration wird durch verschiedene mathematische Ansätze beschrieben, die unter anderem die Toxizität der entsprechenden Substrate beachten. Die verwendeten Substrate Natriumbenzoat und Phenol sind in hohen Konzentrationen toxisch für *P. putida* (Reardon et al. 2000).

Für die Untersuchungen wurden Proben aus kontinuierlichen Kulturen von *P. putida* verwendet. Diese sind auf dem jeweiligen zu untersuchenden Substrat gewachsen. Die Abhängigkeit wurde dann mit dem TAM-4ml aufgenommen. Die Abbildung 71 stellt den Zusammenhang zwischen der Substratkonzentration und der Wärmeleistung dar. Die für toxische Stoffe erwartete Abnahme der thermischen Leistung mit steigender Konzentration konnte bestätigt werden. Dabei zeigt sich, dass für Natriumbenzoat die Abnahme erst bei höheren Konzentrationen eintritt. Ein vollständiges Batch-Wachstum konnte bei Phenol mit einer Konzentration von 7.5 mmol/l oder größer nicht aufgenommen werden. Während das Wachstum auf Natriumbenzoat zwar verzögert, aber noch bis 50 mmol/l möglich war. Für die mathematische Beschreibung wurde die Gleichung (34), dem Andrews-Modell angelehnt, gewählt.

$$P = P_{\max} \frac{S}{K_S + S + S^2 / K_I} \quad (34)$$

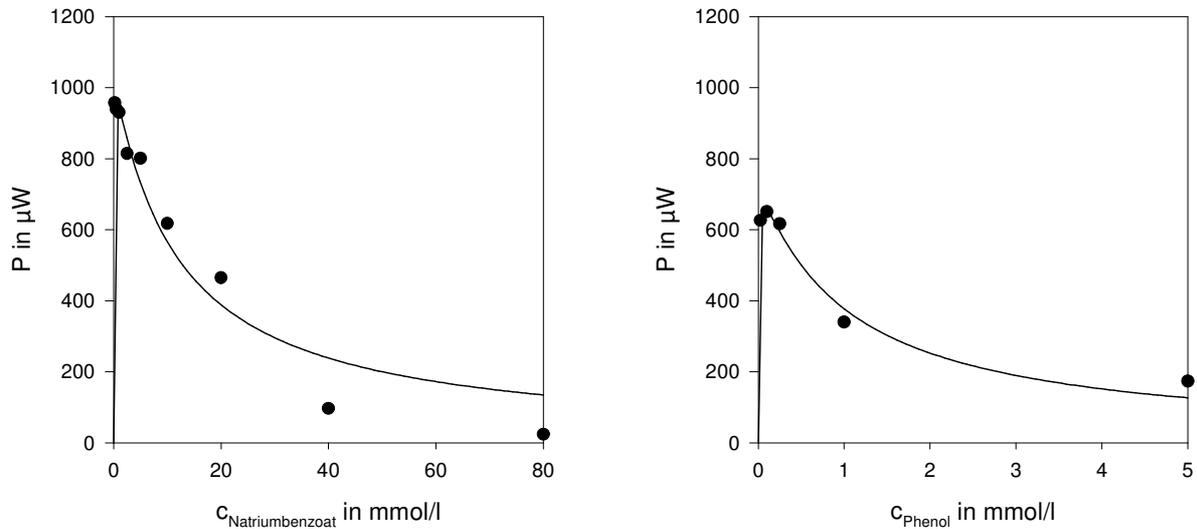


Abbildung 71: Thermische Leistung (TAM-4ml) von *P. putida* (Probe aus einer kont. Kultur) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in der zu messenden Probe, Linie – mathematischen Beschreibung (Gleichung (34)), links – Natriumbenzoat, rechts – Phenol.

Im Gegensatz zu den oben genannten Substraten wird bei Glucose als nicht toxisches Substrat keine Abnahme erwartet. In der Abbildung 72 ist der Bereich zwischen 0 und 6 mmol/l Glucose gezeigt. Höhere Konzentrationen bis 100 mmol/l zeigen keine weitere Erhöhung oder Erniedrigung der Wärmeleistung (100 mmol/l – 1058 µW). Für die mathematische Beschreibung wurde die Gleichung (35), dem Monod-Modell angelehnt, verwendet.

$$P = P_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (35)$$

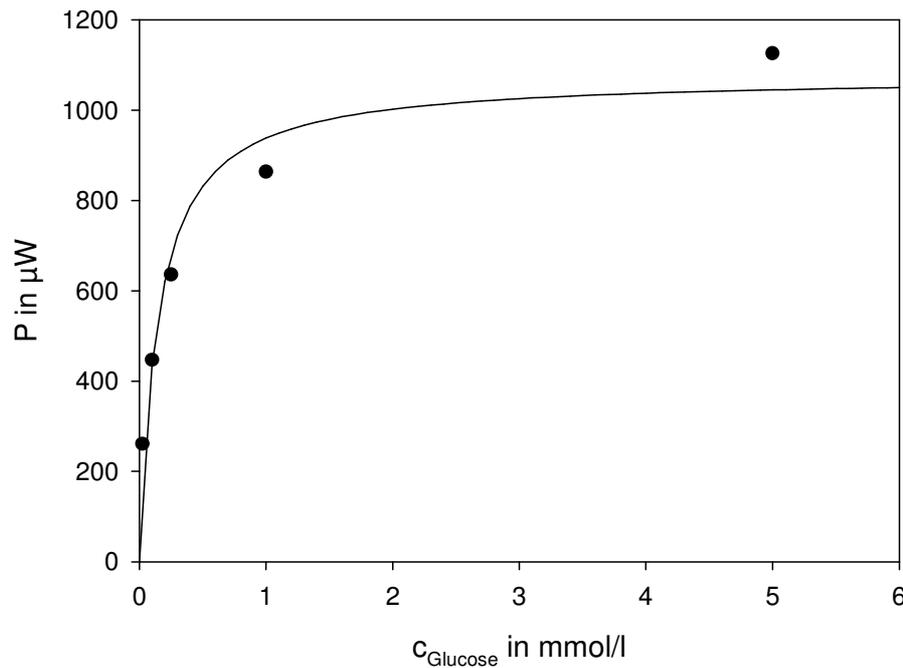


Abbildung 72: Thermische Leistung (TAM-4ml) von *P. putida* (5mmol/l Chemostat-Kultur) in Abhängigkeit der Glucosekonzentration in der zu messenden Probe, Linie – mathematischen Beschreibung durch das Monod-Modell.

Trotz der punktuellen Bestimmung der einzelnen Werte lässt sich sehr gut der zu erwartende Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Aktivität und der Konzentration des Wachstumssubstrates aufzeigen. Eine vollständige Wachstumskurve ist in diesem Fall nicht notwendig.

Die Tabelle 9 stellt die kinetischen Parameter der obigen mathematischen Beschreibungen in einer Übersicht dar.

Tabelle 9: Parameter der Modelle zur Beschreibung der Abhängigkeit der Wärmeleistung von der Substratkonzentration

	Natrium- benzoat	Phenol	Glucose
K_S in mg/l	2.1 ± 4	0.41 ± 0.37	26.42 ± 5.39
K_I in mg/l	1450 ± 45	95 ± 31	-

Der geringen Punktdichte im niedrigen Konzentrationsbereich geschuldet, ist die große Unsicherheit der Sättigungskonstante K_S bei Phenol bzw. Natriumbenzoat als Substrat zu erklären. Kleinere Konzentrationen lassen sich auf Grund der schnellen Verstoffwechslung nicht vermessen. Die ermittelten Parameter liegen im Bereich der in der Literatur (Reva et al. 2006, Reardon et al. 2000, Wang und Loh 1999, Wang et al. 1996) publizierten Werte.

Ein Vergleich mit den Werten aus den Kapiteln 4.3 – 4.5 ist aufgrund unterschiedlicher experimenteller Herangehensweise und einem größeren Konzentrationsbereich schwierig. Die Größenordnung und die tendenzielle Richtung stimmen überein.

4.8.5 Zusammenfassung

Der physiologische Zustand einer mikrobiellen Kultur, gekennzeichnet durch den Zustand von Stoffwechselwegen, lässt sich durch die indirekte kalorimetrische Detektion beschreiben. In den vorangegangenen Beispielen ist deutlich geworden, dass die Wärmeleistung der mikrobiellen Kultur als Messgröße für den Einfluss verschiedener Umweltbedingungen genutzt werden kann.

Silberionen in höherer Konzentration, wie auch höhere Natriumchloridkonzentrationen, erniedrigen die mikrobielle Aktivität. Auch können höhere Konzentrationen der Wachstumssubstrate, wie Phenol oder Natriumpyruvat, erniedrigend wirken. Ebenso konnte das Absinken der Aktivität einer hungernden mikrobiellen Gemeinschaft aufgezeichnet werden.

Die punktuelle Aufnahme der Wärmeleistungen mit dem TAM-4ml, Chip-Kalorimeter oder der MDSC erlauben eine schnelle Bestimmung der mikrobiellen Aktivität. Das TAM-20ml würde durch die lange Temperierzeit einen großen Nachteil haben. Für heterogene Proben, wie ein Belebtschlamm, ist das TAM-4ml optimal. Ein kleineres Volumen würde durch die Feststoffanteile verstopft werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur mikrobiellen Aktivität von *Pseudomonas putida* DSM12735 durchgeführt. Als Messgröße diente die mikrobielle Wärmeleistung, basierend auf dem Stoffumsatz durch die Mikroorganismen. Ziel war es, die Vor- und Nachteile der verwendeten Kalorimeter herauszuarbeiten. Dafür wurden klassische Batch-Wachstumskurven aufgenommen.

Ein weiteres Ziel bestand darin, eine Methode zur schnellen kalorimetrischen Detektion der mikrobiellen Aktivität insbesondere für die stationäre Phase zu entwickeln. In dieser Phase findet kein signifikanter Stoffumsatz statt. Durch das gezielte Auslösen einer zweiten Wachstumsphase und damit einem Stoffumsatz wird die mikrobielle Aktivität kalorimetrisch wieder messbar.

Eingesetzt wurden folgende Kalorimeter: der Thermal Activity Monitor 2277 (TAM) mit den Kalorimetern Micro Reaction System 2250-4 ml und 2250-20 ml (kurz: TAM-4ml, TAM-20ml), das IC-Chip-Kalorimeter FCC22 (Institut für Physikalische Chemie, TU Freiberg) und das Kalorimeter Micro-DSC II (MDSC).

Das TAM-20ml ermöglicht eine kontinuierliche Rührung und eine Sauerstoffversorgung der mikrobiellen Kultur. Damit konnte eine komplette Kultivierung innerhalb der kalorimetrischen Zelle durchgeführt werden, die die gute Ermittlung von charakteristischen Parametern – mikrobielle und kalorimetrische Kenngrößen – erlaubt. Die Grenze der experimentellen Anordnung ist durch eine maximale Detektion von 3mW (0.15 W/l) gesetzt. Vor jedem Wachstumsexperiment ist bei diesem Kalorimeter eine fünf- bis siebenstündige Temperierphase notwendig. Schnelle Bestimmungen der mikrobiellen Aktivität an einzelnen Proben sind damit ausgeschlossen.

Den beiden Kalorimetern TAM-4ml und Chip FCC22 fehlen sowohl Rührung als auch Sauerstoffversorgung. Damit ist eine vollständige Kultivierung innerhalb der Messzelle nicht durchführbar. Jedoch ist die punktuelle Bestimmung der Wärmeleistung aus einer externen Kultivierung (Schüttelkolben) gut und schnell möglich.

Das TAM-4 ml benötigt durch das relativ große Reaktionsvolumen von einem Milliliter zu untersuchender Probe eine 20-minütige Temperierdauer und anschließend 30 Minuten für die Detektion. Für die Aufzeichnung einer Standardkultivierung war es notwendig, die mikrobielle Probe mit Minimalmedium zu verdünnen. Ohne diese Verdünnung wurde auf

Grund der schnell einsetzenden Sauerstofflimitierung ein verfälschter Wert gemessen. Leistungswerte bis 150 $\mu\text{W}/\text{ml}$ können ohne Verdünnung problemlos gemessen werden.

Das Chip-Kalorimeter benötigt für die Probenzuführung (kalorimetrische Messzelle: 24 μl), Detektion der Wärmeleistung und Probenabführung insgesamt nur 15 Minuten. Bei dem verwendeten mikrobiellen System waren weitere Spülschritte notwendig; dadurch verlängerte sich die gesamte Detektionszeit auf 30 Minuten. Dennoch erfolgte die punktuelle Bestimmung der mikrobiellen Aktivität mit diesem Kalorimeter am schnellsten. Die mikrobielle Probe muss für eine Messung im Chip-Kalorimeter nicht verdünnt werden. Eine auftretende Sauerstofflimitierung wird im Rahmen der Versuchsauswertung beachtet. Die Bestimmung von niedrigen Leistungswerten ist durch das relativ hohe Rauschen (10 $\mu\text{W}/\text{ml}$) schlechter möglich, als bei den beiden TAM-Kalorimetern.

Für Messungen mit dem Kalorimeter MDSC wurde eine externe Kultivierung im Bioreaktor durchgeführt. Die mikrobielle Probe wurde im Kreislauf durch die kalorimetrische Messzelle (max. ein Milliliter) wieder zurück in den Bioreaktor geführt. Um eine Sauerstofflimitierung zu unterbinden, wurde der Flüssigkeitsfluss durch Sauerstoffzugaben angereichert. Dieses System benötigt durch die vielen Komponenten (Kalorimeter, Sauerstoffversorgung, Bioreaktor, Pumpe) die umfangreichste Vorbereitung, bietet aber weiterhin die Möglichkeit zusätzliche Analytik durchzuführen.

Mit den Kalorimetern wurden Wachstumskurven, basierend auf den Substraten Natriumbenzoat, Glucose und Phenol, aufgenommen. Bei Verwendung des Kalorimeters TAM-20ml stimmen besonders gut die kinetischen Parameter, wie die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ_{max} oder die Sättigungskonstante K_S , und der molare Ertragsfaktor $Y_{X/S}$, errechnet aus der Reaktionsenthalpie $\Delta_R H$, mit den Ergebnissen aus den Wachstumsexperimenten im Schüttelkolben überein. Kleinere Reaktionsenthalpien wurden bei Verwendung von Natriumbenzoat als Substrat und dem Chip-Kalorimeter bzw. TAM-4ml ermittelt. Die Probennahme und die anschließende Probenvorbereitung sind hierbei als problematisch anzusehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige Methode erarbeitet, welche die Untersuchung der mikrobiellen Aktivität in der stationären Phase bzw. Hungerphase gestattet. Auf Grund des fehlenden Stoffumsatzes in dieser Phase muss durch eine erneute Substratzugabe ein mikrobieller Stoffumsatz ausgelöst werden. Je nach Kalorimeter erfolgt dies auf unterschiedliche Weise.

Für die Bestimmung des Verlaufs der mikrobiellen Aktivität in der Hungerphase mit dem TAM-20ml dienten die Startwärmeleistung (Wärmeleistung zu Beginn der zweiten Wachstumsphase) und die Hungerdauer (Zeitdauer zwischen dem Wärmemaximum und dem Zeitpunkt der 2. Substratzugabe) als Messgröße. Für jeden einzelnen Wert ist eine neue Kultivierung mit zeitlicher Variation der zweiten Substratzugabe durchzuführen. Durch jeweils eine Vorkultur, Temperierzeit und erste Wachstumsphase ist so eine Messung sehr langwierig. Von Vorteil ist jedoch die Aufnahme einer vollständigen Wachstumskurve mit kontinuierlichem Wärmeleistungssignal. Damit sind Aussagen bezüglich der Reaktionsenthalpie und des Ertragsfaktors für die zweite Wachstumsphase möglich.

Wird das TAM-4ml oder das Chip-Kalorimeter verwendet, so ist die mikrobielle Aktivität schneller fassbar. Der Verlauf der Aktivität in der Hungerphase kann an einer einzigen hungrigen Kultur bestimmt werden. Die Probe aus der hungrigen Kultur wird mit Substrat versetzt und die resultierende Wärmeleistung auf Grund des einsetzenden Stoffumsatzes als Signal verwendet. Der Nachteil bei dieser Methode besteht darin, dass keine vollständige zweite Wachstumsphase aufgenommen wird, und so keine weiteren Informationen ausgewertet werden können.

Die MDSC mit dem kontinuierlichen Durchfluss und damit einem kontinuierlichen Signal konnte nicht erfolgreich zur Charakterisierung der mikrobiellen Aktivität eingesetzt werden. Eine kontinuierliche Zuführung in die kalorimetrische Messzelle von hungrigen Bakterien, versetzt mit neuem Substrat, konnte zwar erreicht werden, jedoch stellte sich konstruktionsbedingt kein laminarer Durchfluss ein. Die Mikroorganismen setzten sich ab und vermischten sich mit der neuen Probe, sodass keine korrekte mikrobielle Aktivität detektiert werden konnte.

Die Ergebnisse von den verschiedenen kalorimetrischen Anordnungen zusammenfassend, zeigte sich, dass der Verlauf der mikrobiellen Aktivität von *P. putida* in der Hungerphase stark vom Wachstumssubstrat abhängt. Bei den beiden aromatischen Wachstumssubstraten Natriumbenzoat und Phenol zeigte sich eine schnelle Abnahme der mikrobiellen Aktivität. Beim Substrat Glucose hingegen konnte auch über einen längeren Zeitraum keine bedeutende Abnahme festgestellt werden. Der Verlust der Aktivität ist jedoch nicht auf den Tod der Bakterien zurückzuführen. Sowohl die Optische Dichte als summarisches Signal über alle Bakterien, als auch die Lebendkeimzahl als Signal der vermehrungsfähigen Bakterien, verblieben auf dem Niveau zum Anfang der Hungerphase. Der Aktivitätsverlust betraf somit nur den speziellen Stoffwechselweg für aromatische Verbindungen, was beispielhaft an der Abnahme der Catechol-2,3-Dioxygenase gezeigt wurde. Für eine korrekte mathematische

Beschreibung der zweiten Wachstumsphase ist die ermittelte Deaktivierungsrate k_D unerlässlich.

Eine interessante Erweiterung des Informationsgehaltes kalorimetrischer Messungen stellt die Untersuchung des mikrobiellen Wachstums unter Variation des Substrates dar. Neben zusätzlichen mikrobiellen Methoden kann damit auch mit kalorimetrischen Messungen ein weiterer Einblick in den physiologischen Zustand der Kultur erfasst werden. Wird ein anderes Substrat als das Wachstumssubstrat verwendet, um die mikrobielle Aktivität zu bestimmen, sind spezifische Aussagen bezüglich der Stoffwechselaktivität möglich. Für diese Untersuchungen wurden das Chip-Kalorimeter und das TAM-4ml verwendet. Durch ihre schnelle Detektion der Wärmeleistung von einzelnen mikrobiellen Proben sind diese Kalorimeter hervorragend dafür geeignet. Um einen konstanten physiologischen Zustand der Ausgangskultur zu gewährleisten, wurde eine kontinuierliche Kultur (Chemostat) eingesetzt. Das jeweilige Wachstumssubstrat (Glucose, Natriumbenzoat, Phenol) erbrachte die höchste Wärmeleistung. Die Zugabe von Glucose in eine Kultur, die ursprünglich auf Aromaten gewachsen ist, erbrachte den zweitgrößten Wärmeleistungswert. Eine Phenol-Aktivität einer Natriumbenzoat-Kultur und umgekehrt konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Glucose-Kultur zeigt keine Aktivität auf den aromatischen Substraten. Dieses Ergebnis weist auf die allgegenwärtige Aktivität des Glucoseabbauweges und die selektive Aktivierung von Stoffwechselwegen hin.

Entsprechend der Zielstellung wurde die Hungerphase von *P. putida* weiter charakterisiert. Die Untersuchung der mikrobiellen Aktivität in der Hungerphase von Phenol/Natriumbenzoat-Kulturen mit Glucose als Substrat zeigte eine nahezu konstante Aktivität über den beobachteten Zeitraum. Die leichte Abnahme korreliert sehr gut mit der leichten Abnahme der gesamten Zellmasse (Optische Dichte). Für die Bestimmung des physiologischen Zustandes ist eine Kombination aus mikrobiellen Aktivitäten auf verschiedenen Substraten hervorragend geeignet. Schon zwei Substrate – Phenol für den Zustand des speziellen Stoffwechselweges und Glucose für den allgegenwärtigen aktiven Weg – können genügen, um einen ersten Einblick zu erhalten.

Mit der vorgestellten Methode zur punktuellen kalorimetrischen Erfassung der mikrobiellen Aktivität wurden weitere Stressfaktoren auf das Wachstum von *P. putida* erfasst. Es zeigte sich, dass das untersuchte Bakterium im Vergleich zu anderen mikrobiellen Systemen empfindlich auf erhöhte Salzkonzentration oder Silberzusätze reagiert. Auch eine höhere

Konzentration an aromatischen Substraten verringert die mikrobielle Aktivität. Dabei ist aber zu beachten, dass die gewonnenen Aussagen nur für den erfassten Zeitrahmen gelten. Die mikrobielle Aktivität bei höheren Phenolkonzentrationen ist zwar geringer, dennoch wird Phenol bis 5 mmol/l vollständig abgebaut.

Für ein weiteres Anwendungsbeispiel wurde die mikrobielle Aktivität einer komplexen Lebensgemeinschaft in einer Abwasseraufbereitungsanlage untersucht. Es zeigte sich, dass die erfasste mikrobielle Aktivität des Belebtschlammes vollständig dem Feststoff zuzuordnen war. Weiterhin wurde eine erhöhte Aktivität nach der Zugabe von verschiedenen Kohlenhydraten (Glucose, Fructose) beobachtet. Bei der Zugabe von Phenol oder Natriumbenzoat wurde keine Veränderung der Aktivität registriert.

Für die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität, d. h. den Stoffumsatz einer einzelnen Probe, sind die beiden Kalorimeter TAM-4ml und Chip FCC22 besonders geeignet. Insbesondere bei einem Vergleich zwischen gestressten und ungestressten Proben ist die schnelle Bestimmung von Vorteil. Für die vollständige Aufzeichnung einer Wachstumskurve mit einer vertieften Auswertung ist das kontinuierliche Signal des TAM-20ml zu bevorzugen.

Literaturverzeichnis

- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., Büchs, J. 2004, Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks, *Biochemical Engineering Journal*, 17(3), 187-194
- Andersen, D.C., Swartz, J., Ryll, T., Lin, N., Snedecor, B. 2001, Metabolic Oscillations in an *E. coli* Fermentation, *Biotechnology and Bioengineering*, 75(2), 212-218
- Anderson, R.K.I., Jayaraman, K., Voisard, D., Marison, I.W., von Stockar, U. 2002, Heat flux as an on-line indicator of metabolic activity in pilot scale bioreactor during the production of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*-based biopesticides, *Thermochimica Acta*, 286(2), 127-138
- Andrews, J.F. 1968, A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates, *Biotechnology and Bioengineering*, 10(6), 707-723
- Asagi, N., Ueno, H. 2008, Determination of Application Effects of Sewage Sludge on Growth, Soil Properties, and N Uptake in Komatsuna by using the Indirect ¹⁵N Isotope Method, *Communications in Soil Science & Plant Analysis*, 39(13-17) 1928-1942
- Baldoni, D., Hermann, H., Frei, R., Trampuz, A., Steinhuber, A. 2009, Performance of Microcalorimetry for Early Detection of Methicillin Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3), 774-776
- Barja, I., Núñez, L. 1999, Microcalorimetric measurements of the influence of glucose concentration on microbial activity in soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 31(3), 441-447
- Barros, N., Gallegoa, M., Feijóo, S. 2007, Sensitivity of calorimetric indicators of soil microbial activity, *Thermochimica Acta*, 458(1-2), 18-22
- Barros, N., Salgado, J., Rodríguez-Añón, J.A., Proupín, J., Villanueva, M., Hansen, L.D. 2010, Calorimetric approach to metabolic carbon conversion efficiency in soils, *Journal of Thermal Analysis & Calorimetry*, 99(3), 771-777
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclaire L., McKenzie, J.A. 2006, Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India, *Current Science*, 90(1), 58-64
- Bayly, R.C., Wigmore, G.J. 1973, Metabolism of Phenol and Cresols by Mutants of *Pseudomonas putida*, *Journal of Bacteriology*, 113(3), 1112-1120
- Bertini, I., Briganti, F., Scozzafava, A. 1994, Aliphatic and aromatic inhibitors binding to the active site of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2, *FEBS Letters*,

- 343(1), 56-60
- Biener, R., Steinkämper, A., Hofmann, J. 2010, Calorimetric control for high cell density cultivation of a recombinant *Escherichia coli* strain, *Journal of Biotechnology*, 146, 45-53
- Braissant, O., Wirz, D., Göpfert, B., Daniels, A.U. 2009, Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities, *FEMS Microbiology Letters*, 303(1), 1-8
- Braissant, O., Wirz, D., Göpfert, B., Daniels, A.U. 2010, "The heat is on": Rapid microcalorimetric detection of mycobacteria in culture, *Tuberculosis*, 90(1), 57-59
- Browne, N., Dowds, B.C.A. 2001, Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 91(6), 1085-1094
- Cassidy, D.P., Irvine, R.L. 1999, Use of calcium peroxide to provide oxygen for contaminant biodegradation in a saturated soil, *Journal of Hazardous Materials*, 69(1), 25-39
- Cervantes, C., Silver, S. 1996, Metal resistance in *Pseudomonas*: genes and mechanisms, S. 398, *Molecular biology of pseudomonads*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J.W., Mauch, K., Reuss, M. 2002, Dynamic modelling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineering*, 73(1), 53-73
- Chung, H.J., Bang, W., Drake, M.A. 2006, Stress Response of *Escherichia coli*, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 52-64
- Cordier, J.L., Butsch, B.M., Birou, B., von Stockar, U. 1987, The relationship between elemental composition and heat of combustion of microbial biomass, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25, 305-312
- Coutard, F., Crassous, P., Droguet, M., Gobin, E., Colwell, R.R., Pompey M., Hervio-Heath, D. 2007, Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation?, *The ISME Journal*, 1(2), 111-120
- Daverio, E., Spanjers, H. Bassani, C., Ligthart, J., Nieman H. 2003, Calorimetric Investigation of Anaerobic Digestion Biomass Adaptation and Temperature Effect, *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 499-505
- Deeb, R.A., Alvarez-Cohen, L. 1999, Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*, *Biotechnology and Bioengineering*, 62(5), 526-536
- DSMZ <http://www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm012735.html> (April 2010)
- Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. and Knackmuss, H.J. 1974 Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad, *Archives of Microbiology*, 99, 61-70.

- Feist, C.F. and Hegeman, G.D. 1969, Phenol and benzoate metabolism by *Pseudomonas putida*: regulation of tangential pathways, *Journal of Bacteriology*, 100, 869–877
- Frank, N., Lißner, A., Winkelmann, M., Hüttl, R., Mertens, F.O., Kaschabek, S.R., Schlömann, M. 2010, Degradation of selected (bio-)surfactants by bacterial cultures monitored by calorimetric methods, *Biodegradation*, 21(2), 179-191
- Fujita, M., Kamiya, T., Ike, M., Kawagoshi, Y., Shinohara, N. 1991, Catechol 2,3-oxygenase production by genetically engineered *Escherichia coli* and its application to catechol determination, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(3), 407-414
- Gardea, A.A., Carvajal-Millán, E., Higuera-Ciapara, I., Figueroa, C., Molina-Corral, J., Rascón, A., Orozco, A., Inda, A. 2002, Calorimetric assessment of microbial growth in milk as affected by different conditions, *Thermochimica Acta*, 294, 179-184
- Genovese, M., Denaro, R., Cappello, S., Di Marco, G., La Spada, G., Giuliano, L., Genovese, L., Yakimov, M.M. 2008, Bioremediation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes-contaminated soil: a biopile pilot experiment, *Journal of Applied Microbiology*, 105(5), 1694-1702
- Ghandour, W., Hubbard, J.A., Deistung, J., Hughes M.N., Poole, R.K. 1988, The uptake of silver ions by *Escherichia coli* K12: toxic effects and interaction with copper ions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 559-565
- Givskov, M., Eberl, L., Møller, S., Poulsen, L.K., Molin, S. 1994, Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: analysis of general cross-protection, cell shape, and macromolecular content, *Journal of Bacteriology*, 176(1), 7-14
- Glandorf, D.C.M., Verheggen, P., Jansen, T., Jorritsma, J.-W., Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K., Thomashow, L.S., Laureijs, E., Thomas-Oates, J.E., Bakker, P.A.H.M., van Loon, L.C. 2001, Effect of Genetically Modified *Pseudomonas putida* WCS358r on the Fungal Rhizosphere Microflora of Field-Grown Wheat, *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3371-3378
- Glombitza, F., Heinritz, B., Ringpfeil, M. 1984, Die Verwendung thermodynamischer und kinetischer Gesetzmäßigkeiten zur Interpretation des Begriffes, physiologischer Zustand bei Hefepopulationen, Teil I: Grundlagen und Modelle, *Acta Biotechnologica*, 4(2), 117-124
- Gordon, A.S., Millero, F.J., Gerchakov, S.M. 1982, Microcalorimetric measurements of glucose metabolism by marine bacterium *Vibrio alginolyticus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1102-1109
- Guan, Y., Evans, P.M., Kemp, R.B. 1998, Specific Heat Flow Rate: An On-Line Monitor and

- Potential Control Variable of Specific Metabolic Rate in Animal Cell Culture that Combines Microcalorimetry with Dielectric Spectroscopy, *Biotechnology and Bioengineering*, 58, 464-477
- Guan, Y.H., Lloyd, P.C., Kemp, R.B. 1999, A calorimetric flow vessel optimised for measuring the metabolic activity of animal cells, *Thermochimica Acta*, 332, 211-200
- Hansen, L.D., Russell, D.J. 2006, Which calorimeter is best? A guide for choosing the best calorimeter for a given task, *Thermochimica Acta*, 450(1-2), 71-72
- Hansen, L.D., Macfarlane, C., McKinnon, N., Smith, B.N., Criddle, R.S. 2004, Use of calorespirometric ratios, heat per CO₂ and heat per O₂, to quantify metabolic paths and energetics of growing cells, *Thermochimica Acta*, 422(1-2), 55-61
- Hecker, M., Schumann, W., Völker, U. 1996, Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*, *Molecular Microbiology*, 19(3), 417-428
- Held, K., Klare, P., Mueller, D., Tonak, P., Wolf, G., Harmel, J., Hüttl, R., Berthold, F., Herrmann, S., Vonau, W., Miniaturized complex reactor system. Ger. Offen. (2007), 5pp, DE 102006013117 A1 20070927
- Hemminger, W., Höhne, G. 1980, Grundlagen der Kalorimetrie, Akademie-Verlag Berlin, 183
- Higuera-Guisset, J., Rodríguez-Viejo, J., Chacón, M., Muñoz, F.J., Vigués, N., Mas, J. 2005, Calorimetry of microbial growth using a thermopile based microreactor, *Thermochimica Acta*, 427(1-2), 187-191
- Ho, K.P., Payne, W.J. 1979, Assimilation efficiency and energy contents of prototrophic bacteria, *Biotechnology and Bioengineering*, 21(5), 787-802
- Hoffmann, F. 1999, Physiologischer Zustand von rekombinanten *Escherichia coli* in Hochzelldichtekultivierungen bei der Produktion eines humanen Proteins, Dissertation
- Hölzel, R., Lamprecht, I., Motzkus C., Welge, G. 1995, Aromatic compounds as model substances for environmental pollutions: Energetic and kinetic calorimetric investigations of mineralization by microorganisms, *Pure and Applied Chemistry*, 67(6), 947-954
- Hrenovic, J., Ivankovic, T. 2009, Survival of *Escherichia coli* and *Acinetobacter junii* at various concentrations of sodium chloride, *EurAsian Journal of BioSciences*, 3, 144-151
- Hüttl, R.; Harmel, J.; Lissner, A.; Wolf, G.; Klare, P.; Vonau, W.; Berthold, F.; Herrmann, S. 2008, A small-scale calorimetric reactor system combined with several chemical sensors for the investigation of microbial growth processes. *Engineering in Life Sciences*, 8(1), 56-61.
- Hüttl, R., Frank, N., Harmel, J., Lißner, A., Winkelmann, M. 2009, Einsatzmöglichkeiten

- thermophysikalischer Methoden zur Lösung biochemischer und biotechnologischer Fragestellungen, Chemie Ingenieur Technik, 82(1-2), 129-134
- Hugenholtz, P. 2002, Exploring prokaryotic diversity in the genomic era, *Genome Biology*, 3(2), 1-8
- Hwang, M.G., Katayama, H., Ohgaki, S. 2007, Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the bactericidal ability of silver cations, *Water Research*, 41(18), 4097-4104
- Janssen, M., Wijffels, R., von Stockar, U. 2007, Biocalorimetric monitoring of photoautotrophic batch cultures, *Thermochimica Acta*, 458(1-2), 54-64
- Jenkins, R.O., Heald, S.C. 1996, Stability of toluene oxidation by *Pseudomonas putida* under nutrient deprivation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(4), 388-392
- Johnson, D.R., Park, J., Kukor, J.J., Abriola, L.M. 2006, Effect of carbon starvation on toluene degradation activity by toluene monooxygenase-expressing bacteria, *Biodegradation*, 17(5), 437-445
- Jones, S.A., Bowler, P.G., Walker, M., Parsons, D. 2004, Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber® dressing, *Wound Repair and Regeneration*, 12(3), 288-294
- Jungo, C., Marison, I., von Stockar, U. 2007, Regulation of alcohol oxidase of a recombinant *Pichia pastoris* Mut+ strain in transient continuous cultures, *Journal of Biotechnology*, 130(3), 236-246
- Juteau, P., Bisailon, J.G., Lépine, F., Ratheau, V., Beudet R., Villemur, R. 2003, Improving the Biotreatment of Hydrocarbons-Contaminated Soils by Addition of Activated Sludge taken from the Wastewater Treatment Facilities of an Oil Refinery, *Biodegradation*, 14(1), 31-40
- KEGG PATHWAY: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (März 2010) mit <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map01100.html>
- Kim, J., Kwon, S., Ostler, E. 2009, Antimicrobial effect of silver-impregnated cellulose: potential for antimicrobial therapy, *Journal of Biological Engineering*, 3(20), 1-9
- Krell, T. 2007, Microcalorimetry: a response to challenges in modern biotechnology, *Microbial Biotechnology*, 1(2), 126-136
- Lendenmann, U., Snozzi, M., Egli, T. 2000, Growth kinetics of *Escherichia coli* with galactose and several other sugars in carbon-limited chemostat culture, *Canadian Journal of Microbiology*, 46(1), 72-80
- Lerchner, J., Wolf, A., Schneider, H.-J., Mertens, F., Kessler, E., Baier, V., Funfak, A.,

- Nietzsch, M. Krügel 2008a, Nano-calorimetry of small-sized biological samples, *Thermochimica Acta*, 477(1-2), 48-53
- Lerchner, J., Wolf, A., Schneider, H.-J., Mertens, F., Neu, T.R., Harms, H., Maskow, T. 2008b, Miniaturized calorimetry — A new method for real-time biofilm activity analysis, *Journal of Microbiological Methods*, 74(2-3), 74-81
- Li, X.Z., Nikaido, H., Williams, K.E. 1997, Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins, *Journal of Bacteriology*, 179(19), 6127-6132
- Lim, T.G.H., Gan, K.D., Hughes, T.A., Hayasaka, S.S. 2001, Toluene Mineralization and Growth Potential of *Pseudomonas putida* PaW164 Under Toluene-Limiting Conditions, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), 117-122
- Liu, J.-S., Marison, I.W., von Stockar, U. 1999, Anaerobic Calorimetry of the Growth of *Lactobacillus Helveticus* Using a Highly Sensitive Bio-RCl, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 56(3), 1191-1195
- Loha, K.-C., Chua, S.-S. 2002, Ortho pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of meta pathway at high substrate concentrations, *Enzyme and Microbial Technology*, 30(5), 620-626
- Marison, I.W., Liu, J.-S., Ampuero, S., Von Stockar, U., Schenker, B. 1998, Biological reaction calorimetry: Development of high sensitivity bio-calorimeters, *Thermochimica Acta*, 309(1-2), 157-173
- März, Ulrich 2009, World Markets for Fermentation Ingredients – FOD020C, <http://www.bccresearch.com/report/FOD020C.html>
- Maskow T., Babel, W. 2003, Thermokinetic description of anaerobic growth of *Halomonas halodenitrificans* using a static microcalorimetric ampoule technique, *Journal of Biotechnology*, 101(3), 267-274
- Maskow, T., Olomolaiye, D., Breuer, U., Kemp, R. 2004, Flow Calorimetry and Dielectric Spectroscopy to Control the Bacterial Conversion of Toxic Substrates into Polyhydroxyalcanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 85(5), 547-552
- Maskow, T., Lerchner, J., Peitzsch, M., Harms, H., Wolf, G. 2006, Chip calorimetry for the monitoring of whole cell biotransformation, *Journal of Biotechnology*, 122(4), 431-442
- Maskow, T., Harms, H. 2006, Real Time Insights into Bioprocesses Using Calorimetry: State of the Art and Potential, *Engineering in Life Sciences*, 6(3), 266-277
- Modak, S. M., Fox, C.R.Jr. 1973, Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemical Pharmacology*, 22, 2391–2404

- Monod, J. 1949, The growth of bacterial cultures, *Annual Review of Microbiology*, 3, 371-394
- Motzkus, c., Welge, G., Lamprecht, I. 1993, Calorimetric investigations of phenol degradation by *Pseudomonas putida*, *Thermochimica Acta*, 229(1), 181-192
- Niescher, S., Wray, V., Lang, S., Kaschabeck, S.R., Schloemann, M. 2006, Identification and structural characterization of novel trehalose dinocardiomycolates from n-alkane-grown *Rhodococcus opacus* 1CP, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(5), 605-611
- Nuñez, L., Barros N., Barja, I. 1994, A kinetic analysis of the degradation of glucose by soil microorganisms studied by microcalorimetry, *Thermochimica Acta*, 237(1), 73-81
- O'Neill, M.A.A., Beezer, A.E., Vine, G.J., Kemp, R.B., Olomolaiye, D., Volpe, P.L.O, Oliveira, D. 2004, Practical and theoretical consideration of flow-through microcalorimetry: determination of "thermal volume" and its flow rate dependence, *Thermochimica Acta*, 413(1-2), 193-199
- Oliver, J.D. 2005, The Viable but Nonculturable State in Bacteria, *The Journal of Microbiology*, 43(1), 93-100
- Onken, U., Liefke, E. 1989, Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 40, 137-169
- Onysko, K.A., Budman, H.M., Robinson, C.W. 2000, Effect of Temperature on the Inhibition Kinetics of Phenol Biodegradation by *Pseudomonas putida* Q5, *Biotechnology and Bioengineering*, 70, 291-299
- Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. (2001), In vivo dynamics of galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolic fluxes and metabolite levels, *Biotechnology and Bioengineering*, 73(5), 412-425
- Patiño, R., Janssen, M., von Stockar, U. 2007, A study of the growth for the microalga *Chlorella vulgaris* by photo-bio-calorimetry and other on-line and off-line techniques, *Biotechnology and Bioengineering*, 96(4), 757-767
- Pepper, I.L., Gerba, C., Brusseau, M.L. 1996, *Pollution Science*, Academic Press Inc.
- Rappé, M.S, Giovannoni, S.J. 2003, The uncultured microbial majority, *Annual Review of Microbiology*, 57, 369-394
- Reardon, K.F., Mosteller, D.C., Bull Rogers, J.D. 2000, Biodegradation Kinetics of Benzene, Toluene, and Phenol as Single and Mixed Substrates for *Pseudomonas putida* F1, *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 385-400
- Renneberg, R. 2007, *Biotechnologie für Einsteiger*, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag,

ISBN 978-3-8274-1847-0

- Regestein, L., Knabben, I., Lerchner, J., Maskow, T., Büchs, J. 2009, Messung der Wärmeproduktion mikrobieller Kulturen mittels Chip-Kalorimeter und Reaktorkalorimeter, *Chemie Ingenieur Technik*, 181(8), 1269
- Reva, O.N., Weinel, C., Weinel, M., Böhm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J.D., Tümmler, B. 2006, Functional Genomics of Stress Response in *Pseudomonas putida* KT2440, *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4079-4092
- Rodrigues, A.C., Wuertz, S., Brito, A.G., Melo, L.F. 2005, Fluorene and Phenanthrene Uptake by *Pseudomonas putida* ATCC 17514: Kinetics and Physiological Aspects, *Biotechnology and Bioengineering*, 90(3), 281-289
- Schäffer, B., Szakály S., Lörinczy, D. 2004, Examination of the growth of probiotic culture combinations by the isoperibolic batch calorimetry, *Thermochimica Acta*, 415(1-2), 123-126
- Schäffer, B., Keller, B., Daróczy, L., Lörinczy, D. 2010, Examination of growth of probiotic microbes by an isoperibolic calorimetry, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 102(1), 9–12
- Schirmer, M., Butler, B.J., Roy, J.W., Frind, E.O., Barker, J.F. 1999, A relative-least-squares technique to determine unique Monod kinetic parameters of BTEX compounds using batch experiments, *Journal of Contaminant Hydrology*, 37, 69-86
- Schubert, T., Breuer, U., Harms, H., Maskow, T. 2007, Calorimetric bioprocess monitoring by small modifications to a standard bench-scale bioreactor, *Journal of Biotechnology*, 130(1), 24-31
- Scott, C., Hilton, M.E., Coppin, C.W., Russell, R.J., Oakeshott, J.G., Sutherland T.D. 2007, A global response to sulphur starvation in *Pseudomonas putida* and its relationship to the expression of low-sulfur-content proteins, *FEMS Microbiology Letters*, 267(2), 184-193
- Seletzky, J.M., Noack, U., Fricke, J., Hahn, S., Büchs, J. 2006, Metabolic activity of *Corynebacterium glutamicum* grown on l-lactic acid under stress, *Applied Microbiology & Biotechnology*, 72(6), 1297-1307
- Seletzky, J., Noack, U., Hahn, S., Knoll, A., Amoabediny, G., Büchs, J. 2007, An experimental comparison of respiration measuring techniques in fermenters and shake flasks: exhaust gas analyzer vs. RAMOS device vs. respirometer, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(2), 123-130
- Shehata, T.E., Marr, A.G. 1971, Effect of Nutrient Concentration on the Growth of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 107(1), 210-216

- Stark, D., Zala, D., Munch, T., Sonnleitner, B., Marison, I.W., von Stockar, U. 2003, Inhibition aspects of the bioconversion of l-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2), 212-223
- Stein, S., Selesi, D., Schilling, R., Pattis, I., Schmid, M., Hartmann, A. 2005, Microbial activity and bacterial composition of H₂-treated soils with net CO₂ fixation, *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10), 1938-1945
- Syn, C.K.C., Magnuson, J.K., Kingsley, M.T., Swarup, S. 2004, Characterization of *Pseudomonas putida* genes responsive to nutrient limitation, *Microbiology*, 150, 1661-1669
- Tam, L.T., Antelmann, H., Eymann, C., Albrecht, D., Bernhardt, J., Hecker, M. 2006, Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach, *Proteomics*, 6(16), 4565-4585
- Thornton, W.M. 1917, The relation of oxygen to the heat of combustion of organic compounds, *Philosophical Magazine*, 33, 196-203
- Torres, F.E., Kuhn, P., De Bruyker, D., Bell, A.G., Wolkin, M.V., Peeters, E., Williamson, J.R., Anderson, G.B., Schmitz, G.P., Recht, M.I., Schweizer, S., Scott, L.G., Ho, J.H., Elrod, S.A., Schultz, P.G., Lerner, R.A., Bruce, R.H. 2004, Enthalpy arrays, *PNAS*, 101(26), 9517-9522
- Türker, M. 2004, Development of biocalorimetry as a technique for process monitoring and control in technical scale fermentations, *Thermochimica Acta*, 419(1-2), 73-81
- Ullrich, F., Winkelmann, M., Hüttl R., Wolf, G. 2005, Performance of calorimetric methods for the investigation of microbial systems in combination with additional sensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383(5), 747-751
- Voisard, D., Claivaz, C., Menoud, I., Marison I.W., von Stockar U. 1998, Use of reaction calorimetry to monitor and control microbial cultures producing, *Thermochimica Acta* , 309(1-2), 87-96
- Walsh, G. 2007, *Pharmaceutical Biotechnology: Concepts and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, ISBN 978-0-470-01244-4
- Wang, K.-W., Baltzis, B.C. and Lewandowski, G.A. 1996, Kinetics of phenol biodegradation in the presence of glucose, *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 87-94
- Wang, X., Liu, Y., Xie, B., Shi, X., Zhou, J., Zhang, H. 2005, Effect of nisin on the growth of *Staphylococcus aureus* determined by a microcalorimetric method, *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(4), 350-354
- Wang, S.-J., Loh, K.-C. 1999, Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of

- phenol biodegradation, *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3-5), 177-184
- Wayman, M., Tseng, M.C. 1976, Inhibition-threshold substrate concentrations, *Biotechnology and Bioengineering*, 18(3), 383-387
- Winkelman, M., Hunger, N., Hüttl, R., Wolf, G. 2009, Calorimetric investigations on the degradation of water insoluble hydrocarbons by the bacterium *Rhodococcus opacus* 1CP, *Thermochimica Acta*, 482(1-2), 12-16
- Xi, L., Yi, L., Jun, W., Songsheng, Q. 2001, The effect of the selenomorpholine derivatives on the growth of *Staphylococcus aureus* studied by microcalorimetry, *Thermochimica Acta*, 375(1-2), 109-113
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., Colwell, R.R. 1982, Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment, *Microbial Ecology*, 8(4), 313-323
- Yao, J., Wang, F., Tian, L., Zhou, Y., Chen, H.L., Chen, K., Gai, N., Zhuang, R.S., Maskow, T., Ceccanti B., Zaray, G. 2009, Studying the toxic effect of cadmium and hexavalent chromium on microbial activity of a soil and pure microbe, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 95(2), 517-524
- Zhang, L.X., Liu, Y., Cia, L.H., Ha, Y.J., Yin, J., Hu, P.Z. 2006, Inhibitory study of some novel Schiff base derivatives on *Staphylococcus aureus* by microcalorimetry, *Thermochimica Acta*, 440(1), 51-56
- Zotta, T., Parente, E., Ricciardi, A. 2009, Viability staining and detection of metabolic activity of sourdough lactic acid bacteria under stress conditions, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 1119-1124
- Zoog, A., Stoessel, F., Fischer, U., Hungerbühler, K. 2004, Isothermal reaction calorimetry as a tool for kinetic analysis, *Thermochimica Acta*, 419(1-2), 1-17

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Physiologische Stadien von Mikroorganismen, nach Pepper et al. 1996.	4
Abbildung 2: Unterschiedlicher Abbau von Catechol im Aromatenstoffwechsel, links – ortho Ringspaltung, rechts – meta Ringspaltung, nach Feist und Hegeman (1969)..	16
Abbildung 3: A) Kompletter Kalorimereinsatz (20 ml) mit: Rührmotor, Kalorimeterzellenaufsatz, Rührerwelle, Sicherungsring, Teflondichtung, Rührer, Kalorimeterzelle; B) 4 ml Kalorimetergefäß und 20 ml Kalorimetergefäß; C) TAM mit vier Kalorimereinsätzen (orange) mit zwei Spritzenpumpen (links).....	25
Abbildung 4: Messprogramm mit dem TAM-20 ml anhand einer schematischen Messkurve, I Probeneinbau, II Temperierphase, III Basislinie, IV Hauptphase, V Basislinie, VI elektrische Kalibrierung.	26
Abbildung 5: Messprogramm mit dem TAM – 4 ml anhand einer schematischen Messkurve, I Probenpräparation und –einbau, II Temperierphase, III Messphase.	27
Abbildung 6: Schematischer Aufbau der Rückflussanordnung, von links nach rechts: Sauerstoffversorgung, Bioreaktor, MDSC mit Probe- und Referenzzelle.	28
Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Anordnung für einmaligen Durchfluss, von links nach rechts: Sauerstoffversorgung, bakterielle Kultur, frisches Nährmedium, MDSC mit Probe- und Referenzzelle, Abfallbehälter.....	28
Abbildung 8: Chip-Kalorimeter (Lerchner et al. 2008a), B) Thermostat System, C) Messzelle.	30
Abbildung 9: Messprogramm mit dem Chip-Kalorimeter anhand einer schematischen Messkurve, I Probenvorbereitung/Basislinie, II Kammerbefüllung, III Messphase, IV Kammerentleerung.....	30
Abbildung 10: Einzelmessung mit dem Kalorimeter TAM-4ml, 100 µl mikrobiologische Probe, 900 µl Minimalmedium mit 5 mmol/l Natriumbenzoat, I Probenpräparation und –einbau, II Temperierphase, III Messphase.	37
Abbildung 11: Einzelmessung mit dem Kalorimeter TAM-4ml, 100 µl mikrobiologische Probe 900 µl Minimalmedium mit 5 mmol/l Natriumbenzoat, schwarz – Originaldaten, rot – entschierte Daten, grün – Zeitpunkt zur Erfassung der Wärmeleistung der Probe.	38
Abbildung 12: Messsingale des Chip-Kalorimeters bei verschiedenen Proben, rot – steriles Minimalmedium, schwarz – mittlere mikrobielle Aktivität, grün – hohe mikrobielle Aktivität.....	39
Abbildung 13: Abhängigkeit des thermischen Volumens v_{th} von der Durchflussgeschwindigkeit.....	40
Abbildung 14: Zeitliche Wärmeleistungsentwicklung bei Variation der Biomassekonzentration ($c_{Mik} = 25, 50, 100, 250, 500$ und $1000 \mu\text{l/ml}$).....	42
Abbildung 15: Zusammenhang zwischen der Wärmeleistung und der Biomassekonzentration.	42
Abbildung 16: Zeitliche Wärmeleistungsentwicklung bei Variation des Volumens an mikrobieller Probe konstanter Aktivität ($c_{Mik} = 0, 50, 100, 150, 200 \mu\text{l/ml}$, 0.5 ml Gesamtvolumen, 5 mmol/l Natriumbenzoat), lineare Regression der Wärmeleistung bei 666 s (rote Linie).	44
Abbildung 17: Zusammenhang zwischen der Wärmeleistung markanter Punkte der Messkurven (Abbildung 16) und der Konzentration der mikrobiellen Probe, schwarz – konstanter Zeitpunkt (666 Sekunden nach Einbringen der Kalorimeterzelle), grün – Minimum im ersten Wärmeeffekt, blau – Maximum des zweiten Wärmeeffektes.	44

Abbildung 18: Dreifache Bestimmung der Wachstumskurve (Optische Dichte) von <i>P. putida</i> auf 5 mmol/l Natriumbenzoat an einer Schüttelkultur.	46
Abbildung 19: Mathematische Modellierung des Wachstums von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat, Andrews-Modell – vollständige Linie, Monod-Modell – gestrichelte Linie.	47
Abbildung 20: Kalorimetrisch (TAM-20ml) aufgenommene Wachstumskurve von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (0.33 mmol/l), schwarz – Wärmeleistung, rot – korrigierte Wärmeleistung, grün – Wärme, Pfeile kennzeichnen markante Punkte.	50
Abbildung 21: Kalorimetrische Mehrfachbestimmung (TAM-20ml) der Wachstumskurve von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (0.33 mmol/l).....	51
Abbildung 22: Mathematische Beschreibung der erfassten Wärmeleistungskurve (rot) und Wärmekurve (grün) von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat, blau – Andrews-Modell, schwarz – Monod-Modell.	51
Abbildung 23: Mathematische Beschreibung der kalorimetrisch (TAM-20ml) erfassten Wachstumskurve von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat ohne den Anfangsbereich, blau – Andrews-Modell, schwarz – Monod-Modell.....	52
Abbildung 24: Wachstum von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (2.5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit TAM-4ml (rot), Wärme (grün).	53
Abbildung 25: Mathematische Beschreibung (Monod-Modell) des kalorimetrisch (TAM-4ml) aufgezeichneten Wachstums von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat, Wärmeleistung (rot), Wärme (grün).	55
Abbildung 26: Wachstum von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit Chip-Kalorimeter (rot), Wärme (grün).	56
Abbildung 27: Mathematische Beschreibung (Monod-Modell) des kalorimetrisch (Chip-Kalorimeter) aufgezeichneten Wachstums von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat.	57
Abbildung 28: Wachstum von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (5 mmol/l) in einem Bioreaktor (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit der MDSC (rot), Wärme (grün).	58
Abbildung 29: Mathematische Beschreibung (Monod-Modell) des kalorimetrisch (MDSC) aufgezeichneten Wachstums von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat.	59
Abbildung 30: Wachstumskurve (Optische Dichte) von <i>P. putida</i> auf 5 mmol/l Glucose (Punkte) und mathematische Modellierung mit dem Monod-Modell (Linie)..	61
Abbildung 31: Kalorimetrisch (TAM-20ml) aufgenommene Wachstumskurve von <i>P. putida</i> auf Glucose (0.33 mmol/l), schwarz – Wärmeleistung, grün – korrigierte Wärmeleistung, blau – Wärme.	62
Abbildung 32: Mathematische Beschreibung der erfassten Wärmeleistungskurve (schwarz) und Wärmekurve (blau) von <i>P. putida</i> auf Glucose, rot – Monod-Modell.	63
Abbildung 33: Wachstum von <i>P. putida</i> auf Glucose (5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit TAM-4ml (rot), Wärme (grün), durchgezogene Linie – mathematische Beschreibung (Monod-Modell).	64
Abbildung 34: Wachstum von <i>P. putida</i> auf Glucose (5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit Chip-Kalorimeter (rot), Wärme (grün), durchgezogene Linie – mathematische Beschreibung (Monod-Modell).	65
Abbildung 35: Wachstumskurve (Optische Dichte) von <i>P. putida</i> auf 5 mmol/l Phenol (Punkte) und mathematische Modellierung mit dem Andrews-Modell (Linie).	67

Abbildung 36: Kalorimetrisch (TAM-20ml) aufgenommene Wachstumskurve von <i>P. putida</i> auf Phenol (0.33 mmol/l), schwarz – Wärmeleistung, grün – korrigierte Wärmeleistung, blau – Wärme.	68
Abbildung 37: Mathematische Beschreibung der erfassten Wärmeleistungskurve (schwarz) und Wärmekurve (blau) von <i>P. putida</i> auf Phenol, rot – Andrews-Modell.	69
Abbildung 38: Wachstum von <i>P. putida</i> auf Phenol (2.5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit TAM-4ml (rot), Wärme (grün), durchgezogene Linie – mathematische Beschreibung (Andrews-Modell).	70
Abbildung 39: Wachstum von <i>P. putida</i> auf Phenol (5 mmol/l) in einer Schüttelkultur (schwarz – Optische Dichte), Messung der Wärmeleistung mit Chip-Kalorimeter (rot), Wärme (grün), durchgezogene Linie – mathematische Beschreibung (Andrews-Modell).	71
Abbildung 40: Wachstums von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (Doppelbestimmung), 5 mmol/l (rot, schwarz), zwei mal 2.5 mmol/l (blau, grün).	74
Abbildung 41: Wachstums von <i>P. putida</i> auf Glucose (Doppelbestimmung), 5 mmol/l (rot, schwarz), zwei mal 2.5 mmol/l (blau, grün).	75
Abbildung 42: Wachstums von <i>P. putida</i> auf 2 mal 2.5 mmol/l Natriumbenzoat, blau – Optische Dichte, grün – Wärmeleistung (TAM-4ml).....	75
Abbildung 43: Wachstums von <i>P. putida</i> auf 2 mal 2.5 mmol/l Glucose, blau – Optische Dichte, grün – Wärmeleistung (TAM-4ml).	76
Abbildung 44: Zweifaches Wachstum von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (0.33 mmol/l bzw. 5 μ mol), Wärmeleistung aufgezeichnet mit TAM-20ml, Hungerdauer: 171 min, Ausschnitt von 12 bis 13.5 h.	77
Abbildung 45: Zweifaches Wachstum von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (0.33 mmol/l bzw. 5 μ mol), Wärmeleistung aufgezeichnet mit TAM-20ml, Hungerphase: von 73 bis 485 min.	78
Abbildung 46: Exponentieller Zusammenhang zwischen Startwärmeleistung P_0 (TAM-20ml) und Zeitdauer der Hungerphase bei <i>P. putida</i> mit Natriumbenzoat als Wachstumssubstrat.	79
Abbildung 47: Exponentieller Zusammenhang zwischen Wärmeleistung (TAM-4ml) und Zeitdauer der Hungerphase bei <i>P. putida</i> mit Natriumbenzoat als Wachstumssubstrat.	80
Abbildung 48: Exponentieller Zusammenhang zwischen Wärmeleistung (Chip-Kalorimeter) und Zeitdauer der Hungerphase bei <i>P. putida</i> mit Natriumbenzoat als Wachstumssubstrat.	80
Abbildung 49: Zusammenhang zwischen Wärmeleistung (MDSC) und Zeitdauer der Hungerphase bei <i>P. putida</i> mit Natriumbenzoat als Wachstumssubstrat.	81
Abbildung 50: Schematischer Aufbau der Durchflusszelle der Micro-DSC II, aus der Produktbroschüre von Setaram.	82
Abbildung 51: Zweifaches Wachstum von <i>P. putida</i> auf Glucose (0.33 mmol/l bzw. 5 μ mol), Wärmeleistung aufgezeichnet mit TAM-20ml, Hungerdauer: von 5.4 bis 43.2 h, Startwärmeleistung mit roten Punkt markiert.	84
Abbildung 52: Wachstum und stationäre Phase von <i>P. putida</i> auf Glucose (5 mmol/l), Detektion der Wärmeleistung mit TAM-4ml, grün – Wärmeleistung der Kultur, rot – Wärmeleistung der Probe mit Glucosezusatz (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte.	85
Abbildung 53: Fortsetzung der Messung aus Abbildung 52, Detektion der Wärmeleistung mit TAM-4ml, rot – Wärmeleistung der Probe mit erneutem Glucosezusatz (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte.	86

Abbildung 54: Wachstum und stationäre Phase von <i>P. putida</i> auf Glucose (5 mmol/l), Detektion der Wärmeleistung mit Chip-Kalorimeter, rot – Wärmeleistung der Kultur, grün – Wärmeleistung der Probe mit erneutem Glucosezusatz (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte.	87
Abbildung 55: Zweifaches Wachstum von <i>P. putida</i> auf Phenol (0.33 mmol/l bzw. 5 µmol), Wärmeleistung aufgezeichnet mit TAM-20ml, Hungerphase: von 2.5 bis 16.6 h.	88
Abbildung 56: Exponentieller Zusammenhang zwischen Startwärmeleistung P_0 (TAM-20ml) und Zeitdauer der Hungerphase bei <i>P. putida</i> mit Phenol als Wachstumssubstrat.	89
Abbildung 57: Exponentieller Zusammenhang zwischen Wärmeleistung P und Zeitdauer der Hungerphase bei <i>P. putida</i> mit Phenol als Wachstumssubstrat, schwarz – TAM-4ml, blau – Chip-Kalorimeter	89
Abbildung 58: Wachstum und stationäre Phase von <i>P. putida</i> auf Phenol (2.5 mmol/l), Punkte – Optische Dichte, Dreiecke – cfu / Lebendkeimzahl pro ml.....	91
Abbildung 59: Wachstum und stationäre Phase von <i>P. putida</i> auf Phenol (2.5 mmol/l), Punkte – Optische Dichte, Dreiecke – relative Enzymaktivität (Catechol-2,3-Dioxygenase) in Prozent.....	91
Abbildung 60: Mathematische Beschreibung der Wachstumskurve von <i>P. putida</i> auf Phenol, schwarz – Messkurve, blau – ohne Deaktivierungsterm, rot – mit Deaktivierungsterm.....	92
Abbildung 61: Wachstumsphase und Hungerphase von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, grün – Wärmeleistung auf jeweilige Natriumbenzoatzugabe, TAM-4ml.....	98
Abbildung 62: Wachstumsphase und Hungerphase von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, grün – Wärmeleistung auf jeweilige Natriumbenzoatzugabe, Chip-Kalorimeter.....	98
Abbildung 63: Hungerphase von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat (5 mmol/l, Chemostat), grün – Wärmeleistung auf jeweilige Natriumpyruvatzugabe, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, schwarz – Wärmeleistung auf jeweilige Natriumbenzoatzugabe, aufgenommen mit TAM-4ml.	99
Abbildung 64: Wachstumsphase und Hungerphase von <i>P. putida</i> auf Phenol (2.5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, grün – Wärmeleistung auf jeweilige Phenolzugabe, TAM-4ml.....	100
Abbildung 65: Wachstumsphase und Hungerphase von <i>P. putida</i> auf Phenol (5 mmol/l), schwarz – Optische Dichte, rot – Wärmeleistung auf jeweilige Glucosezugabe, grün – Wärmeleistung auf jeweilige Phenolzugabe, Chip-Kalorimeter.....	101
Abbildung 66: Wachstumskurven von <i>P. putida</i> aufgezeichnet mit dem TAM-20ml, links – 3. Phenol Wachstum (1. Wärmeeffekt), anschließend Wachstum auf Glucose (2. Wärmeeffekt) bei verschiedenen Zeiten, rechts – Wachstums auf Glucose nach einer (grün), zwei (blau) und drei (rot) Phenol-Wachstumsphasen.....	101
Abbildung 67: Thermische Leistung (TAM-4ml) einer Belebtschlammprobe in Abhängigkeit des zugegebenen Stoffes.....	104
Abbildung 68: Thermische Leistung einer Belebtschlammprobe mit 200 ml Gasphase in 250 ml Schott-Duran-Flasche, schwarz – Leistung ohne Zusatz, grün – Zusatz von Natriumpyruvat (5 mmol/l), rot – Zusatz von Glucose (5 mmol/l).	105
Abbildung 69: Relative mikrobielle Aktivität von <i>P. putida</i> in Abhängigkeit von der Natriumchloridkonzentration, schwarz – Natriumbenzoat-Kultur, grau – Glucose-Kultur.	107

Abbildung 70: Thermische Leistung (MDSC) von <i>P. putida</i> (Natriumbenzoat, Probe aus einer 5 mmol/l Chemostat-Kultur) in Abhängigkeit von der Silber-Konzentration, schwarz, rot, grün, blau, rosa, grau, braun und dunkelgrün – 0, 20, 25, 35, 40, 50, 200 und 2000 µg/l.....	109
Abbildung 71: Thermische Leistung (TAM-4ml) von <i>P. putida</i> (Probe aus einer kont. Kultur) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in der zu messenden Probe, Linie – mathematischen Beschreibung (Gleichung (34)), links – Natriumbenzoat, rechts – Phenol.....	110
Abbildung 72: Thermische Leistung (TAM-4ml) von <i>P. putida</i> (5mmol/l Chemostat-Kultur) in Abhängigkeit der Glucosekonzentration in der zu messenden Probe, Linie – mathematischen Beschreibung durch das Monod-Modell.	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über einige Daten zu den verwendeten Kalorimetern.....	11
Tabelle 2: Auswahl an mathematischen Modellen zur Beschreibung der Abhängigkeit μ von S	22
Tabelle 3: Linearer Zusammenhang zwischen der Wärmeleistung und der Biomassekonzentration	45
Tabelle 4: Kinetische Parameter des Wachstums von <i>P. putida</i> auf Natriumbenzoat, kalorimetrisch bestimmt und bezogen auf Benzoesäure	53
Tabelle 5: Mikrobielle Wärmeproduktion (TAM-4ml) bei Verwendung von verschiedenen Substraten, Wärmeleistungswerte in $\mu\text{W/ml}$	95
Tabelle 6: Mikrobielle Wärmeproduktion (Chip-Kalorimeter) bei Verwendung von verschiedenen Substraten, Wärmeleistungswerte in $\mu\text{W/ml}$	96
Tabelle 7: Symbolischer Zusammenhang zwischen der substratabhängigen mikrobiellen Aktivität und dem Wachstumssubstrat, ++ sehr gut bis -- nicht vorhanden	96
Tabelle 8: Wärmeleistung der Belebtschlammprobe (200 ml) ohne und mit Natriumpyruvat bzw. Glucose-Zugabe, zum Vergleich die 50 ml Probe, grau unterlegte Werte – Faulgase festgestellt, n.b. – nicht bestimmt, ab 42. Tag mit ausreichend Sauerstoff	106
Tabelle 9: Parameter der Modelle zur Beschreibung der Abhängigkeit der Wärmeleistung von der Substratkonzentration.....	111

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

c_{Bio}	Biomassekonzentration
cfu	colony forming units, Lebendkeimzahl
c_{Mik}	mikrobielle Volumenkonzentration
c_P	Wärmekapazität
γ	Reduktionsgrad
$\Delta_R H$	Reaktionsenthalpie
$\Delta_R H_{Ana}$	Reaktionsenthalpie des Anabolismus
$\Delta_R H_{Kat}$	Reaktionsenthalpie des Katabolismus
ΔT	Temperaturdifferenz
E	Sensitivität der Thermosäule
F	Flussrate
K_I	Inhibierungskonstante
K_S	Sättigungskonstante
k_D	Deaktivierungsrate
M_S	Molmasse des Substrates
M_X	Molmasse der Biomasse
MDSC	Micro Difference Scanning Calorimeter
μ	spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
μ_{max}	maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit
ν_S, ν_X	stöchiometrischer Koeffizient (Substrat, Biomasse)
$O_{\bar{A}}$	Oxykalisches Äquivalent
OD	Optische Dichte
P	Wärmeleistung
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
\dot{q}_m, \dot{q}_e	gemessene, entschmierte Wärmeleistung
R_{th}	Thermischer Widerstand
S	Substratkonzentration
S_C	Anzahl an Kohlenstoffatomen in einem Substratmolekül
t	Zeit
t_S	Hungerdauer
τ	Zeitkonstante
TAM	Thermal Activity Monitor
U	Spannung

v_{ges}	Gesamtvolumen
v_{th}	Thermisches Volumen
X	Biomassekonzentration
X_C	Anzahl an Kohlenstoffatomen in der Biomassesummenformel
$Y_{X/S}$	molarer Ertragsfaktor
$Y_{X/S,g}$	Massen-Ertragsfaktor

Anhang

Mathematische Beschreibung

Die Auswertung der kalorimetrischen Messdaten erfolgte mit Hilfe des Programmpaketes Matlab (6.5.1) von MathWorks. Das Programm zur Beschreibung des mikrobiellen Wachstums unter Verwendung von Matlab stellt sich wie folgt dar.

```
function growth % Funktion zum Programmablauf
% Input
X0 = 1.8e-3; % X0 in g/L
S0 = 180e-3; % S0 in g/L
Ks = 12.2e-3; % Ks in g/L
muemax = 0.897/3600; %  $\mu_{max}$  in 1/s
Y = 0.5; % Y in g/g
V0 = 15e-3; % Reaktorvolumen L
M = 180.16; % M g/mol
DRH = -1300e3; % Reaktionsenthalpie J/mol
% Zeitachse
t0 = 10; % Schrittweite in s
tmax = 10*3600; % Zeit max
t = (0:t0:tmax)'; % Zeit (von:Schrittweite:bis) in s
% Lösung der Differentialgleichungen
[T,Z] = ode23(@Monod,t,[X0 S0],[],Ks,muemax,Y);
% Output
Q = -(S0-Z(:,2))*DRH*V0/M; % Berechnung Wärme
P = diff(Q)./t0; % Berechnung Leistung
% Function mit den Differentialgleichungen
function dy = Monod(t,y,Ks,muemax,Y)
dy = zeros(2,1);
dy(1) = muemax*y(2)/(Ks+y(2))*y(1); % Gleichung für dx/dt
dy(2) = -1/Y*muemax*y(2)/(Ks+y(2))*y(1); % Gleichung für ds/dt
```

Entschmierung von kalorimetrischen Messdaten

Mit Gleichung (A1) ist es relativ einfach, die unverfälschte Messkurve zu berechnen.

$$\dot{q}_e = \dot{q}_m + \tau \cdot \frac{d\dot{q}_m}{dt} \quad (\text{A1})$$

Abbildung A1 stellt ein Beispiel einer Kurve (rot) dar, die zeitlich verschmiert (grün) und mit Hilfe der obigen Gleichung entschmiert wurde (schwarz).

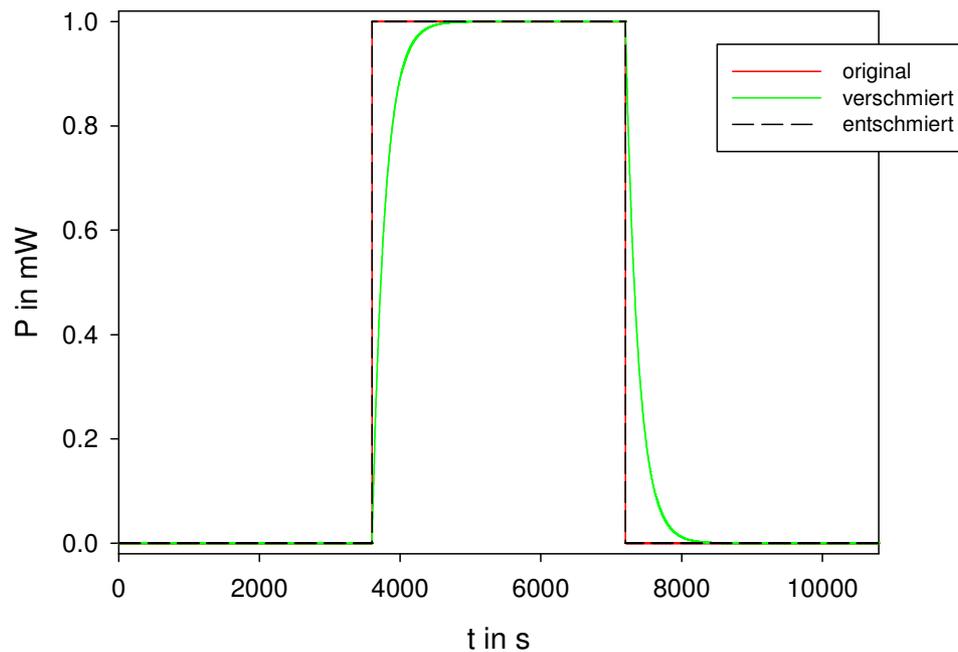


Abbildung A1: rot – originale Daten, grün – verschmierte Daten, schwarz – entschmierte Daten.

Handelt es sich bei den zu entschmierenden Daten um Messdaten, die mit einem Rauschen belastet sind, wird dieses Rauschen durch die obige Gleichung verstärkt. Das Beispiel in Abbildung A2 wurde mit einem Rauschen von $\pm 0.5 \mu\text{W}$ belegt (grüne Kurve).

Die Anwendung eines Mittelwertfilters auf die Messdaten ermöglicht es das Rauschen bei der berechneten Kurve stark zu minimieren (Faktor 10) und eine weiterführende Auswertung durchzuführen.

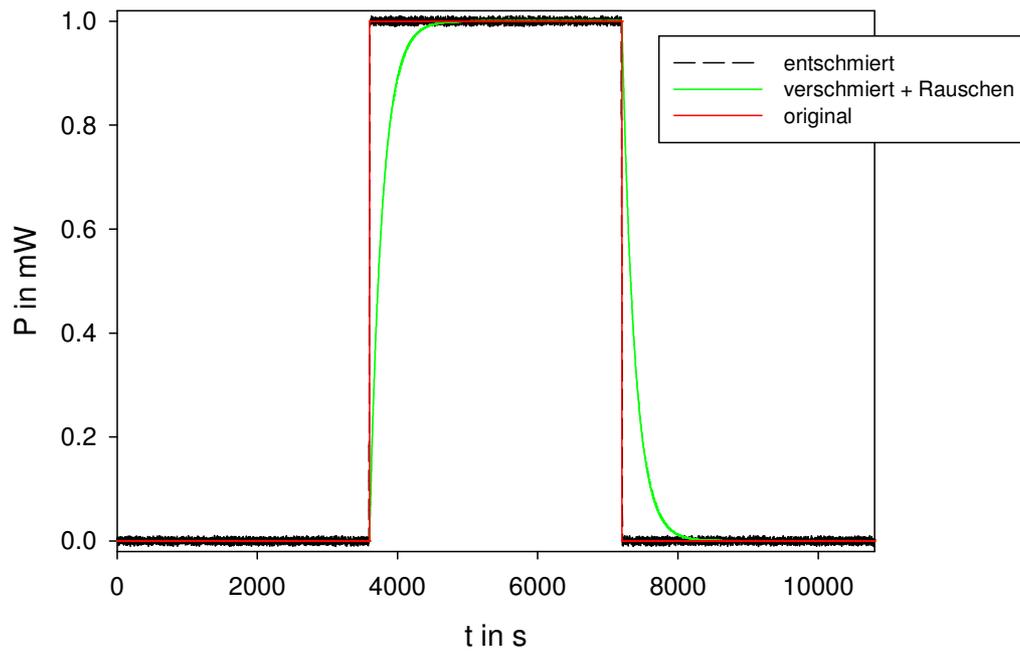


Abbildung A2: rot – originale Daten, grün – verschmierte Daten zusätzliche mit Rauschen, schwarz – entschmierte Daten mit Mittelwertfilter.

Kalibrierung und Bestimmung der Zeitkonstante der TAM-Kalorimeter

Die Bestimmung der Zeitkonstante erfolgte mithilfe einer exponentiellen Funktion an dem ansteigenden oder abfallenden Ast einer Messkurve (Abbildung A3) einer elektrischen Kalibrierung mit dem internen Ohmschen-Heizer der kalorimetrischen Systeme.

$$\dot{q} = \dot{q}_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad (\text{A2})$$

Die Mittelwerte aus den Bestimmungen der Zeitkonstanten τ sind:

- TAM-20ml: 180 ± 4 s
- TAM-4ml: 90 ± 1.5 s.

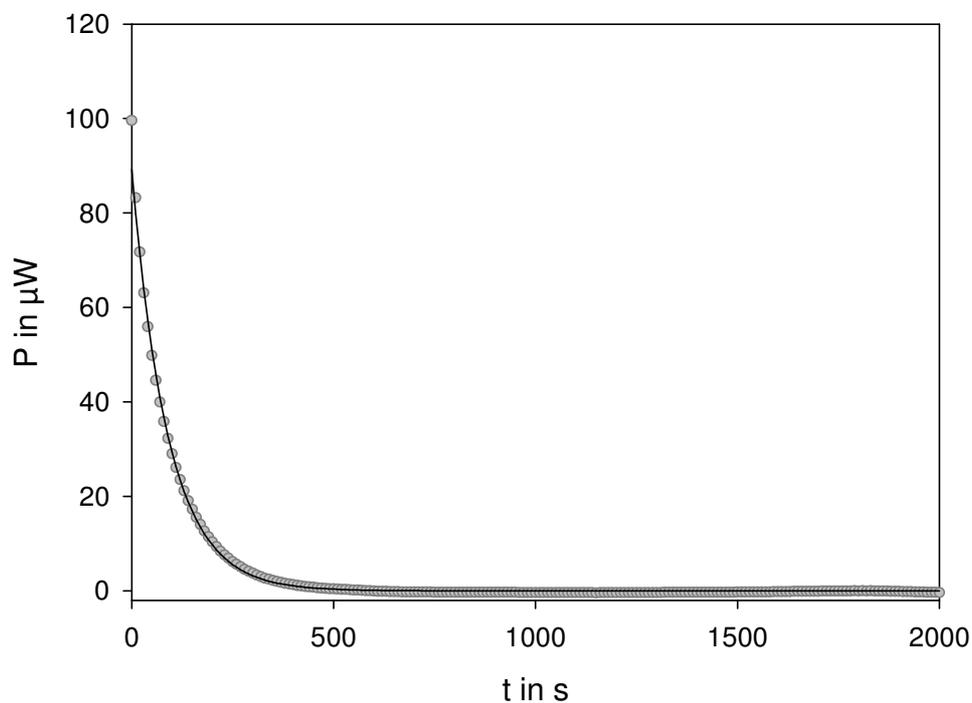


Abbildung A3: Bestimmung der Zeitkonstante mit exponentiellem Fit an abnehmende Leistungskurve einer elektrischen Kalibrierung im TAM-4ml: $\tau = 90.1$ s.

Bestimmung des thermischen Volumens

Es wird der Wärmeeffekt bei einer Temperaturänderung um 1 Kelvin bei

- leere Zelle (rot)
- volle Zelle (schwarz)
- Durchfluss: 5 ml/h (grün)
- Durchfluss: 10 ml/h (blau)
- Durchfluss: 15 ml/h (rosa)

ermittelt.

Mithilfe der Wärmekapazität ($4.186 \text{ J}/(\text{g}\cdot\text{K})$) und der Dichte (0.997 g/ml) des Wassers lässt sich aus der Differenz der Flächen auf das thermische Volumen schließen.

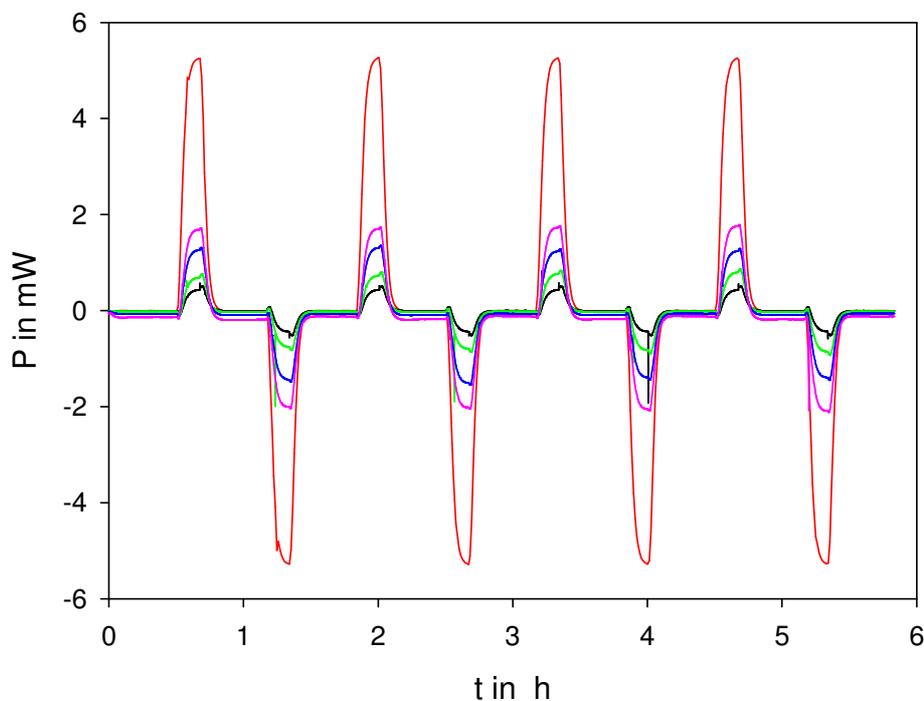


Abbildung A4: Wärmeleistungsdaten zur Wärmekapazitätsbestimmung $\Delta T = 1 \text{ K}$ ($24.5 \text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 25.5 \text{ }^\circ\text{C}$), Zelle leer (rot) / voll (schwarz), Durchfluss 5 (grün), 10 (blau) und 15 (rosa) ml/h.

Tabelle A1: Ergebnisse zur Bestimmung des thermischen Volumens v_{th}

Durchfluss in ml/h	v_{th} in μl
0	696
5.0	655
10.0	546
15.0	496

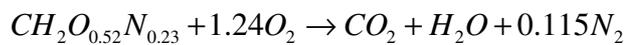
Bilanzierungen und Enthalpieberechnungen

Tabelle A2: Verwendete Substanzen und deren Enthalpien (aus HSC4.0):

Substanz	$\Delta_B H$ in kJ/mol	γ	$\Delta_C H$ in kJ/mol
Benzoessäure $C_7H_6O_2$	- 386		
$O_2(g)$	0		
$CO_2(g)$	- 393		
H_2O	- 286		
$NH_3(aq)$	- 80		
Biomasse $CH_2O_{0.52}N_{0.23}$	- 109	4.96	- 570
N_2	0		
Glucose $C_6H_{12}O_6$	-1273		
Phenol C_6H_6O	-165		

g...gasförmig, aq...in Wasser

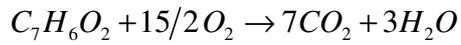
Durch Anwendung des Satzes von Hess lässt sich die Bildungsenthalpie der Biomasse berechnen. Dafür wurde die Reaktionsgleichung für die Verbrennung der Biomasse aufgestellt:



Damit ergibt sich eine Bildungsenthalpie von: -109 kJ/C-mol Biomasse.

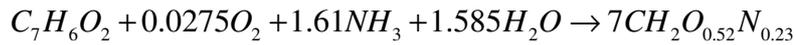
Natriumbenzoat / Benzoesäure

Katabolismus:



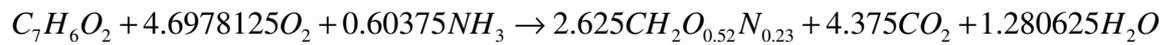
$$\Delta_R H_{Kat} = -3223 \text{ kJ / mol}$$

Anabolismus:



$$\Delta_R H_{Ana} = 248 \text{ kJ / mol}$$

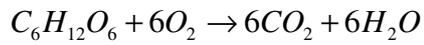
Die Reaktionsgleichung für den Ertragsfaktor 0.375 C-mol Biomasse/C-mol Benzoesäure, der für die Wachstumsexperimente im Schüttelkolben ermittelt wurde, stellt sich wie folgt dar:



$$\Delta_R H = -1921 \text{ kJ / mol}$$

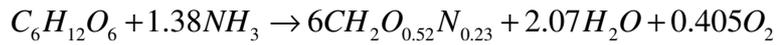
Glucose

Katabolismus:



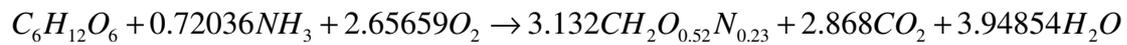
$$\Delta_R H_{Kat} = -2801 \text{ kJ / mol}$$

Anabolismus:



$$\Delta_R H_{Ana} = 137.38 \text{ kJ / mol}$$

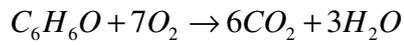
Die Reaktionsgleichung für den Ertragsfaktor 0.522 C-mol Biomasse/C-mol Glucose, der für die Wachstumsexperimente im Schüttelkolben ermittelt wurde, stellt sich wie folgt dar:



$$\Delta_R H = -1267 \text{ kJ / mol}$$

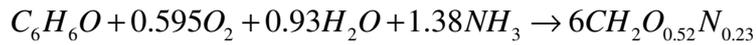
Phenol

Katabolismus:



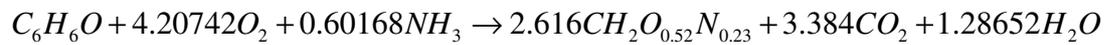
$$\Delta_R H_{Kat} = -3051 \text{ kJ / mol}$$

Anabolismus:



$$\Delta_R H_{Ana} = -112.62 \text{ kJ / mol}$$

Die Reaktionsgleichung für den Ertragsfaktor 0.436 C-mol Biomasse/C-mol Phenol, der für die Wachstumsexperimente im Schüttelkolben ermittelt wurde, stellt sich wie folgt dar:



$$\Delta_R H = -1770 \text{ kJ / mol}$$

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

.....

Dr. Regina Hüttl

Undine Materni

.....

Weitere Personen waren an der Abfassung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen. Weitere Personen haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die nicht als solche kenntlich gemacht worden sind.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Freiberg, 06.05.2011

DANKSAGUNG

Die Dissertation ist am Institut für Physikalische Chemie der Technischen Universität Bergakademie Freiberg in den Jahren 2006 bis 2011 entstanden. Dem gesamten Institut sei für diese erfolgreiche Zeit ein Dank ausgesprochen.

Zum Beginn möchte ich Prof. Florian Mertens für die Möglichkeit der Bearbeitung eines solchen fächerübergreifenden Themas bedanken.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Prof. J. Büchs für seine Gutachtertätigkeit.

Ganz besonders muss ich mich bei Dr. Regina Hüttl bedanken. Immerwährende Unterstützung bei der Arbeit, die vielen Diskussionen, die durch sie ermöglichten Tagungen und natürlich durch die verschiedenen mich finanzierenden Projekte konnte ich erst diese Arbeit erstellen und habe so viel Neues dazugelernt. Nochmals: Vielen, vielen Dank.

Bei Prof. K. Bohmhammel und Prof. E. Kroke bedanke ich mich für die Möglichkeit beim Projekt Somocell-II mitgearbeitet zu haben und ihrem Hilfe bei der Durchführung. Prof. K. Bohmhammel noch ein Extra-Dank für das MgO-Projekt und für seine Unterstützung dabei.

Der Arbeitsgruppe Umweltmikrobiologie von Prof. M. Schlömann danke ich für die freundliche Aufnahme und fortwährende Unterstützung bei den mikrobiellen Arbeiten. Ohne die Hilfe von Beate Erler und Janosch Gröning wäre so manches Experiment nicht gelungen.

Ich danke Dr. J. Seidel für seinen unermüdlichen Einsatz um die Kalorimeter, insbesondere bei seinen erfolgreichen Bemühungen den Flow-Divider am Leben / Laufen zu halten. PD Dr. J. Lerchner danke ich für die freundliche Bereitstellung des Chip-Kalorimeters, die erfrischenden Diskussionen. Dabei auch an seine engste Mitarbeiterin Dr. Antje Wolf ein herzliches Danke Schön. Ohne ihre Tatkraft wäre ich am System sicher verzweifelt. Luftblasen können manchmal so tödliche sein.

Weiterhin danke ich Dr. Mario Winkelmann, Dr. Frank Ullrich und Dr. Ralf Kirchner für die Einführung in die Thematik. Eine schöne Zeit und Unterstützung bei der Arbeit verdanke ich auch Dr. Conny Wiltzsch (die schönen langen Diskussionen über so vieles), Dipl.-Chem. Katja Fiedler, den Erfahrenen: Dr. Thomas Zehl, Dr. Dirk Wählisch, Dr. Georgia Wollman, und natürlich der Biokalorimetrie-Gruppe: Dipl.-Chem. Nicole Frank, Dr. Joachim Harmel, Dipl.-Chem. Tobias Weling und Dipl.-Chem. Daniel Thomas.

Ein Dank an die technischen Mitarbeiter des Institutes, ohne ihre Hilfe würde so manches Gerät nicht funktionieren oder die Praktikumsbetreuung im Chaos untergehen. Einen besonderen Dank an Dipl.-Ing. Matthias Jobst (so viele Sicherungen und Ersatzteile in den Jahren, einfach unglaublich) und Regina Härtel (Der Stern kommt noch.).

Dem IfD und seinen aktiven und ruhenden (Ehren-) Mitglieder danke ich für die genussfrohen Treffen und Diskussionen und rufe ihnen ein: Guten Appetit! Enjoy your meal! Bon appétit! zu.

Zu guter Letzt danke ich noch meiner Familie: Elfriede, Reinhard, Martina, Christian, Ulrike und Carola. Mit Rücksicht und wachsendem Interesse haben sie den Fortgang der Arbeit verfolgt, was mich sehr gefreut hat, und können jetzt das gesamte Werk in einem Zug genießen.

In der Hoffnung niemanden vergessen zu haben ein abschließendes: DANKE.