

Abschlussbericht des Projektes:

**Untersuchung zur Beseitigung von Bakterien im Abfluss
von Kläranlagen mittels *Tetrahymena***

vorgelegt von

Prof. Dr. Arno Tiedtke,

Anja Hillmann und

Fabian Westermeier

Westfälische Wilhelms-Universität

Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik

Schlossplatz 5

48149 Münster

| | |
|---|----|
| 5. Projektphase 3: Bestimmung der Fressraten in Abhängigkeit von Temperatur und Futterorganismus..... | 45 |
| 5.1 Bakterientiter ohne die Zugabe von Ciliaten | 51 |
| 5.2 Titer der Ciliatenspezies <i>T. pyriformis</i> wt und <i>C. campylum</i> | 53 |
| 5.3 Fressraten der Ciliaten in Abhängigkeit von Futter und Temperatur | 57 |
| 6. Projektphase 4: Up-scaling der Fressexperimente auf einen Maßstab von 25 Litern | 64 |
| 6.1 Co-Fermentation für 8 Stunden..... | 64 |
| 6.2 Co-Fermentation für 24 Stunden..... | 68 |
| 7. Phase 5: kontinuierliche Fermentation in einem Maßstab von 25 Litern | 71 |
| 8. Zusammenfassung | 80 |
| 9. Literatur | 81 |

1. Projektbeschreibung und Projektziel

1.1 Problemstellung des Projektes

Bereits im Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben "Untersuchungen zum Eintrag und zur Elimination von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen" vom März 2004 [1.] wurden kommunale Kläranlagen als wichtigste Quellen des Eintrags von Arzneistoffen, u.a. Antibiotika, in die aquatische Umwelt identifiziert. Antibiotika in der Umwelt sind vor allem deshalb ein Problem, weil sie in den Bakterien, die mit ihrer Hilfe bekämpft werden sollen, Resistenzen hervorrufen. Die im Abwasser und in der Kläranlage generell erfüllte Voraussetzung für die Resistenzentwicklung ist, dass die Antibiotikakonzentration unter der für die Bakterien unmittelbar tödlichen Konzentration MBK (= minimale bakterizide Konzentration) liegt.

Doch in einer neueren Publikation von 2002 [2.] wurde gezeigt, dass eine große Zahl antibiotikaresistenter Bakterien – auch mit Mehrfachresistenzen – bereits mit dem Abwasser in die Kläranlagen gelangen. Auch wenn die Untersuchungen ergaben, dass im Mittel 99,9% der Keime aus dem Klärwerkszulauf im Klärwerk eliminiert werden, enthält der Klärwerkablauf immer noch einige Millionen Bakterien pro Milliliter, darunter einige Tausend antibiotikaresistente Coliforme Bakterien (ACB) [3.].

Daneben ist die Kläranlage aufgrund der extrem hohen Bakteriendichte, des damit verbundenen Stresses, der Verfügbarkeit vielfältiger Resistenzgene aus unterschiedlichsten Bakterienspezies und des Selektionsdrucks durch die mit dem Abwasser eingebrachten Antibiotika ein bekannter "Hot-Spot" der Entstehung von Bakterien mit Mehrfachresistenzen [3.].

Die Hochrechnung, dass aus einer gut funktionierenden voll biologischen Kläranlage mit einem täglichen Abwasseranfall von ca. $30 \times 10^3 \text{ m}^3$ unter diesen Umständen (10^3 ACB/ml) täglich ca. 3×10^{13} ACB in den Vorfluter (Fließgewässer) und damit in die Umwelt gelangen, veranlasste die Autoren zu der Empfehlung, diese Pfade aus Gründen der Vorsorge möglichst zu unterbinden [3.]. Trotz der bereits fortgeschrittenen weiten Verbreitung der Resistenzgene im Gen-Pool in der Natur [4.] wird jede Verminderung des weiteren Eintrags von Resistenzgenen in diesen Pool für sinnvoll gehalten, die weitere rasende Verbreitung der Antibiotikaresistenzen abzubremsen [5.]. Die Technik der Abwasserklärung sollte so gestaltet werden, dass

eine Exposition des Menschen mit antibiotikaresistenten Bakterien mit modernen Methoden, z.B. der Mikrofiltration, vermieden wird.

Da die Behandlung des Kläranlagenablaufs durch Mikrofiltration oder die Membranbelebung bei großen Kläranlagen schnell an Grenzen der Wirtschaftlichkeit stößt [6.], soll im Rahmen dieses Projektes geprüft werden ob ein biologisches Verfahren entwickelt werden kann, mit dem das Ziel der maximalen Verminderung des Übertritts von Bakterien in den Vorfluter umweltfreundlich, energiesparend aber wirksam zu erreichen ist.

1.2 Zielsetzung

Es soll untersucht werden ob es möglich ist, mit *Tetrahymena*- und *Colpidien*-Stämmen als "biologischem Filter" ein Verfahren zu entwickeln, das geeignet ist, die Bakterienfracht des Ablaufs der Kläranlage in den Vorfluter zu verringern.

Tetrahymena- bzw. *Colpidien*-Stämme sind einzellige Eukaryonten, keulen- bzw. flammenförmig mit ca. 50 µm Länge und 30 µm maximaler Dicke, die sich bevorzugt von Partikeln, überwiegend Bakterien, ernähren, aber auch gelöste Nährstoffe aus dem Medium aufnehmen können. Die Phagozytose erfolgt kontinuierlich und ohne Unterbrechung. In der logarithmischen Phase einer nicht hungernden Kultur ist die Verdopplungsdauer ca. 1-2 Stunden. Die exponentielle Wachstumsphase wird bis zu einer Zelldichte von ca. 2×10^5 Zellen pro ml aufrechterhalten (optimal für kontinuierliche Kultur), die stationäre Phase wird bei ca. 10^6 Zellen pro ml erreicht. [7.]

Freischwimmende Ciliaten haben eine ungeheure Kapazität Partikel (= Bakterien) aufzunehmen [8.] – nach derzeitigem Wissensstand ohne dabei Präferenzen für bestimmte Bakterienarten zu entwickeln und andere Arten zu verschmähen. Aufgrund ihrer Größe lassen sich die Protozoen leichter zurückhalten als Bakterien. Die Ciliaten, die aus der Anlage entweichen, sind natürliche Beute aquatischer Kleintiere wie z.B. Mückenlarven und Kleinkrebse. Damit wird die Biomasse der Bakterien leichter in die Nahrungskette eingeschleust als wenn sie direkt in den Vorfluter entlassen wird. *Tetrahymena*- und *Colpidien*-Stämme sind nicht pathogen und auch nicht in irgendeiner anderen Weise umweltproblematisch.

Da diese Ciliaten nicht in der Lage sind, die für die DNA- und RNA-Biosynthese benötigten Purin- und Pyrimidin-Basen selbst zu synthetisieren, nehmen sie auch freie DNA aus dem Medium auf [7.], womit die Wahrscheinlichkeit der Verbreitung

von Resistenzgenen nochmals vermindert wird. Dies ist ein klarer Vorteil gegenüber der Mikrofiltration.

In mehreren Stufen soll untersucht werden,

- welche *Tetrahymena*- bzw. *Colpidien*-Stämme zum einen für einen Einsatz unter den in der Kläranlage herrschenden Umweltbedingungen besonders geeignet sind und zum anderen unter diesen Umweltbedingungen die höchsten Klärraten aufweisen,
- wie die gewählten *Tetrahymena*- bzw. *Colpidien*-Stämme unter Laborbedingungen Laborstämme von Bakterien (z.B. *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* einzeln und in Kombination) im Milliliter-Maßstab klären,
- ob sich die Ergebnisse aus dem ml-Maßstab in den Litermaßstab (25-Liter-Fermenter) übertragen lassen – sowohl im Batch-Betrieb als auch im kontinuierlichen Durchfluss.

Bei den Laborversuchen sollen die Parameter wie Temperatur, pH-Wert und Bakterienzeldichte variiert werden.

2. Informationen zur Nachklärung

2.1 Temperatur

In mitteleuropäischen Kläranlagen kommt es aufgrund der unterschiedlichen Jahreszeiten zu Schwankungen der Temperatur des einfließenden Brauchwassers und damit auch der Temperatur des Wassers in der Kläranlage. Diese Variabilität fordert von einem Organismus, der für einen Einsatz in der Kläranlage vorgesehen ist, eine große Temperaturtoleranz und speziell eine Anpassung auch an kältere Temperaturen. Um die Rahmenbedingungen der Experimente an die Realität anzupassen, wurden die Daten zum Temperaturverlauf eines Jahres von zwei unterschiedlichen Kläranlagen Nordrhein-Westfalens eingeholt (siehe Abb. 1 und 2).

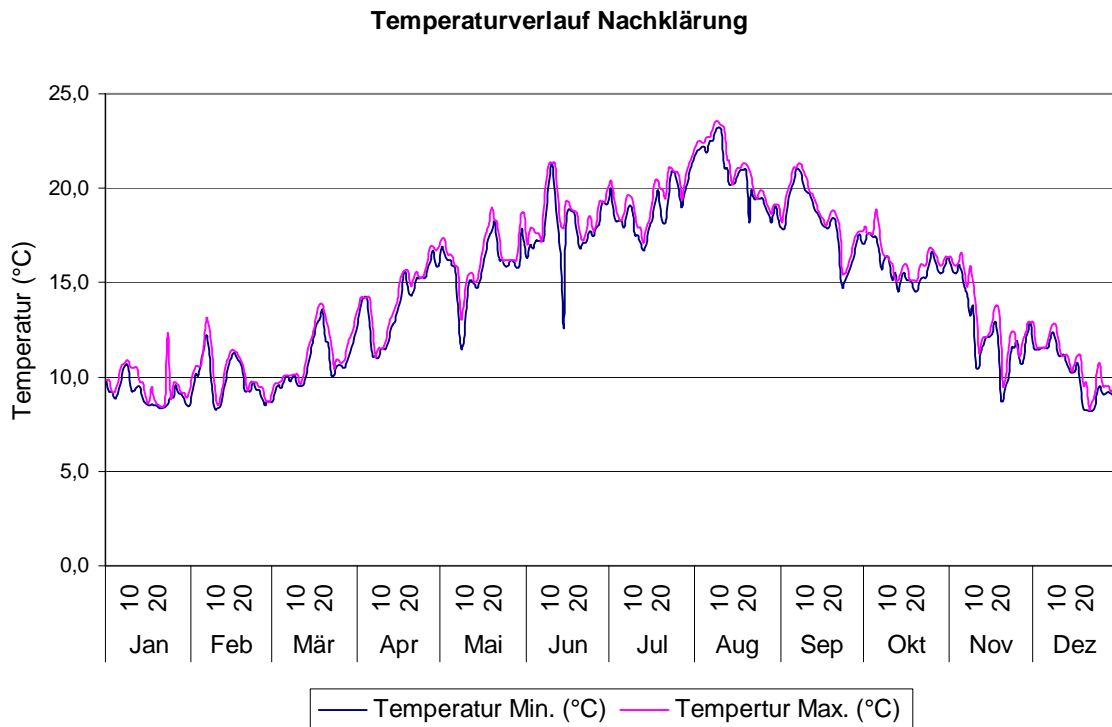


Abb. 1: Temperaturverlauf einer großen Kläranlage. Dargestellt sind Tagesmaximum und Tagesminimum der Temperatur im Ablauf der Kläranlage des Jahres 2004.

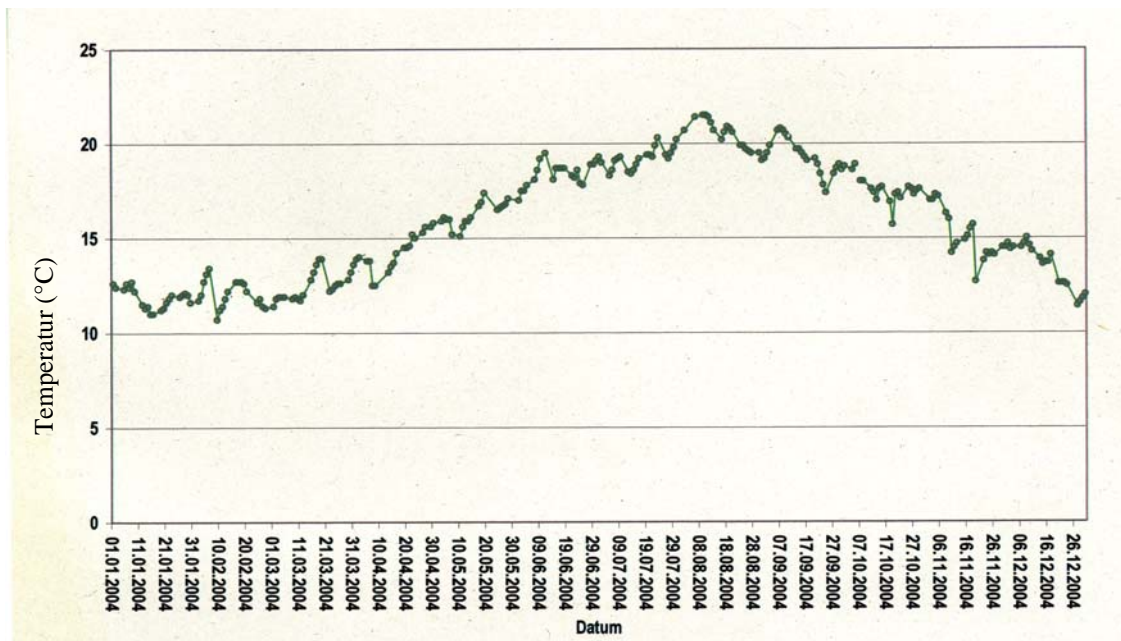


Abb. 2: Temperaturverlauf einer mittelgroßen Kläranlage. Dargestellt ist die mittlere Wassertemperatur in der Nachklärung der Kläranlage des Jahres 2004.

Bei beiden Kläranlagen liegen die Temperaturen im Jahresverlauf des Jahres 2004 zwischen 8° und 23,5°C. Daher wurden für Phase 2 des Projektes „Auswahl geeigneter Ciliaten“ 15° und 25°C als geeignete Temperaturen für die Aufnahme von Fresskurven gewählt. Ein Überleben der Ciliaten bei 5°C wurde in dieser Phase des Projektes ebenfalls getestet, um ein Überleben des Organismus unter Extremtemperaturen in der Kläranlage sicherzustellen. Darüber hinaus wurden in dieser Projektphase Wachstumskurven der gescreenten Organismen bei 10°, 20° und 30°C aufgenommen.

In Projektphase 3 „Bestimmung der Fressraten in Abhängigkeit von Temperatur und Futterorganismus“ wurde ein Temperaturbereich von 10° bis 30°C für die Bestimmung der Fressraten ausgewählt. Da sehr niedrige Temperaturen unter 10°C allenfalls sehr selten zu erwarten sind, wurde auf eine Bestimmung der Fressraten bei niedrigeren Temperaturen als 10°C verzichtet.

bei sehr niedrigen Temperaturen in der Kläranlage auch eine geringe Bakterienfracht zu erwarten ist, wurde auf die Bestimmung von Fressraten bei niedrigeren Temperaturen als 10°C verzichtet.

Der Jahresmittelwert der Temperatur liegt in beiden Kläranlagen jeweils bei ca. 15°C. Aus diesem Grund wurden die Experimente zur Erhöhung des Versuchsmaßstabs in den Projektphasen 4 (Up-scaling der Fresseexperimente auf 25 L) und 5

(Kontinuierliche Fermentation in einem Maßstab von 25 L) auf 25 Liter bei dieser Temperatur durchgeführt.

2.2 pH-Wert

Die Konzentration der Wasserstoff im umgebenden Milieu der Ciliaten ist für die Vitalität der Zellen und der Aktivität der sekretierten Enzyme von großer Bedeutung. Daher wurde der Jahresverlauf des pH-Wertes (der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoff-Ionen Konzentration) einer großen Kläranlage eingeholt (siehe Abb. 3).

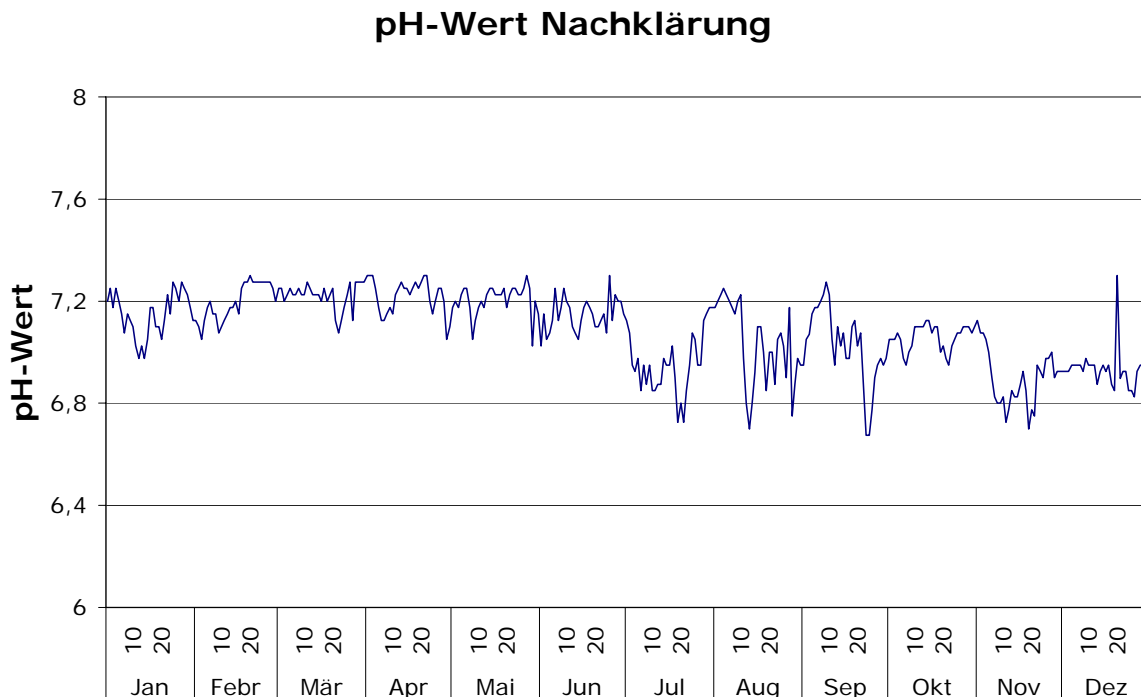


Abb. 3: Der Verlauf des pH-Wertes im Ablauf einer großen Kläranlage. Dargestellt sind die Werte des Jahres 2004.

Der Jahresmittelwert des pH-Wertes lag im Jahr 2004 bei der betrachteten Kläranlage bei pH 7,05. Das Jahresmaximum lag bei pH 7,35, das Jahresminimum bei pH 6,60. Daher wurde für das synthetische Kläranlagenmedium der pH-Wert 7,0 gewählt. Dieser neutrale pH-Wert stellt für alle in Phase 2 des Projektes gescreenten Ciliaten ein optimales Milieu dar.

2.3 Stickstoff

Eine der wesentlichen Aufgaben einer biologischen Stufe einer Kläranlage ist die Senkung des Stickstoffgehaltes im Abwasser durch Nitrifikation und Denitrifikation. Diese führen aber nicht zum vollständigen Verschwinden von Stickstoffverbindungen. Weil letztere durchaus Einfluss auf physiologischen Prozesse der Ciliaten haben können, wurden die Daten zur Stickstoffbelastung einer Kläranlage eingeholt, um das synthetische Kläranlagenmedium an diese Bedingung anpassen zu können (siehe Abb. 4).

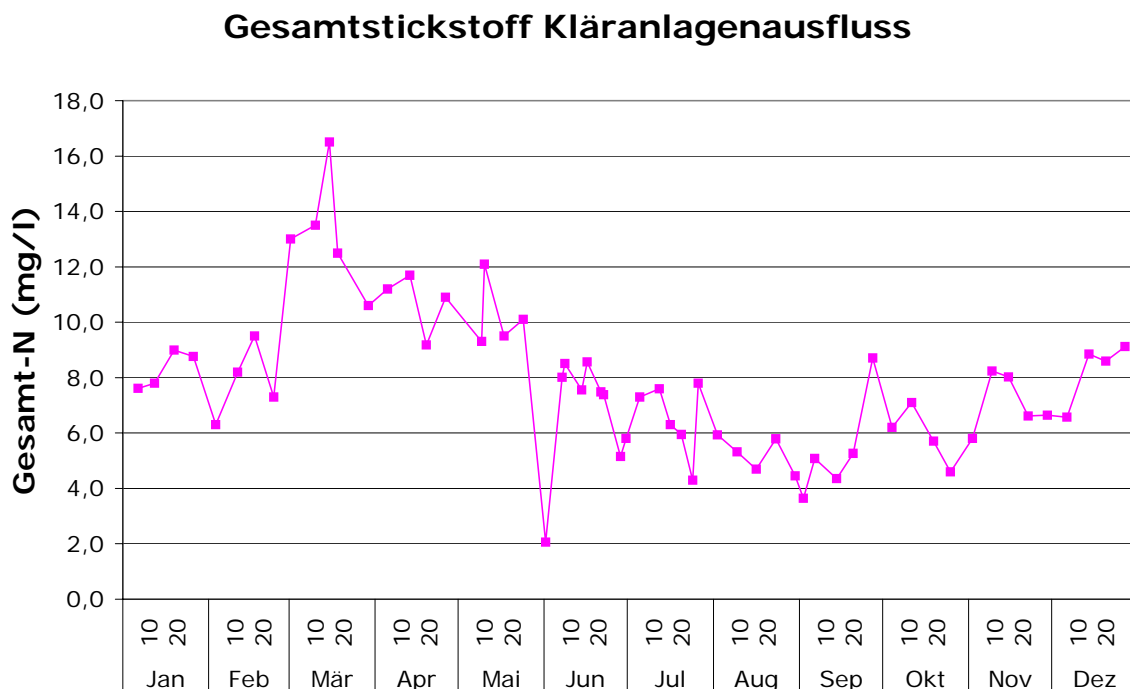


Abb. 4: Verlauf der Gesamtstickstoffkonzentration in der Nachklärung einer großen Kläranlage. Dargestellt sind die Werte des Jahres 2004.

Der mittlere Stickstoffgehalt des Jahres 2004 lag in dieser Kläranlage bei einem Wert von 7,8 mg/l. Die mittlere NH_4^+ -Stickstoffkonzentration des Jahres 2004 lag bei der betrachteten Kläranlage bei 3 mg/l. Für die Untersuchungen wurde daher eine Stickstoffkonzentration von 3 mg/l in Form von NH_4^+ gewählt. Bei dieser Stickstoffverbindung handelt es sich um die Stickstoffverbindung mit der höchsten Bioverfügbarkeit. Daher hat sie den höchsten Einfluss auf ein eventuelles Wachstum der Bakterienpopulationen.

2.4 Phosphor

Neben Kohlen- und Stickstoff ist Phosphor das wichtigste Element biologischer Verbindungen und somit für das Wachstum aller Lebewesen ein entscheidender Faktor. Neben der chemischen Fällung von Phosphorverbindungen dient in einigen Kläranlagen die biologische Stufe auch zur Entfernung von Phosphor durch phosphatakkumulierende Bakterien, die daher auch im Abfluss dieser Kläranlagen zu erwarten sind. Daher wurden die Daten zum Jahresverlauf der Phosphorkonzentration in einer Kläranlage eingeholt, um das synthetische Kläranlagenmedium an diese Bedingungen anpassen zu können.

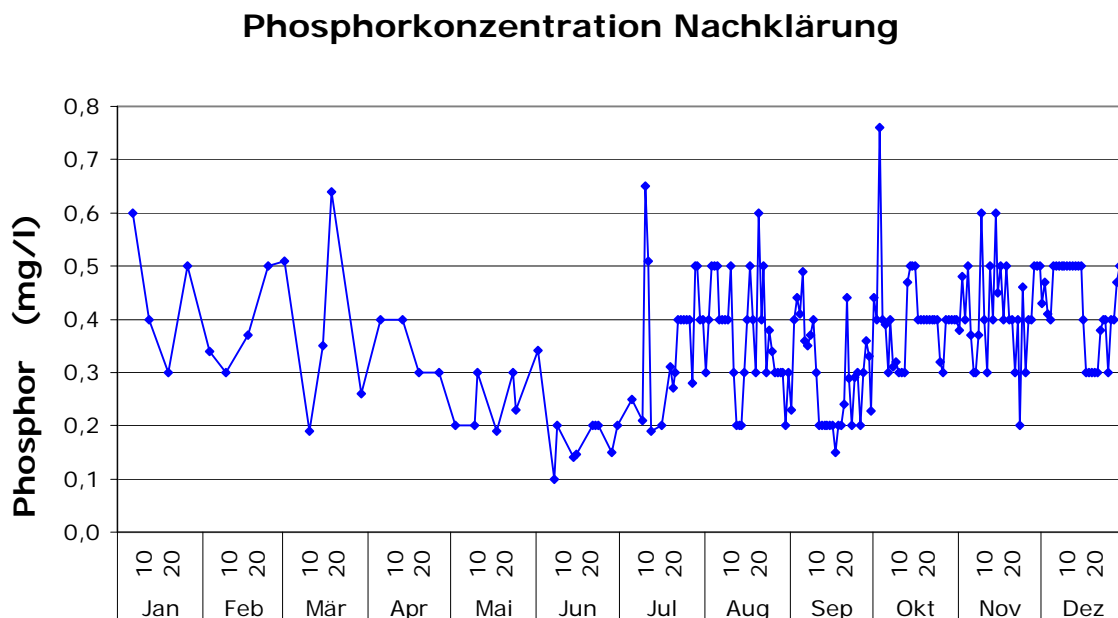


Abb. 5: Verlauf der Gesamtposphorkonzentration in der Nachklärung einer großen Kläranlage. Dargestellt sind die Tagesmittelwerte des Jahres 2004.

Der mittlere Phosphorgehalt des Jahres 2004 lag bei der dargestellten Kläranlage bei einem Wert von 0,3 mg/l. Die minimale Phosphorkonzentration lag bei 0,1 mg/l, die maximale Phosphorkonzentration lag bei 0,75 mg/l. Für das synthetische Kläranlagenmedium wurde daher ein Wert von 0,3 mg/l Phosphor gewählt, der in Form von 0,3 mg/l Orthophosphat zugegeben wurde.

3. Methoden zur Messung der Zellkonzentrationen

3.1 Messung der Ciliatenkonzentration

Für die Messung der Zelldichte der Ciliaten wird ein Z1 Coulter counter (Beckman Coulter) mit einer 100 µm Kapillare eingesetzt. Die Überprüfung des Gerätes ergab eine höhere Präzision der Messungen als mit der FUCHS-ROSENTHAL-Zählkammer.

3.2 Messung der Bakterienkonzentration

Die Messung der Bakterienkonzentration in den vorliegenden, vergleichsweise geringen bis sehr geringen Zelldichten erwies sich als schwierig.

3.2.1 Optische Dichte

Eine Messung der Bakterienkonzentration über die optische Dichte der Bakteriensuspension ist aufgrund der geringen Streuung des Lichtes unterhalb einer Zellkonzentration von 10^7 Zellen pro Milliliter nicht möglich. Das Aufkonzentrieren der Zellen ist aufgrund des geringen Probenvolumens nur in einem geringen Umfang möglich.

3.2.2 Fluoreszenz

Eine höhere Empfindlichkeit konnte durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen erreicht werden. Hierbei wurden die Bakterien mit DAPI bzw. FITC eingefärbt und die Extinktion dieser Fluorochrome im Fluorophotometer gemessen. Die Sensitivität dieser Methode erwies sich ebenfalls nicht als ausreichend, es konnten minimal Konzentrationen bis 10^6 Zellen pro Milliliter gemessen werden. Da das Probenvolumen aufgrund des vorhandenen Messgerätes mit 2,5 ml recht groß ist, ist eine Aufkonzentrierung leider nicht möglich.

3.2.3 Zählkammer

Für Bakterienzählungen wird eine Zählkammer nach THOMA mit einer Kammertiefe von 0,02 bzw. 0,025 mm verwendet. Bei einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml kommen so durchschnittlich 16 Zellen auf den gesamten Bereich einer Zählkammer. Daher müssten die Proben für eine aussagekräftige Zählung aufkonzentriert werden.

Bei der Zählung in der Zählkammer ergeben sich allerdings die folgenden Probleme. Zum einen kommt es durch die Braunschen Molekularbewegungen zu einem starken Zittern der Zellen, welches das Arbeiten am Mikroskop stark erschwert. Auch die durch Ansäuerung verstärkte Anheftung der Zellen an das Glas der Zählkammer eliminiert diese Bewegungen nicht vollständig. Zum anderen ist die Unterscheidung zwischen Bakterien und anderen Partikeln nicht immer eindeutig möglich. Zur Verbesserung der Unterscheidung wurden Färbungen mit unterschiedlichen Farbstoffen getestet (Methylenblau, Karbolfuchsin, Neutralrot, Methylengrün). Es zeigte sich vor allem mit Methylenblau eine bessere Zählbarkeit der Bakterien, allerdings war auch mit diesem Farbstoff die Unterscheidung nicht immer eindeutig möglich. Darüber hinaus bilden die Bakterien nach der Färbung Aggregate, welche die Zählung erschweren.

3.2.4 Automatische Zellzählung

Die Bestimmung des Zelltiters mit Hilfe des vorhandenen Z1 Coulter counter (Beckman Coulter) konnte nicht zuverlässig durchgeführt werden, da dieser Zellzähler lediglich mit einer minimalen Kapillargröße von 50 μm ausgestattet ist. Diese Kapillare ermöglicht eine Partikelzählung von Partikeln bis zu einer minimalen Größe von 1,0 μm . Teilpopulationen der zu untersuchenden Bakterien weisen einen geringeren Durchmesser auf.

Der Prozentsatz der Bakterien mit einem geringeren Durchmesser als 1 μm erwies sich als nicht konstant, so dass kein systematischer Fehler bestimmt werden konnte, über den der tatsächliche Zelltiter berechnet werden kann.

Der ursprünglich für das Projekt vorgesehene automatische Zellzähler, welcher auch für die Bakterienmessungen geeignet gewesen wäre, konnte leider aufgrund der knappen Finanzen des Projektes nicht angeschafft werden.

3.2.5 Keimzahlbestimmung mit Filtern

Die Keimzahlbestimmung mit Hilfe von Filtern konnte nicht durchgeführt werden, da bei der Durchführung des Projektes eine große Anzahl Proben anfallen. Die hierfür benötigte hohe Anzahl an Filtern kann deshalb wegen der knappen Finanzmittel nicht angeschafft werden.

3.2.6 Lebendkeimzahlbestimmung

Für die Vorversuche und die ersten Fresskurven zur Bestimmung der am besten geeigneten Ciliatenspezies wurden die Bakteriensuspensionen in unterschiedlichen Konzentrationen auf Agar-Nährböden ausplattiert, über Nacht im Brutschrank inkubiert und ausgezählt. Diese Methode erwies sich als zuverlässig zur Bestimmung des Zelltiters. Da jedoch eine Abschätzung der erwarteten Keimzahl nur in Grenzen möglich ist und pro Verdünnungsstufe jeweils ein Doppelwert bestimmt wurde, ist mit dieser Zählmethode nur ein recht geringer Probendurchsatz möglich. Bei einer Fresskurve über 8 Stunden mit stündlicher Probennahme wurden pro Kultur 54 Agarplatten verwendet. Das Ausplattieren der Proben mit entsprechender Verdünnung nimmt so viel Zeit in Anspruch, dass maximal 6 Kulturen (324 Platten) an einem Tag bearbeitet werden können. Die Vorbereitung der Agarplatten und das Auszählen der Kolonien ist ebenfalls zeitintensiv.

Darüber hinaus kommen Petrischalen und Chemikalien in größerem Umfang zur Verwendung.

Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass eine Trennung von Ciliaten und Bakterien entfällt.

3.2.7 Wahl des geeigneten Bakterienzählverfahrens

Wie gezeigt kommt aufgrund der fehlenden Sensitivität bzw. der zu hohen Kosten- bzw. Arbeitsintensivität der anderen Messmethoden nur die Lebendkeimzahlbestimmung mittels Ausplattierens zur Bestimmung des Bakterientiters in Frage. Während Messungen über die Fluoreszenz oder die optische Dichte nicht die gewünschte Sensitivität aufweisen, sind die Messungen mittels eines automatischen Zellzählers oder die Keimzahlbestimmung mit Hilfe von Filtern aufgrund der zu hohen Kosten nicht realisierbar. Einzig die Auszählung in der Zählkammer nach vorheriger Aufkonzentrierung der Probe wäre kostentechnisch

realisierbar – allerdings erlaubt diese Zählmethode aufgrund des hohen Zeitbedarfs für die Bestimmung jeder einzelnen Probe nur einen sehr geringen Probendurchsatz.

Allerdings lässt das für die Experimente gewählte Bakterienzählverfahren, die Ausplattierung der Proben und die anschließende Bestimmung der Lebendkeimzahl, ebenfalls bei hohem Aufwand nur einen recht geringen Probendurchsatz zu, dieser ist allerdings wesentlich höher als der Probendurchsatz bei der Bestimmung des Zelltiters mittels der Zählkammer.

Um den Zeitaufwand für die experimentelle Bestimmung jeder einzelnen Fresskurve zu minimieren, wurden einzelne Messpunkte für die Bestimmung der Ciliaten- bzw. der Bakterienkonzentration nur im Abstand von 1 bzw. 2 Stunden genommen. So konnte die Anzahl parallel aufgenommener Messungen auf 6 bzw. 12 Messungen pro Tag erhöht werden. Trotzdem musste bei der Messung des Bakterientiters mittels dieser Methode eine Reduktion der parallelen Testreihen auf Doppelansätze anstelle der geforderten Fünffachansätze durchgeführt werden, da ansonsten eine Durchführung des Projektes in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren ist die Messung der Lebendkeimzahl mittels Ausplattierung nur für Laborstämme möglich. Eine Messung von Bakterienkonzentrationen mit Wasser aus der Nachklärung einer Kläranlage ist eine andere Zählmethode unbedingt erforderlich. Diese Messungen konnten daher mit den für das Projekt zur Verfügung stehenden Mitteln nicht durchgeführt werden, die entsprechenden Projektphasen mussten ersatzlos gestrichen werden.

Der große Vorteil der Messung des Bakterientiters mittels Ausplattierens ist jedoch zum einen, dass tatsächlich nur die Lebendkeimzahl bestimmt wird und sterbende bzw. tote Zellen nicht in die Zählung mit eingehen. Zum anderen entfällt bei dieser Zählweise eine aufwendige Trennung von Ciliaten und Bakterien. Eine derartige Trennung würde eine Fehlerquelle darstellen, die die Präzision der Messung negativ beeinflussen würde.

4. Projektphase 2: Auswahl geeigneter Ciliaten

Nach den theoretischen Vorüberlegungen in der Projektphase 1 und der Entscheidung über die Auswahl der Methode zur Bestimmung der Bakterienzeldichte konnte mit der Projektphase 2 „Auswahl geeigneter Ciliaten“ begonnen werden. In dieser Phase wurden nach Organismen gesucht, die für den Einsatz in der Kläranlage besonders gut geeignet sind.

Hierbei wurde besonders auf vier Faktoren geachtet – (A) die unkomplizierte Kultivierbarkeit der Ciliatenstämme, insbesondere auch die Kultivierungsmöglichkeit hoher Zelldichten, (B) das Überleben der Ciliaten in den vorherrschenden Milieubedingungen der Nachklärung, (C) das Wachstum der betrachteten Stämme bei unterschiedlichen Temperaturen und (D) die Fressraten der untersuchten Stämme. Im Folgenden werden diese vier Faktoren kurz erläutert.

Unkomplizierte Kultivierbarkeit: Die einfache Kultivierbarkeit ist einerseits eine Grundvoraussetzung, um mit den Organismen im Labor ohne großen Zeit-, Arbeits- und Materialeinsatz experimentieren zu können. Andererseits ist sie eine essentielle Bedingung für einen späteren Einsatz der Organismen im großen Maßstab in einer Kläranlage. Dieser Faktor umfasst unter anderem die Möglichkeit der Kultivierung der untersuchten Organismen auf axenischen Medien. Axenische Medien enthalten keine lebenden Futterbestandteile und können sowohl im Labor- als auch im industriellen Maßstab einfach und in gleich bleibender Qualität hergestellt werden. Sie ermöglichen die Anzucht der Ciliaten unter standardisierten Bedingungen auch im großen Maßstab.

Bei der Kultivierung ist insbesondere auch das Erreichen einer hohen Zelldichte von großer Bedeutung, damit die für einen eventuellen späteren Einsatz in einer Kläranlage nötigen großen Zellmengen einfach zur Verfügung gestellt werden können.

Desweiteren müssen die verwendeten Stämme unanfällig gegenüber mäßigen mechanischen Kräften sein. Diese wirken auf die verwendeten Ciliaten beim Handling der Zellen im Labor, beim Einsatz der Ciliaten in den Experimenten und beim letztendlichen Einsatz der Ciliaten in der Kläranlage.

Überleben unter den Milieubedingungen der Nachklärung: Dieser Faktor ist für einen späteren Einsatz der Ciliaten in der Nachklärung selbstverständlich unabdingbar. Neben dem Überleben im Wasser der Nachklärung umfasst dieser Faktor auch das Überleben bei den in der Nachklärung möglichen Extrema der Temperatur.

Wachstum der Ciliaten bei unterschiedlichen Temperaturen: Neben dem Überleben der Organismen in der Kläranlage ist auch ein Populationswachstum der Zellen bei den in der Kläranlage vorherrschenden Temperaturen erwünscht. Ein schnelles Wachstum der Organismen bei den niedrigen Temperaturen der Nachklärung könnte dazu führen, dass die Verringerung der Ciliatenzellendichte in der Nachklärung durch ein eventuelles Auswaschen der Zellen kompensiert oder zumindest vermindert wird.

Fressraten der Ciliaten: Für das Projekt wurde nach Organismen gesucht, die eine möglichst hohe Fressrate aufweisen, um so die Bakterienzellendichte in der Nachklärung bei einem eventuellen Einsatz in der Kläranlage möglichst stark zu vermindern.

4.1 Faktor Unkomplizierte Kultivierbarkeit

Für die weiteren Experimente zur Auswahl geeigneter Ciliaten zum Einsatz in der Nachklärung einer Kläranlage wurden Stämme ausgewählt, deren Kultivierbarkeit auf axenischen Medien bereits etabliert war und deren Handling im Labor als unkompliziert bekannt ist. Die folgenden acht Stämme wurden daher für die weiteren Experimente ausgewählt, bei allen Stämmen handelt es sich um Vertreter der Unterklasse der Hymenostomata:

Tetrahymena thermophila

Tetrahymena pyriformis GI β

Tetrahymena pyriformis GI C

Tetrahymena pyriformis wt

Tetrahymena pigmentosa

Tetrahymena hegewishi

Tetrahymena borealis

Colpidium campylum

In einem ersten Experiment sollte zunächst das Wachstum der 8 untersuchten Stämme und ihre Toleranz gegenüber mechanischen Kräften untersucht werden.

Hierzu wurden Wachstumskurven bei 25°C aufgenommen. Diese wurden in Fernbachkolben mit einem Kulturvolumen von 200 ml durchgeführt. Als Nährmedium wurde Milchmedium [2% Magermilchpulver (w/v), 0,5% Hefeextrakt (w/v), 0,1% Eisensulfat/Chelatlösung (v/v), 0,5% Glucose (w/v)] verwendet. Während des gesamten Experimentes wurden die Zellen mit einer Geschwindigkeit von 60 Umdrehungen pro Minute in 1,8 L Fernbachkolben, die mit einem Aufsteckdeckel verschlossen waren, geschüttelt.

Die Messung der Ciliatenzelldichte erfolgte über einen Zeitraum von 44 Stunden in einem Abstand von jeweils 4 Stunden. Hierbei wurde im Gegensatz zu allen folgenden Experimenten die Bestimmung der Zelldichte jeweils mit der FUCHS-ROSENTHAL Zählkammer durchgeführt und parallel dazu der Zustand der Zellen lichtmikroskopisch beurteilt. Die resultierenden Wachstumskurven sind in Abb.6 dargestellt.

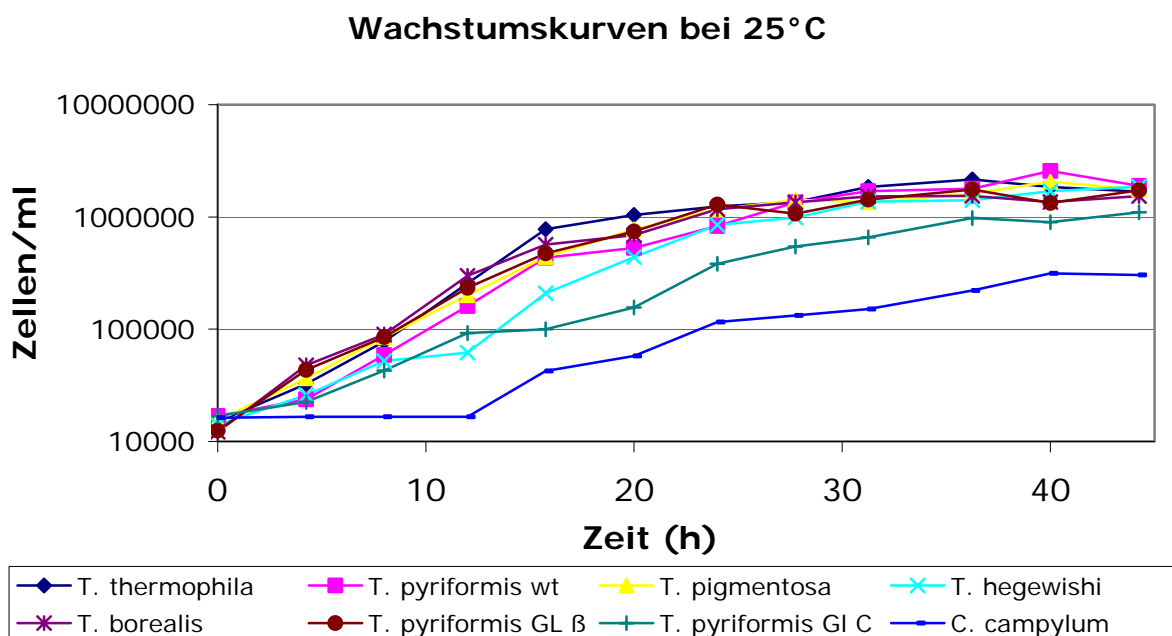


Abb. 6: Wachstumskurven bei 25°C und 60 Umdrehungen pro Minute der Ciliaten *Tetrahymena thermophila*, *Tetrahymena pyriformis* GL β, *Tetrahymena pyriformis* GL C, *Tetrahymena pyriformis* wt, *Tetrahymena pigmentosa*, *Tetrahymena hegewishi*, *Tetrahymena borealis* und *Colpidium campylum*.

Bei allen 8 untersuchten Ciliatenstämmen ist bei einer Temperatur von 25°C im Milchmedium Wachstum zu beobachten. Die erreichten Endtiter liegen bei den sieben untersuchten *Tetrahymena spec.* alle über einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml ($1,1 - 1,9 \times 10^6$ Zellen/ml) und sind damit ausreichend hoch. Aber auch der erreichte Endtiter von 3×10^5 Zellen/ml bei *C. campylum* kann als zufriedenstellend beurteilt werden.

Bei der mikroskopischen Kontrolle zeigte sich, dass nur bei *T. pyriformis* Gl C eine größere Zahl toter bzw. absterbender Zellen auftraten. Anscheinend ist *T. pyriformis* Gl gegenüber mechanischen Stressen anfälliger als die anderen sieben betrachteten Stämme.

4.2 Faktor Überleben unter den Milieubedingungen der Kläranlage

Bei diesem Projektteil wurde untersucht, inwiefern das Überleben der untersuchten Stämme unter den in der Nachklärung einer Kläranlage vorherrschenden Bedingungen möglich ist.

Zum einen wurde das Überleben der Ciliaten im autoklavierten Abfluss einer Kläranlage untersucht, des weiteren das Überleben der Ciliaten in 10 mM Tris-HCl Puffer, der als Grundlage für das synthetische Kläranlagenmedium der anschließenden Projektteile dient.

Zum anderen wurde das Überleben der Ciliaten bei einer minimalen Temperatur von 5°C überprüft. Dieser Wert liegt unterhalb der minimalen Temperatur, die in der Nachklärung der beiden Kläranlagen, deren Temperaturdaten uns für das Jahr 2004 vorlagen, auftrat. Eine Überprüfung des Überlebens der 8 Stämme bei 30°C wurde bei der Untersuchung des Faktors „Wachstum der Ciliaten“ durch die Aufnahme einer Wachstumskurve bei dieser Temperatur durchgeführt und ist unter diesem Faktor aufgeführt. 30°C liegt oberhalb der maximalen Temperatur, der in der Nachklärung der betrachteten Kläranlagen auftrat.

4.2.1 Überleben im Wasser der Kläranlagennachklärung und in 10 mM Tris-HCl

Um das Überleben der Kulturen im Wasser der Nachklärung einer Kläranlage zu testen, wurden diese in autoklaviertem Wasser der Nachklärung einer mittelgroßen Kläranlage bei 15°C und einem Volumen von 9 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben (mit Aufsteckdeckeln verschlossen) kultiviert. Das Kläranlagenwasser für diesen Versuch wurde am 24. Mai 2005 entnommen. Der Animpftiter lag bei 50.000 Zellen/ml.

Zum Vergleich wurde parallel dazu die Überlebensdauer in Hungermedium bestimmt. Hierfür wurden 5 ml-Kulturen in 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) in 50 ml Erlenmeyerkolben (mit Aufsteckdeckeln verschlossen) angesetzt, ebenfalls bei 15°C kultiviert und deren Zelltitert bestimmt. Auch hier lag der Animpftiter bei 50.000 Zellen/ml.

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen die gewonnenen Ergebnisse.

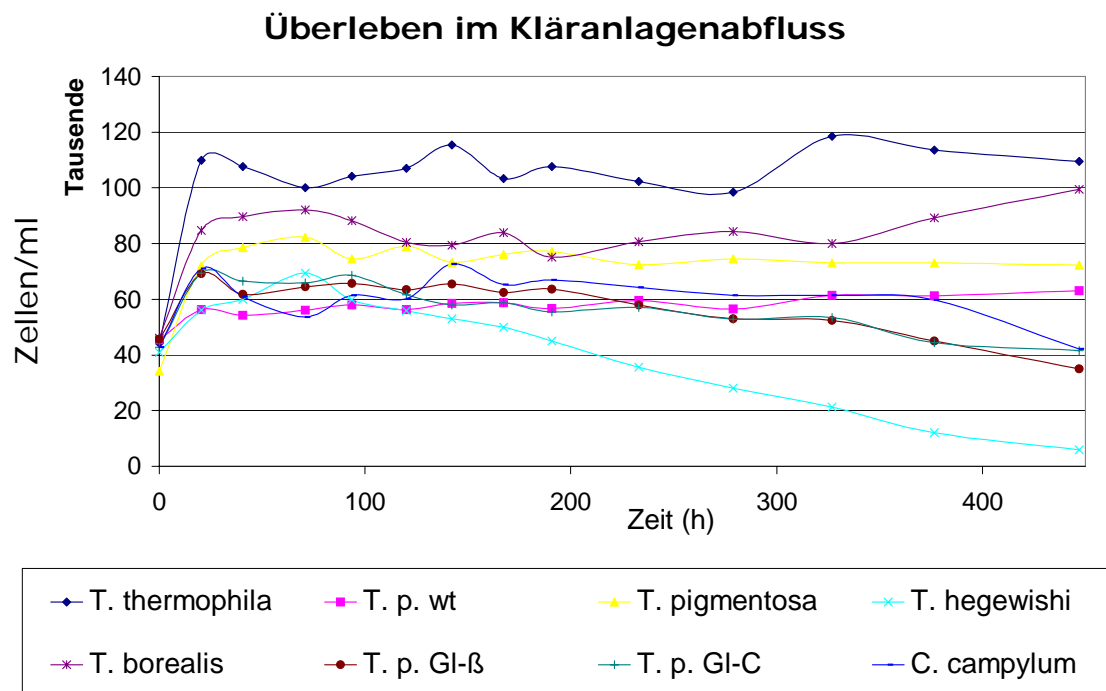


Abb. 7: Überleben der Ciliatenstämme *T. thermophila*, *T. pyriformis* wt, *T. pigmentosa*, *T. hegewishi*, *T. borealis*, *T. pyriformis* GI β, *T. pyriformis* GI C und *C. campylum* im Kläranlagenabfluss bei 15°C.

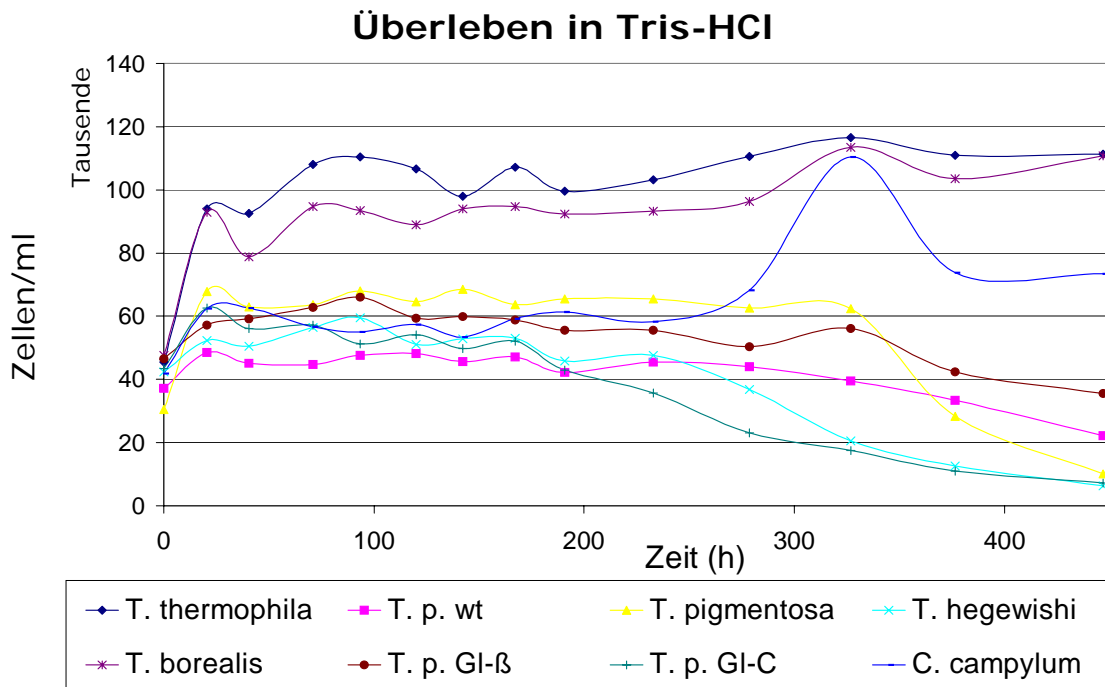


Abb. 8: Überleben der Ciliatenstämme *T. thermophila*, *T. pyriformis* wt, *T. pigmentosa*, *T. hegewishi*, *T. borealis*, *T. pyriformis* GI β , *T. pyriformis* GI C und *C. campylum* in Tris HCl (pH 7,4) bei 15°C.

Bei allen 8 untersuchten Stämmen kommt es im Verlauf des ersten Tages zu einem Anstieg der Zellzahl. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Zellen bei einem Mediumwechsel oft zu einer Zellteilung neigen – ein Effekt, der gerade bei *T. thermophila* häufig zu beobachten ist.

Das Wasser der Nachklärung wirkt sich im Vergleich zum Hungermedium nicht negativ auf das Überleben der Ciliaten aus. Selbst nach 20 Tagen (480 Stunden) lassen sich bei allen Kulturen sowohl im Kläranlagenabfluss als auch in 10 mM Tris-HCl noch lebende, vitale Zellen beobachten.

Im Kläranlagenabfluss zeigt sich nur bei *T. hegewishi* bereits nach 100 h eine Abnahme der Zellzahl, die sich auch bis zum Ende des Versuches fortsetzt. Dieser Organismus scheint also tatsächlich anfälliger für die Bedingungen des Versuches zu sein. Aber auch bei *T. hegewishi* finden sich bei Abbruch des Versuches noch vitale Zellen im Medium.

Des weitern zeigen auch *T. pyriformis* GI C, *T. pyriformis* GI β und *C. campylum* eine Abnahme der Zellzahl. Da diese Abnahme aber erst nach ca. 320 h zu beobachten

ist, ist die Überlebensfähigkeit dieser Stämme im Kläranlagenabfluß als ausreichend zu beurteilen.

Im Hungermedium 10 mM Tris-HCl zeigt sich nach einer Woche (168 h) in keiner der Kulturen eine Abnahme der Zellzahl. Die Überlebensfähigkeit aller Kulturen kann also als ausreichend beurteilt werden.

Das Absterben der Ciliaten im weiteren Versuchsverlauf ist auf das nur noch geringe Medienvolumen zurückzuführen, welches im Verlauf des Versuches aufgrund der Probennahmen abnahm.

4.2.1 Überleben bei 5°C

Die Kulturen wurden jeweils im Doppelansatz (A und B) für 3 Tage bei 5°C in 10 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben (mit Aufsteckdeckeln verschlossen) in Milchmedium inkubiert. Die Abbildung 9 zeigt die Ausgangszelltiters (blaue Balken) und den jeweiligen Zelltiters nach 3 Tagen (rote Balken) der 8 untersuchten Ciliatenstämme. Die Kulturen wurden zuvor bei 10°C herangezogen, weshalb der Zelltiters bei *T. borealis* für eine aussagekräftige Untersuchung zu gering ist.

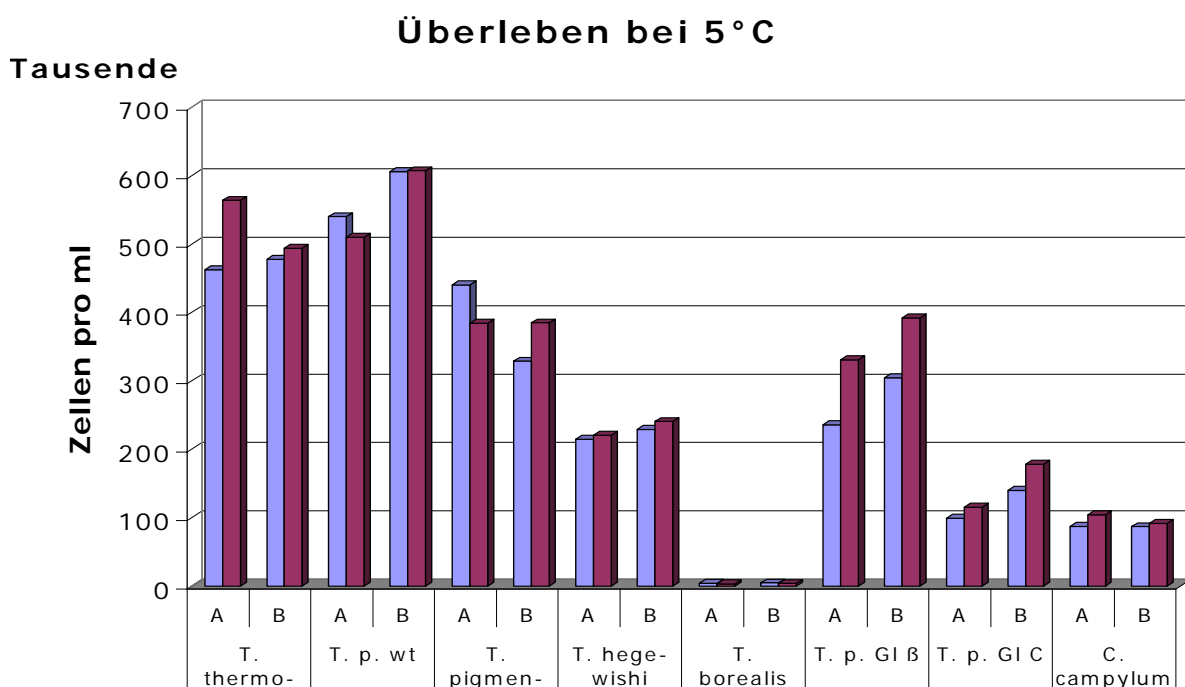


Abb. 9: Überleben der Ciliaten in Milchmedium bei 5°C. Blaue Balken: Ausgangszelltiters. Rote Balken: Zelltiters nach 3 Tagen.

Die Versuchsdaten für *T. borealis* sind bei diesem Versuch aufgrund des geringen Anfangzelltiters nicht aussagekräftig. Bei allen anderen Stämmen bleibt die Zellzahl annähernd konstant, alle Stämme machten bei der mikroskopischen Kontrolle nach 3 Tagen auch einen vitalen Eindruck. Damit kann ein Überleben bei 5°C für sieben der acht untersuchten Ciliaten bestätigt werden.

4.3. Faktor Wachstum der Ciliaten bei unterschiedlichen Temperaturen

Neben dem Überleben ist auch das Wachstum der Ciliaten bei den in der Nachklärung auftretenden Temperaturen ein wichtiger Faktor für die Wahl des geeigneten Organismus. Ein Populationswachstum bei diesen Temperaturen ist ein guter Indikator dafür, dass eine Kultivierung der Ciliaten bei diesen Temperaturen dauerhaft möglich ist. Des Weiteren würde eine Erhöhung der Zellzahl im späteren Einsatz in der Kläranlage dazu führen, dass zum einen die Klärleistung der Ciliaten bezüglich der Minimierung der Bakterienfracht ansteigen würde und zum anderen würden mögliche Zellverluste durch Ausschwemmen der Ciliaten vermindert oder unter Umständen ganz vermeiden werden. Daher wurden Wachstumskurven bei den in der Nachklärung auftretenden Temperaturen 10° und 20°C aufgenommen. Des Weiteren wurde auch das Wachstum bei 30°C protokolliert. Dies diene zum einen der Überprüfung des Überlebens der Ciliaten bei dieser Temperatur, zum anderen wurde bei 30°C bei den meisten der untersuchten Spezies das schnellste Wachstum vermutet. Daher wäre diese Temperatur für eine spätere Anzucht der Ciliaten in hoher Zellzahl (bspw. zur späteren Bestückung der entsprechenden Becken einer Kläranlage mit Ciliaten) bei einem entsprechenden Wachstum die geeignete Wahl.

Die Wachstumskurven der 8 Ciliaten *T. thermophila*, *T. pyriformis* Gl β, *T. pyriformis* Gl C, *T. pyriformis* wt, *Tetrahymena pigmentosa*, *Tetrahymena hegewishi*, *Tetrahymena borealis*, *Colpidium campylum* wurden in Standkulturen in 1,8 l Fernbachkolben (mit Aufsteckdeckeln verschlossen) mit einem Kulturvolumen von 100 mL durchgeführt. Als Nährmedium wurde Magermilchmedium (2% (w/v) Milchpulver, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Glucose-Monohydrat) verwendet und der Animpftiter betrug 10.000 Zellen pro Milliliter.

Das Wachstum der Ciliaten wurde bei den Temperaturen 10°, 20° und 30°C protokolliert, wobei die Versuchsdauer bei 10°C 220 h, bei 20°C 90 h und bei 30°C 40 h betrug. Die Messungen der Zelltiter erfolgten etwa alle 5 Stunden. Von jeder Spezies wurden zwei Kulturen als Doppelwert untersucht.

4.3.1 Wachstumskurven bei 10°C

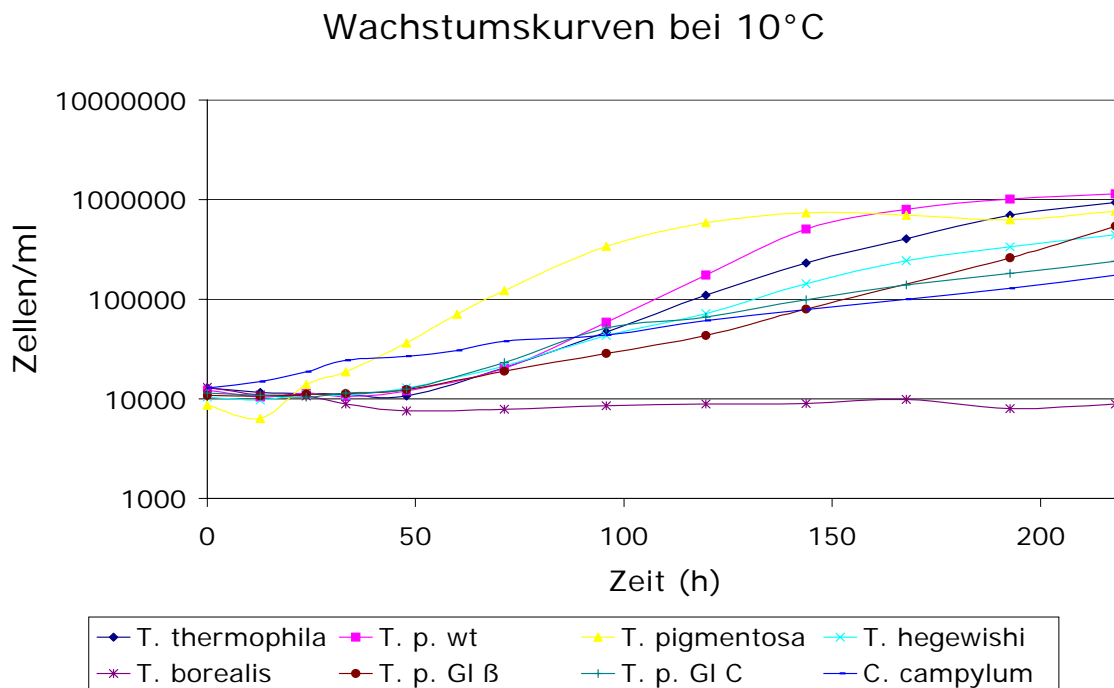


Abb. 10: Wachstumskurven der Ciliaten bei 10°C in Magermilchmedium.

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, wachsen sieben der acht untersuchten Ciliaten bei 10°C. Nur bei *T. borealis* zeigt sich kein Populationswachstum, es kommt aber auch zu keinem Absterben von *T. borealis*. Dieser Stamm ist also für einen Einsatz in gemäßigten oder kälteren Klimazonen nur bedingt geeignet.

Bei *C. campylum* zeigt sich nur eine sehr geringe, bei *T. pigmentosa* eine ebenfalls recht kurze lag-Phase. Die anderen 5 untersuchten Stämme (*T. thermophila*, *T. pyriformis* wt, *T. hegewishi*, *T. pyriformis* Gl C und *T. pyriformis* Gl B) beginnen nach einer lag-Phase von etwa 48 Stunden mit dem Wachstum.

4.3.2 Wachstumskurven bei 20°C

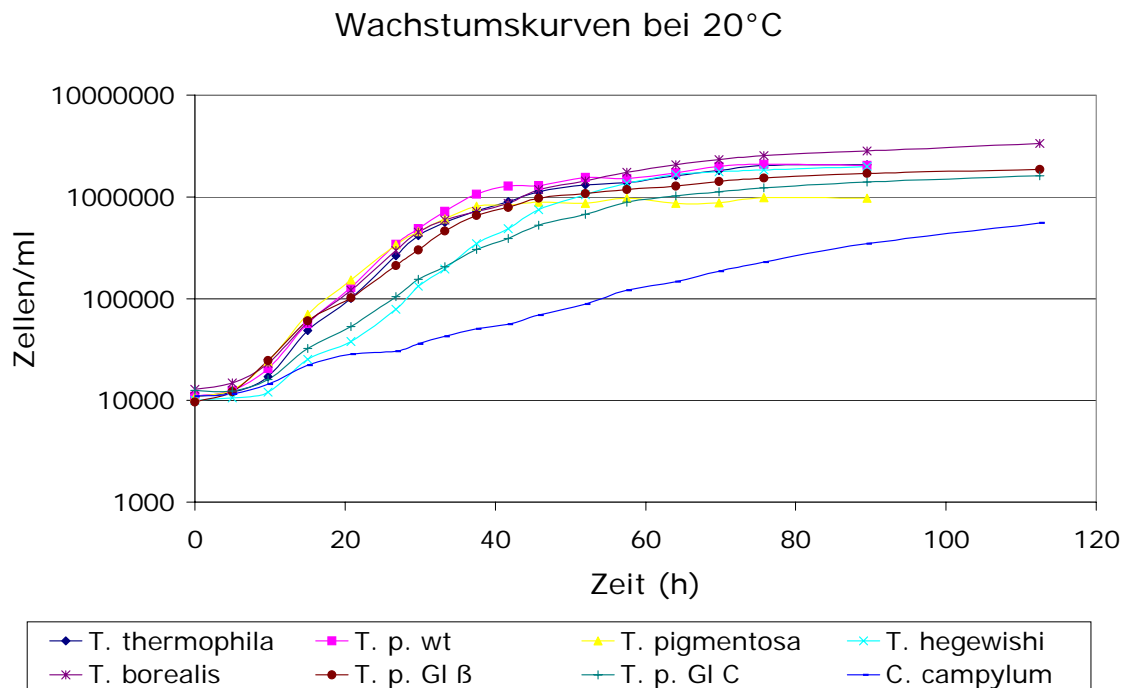


Abb. 11: Wachstumskurven der Ciliaten bei 20°C in Magermilchmedium.

Die Wachstumskurven der 8 untersuchten Ciliaten bei 20°C sind in Abb. 11 dargestellt. Alle Ciliaten zeigen bei dieser Temperatur ein gutes Wachstum, wobei *C. campylum* wie erwartet ein deutlich langsames Wachstum zeigt als die *Tetrahymena spec.* Alle *Tetrahymena spec.* erreichen einen Zelltitel von ungefähr 1×10^6 Zellen/ml, *C. campylum* erreicht einen Endzelltitel von $5,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Allerdings befindet sich *C. campylum* zum Zeitpunkt des Versuchabbruches noch in der Wachstumsphase, von daher wäre bei längerer Versuchsdauer ein noch höherer Endzelltitel zu erwarten.

4.3.3 Wachstumskurven bei 30°C

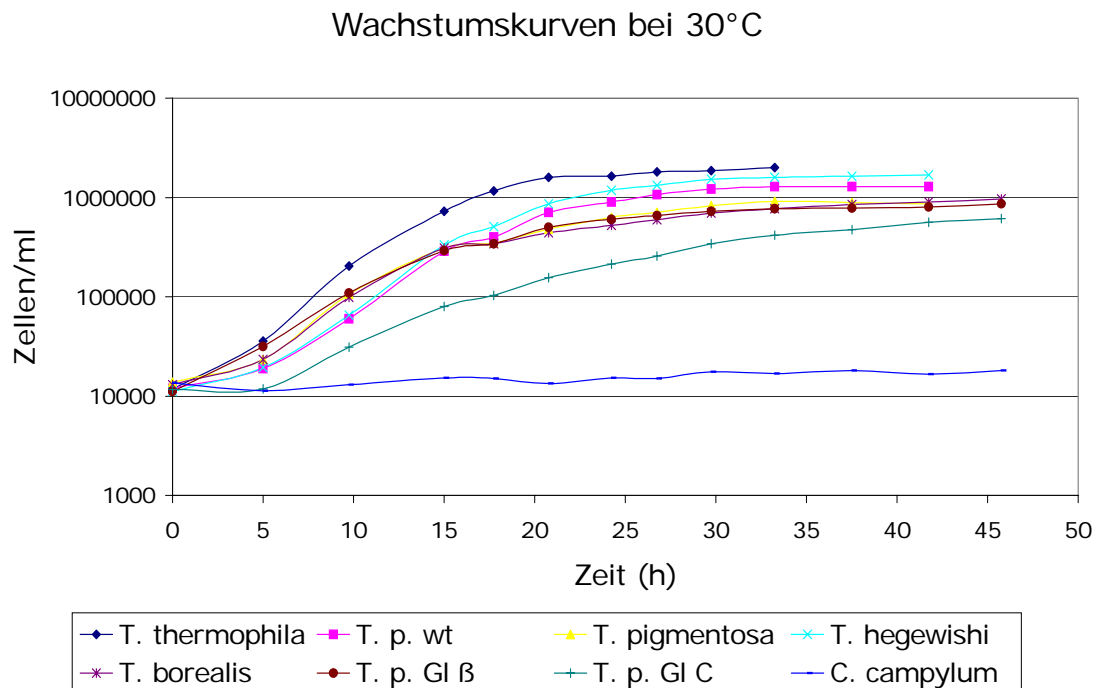


Abb. 12: Wachstumskurven der Ciliaten bei 30°C in Magermilchmedium.

Die Wachstumskurven der acht Stämme bei 30°C sind in Abb. 12 dargestellt. Bei 30°C wachsen alle *Tetrahymena spec.* Das schnellste Wachstum zeigt sich, wie erwartet, bei *T. thermophila*, die mit $2,0 \times 10^6$ auch den höchsten Zelltitern erreichen. Das langsamste Wachstum zeigt *T. pyriformis* Gl C. Dieser Stamm erreicht mit $8,6 \times 10^5$ Zellen/ml auch den geringsten Titer aller *Tetrahymena spec.*

Kein Wachstum zeigt sich hingegen bei *C. campylum*. Bei längerer Inkubation der Zellen bei 30°C sind nach 90 h die meisten Zellen stark deformiert, nach 190 h sind alle Ciliaten gestorben.

Insgesamt wird aus allen Wachstumskurven die deutlich höhere Generationszeit von *C. campylum* gegenüber den *Tetrahymena spec.* ersichtlich. Das Wachstum aller 8 Stämme ist noch einmal in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Übersicht über das Wachstum der 8 untersuchten Spezies bei 10°, 20° und 30°C. +++ entspricht einem sehr gutem Wachstum, ++ entspricht einem guten Wachstum, + entspricht einem geringeren Wachstum, - entspricht keinem Wachstum.

| Spezies | 10°C | 20°C | 30°C |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>T. thermophila</i> | + | +++ | +++ |
| <i>T. pyriformis</i> wt | ++ | +++ | +++ |
| <i>T. pigmentosa</i> | ++ | +++ | +++ |
| <i>T. hegewishi</i> | + | +++ | +++ |
| <i>T. borealis</i> | - | +++ | +++ |
| <i>T. pyriformis</i> Gl ß | + | +++ | +++ |
| <i>T. pyriformis</i> Gl C | + | +++ | ++ |
| <i>C. campylum</i> | + | ++ | - |

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass *T. borealis* bei 10°C und *C. campylum* bei 30°C kein Wachstum zeigen. *C. campylum* wächst jedoch bei 25°C noch problemlos (siehe Abschnitt 4.1)

Zwischen den *Tetrahymena spec.* zeigen sich keine über alle drei Temperaturen signifikanten Unterschiede im Wachstum.

4.4 Faktor: Fressraten der Ciliaten

Bei einem späteren Einsatz in der Kläranlage sind selbstverständlich die Fressraten bezüglich suspendierter Bakterien von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der zur Verfügung stehenden Messmethode zur Zählung der Bakterien – das Ausplattieren – konnte nur mit Laborstämmen als Futterorganismen gearbeitet werden. Die Entscheidung fiel auf *Escherichia coli* K12, da dieses Bakterium über eine durchschnittliche Größe und eine recht hohe Mobilität verfügt. Des Weiteren zählen Coliforme Keime zu einer der häufigsten Bakteriengruppen in einer Kläranlage, und unter den Coliformen Keimen mit Antibiotikaresistenzen gibt es auch für den Menschen gefährliche Bakterien, die durch die Kläranlage gespült werden.

Die Bestimmung der Fressraten wurde bei 15° und 25°C durchgeführt. 15°C wurden gewählt, da es sich hierbei um die ungefähre Jahresdurchschnittstemperatur in der Nachklärung einer Kläranlage handelt; 25°C wurden gewählt, da bei höherer Temperatur ein deutlicher Anstieg der Fressrate erwartet wurde und somit Unterschiede zwischen den Ciliatenstämmen deutlicher gezeigt werden können.

Für die Fresskurven wurden 500 ml Erlenmeyerkolben (mit Aufsteckdeckeln verschlossen) mit 100 ml künstlichem Kläranlagenmedium bestückt, das wie folgt zusammengesetzt war.

Synthetisches Kläranlagenmedium:

10 mM Tris HCl (pH 7,4)

1,724 mg/l Na_2HPO_4

3,64 mg/l NH_3

in 1 L *Aqua dest.*

Der End-pH lag durch die Zugabe von NH_3 bei etwa pH 7,1.

Die Ausgangskonzentration der Ciliaten betrug 20.000 Zellen pro Milliliter. Als Bakterienkultur wurde *Escherichia coli* K12 ausgewählt, die mit einem Zelltiter von rund 10^7 Zellen/ml angeimpft wurden. Sowohl Bakterien als auch Ciliaten wurden zuvor abzentrifugiert, gewaschen und anschließend über Nacht auf Hungermedium (10 mM Tris-HCl, pH 7,4) inkubiert. Anscheinend sterben bei dieser Prozedur viele Bakterien, oder sie verlieren ihre Teilungsfähigkeit, so dass die gemessenen

Anfangszelldichten bei den einzelnen Messungen um den Faktor Fünf bis Zwanzig unter der beabsichtigten Zelldichte lagen.

Die Kultivierung erfolgte bei 15° und bei 25°C in einem Schüttelwasserbad mit externer Temperierung und 44 tangentialen Schüttelbewegungen pro Minute. Diese Schüttelbewegungen dienten zum einen der Sauerstoffzufuhr in das Medium, zum anderen wurden so die Fließbewegungen innerhalb einer Kläranlage simuliert.

Es wurde über einen Zeitraum von 8 Stunden jede Stunde eine Probe mit einem Gesamtvolumen von 600 µl gezogen (500 µl Messung Ciliatenkonzentration, 100 µl Messung Bakterienkonzentration). Der Zählung der Ciliaten erfolgte mit dem Z1 Coulter counter (Beckman Coulter). Die Bestimmung des Bakterientiters erfolgte durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen und Volumina auf Agarplatten. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am Folgetag ausgezählt, wobei in die Auswertung der Fresskurven Platten mit einem Bewuchs zwischen 10 und 500 Kolonien mit einbezogen wurden.

Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle bestimmt, indem eine Kultur *E. coli* K12 ohne Zugabe von Ciliaten unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen kultiviert und die Bakterienkonzentration bestimmt wurde.

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse der Fressexperimente der 8 untersuchten Stämme dargestellt.

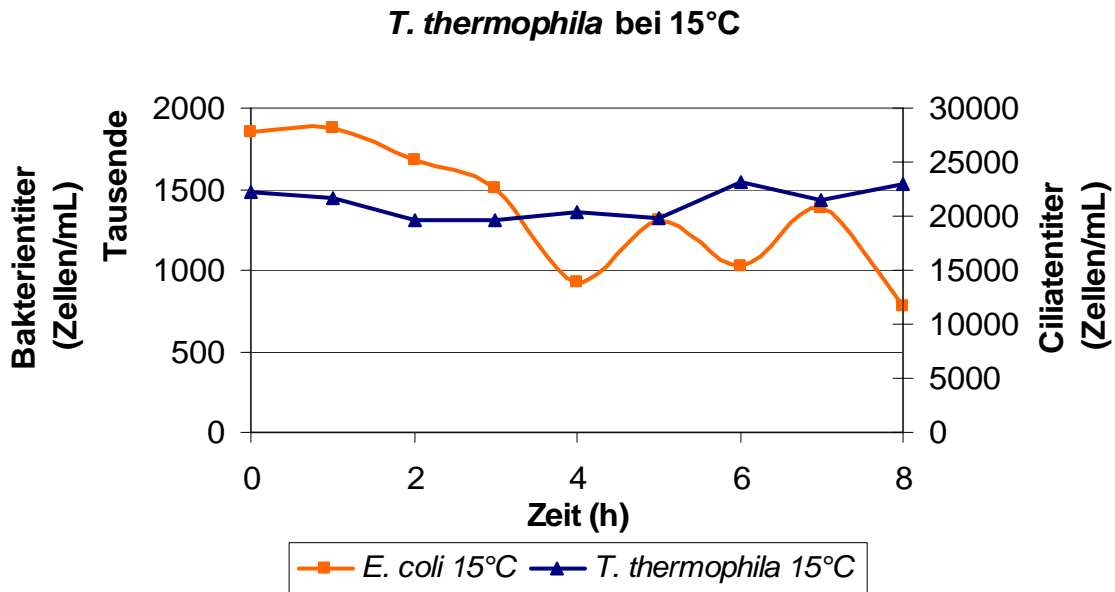


Abb. 13: Zelltiter von *T. thermophila* und *E. coli* bei 15°C.

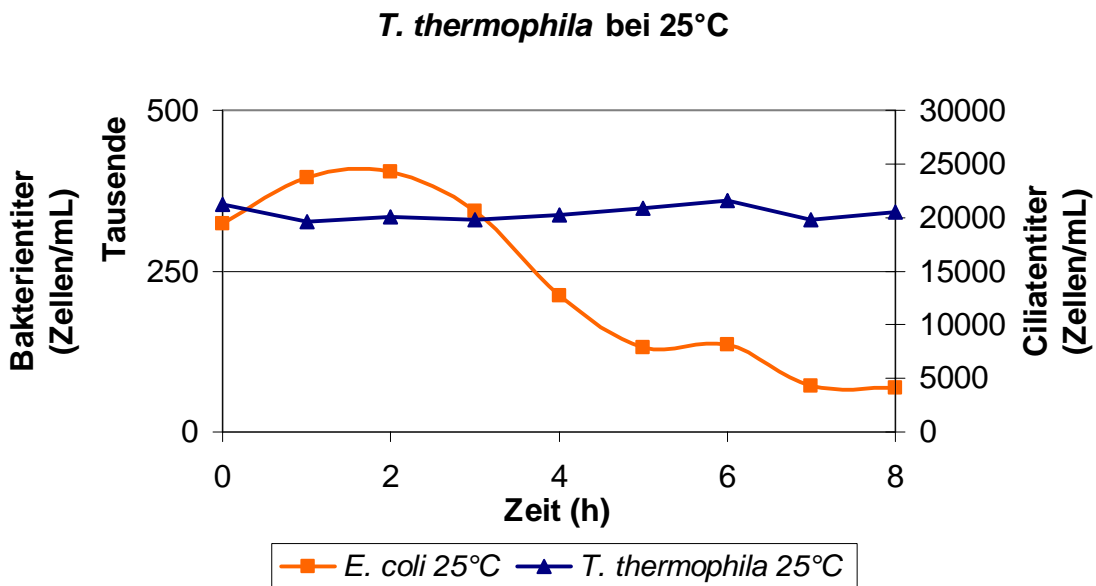


Abb. 14: Zelltiter von *T. thermophila* und *E. coli* bei 25°C.

In Abb. 13 und 14 sind die Ergebnisse der Fresseexperimente bei *T. thermophila* dargestellt. Bei beiden Temperaturen bleibt der Ciliatentiter annähernd konstant. Bei 15°C zeigt sich ein schwacher, bei 25°C ein starker Rückgang der Bakterienkonzentration nach 8 h.

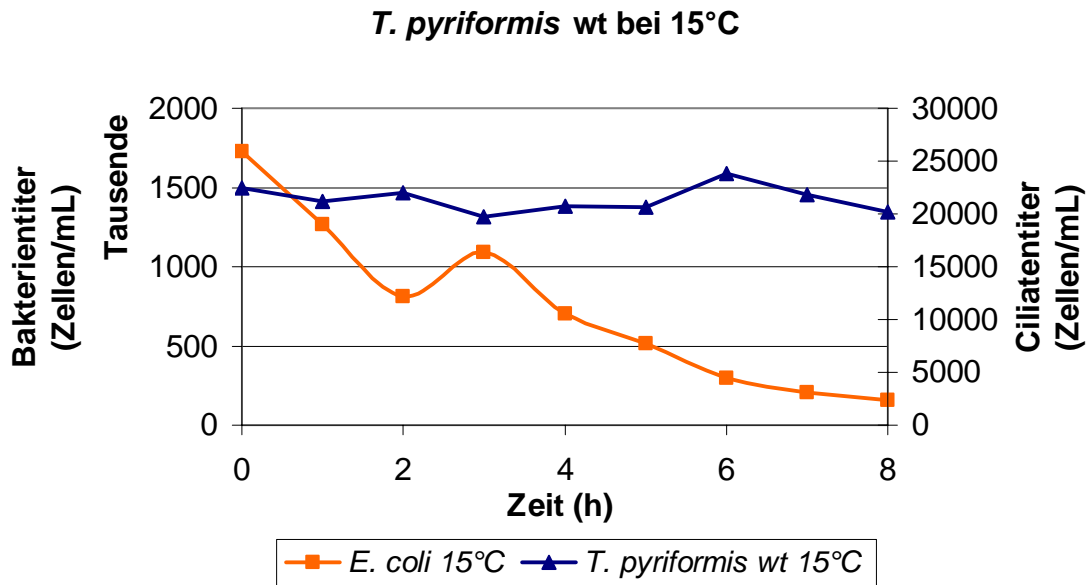


Abb. 15: Zelltiter von *T. pyriformis* wt und *E. coli* bei 15°C.

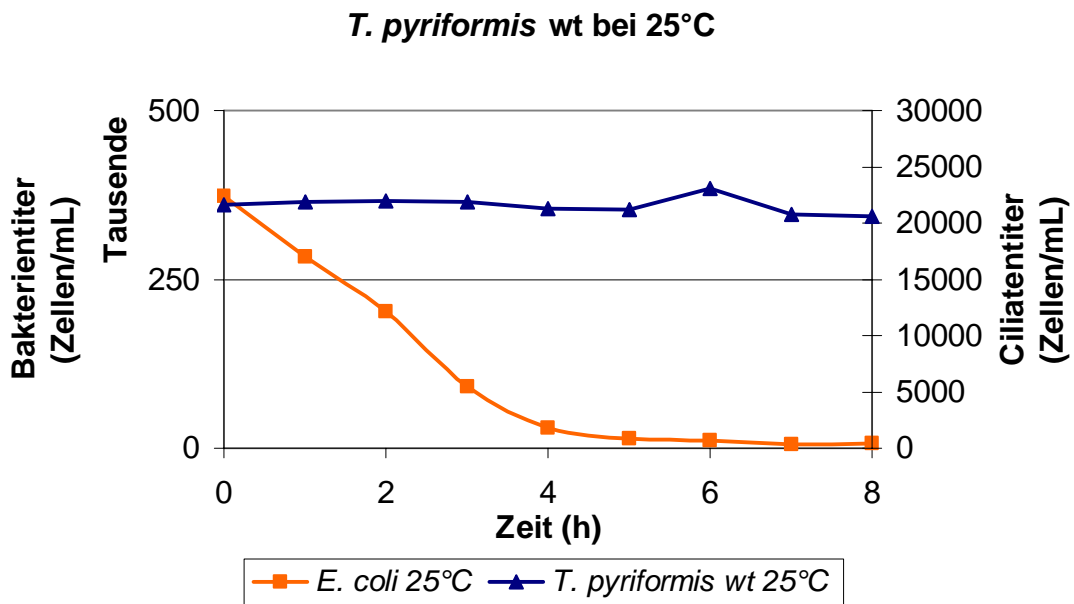


Abb. 16: Zelltiter von *T. pyriformis* und *E. coli* bei 25°C.

In Abb. 15 und 16 sind die Ergebnisse der Fresseexperimente bei *T. pyriformis* wt dargestellt. Bei beiden Temperaturen bleibt der Ciliatentiter annähernd konstant, während die Anzahl Bakterien deutlich reduziert wird.

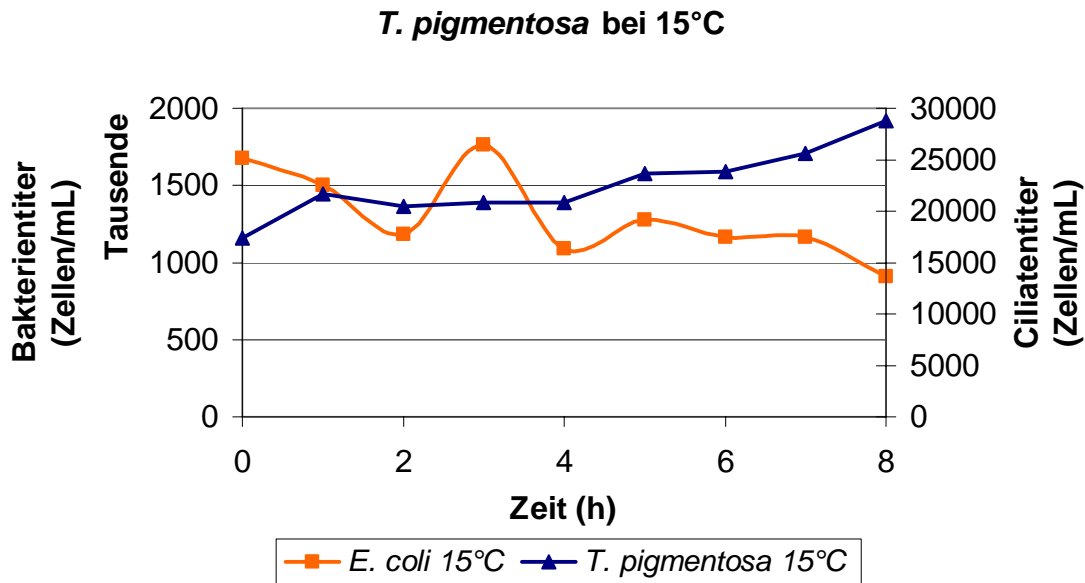


Abb. 17: Zelltiter von *T. pigmentosa* und *E. coli* bei 15°C.

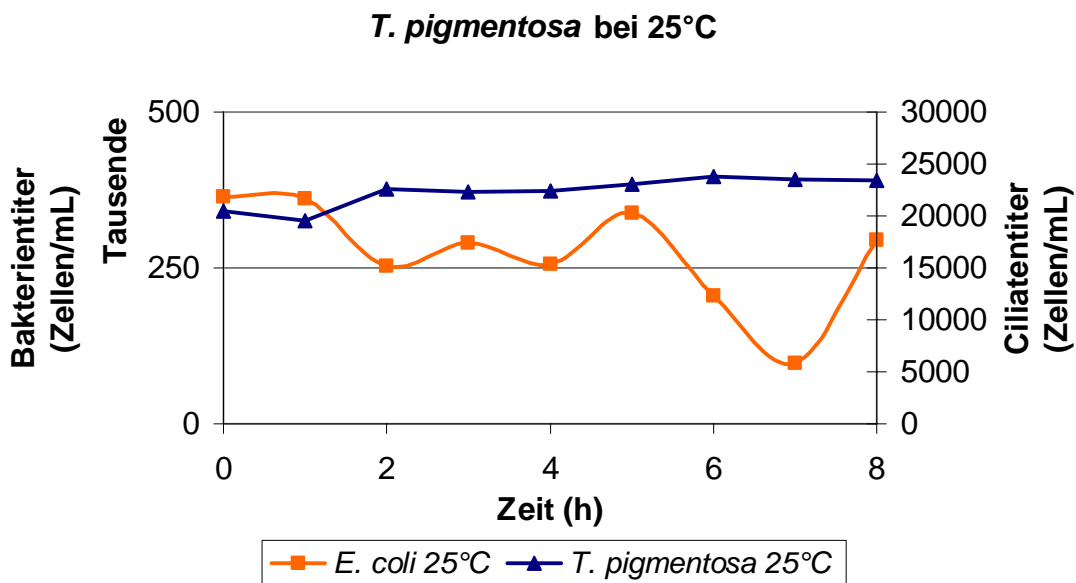


Abb. 18: Zelltiter von *T. pigmentosa* und *E. coli* bei 25°C.

In Abb. 17 und 18 sind die Ergebnisse der Fressexperimente bei *T. pigmentosa* dargestellt. Während der Ciliatentiter bei 25°C annähernd konstant bleibt, zeigt sich bei 15°C ein Anstieg der Ciliatenkonzentration. Der Bakterientiter sinkt bei 15°C leicht, bei 25°C zeigt sich bis 7 h ein stärkerer Rückgang, es kommt jedoch in der letzten Stunde der Messung wieder zu einem Anstieg der Bakterienkonzentration. Eventuell handelt es sich bei den bei dem Messwert zum Zeitpunkt 7h um ein

Messartefakt – ein starker Sinken der Bakterienkonzentration ist bei keinem der anderen Messwerte weder bei 15° noch bei 25°C zu beobachten.

T. hegewishi bei 15°C

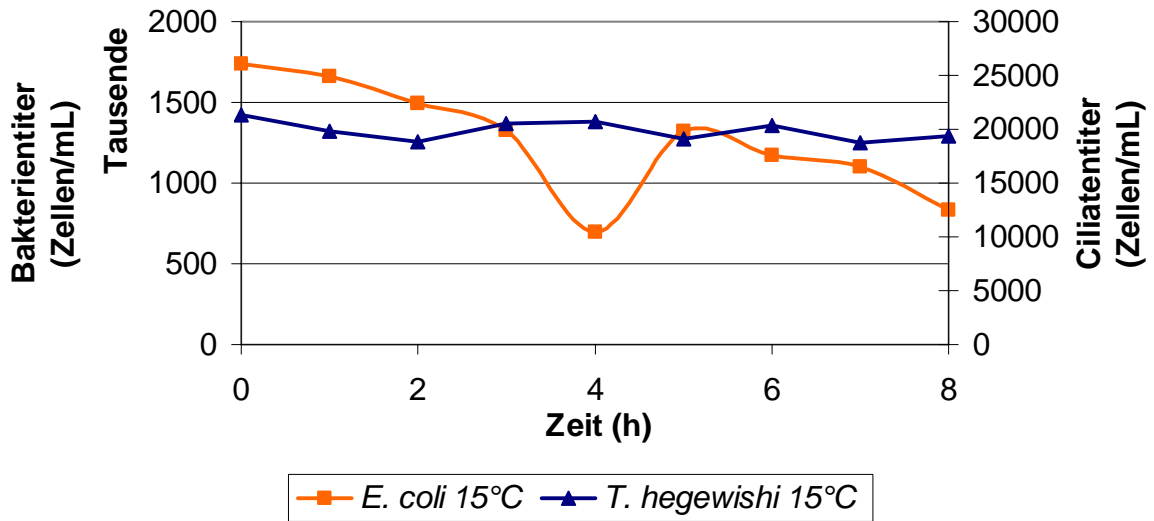


Abb. 19: Zelltiter von *T. hegewishi* und *E. coli* bei 15°C.

T. hegewishi bei 25°C

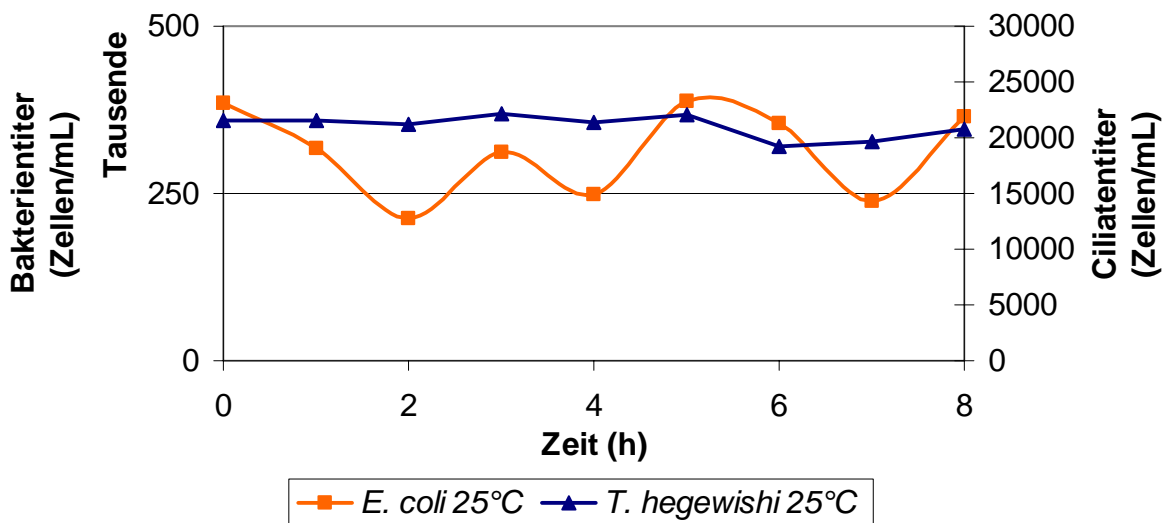


Abb. 20: Zelltiter von *T. hegewishi* und *E. coli* bei 25°C.

In Abb. 19 und 20 sind die Ergebnisse der Fressexperimente bei *T. hegewishi* dargestellt. Bei beiden Temperaturen bleiben die Ciliatentiter annähernd konstant. Der Bakterientiter sinkt bei 15°C leicht, während es bei 25°C nur zu Schwankungen der Bakterienkonzentration ohne einen nennenswerten Rückgang derselben zum Ende der Messung hin kommt.

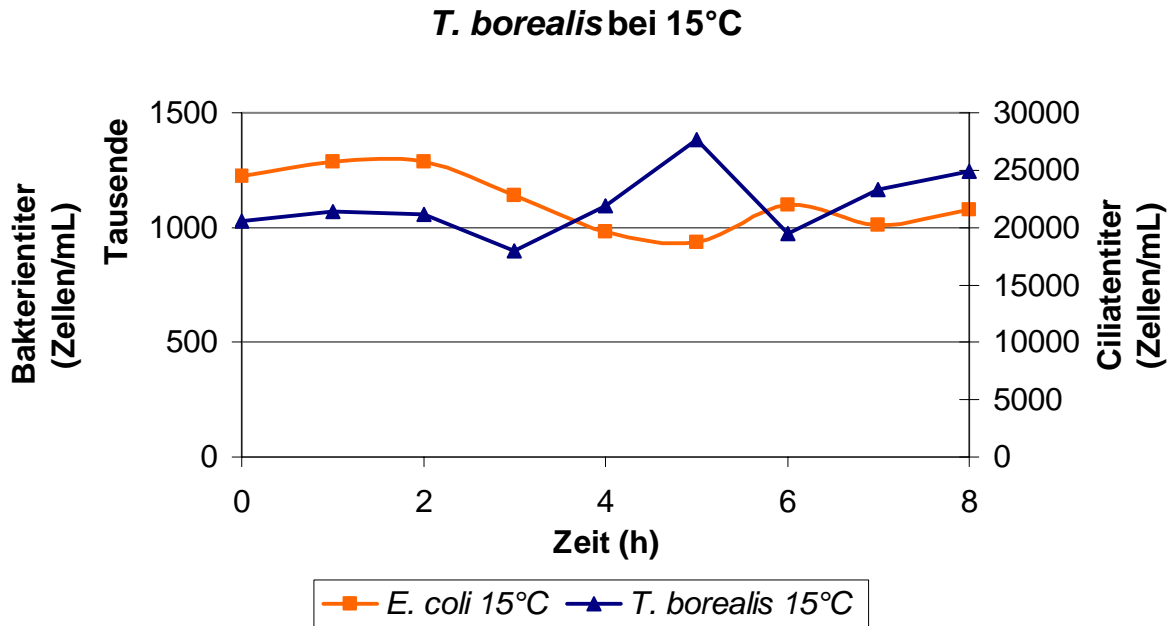


Abb. 21: Zelltiter von *T. borealis* und *E. coli* bei 15°C.

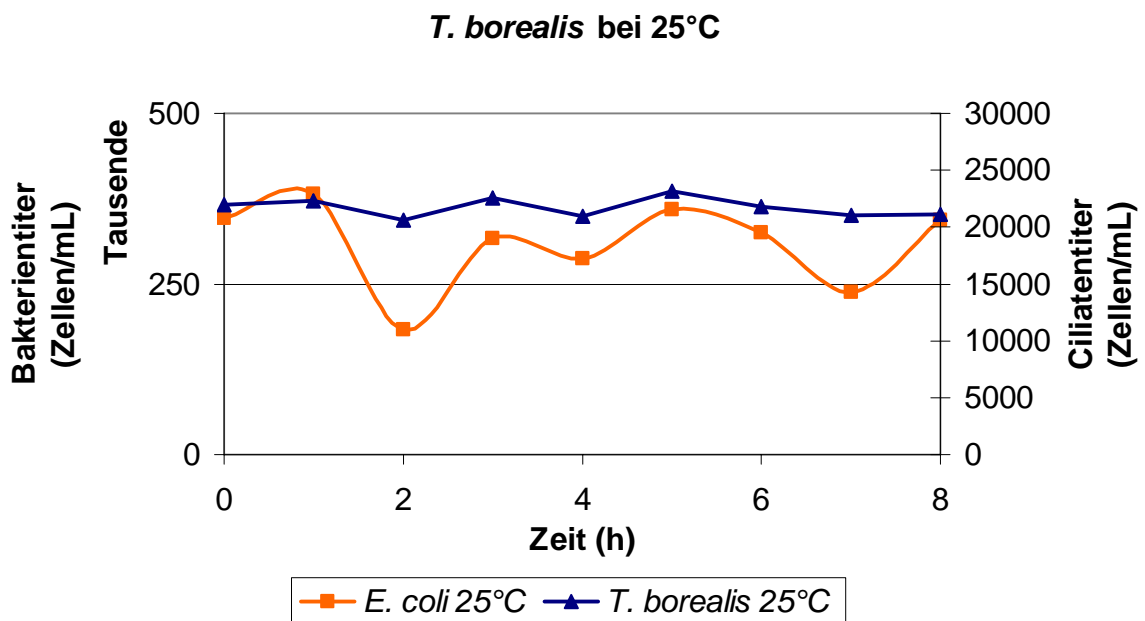


Abb. 22: Zelltiter von *T. borealis* und *E. coli* bei 25°C.

In Abb. 21 und 22 sind die Ergebnisse der Fressexperimente bei *T. borealis* dargestellt. Während der Ciliatentiter bei 25°C annähernd konstant bleibt, kommt es bei 15°C zu einem leichten Anstieg desselben. Bei beiden Temperaturen kommt es zu keinem Rückgang der Bakterienkonzentration nach 8 h, allerdings weist der Bakterientiter bei 25°C einige Schwankungen auf.

T. pyriformis GL-β bei 15°C

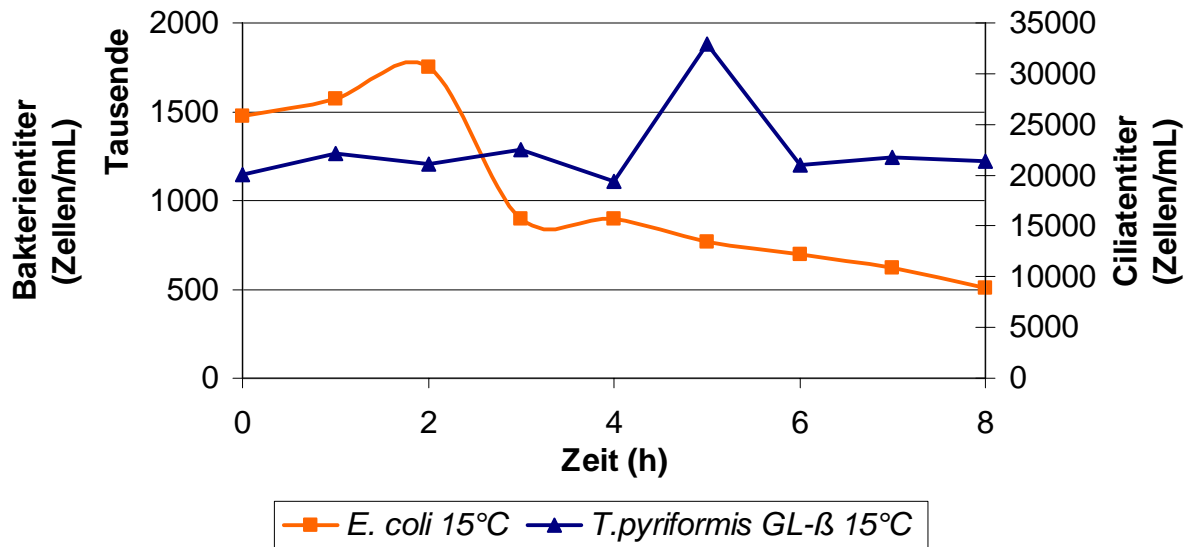


Abb. 23: Zelltiter von *T. Gl β* und *E. coli* bei 15°C.

T. pyriformis GL-β bei 25°C

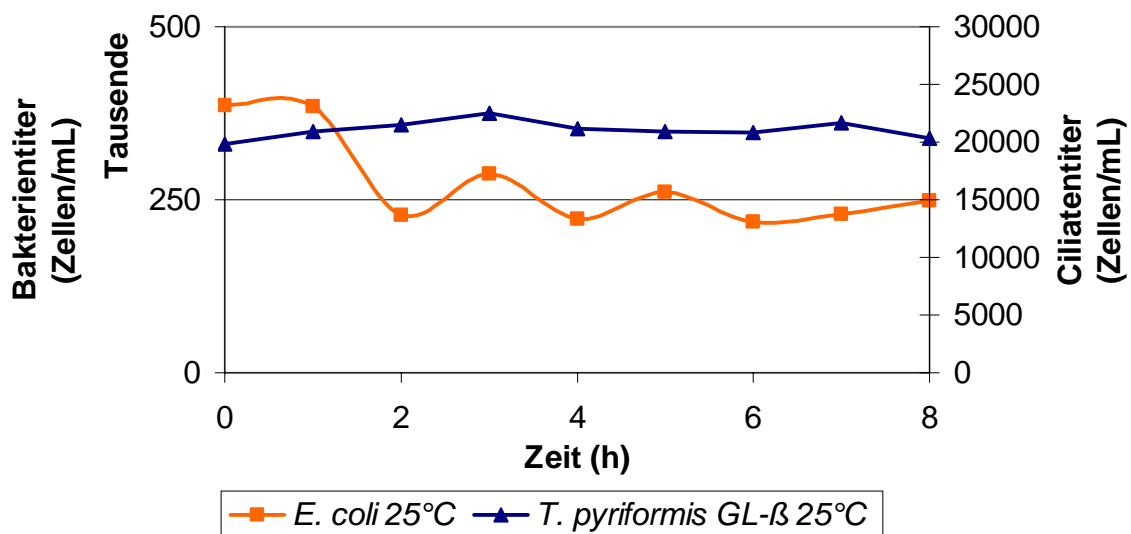


Abb. 24: Zelltiter von *T. Gl β* und *E. coli* bei 25°C.

In Abb. 23 und 24 sind die Ergebnisse der Fresseexperimente bei *T. pyriformis* GL β dargestellt. Bei beiden Temperaturen bleibt der Ciliatentiter annähernd konstant, allerdings wurde bei Stunde 5 bei 15°C eine Erhöhung des Ciliatentiters gemessen. Dies ist vermutlich auf eine Verstopfung der Messkapillare des Coulter Counters zurückzuführen. Der Bakterientiter sinkt bei 15°C deutlich, bei 25°C nur innerhalb der ersten beiden Stunden der Messung.

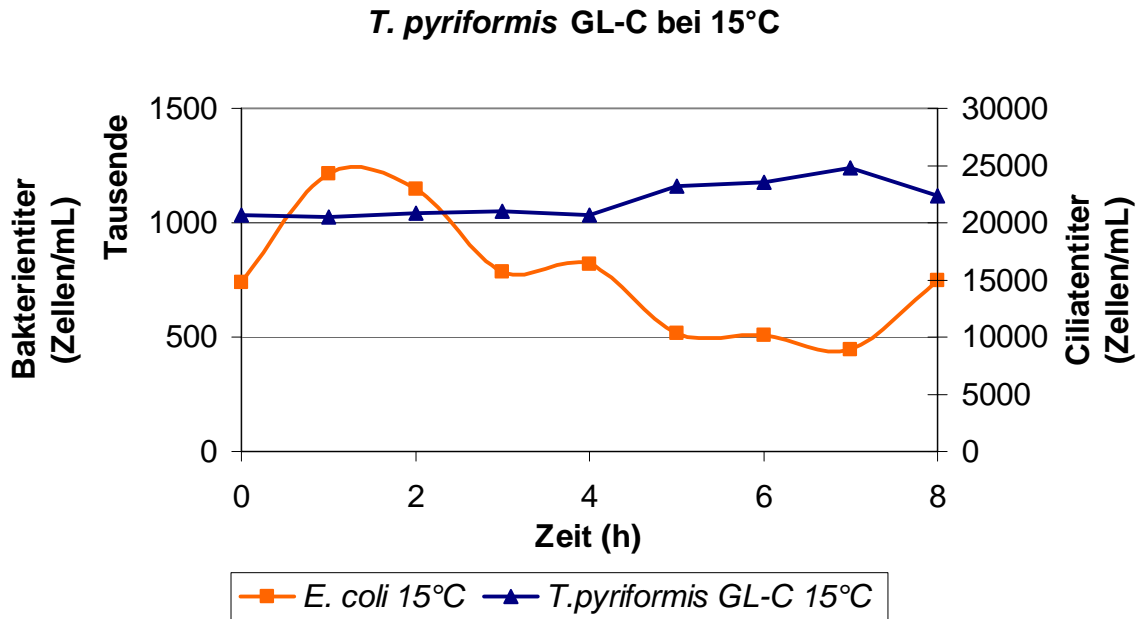


Abb. 25: Zelltiter von *T. Gl C* und *E. coli* bei 15°C.

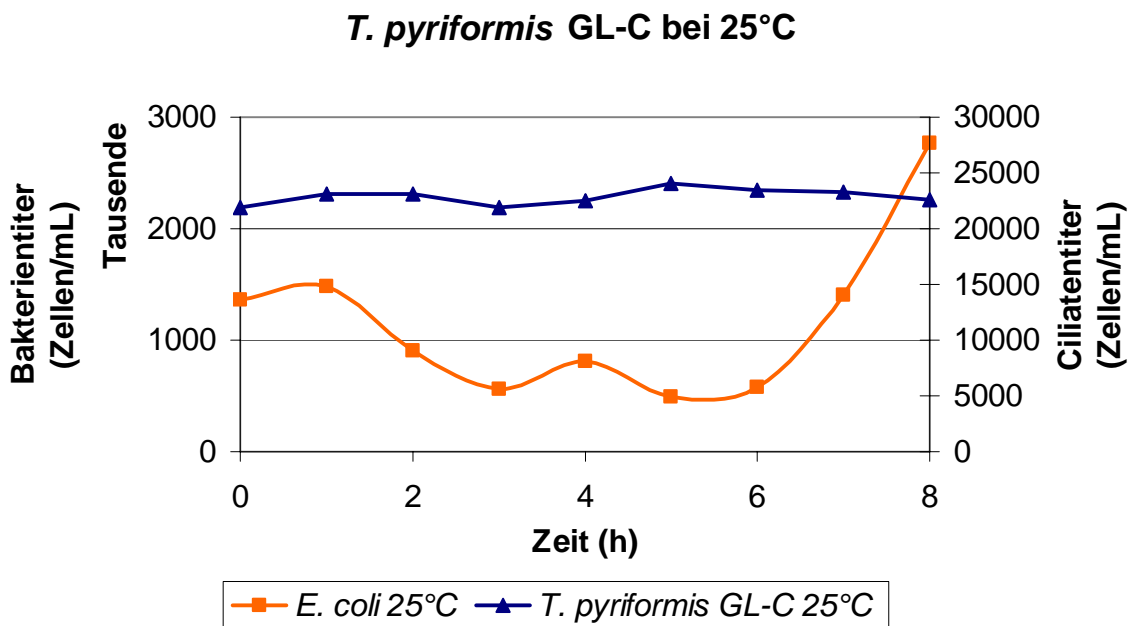


Abb. 26: Zelltiter von *T. Gl C* und *E. coli* bei 25°C.

In Abb. 25 und 26 sind die Ergebnisse der Fresseexperimente bei *T. pyriformis* GL C dargestellt. Bei beiden Temperaturen bleibt der Ciliatentiter annähernd konstant. Bei beiden Temperaturen kommt es zu keinem Rückgang der Bakterienkonzentration nach 8 h, während der Bakterientiter bei 15°C allerdings um einen Wert von $7,5 \times 10^5$ schwankt, steigt der Bakterientiter bei 25°C am Ende der Messung stark an.

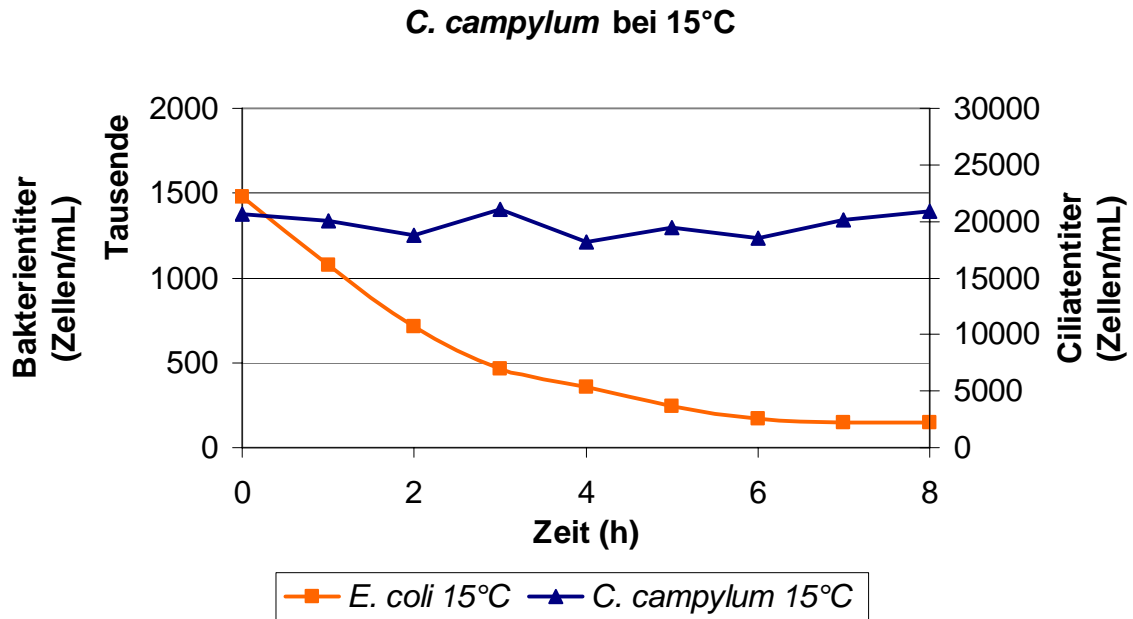


Abb. 27: Zelltiter von *C. campylum* und *E. coli* bei 15°C.

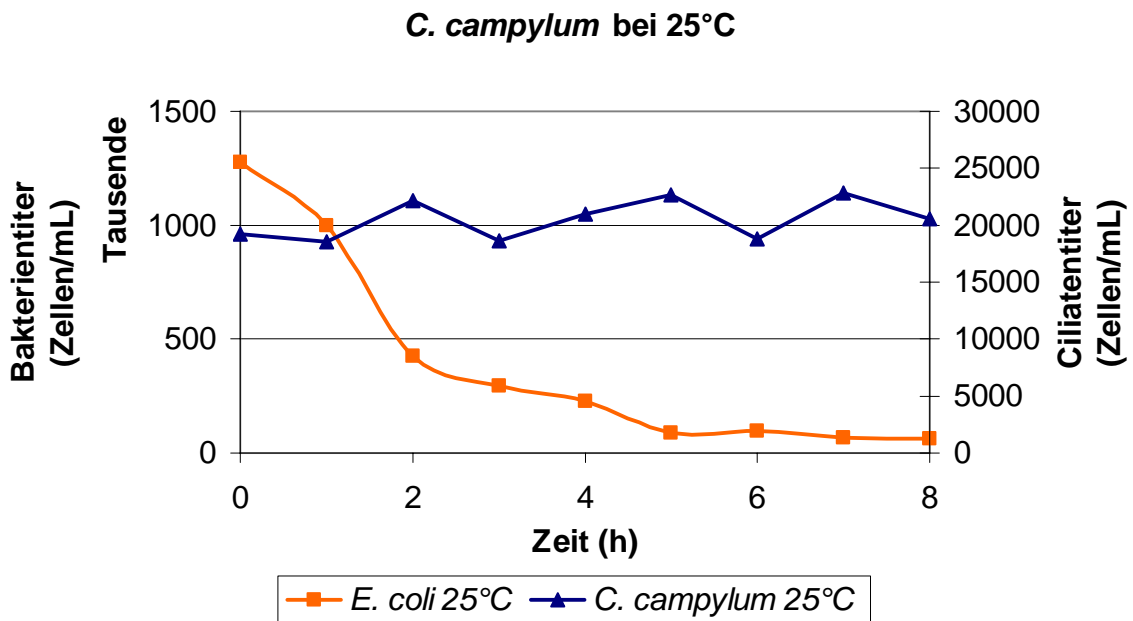


Abb. 28: Zelltiter von *C. campylum* und *E. coli* bei 25°C.

In Abb. 27 und 28 sind die Ergebnisse der Fressexperimente bei *C. campylum* dargestellt. Bei beiden Temperaturen bleibt der Ciliatentiter annähernd konstant, während die Anzahl Bakterien deutlich reduziert wird.

In Abb. 29 sind noch einmal die Bakterienzellzahlen bei Inkubation mit den 8 untersuchten Stämmen und der Nullwert bei 15°C im Verlauf der Zeit zusammengefasst. Dabei wurden die während des Versuches gemessenen Bakterienzellichten auf ihren prozentualen Anteil der Ausgangszellichte umgerechnet.

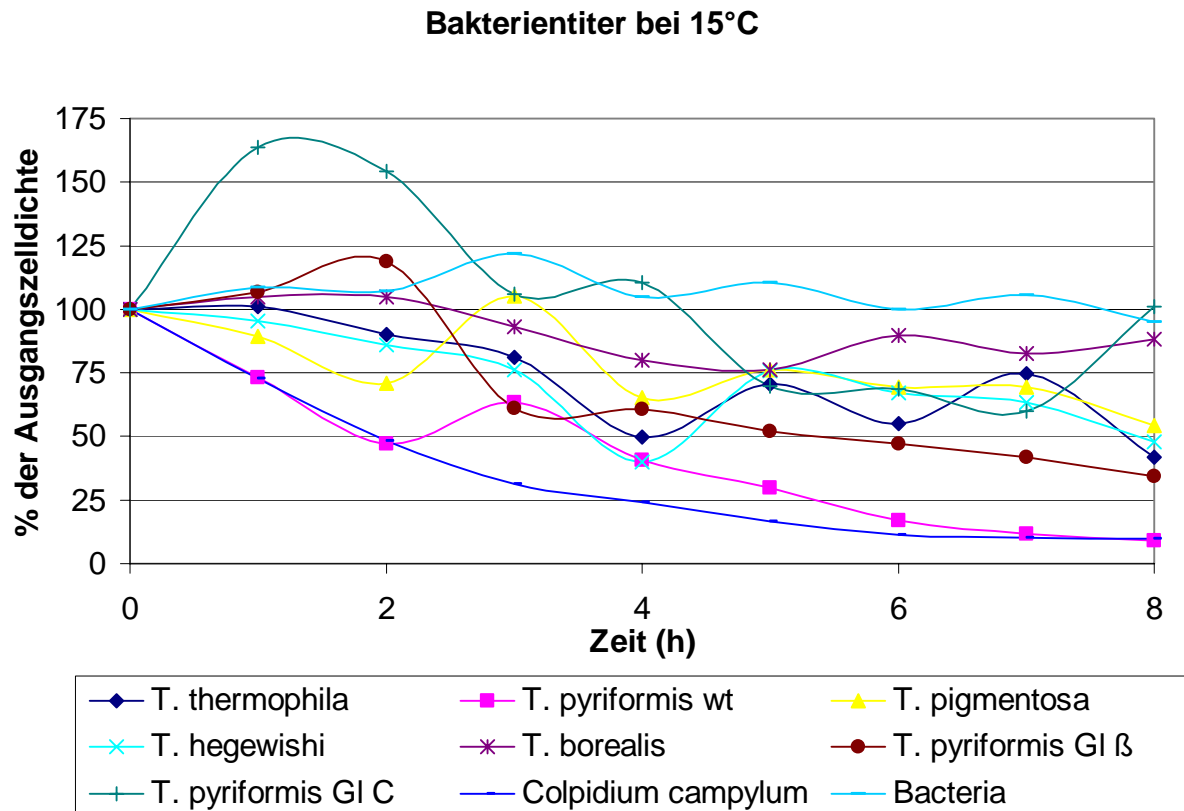


Abb. 29: Bakterientiter in Anwesenheit der acht Ciliatenstämme und ohne Ciliaten bei 15°C.

Bei 15°C ist die stärkste Abnahme der Bakterienzellzahl bei *T. pyriformis wt* und *C. campylum* zu beobachten. Aber auch bei *T. thermophila*, *T. hegewishi*, *T. pigmentosa* und *T. pyriformis GI β* ist eine Abnahme der Bakterienkonzentration zu beobachten. Der Nullwert ohne die Zugabe von Ciliaten bleibt annähernd konstant bei einem Titer von $1,6 \times 10^6$ Zelle/ml.

Bakterientiter bei 25°C

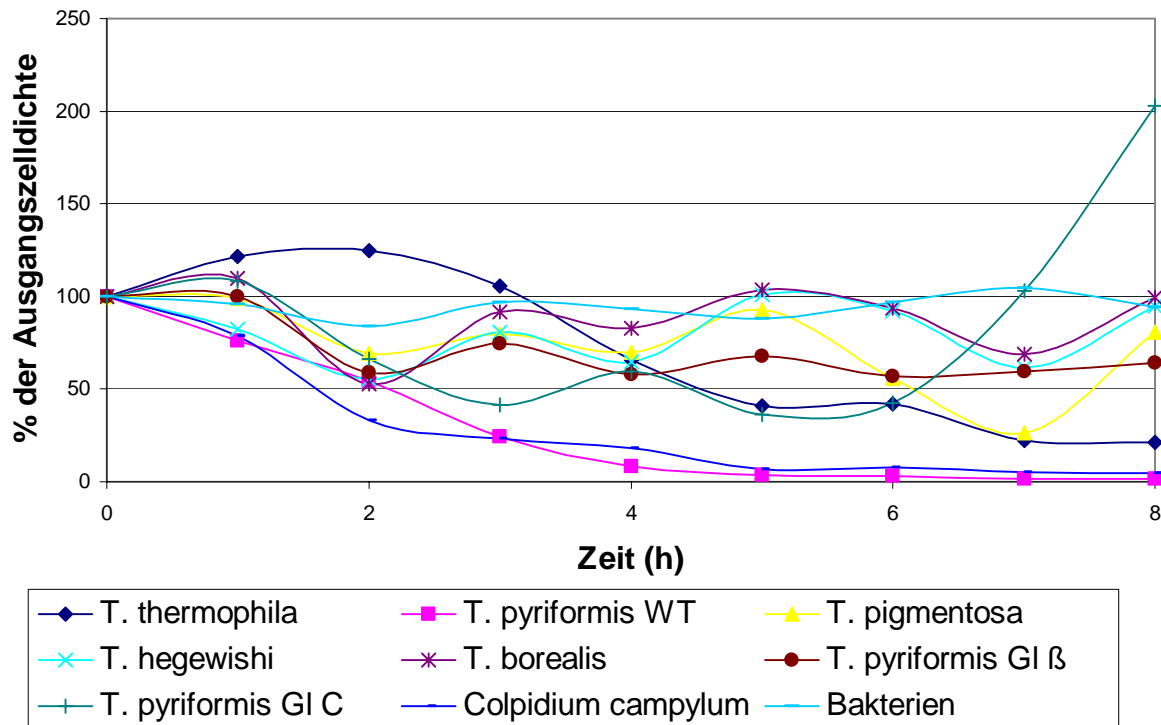


Abb. 30: Bakterientiter in Anwesenheit der acht Ciliatenstämme und ohne Ciliaten bei 25°C.

In Abb. 30 sind die Bakterienzellzahlen bei Inkubation mit den 8 untersuchten Stämmen und der Nullwert bei 25°C im Verlauf der Zeit zusammengefasst. Dabei sind die während des Versuches gemessenen Werte als prozentuale Anteile der Bakterienausgangszellichte dargestellt.

Bei 25°C ist die stärkste Abnahme des Bakterientiters bei *C. campylum*, *T. thermophila* und *T. pyriformis wt* zu beobachten. Aber auch bei *T. pyriformis GI β* zeigt sich eine Abnahme der Bakterienkonzentration.

Die starke Zunahme der Bakterienzellzahl bei *T. pyriformis GI C* am Ende des Beobachtungszeitraums ist wahrscheinlich auf die (mikroskopisch beobachtete) Lyse einiger Ciliaten zurückzuführen. Diese Zellyse führt zu einem Anstieg der verfügbaren Nährstoffe und damit vermutlich zu einem Wachstum der Bakterien. Da die Negativkontrolle, bei der Bakterien ohne Ciliaten inkubiert wurden, keinen Anstieg der Bakterienkonzentration zeigt, muss der Anstieg des Bakterientiters auf die Anwesenheit der Ciliaten zurückzuführen sein.

Auf die gleiche Ursache kann das Ansteigen des Bakterientiters am Ende des Versuchs bei *T. pigmentosa*, *T. borealis* und *T. hegewishi* zurückzuführen sein.

Auch bei 25°C bleibt der Bakterientiter des Nullwertes ohne Ciliaten relativ konstant. Die Abnahme der Bakterienzellzahl ist demnach also wirklich auf die Anwesenheit der Ciliaten zurückzuführen, es handelt sich also nicht um ein allgemeines Absterben der Bakterienkultur.

4.5 Wahl der geeigneten Ciliatenstämme für den weiteren Projektverlauf

Für den weiteren Projektverlauf wurden zwei der acht untersuchten Stämme ausgewählt, die bei einem tatsächlichen Einsatz in der Kläranlage den besten Erfolg versprachen.

Aufgrund der vorliegenden Daten bezüglich des Faktors „Fressraten der Ciliaten“ kamen hierbei *C. campylum*, *T. pyriformis* wt und *T. thermophila* in die nähere Auswahl. Alle drei Spezies zeigten bei beiden Temperaturen gute bis sehr gute Klärungsraten, wobei *C. campylum* bei 15°C und *T. pyriformis* wt bei 25°C die besten Ergebnisse zeigten.

Alle drei Organismen erfüllten die Anforderung „Unkomplizierte Kultivierung“ ohne Beanstandungen, sowohl ein unkompliziertes Handling, eine einfache Kultivierung als auch die geforderte Unanfälligkeit gegenüber mechanischen Stress war gegeben.

Bei dem Faktor „Überleben unter den Umweltbedingungen der Kläranlage“ wiesen alle drei Spezies ein sehr gutes Überleben sowohl im Klaranlagenabfluss als auch im Hungermedium 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) auf. Alle drei Spezies überlebten problemlos bei 5°C. Allerdings zeigt *C. campylum* bei 30°C kein Zellwachstum, nach längerer Inkubation der Zellen bei dieser Temperatur kam es auch zu einem Absterben der Zellen (vgl. Abb. 12). Da allerdings eine Kultivierung bei 25°C problemlos verlief (Abb. 6) und das Jahresmaximum in der Nachklärung bei beiden betrachteten Kläranlagen unter 25°C lag, kann das Überleben von *C. campylum* bei dieser Temperatur als ausreichend betrachtet werden.

Bei dem Faktor „Wachstum der Ciliaten bei unterschiedlichen Temperaturen“ zeigt sich ein Wachstum von *T. thermophila* und *T. pyriformis* wt bei allen Temperaturen, während *C. campylum* bei 30°C kein Wachstum mehr zeigt. Des Weiteren zeigt sich eine deutlich geringere Wachstumsrate dieses Ciliaten gegenüber allen *Tetrahymena spec.* Trotzdem kann die Wachstumsrate von *C. campylum* jedoch als ausreichend betrachtet werden, denn sowohl die erreichten Zelldichten als auch die erreichte Wachstumsrate des Ciliaten liegen im hohen bis sehr hohen Bereich.

Nach Ansicht aller Faktoren fiel unsere Wahl auf die beiden Ciliaten *T. pyriformis* wt und *C. campylum*, da diese beiden Spezies letztendlich höhere Fressraten zeigten als *T. thermophila*. Insbesondere bei 15°C, der ungefähren Durchschnittstemperatur in der Nachklärung, lag der Anteil des Bakterientiters von der Ausgangszelldichte nach 8h Versuchsdauer bei *T. thermophila* um ein mehr als vierfaches über den Anteilen von *C. campylum* und *T. pyriformis* wt (ca. 10 % der Ausgangszelldichte bei *C. campylum* und *T. pyriformis* wt im Vergleich zu ca. 40 % der Ausgangszelldichte bei *T. thermophila*).

Da *T. thermophila* jedoch bereits erfolgsversprechende Fressraten gezeigt hatte, wurde in einem zusätzlichen Anlauf versucht, die Fressleistung dieser Spezies zu verbessern, um sie eventuell doch für das Projekt interessant zu machen. Da alternde Stämme von *T. thermophila* häufig einen Rückgang bei vielen Stoffwechsellleistungen zeigen – die Seneszenz – wurde eine Juvenilisierung der Spezies mittels einer Konjugation durchgeführt. Zwei Exkonjuganten von *T. thermophila* wurden anschließend auf ihr Fressverhalten hin untersucht. Es zeigte sich, dass sie gegenüber dem Elternstamm keine Verbesserung der Klärungsrate aufwiesen.

Für den weiteren Projektverlauf wurden also die beiden Spezies *T. pyriformis* wt und *C. campylum* ausgewählt.

Die folgenden aufgelisteten Gründe sprechen gegen die anderen 5 untersuchten Stämme.

T. pigmentosa: Relativ geringe Fressraten, schlechte Kultivierbarkeit über längere Zeiträume.

T. hegewishi: Relativ geringe Fressraten.

T. borealis: Sehr geringe Fressraten, kein Wachstum bei 10°Cs.

T. pyriformis Gl β: Geringere Fressraten als die drei Favoriten.

T. pyriformis Gl C: Hohe Zelllyseraten, dadurch hoher Nährstoffeintrag in das Medium verbunden mit einer starken Minderung der Klärleistung. Diese Zelllyse ist auf eine Sensitivität gegenüber mechanischer Bewegung zurückzuführen.

5. Projektphase 3: Bestimmung der Fressraten in Abhängigkeit von Temperatur und Futterorganismus

Nach der Auswahl der geeigneten Ciliaten wurde nun für die beiden gewählten Spezies – *T. pyriformis* wt und *C. campylum* – die Fressraten bei verschiedenen Umgebungstemperaturen und mit unterschiedlichen Futterorganismen bestimmt. Als Futterorganismen konnten aufgrund der gewählten Messmethode nur Labororganismen getestet werden. Die Wahl fiel auf *Escherichia coli* K12, *Bacillus subtilis* 23 und *Pseudomonas putida* DSM 548. Diese drei Spezies sind zum einen unter den häufigsten Vertretern der in der Kläranlage zu findenden Prokaryonten, zum anderen bieten sie eine gute Auswahl betreffend Speziesgröße und Mobilität. Die unterschiedlichen Eigenschaften der drei Bakterien bezüglich Größe und Mobilität sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Länge und Mobilität von *Escherichia coli* K12, *Bacillus subtilis* 23 und *Pseudomonas putida* DSM 548.

| Spezies | Länge | Mobilität |
|--------------------------|--------------|------------------|
| <i>E. coli</i> K12 | 1,2 – 1,4 µm | mittel bis hoch |
| <i>B. subtilis</i> 23 | 2 µm | sehr hoch |
| <i>P. putida</i> DSM 548 | 0,8 – 1,2 µm | gering |

Der Einsatz der verschiedenen Bakterienspezies als Futterorganismen sollte über die Frage Aufschluss geben, inwiefern die Fressraten der Ciliaten in Bezug auf Bakterien mit unterschiedlichen Eigenschaften variieren. Zu diesem Zweck wurden je eine der drei Bakterienspezies mit einer der beiden Ciliatenspezies kultiviert.

Des Weiteren wurde eine Fütterung der Ciliaten mit einem Gemisch aller drei Bakterienspezies durchgeführt. Mit diesem Projektteil sollte die eventuelle Präferenz eines Ciliaten für eine bestimmte Bakterienspezies ermittelt werden.

Die Fressexperimente der Projektphase 3 wurden bei Temperaturen von 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C aufgenommen. Diese Temperaturen decken das Temperaturspektrum der Nachklärung in einer Kläranlage der gemäßigten Breiten gut ab.

Die Fresskurven wurden wieder in einem Maßstab von 100 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben (mit Aufsteckdeckeln verschlossen) durchgeführt. Der anfängliche Ciliatentiter lag bei 20.000 Zellen/ml, der Bakterientiter bei 1×10^7 Zellen/ml. Sowohl Ciliaten als auch Bakterien wurden vor den Experimenten über Nacht auf Hungermedium (10 mM Tris HCl, pH 7,4) gesetzt, um so einen Nährstoffeintrag in das synthetische Kläranlagenmedium zu vermeiden und das Zellwachstum sowohl der Ciliaten als auch der Bakterien während des eigentlichen Versuches zu verhindern.

Für die Fressexperimente wurden 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml künstlichem Kläranlagenmedium bestückt (Zusammensetzung siehe Punkt 4.4). Die Kultivierung erfolgte bei allen Temperaturen in einem Schüttelwasserbad mit externer Temperierung und 44 tangentialen Schüttelbewegungen pro Minute. Diese Schüttelbewegungen dienten zum einen der Sauerstoffzufuhr in das Medium, zum anderen wurden so die Fließbewegungen innerhalb einer Kläranlage simuliert.

Es wurde über einen Zeitraum von 8 Stunden alle zwei Stunden eine Probe mit einem Gesamtvolumen von 600 µl gezogen. Der Zählung der Ciliaten erfolgte mit dem Z1 Coulter counter (Beckman Coulter). Die Bestimmung des Bakterientiters erfolgte durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen und Volumina auf Agarplatten. Hierbei wurden *E. coli* K12 und *B. subtilis* 23 auf LB-Agar, *P. putida* DSM 540 auf Standard 1-Agar und der Bakterienmix aller drei Spezies auf einem eigens entworfenen Identifikationsagar ausgestrichen.

Der Identifikationsagar setzt sich wie folgt zusammen:

Identifikationsagar:

| | |
|-------------|-----------------|
| 5 g/l | Caseinpepton |
| 5 g/l | Universalpepton |
| 10 g/l | Lactose |
| 10 g/l | Stärke |
| 20 mg/l | Bromthymolblau |
| 15 g/l | Agar |
| in A. dest. | |

Die Platten wurden über Nacht inkubiert, wobei die Inkubationstemperatur der LB-Platten 37°C und die Inkubationstemperatur der Standard 1-Platten und der Identifikationsplatten 30°C betrug. Die Platten wurden am Folgetag ausgezählt, wobei in die Auswertung der Fresskurven Platten mit einem Bewuchs zwischen 10 und 500 Kolonien mit einbezogen wurden.

Außerdem wurden zusätzlich ein Nullwert aller 3 Bakterienspezies und des Bakteriengemisches bestimmt, indem die Bakterien jeweils ohne Zugabe von Ciliaten unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen kultiviert und die Bakterienkonzentration bestimmt wurde.

Außer den Nullwerten wurden alle Experimente im Doppelansatz durchgeführt. Alle durchgeführten Experimente sind noch einmal in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Übersicht über die in Projektphase 3 durchgeführten Einzelversuche (Dauer jedes einzelnen Versuches: 8 Stunden).

| | E. coli | B. subtilis | P. putida | Bakterienmix |
|-------------|---|---|---|---|
| 10°C | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten |
| 15°C | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten |
| 20°C | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten |
| 25°C | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten |
| 30°C | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten | 2 x C. campylum 2 x T. pyriformis wt 1 x Ohne Ciliaten |

Da bei der Menge der aufgenommenen Daten die Darstellung einzelner Fresskurven zuviel Platz in Anspruch nehmen würde, wurde für jede der aufgenommenen Ko-Kultivierungen von Ciliatenspezies und Bakterienspezies bzw. –gemisch die Fressrate errechnet.

Diese wurde wie folgt berechnet: Bei den Ciliaten handelt es sich um Filtrierer, d.h. dass jeder Ciliat in einer bestimmten Zeiteinheit ein bestimmtes Volumen des umgebenden Mediums filtriert und dabei Partikel (bspw. suspendierte Bakterien) aus diesem Medium herausfiltert. Dementsprechend ist die Abnahme des Bakterientiters unter diesen Umständen von der aktuellen Bakterienkonzentration abhängig – bei hohen Bakterienkonzentrationen kann eine größere Anzahl Bakterien von einem einzelnen Ciliaten eingestrudelt werden als bei niedrigen Bakterienkonzentrationen. Jeder Ciliat verringert daher in einer festen Zeiteinheit die Bakterienkonzentration um einen festen Prozentsatz.

Diese Abnahme ist im Idealfall annähernd exponentiell und lässt sich durch eine Korrelationskurve beschreiben. Ein Beispiel für eine solche Korrelationskurve ist in Abb. 31 dargestellt.

Titer von *P. putida* bei 25°C

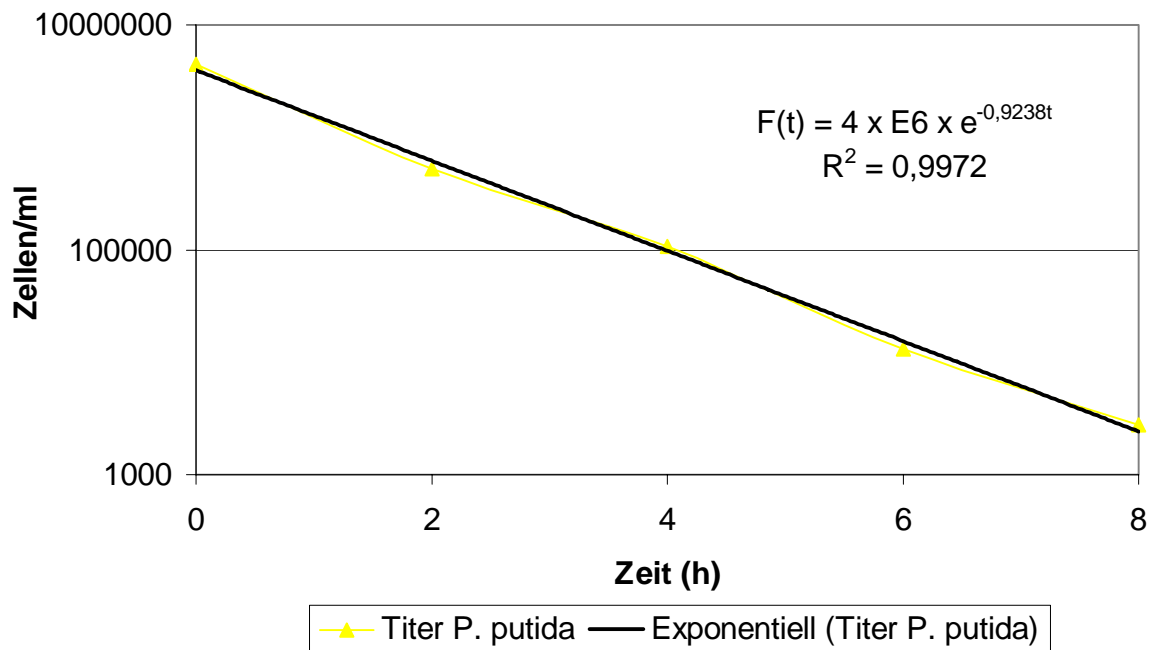


Abb. 31: Bakterienkonzentration von *P. putida* DSM 548 in Ko-Kultur mit *C. campyllum*. Die Gleichung und das Bestimmtheitsmaß der Korrelationskurve sind im Diagramm dargestellt.

Die Kurvengleichung der Korrelationsgerade hat die Form:

$$f(t) = f(0) * e^{-k * t}$$

| | |
|-------|--------------------------------|
| t: | Zeit |
| f(0): | Bakterientiter zum Zeitpunkt 0 |
| f(t): | Bakterientiter zum Zeitpunkt t |
| k: | Konstante |

Zur Bestimmung der Fressrate ist nun nicht die absolute, sondern nur die relative Abnahme des Bakterientiters entscheidend. Diese wird nur durch folgenden Faktor ausgedrückt:

$$e^{-k * t}$$

Bei einer Betrachtung der relativen Abnahme pro Stunde wird der Faktor $t = 1$ gesetzt. Umgerechnet in Prozent ergibt sich dann die folgende Formel:

$$\text{Fressrate in Prozent} = e^{-k} * 100\%$$

In diese Rechnung werden jedoch alle im Versuchsansatz vorhandenen Ciliaten miteinbezogen. Um die Fressrate pro Ciliat zu erhalten, muss daher durch die Anzahl Ciliaten geteilt werden. Die so errechneten Zahlenwerte sind jedoch sehr gering und daher wenig anschaulich. Sie wurden daher mit dem Faktor 10.000 multipliziert, um so die „Fressrate pro Stunde in Prozent der Bakterienkonzentration für 10.000 Ciliaten/ml“ zu erhalten (im folgenden F10.000 genannt).

$$F10.000 = 100 \% * \frac{e^{-k}}{\text{Ciliatenkonzentration}} * 10.000$$

5.1 Bakterientiter ohne die Zugabe von Ciliaten

In Abb. 32, 33 und 34 sind die Bakterientiter der drei Spezies *E. coli* K12, *B. subtilis* 23 und *P. putida* DSM 548 ohne die Zugabe von Ciliaten über einen Zeitraum von jeweils 8 Stunden dargestellt. Gemessen wurden die Bakterientiter bei den 5 Temperaturen 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

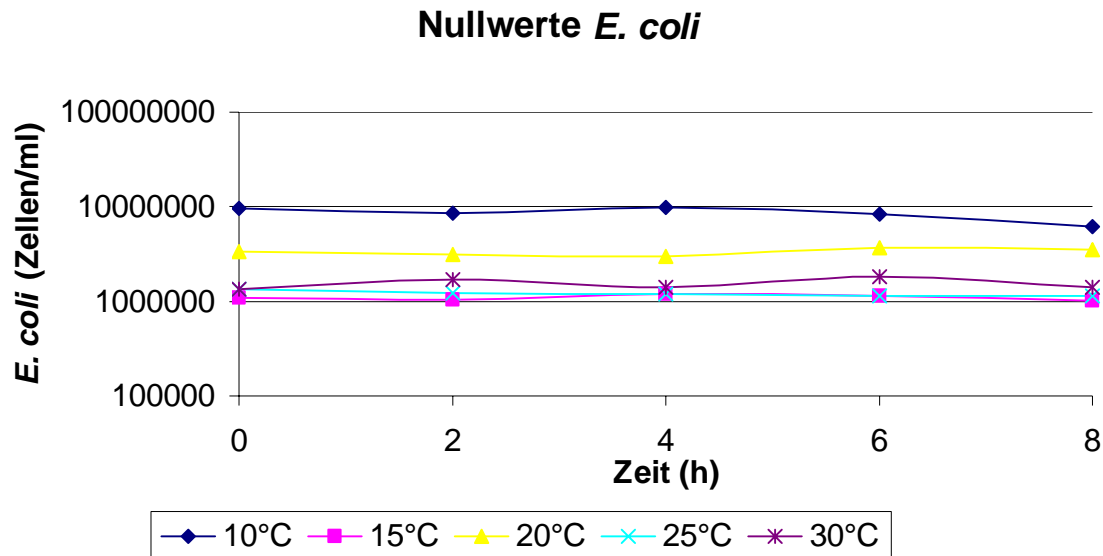


Abb. 32: Bakterientiter von *E. coli* K12 in Abwesenheit von Ciliaten bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

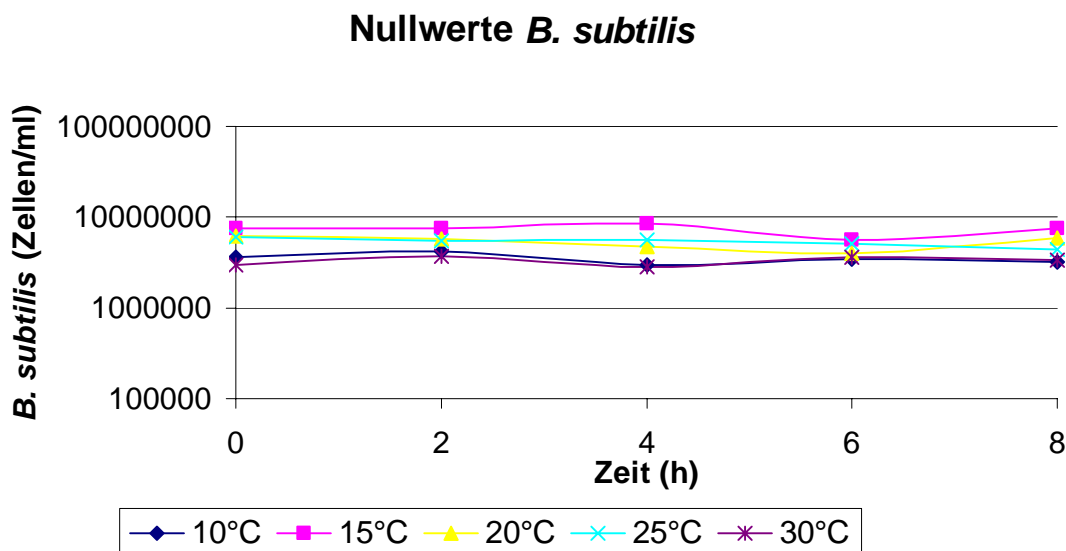


Abb. 33: Bakterientiter von *B. subtilis* 23 in Abwesenheit von Ciliaten bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

Nullwerte *P. putida*

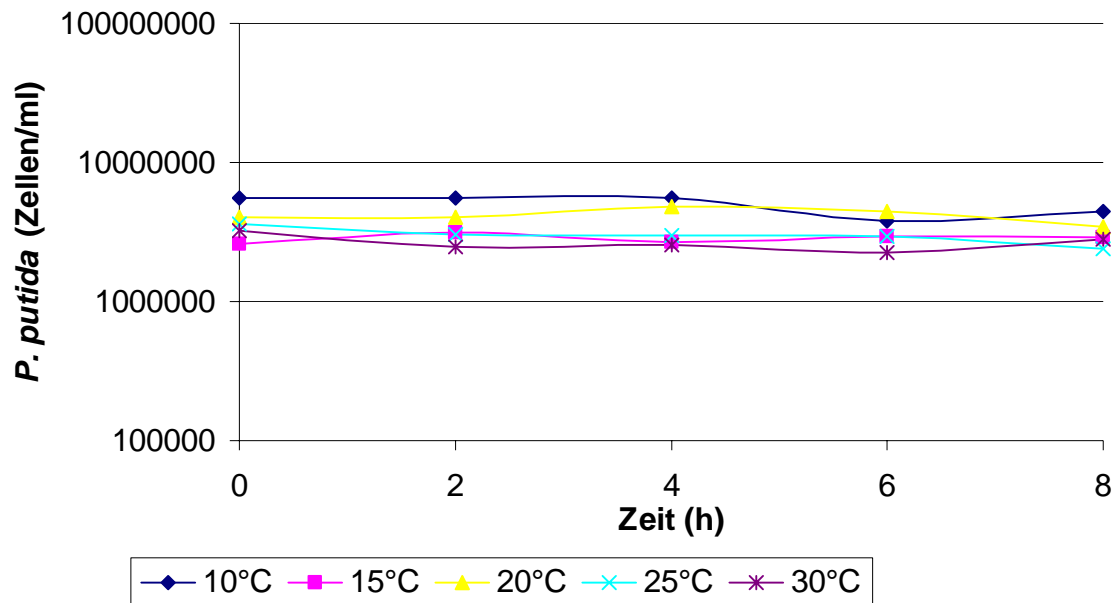


Abb. 34: Bakterientiter von *P. putida* DSM 548 in Abwesenheit von Ciliaten bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

Die Werte der Bakterientiter in Abwesenheit von Ciliaten weisen bei allen 3 untersuchten Spezies und bei allen 5 betrachteten Temperaturen keine größeren Schwankungen auf. Die Abnahmen der Bakterientiter bei Koinkubation mit einer Ciliatenspezies sind also auf das Fressverhalten derselben zurückzuführen.

5.2 Titer der Ciliatenspezies *T. pyriformis* wt und *C. campylum*

In Abb. 35, 36, 37 und 38 sind die Mittelwerte der Ciliatentiter von *C. campylum* in den durchgeführten Fressexperimenten dargestellt.

C. campylum + *E. coli*

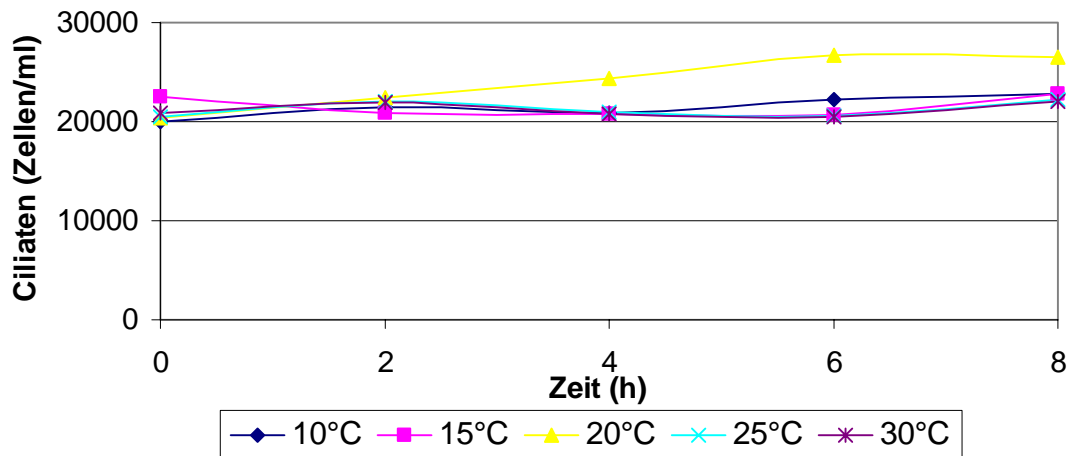


Abb. 35: Mittelwerte der Ciliatentiter von *C. campylum* in den Fressexperimenten mit *E. coli* bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

C. campylum + *B. subtilis*

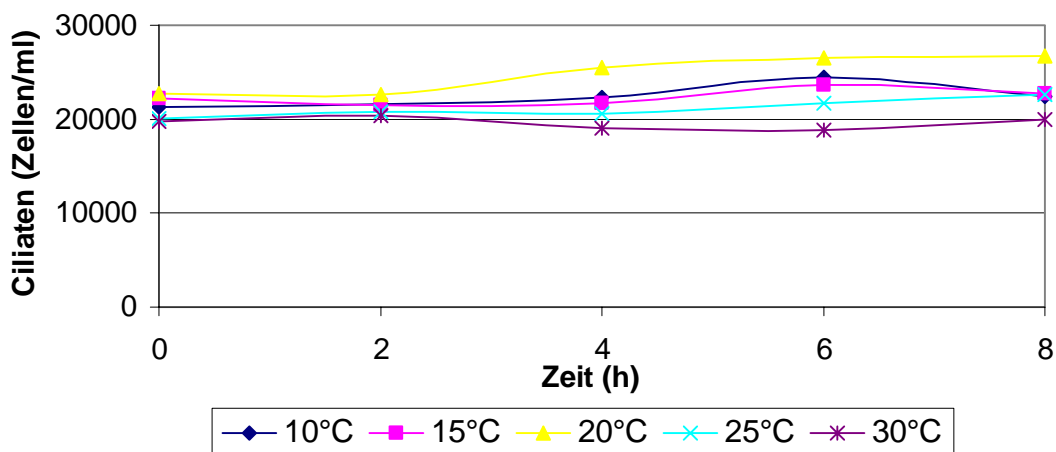


Abb. 36: Mittelwerte der Ciliatentiter von *C. campylum* in den Fressexperimenten mit *B. subtilis* bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

C. campylum + *P. putida*

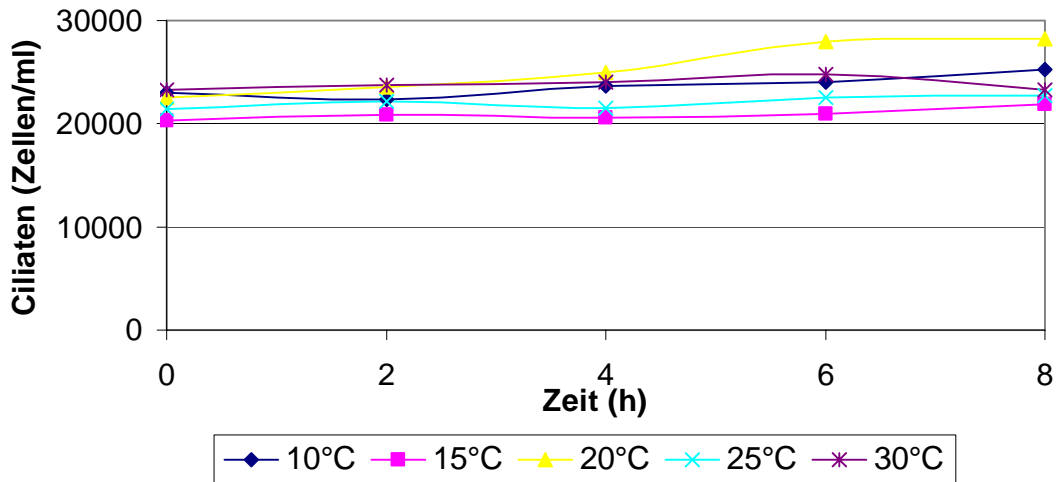


Abb. 37: Mittelwerte der Ciliatentiter von *C. campylum* in den Fressexperimenten mit *P. putida* bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

C. campylum + Bakterienmix

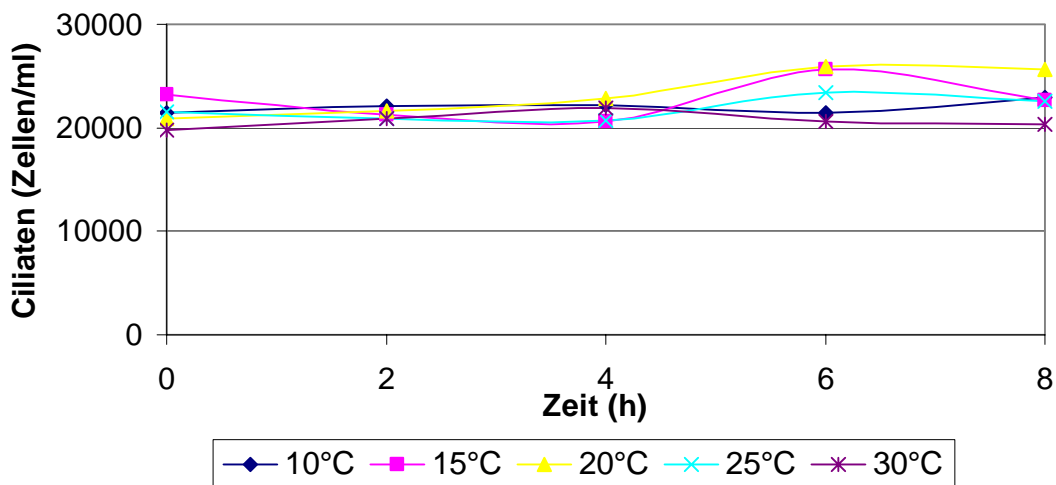


Abb. 38: Mittelwerte der Ciliatentiter von *C. campylum* in den Fressexperimenten mit dem Bakteriengemisch bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

Insgesamt bleibt die Ciliatenkonzentration im Verlauf der Fressexperimente konstant. Nur bei 20°C zeigt sich bei allen Experimenten eine leichte Erhöhung der Ciliatenzahl unabhängig vom Futterorganismus. Für die Berechnung der Fressraten wurde dementsprechend der Mittelwert der Ciliatenkonzentration im gesamten Versuchsverlauf zur Berechnung herangezogen.

Die Mittelwerte der gemessenen Ciliatentiter von *T. pyriformis* wt in den durchgeführten Fressexperimenten sind in Abb. 39, 40, 41 und 42 dargestellt.

T. pyriformis wt + *E. coli*

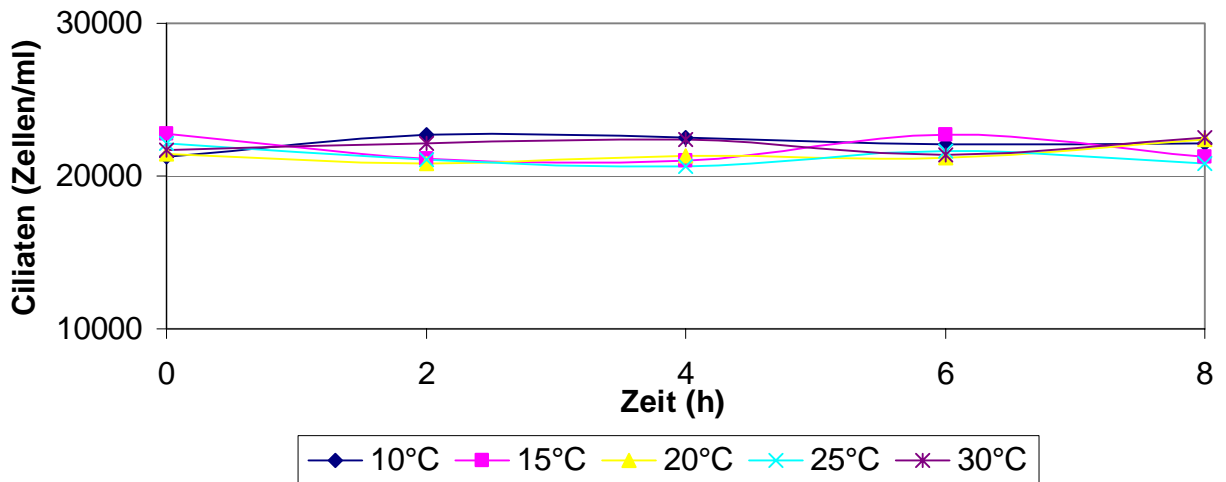


Abb. 39: Mittelwerte der Ciliatentiter von *T. pyriformis* wt in den Fressexperimenten mit *E. coli* bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

T. pyriformis wt + *B. subtilis*

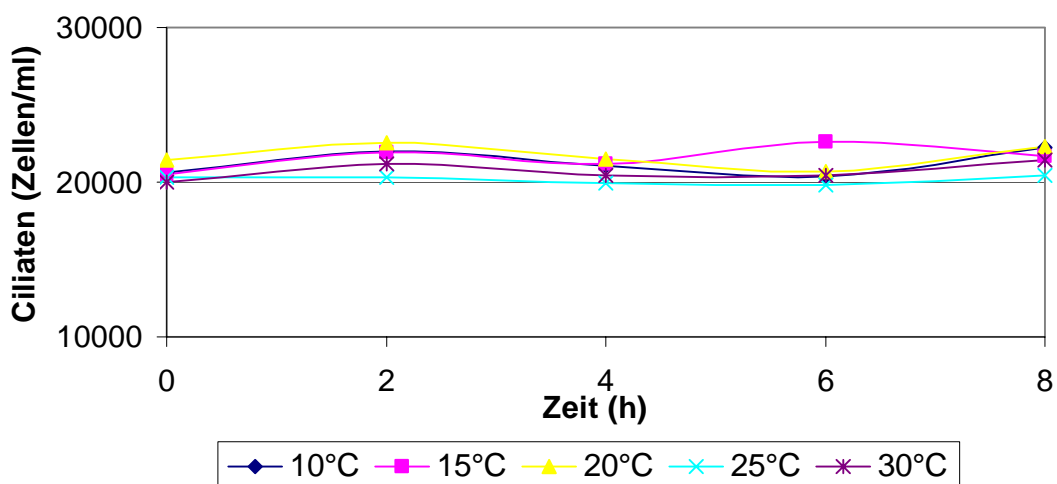


Abb.

Abb. 40: Mittelwerte der Ciliatentiter von *T. pyriformis* wt in den Fressexperimenten mit *B. subtilis* bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

T. pyriformis wt + *P. putida*

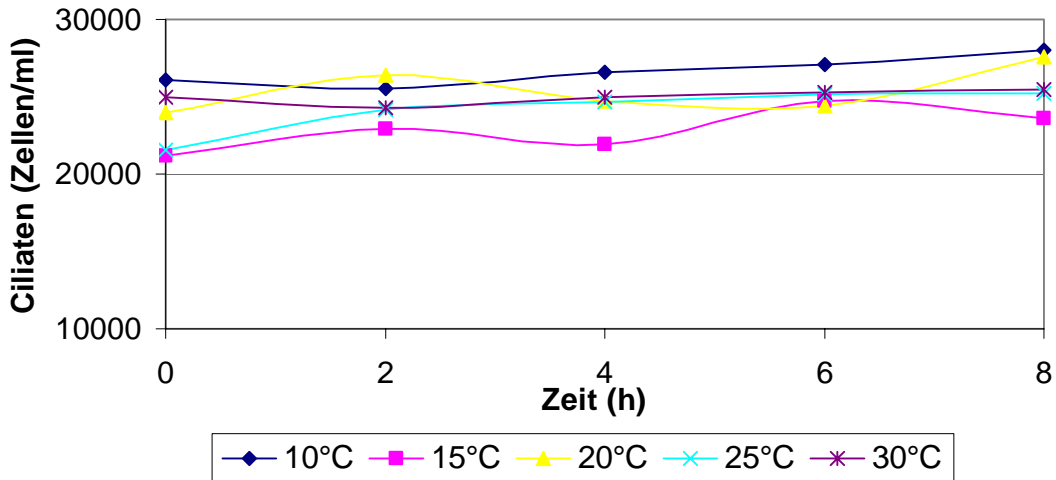


Abb.

Abb. 41: Mittelwerte der Ciliatentiter von *T. pyriformis* wt in den Fressexperimenten mit *P. putida* bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

T. pyriformis wt + Bakterienmix

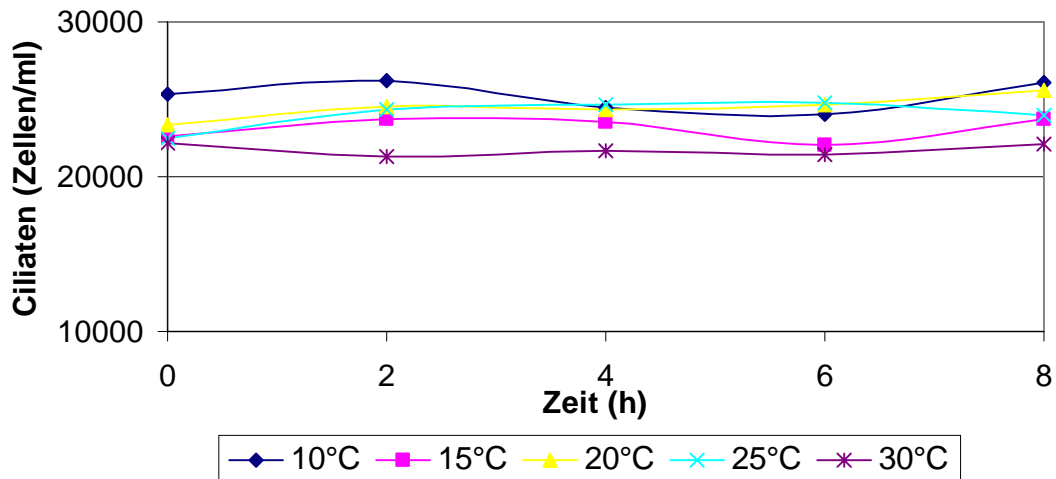


Abb. 42: Mittelwerte der Ciliatentiter von *T. pyriformis* wt in den Fressexperimenten mit dem Bakteriengemisch bei 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C.

Die Ciliatentiter bleiben bei *T. pyriformis* wt über alle Temperaturen und bei allen Futterorganismen bzw. dem Bakteriengemisch annähernd konstant. Daher konnte auch bei dieser Ciliatenspezies problemlos der Mittelwert der Ciliatenkonzentration im achtstündigen Versuchsverlauf zur Berechnung der Fressrate herangezogen werden.

5.3 Fressraten der Ciliaten in Abhängigkeit von Futter und Temperatur

In Abb. 43 sind die Fressraten von *T. pyriformis* wt und *C. campylum* für den Futterorganismus *E. coli* K12 dargestellt.

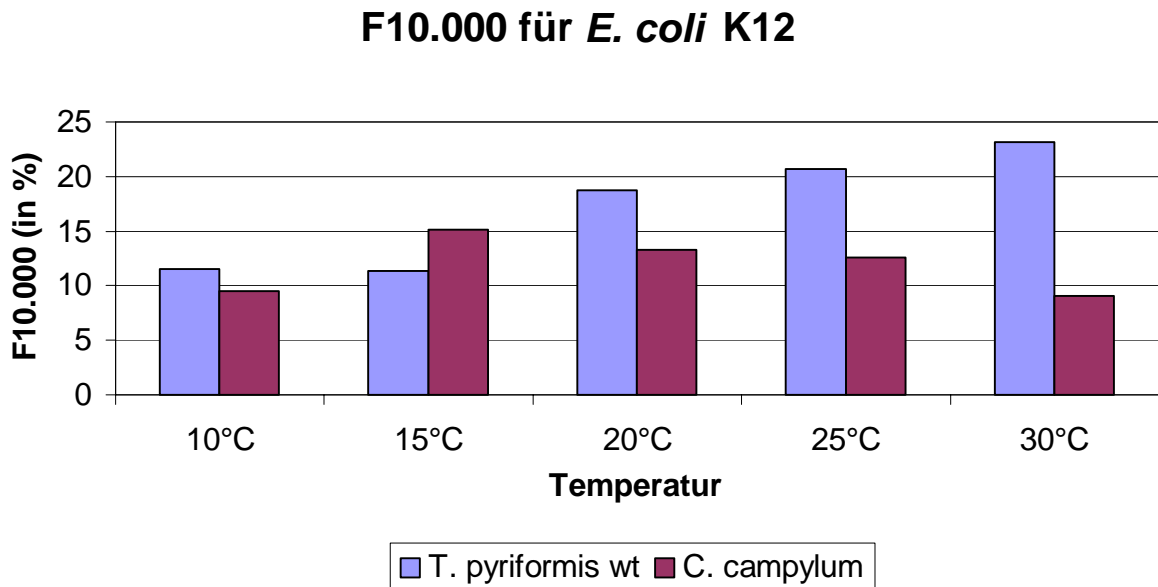


Abb. 43: Fressraten von *T. pyriformis* wt und *C. campylum* für den Futterorganismus *E. coli* K12 bei den Temperaturen 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C. Der Animpftiter lag zwischen 0,9 und 9,6 x 10⁶ Zellen/ml.

Bei *T. pyriformis* wt zeigt sich bei den Fressraten bezüglich *E. coli* K12 ein deutlicher Anstieg der Fressrate mit steigenden Temperaturen. Die F10.000 (Fressrate in % Bakterientiter pro Stunde und pro 10.000 Ciliaten) steigt von 11 auf über 22 % an. Hingegen zeigt sich bei *C. campylum* ein Maximum der Fressrate bei 15°C (F10.000: 15 %), die mit steigender oder sinkender Temperatur wieder absinkt (Minimum bei 30°C, F10.000 bei 9 %).

Insgesamt zeigt sich für das Bakterium *E. coli* K12 eine höhere Fressleistung für den Ciliaten *T. pyriformis* – allerdings hat bei 15°C, der ungefähren Durchschnittstemperatur deutscher Kläranlagen, *C. campylum* eine etwas bessere Fressrate.

Die Fressraten in Bezug auf den Futterorganismus *B. subtilis* 23 sind in Abb. 44 dargestellt.

F10.000 für *B. subtilis* 23

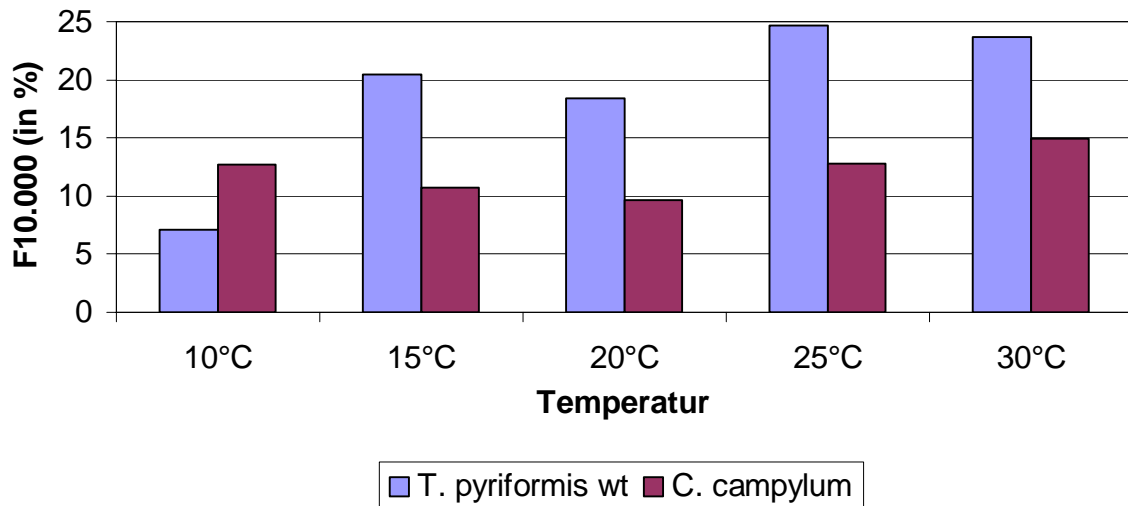


Abb. 44: Fressraten von *T. pyriformis* wt und *C. campyllum* für den Futterorganismus *B. subtilis* 23 bei den Temperaturen 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C. Der Animpftiter lag zwischen $1,7$ und $9,5 \times 10^6$ Zellen/ml.

T. pyriformis wt zeigt von 15°C bis 30°C eine sehr hohe F10.000 von ungefähr 20 %, nur bei 10°C ist die F10.000 mit 7 % wesentlich niedriger. Dagegen zeigt sich bei *C. campyllum* eine vergleichsweise konstante F10.000 von 10 bis 15 % bei allen 5 untersuchten Temperaturen. Hierbei ist die Fressrate bei 20°C am geringsten, während sie bei höheren oder niedrigeren Temperaturen wieder ansteigt.

Insgesamt sind die Fressraten bei dem Bakterium *B. subtilis* 23 bei *T. pyriformis* wt deutlich höher als bei *C. campyllum*. Nur bei 10°C, der kleinsten untersuchten Temperatur, weist *C. campyllum* eine höhere Klärungsrate auf.

Die Fressraten des Prokaryonten *P. putida* DSM 548 für die beiden untersuchten Ciliaten sind in Abb. 45 dargestellt.

F10.000 für *P. putida* DSM 548

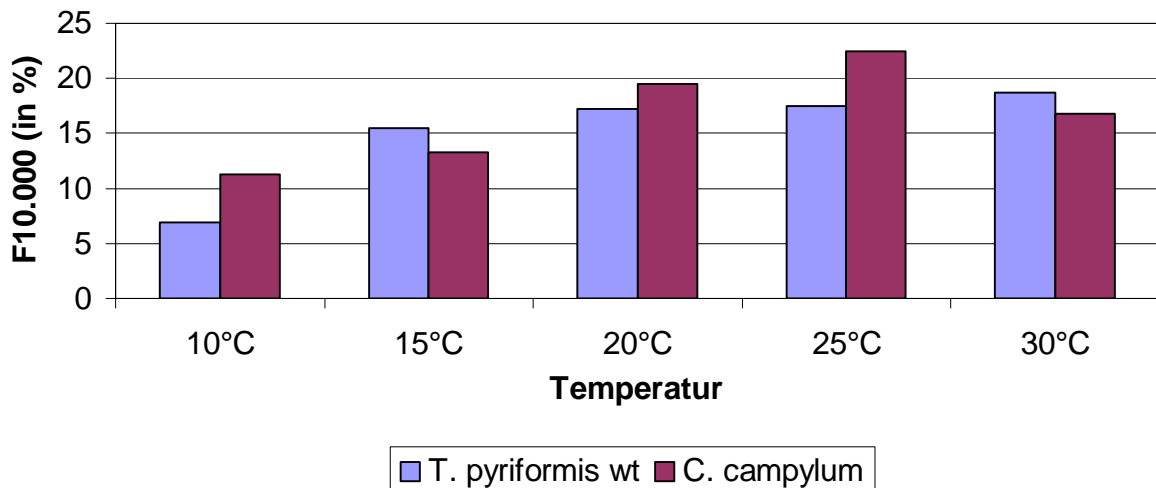


Abb. 45: Fressraten von *T. pyriformis* wt und *C. campylum* für den Futterorganismus *P. putida* DSM 548 bei den Temperaturen 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C. Der Animpftiter lag zwischen $3,1$ und $7,5 \times 10^6$ Zellen/ml.

T. pyriformis wt zeigt für das Bakterium *P. putida* DSM 548 ein ähnliches Bild des Fressverhaltens wie für *B. subtilis* 23. Während die Fressrate bei 15° bis 30°C annähernd konstant bleibt (allerdings nur bei einer F10.000 von gut 15 %, bei *B. subtilis* F10.000 von um die 20 %), ist die F10.000 bei 10°C mit 7 % deutlich geringer. Bei *C. campylum* hingegen steigt die F10.000 mit ebenfalls steigender Temperatur von 11 % auf 22 %, um dann bei 30°C wieder etwas geringer zu werden. Insgesamt zeigt sich bei dieser Temperatur ein uneinheitliches Bild – während *T. pyriformis* bei 15°C und bei 30°C eine höhere F10.000 aufweist, zeigt *C. campylum* bei den anderen untersuchten Temperaturen eine bessere Fressleistung. Die Fressraten liegen jedoch über alle Temperaturen recht eng aneinander, so dass für eine definitive Aussage eine größere Anzahl an Fressexperimenten benötigt wird.

Alle drei Futterorganismen werden von beiden Ciliatenspezies bei allen betrachteten Temperaturen gefressen, wobei die F10.000 zwischen 7 und 25 % liegen. Dies bedeutet eine erhebliche Reduktion der Bakterienzahl, wobei die tatsächliche Reduktion von der Länge der gemeinsamen Kultivierung von Bakterien und Ciliaten abhängt. Während bei den kälteren Temperaturen von 10° und teilweise 15°C

C. campylum bessere Fressergebnisse zeigt, sind bei höheren Temperaturen zumeist die Fressleistungen von *T. pyriformis* als besser zu bewerten. Insgesamt scheinen die Fressergebnisse bei *C. campylum* weniger temperaturabhängig zu sein als bei *T. pyriformis* wt (Ausnahme: *P. putida* DSM 548).

Zusätzlich zu den Inkubationen mit nur einer einzigen Bakterienspezies wurden beide Ciliaten auch mit einem Gemisch aller drei Bakterienspezies inkubiert. Die Fressraten von *T. pyriformis* wt für dem Bakterienmix sind in Abb. 46 dargestellt.

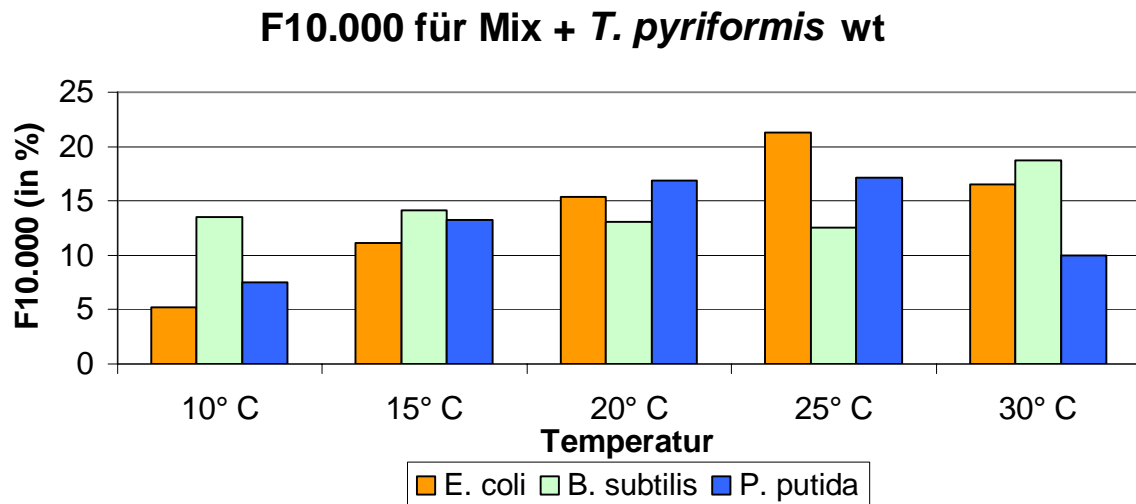


Abb. 46: Fressraten von *T. pyriformis* wt in Bezug auf das Bakteriengemisch bei den Temperaturen 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C. Der Animpftiter lag zwischen $0,3$ und $5,3 \times 10^6$ Zellen/ml.

Auch bei den Fressraten bezüglich des Bakteriengemisches zeigt sich bei *T. pyriformis* wt eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Fressrate von *E. coli* K12, während die Fressraten für die anderen beiden Bakterienspezies weniger Schwankungen bei den verschiedenen Temperaturen zeigen. Die F10.000 für die drei Spezies fallen insgesamt bei 10°C deutlich geringer aus als bei den anderen untersuchten Temperaturen, allerdings lässt sich dieser Trend für *B. subtilis* 23 nicht bestätigen.

Über alle Temperaturen hinweg lässt sich jedoch keine Präferenz für eine bestimmte Bakterienspezies entdecken. Während bei 10°C *B. subtilis* 23 die höchste F10.000 aufweist, zeigt sich bei 25°C die höchste Fressrate für *E. coli* K12. Bei den anderen Temperaturen – 15°, 20° und 30°C – liegen die Fressraten für die Bakterienspezies in einer ähnlichen Größenordnung.

Insgesamt schwanken die F10.000 zwischen 5 und 21 %.

In Abb. 47 sind die Fressraten von *C. campyllum* in Ko-Kultur mit den drei Bakterienspezies dargestellt. Die Fressraten für *E. coli* K12 bei 25° und 30°C konnten leider aufgrund von Problemen bei den Plattentests nicht bestimmt werden.

F10.000 für Mix + *C. campyllum*

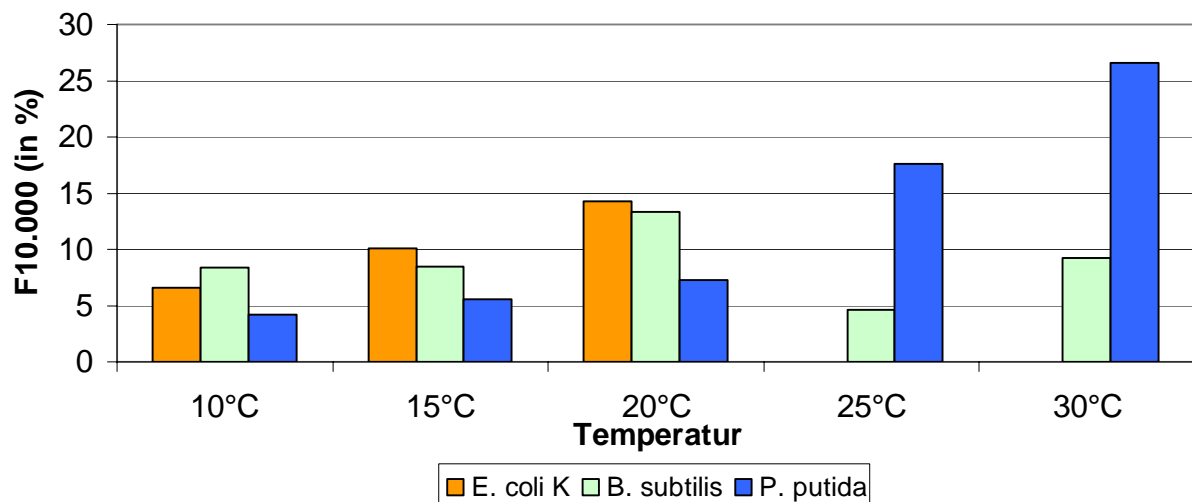


Abb. 47: Fressraten von *C. campyllum* in Bezug auf das Bakteriengemisch bei den Temperaturen 10°, 15°, 20°, 25° und 30°C. Der Animpftiter lag zwischen 0,3 und 5,4 x 10⁶ Zellen/ml.

Anders als bei den zuvor gemessenen Fressraten in Ko-Kultur mit nur einer Bakterienspezies zeigt sich bei den F10.000 von *C. campyllum* bei gemeinsamer Inkubation mit allen drei Bakterienspezies eine Temperaturabhängigkeit. Bei geringeren Temperaturen weisen auch die Fressraten insgesamt einen niedrigeren Wert auf. Besonders stark ist dieser Trend bei den F10.000 für *P. putida* DSM 540 zu beobachten, allerdings wurde für dieses Bakterium auch schon eine Temperaturabhängigkeit der Fressrate in der Einzelinkubation gezeigt. Die F10.000 steigen hier von 4 auf 27 %. Auch bei *E. coli* K12 lässt sich für die drei auswertbaren Temperaturen eine Abhängigkeit der Fressrate von denselben zeigen. Die F10.000 steigen hier von 7 auf 14 %. Diese Temperaturabhängigkeit war bei der Einzelinkubation nicht zu beobachten.

Bei *B. subtilis* 23 ergibt sich im Gegensatz zu den anderen beiden Spezies kein einheitliches Bild der Temperaturabhängigkeit der Fressraten. Die maximale F10.000 wurde bei 20°C mit 13 % gemessen, die minimale Fressrate bei 25°C mit nur 5 %. Insgesamt zeigt sich nur bei den hohen Temperaturen von 25° und 30°C eine Beutepreferenz von *C. campyllum*. Bei diesen Temperaturen scheinen kleinere und

unbeweglichere Bakterien (bspw. *P. putida* DSM 548) gegenüber größer und schnelleren Bakterien (bspw. *B. subtilis* 23) bevorzugt gefressen zu werden.

Insgesamt werden jedoch alle drei Bakterienspezies bei allen Temperaturen auch von *C. campylum* reduziert, die F10.000 liegen hier zwischen 4 und 27 %.

Im Vergleich der Fressraten von *T. pyriformis* wt und *C. campylum* bezüglich des Bakteriengemisches zeigt *T. pyriformis* wt jedoch über alle Temperaturen und alle Bakterienspezies bessere Fressraten. Nur für die F10.000 bei *E. coli* K12 bei 10°C und für die F10.000 bei *P. putida* DSM 548 bei 25° und 30°C zeigt *C. campylum* eine bessere Performance.

Zusammenfassend lässt sich bemerken, dass insgesamt *T. pyriformis* wt ein insgesamt besseres Ergebnis bei den Fressraten aufweist. In der Einzelinkubation mit den Bakterienspezies zeigt bei einer Temperatur von 10°C *C. campylum* jedoch ein besseres Ergebnis. Dieser Vorteil bei niedrigen Temperaturen konnte jedoch im Fressexperiment mit einem Bakteriengemisch nicht bestätigt werden.

Für einen eventuellen Einsatz in einer Kläranlage empfiehlt sich also der Einsatz von *T. pyriformis*. Allerdings könnte bei niedrigen Temperaturen auch über einen gemeinsamen Einsatz der beiden Ciliaten nachgedacht werden.

6. Projektphase 4: Up-scaling der Fressexperimente auf einen Maßstab von 25 Litern

In dieser Phase des Projektes sollte getestet werden, ob die Ergebnisse der Fressexperimente in Projektphase 3 auch auf einen größeren Maßstab übertragbar sind. Die Erhöhung des Kulturvolumens auf 25 Liter erfolgte in Fermentern mit einem Nennvolumen von 30 Litern.

Aufgrund des großen materiellen und zeitlichen Aufwandes dieser Versuche konnten sie nicht für das gesamte Temperaturspektrum der Kläranlagen durchgeführt werden. Da sich die durchschnittliche Temperatur des Kläranlagenablaufs im Jahresverlauf auf etwa 15°C beläuft, wurde diese Temperatur für die Co-Kultivierung festgelegt.

Als Futterbakterium wurde *Escherichia coli* K12 ausgewählt, als Vertreter der Coliformen, der am häufigsten auftretenden suspendierten Bakterien in der Nachklärung.

6.1 Co-Fermentation für 8 Stunden

In Phase drei wurden die Versuche in einem Maßstab von 0,1 Liter durchgeführt. Um die Fressraten von *T. pyriformis* wt und *C. campylum* in einem größeren Maßstab zu untersuchen wurden 2 Fermentationen über einen Zeitraum von 8 Stunden in einem 30 Liter-Fermenter der Firma Braun durchgeführt. Hierzu wurde der Fermenter mit 25 Litern 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) befüllt und für 30 Minuten bei 120°C sterilisiert. Während der Sterilisationszeit wurde der partielle Sauerstoffgehalt auf 0% eingestellt. Die Kalibrierung der Sauerstoffsättigung auf 100 % erfolgte bei 15 °C, einer Rührerdrehzahl von 300 rpm und einer Begasung von 30 L/min. Die Kalibrierung der pH-Elektrode erfolgte im Vorfeld der Fermentation in Kalibrierflüssigkeiten mit einem definierten pH-Wert von 4 bzw. 7.

Nach dem Erreichen der Kultivierungstemperatur von 15°C wurden die sterilen Zusätze für das Fressmedium zugefügt. Im Anschluss wurde der Fermenter mit etwa 10.000 Zellen/mL Ciliaten und $5 \cdot 10^6$ *E. coli*-Zellen/mL angeimpft. Beide Organismen wurden über Nacht in Schüttelkulturen auf 10 mM Tris-HCl gehungert.

Die Fermentation erfolgte bei einer Drehzahl des Scheibenrührers von 100 rpm und einer Begasung von 10 L pro Minute. Während des Fermentationsprozesses wurden der pH-Wert, die relative Sauerstoffsättigung, die Rührerdrehzahl, die Begasung und

die Temperatur automatisch aufgezeichnet und alle 30 Minuten ein Mittelwert angegeben.

Die Bestimmung der Zelltitel von Ciliaten und Bakterien erfolgte stündlich. Etwa 25 mL der Kultur wurden nach vorhergehender Sterilisation des Probenahmeventils entnommen. Die Zelldichte der Bakterien wurde über die Methode der Lebendkeimzahlbestimmung ermittelt, der Ciliaten-Zelltitel mit Hilfe des automatischen Zellzählers.

Die Abbildungen 48 und 49 zeigen die mittleren Bakterientiter im Laufe der Zeit, also die Fresskurven. Darüber hinaus sind die Mittelwerte der Ciliatenkonzentrationen gegen die Zeit aufgetragen.

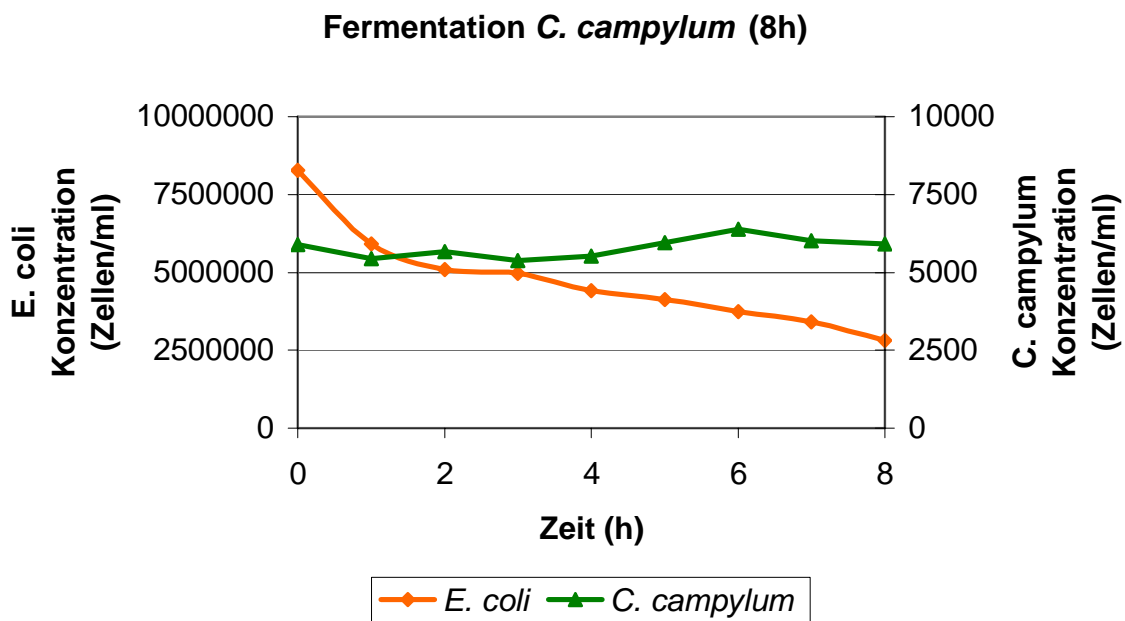


Abb. 48: Co-Fermentation von *C. campylum* und *E. coli* bei 15°C über 8 Stunden: Dargestellt sind die Mittelwerte der Zelltitel der zwei durchgeführten Fermentationen

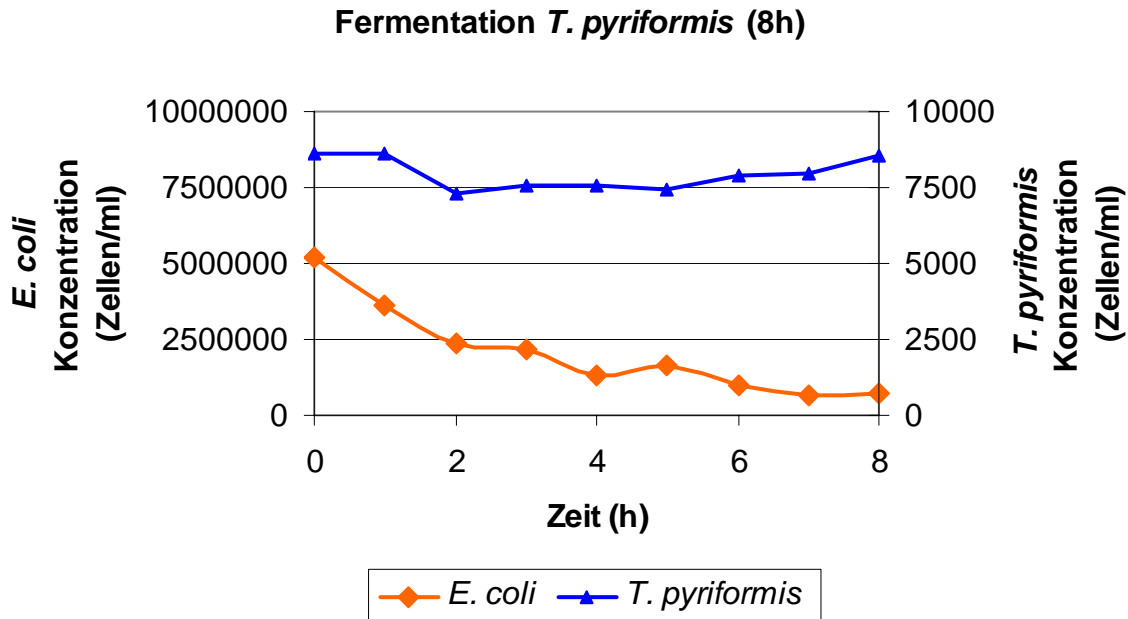


Abb. 49: Co-Fermentation von *T. pyriformis* und *E. coli* bei 15°C über 8 Stunden: Dargestellt sind die Mittelwerte der Zelltiters der zwei durchgeführten Fermentationen

Zur Ermittlung der Fressraten wurden exponentielle Korrelationskurven an die Graphen der mittleren Bakterienkonzentrationen angelegt. Die Funktionsgleichungen und die daraus berechneten Fressraten für die Elimination von Bakterien durch 10.000 Ciliaten /mL pro Stunde sind in Tabelle 4 dargestellt

Tab. 4: Fressraten bei der Batch-Fermentation für 8 Stunden.

| Organismus | Kurvengleichung | Fressrate $F_{10.000}$ |
|----------------------|----------------------------------|------------------------|
| <i>C. campyllum</i> | $f(t) = 7 * 10^6 * e^{-0,1126t}$ | $F_{10.000} = 18,36\%$ |
| <i>T. pyriformis</i> | $f(t) = 5 * 10^6 * e^{-0,2478t}$ | $F_{10.000} = 27,65\%$ |

Im Laufe der Fermentationen wurden zusätzlich der pH-Wert, der Sauerstoffpartialdruck, die Rührgeschwindigkeit, der Lufteintrag und die Temperatur aufgenommen. Es treten keine Veränderungen bei den geregelten Parametern Rührerdrehzahl, Temperatur und Belüftung auf. Die Veränderungen von pH-Wert und Sauerstoffsättigung sind in der Abbildung 50 dargestellt.

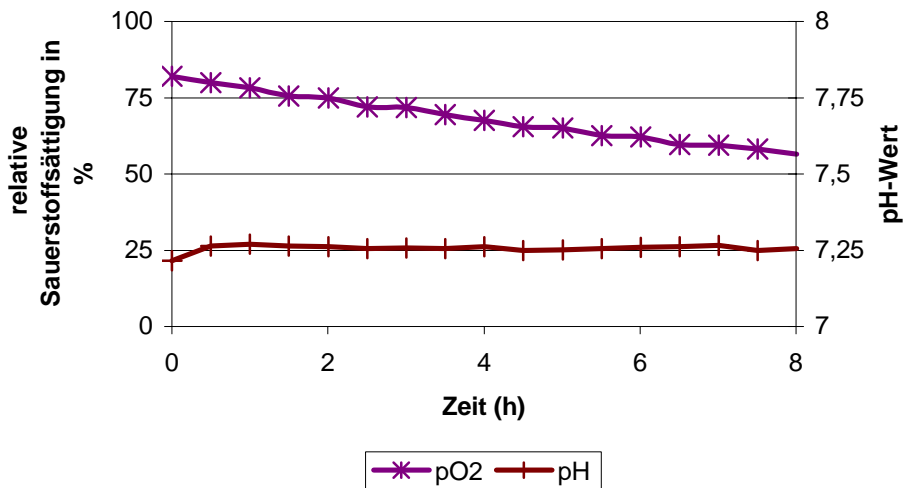


Abb. 50: pH-Wert und partielle Sauerstoffsättigung im Verlauf der Fermentationen für 8 Stunden. Dargestellt sind automatisch aufgezeichneten Daten als Mittelwerte der beiden Co-Fermentationen von *T. pyriformis* und *E. coli*.

Die Abnahme der partiellen Sauerstoffsättigung könnte bei einer längeren Fermentation problematisch werden, da es sich bei den eingesetzten Ciliatenstämmen *T. pyriformis* und *C. campylum* um obligat aerobe Organismen handelt. Das Absinken der Sauerstoffsättigung in einen für diese Organismen kritischen Wert könnte zu einem Absterben der Cilaten führen. Eine Ursache für das Absinken trotz Begasung und mechanischem Sauerstoffeintrag wurde nicht deutlich.

6.2 Co-Fermentation für 24 Stunden

Die Untersuchung der Fressrate von *T. pyriformis* und *C. campylum* über einen Zeitraum von 24 Stunden sollte darüber Aufschluss geben, ob die Elimination von Bakterien auch unterhalb der erreichten Bakterienkonzentration nach einer Co-Fermentation von 8 h mit Ciliaten weiter gewährleistet ist und ob eine bestimmte Fressrate auch über einen längeren Zeitraum gehalten wird. Darüber hinaus sollte im Hinblick auf die kontinuierliche Fermentation der Phase 5 (100h) untersucht werden, ob der pH-Wert und die partielle Sauerstoffsättigung im Laufe der Zeit weiter sinken. Die Fermentationen wurde unter den gleichen Bedingungen, wie die Fermentation von 8 Stunden gefahren, abgesehen davon, dass der Scheibenrührer nur während der Probenahme auf 150 rpm gestellt wurde und ansonsten, abgesehen von der Kulturbewegung durch die Airlift-Begasung, keine mechanische Durchmischung stattfand. Dieses entspricht eher dem mechanischen Stress, dem die Ciliaten in einem potentiellen Klärbecken ausgesetzt sind Die Ermittlung der Zelltitel erfolgte alle 6 Stunden. In den Abbildungen 51 und 52 sind die Messwerte als Graph dargestellt. Die Fresskurve ist halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen und es ist eine Korrelationsgerade angelegt worden.

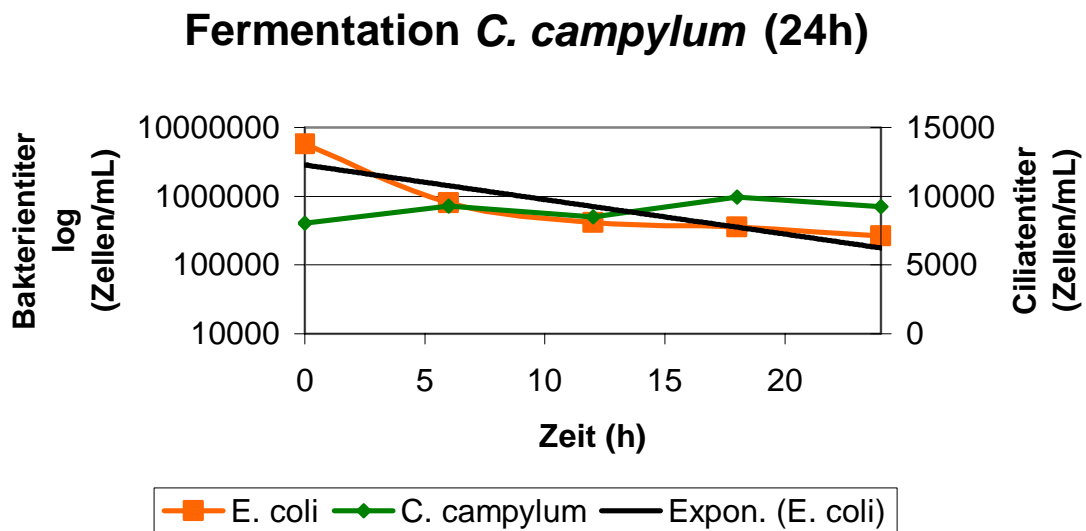


Abb. 51: Manuelle Messungen während der 24 Stunden-Fermentation: dargestellt sind die halblogarithmisch aufgetragene Fresskurve mit Korrelationsgeraden und die Ciliatenkonzentration.

Fermentation *T. pyriformis* (24h)

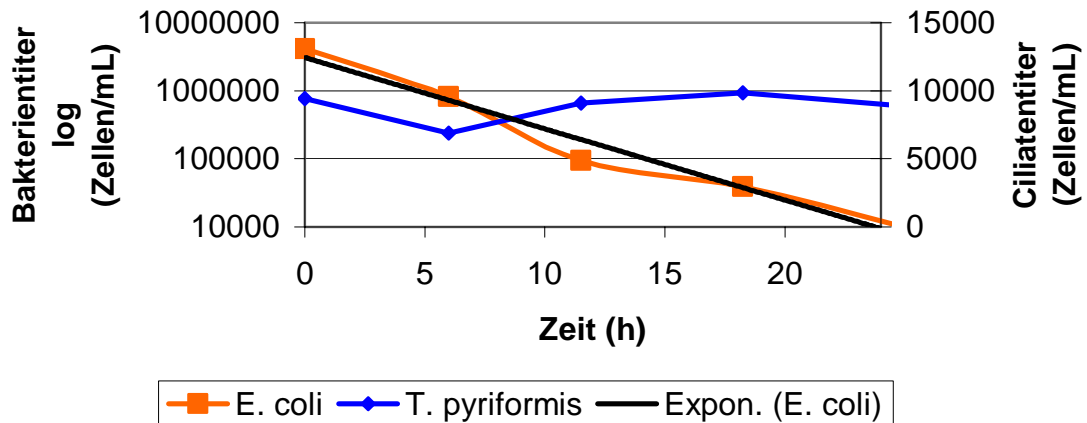


Abb. 52: Manuelle Messungen während der 24 Stunden-Fermentation: dargestellt sind die halblorarithmisch aufgetragene Fresskurve mit Korrelationsgeraden und die Ciliatenkonzentration.

Die mittlere Ciliatenkonzentration lag im Verlauf der Batch-Fermentationen bei *T. pyriformis* bei einem Wert von bei 8.839 Zellen pro Milliliter. Für die Fermentation mit *C. campyllum* ergab sich eine mittlere Ciliatenkonzentration von 8990 Zellen pro Milliliter. Mit Hilfe der ermittelten Funktionen der Korrelationsgeraden und des durchschnittlichen Ciliatentiters lassen sich Fressraten für 10.000 Ciliaten pro Milliliter ermitteln. Sie sind, ebenso wie die Korrelationsfunktionen in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Fressraten bei der Batch-Fermentation für 24 Stunden.

| Organismus | Kurvengleichung | Fressrate $F_{10.000}$ |
|----------------------|--|------------------------|
| <i>C. campyllum</i> | $f(t) = 3 \cdot 10^6 \cdot e^{-0,1158t}$ | $F_{10.000} = 12,16\%$ |
| <i>T. pyriformis</i> | $f(t) = 3 \cdot 10^6 - e^{-0,2412t}$ | $F_{10.000} = 24,25\%$ |

Die Fresskurven sind auch über einen Zeitraum von 24 Stunden logarithmisch. Das bedeutet, dass eine konstante Fressrate über diese Zeitspanne gehalten werden kann und die Ciliaten auch bei sehr geringen Konzentrationen noch Bakterien phagozytieren können.

Die Parameter pH und pO_2 wurden, ebenso wie die Rührerdrehzahl, die Belüftung und die Temperatur, während des Fermentationsprozesses aufgezeichnet. Die Abbildung 53 zeigt die Veränderungen von pH-Wert und relativer Sauerstoffsättigung.

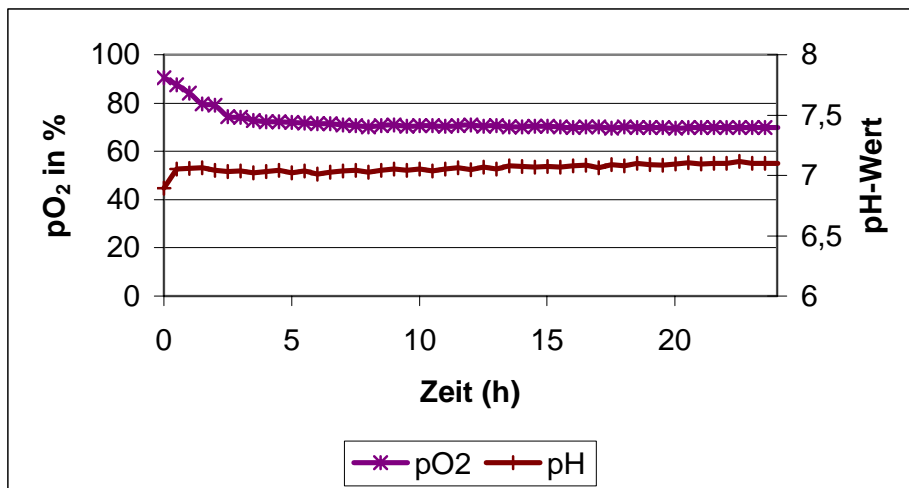


Abb. 53: Fermentationsprozess bei 15°C über 24 Stunden: automatisch aufgezeichnete Daten des pH-Wertes und der Sauerstoffsättigung.

Aus der Abbildung 53 ist zu entnehmen, dass nach einer Abnahme der relativen Sauerstoffsättigung in den ersten 5 Stunden um fast 20%, die Sauerstoffsättigung im folgenden Verlauf der Fermentation lediglich um 1% sinkt. Der pH-Wert steigt innerhalb von 24 Stunden um 0,1.

Die Differenzen zu den Ausgangswerten sind im Vergleich zu der Fermentation für 8 Stunden nicht gestiegen. Eine erhebliche Veränderung von pH-Wert und partieller Sauerstoffsättigung sollte demnach auch bei einer Fermentation über einen Zeitraum von 100 Stunden (Phase 5) nicht zu befürchten sein.

7. Phase 5: kontinuierliche Fermentation in einem Maßstab von 25 Litern

Kontinuierliche Fermentationen sollten zeigen, ob eine Umsetzung der Eliminierung der Bakterien durch *T. pyriformis* wt bzw. *C. campylum* im kontinuierlichen Prozess über einen Zeitraum von 100 Stunden möglich ist.

Die Fermentationen fanden für die beiden Ciliatenspezies *T. pyriformis* wt und *C. campylum* jeweils in 2 Fermentern (Braun) mit einem Nennvolumen von 30 Litern parallel statt. Die Kultivierungsbedingungen waren eine Temperatur von 15°C und eine Belüftung von 10 L/h. Die Scheibenrührer wurden lediglich einige Minuten vor der Probennahme bei 150 rpm in Betrieb genommen, um eine homogene Probe sicher zu stellen. Die Parameter pH, pO₂, Rührer, Temperatur und Belüftung wurden während des gesamten Fermentationsprozesses aufgezeichnet und ein halbstündiger Mittelwert berechnet.

Die kontinuierliche Zufütterung von Bakterien erfolgte über eine am Fermenter angeschlossene Impfnadel, die über einen Schlauch mit einem 20 Liter-Kulturgefäß verbunden war. In diesem Kulturgefäß wurde eine Bakteriensususpension in Tris-HCl mit einem Magnetrührkern (etwa 330 rpm) auf einem Magnetrührer gerührt. Die Durchmischung diente zur Homogenisierung der Bakterienkultur und zum Sauerstoffeintrag. Eine Schlauchpumpe (Gilson, Villiers le bel, Frankreich; Typ Minipuls 2) förderte die gewünschte Menge Bakteriensususpension in den Fermenter. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 54 skizziert.

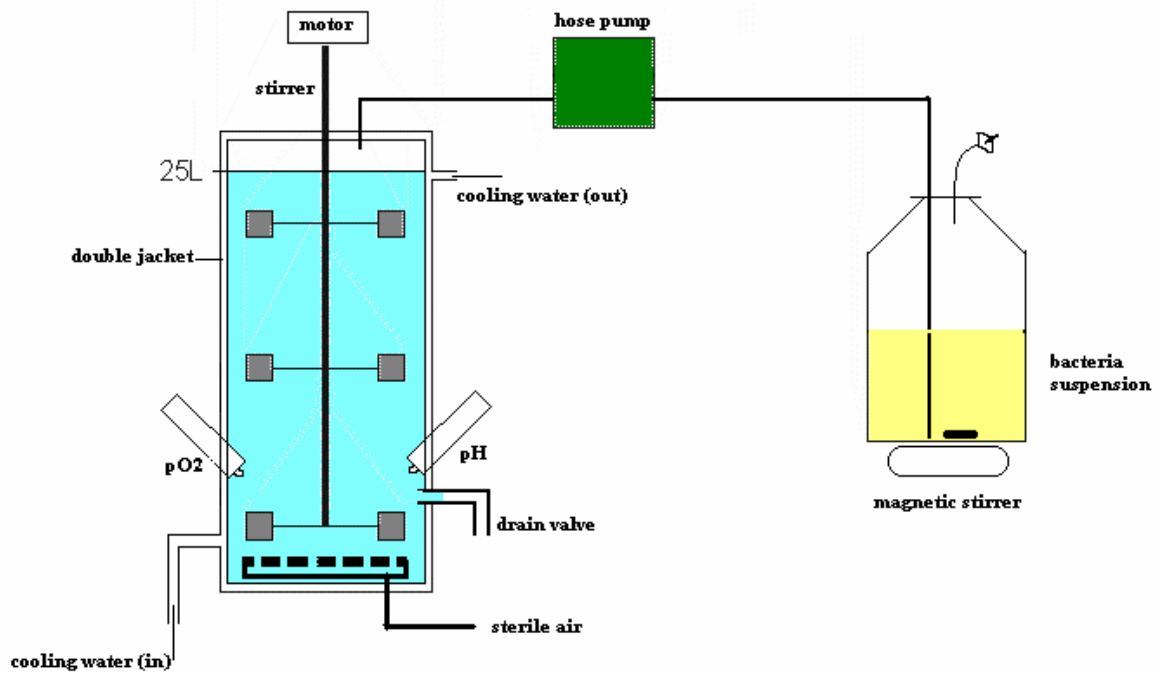


Abb. 54: Schematischer Aufbau der kontinuierlichen Fermentation

Die Fermentationen A₁₀₀ erfolgten in dem Fermenter DL30 und die Fermentationen B₁₀₀ erfolgten in dem Modell UD30. Ziel der Fermentationen war das Erlangen eines konstanten Bakterienzelltiters trotz kontinuierlichem Zufluss einer Bakteriensuspension.

Da der pH-Wert über einen Zeitraum von 24 Stunden relativ konstant geblieben ist, war es nicht nötig bei dem hier beschriebenen Versuch über 100 Stunden eine automatische Regelung des pH-Wertes durch die Zugabe von Säuren und/oder Basen anzuschließen. Auch die Sauerstoffsättigung änderte sich nach dem Erreichen eines bestimmten Wertes nicht mehr. Somit war gewährleistet, dass die Zellen durch die Begasung hinreichend mit Sauerstoff versorgt waren. Die Graphen des pH-Wertes und der Sauerstoffsättigung beider Fermentationen A₁₀₀ und B₁₀₀ sind in den Abbildungen 55 und 56 dargestellt.

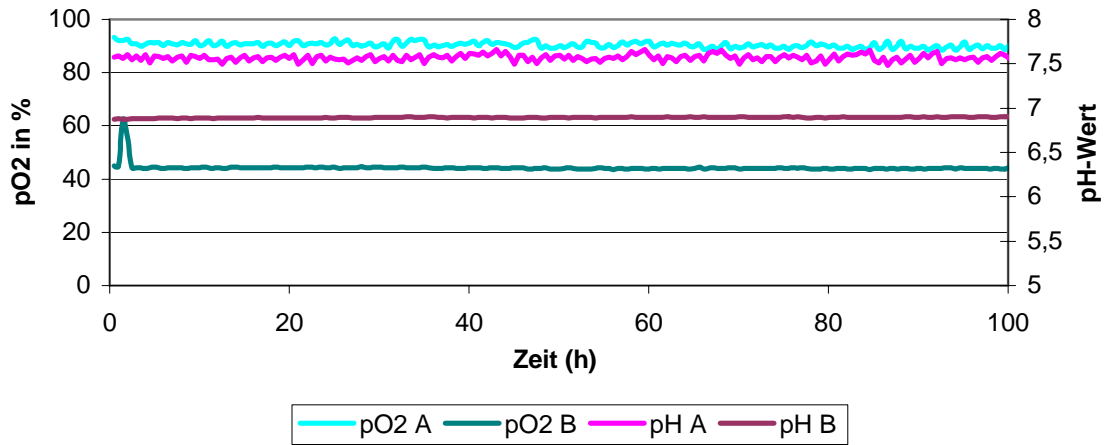


Abb. 55: *T. pyriformis*: Fermentationsprozesse A₁₀₀ und B₁₀₀ bei 15°C über 100 Stunden: automatisch aufgezeichnete Daten des pH-Wertes (pHA bzw. pHB) und der Sauerstoffsättigung (pO₂ A bzw. pO₂ B).

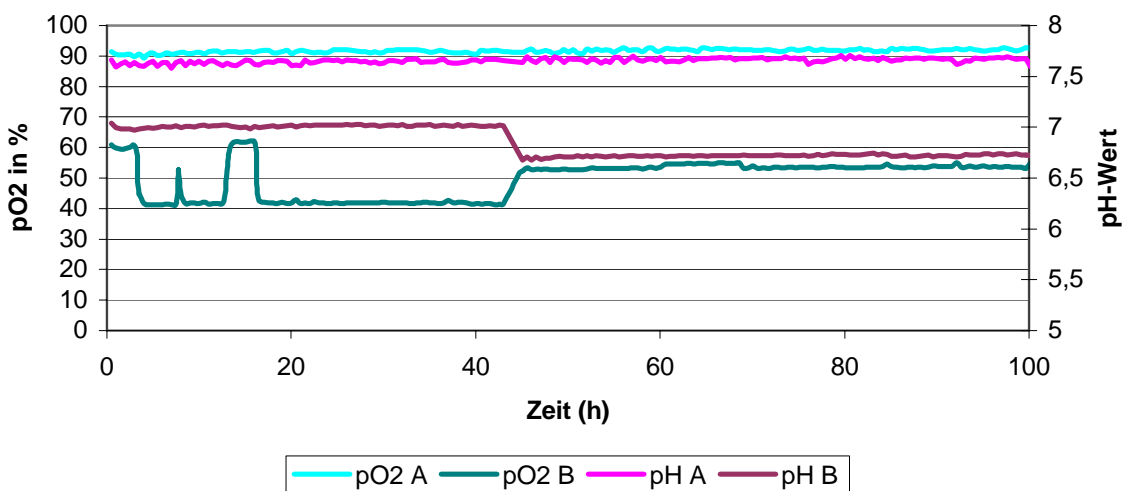


Abb. 56: *C. campyllum*: Fermentationsprozesse A₁₀₀ und B₁₀₀ bei 15°C über 100 Stunden: automatisch aufgezeichnete Daten des pH-Wertes (pHA bzw. pHB) und der Sauerstoffsättigung (pO₂ A bzw. pO₂ B).

Man erkennt in den Abbildungen 55 und 56, dass die Begasung ausreichend war um ein konstantes Niveau der partiellen Sauerstoffsättigung zu halten und keine starke Veränderung des pH-Wertes auftrat. Die simultane Veränderung des pH-Wertes und der partiellen Sauerstoffsättigung bei der kontinuierlichen Fermentation B von *C. campyllum* mit *E. coli* (Abb. 56) ist auf einen Stromausfall in der Stunde 43 der Fermentation zurückzuführen.

Die Menge nachgefütterter Bakterien wurde so festgelegt, dass ein konstanter Bakterientiter in dem Fermenter gehalten werden sollte. Es wurde eine Klärungsrate angenommen, die leicht unter der ermittelten Fressrate in dem 24-Stunden-Versuch lag. Die Fressrate F_{10000} von 20% bei *T. pyriformis* und 15% bei *C. campyllum* wurde festgelegt. Über Schlauchpumpen erfolgte die Zu- bzw. Nachfütterung der Bakteriensuspensionen in die Fermenter. Ausgegangen wurde von einer Pumpleistung von 200 mL pro Stunde. Spätere Überprüfungen der Pumpen über einen Zeitraum von mehr als 12 Stunden ergaben Abweichungen von der gewünschten Pumpleistung, die in Tabelle 6 dargestellt sind.

Tab. 6: Pumpleistungen der Schlauchpumpen für die Fermentationen A_{100pyr} / $A_{100colp}$ und B_{100pyr} / $B_{100colp}$ und deren Abweichung vom Sollwert.

| Pumpe | Soll-Leistung | Ist-Leistung | Abweichung vom Soll-Wert |
|---------------|---------------|--------------|--------------------------|
| $A_{100colp}$ | 200 mL/h | 268 ml/h | 68 ml $\hat{=}$ 34% |
| $B_{100colp}$ | 200 mL/h | 180 ml/h | 19 ml $\hat{=}$ 9,7% |
| A_{100pyr} | 200 mL/h | 203 ml/h | 3 ml $\hat{=}$ 1,38% |
| B_{100pyr} | 200 mL/h | 172 ml/h | 28 ml $\hat{=}$ 13,8% |

Die Bakteriensuspensionen wurden täglich neu angesetzt und der zugehörige Zelltiter über die Lebendkeimzahlbestimmung ermittelt. Die Tabelle 7 zeigt die ermittelten Bakterienkonzentrationen der Nachfütterungssuspensionen von und den daraus ermittelten Zulauf an Bakterien pro Stunde in den jeweiligen Fermenter von *C. campyllum*. Die Daten zur Zufütterungsmenge von *T. pyriformis* sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 7: *C. campyllum*: Zelltiter der Nachfütterung und die daraus folgende Menge an Zellen, die pro Stunde in die Fermenter eingeleitet wurden.

| Zeitraum (h) | Fermenter DL30 ($A_{100colp}$) | | Fermenter UD30 ($B_{100colp}$) | |
|-------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| | Zelltiter NF (Zellen/ml) | Bakterienmenge NF (Zellen/h) | ZelltiterNF (Zellen/ml) | BakterienmengeNF (Zellen/h) |
| 02,0-25,5 | 11.862.500 | 3.183.017.000 | 12.100.000 | 2.185.379.000 |
| 25,5-50,5 | 29.875.000 | 8.016.238.000 | 37.100.000 | 6.700.627.000 |
| 50,5-74,0 | 28.500.000 | 7.647.290.000 | 40.442.000 | 7.304.164.000 |
| 74,0-100,0 | 28.667.000 | 7.692.011.000 | 29.533.000 | 5.334.012.000 |

Tabelle 8: *T. pyriformis*: Zelltiter der Nachfütterung und die daraus folgende Menge an Zellen, die pro Stunde in die Fermenter eingeleitet wurden.

| | Fermenter DL30 ($A_{100\text{pyr}}$) | | Fermenter UD30 (B_{100}) | |
|--------------|--|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Zeitraum (h) | Zelltiter NF (Zellen/ml) | Bakterienmenge NF (Zellen/h) | ZelltiterNF (Zellen/ml) | BakterienmengeNF (Zellen/h) |
| 02,0-25,5 | 18.917.000 | 3.835.517.000 | 14.267.000 | 2.459.770.000 |
| 25,5-50,5 | 15.386.000 | 3.119.667.000 | 18.117.000 | 3.123.563.000 |
| 50,5-74,0 | 20.672.000 | 4.191.471.000 | 18.883.000 | 3.255.747.000 |
| 74,0-100,0 | 15.697.000 | 3.182.747.000 | 14.683.000 | 2.531.609.000 |

Über die in den Tabellen 7 und 8 dargestellten Werte kann man die theoretische Zunahme der Bakterienkonzentration berechnen, die ohne Ciliaten und ohne natürliche Reduktion oder Vermehrung der Bakterienzellen im Fermenter herrschen würde. Hierbei ist zu beachten, dass sich das Volumen mit der Zugabe der Bakteriensuspension erhöht. Der Volumenausgleich erfolgte bei jeder Probenahme durch manuelles Ablassen des, seit der letzten Probenahme, zugefütterten Volumens über das Probenahmeventil. Die so ermittelte theoretische Bakterienkonzentration ist für die Fermentationen mit *T. pyriformis* der beiden Versuchsansätze A_{100} und B_{100} in Abbildung 57 exemplarisch dargestellt. Ein Mittelwert (MW) der beiden Fermentationen ist ebenfalls dargestellt.

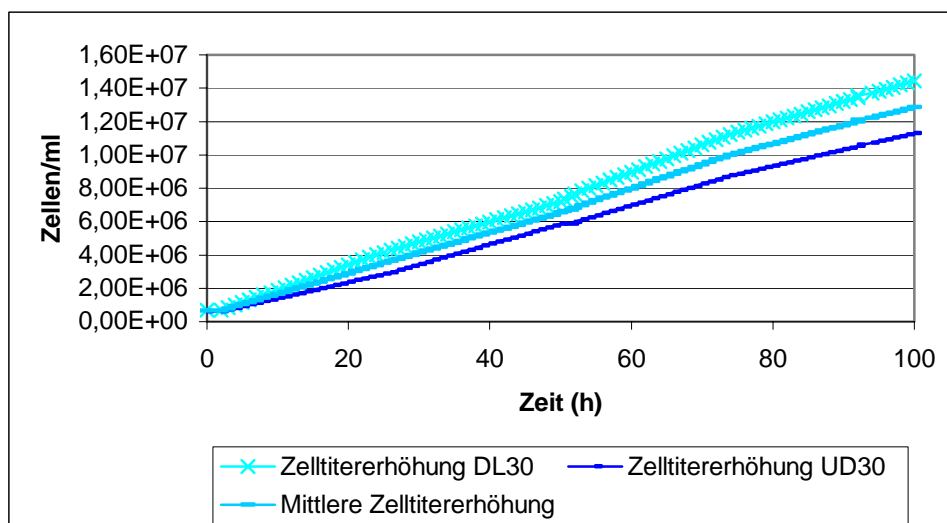


Abb. 57: *T. pyriformis*: Theoretische Konzentration an Bakterienzellen in den Fermentationen: Fermenter DL30 (Ansatz A_{100}) und UD30 (Ansatz B_{100}) und der Mittelwert (MW) der theoretischen *E. coli*-Zelltiter beider Fermentationen, unter der Annahme, dass die Bakterien während der Fermentation weder absterben, noch sich vermehren.

Aus den in den Tabellen 7 und 8 dargestellten Werten der Zufütterung wird nicht ersichtlich, dass die gewünschte Menge an Bakterienzellen pro Stunde zugefüttert wurde. Die mittlere Zufütterungsmenge an Bakterien beträgt bei den Fermentationen von *C. campylum* mit *E. coli* 6.007.842.132 Bakterienzellen pro Stunde und bei den Fermentationen mit *T. pyriformis* 3.212.511.494 Bakterienzellen pro Stunde. Die über den Ausgangstiter und die Zufütterung ermittelten durchschnittlichen Zufütterungsraten sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Darstellung der durchschnittlichen prozentualen Zellzahlerhöhung bei den Kontinuierlichen Fermentationen.

| Organismus | Ausgangszellzahl (Zellen) | Zufütterung (Zellen/h) | Zellzahlerhöhung (%) |
|----------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>C. campylum</i> | 39.375.000.000 | 6.007.842.000 | 15,3 |
| <i>T. pyriformis</i> | 16.331.250.000 | 3.212.511.000 | 19,7 |

Anhand der Tabelle 9 ist zu erkennen, dass die tatsächlich zugefütterte Menge an Bakterien in etwa der geplanten Zufütterung von 15% bzw. 20% entspricht.

Die reale *E. coli*-Konzentration in den Fermentationen wurde alle 2 bis 8 Stunden mit Hilfe der Lebendkeimzahlbestimmung ermittelt. Eine Darstellung dieser Bakterientiter ist in den Abbildungen 58 und 59 zu sehen.

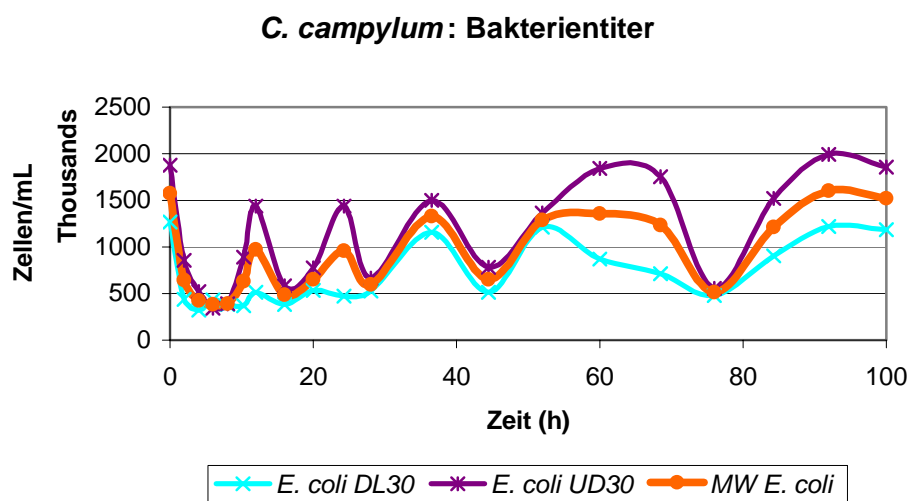


Abb. 58: *C. campylum*: Reale Konzentration an Bakterienzellen in den Fermentationen: Fermenter DL30 (Ansatz A) und UD30 (Ansatz B) und der Mittelwert (MW) der realen *E. coli*-Zelltiter beider Fermentationen

Die Bakterienkonzentrationen in Laufe der 100-stündigen kontinuierlichen Fermentationen mit *C. campyllum* zeigen in beiden Fermentern ein ähnliches Bild. Die Titer oszillieren um einen Wert von etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter, wobei die Intervalle und Amplituden mit zunehmender Zeit größer werden.

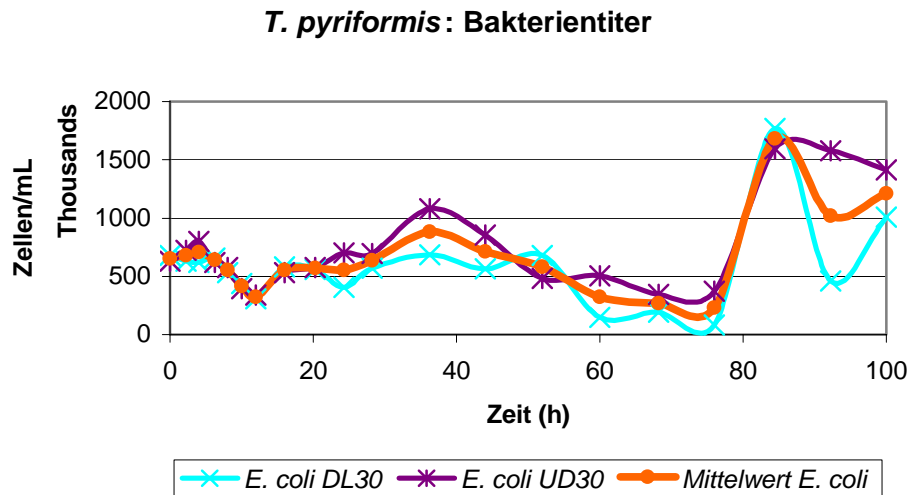


Abb. 59: *T. pyriformis*: Reale Konzentration an Bakterienzellen in den Fermentationen: Fermenter DL30 (Ansatz A) und UD30 (Ansatz B) und der Mittelwert (MW) der realen *E. coli*-Zelltiters beider Fermentationen

Die Bakterienkonzentrationen der beiden Fermentationen mit *T. pyriformis* sind sich im Verlauf der 100 Stunden ähnlich. Der Zelltiter nahm nach 80 Stunden sprunghaft zu. Er erreichte maximale Werte zum Zeitpunkt 84,5 Stunden. Diese lagen bei dem Ansatz A bei 1.768.750 Zellen/mL und bei dem Ansatz B bei 1.592.250. Innerhalb der ersten 12 Stunden sank die reale Bakterienkonzentration, nahm dann wieder leicht zu und sank nach 36 Stunden langsam auf einen absoluten Tiefstand, der nach 68,25 bzw. 76 Stunden erreicht ist. Der geringste *E. coli*-Zelltiter lag in dem Fermenter DL30 nach 68,25 Stunden bei einem Wert von 345.250. In dem Fermenter UD30 wurde nach 76 Stunden ein *E. coli*-Zelltiter von 228.000 erreicht.

Eine Klärungsrate von 15 bzw. 20% sollte mit einer Ciliatenkonzentration von 10.000 Zellen pro Milliliter erreicht werden. Der Zelltiter von *C. campylum* bzw. *T. pyriformis* wurde parallel zu der Bakterienkonzentration mit Hilfe eines automatischen Zellzählers ermittelt. In den Abbildungen 60 und 61 sind die Konzentrationen der Ciliaten in jeweils beiden Fermentationen über einem Zeitraum von 100 Stunden dargestellt.

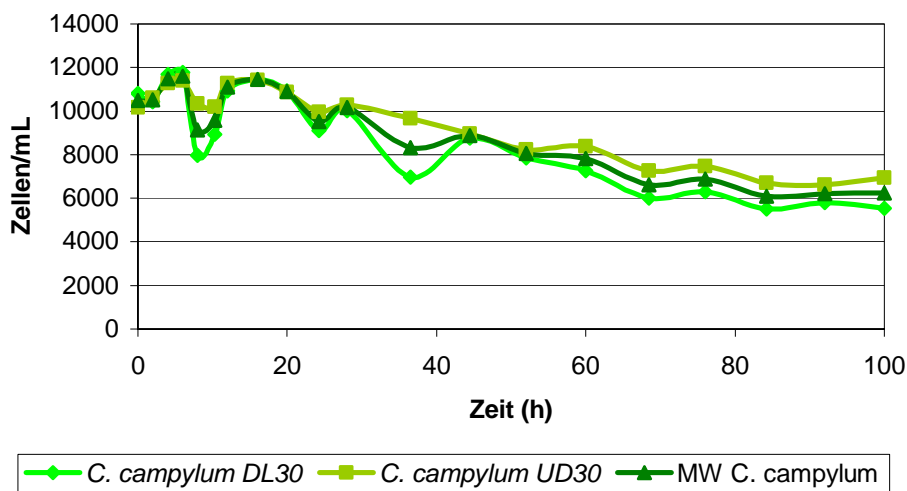


Abb. 60: *T. pyriformis*: Konzentration an Ciliatenzellen in den Fermentationen: Fermenter DL30 (Ansatz A) und UD30 (Ansatz B) und der Mittelwert (MW) der realen *T. pyriformis*-Zelltiter beider Fermentationen

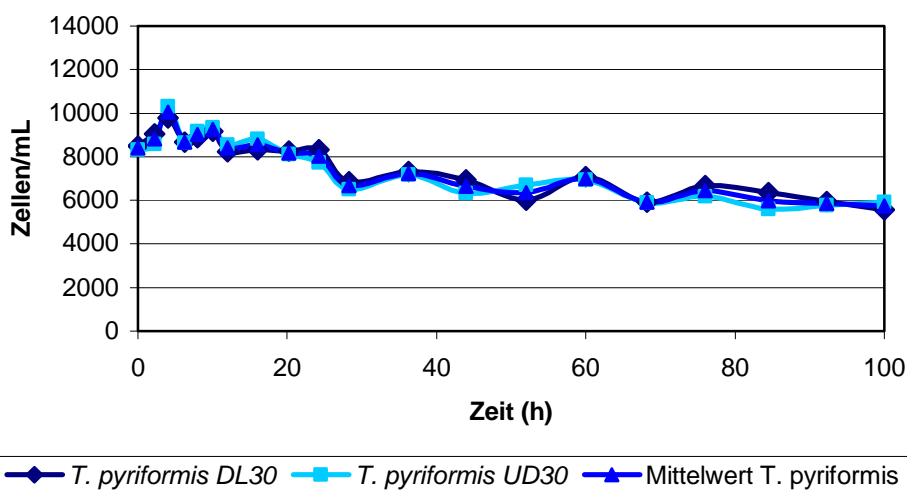


Abb. 61: *T. pyriformis*: Konzentration an Ciliatenzellen in den Fermentationen: Fermenter DL30 (Ansatz A) und UD30 (Ansatz B) und der Mittelwert (MW) der realen *T. pyriformis*-Zelltiter beider Fermentationen

Die Konzentration der Ciliaten in den Fermentationen war weitgehend identisch. Sie nahm in den ersten 4 Stunden leicht zu. Im weiteren Verlauf der Fermentation kam es jedoch zu einer Reduktion des Ciliatentiters. Diese ist auf die Volumenerhöhung durch die Nachfütterung und das Ablassen von Kulturvolumen zum Zeitpunkt jeder Probenahme zurückzuführen.

Die Steigerung der Bakterienkonzentration im Verlauf des Experiments ist auf die Ausdünnung der Ciliaten zurückzuführen. Um die theoretische Abnahme des Ciliatentiters mit der realen Ciliatenkonzentration zu vergleichen wurden diese in einer Grafik (Abbildung 62) exemplarisch für *T. pyriformis* dargestellt.

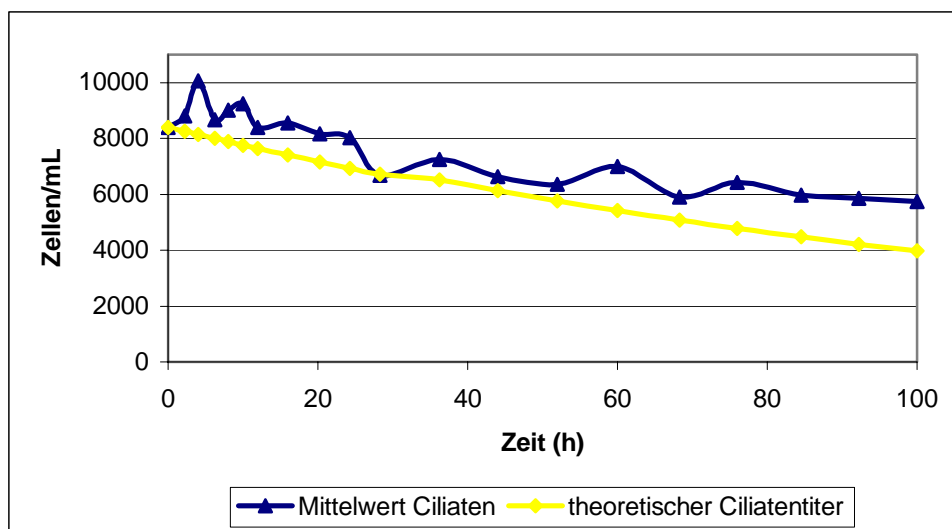


Abb. 62: *T. pyriformis*: Theoretische Konzentration an Ciliatenzellen in den Fermentationen: Mittlere Ciliatenkonzentrationen während der beiden kontinuierlichen Fermentationen und mittlerer theoretischer Ciliatentiter, unter der Annahme, dass die Zellen während der Fermentation weder absterben, noch sich vermehren.

Die Abbildung verdeutlicht, dass es zwar während der Fermentation zu einer Vermehrung der Ciliaten kam, die Nahrung durch die geringe Bakterienfracht nicht ausreichte um eine konstante Ciliatenkonzentration zu halten.

Die kontinuierliche Fermentation über 100 Stunden hat gezeigt, dass sowohl *C. campylum*, als auch *T. pyriformis* in der Lage sind bei kontinuierlicher Zufütterung einen stabilen Bakterientiter zu halten.

8. Zusammenfassung

Als Vorbereitung des Projektes zur Beseitigung von Bakterien im Abfluss von Kläranlagen mittels *Tetrahymena* wurden vor allem Daten bezüglich der vorherrschenden Parameter im Kläranlagenauslauf ausgewertet und eine Planung der Versuchsumstände vorgenommen.

Im Laufe des praktischen Teils dieses Projektes wurden zunächst *Tetrahymena pyriformis* und *Colpidium campylum* aus acht Ciliatenspezies ausgewählt. Sie zeichneten sich neben ihrer einfachen Kultivierbarkeit und der breiten Temperaturtoleranz besonders durch ihr Fressverhalten bei 15° und 25°C mit *Escherichia coli* als Futterbakterium aus.

In der dritten Projektphase zeigte sich, dass beide der ausgewählten Ciliatenspezies zur Reduktion aller drei als Futterbakterien eingesetzten Bakterienspezies (*B. subtilis* 23, *E. coli* K12 und *P. putida* DSM 548) in der Lage sind. Insgesamt zeigte *T. pyriformis* wt deutlich höhere Fressraten als *C. campylum*, allerdings zeigten sich in der Einzelinkubation mit jeweils nur einer Bakterienspezies bei 10°C deutlich höhere Fressraten bei *C. campylum*. Insgesamt lagen die gemessenen F10.000 zwischen 4 und 27 %.

Um sich dem Maßstab einer Kläranlage anzunähern wurde in der vierten Phase des Projektes gezeigt, dass eine erhebliche Reduktion der Bakterienkonzentration auch in einem Maßstab von 25 Litern möglich ist. Darüber hinaus wurde in dieser Phase gezeigt, dass es möglich ist eine konstante Fressrate über einen Zeitraum von 24 Stunden zu halten.

Zum Abschluss des Projektes wurde mit Hilfe von kontinuierlichen Fermentationen ein potentiell Klärbecken simuliert, bei dem kontinuierlich Bakterien zugefüttert wurden. Beide Ciliaten waren in der Lage die Bakterienkonzentration in dem Fermenter trotz Zufütterung auf einem konstant niedrigen Niveau zu halten.

9. Literatur

1. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben "Untersuchungen zum Eintrag und zur Elimination von gefährlichen Stoffen in kommunalen Kläranlagen", Herausgeber: MUNLV NRW, Düsseldorf, März 2004.
2. Bendt, T., Pehl, B, Gehrt, A. & Rolfs, C.-H. (2002) Antibiotikaresistente Keime in einem Klärwerk; KA - Wasserwirtschaft, Abwasser, Abfall **49**, 49-56
3. Feuerpfeil, I., López-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E. & Szewzyk, R. (1999) Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt; Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz **42**, 37-50
4. Feuerpfeil, I. & Stelzer, W. (1992) Das Vorkommen von antibiotikaresistenten koliformen Bakterien in der Darmflora des Menschen; Bundesgesundhbl. **35**, 61-65
5. Heier, H. (1983) Über das Vorkommen von R-Plasmiden in *Escherichia coli* und koliformen Keimen aus Wasser und Abwasser - Teil 1: Einführung und Bedeutung der übertragbaren Chemotherapeutikaresistenz bei gramnegativen Keimen aus Wasser und Abwasser; Acta hydrochim. hydrobiol. **11**, 623-629
6. Resch, H. (2004) Planung und Bau einer Membranbelebungsanlage; Wasser Abwasser **145**, 622-626
7. Frankel, J. (2000) Cell biology of *Tetrahymena thermophila*; in: Asai, D. J. & Forney, J. D. (eds.) Methods in Cell Biology - Vol. **62**, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto; S. 27-125
8. Nilsson, J. R. (1989) *Tetrahymena* in cytotoxicology: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs; Europ. J. Protozool. **25**, 2-25