

**„Bildung, Isolierung und Nachweis der mikrobiell gebildeten Speicherstoffe
Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure bei ausgewählten
Mikroorganismen“**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom Ingenieurin (Fachhochschule) Chemie

Petra Yvonne Schacht

aus Stuttgart

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Wolfgang Dott
 Universitätsprofessor Dr. Lars Blank

Tag der mündlichen Prüfung: 03. März 2016

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ermittelt, inwieweit die Bildung der mikrobiellen Speicherstoffe Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure gefördert werden kann und diese isoliert werden können. Zudem wird ihre Einsatzmöglichkeit, über die biologische Funktion hinaus, im Bereich umweltschonender Produkte und Technologien angesprochen.

Bedingt durch die umfassende Methodenentwicklung und die Untersuchung beider Speicherstoffe setzt sich die vorliegende Arbeit aus den drei Bereichen Nachweismethoden für die polymeren Verbindungen Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure, die mikrobielle Bildung von Polyphosphaten sowie die mikrobielle Bildung von Polyhydroxybuttersäure zusammen.

Es wurden Versuchsreihen im Labormaßstab durchgeführt, in denen unter selektiver Anreicherung von Mikroorganismen die Speicherstoffe Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure gebildet werden. Die Verfahren für die Isolierung und den qualitativen und quantitativen Nachweis der Speicherstoffe wurden entwickelt beziehungsweise etabliert.

Die gebildeten Polyphosphate konnten qualitativ und quantitativ mittels Mikroskopie, Fluoreszenzphotometrie und Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Polyphosphate erfolgte nach Extraktion und durch Messung als Ortho-Phosphat. Allerdings bestehen bei den Nachweisverfahren methodische Schwierigkeiten hinsichtlich der Bestimmung der einzelnen Kettenlängen der Polyphosphate und deren Quantifizierung bedingt durch das Fehlen einheitlicher Standards. Die Ergebnisse sind deshalb kritisch zu betrachten und eine Optimierung der Nachweisverfahren ist anzustreben. Dennoch ist bei simultaner Betrachtung der Ergebnisse des Prozessablaufs aller angewendeten Nachweisverfahren eine Übereinstimmung festzustellen, so dass die verschiedenen Methoden in der Kombination als zielführend angesehen werden können.

Die gebildete Polyhydroxybuttersäure konnte aus der Zelle isoliert und qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte mikroskopisch, enzymatisch und mittels Gaschromatographie. Die Nachweisverfahren für Polyhydroxybuttersäure brachten zufriedenstellende Ergebnisse, da geeignete Standardsubstanzen vorlagen.

Die Phosphataufnahme und Polyphosphatspeicherung wurde anhand der Mikroorganismen im Klärschlamm und unter besonderer Berücksichtigung des Pilzes *Cunninghamella elegans* untersucht. Es wurde festgestellt, dass Phosphat vorwiegend als Polyphosphat in der Zelle durch die Aktivität von Mikroorganismen gespeichert wird. Bei ungünstigen Kultivierungsbedingungen, wie der Änderung des pH-Wertes, kam es zusätzlich zu direkt oder indirekt induzierten Fällungsreaktionen, wie der chemischen Ausfällung von Struvit (Magnesium-Ammonium-Phosphat). Zur Beurteilung der Untersuchungsergebnisse wurde die Kohlenstoff/Stickstoff/Phosphor-Bilanz im Medium herangezogen.

Im Vergleich zu den Mikroorganismen im Klärschlamm war der Pilz *Cunninghamella elegans* in der Lage ein Zehnfaches an Phosphat aus dem Medium zu eliminieren und intrazellulär als Polyphosphat zu speichern. *Cunninghamella elegans* konnte maximal 10 % Phosphat in der Biomasse festlegen, während die Klärschlammbiozönose höchstens 3 % Phosphat fixierte. Bei *Cunninghamella elegans* ergaben sich ein vielversprechender Ertrag an Biomasse und eine Polyphosphatspeicherung in kurzer Zeit. Allerdings scheitert die technische Nutzung der Polyphosphatproduktion an der Abtrennung der Polyphosphate von der Biomasse, die ohne Hydrolyse nicht möglich ist.

Die mikrobielle Bildung und Speicherung von Polyhydroxybuttersäure wurde anhand der Bakterien *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* untersucht. Trotz unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen und eines sehr hohen Kohlenstoffverbrauchs, ist es nicht gelungen einen hohen Ertrag an Biomasse und Polyhydroxybuttersäure zu erreichen. Eine Optimierung der Verfahren ist deshalb notwendig. Die höchste Ausbeute an 3-Hydroxybuttersäure betrug bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* maximal 50 % des Trockengewichts.

Angesichts der im Labormaßstab erzielten Untersuchungsergebnisse sollte eine Übertragung auf großtechnische Maßstäbe angedacht und untersucht werden. Um eine wirtschaftliche Einsatzmöglichkeit der Speicherstoffe zu erreichen, sind eine hohe Zelldichte an Mikroorganismen und damit eine hohe Ausbeute unumgänglich. Deshalb wurden für jeden Speicherstoff die untersuchten Mikroorganismen individuell ausgewählt.

Zur Senkung der Produktionskosten bei der Polymerherstellung erscheint die Weiterverarbeitung industrieller Abwässer ein Ansatzpunkt zu sein. Im Rahmen der Arbeit wurde anfallendes Prozesswasser aus der Industrie als Phosphatquelle den verwendeten Medien zugeführt und getestet.

Die Isolierung und Quantifizierung der gebildeten Speicherstoffe aus Mikroorganismen ist, trotz Fortschritten in der Speicherstoffforschung, noch schwierig, da sich durch Hydrolyse Verluste ergeben können.

Die Bildung und Gewinnung der mikrobiellen Speicherstoffe Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure ist zurzeit noch nicht wirtschaftlich und nur bedingt technisch realisierbar.

Summary

The present paper is aimed at investigating to what extent the production of the microbial reserve substances polyphosphate and polyhydroxybutyrate can be enhanced and whether they can be isolated. In addition, the possibility of utilising these substances beyond their biological function in the field of environmentally friendly products and technologies is addressed.

Owing to the comprehensive method development and the examination of both reserve substances, the present paper consists of three parts, namely methods of detecting the polymer compounds polyphosphate and polyhydroxybutyrate, the microbial production of polyphosphate and the microbial production of polyhydroxybutyrate.

Laboratory-scale test series were performed to produce the reserve substances polyphosphate and polyhydroxybutyrate through selective enrichment of microorganisms. The methods for the isolation as well as the qualitative and quantitative detection of the reserve substances were developed and/or established.

The produced polyphosphates were detected qualitatively and quantitatively by means of microscopy, fluorescence photometry and gel electrophoresis. The polyphosphates were quantified after extraction by measurement as orthophosphate. Due to a lack of uniform standards, however, the detection methods involve methodological difficulties regarding the determination of the individual chain lengths of the polyphosphates and their quantification, which is why the results should be seen with a critical eye and the detection methods require optimisation. Nevertheless, a simultaneous look at the process flow of all employed detection methods reveals consistent results, which is why the combination of the employed methods can be regarded as purposeful.

The produced polyhydroxybutyrate was isolated from the cell and detected qualitatively and quantitatively. The employed detection methods included microscopy, enzyme-mediated assay and gas chromatography. The detection methods for polyhydroxybutyrate yielded satisfactory results, given the availability of suitable standard substances.

The phosphate uptake and phosphate accumulation was examined on the basis of the microorganisms in sewage sludge, giving special regard to the fungus species *Cunninghamella elegans*. It was found that phosphate is accumulated in the cell predominantly as polyphosphate through the activity of microorganisms. At unfavourable culture conditions, such as a change in the pH value, directly or indirectly induced precipitation reactions, such as the chemical precipitation of struvite (magnesium ammonium phosphate) occurred additionally. The carbon/nitrogen/phosphorus ratio in the employed medium was taken as a basis for the assessment of the test results.

Compared to the microorganisms in the sewage sludge, the fungus species *Cunninghamella elegans* was found to be capable of removing from the medium and accumulating in the cell as polyphosphate the tenfold amount of phosphate. *Cunninghamella elegans* was able to fix a maximum of 10% phosphate in the biomass, whereas the sewage sludge biocoenosis only fixed 3% of phosphate at maximum. *Cunninghamella elegans* produced a promising biomass yield and accumulated large amounts of phosphate within a short period of time. However, the technical utilisation of polyphosphate production is impracticable due to the necessity of separating the polyphosphates from the biomass, which is not possible without hydrolysis.

The microbial production and accumulation of polyhydroxybutyrate was examined on the basis of the bacterial species *Paracoccus denitrificans* and *Cupriavidus necator*. Despite varying culture conditions and very high carbon consumption, it was not possible to achieve a high yield of biomass and polyhydroxybutyrate, which is why the method requires optimisation. The highest yield of 3-hydroxybutyrate with *Paracoccus denitrificans* and *Cupriavidus necator* amounted to 50% of the dry weight at maximum.

In view of the test results achieved at laboratory scale, a transfer to industrial scale should be considered and investigated. The economical utilisation of the reserve substances requires a high cell density of microorganisms as well as a high yield. The tested microorganisms were therefore selected individually for each reserve substance.

The further processing of industrial wastewater appears to be a starting point for reducing the production costs of polymers. As part of the tests, industrial process water was added to the employed media as a source of phosphate.

Despite some progress in the research into reserve substances, the isolation of the produced reserve substances from microorganisms and their quantification is still difficult, since losses may occur in the course of hydrolysis.

At present, the production and extraction of the microbial reserve substances polyphosphate and polyhydroxybutyrate is not yet economical and the method's technical feasibility is limited.

Die praktischen Tätigkeiten für diese Arbeit wurden am Institut für Hygiene und Umweltmedizin im Universitätsklinikum der RWTH Aachen durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Dott für die Erstbetreuung und Herrn Prof. Dr. Lars Blank für die Übernahme der Zweitbetreuung.

Desweiteren danke ich dem Laborteam am Institut für Hygiene und Umweltmedizin für die Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Polymere	1
1.2 Polyphosphate als Speicherstoff in Mikroorganismen	1
1.3 Polyhydroxybuttersäure als Speicherstoff in Mikroorganismen	5
1.4 Verbindung zwischen den Speicherstoffen Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure	9
1.5 Ziel der Arbeit	10
2. Material und Methoden	12
2.1 Mikroorganismen	12
2.1.1 Klärschlammbiozönose	12
2.1.2 Pilze	12
2.1.3 Bakterien	12
2.2 Untersuchungsmedien	12
2.2.1 Klärschlammbiozönose	12
2.2.2 Pilze	13
2.2.3 Bakterien	13
2.3 Kultivierungsbedingungen zur Polyphosphat- bzw. Polyhydroxybuttersäurespeicherung	14
2.3.1 Kultivierung der Klärschlammbiozönose zur Polyphosphatspeicherung	14
2.3.2 Kultivierung der Pilze <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Mucor plumbeus</i> und <i>Rhizopus stolonifer</i>	15
2.3.2.1 Kultivierung im Schüttelschrank	15
2.3.2.2 Kultivierung mit Sauerstoffeintrag durch Druckluft	15
2.3.3 Kultivierung der Bakterien <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> zur Polyhydroxybuttersäurespeicherung	16
2.3.3.1 Kultivierung im Schüttelschrank	16
2.3.3.2 Kultivierung bei Sauerstoffeintrag durch Rühren	17
2.3.3.3 Kultivierung bei Sauerstoffeintrag mit Druckluft	17
2.3.3.4 Kultivierung bei Begasung mit Sauerstoff	18
2.4 Analyseverfahren	19
2.4.1 Ermittlung des Phosphatgehalts	19
2.4.2 Ermittlung des Phosphorgehalts	19
2.4.3 Ermittlung des Ammoniumgehalts	19
2.4.4 Ermittlung des Acetatgehalts	20
2.4.5 Ermittlung des Glucosegehalts	20
2.4.6 Ermittlung des Glyceringehalts	20
2.4.7 Bestimmung des pH-Wertes	20
2.4.8 Bestimmung der Optischen Dichte	20
2.4.9 Ermittlung des Proteingehalts	21
2.4.10 Bestimmung der Trockenmasse	21
2.4.11 Bestimmung der Feuchtmasse	21
2.4.12 Gramfärbung	22
2.4.13 Berechnung der Stoffmenge	22
2.4.14 Berechnung des molaren Ertragskoeffizienten	22
2.4.15 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Polyphosphaten	23
2.4.15.1 Neisser-Färbung	23
2.4.15.2 DAPI-Färbung	23
2.4.15.3 Polyphosphat-Extraktion	23

2.4.15.4 Fluoreszenzphotometrie.....	24
2.4.15.5 Gelelektrophorese	24
2.4.16 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Polyhydroxybuttersäuren.....	26
2.4.16.1 Sudanschwarz-Färbung	26
2.4.16.2 Polyhydroxybuttersäure-Isolierung und Quantifizierung von 3-Hydroxybuttersäure mittels Enzymreaktion	26
2.4.16.3 Polyhydroxybuttersäure-Isolierung und Quantifizierung von 3-Hydroxybuttersäure mittels Gaschromatographie	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1 Nachweismethoden für die polymeren Verbindungen Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure	29
3.1.1 Qualitativer und quantitativer Nachweis mikrobiell gebildeter Polyphosphate	29
3.1.1.1 Mikroskopischer qualitativer Nachweis von Polyphosphaten mittels Neisser- und DAPI- Färbung	29
3.1.1.2 Qualitativer Nachweis der gebildeten Polyphosphate im Pilz mittels Gelelektro- phorese	37
3.1.1.3 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Polyphosphatstandardsubstanzen mittels Fluoreszenzphotometrie.....	41
3.1.1.4 Qualitativer und quantitativer Nachweis von mikrobiell gebildeten Polyphosphaten mittels Fluoreszenzphotometrie	46
3.1.1.5 Quantitativer Nachweis der Extraktion von Clark et al. (1986)	50
3.1.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis mikrobiell gebildeter Polyhydroxybuttersäure	52
3.1.2.1 Mikroskopischer qualitativer Nachweis der Bakterien mittels Sudanschwarz-Färbung.....	52
3.1.2.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Polyhydroxybuttersäure bei Bakterien mittels spezifischer Enzymreaktion.....	53
3.1.2.3 Quantitativer Gaschromatographischer Nachweis von mikrobiell gebildeter Poly- hydroxybuttersäure	60
3.2 Mikrobielle Speicherung von Phosphor.....	63
3.2.1 Optimierung der selektiven Phosphatanreicherung in Klärschlammbiozönosen.....	63
3.2.1.1 Ausschluss der chemischen Phosphor-Fällung	66
3.2.1.1.1 Klärschlammbiozönose	66
3.2.1.1.2 Autoklavierte Klärschlammbiozönose	66
3.2.1.1.3 Abgetötete Klärschlammbiozönose mit Natriumazid	67
3.2.1.2 Einflussfaktor pH-Wert auf die Phosphatelimination im Medium	69
3.2.1.3 Einfluss der Co-Substrate wie Acetat, Glucose bzw. Essigsäure auf die Phosphat- elimination im Medium	71
3.2.1.3.1 Acetat	71
3.2.1.3.2 Glucose	72
3.2.1.3.3 Essigsäure	73
3.2.1.4 Variiation der Phosphatzugabe	76
3.2.1.5 Polyphosphatbildung in der Klärschlammbiozönose.....	78
3.2.2 Phosphatanreicherung bei <i>Cunninghamella elegans</i>	81
3.2.2.1 Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen und Phosphataufnahmekapazität bei <i>Cunninghamella elegans</i> im Medium nach Hesseltine und Anderson.....	81
3.2.2.2 Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen und der Phosphataufnahme bei <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) im Medium mit Hefextrakt.....	82
3.2.2.3 Einfluss der Substrate Glucose, Glycerin und Acetat auf das Wachstumsverhalten von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt.....	84
3.2.2.4 Einfluss der Kulturbedingungen im Schüttelschrank und Begasung mit technischer Luft auf das Wachstum von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908).....	85
3.2.2.5 Einfluss der Versuchszeit auf das Wachstum von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908)	86

3.2.2.6 Wachstum und Phosphataufnahme in den verschiedenen <i>Cunninghamella elegans</i> -Stämmen 1908, IFM 46109, 8271 und 63299	87
3.2.2.7 Festlegung des Phosphats in der Biomasse von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908)	92
3.2.2.8 Phosphatkonzentration in der Biomasse und dem umgebenen Medium von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908 und IFM 46109)	93
3.2.2.9 Bilanzierung Phosphataufnahme bei den verschiedenen Pilzen <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908), <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Mucor plumbeus</i> , <i>Mucor racemosus</i> und <i>Rhizopus stolonifer</i>	95
3.2.3 Phosphatelimination bei Prozesswässern mittels Klärschlammbiozönose	98
3.2.3.1 Mikrobiologische Polyphosphatbildung aus Prozesswässern der Firma Budenheim..	98
3.2.3.2 Mikrobiologische Polyphosphatbildung aus Produktionswasser der Brauerei Erding	103
3.3 Mikrobielle Speicherung von Polyhydroxybuttersäure	106
3.3.1 Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen und die Polyhydroxybuttersäurebildung.....	106
3.3.1.1 Wachstumsverhalten von <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> im Medium nach Mothes bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen	107
3.3.1.2 Wachstumsverhalten von <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> im Medium nach Mothes bei Einsatz von Glucose und Acetat als Substrat	112
3.3.2 Polyhydroxybuttersäurebildung durch <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> im Medium nach Steinbüchel et al. (2013) und Mothes et al. (2007) bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.....	116
3.3.2.1 Substratverbrauch (Glycerin, Ammonium, Phosphor) in mg/L bei <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i>	121
3.3.2.2 Zusammensetzung der gebildeten Biomasse (Organik) in mg/L bei <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i>	125
3.3.2.3 Elementverteilung in der Biomasse in mg/kg bei <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i>	130
3.3.3 Bilanzierung.....	131
3.3.3.1 Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorverbrauch in mmol bei <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i>	131
3.3.3.2 Gebildete Biomasse in mmol bei <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> .	134
4. Diskussion	136
4.1 Nachweismethoden für die polymeren Verbindungen Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure	136
4.1.1 Nachweismethoden für Polyphosphat	136
4.1.2 Nachweismethoden für Polyhydroxybuttersäure	138
4.2 Diskussionen zur Phosphateliminierung und Speicherung von Polyphosphat in Mikroorganismen.....	139
4.3 Diskussion zur Speicherung und Gewinnung von Polyhydroxybuttersäure in den Bakterien <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i>	142
5. Zusammenfassung und Fazit	147
6. Literatur.....	150
7. Abbildungsverzeichnis	156
8. Tabellenverzeichnis	163
9. Anhang.....	165

9.1 Mikrobielle Speicherung von Phosphor	165
9.1.1 Wachstumsverhalten von Rein- und Mischkultur im Vergleich	165
9.1.2 pH-Wert Einstellung während der Kultivierung der Klärschlamm-biozönose	167
9.1.3 Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen und Phosphataufnahmekapazität bei <i>Cunninghamella elegans</i> im Medium nach Hesseltine und Anderson	171
9.1.4 Unterschiedliches Wachstumsaussehen von <i>Cunninghamella elegans</i> 1908	172
9.1.5 Einfluss der Substrate Glucose, Glycerin und Acetat auf das Wachstumsverhalten von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt	174
9.1.6 Wachstumsverhalten von <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Mucor plumbeus</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Mucor racemosus</i> ^T in den Medien mit und ohne Hefeextrakt bei Inkubation im Schüttelschrank	175
9.1.7 Mikroskopische Untersuchungen von <i>Cunninghamella elegans</i> 1908, <i>Absidia corymbifera</i> und <i>Mucor plumbeus</i>	177
9.1.8 Polyphosphat-Nachweis mittels Gelelektrophorese bei den Pilzen <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Absidia corymbifera</i> und <i>Rhizopus stolonifer</i>	181
9.2 Mikrobielle Speicherung von Polyhydroxybuttersäure	183
9.2.1 Polyhydroxybuttersäure-Isolierung bei dem Pilz <i>Cunninghamella elegans</i> 1908	183
9.2.2 Mikroskopischer Polyhydroxybuttersäure-Nachweis mittels Sudanschwarz-Färbung bei <i>Cunninghamella elegans</i> und <i>Absidia corymbifera</i>	184
9.2.3 Elementverteilung in der Biomasse bei <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i>	185

1. Einleitung

1.1 Polymere

Polymere sind in der Natur weit verbreitet und werden von Pflanzen in großen Mengen produziert. Sie sind auch wesentliche Bestandteile von Bakterien und anderen Mikroorganismen; ihr Anteil an deren Trockengewicht beträgt durchschnittlich ca. 95 %. Somit steht diese Stoffgruppe im Zentrum des natürlichen Kohlenstoffkreislaufs.

Neben den natürlichen Polymeren, wie Cellulose, Wolle, Seide und Nucleinsäuren, gibt es auch von der chemischen Industrie synthetisch hergestellte in großem Umfang. Exemplarisch seien das Polyethylen und andere Kunststoffe genannt.

Polymere sind wesentliche Bestandteile der Zelle. Sie kommen als Speicherstoffe im Cytoplasma vor, sind in der Zellwand enthalten und können nach gezieltem Freisetzen aus der Zelle auch extrazellulär vorliegen. Die eingelagerten Speicherstoffe dienen als Reservestoffe. Sie können als Kohlenstoff- und Energiequelle sowie als Phosphatreservoir fungieren, so dass die Zelle auch bei ungünstigen Milieubedingungen überleben kann.

Im Folgenden werden aus der Gruppe der intrazellulären Speicherstoffe die Polyphosphate und Polyalkanoate betrachtet. Dabei steht nicht die biologisch essenzielle Funktion der Polymere für die Zelle im Fokus, sondern eine mögliche wirtschaftliche Einsatzmöglichkeit der Speicherstoffe im Rahmen vielfältiger Produkte.

Die intrazelluläre Anordnung der Speicherstoffe führt zu einer räumlichen Begrenzung auf Cytoplasma und Membran, so dass eine hohe Zelldichte notwendig ist, um eine nennenswerte Ausbeute zu erreichen. Zudem stellt sich das Problem einer realisierbaren Gewinnung aus den Zellen (Takors et al., 2013).

1.2 Polyphosphate als Speicherstoff in Mikroorganismen

Phosphor spielt eine wichtige Rolle im Ökosystem, da er als Nährstoff für Lebewesen essentiell ist. Seine Verfügbarkeit limitiert das Vermögen eines Organismus zu wachsen (Baumann, 2003).

Phosphat gilt als wichtiger Nährstoff in der Landwirtschaft und ist weltweit bei der Pflanzenproduktion im Einsatz. Phosphatdüngemittel sind daher Standard. Allerdings birgt eine übermäßige Verwendung der Düngemittel Gefahren für die Umwelt (Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, 2013).

Eine erhöhte Zufuhr von Phosphat in Gewässer kann zu deren Eutrophierung führen. Algen und andere Wasserorganismen werden durch den Eintrag zu starkem Wachstum angeregt, was zu Sauerstoffmangel und Sterben von Wassertieren führen kann. Unmittelbar verantwortlich für die Eutrophierung von Gewässern ist meist die Einleitung phosphathaltiger Abwässer aus Industrie und Landwirtschaft.

Während der Phosphatgehalt der Abwässer in den letzten Jahren vor allem durch den Gebrauch phosphatfreier Waschmittel zurückgegangen ist, bleibt die Phosphatbelastung von Flüssen und Seen deshalb problematisch, weil die wasserlöslichen Phosphate der in der Landwirtschaft verwendeten Mineraldünger ausgewaschen werden und die Mikroorganismen im Wasser zu verstärkter Biomassebildung anregen (Munk et al., 2008).

Die durchschnittliche Phosphatbelastung des Abwassers liegt bei ca. 20 mg/L Phosphor (Takors et al., 2013).

Wenn es um die Belastung der Gewässer mit Phosphaten geht, ist auch der natürliche Phosphorkreislauf mit ins Kalkül einzubeziehen. Da Phosphor ein in der Erdkruste häufig vertretenes Element ist, gelangen Phosphate durch Verwitterungsprozesse in die oberen Bodenschichten und so in den Biokreislauf. Es entstehen andere Phosphatverbindungen und Phosphat gelangt durch Sickerwasser in Flüsse und Meere, wo es teilweise zum Meeresboden absinkt und in Bodenschichten eingebaut wird. Durch Eingriffe von außen (beispielsweise Landwirtschaft, Abholzung von Wäldern) hat sich der Eintrag von Phosphat in die Meere erhöht. Zu den Größenordnungen liegen verschiedene Schätzungen und Modellrechnungen vor (Werner, 1999).

Diese „natürliche“ Phosphatbelastung der Gewässer kann als zusätzlicher Anreiz gesehen werden, die biologische Phosphatentfernung der kommunalen Abwässer zu verfeinern und zu optimieren, um die Phosphorbelastung der Flüsse und Meere in Grenzen zu halten.

Bei der Abwasseraufbereitung in der Kläranlage erfolgt die chemische Phosphatelimination durch Ausfällung mit Eisen- und Aluminiumsalzen. Dies führt zur einer Aufsalzung des gereinigten Wassers und einer Metallbelastung des anfallenden Schlammes. Um dies zu verringern, wird zunehmend mit biologischer Phosphatelimination gearbeitet. Sie wird mittels Mikroorganismen erreicht, die Phosphat in Form von Polyphosphat aufnehmen und intrazellulär speichern können (Grohmann et al., 2011).

Dieser Polyphosphatstoffwechsel wird in Kläranlagen in der dritten Reinigungsstufe eingesetzt (Steinbüchel, 2006).

Die biologische Phosphorelimination durch Akkumulation von Polyphosphaten durch Schlamm Bakterien wird als kostengünstige Methode im „enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process“ angewendet (Kulakovskaya et al., 2012, Zhang et al., 2013).

Polyphosphate können an verschiedenen Stellen in der Bakterienzelle eingelagert werden. Oft bilden sie Einschlusskörper im Cytoplasma, können aber auch zwischen Zellmembran und Zellwand zu finden sein. Diese Phosphateinlagerungen stellen ein Energiereservoir dar (Baumann, 2003).

Verfahrenstechnisch wird bei der Phosphatentfernung unter anaeroben und aeroben Bedingungen gearbeitet. In der anaeroben Phase dient der Polyphosphatspeicher als Energiequelle (Adenosintriphosphat) für den Erhaltungsstoffwechsel der Mikroorganismen, da der Atmungsstoffwechsel nicht funktionsfähig ist. Dabei wird Phosphat freigesetzt (Baumann, 2003).

Unter aeroben Bedingungen wird Polyphosphat wieder intrazellulär eingelagert. Bei diesem Auffüllen des Polyphosphatspeichers ist die Phosphataufnahme aus dem Abwasser größer als die Rücklösung von Polyphosphat in der anaeroben Phase. Dieser Tatbestand wird als luxury uptake bezeichnet und stellt die Basis für die biologische Phosphatentfernung aus Abwasser dar (Takors et al., 2013).

Der in Abbildung 1 dargestellte Vorgang zeigt wie Polyphosphat als Energiespeicher zur Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) genutzt wird (Fritsche, 1998).

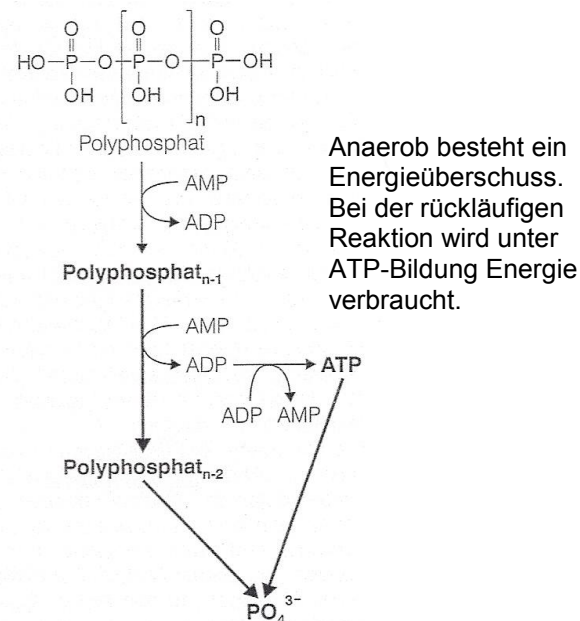


Abbildung 1: Anaerober Stoffwechsel aus Umwelt-Mikrobiologie, Wolfgang Fritsche, Kapitel 8, Seite 145, Abb. 8.6., © Gustav Fischer Verlag Jena, 1998.

Die Intensität der Polyphosphatspeicherung in den Mikroorganismen ist von verschiedenen Bedingungen abhängig, etwa von der Menge an frei verfügbarem Phosphat und der Nährstoffkonzentration im umgebenden Medium. Bei den Polyphosphaten handelt es sich um Salze der Polyphosphorsäure. Sie sind gekennzeichnet durch lange Phosphatrestketten, deren negative Ladungen durch Kationen wie Magnesium oder Calcium abgesättigt sind (Bark, 1992).

Die Struktur der Polyphosphate variiert und kann auch verzweigte Ketten und Ringschlüsse aufweisen. Die allgemeine Formel lautet $\text{M}_{(n+2)}\text{P}_n\text{O}_{(3n+1)}$ (Kulaev et al., 2004).

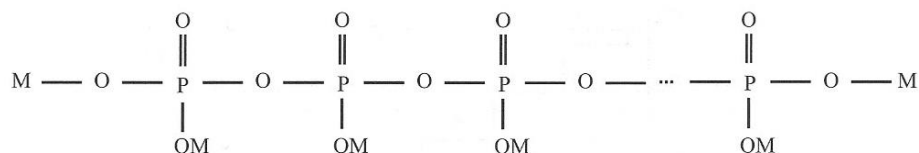


Abbildung 2: Beispiel für eine Strukturformel von Polyphosphat, wobei M für ein Wasserstoffatom oder Metallkation steht, aus The Biochemistry of Inorganic polyphosphates, second Edition, Kulaev et al., content 1, page 5, figure 1.2, © John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO 19 8SQ, England, 2004.

Die industrielle Herstellung der Polyphosphate erfolgt daher mittels chemischer Verfahren. Polyphosphate finden, abhängig von ihrer Struktur, in vielen Bereichen Anwendung, beispielsweise in der Medizin wegen ihrer antiseptischen und zellschützenden Funktionen und in der Lebensmittelindustrie als Zusatzstoffe zur Haltbarmachung und wegen ihrer antibakteriellen Wirkung (Kulaev et al., 2004, Kornberg, 1995).

Die Produktion von Polyphosphaten findet bei großer Hitze durch Kondensation saurer Orthophosphate statt (Chemische Fabrik Budenheim, 2015). Polyphosphate werden auch als Flammenschutzmittel in Kunststoffen und Textilien verwendet. In diesem Fall handelt es sich um Polyphosphate organischer Stickstoffbasen, wie beispielsweise Melamin. Zur Herstellung

dieser Polyphosphate hat die Chemische Fabrik Budenheim ein kostengünstiges Verfahren entwickelt.

Phosphor gehört zu den nicht substituierbaren Stoffen mit begrenztem Vorkommen weltweit. In der Literatur (Cordell et al., 2011) wird viel auf die globale Phosphorknappheit hingewiesen. Phosphor spielt eine wichtige Rolle in der Landwirtschaft und somit für die Nahrungsmittelproduktion und wird aus endlichen Vorkommen von Phosphatgestein gewonnen. Das Element Phosphor zählt zwar zu den 11 häufigsten Elementen in der Erdkruste, aber das Vorkommen von Phosphatgestein ist auf der Erde ungleich verteilt. Die größten Gesteinsreserven befinden sich in China, Marokko, Südafrika, Jordanien und den USA. Während die Schätzungen für die mögliche Nutzungsdauer von Phosphatgestein zwischen 30 und 300 Jahren differieren, da verfügbare Daten fehlen und große Unsicherheit besteht, ist unbestritten, dass die Qualität und Zugänglichkeit der Reserven abnehmen und die Kosten steigen werden.

Da Phosphat in der Klärschlammbiomasse festgelegt werden kann, kommt der Phosphatrückgewinnung aus Klärschlamm deshalb große Bedeutung zu. Um Phosphor aus Klärschlamm zurückzugewinnen, entstanden in den vergangenen Jahren verschiedene Technologien, die teilweise bereits großtechnisch praktiziert werden. Dabei kann Phosphor aus der wässrigen Phase, dem Klärschlamm selbst oder der Klärschlammasche gewonnen werden. Bewertung und Vergleich der Verfahren erweisen sich als schwierig, da die Intensität der Phosphorrückgewinnung und die Entsorgung von Reststoffen noch weitgehend ungeklärt sind (Zessner et al., 2013).

Während zunächst die Rolle der Phosphate als Schadstoffe in Bezug auf Wasserverschmutzung und Eutrophierung, vor allem durch Verwendung als Düngemittel, im Fokus stand, geht es heute darüber hinaus um die Verfügbarkeit und Verknappung von Phosphor. Für den wachsenden Nahrungsmittelbedarf weltweit sind große Phosphormengen notwendig. Diese können nicht problemlos durch Alternativen ersetzt werden. Denn der Einsatz von phosphorhaltiger Gülle bzw. Klärschlamm in der Landwirtschaft gilt als bedenklich (Gaxiola et al., 2011, Cordell et al., 2012, Vassilev et al., 2013, Scholz et al., 2013).

Eine wichtige Phosphorquelle ist Klärschlamm, der Phosphorverbindungen menschlichen Ursprungs enthält. Diese Verbindungen können genutzt werden, müssen aber vor der Wiederverwendung entsprechend aufbereitet werden (Schönberg et al., 2014).

Als Lösungsansatz ist die Kombination aus Bioleaching von Schwermetallen und selektiver Rückgewinnung von Phosphat aus Klärschlammasche zu betrachten.

Da das Ausbringen schwermetallhaltiger Aschen auf landwirtschaftliche Flächen nicht möglich ist, gilt das Bioleaching als eine Möglichkeit zur Schwermetallabreicherung. Bakterien, wie *Acidithiobacillus*-Arten, oxidieren Metallsulfide unter Produktion von Schwefelsäure um Metallionen zu lösen. Diese Reaktionen werden als Thiosulfat- und Polysulfid-Mechanismus bezeichnet. Neben der Freisetzung der Schwermetalle in der Asche wird auch Phosphor gelöst. Das gelöste Phosphat wird mittels polyphosphatakkumulierender Bakterien aus der Lösung entfernt und an die Bakterienbiomasse gebunden (Dott et al., 2011, 2012, 2013).

Verschiedene Phosphorrückgewinnungstechniken aus Abwasser sind zwar technologisch realisierbar, werden aber aus wirtschaftlichen, rechtlichen und politischen Gründen weltweit noch nicht eingesetzt (Desmidt et al., 2015). Diese Hemmschwellen gilt es abzubauen.

Obwohl von einem begrenzten Vorrat an Phosphatgestein weltweit auszugehen ist, setzen sich Ulrich et al. (2014) in ihrer Veröffentlichung mit verschiedenen Szenarien der globalen Phosphorverknappung kritisch auseinander. Die Diskussion um möglichen Phosphormangel entstand schon im 19. Jahrhundert wegen der Entdeckung des Phosphors als Düngemittel und dessen weltweitem Einsatz in der Landwirtschaft. Allerdings wird auf neuere Untersuchungen verwiesen, nach denen die Phosphorreserven wesentlich größer sind als angenommen. Dabei ist aber zu bedenken, dass große Teile der Phosphatlagerstätten in Nordafrika, dem Vorderen Orient und in Russland und somit in politisch und wirtschaftlich instabilen Regionen liegen. Darüber hinaus sollten auch die negativen Auswirkungen des Phosphatabbaus und der Verarbeitung auf die Umwelt berücksichtigt werden, beispielsweise der Landverbrauch und die anfallenden Abfallstoffe (Schönberg et al., 2014).

1.3 Polyhydroxybuttersäure als Speicherstoff in Mikroorganismen

Zurzeit wird die zunehmende Verschmutzung der Weltmeere und verschiedener Bergregionen (Mount Everest) durch Kunststoffe, vor allem Plastiktüten und –folien, in den Medien vielfältig diskutiert (Olivera et al., 2010). Die erdölbasierten Kunststoffe finden sich in allen Lebensbereichen (Automobil, Haushaltsgeräte, Computer, Verpackungsmaterial) und können günstig hergestellt werden, sind aber meist nicht biologisch abbaubar. Ihre Entsorgung wurde deshalb zum globalen Problem.

Sie stellen eine Gefahr für den natürlichen Lebensraum Meer und seine Lebewesen dar. Welche Folgen das Gelangen dieser Stoffe in die Nahrungskette letztendlich für den Menschen hat, kann kaum abgeschätzt werden (Panchal et al., 2013).

Die sprunghaft gestiegene Verbreitung konventioneller erdölbasierter Kunststoffe weltweit, vor allem in den Schwellenländern, löst wegen der wachsenden Wasserverschmutzung Besorgnis aus. Als Hauptplastikmüll-Lieferant für die Weltmeere gilt China. Zwischen 1,3 und 3,5 Millionen Tonnen Kunststoffe gelangten hier 2010 ins Meer. Die Belastung der Weltmeere wird im gleichen Zeitraum 5 bis 13 Millionen Tonnen beziffert (Stuttgarter Zeitung, 13.02.2015).

Dieses Problem und seine Auswirkungen auf die Umwelt führt dazu, dass biologisch abbaubare Kunststoffe notwendig sind und der biologische Abbau von Kunststoffabfällen in den letzten Jahren immer bedeutender wird (Shah et al., 2008).

Auch der von der Europäischen Union gemachte Kompromissvorschlag zur Senkung des Verbrauchs von Plastiktüten in Europa (Stuttgarter Zeitung, 19.11.14) kann als Denkanstoß für die verstärkte Entwicklung biobasierter Kunststoffe gesehen werden.

Die EU-Staaten dürfen künftig Plastiktüten besteuern oder national eventuell verbieten. Die einzelnen Staaten sollen vor allem Konzepte entwickeln, damit ihre Bürger seltener Plastikeinkaufstüten verwenden. Ziel ist, die Senkung des Tütenverbrauchs auf durchschnittlich 40 Stück pro Europäer und Jahr bis 2025, während der Verbrauch 2010 noch bei 176 Stück lag (Stuttgarter Zeitung, 03.03.2015).

Für die industrielle Herstellung biobasierter Kunststoffe kommen grundsätzlich Pflanzen und Bakterien in Betracht. Als Ausgangsstoff für Kunststoffe auf Pflanzenbasis wird pflanzliche Stärke zum Beispiel aus Mais und Kartoffeln verwendet, die chemisch in Polyester umgewandelt werden kann (Panchal et al., 2013).

Werden Mikroorganismen zur Plastikherstellung eingesetzt, spielen die Hydroxyalkanoate unter den häufig vorkommenden Monomertypen eine wichtige Rolle.

Die Polyhydroxyalkanoate finden in Bereichen wie Medizin, Landwirtschaft, Lebensmittel- und Verpackungsindustrie wegen ihrer biologischen Abbaubarkeit, Wasserunlöslichkeit, Ungiftigkeit und Umweltverträglichkeit Anwendung (Panchal et al., 2013).

Die Vielseitigkeit und die Verträglichkeit der Polyhydroxyalkanoate, die mit dem menschlichen Blut und Gewebe kompatibel sind, haben beispielsweise zu einem verbreiteten Einsatz bei medizinischen Anwendungen geführt. Sie sind in Knochenimplantaten enthalten, dienen als Nahtmaterial und sind Bestandteil von Tablettenverpackungen. In diesen Fällen werden Polyhydroxyalkanoat-Harze verwendet (Urtuvia et al. 2014).

Allerdings werden die Hydroxyalkanoate in den Mikroorganismen nicht als Monomere gebildet, sondern sie liegen als Polymere vor. Diese Polymere werden als Polyhydroxyalkanoate bezeichnet und werden von vielen Bakterien als Speicherstoff für Kohlenstoff und Energie in den Zellen gebildet (Chen, 2010).

Diese Fähigkeit der Bakterienzellen, Polyhydroxyalkanoate intrazellulär zu bilden, kann für die Herstellung von biologisch abbaubarem Plastik genutzt werden (Castro-Sowinski et al., 2010).

Die Polyhydroxyalkanoate befinden sich in unlöslicher Form in der Bakterienzelle und erscheinen unter dem Mikroskop als Grana (Takors et al., 2013).

Bezeichnend für diese Speicherstoffe ist, dass sie vollständig biologisch abbaubar und nicht giftig sind. Sie sind UV-beständig, wasserunlöslich und formbar, wobei die Elastizität vom Aufbau der Polymere abhängt. Sie sind mit dem Polypropylen vergleichbar und so für die Herstellung von Kunststoffen geeignet (Kempken et al., 2012).

Die Marktverbreitung und somit Herstellung von Bioplastik, das vollständig von Bakterien synthetisiert wird, nimmt zu und wird weiterentwickelt. Über 30 % der im Boden lebenden Bakterien und Bakterien im Klärschlamm sind in der Lage Polyhydroxyalkanoate aufzubauen (Chen, 2010).

Das bekannteste und verbreitetste Polyhydroxyalkanoat ist die 3-Polyhydroxybuttersäure. Sie gehört zur Gruppe der kurzkettigen Hydroxyalkanoate mit drei bis fünf Kohlenstoffatomen (Takors et al., 2013).

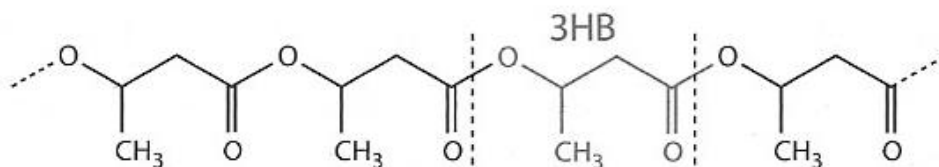


Abbildung 3: Strukturformel von 3-Hydroxybuttersäure aus Industrielle Mikrobiologie, Hrsg. Takors et al. Kapitel 11, Seite 238, Abb.11.5, Autor Steinbüchel et al. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013, with permission of Springer.

Schon im Jahr 1926 hat Maurice Lemoigne die 3-Polyhydroxybuttersäure (PHB) im *Bacillus megaterium* entdeckt. Es dauerte etwa 30 Jahre bis zur Vermarktung des Polymers. Danach wurde Polyhydroxybuttersäure auch in aktivem Schlamm entdeckt (Panchal et al., 2013).

Die Polyhydroxybuttersäure kann unter günstigen Kultivierungsbedingungen als Granula in der Zelle ca. 80 % und mehr der Bakterienmasse betragen. Sie kann als Bioplastik beispielsweise zu Tüten und Folien verarbeitet werden (Gottschalk, 2012).

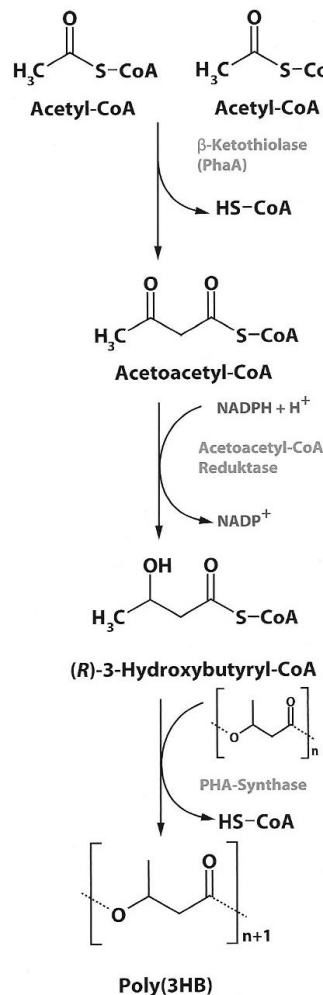


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Biosynthesewegs von 3-Hydroxybuttersäure aus
Mikrobiologisches Praktikum, Steinbüchel et al., 2. Auflage, Kapitel 3, Seite 144,
Abb. 3.80, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013, with permission of Springer.

Um Polyhydroxybuttersäure synthetisieren zu können, benötigen die Bakterien bei der Kultivierung eine Kohlenstoffquelle. Voraussetzung für die Bildung von 3-Polyhydroxybuttersäure ist ein Kohlenstoffüberschuss im Medium bei parallelem Fehlen eines Elementes wie z.B. Phosphor, Stickstoff oder Eisen. Zudem wird Polyhydroxybuttersäure dann eingelagert, wenn das Zellwachstum aus Sauerstoffmangel verlangsamt ist.

Zunächst wird aus Acetyl-Coenzym A mittels der Syntheseeenzyme β -Ketothiolase und Acetoacetyl-Coenzym A-Reduktase (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA gebildet, eine Vorstufe der 3-Polyhydroxybuttersäure. Nach der Polymerisation, bei der Coenzym A abgetrennt wird, erfolgt der letzte Syntheseschritt mit Hilfe des Enzyms PHA-Synthase (siehe Abbildung 4).

Dabei wirkt sich die Anzahl der PHA-Synthase-Moleküle in der Bakterienzelle auf Anzahl und Kettenlänge der Polyester während der Bildung aus. Je höher die Zahl der Enzymmoleküle, je mehr Polyesterketten werden synthetisiert. Bei gleichbleibendem beziehungsweise sinkendem Gehalt an Substrat führt dies zu einem früheren Abbruch des Polymerisationsprozesses und zu geringerer Kettenlänge.

Die Bakterienzellen können den in dieser Weise gebildeten Speicherstoff bei Bedarf verwerten. Besteht Kohlenstoffmangel im Medium und verfügen die Mikroorganismen über gute Wachstumsbedingungen, setzt der intrazelluläre Abbau der Polyhydroxybuttersäure ein. Mit Hilfe des Enzyms PHA-Depolymerase wird sie in niedermolekulare Spaltprodukte zerlegt, die für den Zellstoffwechsel eingesetzt werden können (Steinbüchel et al., 2013, Takors et al., 2013).

Die Fähigkeit von Bakterien, Polyhydroxybuttersäure zu bilden, wird seit längerem von der Industrie vor allem bei der Herstellung biologisch abbaubarer Kunststoffe genutzt. Nach Schätzungen könnten von 300 Millionen Tonnen jährlich produzierter nichtbiologisch abbaubarer Kunststoffe etwa ein Drittel durch biologisch abbaubare ersetzt werden. Allerdings liegt deren Jahresproduktion noch im Bereich von 300 Tausend Tonnen (Takors et al., 2013).

Heute sind neben den genannten Bakterien *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* mehr als 300 verschiedene Mikroorganismen bekannt, die Polyhydroxyalkanoate produzieren können. Dabei werden mehr als 100 verschiedene Typen von Monomeren gebildet (Panchal et al., 2013).

Nicht alle Polyhydroxyalkanoate sind für die Herstellung von Produkten aus biobasierten Kunststoffen geeignet. Ihre Verwendung ist abhängig von ihrer chemischen Struktur. Die vielfältigen Modifikationen der Polyhydroxyalkanoate bestimmen ihre stofflichen Eigenschaften und damit ihre Einsatzgebiete. Daraus resultiert ein hoher Forschungs- und Entwicklungsbedarf bei biobasiertem Plastik (Chen, 2010, Hazer et al., 2007).

Die Polyhydroxyalkanoate sind in der Natur durch enzymatische Aktivitäten von Mikroorganismen im Boden, Kompost und in Meeressedimenten abbaubar. Auf diese Weise werden sie in den Kohlenstoffkreislauf zurückgeführt. Der Abbau kann im aeroben oder anaeroben Milieu erfolgen, ohne dass toxische Nebenprodukte anfallen. Beim Abbau müssen die Polymere zunächst in Monomere umgewandelt werden. Trotz der Fähigkeit von Mikroorganismen, Polyhydroxyalkanoate zu speichern, kann der Abbau aufgrund der Größe bei einzelnen Polymeren nicht möglich sein, da diese nicht durch die Zellwand diffundieren können und in der Biomasse verbleiben. Dann ist ein vollständiger Abbau nicht realisierbar. Zudem wird der biologische Abbau von den Polymereigenschaften, wie Molekulargewicht, Art der funktionellen Gruppe, dem Mikroorganismus selbst und der Produktionsart des Polymers beeinflusst. Bei der Herstellung wird oft das sogenannte „Blending“ angewendet, das heißt, Polyhydroxybuttersäure wird mit anderen Polymeren oder Weichmachern gemischt, um eine verbesserte Verarbeitbarkeit und bestimmte Eigenschaften des Endproduktes zu erreichen (Anderson et al, 1990, Shah et al., 2008, Bugnicourt et al., 2014).

In der aktuellen Diskussion um die biologische Abbaubarkeit von Polymeren fehlt weitgehend das Verständnis für die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Produktkomponenten, ihrer Einsatzmöglichkeit und dem Einsatz von Mikroorganismen. Hier wäre die Erarbeitung von weltweit einheitlichen Standards für die biologische Abbaubarkeit hilfreich.

Neben dem Abbaubarkeitsaspekt steht unter dem Postulat der Nachhaltigkeit die Produktion von Biopolymeren aus nachwachsenden Rohstoffen im Fokus, um fossile Ressourcen zu schonen. Je nach Einsatzgebiet steht nicht die biologische Abbaubarkeit, sondern die Beständigkeit des Materials, beispielsweise beim Haus- und Automobilbau, im Vordergrund. Deshalb sind auch nicht biologisch abbaubare Biopolymere notwendig (Steinbüchel, 2005).

1.4 Verbindung zwischen den Speicherstoffen Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure

Die Abbildungen 5 und 6 zeigen das Zusammenwirken von Polyphosphat als Energiespeicher und Polyhydroxybuttersäure als Kohlenstoffspeicher in Mikroorganismen bei der biologischen Phosphatentfernung in vielen Kläranlagen.

Durch die Verfahrensweise unter wechselnden Bedingungen (anaerob/aerob) können sich Mikroorganismen optimal ihrer Umgebung anpassen.

Voraussetzung für die Phosphatelimination ist das Vorhandensein eines leicht abbaubaren Substrates im Abwasser, wie beispielsweise Acetat. Unter anaeroben Bedingungen ist der Atmungsstoffwechsel nicht funktionsfähig, so dass ein Teil des eingelagerten Polyphosphats als Energiequelle in Form von Adenosintriphosphat (ATP) dient und Phosphat freigesetzt wird.

Dabei wird das Substrat aufgenommen und in Form von organischen Reservestoffen, wie zum Beispiel der Polyhydroxybuttersäure, gespeichert. Diese Reservestoffe stehen für das Wachstum in der aeroben Phase zur Verfügung (Baumann, 2003, Czitrich, 2005).

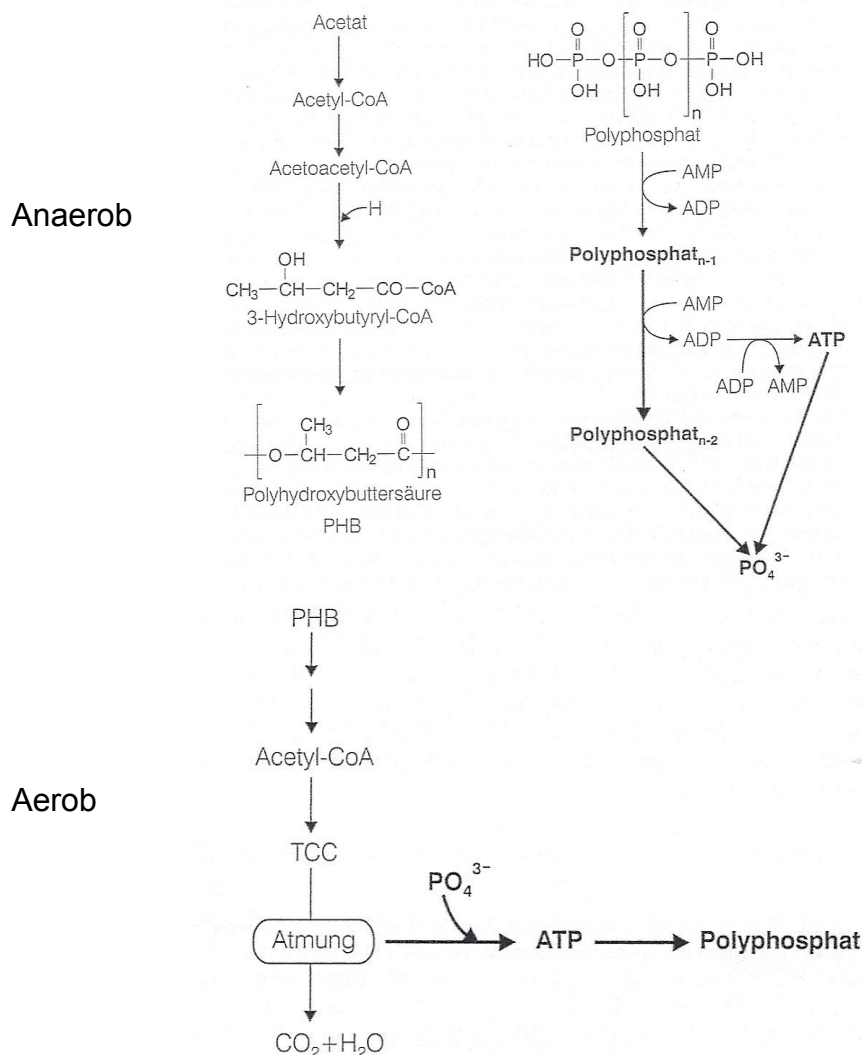


Abbildung 5: Anaerober (oben) und Aerober (unten) Stoffwechsel aus Umwelt-Mikrobiologie, Wolfgang Fritsche, Kapitel 8, Seite 145, Abb. 8.6., © Gustav Fischer Verlag Jena, 1998.

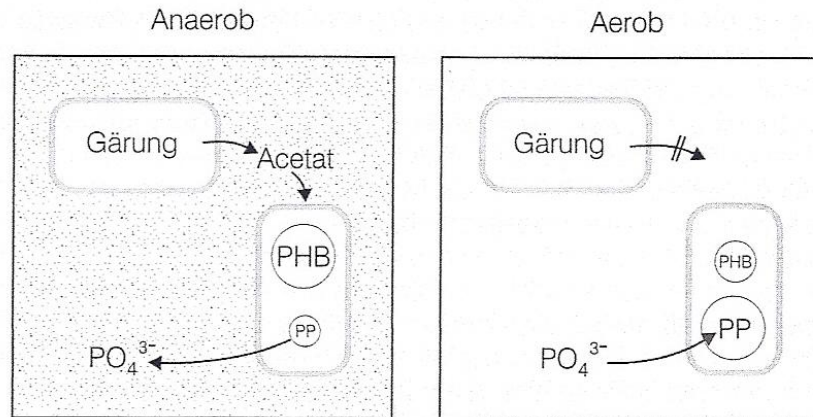


Abbildung 6: Schema Phosphatverhalten in unterschiedlichem Milieu aus Umwelt-Mikrobiologie, Wolfgang Fritsche, Kapitel 8, Seite 147, Abb. 8.7., © Gustav Fischer Verlag Jena, 1998.

1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der Themenstellung „Bildung, Isolierung und Nachweis der mikrobiell gebildeten Speicherstoffe Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure bei ausgewählten Mikroorganismen“ sollen Versuchsreihen im Labormaßstab durchgeführt werden, in denen unter selektiver Anreicherung von Mikroorganismen die Speicherstoffe Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure gebildet werden. Darüber hinaus sollen Verfahren für die Isolierung und den qualitativen und quantitativen Nachweis der Speicherstoffe entwickelt bzw. etabliert werden.

Die gewonnenen Untersuchungsergebnisse sollen hinsichtlich Substratverbrauch, Biomassebildung und Produktbildung der beiden Speicherstoffe ausgewertet werden. Die Darstellung der Ergebnisse soll in den Einheiten mg/L, mmol und in Prozent erfolgen, so dass die Effizienz der Speicherstoffbildung beurteilt und deren Nachweis erbracht werden kann.

Neben der Beurteilung der Untersuchungsergebnisse soll eine mögliche Übertragung auf großtechnische Maßstäbe angedacht werden. Dafür ist eine hohe Zelldichte mit großer Ausbeute notwendig. Unter diesem Aspekt wurden die in der Arbeit untersuchten Mikroorganismen individuell für jeden Speicherstoff ausgewählt.

Im Fokus stehen die drei Untersuchungsbereiche Nachweismethoden für die polymeren Verbindungen Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure, die mikrobielle Bildung von Polyphosphaten und die mikrobielle Bildung von Polyhydroxybuttersäure, wobei Polyphosphate als Energiespeicher und Polyhydroxybuttersäure als Kohlenstoffspeicher in den jeweiligen Mikroorganismen fungieren.

Nachweismethoden für Polyphosphate und Polyhydroxybuttersäure:

Als Nachweisverfahren für die gebildeten Polyphosphate sollen Mikroskopie (Neisser-Färbung), Fluoreszenzphotometrie und Gelelektrophorese eingesetzt werden.

Die gebildete Polyhydroxybuttersäure soll mittels Mikroskopie (Sudanschwarz-Färbung), mittels spezifischer Enzymreaktion und gaschromatographisch nachgewiesen werden.

Die Verfahren sollen hinsichtlich ihrer methodischen Schwierigkeiten beurteilt werden und es soll festgestellt werden, ob die Ergebnisse verifiziert werden können.

Mikrobielle Bildung von Polyphosphaten:

Phosphat soll mit Hilfe der Klärschlamm-biozönose aus synthetischen Medien entfernt und nach Möglichkeit überwiegend als Polyphosphat in den Zellen gespeichert werden.

Im Hinblick auf die Phosphatfestlegung soll die maximal mögliche Eliminierungsmenge (möglichst im Gramm-Bereich) ermittelt werden.

Außerdem soll festgestellt werden, welchen Einfluss die Faktoren Substrat (Acetat, Glucose, Essigsäure), pH-Wert und Versuchsdauer auf die Polyphosphatbildung in der Mischkultur haben.

Wesentlich sind die Erstellung der Kohlenstoff/Stickstoff/Phosphor-Bilanz im Medium sowie die Ermittlung der gebildeten Menge an Polyphosphat in der Biomasse.

Es soll untersucht werden, ob anstelle der Klärschlamm-biozönose auch der Pilz *Cunninghamella elegans* Polyphosphate speichern kann und in welchem Umfang. Untersucht werden die Stämme 1908, IFM 46109, 8271 und 63299 von *Cunninghamella elegans*. Dabei sind die optimalen Wachstumsbedingungen für die Pilze zu ermitteln.

Des Weiteren soll der Einfluss der Faktoren Substrat (Glucose, Glycerin bzw. Acetat), Kultivierung im Schüttelschrank bzw. Begasung mit technischer Luft sowie Versuchsdauer und pH-Wert auf die Phosphataufnahme festgestellt werden.

Es soll auch ermittelt werden, ob die Pilze *Absidia corymbifera*, *Mucor plumbeus*, *Mucor racemosus* und *Rhizopus stolonifer* Polyphosphate speichern können.

Im Fokus der Untersuchung stehen die Bilanzierung (Kohlenstoff/Stickstoff/Phosphor-Verhältnis) im Medium sowie die Ermittlung der gebildeten Menge an Polyphosphat in der Biomasse.

Es soll untersucht werden, ob anstelle eines rein synthetischen Mediums die industriellen Abwässer der Firma Budenheim und der Brauerei Erding zur Phosphatrückgewinnung eingesetzt werden können.

Bei allen Untersuchungen gilt es zu prüfen, inwieweit es sich bei der Phosphatfestlegung um eine direkte oder indirekte (pH-Wert Verschiebung) biologisch induzierte Fällungsreaktion oder um eine Speicherung als Polyphosphat handelt.

Mikrobielle Bildung von Polyhydroxybuttersäure:

Es soll die selektive Anreicherung von Polyhydroxybuttersäure bei den Bakterien *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* untersucht werden. Dabei werden der Einfluss der Medien nach Steinbüchel et al. (2013) und Mothes et al. (2007) sowie der Einfluss der Kultivierungsbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Kultivierung im Schüttelschrank, Belüftung durch Druckluft und Sauerstoff auf die Biomasse der Bakterien und die Polyhydroxybuttersäurebildung untersucht. Im Fokus der Untersuchung stehen der Substratverbrauch (Glycerin, Ammonium, Phosphor) und die Zusammensetzung der gebildeten Biomasse.

2. Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen

Die Untersuchungen wurden mit definierten Mikroorganismen und Mischpopulationen durchgeführt, die im Folgenden dargestellt sind.

2.1.1 Klärschlammbiozönose

Mischpopulationen aus Klärschlamm-Mikroorganismen aus Rücklauf- und Faulschlamm der Kläranlage Aachen Soers.

2.1.2 Pilze

Cunninghamella elegans, 4 Stämme (DSM-1908, DSM-8271, DSM-63299, IFM 46109*), *Absidia corymbifera*, *Mucor plumbeus*, *Mucor racemosus* und *Rhizopus stolonifer* (aus der Institutssammlung).

* von Frau Priv.-Doz. Dr. med Heidrun Peltroche-Llacsahuanga bezogen.

2.1.3 Bakterien

Paracoccus denitrificans (DSM-413), *Cupriavidus necator* (DSM-428).

2.2 Untersuchungsmedien

Die für die Versuche verwendeten Chemikalien wurden überwiegend von den Herstellern Merck und Sigma-Aldrich bezogen. Ausnahmen sind gekennzeichnet.

2.2.1 Klärschlammbiozönose

Als synthetische Medien für die folgenden Versuche dienen Minimal- bzw. Reaktionsmedium mit folgenden Zusammensetzungen (in Anlehnung an Schacht, 2011).

<u>Minimalmedium:</u>	Lösung 1	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,0 g, NaCl 0,05 g, dest. H ₂ O 985,8 mL
	Lösung 2	KH ₂ PO ₄ 880,0 mg, dest. H ₂ O ad 20 mL
	Lösung 3	CaCl ₂ *2H ₂ O 15,0 g, MgCl ₂ *6H ₂ O 40,0 g, dest. H ₂ O ad 20 mL
	Lösung 4	FeCl ₂ *4H ₂ O 750,0 mg, ZnCl ₂ 35,0 mg, MgCl ₂ *4H ₂ O 49,9 mg, CoCl ₂ *6H ₂ O 95,0 mg, CuCl ₂ *2H ₂ O 1,0 mg, NiCl ₂ *6H ₂ O 18,0 mg, Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O 18,0 mg, H ₃ BO ₃ 3,0 mg, HCl 25 % 5,0 mL, dest. H ₂ O 495,0 mL
	Lösung 5	Na ₂ SeO ₃ *5 H ₂ O 304,0 mg, Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O 400,6 mg, NaOH 500,0 mg, hochreines H ₂ O ad 1000 mL
	Lösung 6	(Vitaminlösung) Nicotinsäure 1,2 mg, hochreines H ₂ O 12,1 mL, Kao and Michayluk-Vitaminlösung 120 µL
	Lösung 7	Natriumacetat 82,03 g, dest. H ₂ O ad 1000 mL

Minimalmedium, mit einem Volumen von 1000 mL, setzt sich aus den Lösungen 1 (985,8 mL), 2 (1,0 mL), 3 (200,0 µL), 4 (1,0 mL), 5 (1,0 mL), 6 (1,0 mL) und 7 (10,0 mL) zusammen.

Allerdings wurden bei den einzelnen Versuchen die Phosphat-, Acetat- und Ammoniummengen variiert.

Reaktionsmedium: Lösung 1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g, NaCl 0,05 g, dest. H_2O 985,8 mL

Lösung 2 KH_2PO_4 880,0 mg, dest. H_2O ad 20 mL

Lösung 7 Natriumacetat 82,03 g, dest. H_2O ad 1000 mL

Reaktionsmedium, mit einem Volumen von 1000 ml, setzt sich aus den Lösungen 1 (989,0 ml), 2 (1,0 ml) und 3 (10,0 ml) zusammen. Minimal- bzw. Reaktionsmedium wurden in der aufgezeigten Zusammensetzung verwendet. Allerdings wurden bei den einzelnen Versuchen die Phosphat-, Acetat- und Ammoniummengen variiert.

2.2.2 Pilze

Medium nach Hesseltine und Anderson 1957:

40 g D-Glucose, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2 g Asparagin, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 mg Vitamin B1 Thiamin Chlorhydrat, 1 Liter bidest. Wasser.

Allerdings wurden bei den einzelnen Versuchen die Phosphat- und Glucosemengen variiert.

Medium:

10 g D-Glucose, 4 g Ammoniumchlorid, 4 g Hefeextrakt, 3 g KH_2PO_4 , 1000 mL bidest. Wasser.

Allerdings wurden bei den einzelnen Versuchen die Phosphat-, Glucose- und Ammoniummengen variiert.

2.2.3 Bakterien

Medium nach Steinbüchel et al. 2013:

1 Liter Medium enthält: dest. Wasser mit 9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L NH_4Cl , 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,2 mg/L Fe (III)-citrat-Hydrat, 2,5 mL Glycerin, 0,4 g/L Hefeextrakt, 100 μL SL 6.

Spurenelement-Lösung (SL 6): 1 Liter enthält dest. Wasser mit 30 mg H_3BO_3 , 20 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 3 mg $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 3 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.

Medium nach G. Mothes et al. 2007:

1 Liter Medium enthält: Bidest. Wasser mit 0,95 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5,47 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,68 g/L KH_2PO_4 , 0,87 g/L K_2HPO_4 , 2,5 mL Glycerin, 0,4 g/L Hefeextrakt, 1 mL Stocklösung.

Stocklösung: 1 Liter enthält bidest. Wasser mit 71 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,45 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,6 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g Ammoniumeisen(III)-citrat.

2.3 Kultivierungsbedingungen zur Polyphosphat- bzw. Polyhydroxybuttersäure-speicherung

2.3.1 Kultivierung der Klärschlammbiozönose zur Polyphosphatspeicherung

Die Inkubation der Mischkulturen erfolgte im aeroben und anaeroben Wechsel in sterilen 500 mL-Duranflaschen. Zur abwechselnden Begasung der Inkubationsgefäße wurden diese über Schläuche (PharMed®-BPT, Saint Gobain) und Luer-Look-Verbindungen mit einer Gasversorgung mit Druckluft beziehungsweise Stickstoff (5.0, Linde) verbunden. Um einen Flüssigkeitsverlust durch die Begasung zu verhindern, wurden die Gase in Gaswaschflaschen mittels sterilen ultrareinen Wassers (Millipore) befeuchtet. Entstandene Flüssigkeitsverluste wurden mit ultrareinem Wasser ausgeglichen. Die Gase wurden mittels Membranfilter (Millex®GP, 0,22 µm) steril filtriert. Zum Druckausgleich wurde die Abluft der einzelnen Ansätze über ein Ventil abgeleitet. Über einen zusätzlichen, sterilen Zugang mit Drei-Wege-Hahn konnte dem Versuchsansatz Flüssigkeit zur Probenahme entnommen oder Substrat zugegeben werden.

Um eine Polyphosphatbildung durch Klärschlamm-Mikroorganismen zu erreichen, wurden diese in einem Minimal- beziehungsweise Reaktionsmedium (siehe Kapitel 2.2.1) bis zu 35 Tagen inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurden die verwendeten Gefäße und Schläuche autoklaviert und unter sterilen Bedingungen vorbereitet, um eine Kontamination zu verhindern. 240 mL Medium wurden mit einem Inoculum von 10 mL Klärschlamm beimpft. Während der Versuchsdauer wurde alternierend Sauerstoff beziehungsweise Stickstoff zugeführt. Es wurden pro Probenahme je 3 mL mittels Einmalspritzen (BD 10 mL Syringe Luer-Lok™ Tip REF 300912) entnommen und in Plastikröhrchen (Sarstedt ST. 500 REF 55.468.001, Röhre 13 mL, 95 x 16,8 mm, PS) überführt (nach Schacht, 2011).



Abbildung 7: Kultivierung der Mischkulturen bei alternierender Begasung mit Druckluft und Stickstoff.

2.3.2 Kultivierung der Pilze *Cunninghamella elegans*, *Absidia corymbifera*, *Mucor plumbeus* und *Rhizopus stolonifer*

2.3.2.1 Kultivierung im Schüttelschrank

Die Vorkultivierung der einzelnen Stämme erfolgte auf Kartoffel-Glukose-Agar (Merck, Bestellnummer 1101300500, 500 g) bis zu 3 Wochen bei Raumtemperatur. Die Sporen wurden mit NaCl und Tween (0,9 % NaCl + 200 µL Tween 80) abgelöst und in einer Thoma-Zählkammer ausgezählt. Im 250 mL-Erlenmeyerkolben wurden 100 mL Medium mit 1 mL Sporensuspension angeimpft und mit Alufolie verschlossen. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelschrank (HT Infors, Infors AG CH-4103 Bottmingen, Switzerland) bei 30°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm bis zu vier Tagen. Vor Versuchsbeginn wurden die verwendeten Gefäße und Materialien autoklaviert.



Abbildung 8: Kultivierung der Pilze im Schüttelschrank.

2.3.2.2 Kultivierung mit Sauerstoffeintrag durch Druckluft

Die Vorkultivierung der einzelnen Stämme erfolgte auf Kartoffel-Glukose-Agar bis zu 3 Wochen bei Raumtemperatur. Die Sporen wurden mit NaCl und Tween (0,9 % NaCl + 200 µL Tween 80) abgelöst und in einer Thoma-Zählkammer ausgezählt. Die Inkubation der Pilze erfolgte in sterilen 500 mL- bzw. 2000 mL-Duranflaschen und bei 30°C (Magnetrührer: Heidolph, MR Hei-Standard, 350 rpm). Zur Begasung der Ansätze wurden diese über Schläuche und Luer-Look-Verbindungen mit einer Gasversorgung mit Druckluft verbunden. Um einen Flüssigkeitsverlust durch die Begasung zu verhindern, wurden die Gase in Gaswaschflaschen mittels sterilen ultrareinen Wassers (Millipore) befeuchtet. Entstandene Flüssigkeitsverluste wurden mit ultrareinem Wasser ausgeglichen. Die Gase wurden mittels Membranfilter (Millex®GP, 0,22 µm) steril filtriert. Zum Druckausgleich wurde die Abluft der einzelnen Ansätze über ein Ventil abgeleitet. Über einen zusätzlichen, sterilen Zugang mit Drei-Wege-Hahn konnte dem Versuchsansatz Flüssigkeit zur Probenahme entnommen werden.



Abbildung 9: Kultivierung der Pilze bei Begasung mit Druckluft.

2.3.3 Kultivierung der Bakterien *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* zur Polyhydroxybuttersäurespeicherung

2.3.3.1 Kultivierung im Schüttelschrank

Die Vorkultivierung der Bakterien erfolgte auf Caso-Agar (Merck, Bestellnummer: 1054580500, 500 g) einen Tag im Brutschrank (Heraeus Instruments) bei 30°C. Die Bakterien wurden mit einer 0,9 % igen NaCl-Lösung abgelöst. Im 1000 mL-Erlenmeyerkolben wurden 100 mL Medium mit 10 mL Bakteriensuspension angeimpft und mit Alufolie verschlossen. Die Inkubation erfolgte im Schüttelschrank (HT Infors, Infors AG CH-4103 Bottmingen, Switzerland) bei 30°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm bis zu vier Tagen. Vor Versuchsbeginn wurden die verwendeten Gefäße und Materialien autoklaviert.



Abbildung 10: Kultivierung der Bakterien im Schüttelschrank.

2.3.3.2 Kultivierung bei Sauerstoffeintrag durch Rühren

Die Vorkultivierung der Bakterien erfolgte auf Caso-Agar (Merck, Bestellnummer: 1054580500, 500 g) einen Tag im Brutschrank (Heraeus Instruments) bei 30°C. Die Bakterien wurden mit einer 0,9 % igen NaCl-Lösung abgelöst. In 500 mL-Duranflaschen wurden 100 mL Medium mit 10 mL Bakteriensuspension angeimpft. Der Sauerstoffeintrag erfolgte durch Rühren mittels Magnetrührer (Heidolph, MR Hei-Standard) bei 30°C und einer Rührgeschwindigkeit von 350 rpm. Die Zugänge mit Drei-Wege-Hahn dienten zur Probenentnahme.



Abbildung 11: Kultivierung der Bakterien mit Sauerstoffeintrag durch Rühren.

2.3.3.3 Kultivierung bei Sauerstoffeintrag mit Druckluft

Die Vorkultivierung der Bakterien erfolgte auf Caso-Agar (Merck, Bestellnummer: 1054580500, 500 g) einen Tag im Brutschrank (Heraeus Instruments) bei 30°C. Die Bakterien wurden mit einer 0,9 % igen NaCl-Lösung abgelöst. In 500 mL-Duranflaschen wurden 100 mL Medium mit 10 mL Bakteriensuspension angeimpft und 1 Tropfen Silikonöl (Fluka 85415, 2,5 L) als Antischaummittel zugegeben. Die Inkubation der Bakterien erfolgte bei 30°C (Magnetrührer: Heidolph, MR Hei-Standard, 350 rpm). Zur Begasung der Ansätze wurden diese über Schläuche mit einer Gasversorgung mit Druckluft verbunden. Um einen Flüssigkeitsverlust durch die Begasung zu verhindern, wurden die Gase in Gaswaschflaschen mittels sterilen ultrareinen Wassers (Millipore) befeuchtet. Entstandene Flüssigkeitsverluste wurden mit ultrareinem Wasser ausgeglichen. Zum Druckausgleich wurde die Abluft der einzelnen Ansätze über ein Ventil abgeleitet. Über einen zusätzlichen, sterilen Zugang mit Drei-Wege-Hahn konnte dem Versuchsansatz Flüssigkeit zur Probenahme entnommen werden.



Abbildung 12: Kultivierung der Bakterien bei Begasung mit Druckluft.

2.3.3.4 Kultivierung bei Begasung mit Sauerstoff

Die Vorkultivierung der Bakterien erfolgte auf Caso-Agar (Merck, Bestellnummer: 1054580500, 500 g) einen Tag im Brutschrank (Heraeus Instruments) bei 30°C. Die Bakterien wurden mit einer 0,9 % igen NaCl-Lösung abgelöst. In 500 mL-Duranflaschen wurden 100 mL Medium mit 10 mL Bakteriensuspension angeimpft und 1 Tropfen Silikonöl (Fluka 85415, 2,5 L) als Antischaummittel zugegeben. Die Inkubation der Bakterien erfolgte bei 30°C (Magnetrührer: Heidolph, MR Hei-Standard, 350 rpm). Zur Begasung der Ansätze wurden diese über Schläuche mit einer Gasversorgung mit 100 % igem Sauerstoff (Linde) verbunden. Um einen Flüssigkeitsverlust durch die Begasung zu verhindern, wurden die Gase in Gaswaschflaschen mittels sterilen ultrareinen Wassers (Millipore) befeuchtet. Entstandene Flüssigkeitsverluste wurden mit ultrareinem Wasser ausgeglichen. Zum Druckausgleich wurde die Abluft der einzelnen Ansätze über ein Ventil abgeleitet. Über einen zusätzlichen, sterilen Zugang mit Drei-Wege-Hahn konnte dem Versuchsansatz Flüssigkeit zur Probenahme entnommen werden.



Abbildung 13: Kultivierung der Bakterien bei Begasung mit Sauerstoff.

2.4 Analyseverfahren

2.4.1 Ermittlung des Phosphatgehalts

Zur Bestimmung des Phosphatgehalts wurden Küvettentests der Firma Lange verwendet. Die Tests LCK 350, mit Nachweisbereich 6-60 mg/L PO_4 , LCK 348, mit Nachweisbereich 1,5-15,0 mg/L PO_4 , und LCK 349, mit Nachweisbereich 0,15-4,50 mg/L PO_4 , wurden gemäß der Packungsbeilage durchgeführt. Das Prinzip dieser Tests beruht darauf, dass Phosphationen in saurer Lösung mit Molybdat- und Antimonionen zu einem Antimonylphosphormolybdat-Komplex reagieren. Dieser Komplex wird durch Ascorbinsäure zu Phosphormolybdänblau reduziert. Die Blaufärbung wird mit dem Photometer (Spectrophotometer DR 2800; Hach Lange GmbH) gemessen.

2.4.2 Ermittlung des Phosphorgehalts

Der Phosphorgehalt sowie weitere Elementaranalyte wurden mittels ICP-MS (ICP-MS-Elan-DRC II, Perkin-Elmer) ermittelt.

2.4.3 Ermittlung des Ammoniumgehalts

Zur Bestimmung des Ammoniumgehalts wurden Küvettentests der Firma Hach Lange verwendet. Die Tests LCK 303, mit Nachweisbereich 2,5-60 mg/L NH_4 und LCK 302, mit Nachweisbereich 60-167 mg/L NH_4 , wurden gemäß der Packungsbeilage durchgeführt. Das Prinzip dieser Tests beruht darauf, dass Ammoniumionen bei pH 12,6 mit Hypochloritionen und Salicylationen in Gegenwart von Nitroprussid-Natrium als Katalysator zu Indophenolblau reagieren.

2.4.4 Ermittlung des Acetatgehalts

Die Bestimmung des Acetatgehalts wurde in Anlehnung an DIN 38405 Teil 19 mit dem Ionenchromatographen (ICS-3000 Dionax, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Kalibration wurde mit einer Konzentration von 5-50 mg/l Acetat durchgeführt (Acetat-Standard für IC Sigma-Aldrich 51791-100 mL). Weitere Anionen wurden mit einer Konzentration von 0,1-10 mg/L kalibriert. Die Proben wurden vor der Messung durch einen 0,45 µm Filter (Pall, Life Sciences) filtriert und exemplarisch im Verhältnis 1:10 verdünnt (100 µL Probe + 10 µL Eluentenkonzentrat + 890 µL hochreines Wasser).

Stammlösung Eluent:

Lösung A (0,90 mM) 47,68 g Na₂CO₃, hochreines Wasser ad 500 mL

Lösung B (0,70 mM) 29,40 g NaHCO₃, hochreines Wasser ad 500 mL

Eluent (4,5 mM Na₂CO₃/1,4 mM NaHCO₃):

5,0 mL Lösung A und 2,0 mL ad 1000,0 mL mit hochreinem Wasser

Eluentenkonzentrat (0,45 M Na₂CO₃ / 1,4 M NaHCO₃):

5,0 mL Lösung A und 2,0 mL Lösung B ad 10,0 mL mit hochreinem Wasser

2.4.5 Ermittlung des Glucosegehalts

Die Bestimmung wurde mit dem UV-Test Lactose/D-Glucose (Best. Nr. 10 986 119 035) der Firma R-biopharm nach Packungsbeilage durchgeführt. Es wurden Einmalküvetten (REF 67.741, Polystyrol/Polystyrene, 4 mL, 10 x 10 x 45 mm, Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

2.4.6 Ermittlung des Glyceringehalts

Die Bestimmung wurde mit dem UV-Test (Best. Nr. 10 148 270 035) der Firma R-biopharm nach Packungsbeilage durchgeführt. Es wurden Einmalküvetten (REF 67.741, Polystyrol/Polystyrene, 4 mL, 10x10x45 mm, Sarstedt, Nümbrecht) verwendet.

2.4.7 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde mit dem pH-Meter (QpH 7) und pH-Indikatorteststäbchen der Firma Merck (Messbereich 0-14) gemessen.

2.4.8 Bestimmung der Optischen Dichte

Die photometrische Messung erfolgte in einer 1 mL-Küvette (Halbmikro, REF 67.742, Polystyrol/Polystyrene, 10x4x45 mm, Sarstedt, Nümbrecht) bei 600 nm. Liegt ein Extinktionswert oberhalb von 0,5, muss dieser verdünnt werden.

2.4.9 Ermittlung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Frølund et al. (1996).

Lösung 1: NaOH/Na₂CO₃-Lösung

0,143 mol/L (5,7196 g/L) NaOH und 0,270 mol/L (28,6168 g/L) Na₂CO₃ in hochreinem Wasser

Lösung 2: Kupfersulfat-Pentahydratlösung

0,057 mol/L (14,2313 g/L) Kupfersulfat-Pentahydrat in hochreinem Wasser

Lösung 3: Di-Natriumtetrat-dihydrat-Lösung

0,124 mol/L (28,5299 g/L) Di-Natriumtetrat-dihydrat in hochreinem Wasser

Lösung 4: hochreines Wasser

Arbeitsreagenz: Lösung 1, 2 und 3 wurden im Verhältnis 100:1:1 gemischt.

Phenolreagenz: 5 mL Folin Ciocalteus Phenolreagenz in 6 mL hochreinem Wasser

Stammlösung: 10 mg BSA pro 100 mL Medium

SDS-Lösung: 1,68 g SDS pro 100 mL hochreines Wasser

Je 275 µL der Probe wurden mit 400 µL SDS (Dodecylhydrogensulfat Natriumsalz) versetzt. Je 0,5 mL dieser Probelösung wurde mit 0,7 mL Arbeitsreagenz in einer 1 cm-Küvette (Halbmikro, REF 67.742, Polystyrol/Polystyrene, 10 x 4 x 45 mm, Sarstedt, Nümbrecht) vorsichtig gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde 0,1 mL Phenolreagenz zugegeben. Nach weiteren 30 Minuten bei Raumtemperatur, wurde die Extinktion bei 750 nm im Photometer gemessen. Als Blindwert diente hochreines Wasser (Millipore). Die Kalibration erfolgte mit einer Konzentration von 1-100 mg/L BSA-Stammlösung.

2.4.10 Bestimmung der Trockenmasse

Zur Trockengewichtbestimmung wurden die Pilz-Biomassen in vorgetrocknete, zuvor gewogene, Porzellantiegel eingefüllt. Die Tiegel wurden bei 105°C im Trockenschrank (Heraeus Instruments, Düsseldorf) 12 Stunden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Abkühlen im Exsikkator wurden die Tiegel erneut gewogen.

Zur Bestimmung der Trockenmasse der Bakterien wurde ein leeres 50 mL-Falcon (Polypropylen Röhrchen, (Cellstar® Tubes), 50 mL, konischer Boden mit Stehrand, natur; Artikelnummer: 227261; Greiner Bio One) gewogen. Nach Zentrifugation (Flurzentrifuge, Beckman, Coulter_{TM}, Avanti_{TM} J-20 XP Centrifuge, Rotor 14, 6500 rpm, 20 Minuten bei 4°C) von 100 mL Ansatz wurde der Überstand abgenommen und das Falcon bei 105°C im Trockenschrank (Heraeus Instruments, Düsseldorf) 12 Stunden getrocknet. Nach dem Abkühlen wurde das Falcon erneut gewogen.

2.4.11 Bestimmung der Feuchtmasse

Zur Bestimmung der Feuchtmasse wurde ein leeres 50 mL-Falcon (Polypropylen Röhrchen, (Cellstar® Tubes), 50 mL, konischer Boden mit Stehrand, natur; Artikelnummer: 227261; Greiner Bio One) gewogen. Nach Zentrifugation (Flurzentrifuge, Beckman, Coulter_{TM},

Avanti_{TM} J-20 XP Centrifuge, Rotor 14, 6500 rpm, 20 Minuten bei 4°C) von 100 mL Ansatz wurde der Überstand abgenommen und das Falcon erneut gewogen.

2.4.12 Gramfärbung

Karbofuchsin-Lösung 1:10: 10 mL konzentrierte Karbofuchsin-Lösung, 90 mL dest. Wasser

Entfärbungslösung: 15 mL Aceton und 485 mL 96 % igen Ethanol

Die Objektträger (R. Langenbrinck, ca. 76 x 26 mm / 3 x 1 inch, geputzt/ gebrauchsfertig, Emmendingen) wurden zunächst an der Luft getrocknet und anschließend hitzefixiert. Mittels filtrierter Kristallviolett-Lösung wurden die Objektträger 3 Minuten eingefärbt. Nach dem Abgießen wurden diese mit Lugol-Lösung 1,5 Minuten bedeckt. Nach erneutem Abgießen wurden die Farbreste mit Entfärbungslösung entfernt. Die Gegenfärbung erfolgte mit verdünnter Karbofuchsin-Lösung (2 Minuten). Anschließend wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült und luftgetrocknet. Unter dem Mikroskop (Leica DM R, Programm LAS V 4,0, Kamera Leica DFC420 C).

Die Durchführung erfolgte nach dem institutseigenen internen Laborskript.

2.4.13 Berechnung der Stoffmenge

$$n = m / M$$

n: Stoffmenge in mol
m: Masse in g
M: Molare Masse in g/mol

Phosphat: $M(\text{PO}_4) = 94,97 \text{ g/mol}$

Ammonium: $M(\text{NH}_4) = 18 \text{ g/mol}$

Glucose: $M(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6) = 180,16 \text{ g/mol}$

Glycerin: $M(\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3) = 92,1 \text{ g/mol}$

Natriumacetat: $M(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2) = 82,03 \text{ g/mol}$

3-Hydroxybuttersäure: $M(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_3) = 104,1 \text{ g/mol}$

Trockenmasse/Protein: $M(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}) = 102,1 \text{ g/mol}$

Phosphor: $M(\text{P}) = 31 \text{ g/mol}$

Stickstoff: $M(\text{N}) = 14 \text{ g/mol}$

Kohlenstoff: $M(\text{C}) = 12 \text{ g/mol}$

Bei Trockenmasse und Proteingehalt wurde die Formel $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}$ mit der Molaren Masse von 102,1 g/mol zugrunde gelegt (Abschlussbericht, Scherzer, 2008). Die übrigen Molaren Massen wurden aus der Rechentafel (Küster-Thiel, 2003) entnommen.

2.4.14 Berechnung des molaren Ertragskoeffizienten

$$\text{Ertragskoeffizient} = \text{Ertrag [mol]} / \text{Substratverbrauch [mol]}$$

2.4.15 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Polyphosphaten

2.4.15.1 Neisser-Färbung

Die Durchführung der Neisser-Färbung erfolgte in Anlehnung an Weltin, D. et al., 1993.

Lösung 1: 2 Teile Neisser-Lösung 1 (Methylenblau-Lösung, Roth 3463.2, 500 mL) und 1 Teil Neisser-Lösung 2 (Kristallviolett-Lösung, Roth 3464.2, 500 mL)

Lösung 2: Neisser-Lösung 3 (Chrysoidin-Lösung, Roth 3466.2, 500 mL)

Der Objektträger (R. Langenbrinck, ca. 76 x 26 mm/ 3 x 1 inch, geputzt/gebrauchsfertig, Emmendingen) wurden zunächst an der Luft getrocknet und anschließend hitzefixiert. Er wurde dann mit Lösung 1 bedeckt, nach 30 Sekunden erfolgte das Abgießen der Lösung. Nach vollständigem Bedecken mit Lösung 2 wurde der Objektträger nach 10 Sekunden mit bidest. Wasser abgespült. Unter dem Mikroskop (Leica DM R, Programm LAS V 4,0, Kamera Leica DFC420 C) bei 100-facher Vergrößerung mit Öl erscheinen Polyphosphate dunkelbraun bis schwarz.

2.4.15.2 DAPI-Färbung

Im Epicap (Reagiergefäße, Micro tubes, 1,5 mL; Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht) wurden 0,3 mL Probelösung mit 50 µL DAPI (0,2 mg/mL, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; Artikelnummer: 1.24653.0100; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) versetzt und im Dunkeln stehen gelassen, nach 20 Minuten wurde mikroskopiert. Auf den Objektträger (R. Langenbrinck, ca. 76 x 26 mm/ 3 x 1 inch, geputzt/gebrauchsfertig, Emmendingen) wurden ca. 2 Tropfen Probelösung gegeben und mit dem Deckglas (18 x 18 mm Deckgläser für Mikroskop, Art.- Nr. k 11818, Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, GmbH Edermünde) verschlossen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM R, Programm LAS V 4,0, Kamera Leica DFC420 C) erscheinen Polyphosphate gelb und DNA-Fragmente blau.

2.4.15.3 Polyphosphat-Extraktion

Die fraktionelle Extraktion der Polyphosphate erfolgte nach Clark et al. 1986.

Fraktion 1: kurzkettige Polyphosphate (Kettenlänge < 20 Phosphatreste)

Die Feuchtmasse (ca. 0,1-0,3 g) wurde mit 0,5 mL eiskalter 2 %-Trichloressigsäure (0,2 g Trichloressigsäure, 100 mL hochreines Wasser) gemischt und 20 Minuten auf Eis extrahiert. Dann wurde mittels Zentrifuge (Thermo Scientific Heraeus, Multifuge 1S-R) 10 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einem Reagenzglas gesammelt. Das Pellet wurde mit 1 mL eiskalter Trichloressigsäure/Aceton-Lösung (0,7 %/ 67 %, 0,07 g Trichloressigsäure, 100 mL Aceton) versetzt. Nach erneutem 20 minütigem Extrahieren auf Eis wurde bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem des vorigen Extraktionsschrittes zusammengeführt. Die vereinigten Überstände wurden mit dem gleichen Volumen Chloroform-Phenol-Lösung (6 g Phenol, 6 g Chloroform-Lösung) versetzt.

Fraktion 2: mittelkettige Polyphosphate (Kettenlänge 20-250 Phosphatreste)

Das Pellet aus Fraktion 1 wurde mit 67 % igem Aceton (335 mL Aceton, 165 mL hochreines Wasser) gewaschen. Anschließend wurden 0,5 mL 2 mM EDTA (0,367 g EDTA, 500 mL hochreines Wasser) und 25 µL 0,2 M LiOH (0,479 g LiOH, 100 mL hochreines Wasser) zugegeben (pH-Wert 7-8). Es wurde 15 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert und der Überstand in einem Reagenzglas gesammelt.

Fraktion 3: langkettige Polyphosphate (Kettenlänge 250-750 Phosphatreste)

Zum Pellet aus Fraktion 2 wurden 0,5 mL 2mM EDTA (0,367 g EDTA, 500 mL hochreines Wasser), 25 µL 0,2 M LiOH (0,479 g LiOH, 100 mL hochreines Wasser) und 0,2 mL Chloroform-Phenol-Lösung (6 g Phenol, 6 g Chloroformlösung) zugegeben. Nach 10 minütigem Extrahieren auf Eis und kurzem Zentrifugieren bei 3500 rpm zur Phasen-trennung, wurde der Überstand in ein Reagenzglas überführt.

Die Überstände aus Fraktion 1, 2 und 3 wurden auf je 4 mL mit hochreinem Wasser (Millipore) aufgefüllt.

Die Bestimmung des Phosphorgehalts in den Extrakten wurde mittels ICP-MS durchgeführt.

2.4.15.4 Fluoreszenzphotometrie

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Aschar-Sobbi et al., 2008.

In einer Küvette (Makro, 4 optisch klare Seiten; Artikelnummer: 634-0686; VWR International) wurde 1 mL Probe mit 300 µL DAPI (2 mg/ mL, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; Artikelnummer: 1.24653.0100; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) versetzt. Die fluoreszenzphotometrische Messung erfolgte nach 10 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln. Das Fluoreszenzphotometer (Fluorescence Spectrophotometer F-4500, Hitachi High-Technologies Corporation) zeigt beim Vorliegen von Polyphosphaten eine Verschiebung der Wellenlänge von ca. 470 auf ca. 550 nm.

Die quantitative Analyse erfolgte mit den Polyphosphat-Substanzen Budit 4 (Natriumpolyphosphat, food grade, MV 3248; Budenheim, Germany) und Sodiumtripolyphosphate (technical grade, 85 %; Artikelnummer: 238503-500G; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die Kalibrierung fand im Bereich von 50-1000 µg/L statt. Die Erstellung der Standardgeraden erfolgte mit HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES), 250 g; Artikelnummer: 1.10110.0250; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in Anlehnung an die Veröffentlichung von Diaz et al. (2010).

Diese Methode wurde im Rahmen der Arbeit entwickelt (siehe 3.1.1.3 im Ergebnisteil).

2.4.15.5 Gelelektrophorese

- EcoCell Elektrophoresezelle (vertikal); Anamed Elektrophorese GmbH, Darmstadt, Deutschland.
- TBE Laufpuffer, 5x Konzentrat, 1000 mL Artikelnummer: TB10060; Anamed Elektrophorese GmbH, Darmstadt, Deutschland.
- TBE Probenpuffer mit Farbstoff extra schwer, 5x Konzentrat, 10 mL; Artikelnummer: TB01075; Anamed Elektrophorese GmbH, Darmstadt, Deutschland.

- Fertiggel: NucGel TBE 20 %, 1.0 mm, 10 Bahnen; Artikelnummer: TB20110; Anamed Elektrophorese GmbH, Darmstadt, Deutschland.
- Fertiggel: NucGel-S TBU 15 %, 1.0 mm, 10 Bahnen; Artikelnummer: TU15110; Anamed Elektrophorese GmbH, Darmstadt, Deutschland.
- Herstellung Laufpuffer: Verdünnung 1:5, 1 Teil Laufpuffer und 4 Teile Millipore.
- Herstellung Probenpuffer ohne Farbstoff: Verdünnung 1:2, 500 µL Laufpuffer (6 fach), 300 µL Glycerin, 200 µL Millipore.
- Anfärben von Polyphosphaten mit Färbelösung Toluidinblau (500 mL): 0,05 % Toluidinblau in 25 % igem Methanol (250 mL Methanol absolut, 750 mL Leitungswasser) – 0,25 g Toluidinblau in 500 mL Methanol (25 %).
- Entfärbung mit Entfärbelösung (500 mL): 495 mL 25 %iges Methanol + 5 mL Glycerin.

Die Fraktionen 1 bis 3 wurden nach der Polyphosphat-Extraktion mit der Abdampfanlage (Thermo Scientific DC 10, mit Stickstoff, Wasserbad 60°C) eingengt. Es wird allerdings kein gleichmäßiges Verdampfen der Proben gewährleistet. Stickstoffabdampfanlage.

Tabelle 1: Beispiel für ein Pipettierschema (TBE-Gel 20 %, Einstellungen: 170 V, 15 mA, 50 Watt, Laufzeit 60 min).

Kammer	Probenbezeichnung	Proben- volumen [µL]	Proben- puffer [µL]
1	Budit 4 ohne HEPES (500 mg/L), Probenpuffer mit Farbstoff	8	2
2	Budit 4 ohne HEPES (500 mg/L), Probenpuffer ohne Farbstoff	6	2
3	C. elegans 1908, Fraktion 1, pH 5,5 , Probenpuffer ohne Farbstoff	12	4
4	C. elegans 1908, Fraktion 2, pH 5,5 , Probenpuffer ohne Farbstoff	12	4
5	C. elegans 1908, Fraktion 3, pH 5,5 , Probenpuffer ohne Farbstoff	12	4
6	C. elegans 1908, Fraktion 1, pH 2 , Probenpuffer ohne Farbstoff	12	4
7	C. elegans 1908, Fraktion 2, pH 2 , Probenpuffer ohne Farbstoff	12	4
8	C. elegans 1908, Fraktion 3, pH 2 , Probenpuffer ohne Farbstoff	12	4
9	Budit 4 mit HEPES (500 mg/L), Probenpuffer mit Farbstoff	8	2
10	Budit 4 mit HEPES (500 mg/L), Probenpuffer ohne Farbstoff	6	2

Diese Methode wurde im Rahmen der Arbeit entwickelt (siehe 3.1.1.2 im Ergebnisteil). Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Bark, 1992.

2.4.16 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Polyhydroxybuttersäuren

2.4.16.1 Sudanschwarz-Färbung

Die Durchführung der Sudanschwarz-Färbung erfolgte in Anlehnung an Weltin, D. et al., (1993).

Lösung A: 0,3 g Sudanschwarz B (Roth 0292.1, 10 g), in 100 mL 70 % (vol/vol) Ethanol

Lösung B: Xylol

Lösung C: 0,5 % (wt/vol) wässrige Safranninlösung (Safraninlösung 1 % ig, Roth CN01.1)

Der Objektträger (R. Langenbrinck, ca. 76 x 26 mm/ 3 x 1 inch, geputzt/gebrauchsfertig, Emmendingen) wurden zunächst an der Luft getrocknet und anschließend hitzefixiert. Das Präparat wurde 7 Minuten mit Lösung A behandelt, anschließend mit Lösung B gespült und 15 Sekunden mit Lösung C gegengefärbt. Zum Schluss wurde der Objektträger mit bidest. Wasser gespült. Unter dem Mikroskop (Leica DM R, Programm LAS V 4,0, Kamera Leica DFC420 C) bei 100-facher Vergrößerung mit Öl erscheinen im Hellfeld die sudanophilen Granula bläulich-schwarz und die Zellen rosa.

2.4.16.2 Polyhydroxybuttersäure-Isolierung und Quantifizierung von 3-Hydroxybuttersäure mittels Enzymreaktion

Die Isolierung und Quantifizierung der gebildeten Polyhydroxybuttersäure erfolgt in Anlehnung an das Praktikumsskript (Modulname: Mikrobiologisch-biochemisches Praktikum; Modulcode: MIBIPRA.BA.Nr. 156; Vers. 2009; Versuch Nr. 8 Speicherstoffe: Produktion von Poly- β -Hydroxybuttersäure. http://tu-freiberg.de/fakult2/bio/ag_mikrobio/lehre/Versuch8.pdf).

0,1 M Tris pH 8,0:

1,211 g Tris (Tris; Artikelnummer: 161-0716; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und 80 mL bidest. Wasser, Zugabe von HCl bis ~ pH 8,0, mit bidest. Wasser auf 100 mL auffüllen.

NAD-Lösung 33 mM:

2,19 g NAD (Artikelnummer: 481911-5GM; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in 100 mL bidest. Wasser lösen, aliquotieren und einfrieren.

β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (0,063 units):

(β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase, from *Pseudomonas lemoignei*, lyophilized powder $\geq$ 200 units/mg Protein; Produktnummer: H9408-25UN; Sigma-Aldrich, USA).

Ansetzen der β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase mit 0,063 units: 200 units in 31,746 mL bidest. Wasser lösen, damit 10 μ L 0,063 units enthalten, aliquotieren und einfrieren.

Ansetzen der β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase mit 0,2 units: 200 units in 10,0 mL bidest. Wasser lösen, damit 10 μ L 0,2 units enthalten, aliquotieren und einfrieren.

0,5 N NaOH:

1 N NaOH = 1 M NaOH 1:2 in bidest. Wasser verdünnen, 5 mL 1 M NaOH mit 5 mL bidest. Wasser versetzen.

1 N Salzsäure:

77,1 mL der 32 % igen Salzsäure in 922,9 mL bidest. Wasser lösen.

Polyhydroxybuttersäure-Isolierung

- Bestimmung der Feuchtmasse der Probe von 100 mL-Ansatz. Zentrifugation der Biomasse (Beckman CoulterTM, AvantiTM J-20XP Centrifuge, Rotor 14, 6500 rpm, 20 Minuten 4°C).
- Falcon mit Feuchtmasse + 10 mL 10 % ige Natriumhypochlorit-Lösung versetzen und 1 h bei 50°C im Trockenschrank erhitzen, von Zeit zu Zeit schütteln.
- Im Anschluss 45 Sekunden ins Ultraschallbad (Branson 5210).
- Verdünnung mit 33,33 mL bidest. Wasser, Zentrifugation bei 3500 rpm für 15 Minuten (Tischzentrifuge: Thermo Scientific Heraeus Multifuge 1S-R).
- 2 x Waschgänge: 20 mL bidest. Wasser, Zentrifugation bei 3500 rpm für 15 Minuten (Tischzentrifuge).
- 10 mL Ethanol, Zentrifugation bei 3500 rpm für 15 Minuten (Tischzentrifuge).
- Trocknen bei 60°C.
- Falcon wiegen.

Alkalische Hydrolyse:

- Zugabe von 900 µL 4M NaOH, 1 h bei 85°C in Trockenschrank
- Nach Abkühlen Zugabe von 600 µL 4 M HCl
- Beim Vorhandensein von Schwebstoffen → Zentrifugation

Enzymumsatz:

- 790 µL Tris/HCl
- 100 µL NAD 33 mM
- 10 µL Hydrolyseansatz
- Gut durchmischen und Extinktion bei 340 nm messen
- 100 µL β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase Lösung (0,2 units)
- Gut durchmischen und Küvetten mit Parafilm abdecken
- Schüttelschrank 30°C, 150 rpm
- Extinktion 3 x nach 20 Minuten messen (Extinktionswert ist nach ca. 40 Minuten konstant)

Nullwert = Küvette mit Wasser, Leerwert = 10 µL Wasser sonst verfahren wie Probe

Auswertung über die Formel: Lambert-Beer'sches-Gesetz

$$c = (\Delta E \cdot VT \cdot M) / (\epsilon \cdot d \cdot VP)$$

$$\Delta E = (E2 - E1)_{\text{Probe}} - (E2 - E1)_{\text{Blindwert}}$$

VT = Volumentestansatz, 1 mL

M = Molare Masse β -Hydroxybuttersäure, 104,1 g/mol

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, $\epsilon \cdot d = 6,3 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$

d = Schichtdicke

VP = Volumen Probe, 0,01 mL

Auswertung über die Standardgerade:

Standardgerade mit R-(-)-3-Hydroxybuttersäure (Sodium salt, Aldrich chemistry, Sigma-Aldrich).

Diese Methode wurde im Rahmen der Arbeit entwickelt (siehe 3.1.2.2 im Ergebnisteil). Da der Enzymtest nur die (R)-drehenden-3-Hydroxybuttersäuren erfasst, wurden die ermittelten Werte mit zwei multipliziert.

2.4.16.3 Polyhydroxybuttersäure-Isolierung und Quantifizierung von 3-Hydroxybuttersäure mittels Gaschromatographie

Large Volume-GC/MS:

Die Analyse der Chloroformphase erfolgt mit 40 μL Volumen auf einem Kaltaufgabeinjektor KAS 3 der Fa. GERSTEL mit einer GC/MS-Kopplung GC 5890/MSD 5972 der Firma AGILENT. Die Injektionen werden temperaturprogrammiert durchgeführt mit einer Starttemperatur von 20°C und einer Isotherme von 0,1 Minuten, dann mit einer Heizrate von 10°C/Sec. auf 300°C, dort 1 Min. isotherm, dann mit einer Heizrate von 1°C/Sec. auf 330°C und dort 1 Min. isotherm.

Gaschromatographische Parameter:

Die gaschromatographische Trennung erfolgt über eine 30 m lange Kapillarsäule der Firma RESTEK, Stabilwax DA, Innendurchmesser 250 μm und 0,25 μm Filmdicke. Die Analysen wurden temperaturprogrammiert durchgeführt mit einer Starttemperatur von 40°C und einer Isotherme von 5 Min., dann mit einer Heizrate von 5°C/Min. auf 120°C, dort 0,01 Min. isotherm, dann mit einer Heizrate von 15°C/Min. auf 210°C, dort 0,01 Min. isotherm, dann mit 5°C/Min. bis 230°C, dort 14,64 Min. isotherm bis zum Ende der Trennung.

Massenspektrometrische Parameter:

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte in einem Massenbereich von 10-200 amu bei einer Scanrate von 2,2 Scans/sec. Die Beheizung für die Ionenquelle und den Quadrupol wurde über das Interface mit 250°C eingestellt.

Die detaillierte Durchführung der gaschromatographischen Untersuchungen zum Nachweis von Polyhydroxybuttersäure befindet sich im Ergebnisteil unter 3.1.2.3. Es wurde nach zwei unveröffentlichten institutseigenen Methoden gearbeitet (Dr. Möller, 2013, 2014).

3. Ergebnisse

3.1 Nachweismethoden für die polymeren Verbindungen Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure

3.1.1 Qualitativer und quantitativer Nachweis mikrobiell gebildeter Polyphosphate

Es sollte untersucht werden, ob Polyphosphate in den Pilzen *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908), *Absidia corymbifera*, *Mucor plumbeus* und *Rhizopus stolonifer* gebildet wurden. Sie sollten dann mikroskopisch mittels Neisser- und DAPI-Färbung, fluoreszenzphotometrisch und mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Dabei wird in diesem Kapitel auch auf die gewählten und weiterentwickelten Methoden zum Nachweis von Polyphosphaten in Mikroorganismen eingegangen.

3.1.1.1 Mikroskopischer qualitativer Nachweis von Polyphosphaten mittels Neisser- und DAPI-Färbung

Zunächst werden die beiden Präparationstechniken dargestellt, die notwendig waren, um die gespeicherten Polyphosphate im Pilzininneren anzufärben.

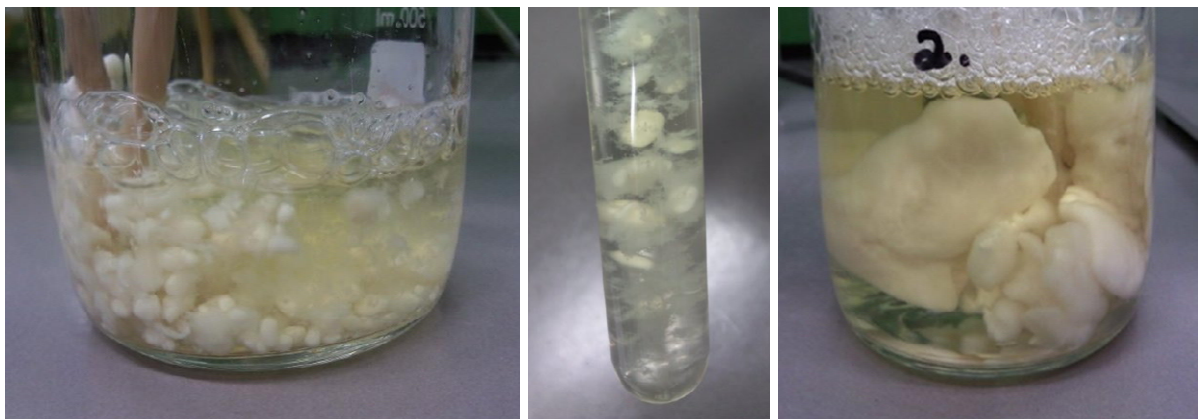


Abbildung 14: *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) nach sechstägiger Kultivierung mit Druckluft (links), Reagenzglas mit dem Ansatz nach sechstägiger Inkubation mit Druckluft (Mitte) und *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) nach dreitägiger Kultivierung mit Druckluft (rechts).

Die Abbildung 14 zeigt zwei Ansätze nach mehrtägiger Begasung mit technischer Luft, wobei in der linken Probe der Pilz *Cunninghamella elegans* nach sechs Tagen in Klümpchen und Flocken zerfallen ist. Rechts ist *Cunninghamella elegans* nach dreitägiger Kultivierung abgebildet. Es zeigen sich große Verklumpungen, die ohne Behandlung nicht mikroskopierfähig sind.

Bei der ersten Probenvorbereitung wurde der Pilz mit KOH-Lösung behandelt. Die Einwirkzeiten variierten zwischen 20 und 50 Minuten, wobei alternativ mit und ohne Neutralisation gearbeitet wurde. Wurde nicht neutralisiert, zerfiel die Biomasse in homogene kleine Teile, die gut zu mikroskopieren waren. Allerdings kam es bei Einsatz der Neisser-Färbung (Nachweis von Polyphosphaten) zu Farbverfälschungen (siehe Abbildung 15), da diese im sauren Milieu stattfindet. Deshalb wurde der Pilz nach Behandlung mit KOH-Lösung neutralisiert. Dies führte zu einem verminderten Zerfallsprozess der Biomasse (mehrere große Teile), so dass das Präparat zum Mikroskopieren ungeeignet war.

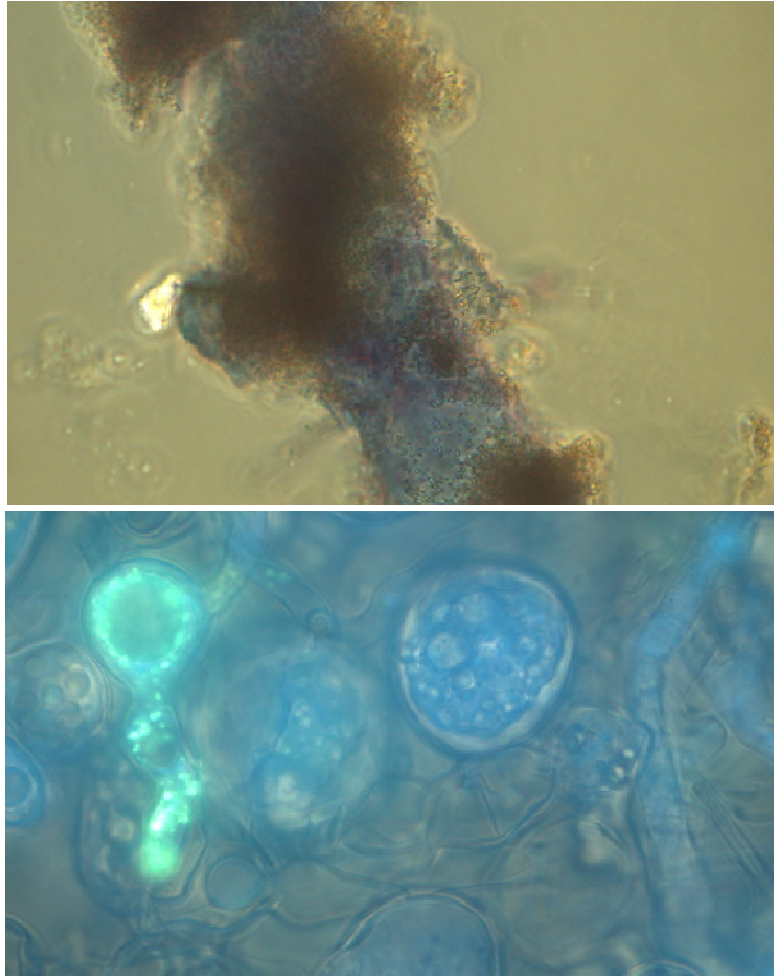


Abbildung 15: Mikroskopische Untersuchungen von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) nach Behandlung mit KOH-Lösung ohne Neutralisation. Neisser-Färbung (oben) und DAPI-Färbung (unten).

Bei der zweiten Probenvorbereitung wurde *Cunninghamella elegans* mittels Ultraschall behandelt. Gewählt wurde die niedrigste Einstellung bei Variation der Behandlungszeit (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 Minuten). Dadurch wurde die Biomasse in einen mikroskopierfähigen Zustand gebracht. Allerdings sollte die Einstellung 0,5 Minuten gewählt werden, um das Zerreißen bzw. die Zerstörung des Präparats zu vermeiden.

Beim Vergleich der beiden Präparationsmethoden ist die Behandlung mit Ultraschall zu präferieren, da der Zeitaufwand geringer ist und das Ergebnis nicht verfälscht wird. Deshalb wurde die Präparationstechnik mit Ultraschall bei allen Versuchsansätzen der vorliegenden Arbeit angewendet.

Die Kultivierung der Pilze erfolgte vier Tage lang im 250 mL-Erlenmeyerkolben in 100 mL Medium mit Hefeextrakt und 1 mL Sporensuspension bei 30°C im Schüttelschrank. Nach der Inkubation im Schüttelschrank wurde die gebildete Biomasse vom Medium separiert und jeweils mit bidest. Wasser eines pH-Werts von 5,5 bzw. 2 gewaschen. Die Abbildung 16 zeigt Ausschnitte der Pilze *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908), *Absidia corymbifera* und *Rhizopus stolonifer* gewaschen mit bidest. Wasser eines pH-Werts von 5,5 bzw. 2 nach dem Anfärben mit Neisser-Lösung.

Es sind sehr kleine dunkle Granula vorhanden, die teilweise mikroskopisch bei 100-facher Vergrößerung in den unterschiedlichen Myzel-Strukturen schwer erkennbar sind. Die Polyphosphatgranula sind an der Pilzoberfläche und abhängig vom pH-Wert des Waschmediums, auch in der Suspension zu sehen.

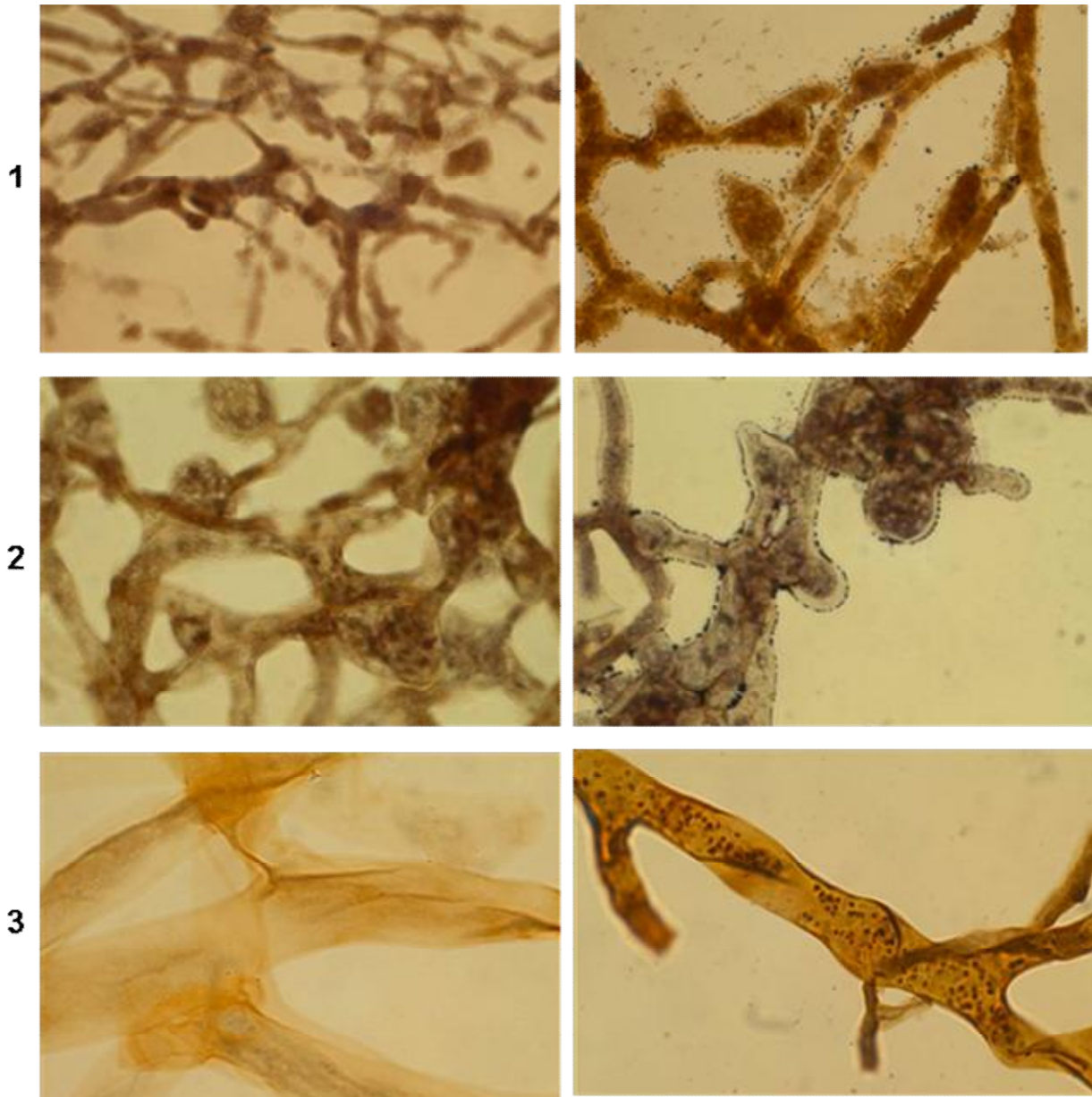


Abbildung 16: Neisser-Färbung von
1. *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908),
2. *Absidia corymbifera*,
3. *Rhizopus stolonifer*,
nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (Mitte) und pH 2 (unten).

Die folgende Abbildung 17 zeigt am Beispiel von *Cunninghamella elegans* den Pilz unge-
waschen, gewaschen mit bidest. Wasser eines pH-Wertes 5,5 und 2.

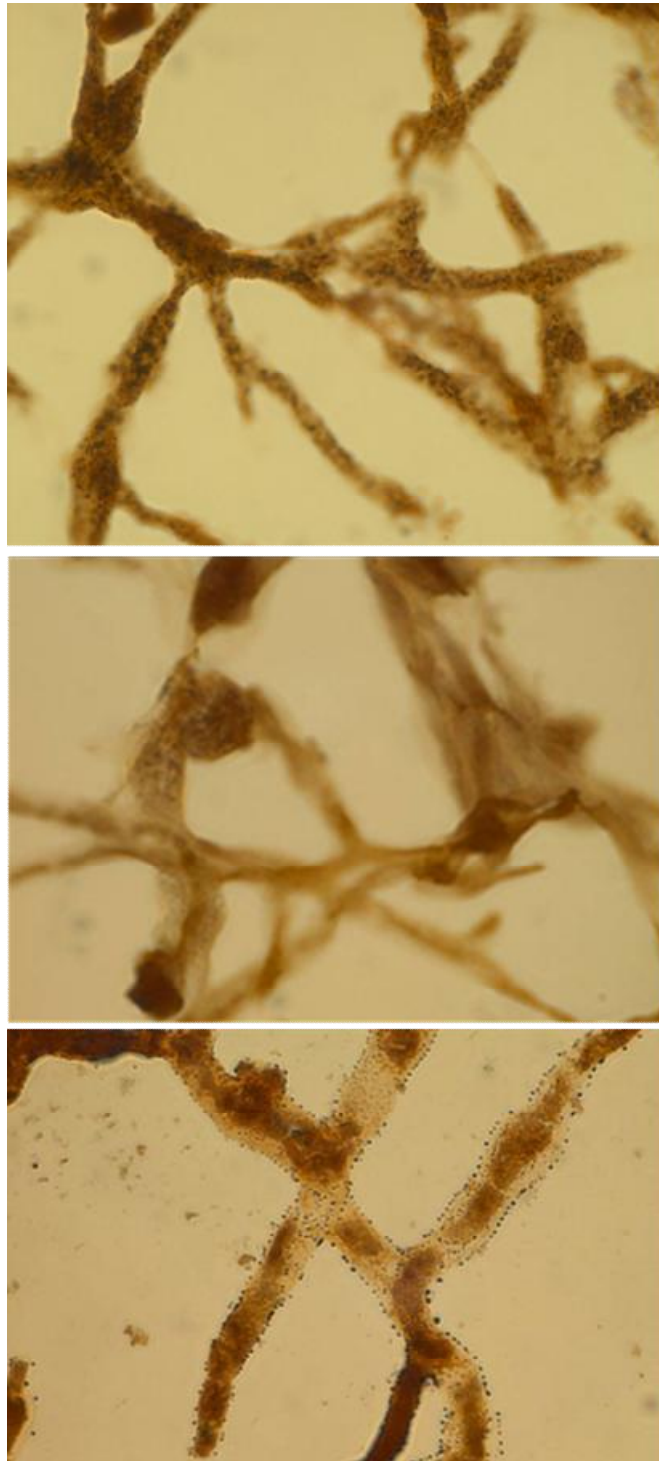


Abbildung 17: Neisser-Färbung von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Medium (oben), nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (Mitte) und pH 2 (unten).

Im Pilzmyzel des ungewaschenen *Cunninghamella elegans* sind Polyphosphatgranula zu sehen. Beim Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5 finden sich am Myzel und in der Suspension kaum dunkle Granula, während bei Verwendung von Waschwasser mit einem pH-Wert von 2 Granula an der Pilzoberfläche außerhalb des Myzels und in der Lösung sichtbar sind. Die Ab- beziehungsweise Anlagerungen der Polyphosphatgranula am Pilzmyzel können auf die Präparation mit Ultraschallstab zurückzuführen sein, obwohl die niedrigste Einstellung gewählt wurde, um eine Zerstörung des Präparats weitgehend zu vermeiden.

Unter gleichen Kultivierungs- und Präparationsbedingungen wurde die DAPI-Färbung bei *Cunninghamella elegans* angewendet. Die folgende Abbildung 18 zeigt den Pilz ungewaschen, gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5 und pH 2.

Beim ungewaschenen Präparat sind gelbe Einschlüsse im Pilz zu erkennen, die auf Polyphosphate hindeuten. Wurde der Pilz mit bidest. Wasser pH 5,5 gewaschen, schwimmen gelbe Granula in der Suspension. Beim Waschen mit bidest. Wasser pH 2 sind im Pilz und in der Lösung gelb fluoreszierende Partikel zu erkennen.

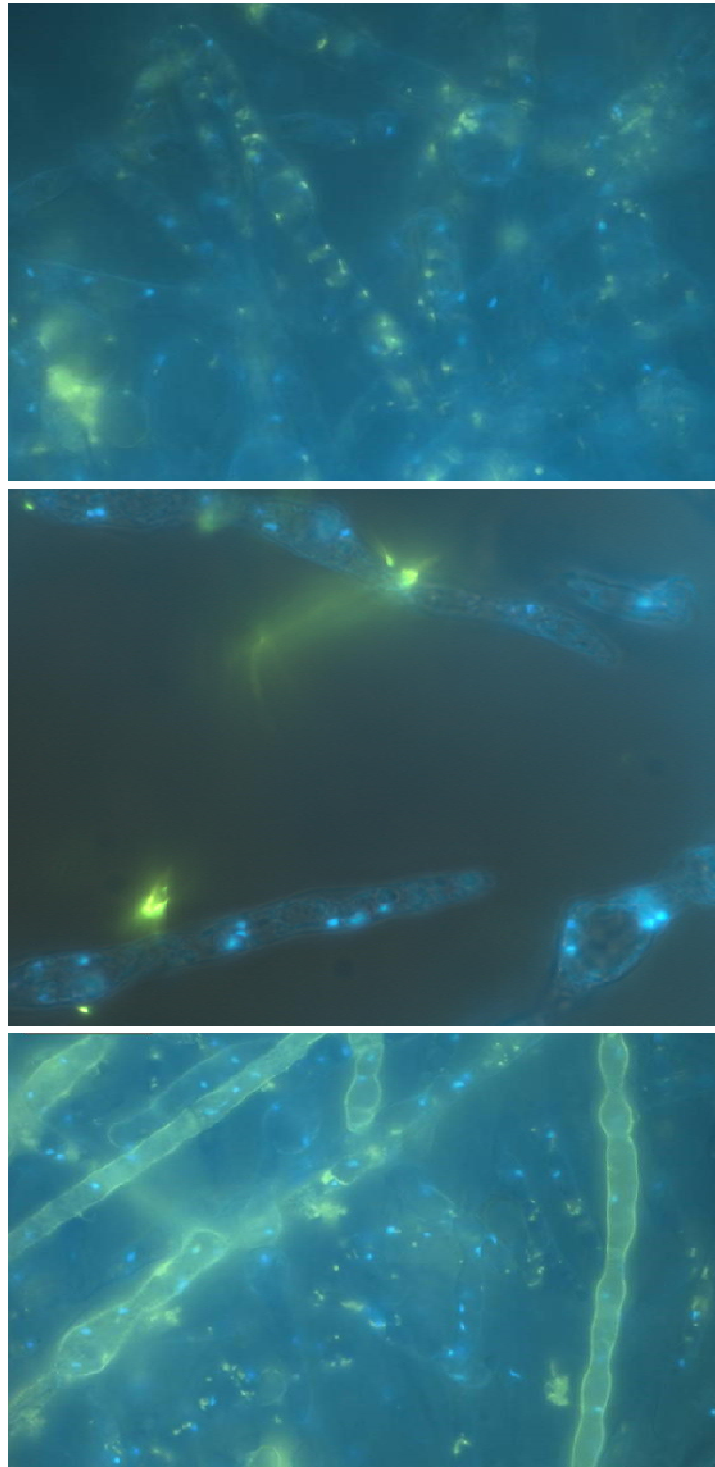


Abbildung 18: DAPI-Färbung von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Medium (oben), nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (Mitte) und pH 2 (unten).

Des Weiteren sollten aus der *Cunninghamella elegans*-Biomasse Polyphosphate isoliert werden. Dies erfolgte nach dem Extraktionsverfahren nach Clark et al. (1986) bei dem kurz- (Fraktion 1), mittellang- (Fraktion 2) und langkettige (Fraktion 3) Polyphosphate gewonnen werden.

Die folgenden Abbildungen 19 und 20 zeigen die mittels Neisser-Färbung behandelte Biomasse vor der Extraktion, nach Isolierung der kurzkettigen Polyphosphate (Fraktion 1), nach weiterer Isolierung der mittellangkettigen Polyphosphate (Fraktion 2) und nach Abtrennung der langkettigen Polyphosphate (Fraktion 3). Weitere Abbildungen befinden sich im Anhang (Abbildung 140 und 141).

In der Biomasse vor der Polyphosphatextraktion sind in der Mitte des Bildausschnitts neben feinen Polyphosphatgranula längliche intrazelluläre Wandablagerungen zu erkennen. Nach Isolierung der kurzkettigen Polyphosphate sind dunkle Wandablagerungen im Myzel sichtbar. Sind mittellang- und langkettige Polyphosphate abgetrennt, ist keine Aussage möglich, da sich Farbveränderungen einstellten. Die Biomasse wurde nach den Extraktionsschritten verworfen.

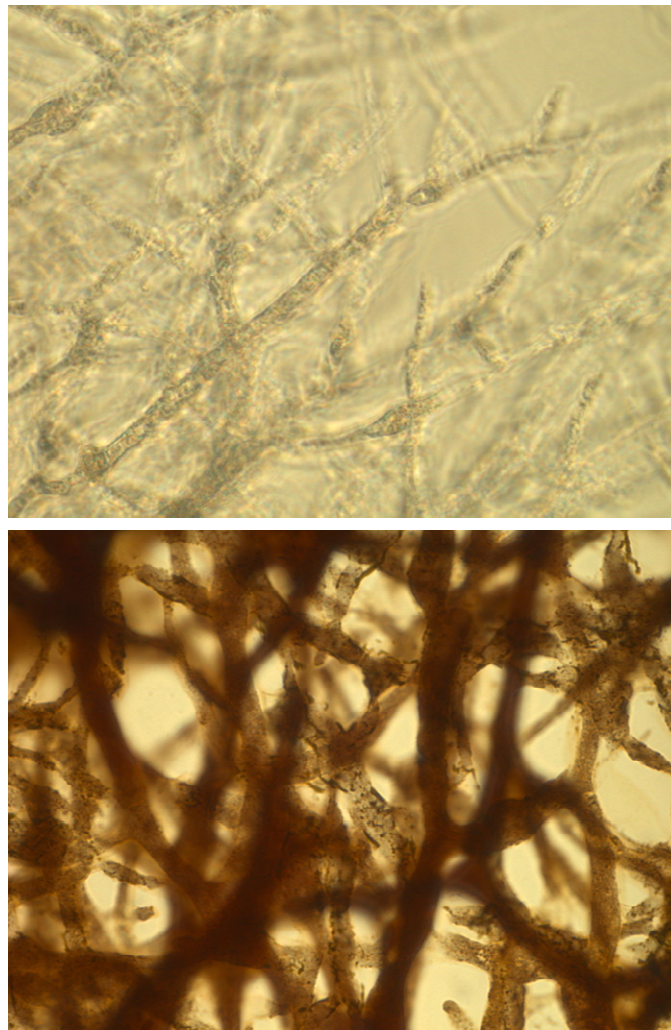
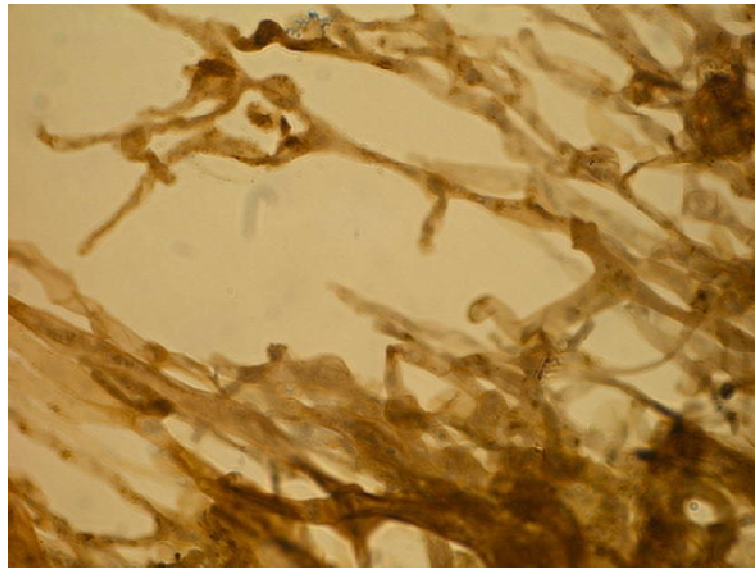
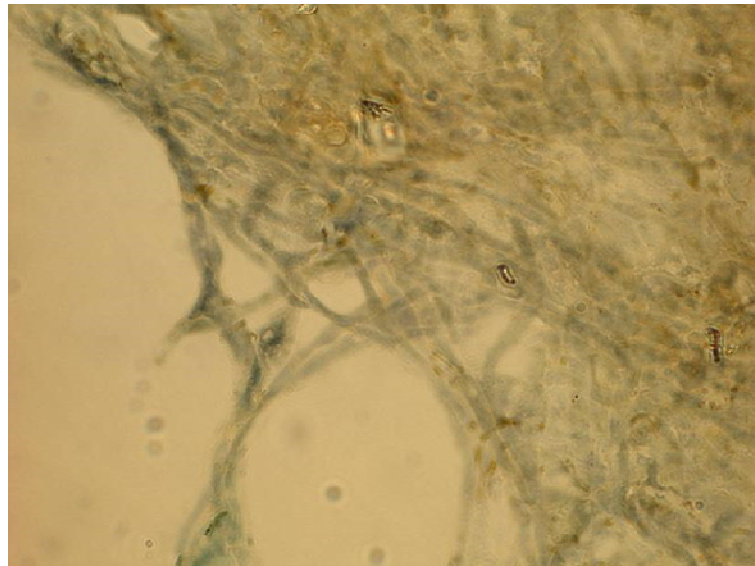


Abbildung 19: Nativpräparat von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) (oben) und Neisser-Färbung des Pellets vor der Polyphosphatextraktion (unten). Präparat ohne Ultraschallbehandlung.

Fraktion 1



Fraktion 2



Fraktion 3

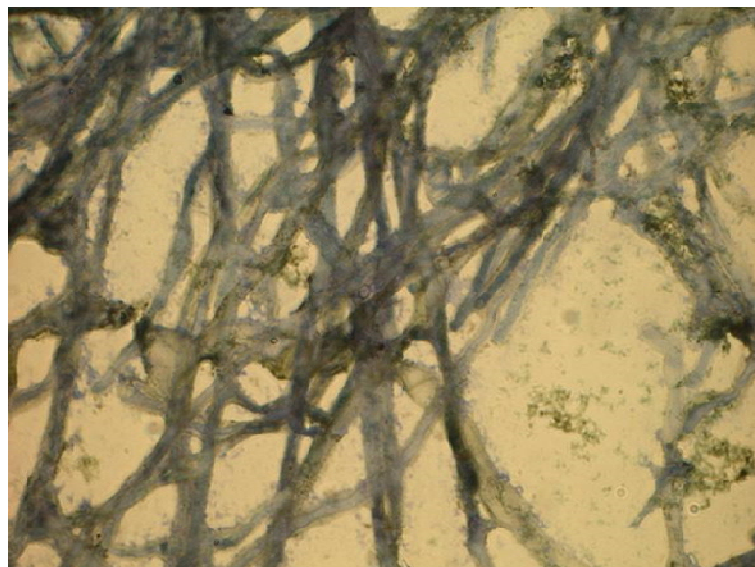


Abbildung 20: Neisser-Färbung nach Polyphosphatextraktion von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) ungewaschen, Fraktion 1 (oben), Fraktion 2 (Mitte) und Fraktion 3 (unten).

Die Abbildung 21 zeigt die Überstände der Biomasse mit den isolierten kurz-, mittellang- und langkettigen Polyphosphaten nach dem Anfärben mit DAPI. Bei 100-facher Vergrößerung sind unter dem Mikroskop längliche gelb fluoreszierende Partikel sichtbar, bei denen es sich um Polyphosphate handeln kann.

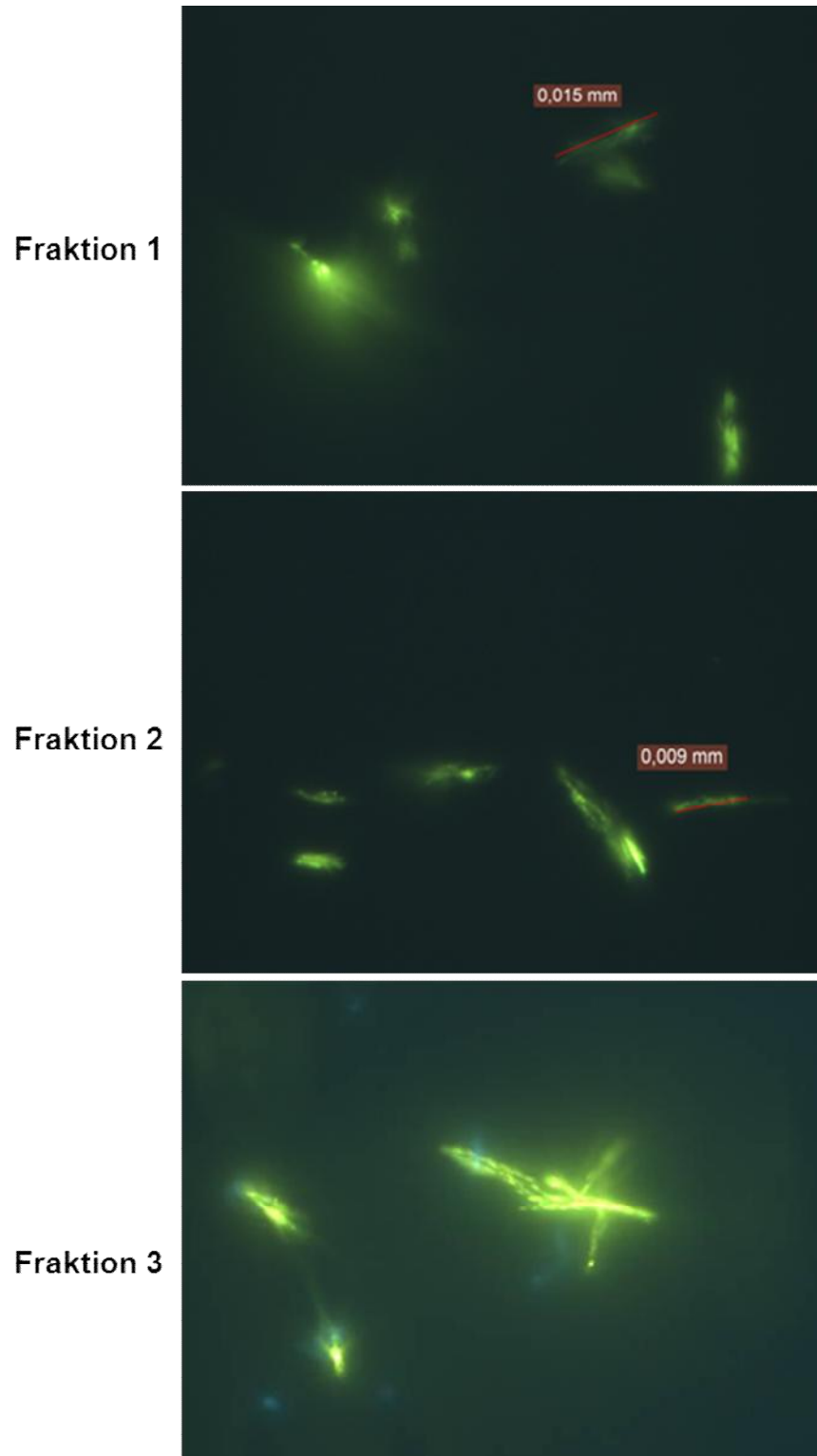


Abbildung 21: DAPI-Färbung: Überstand von Fraktion 1 (oben links), Fraktion 2 (oben rechts) und Fraktion 3 (unten) von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) nach Waschen mit bidest. Wasser pH 2.

3.1.1.2 Qualitativer Nachweis der gebildeten Polyphosphate im Pilz mittels Gelelektrophorese

Die bei der Kultivierung von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908 und IFM 46109), *Absidia corymbifera* und *Rhizopus stolonifer* gebildeten Polyphosphate sollten mit Hilfe der Gelelektrophorese qualitativ nachgewiesen werden. In diesem Kapitel wird die Methode der Gelelektrophorese dargestellt. Der Nachweis erfolgte in Anlehnung an Bark (1992).

Zum Einsatz kam die oben abgebildete Gelelektrophoresekammer der Firma Anamed Elektrophorese GmbH, die mit Laufpuffer gefüllt war. Als Gel wurde TBE 20 % verwendet. Die Proben bzw. Standards wurden mit Probenpuffer in die Bahnen pipettiert, wobei die Standards zum Erkennen der Fließmittelfront am Ende der Laufzeit Probenpuffer mit Farbstoff enthielten (siehe Abbildung 22).

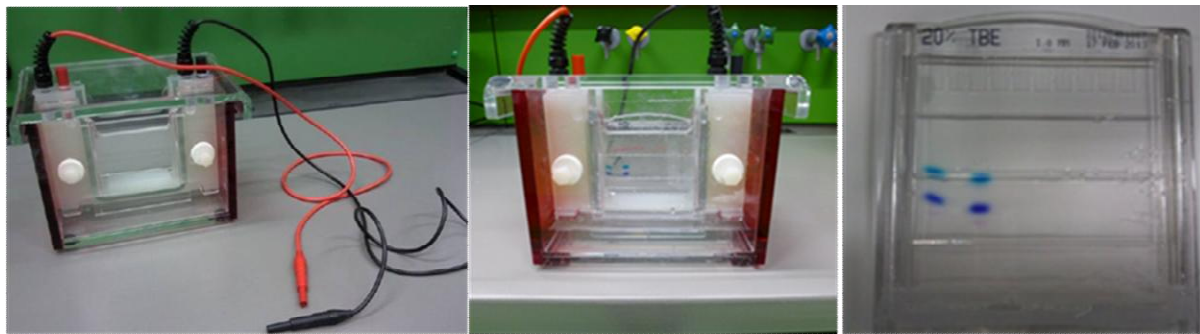


Abbildung 22: Gelelektrophoresekammer (links), Gelelektrophoresekammer mit TBE-Gel (Mitte) und Fertiggel TBE 20 %, Probenpuffer mit und ohne Farbstoff, nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 60 Minuten (rechts).

Die einzelnen Parameter, wie Laufzeit der Gelelektrophorese und Volumen von Proben und Probenpuffer wurden variiert. Die optimierte Methode beinhaltet die Einstellungen 170 V, 15 mA, 50 Watt und eine Laufzeit von 60 Minuten. Diese Einstellungen wurden für alle Versuchsansätze der vorliegenden Arbeit angewendet.

Als Standard diente Budit 4 (Natriumpolyphosphat mit einer Kettenlänge von ≥ 28). Er wurde in bidest. Wasser gelöst und der pH-Wert mit HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) gepuffert.

Die sechstägige Kultivierung der Pilze erfolgte im Medium mit Hefeextrakt bei 30°C und einer Druckluftzuführung über zwei Schläuche. Die gebildeten Polyphosphate wurden nach der Methode von Clark et al. (1986) extrahiert. Untersuchungsgegenstand waren die Fraktionen 1 bis 3 (kurz- bis langkettige Polyphosphate) der Pilze.

Diese Fraktionen und der Standard wurden in das Gel pipettiert. Nach einer Laufzeit von 45 bis 90 Minuten wurde das Gel aus der Verpackung gelöst. Anschließend wurde es in einer Schale 15 Minuten lang mit Toluidinblau-Lösung eingefärbt und dabei manuell leicht geschüttelt. Das Entfärben des Gels verlief nur schleppend und nach mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung. Zufriedenstellend war das Ergebnis bei Einwirkung der Entfärbelösung über Nacht.

Zunächst waren nur die Bahnen des Standards mit einer Konzentration von 500 mg/L zu sehen. Die Fraktionen 1 bis 3 zeigten kein Ergebnis (siehe Abbildung 23). Da bei diesen Proben fluoreszenzphotometrisch und mikroskopisch Polyphosphate qualitativ nach-

gewiesen werden konnten, war möglicherweise die zu geringe Konzentration an Polyphosphaten ursächlich.

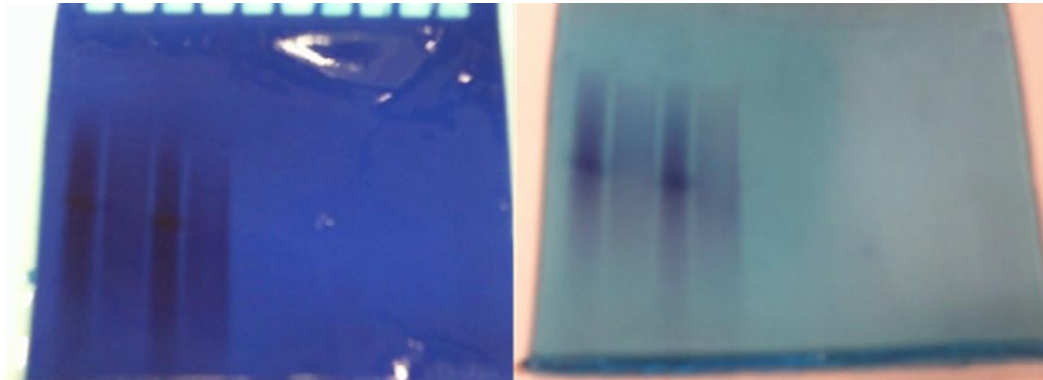


Abbildung 23: Gel nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 90 Minuten. TBE-Gel-Bahnen (N=10) nach dem Färben mit Toluidinblau (links) und nach mehrmaligen Spülen mit Entfärbelösung (rechts). Die Proben wurden nach Extraktion mit Millipore verdünnt. Bahnen 1 bis 4: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff. Bahnen 5 bis 10: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff.

Deshalb wurden die Proben nach der Extraktion der Polyphosphate nach Clark et al. (1986) nicht mehr, wie anfänglich, mit Millipore (hochreines Wasser) verdünnt und es erfolgte eine Einengung der Proben mit Hilfe der Abdampfanlage (mit Stickstoff, Wasserbad 60°C). Allerdings konnte kein gleichmäßiges Verdampfen der Proben gewährleistet werden.

Nach erneutem Pipettieren ins Gel konnten nach einer Laufzeit von 60 Minuten und dem Färben bzw. Entfärben des Gels neben dem Standard (Kettenlänge von ≥ 28) auch die Proben der Fraktion 2 (Kettenlänge 20-250) und 3 (Kettenlänge 250-750) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 24). Fraktion 1 (Kettenlänge < 20) blieb unsichtbar. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass Polyphosphate der Fraktion 1 im Pilz nicht existieren oder dass diese durch das Gel gewandert sind.

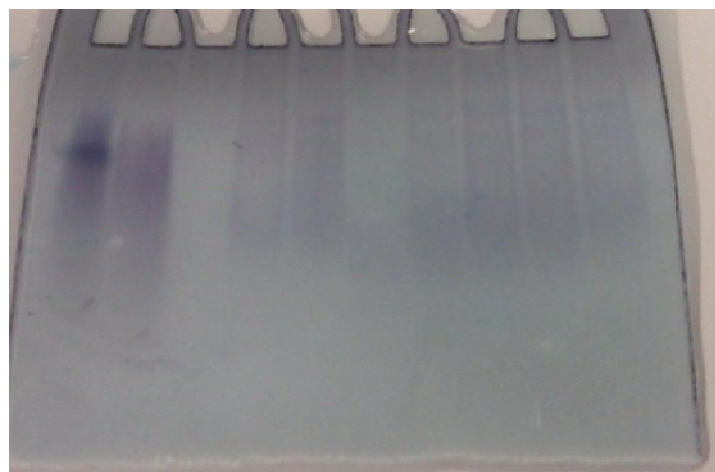


Abbildung 24: Gel nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 45 Minuten. TBE-Gel-Bahnen (N=10) nach mehrmaligen Spülen mit Entfärbelösung. Die Proben wurden nach Extraktion nicht mit Millipore verdünnt. Bahnen 1 und 2: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff. Bahnen 3 bis 5: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 6 bis 8: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 8, 9 und 10 enthalten dieselbe Probe.

Zum Vergleich erfolgte der Nachweis der Polyphosphate bei *Cunninghamella elegans* mit TBU-Gelelektrophorese, um die verwendeten TBE-Gele als Störfaktoren auszuschließen.

Als problematisch erwies sich das Pipettieren der Standards und Proben in die Geltaschen, da ein Diffundieren zwischen den Taschen stattfand. Zudem sind die dünnen Gele sehr instabil, so dass das einwandfreie Herauslösen aus den Platten nicht möglich war (siehe Abbildung 25). Deshalb wurden bei allen Versuchsansätzen der vorliegenden Arbeit TBE-Gele angewendet.

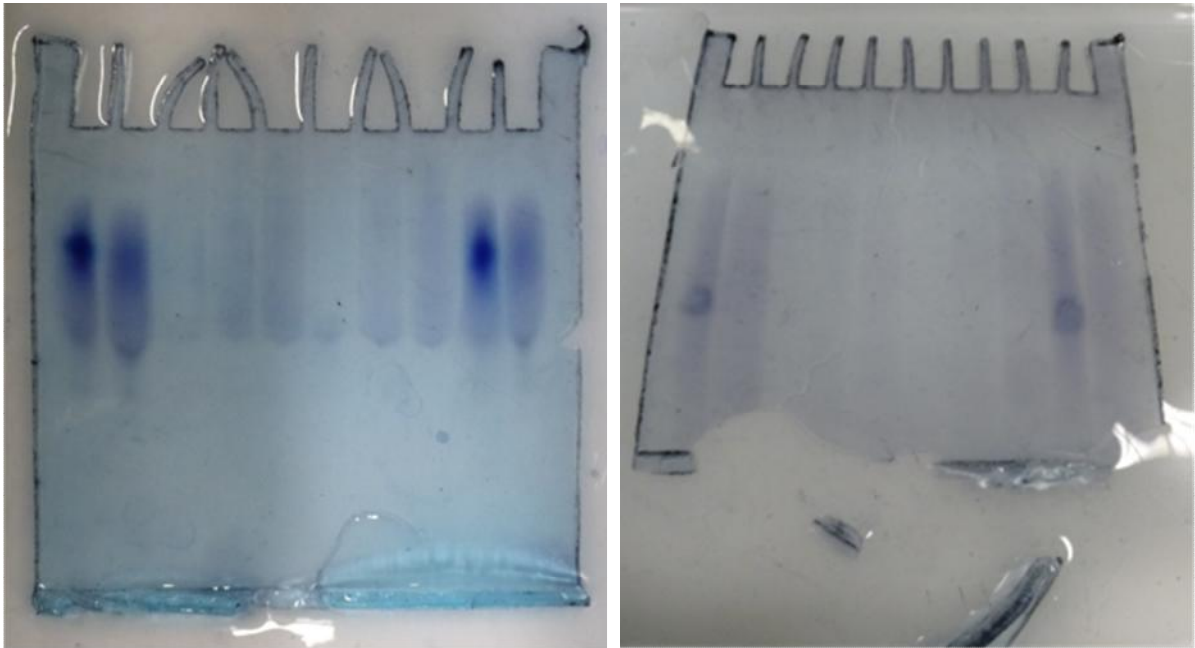


Abbildung 25: Gel nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 30 (links) bzw. 65 (rechts) Minuten. TBU-Gele-Bahnen (N=10) mehrmaligen Spülen mit Entfärbelösung. Die Proben wurden nach Extraktion nicht mit Millipore verdünnt. Bahnen 1 und 2: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff. Bahnen 3 bis 5: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 6 bis 8: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 9 und 10: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff.

Die folgende Abbildung 26 zeigt die TBE-Gele nach dem Färben bzw. Entfärben mit Toluidinblau am Beispiel von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908). Die Abbildung für die Pilze *Absidia corymbifera* und *Rhizopus stolonifer* befinden sich im Anhang (Abbildungen 142 bis 145).

Die Abbildung zeigt das Gel nach der Elektrophorese. Untersucht wurden der Standard Budit 4 (Natriumpolyphosphat, Kettenlänge ~ 28) und die extrahierten Proben aus der mit bidest. Wasser pH 5,5 und 2 gewaschenen *Cunninghamella elegans*-Biomasse. Es sind Bahnen in unterschiedlicher Intensität sichtbar mit Ausnahme bei Fraktion 1. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass kurzkettige Polyphosphate durch das Gel gewandert sind, kurzkettige Polyphosphate nicht vorkommen oder ihre Konzentration im Überstand zu gering ist. Hingegen zeigen die Banden der Fraktionen 2 und 3 das Vorhandensein mittellang- und langkettiger Polyphosphate.

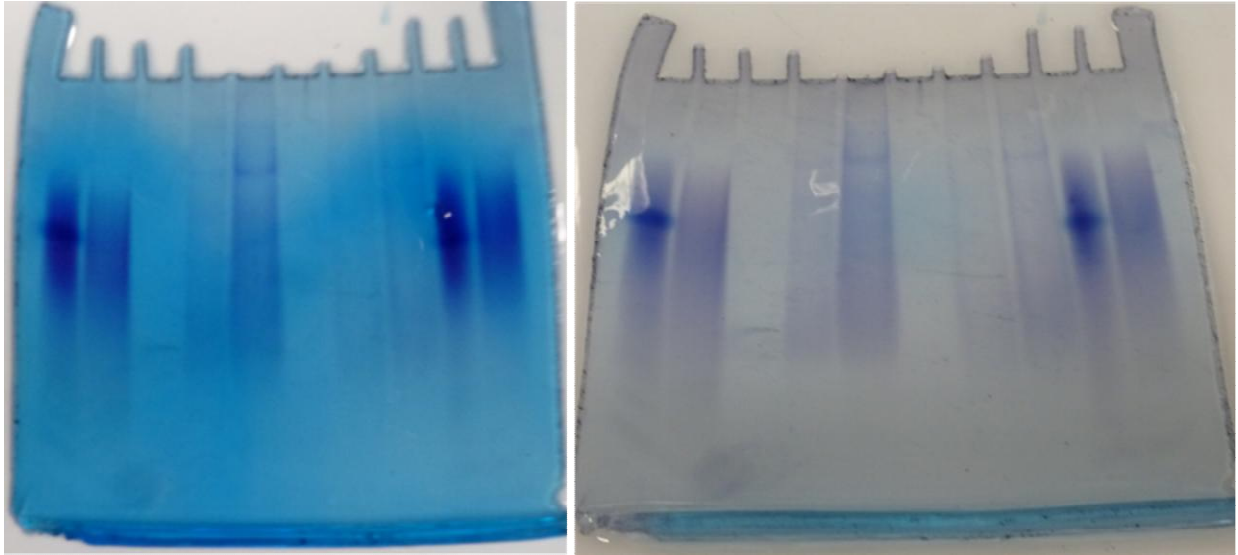


Abbildung 26: Gel nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 60 Minuten. TBE-Gel-Bahnen (N=10) nach dem Färben mit Toluidinblau (links) und nach mehrmaligen Spülen mit Entfärbelösung (rechts).
Die Proben wurden nach Extraktion mit Hilfe der Abdampfanlage eingengt.
Bahnen 1 und 2: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff.
Bahnen 3 bis 5: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff.
Bahnen 6 bis 8: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff.
Bahnen 9 und 10: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff.

3.1.1.3 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Polyphosphatstandardsubstanzen mittels Fluoreszenzphotometrie

Es wurden die Standardsubstanzen Pentanatriumtriphosphat (Sigma-Aldrich, Kettenlänge ≥ 3) und Budit 4 (Budenheim, Kettenlänge ≥ 28) qualitativ fluoreszenzphotometrisch untersucht. Diese Standardsubstanzen wurden in bidest. Wasser gelöst und mit DAPI angefärbt. Die fluoreszenzphotometrische Messung erfolgte nach 10 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln. Zunächst wurde beim Fluoreszenzphotometer (Hitachi F- 4500) ein Wellenlängenbereich von 300-900 nm gewählt. Neben dem Einstrahlungsspeak traten mehrere Peaks auf, die teilweise nicht zuzuordnen waren. Deshalb wurde der Wellenlängenbereich auf 415-650 nm eingeschränkt. Zudem wurden andere Parameter, wie Scan Speed und Response, variiert. Die optimierte Methode ist im Folgenden dargestellt (siehe Tabelle 2) und wurde für den qualitativen Nachweis der Polyphosphate bei allen Versuchsansätzen der vorliegenden Arbeit angewendet.

Tabelle 2: Einstellungen am Fluoreszenzphotometer für den qualitativen Nachweis der Polyphosphate.

Measurement type:	Wavelength Scan
Scan mode:	Emission
Data mode:	Fluorescence
EX WL:	415 nm
EM Start WL:	425 nm
EM End WL:	650 nm
Scan Speed:	2400 nm/min
Delay:	0 s
EX Slit + EM Slit:	5 nm
PMT Voltage:	700 V
Response:	0,5 s
Corrected Spectra:	Off
Shutter Control:	On

Die Abbildung 27 zeigt den Wellenlängenscan der Standardsubstanzen. Das Maximum des DAPI-Peaks liegt bei 470 nm, während bei den Polyphosphatstandards das Maximum bei 550 nm liegt. Die Wellenlängenverschiebung von 470 auf 550 nm ist auf den DAPI-Polyphosphat-Komplex zurückzuführen.

Bereits in der Veröffentlichung von Aschar-Sobbi et al. (2008) konnten Polyphosphate mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 15 und 130 mit Hilfe der Wellenlängenverschiebung des DAPI-Polyphosphat-Komplexes erkannt werden.

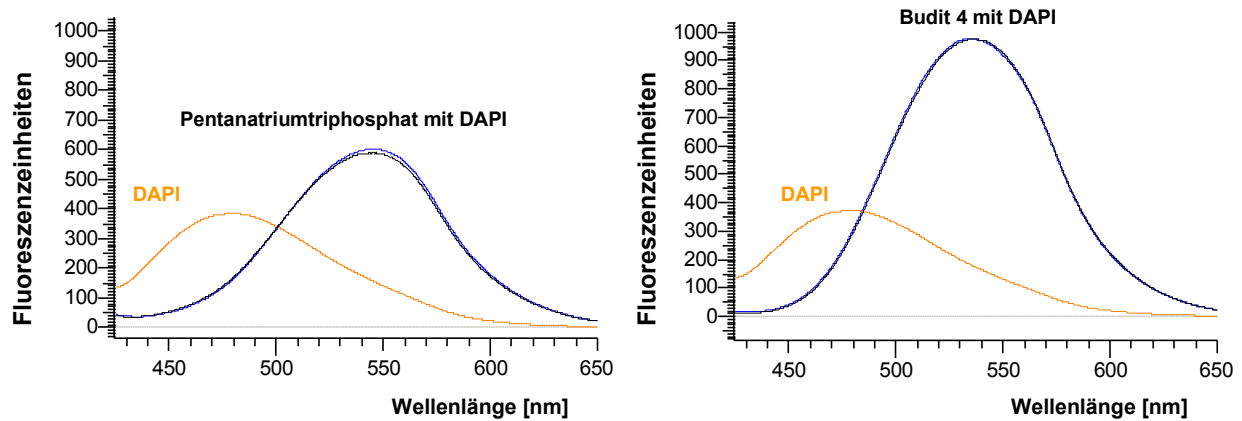


Abbildung 27: Wellenlängenscan, orange: DAPI, blau/schwarz: Polyphosphatstandard (10 mg/0,6 mL), Pentatriumtriphosphat (links) und Buditi 4 (rechts).

Im Folgenden wurden die genannten Polyphosphate quantitativ untersucht. Die Einstellungen am Fluoreszenzphotometer sind tabellarisch dargestellt und wurden für den quantitativen Nachweis der Polyphosphate bei allen Versuchsansätzen der vorliegenden Arbeit angewendet.

Tabelle 3: Einstellungen am Fluoreszenzphotometer für den quantitativen Nachweis der Polyphosphate.

Measurement type:	Photometry
Data mode:	Fluorescence
Number of Wavelengths:	1
Wavelength mode:	Both WL fixed
WL 1:	415/550 nm
Integration time:	0,1 s
Delay:	0s
EX Slit + EM Slit:	5 nm
PMT Voltage:	700 V

Die Konzentration der Standards wurde zunächst zu hoch gewählt, so dass keine Linearität bei der Extinktionsmessung mittels Fluoreszenzphotometer erreicht werden konnte. Eine Verringerung der Konzentrationen brachte ebenfalls keine Linearität bei der Messung der Standards. Als problematisch erwies sich die Probenpräparation, da die Standards nach Lösung in Millipore (hochreines Wasser) unterschiedliche pH-Werte aufwiesen.

Deshalb wurden die Standards in Anlehnung an Diaz et al. (2010) angesetzt. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 50 bis 1000 µg/L gewählt, die Stammlösung wurde in Millipore angesetzt und mit HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) ein pH-Wert von 7 eingestellt.

In den Messkolben wurden die Standards alternativ mit Millipore bzw. HEPES aufgefüllt. Nach zehnminütiger Inkubation im Dunkeln erfolgte die fluoreszenzphotometrische Messung, bei der zunächst eine DAPI-Konzentration von 0,2 mg/mL gewählt wurde. Zur Optimierung

des Messverfahrens wurden die Polyphosphate mit einer Konzentration an DAPI von 2 mg/mL angefärbt.

Die Abbildungen 28 bis 31 zeigen die unterschiedlich angesetzten Standards am Beispiel von Pentanatriumtriphosphat.

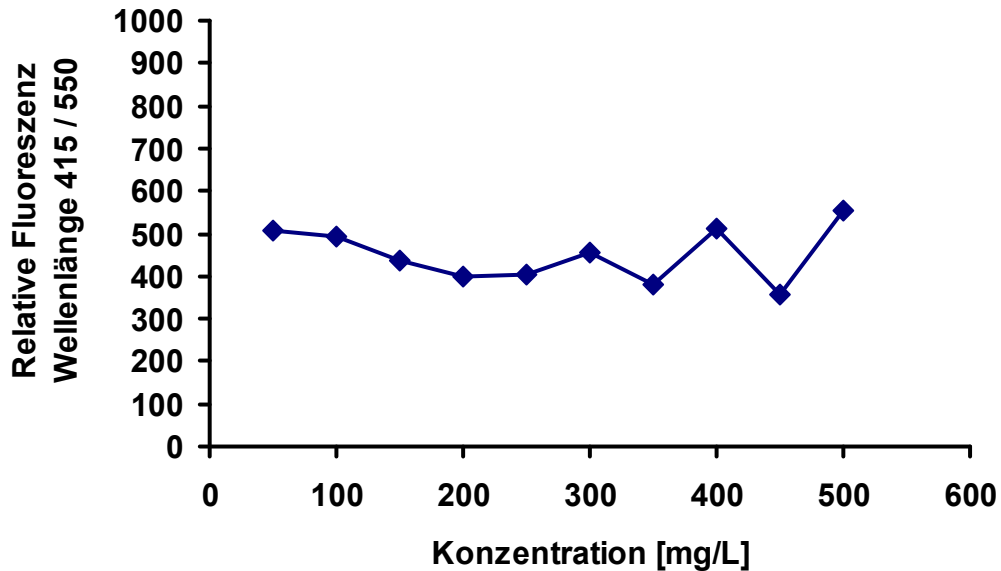


Abbildung 28: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat: 50–500 mg/L (Stammlösung angesetzt in bidest. Wasser, Standards mit bidest. Wasser aufgefüllt) + 300 μ L DAPI (0,2 mg/mL), Messung jeweils nach 10 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln.

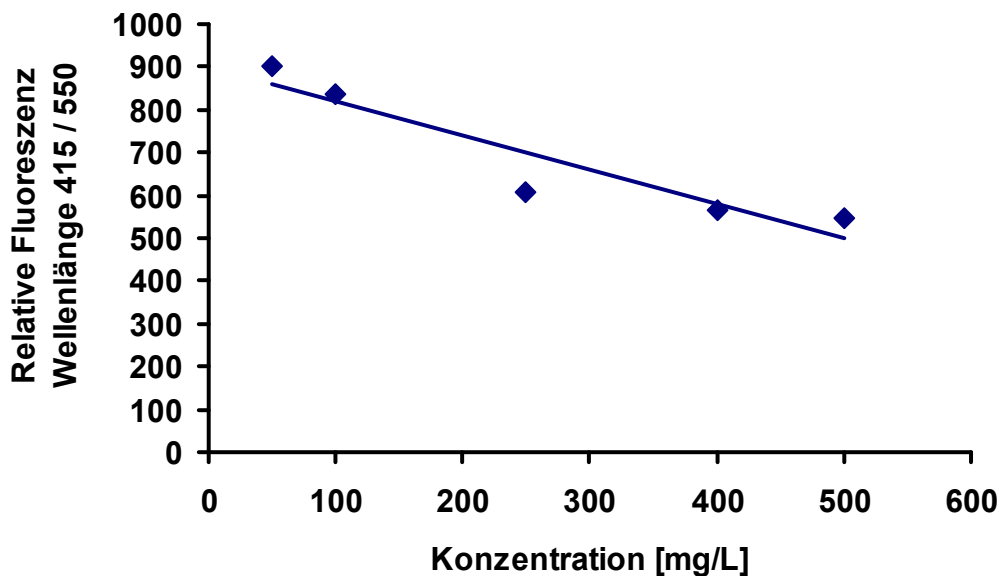


Abbildung 29: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat: 50–500 mg/L + Puffer (Stammlösung angesetzt in HEPES, Standards aufgefüllt mit Millipore) + 300 μ L DAPI (0,2 mg/mL).

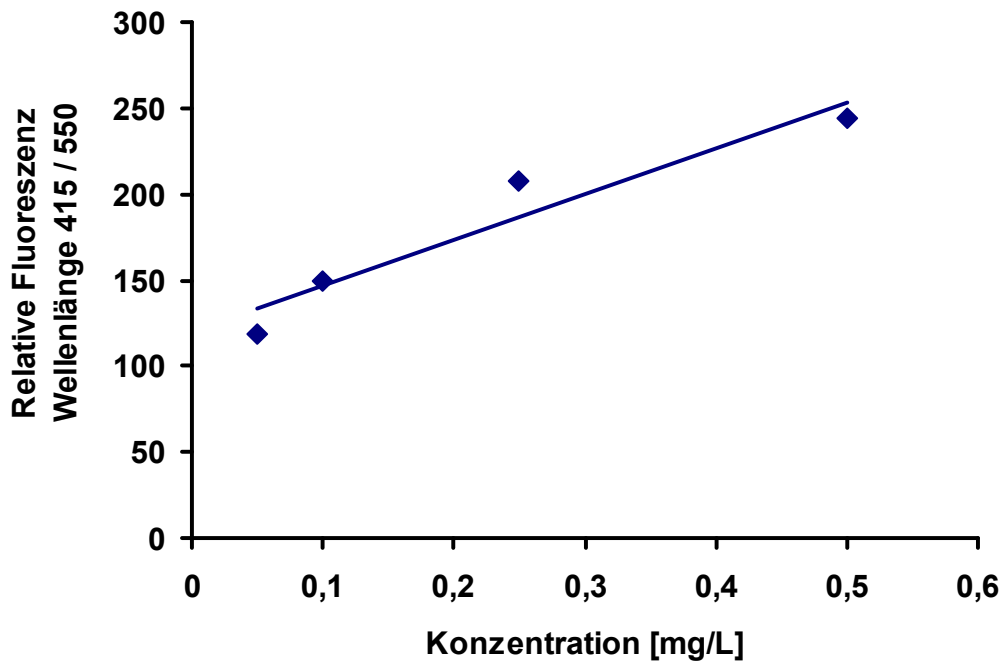


Abbildung 30: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat: 0,05–0,5 mg/L + Puffer (Stammlösung angesetzt in Millipore, pH 7 Einstellung mit HEPES, Standards aufgefüllt mit Millipore) + 100 μ L DAPI (2 mg/mL).

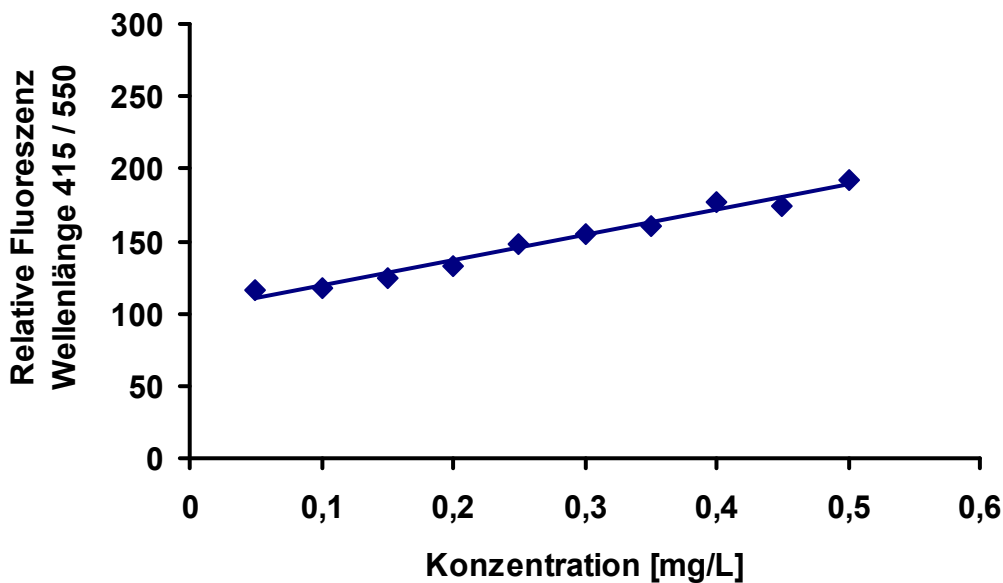


Abbildung 31: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat: 0,05–0,5 mg/L + Puffer (Stammlösung angesetzt in Millipore, pH 7 Einstellung mit HEPES, Standards aufgefüllt mit HEPES) + 100 μ L DAPI (2 mg/mL).

Zusammenfassend wird festgestellt, dass die Fluoreszenz des DAPI-Polyphosphat-Komplexes von drei Faktoren, dem pH-Wert, der Konzentration an Polyphosphat und DAPI, beeinflusst wird.

Eine lineare Standardgerade konnte nur bei ausreichender HEPES-Pufferung, einem Polyphosphat-Konzentrationsbereich von 0,05 bis 0,5 mg/L und 100 μ L DAPI (2 mg/mL) erzielt werden.

Die folgenden Grafiken 32 und 33 zeigen die Standardgeraden von Pentanatriumtriphosphat (Kettenlänge ≥ 3) und Budit 4 (Kettenlänge ≥ 28). Die Kalibration erfolgte im Bereich von 50 bis 1000 $\mu\text{g/L}$ und wurde bei allen Versuchsansätzen der vorliegenden Arbeit angewendet.

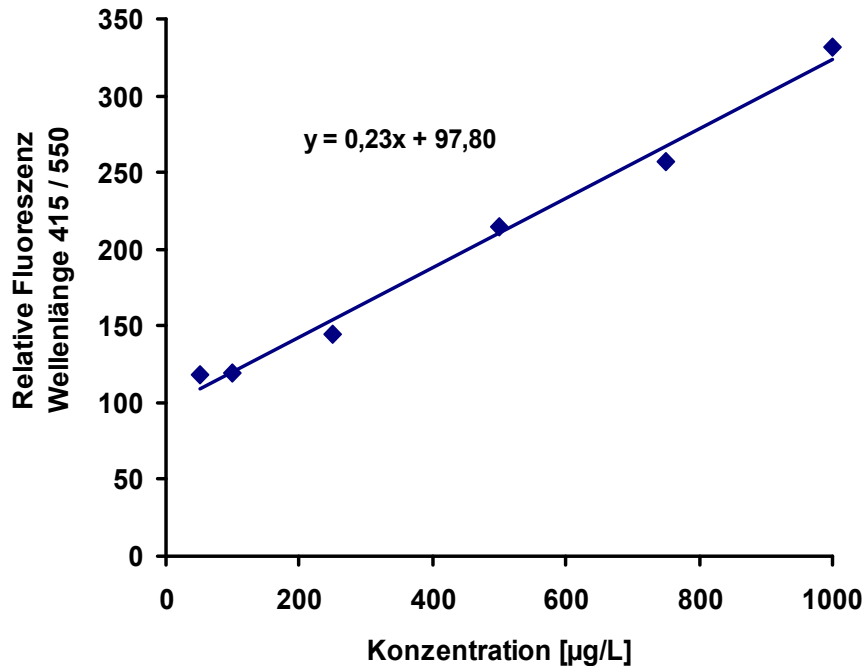


Abbildung 32: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat, Kettenlänge ≥ 3 , [50–1000 $\mu\text{g/L}$], Stammlösung angesetzt in Millipore, Einstellung pH 7 mit HEPES, Standards aufgefüllt mit HEPES, + 100 μL DAPI (2 mg/mL).

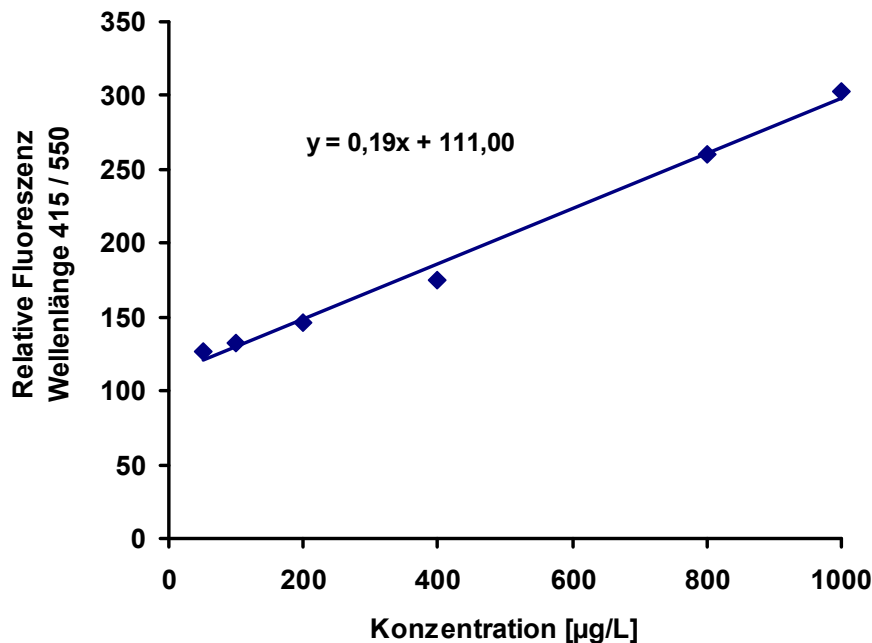


Abbildung 33: Standardgerade Budit 4, Kettenlänge ≥ 20 , [50–1000 $\mu\text{g/L}$], Stammlösung angesetzt in Millipore, Einstellung pH 7 mit HEPES, Standards aufgefüllt mit HEPES, + 100 μL DAPI (2 mg/mL).

Beide Geraden haben einen ähnlichen Verlauf, wobei die Standardgerade bei Pentanatriumtriphosphat eine Steigung von 0,23 aufweist während bei Budit 4 eine Steigung von 0,19 vorliegt.

Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Peakmaximum des DAPI-Polyphosphat-Komplexes für beide Polyphosphate (Kettenlänge 3 bzw. 28) bei ca. 550 nm liegt (siehe Abbildung 27 Wellenlängenscan).

Die Veröffentlichung von Diaz et al. (2010) kommt zu einer ähnlichen Schlussfolgerung bezüglich des Verhaltens der Polyphosphate. Allerdings differieren Gerätetyp und Wahl des Peak-Maximums, so dass Polyphosphate erst ab einer Kettenlänge von 15 ein analoges Verhalten bezüglich der Steigung der Standardgeraden zeigen.

3.1.1.4 Qualitativer und quantitativer Nachweis von mikrobiell gebildeten Polyphosphaten mittels Fluoreszenzphotometrie

Die bei der Kultivierung von Klärschlamm-biozönose und *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) gebildeten Polyphosphate sollten qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. In diesem Kapitel wird die Methode der Fluoreszenzphotometrie dargestellt.

Nach dreitägiger Kultivierung der *Cunninghamella elegans*-Biomasse im Medium mit Hefeextrakt sollten die gebildeten Polyphosphate qualitative fluoreszenzphotometrisch untersucht werden.

Zunächst erfolgte die Messung von *Cunninghamella elegans* im Rohextrakt. In einer Küvette wurden 1 mL Medium mit Pilz mit 300 µL DAPI (2 mg/mL) versetzt und nach zehnminütiger Inkubation im Dunkeln gemessen. Daneben wurde das Medium mit Hefeextrakt und DAPI untersucht. In beiden Fällen ergab sich eine große Fluoreszenz mit Wellenlängenschiebung.

Diese kann auf das Vorhandensein von Polyphosphaten im Pilz oder auf das im Medium enthaltene Hefeextrakt zurückzuführen sein. Das Medium mit Hefeextrakt besitzt eine Eigenfärbung. Bei der alternativ durchgeführten mikroskopischen Untersuchung mit DAPI wurden einerseits Hefeextraktpartikel sichtbar, die hellgelb fluoreszieren und DNA von *Cunninghamella elegans*, die blau fluoresziert (siehe Abbildung 34).

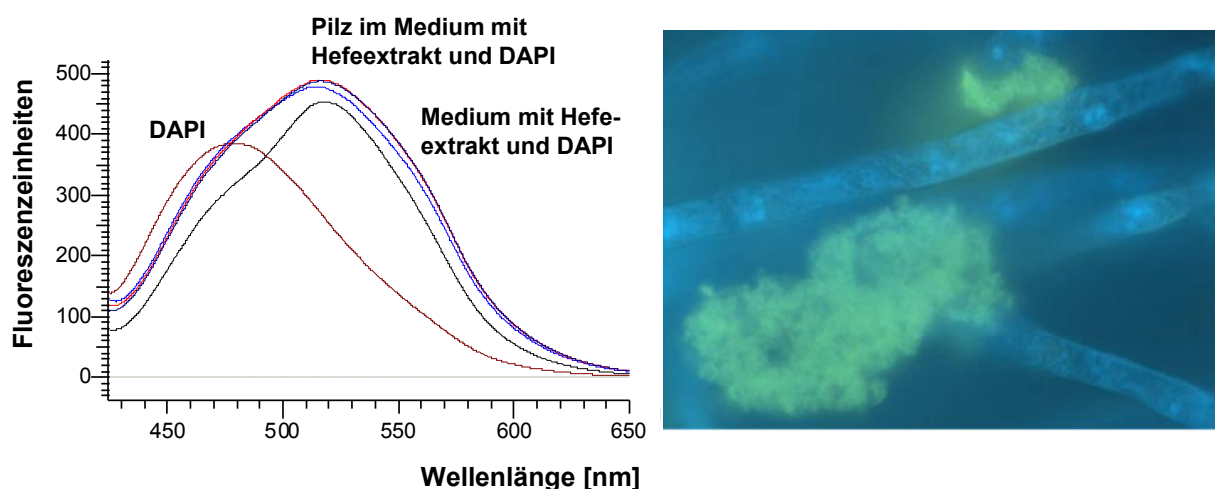


Abbildung 34: links: Wellenlängenscan des Pilzes im Medium mit Hefeextrakt und DAPI, rechts: Mikroskopische Untersuchung des Pilzes im Medium mit DAPI.

Für die Zielerreichung, gebildete Polyphosphate im Pilz nachzuweisen, stellt das Hefeextrakt einen potentiellen Störfaktor dar, der beseitigt werden musste.

Zur Lösung des Problems wurde der Pilz nach Abtrennung des Mediums mit bidest. Wasser gewaschen. Alternativ besteht die Möglichkeit *Cunninghamella elegans* im Medium ohne Hefeextrakt (Hesseltine und Anderson) zu kultivieren. Allerdings geht diese Vorgehensweise mit verringerter Biomassenbildung und Phosphataufnahme einher.

Nach Elimination des Mediums mit Hefeextrakt wurden die gebildeten Polyphosphate im Rohextrakt fluoreszenzphotometrisch gemessen (siehe Abbildung 35).

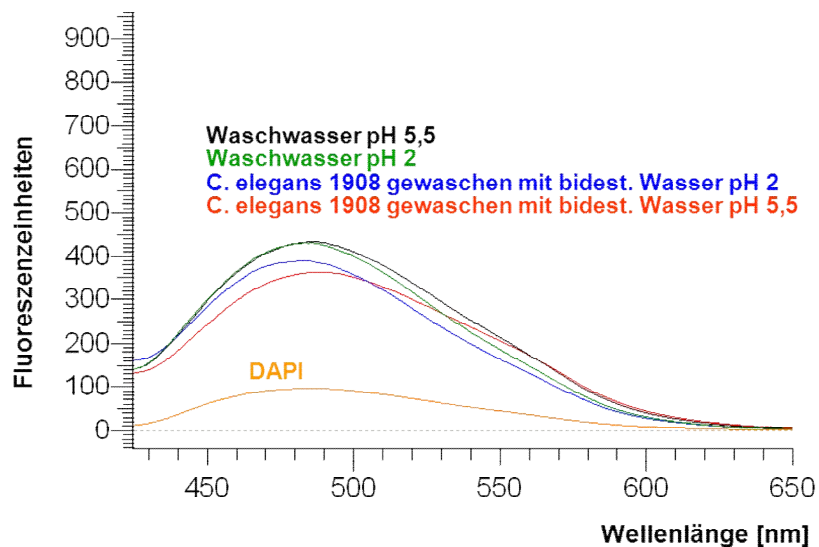


Abbildung 35: Wellenlängenscan von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908), im Rohextrakt.

Bei der Beurteilung des Messergebnisses ist anzunehmen, dass die Probe aufgrund der zellulären Bestandteile inhomogen ist und die Fluoreszenz der Polyphosphate lediglich auf der Zelloberfläche und nicht im Pilzinneren erfasst werden konnte (siehe Abbildung 36).

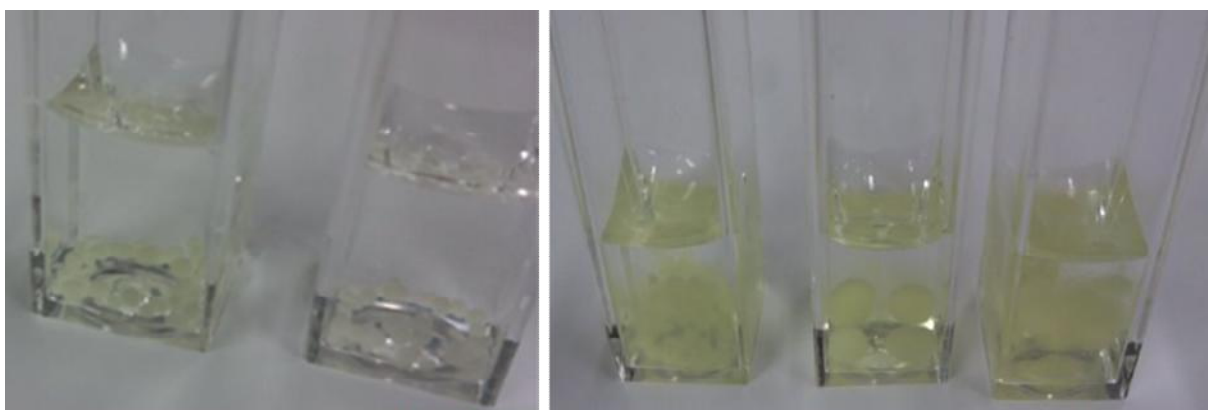


Abbildung 36: links: Küvette mit Pilz und DAPI nach und vor der fluoreszenzphotometrischen Messung, rechts: Küvetten mit unterschiedlicher Pilzkonsistenz und DAPI nach der fluoreszenzphotometrischen Messung.

Zur Optimierung des Messergebnisses wurde der Pilz *Cunninghamella elegans* nach der Methode von Clark et al. (1986) behandelt. Dabei wurden die Polyphosphate extrahiert. Es ergaben sich drei Fraktionen. Fraktion 1 umfasst kurzkettige (Kettenlänge < 20 Phosphatreste), Fraktion 2 mittellangkettige (Kettenlänge 20-250 Phosphatreste) und Fraktion 3 langkettige (Kettenlänge 250-750 Phosphatreste) Polyphosphate.

Je 1 mL der erhaltenen Fraktionen wurde mit 300 µL DAPI (2 mg/mL) versetzt und nach zehnminütiger Inkubation im Dunkeln fluoreszenzphotometrisch gemessen.

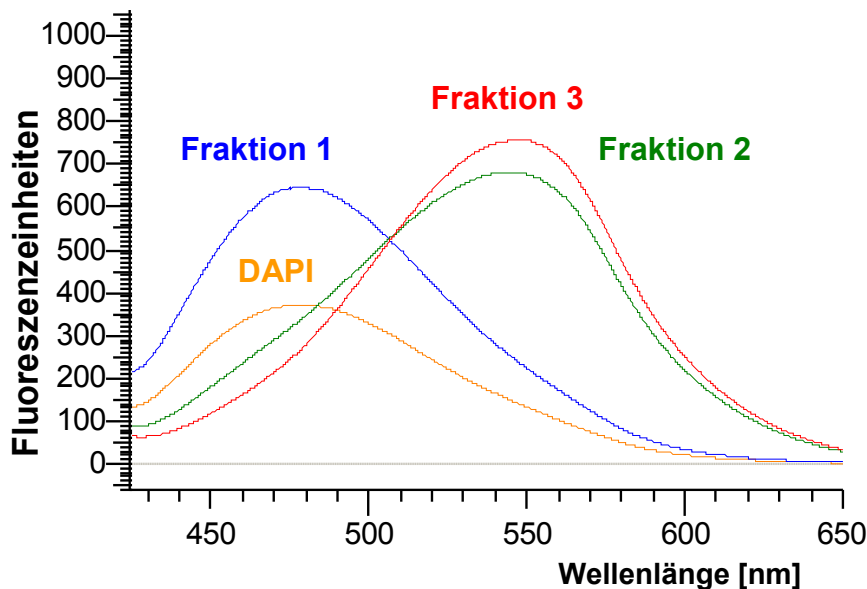


Abbildung 37: Wellenlängenscan von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) nach Extraktion der Polyphosphate.

In Abbildung 37 ist bei Fraktion 1 keine Wellenlängenverschiebung sichtbar, während Fraktion 2 und 3 eine Verschiebung der Wellenlänge aufweisen. Dieses Verhalten bei Fraktion 2 und 3 lässt auf die Existenz von mittel- und langkettigen Polyphosphaten schließen.

Diese beschriebene Probenpräparation wurde für den qualitativen Nachweis der Polyphosphate bei allen Versuchsansätzen der vorliegenden Arbeit angewendet.

Um die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung der extrahierten Polyphosphate aus der *Cunninghamella elegans*-Biomasse zu verifizieren, wurden die Proben (Fraktion 1 bis 3) fluoreszenzphotometrisch untersucht. Zum Vergleich wurden die Pilze *Absidia corymbifera*, *Mucor plumbeus* und *Rhizopus stolonifer* ebenfalls fluoreszenzphotometrisch untersucht.

Vor der Untersuchung wurden die Pilzbiomassen analog zur Vorgehensweise bei *Cunninghamella elegans* extrahiert. Die folgende Abbildung 38 zeigt die Wellenlängenscans der einzelnen Pilze. Jeweils dargestellt sind die extrahierten Polyphosphate aus der zuvor mit bidest. Wasser pH 5,5 beziehungsweise 2 gewaschenen Biomasse der Pilze. Das Waschen war erforderlich, um mögliche Störungen durch das wachstumsfördernde Hefeextrakt im Medium zu verhindern.

Bei allen untersuchten Pilzen ist bei Fraktion 1 keine Wellenlängenverschiebung erkennbar, während bei Fraktion 2 und 3 Wellenlängenverschiebungen auftreten. Die untersuchten Pilze zeigen somit ein bestimmtes Verhaltensmuster, allerdings variiert die Intensität der

Fluoreszenzeinheiten. Die fehlende Wellenlängenverschiebung bei Fraktion 1 kann auf das Nichtvorhandensein oder auf eine zu niedrige Konzentration von kurzkettigen Polyphosphaten im Überstand zurückzuführen sein. Die Wellenlängenverschiebungen bei Fraktion 2 und 3 lassen auf die Existenz von mittellang- und langkettigen Polyphosphaten im Pilz schließen.

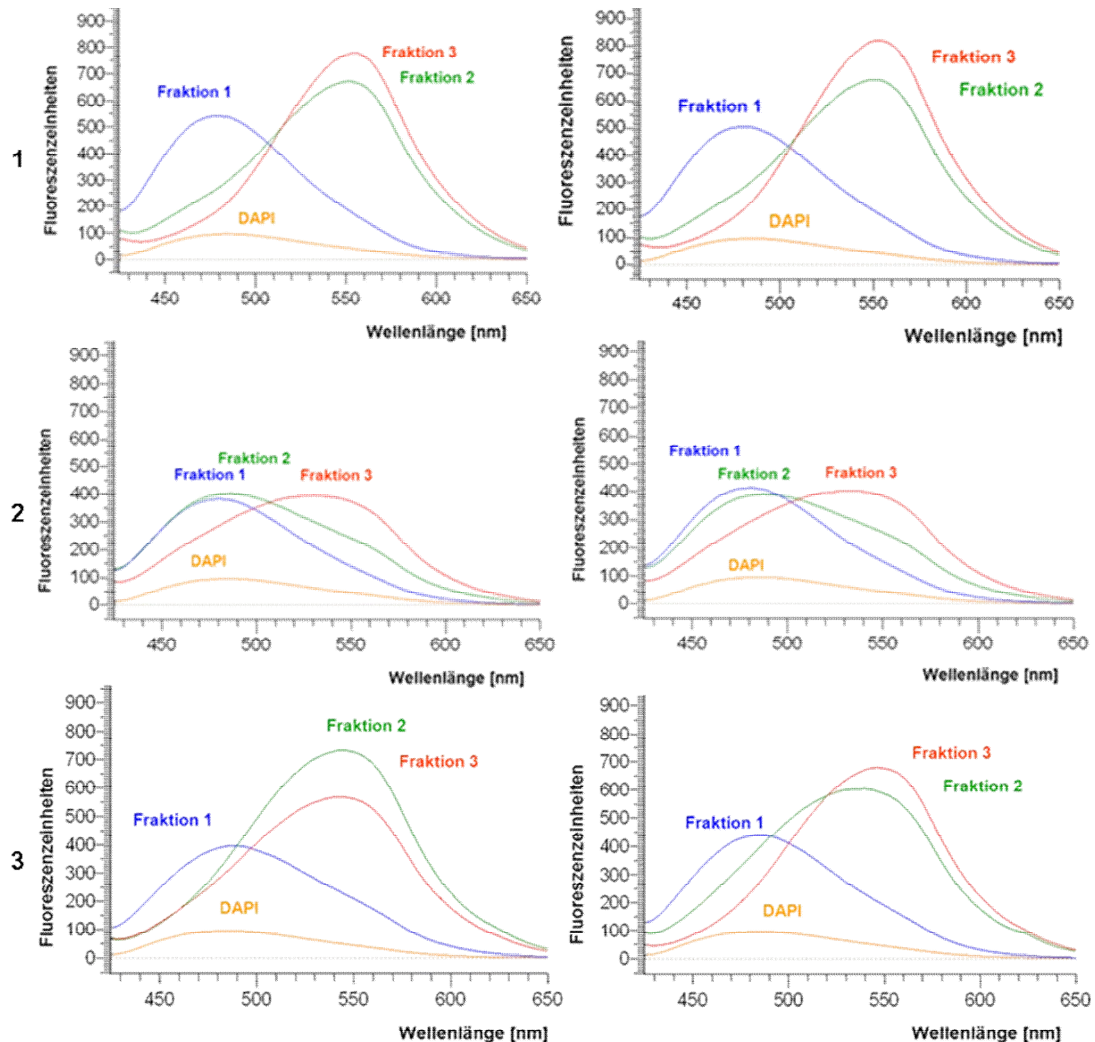


Abbildung 38: Wellenlängenscans der Fraktionen 1 bis 3 nach Polyphosphat-Extraktion von
1. *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908),
2. *Absidia corymbifera*,
3. *Rhizopus stolonifer*,
gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (links) bzw. pH 2 (rechts).

3.1.1.5 Quantitativer Nachweis der Extraktion von Clark et al. (1986)

Es sollten die gebildeten Polyphosphate in der Klärschlamm-biozönose nach dem Verfahren von Clark et al. (1986) extrahiert werden. Dabei ergaben sich folgende Fraktionen. Fraktion 1 kurzkettige (Kettenlänge < 20 Phosphatreste), Fraktion 2 mittellangkettige (Kettenlänge 20-250 Phosphatreste) und Fraktion 3 langkettige (Kettenlänge 250-750 Phosphatreste) Polyphosphate. Anschließend sollte der Phosphorgehalt in den einzelnen Fraktionen ermittelt werden. Gemessen wurde der Gehalt an Ortho-Phosphat in der Lösung.

Die durch eine Messung mittels ICP-MS bestimmte Phosphorkonzentration der Extrakte wurde mit dem Faktor 3 multipliziert, um die Phosphatkonzentration der Extrakte zu berechnen. Es wurde davon ausgegangen, dass das extrahierte Phosphat vollständig als Polyphosphat der entsprechenden Kettenlängen im Extrakt vorlag. Nach Multiplikation mit dem Extraktionsvolumen konnte über den Feuchtmassfaktor (FM_P) die Gesamtausbeute an Polyphosphat berechnet werden.

$$FM_P = \frac{\text{Gesamt FM im Ansatz [g]}}{FM \text{ Extraktion [g]}}$$

Für prozentuale Angaben der Polyphosphatausbeuten wurden diese auf das insgesamt den Ansätzen zugesetzte Phosphat (z.B. 7,5 mg/ 250 mL) bezogen.

Die Abbildung 39 zeigt die Zusammensetzung der Polyphosphatausbeute bei der Klärschlamm-biozönose nach dreitägiger Kultivierung mit alternierender Begasung von Druckluft und Stickstoff im 24-Stunden-Rhythmus. Nach Extraktion der Polyphosphate wurden Werte von 2,2 mg/250 L (kurzkettig), 1,2 mg/250 L (mittellangkettig) und 1,3 mg/250 mL (langkettig) ermittelt. Dies entspricht 29 %, 16 % und 17 %.

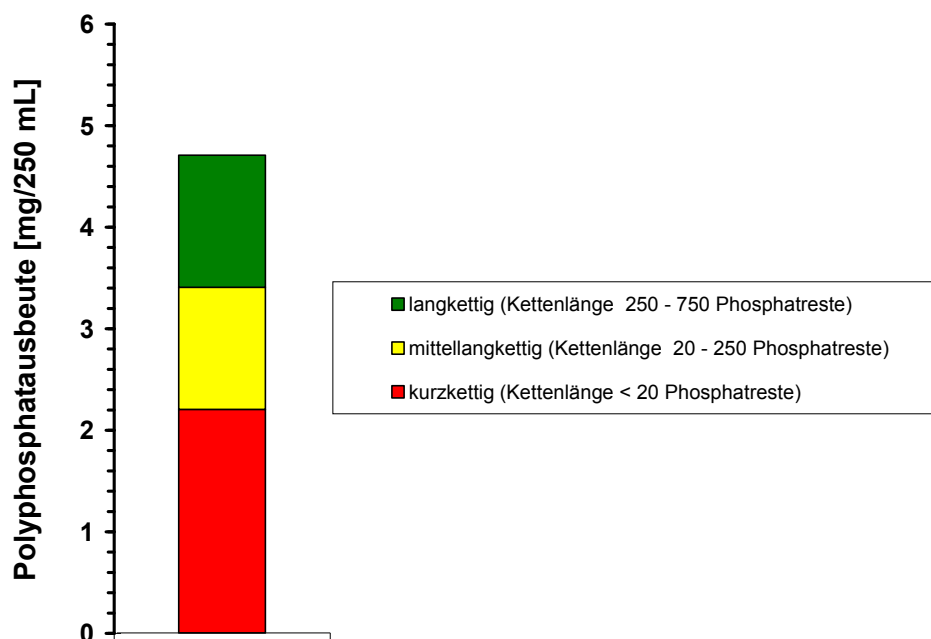


Abbildung 39: Zusammensetzung der Polyphosphate bei der Klärschlamm-biozönose nach unterschiedlicher Kettenlänge (kurzkettig, mittellangkettig und langkettig).

Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch die angewandten qualitativen und quantitativen Verfahren wie Mikroskopie, Fluoreszenzphotometrie und Gelelektrophorese zum Nachweis mikrobiell gebildeter Polyphosphate deren Bildung in den untersuchten Mikroorganismen belegt werden konnte.

Es konnten Polyphosphatgranula am Myzel der untersuchten Pilze und in der Suspension mikroskopisch nachgewiesen werden. Die für die gespeicherten Polyphosphate typischen, granulären, zellwandständigen Strukturen waren bei den vier *Cunninghamella elegans*-Stämmen besonders ausgeprägt. Die granulären Strukturen konnten mittels Neisser-Färbung nachgewiesen werden. Diese Strukturen, deren membran- und zellwandständige Anordnung und deren Verhalten beim Waschen mit unterschiedlichen pH-Werten, weisen auf eine Festlegung als Polyphosphat hin.

Vor der Färbung mussten die Proben mittels Ultraschallstab präpariert werden, da die Biomasse wegen ihrer Konsistenz ohne Behandlung nicht mikroskopierfähig war. Die Behandlung mit Ultraschall ist wahrscheinlich ursächlich für die bisweilen sichtbaren Anlagerungen von Polyphosphatgranula am äußeren Pilzmyzel statt der Einlagerung im Inneren des Pilzes.

Alternativ sollte der Speicherstoff fluoreszenzphotometrisch untersucht werden. Bei Verwendung des Verfahrens in Anlehnung an Aschar-Sobbi et al. (2008) und Diaz et al. (2010) konnten im Kapitel 3.1.1.3 Polyphosphate qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Durch Variation verschiedener Parameter kam ein optimiertes Verfahren zu stande, das dann im Labormaßstab eingesetzt wurde.

Der Polyphosphatnachweis mittels Gelelektrophorese erfolgte in Anlehnung an Bark (1992). Nach Optimierung der Methode, wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben, konnten Polyphosphate nach dem Anfärben sichtbar gemacht werden.

3.1.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis mikrobiell gebildeter Polyhydroxybuttersäure

Es sollte untersucht werden, ob Polyhydroxybuttersäuren in den Bakterien *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* gebildet wurden. Sie sollten dann mikroskopisch mittels Sudanschwarz-Färbung, mittels spezifischer Enzymreaktion und Gaschromatographie nachgewiesen werden. Dabei wird in diesem Kapitel auch auf die gewählten und weiterentwickelten Methoden zum Nachweis von Polyhydroxybuttersäuren eingegangen.

3.1.2.1 Mikroskopischer qualitativer Nachweis der Bakterien mittels Sudanschwarz-Färbung

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigen die Bakterien *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* nach zweitägiger Inkubation mit Sauerstoff. Die Abbildungen 40 und 41 zeigen die bläulich gefärbten Polyhydroxybuttersäure-Granula im Zellinneren, während die Zellen selbst eine rosa Färbung aufweisen.

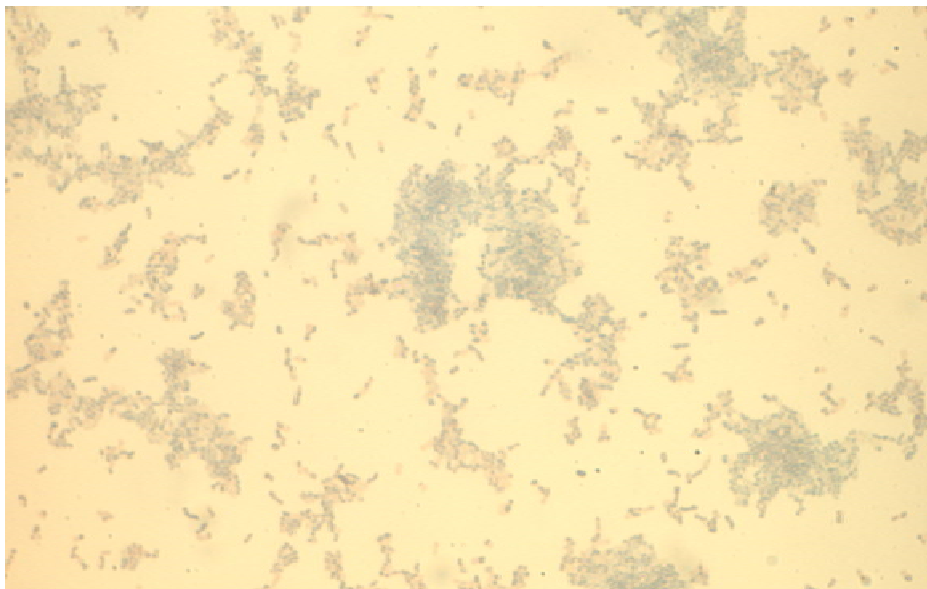


Abbildung 40: Sudanschwarz-Färbung von *Paracoccus denitrificans*.

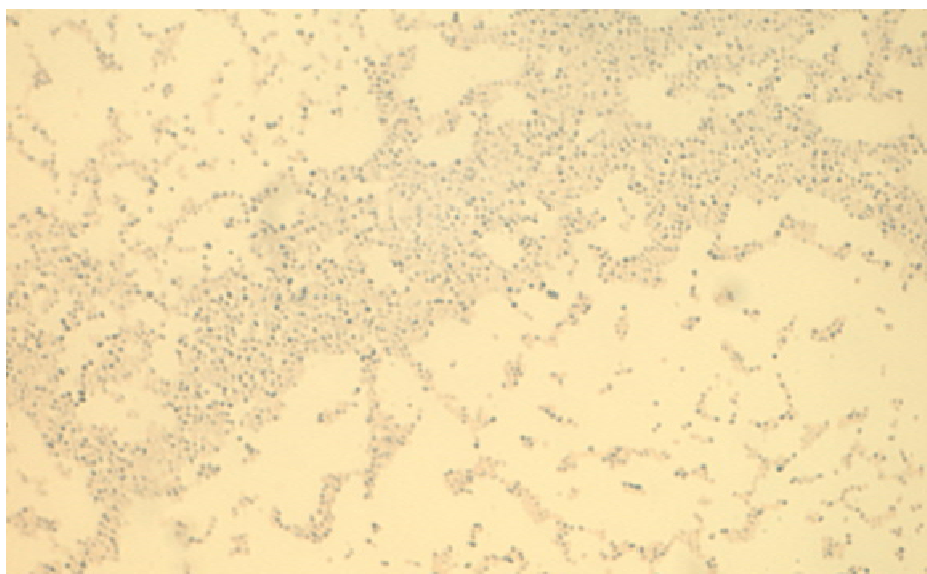


Abbildung 41: Sudanschwarz-Färbung von *Cupriavidus necator*.

3.1.2.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Polyhydroxybuttersäure bei Bakterien mittels spezifischer Enzymreaktion

Die bei der Kultivierung von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* gebildete Polyhydroxybuttersäure sollte qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. In diesem Kapitel wird die Methode zum Nachweis der Polyhydroxybuttersäure als 3-Hydroxybuttersäure dargestellt.

Im ersten Schritt erfolgt die Lyse der Bakterienzellen mittels Natriumhypochlorit-Lösung. Die Zellwand wird dabei aufgelöst und Polyhydroxybuttersäure als wasserunlöslicher Feststoff isoliert. Die Polyhydroxybuttersäure wird dann durch alkalische Hydrolyse in monomere 3-Hydroxybuttersäure zerlegt. Der quantitative Nachweis der Monomere erfolgt photometrisch mit Hilfe einer spezifischen Enzymreaktion.

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Praktikumsskript „Mikrobiologisch biochemisches Praktikum“, TU-Freiberg (2009). Zunächst wird die Vorgehensweise nach dem oben genannten Skript beschrieben, um danach vorgenommene Änderungen der Methode vergleichen zu können.

Polyhydroxybuttersäure-Isolierung:

Das gesamte Zellpellet wird noch im Zentrifugenbecher in möglichst wenig (1-2 mL) 25 % iger Natriumhypochlorit-Lösung sorgfältig resuspendiert. Nachdem keine Klümpchen mehr sichtbar sind, wird in ein 100 mL-Becherglas mit Magnetrührer überführt. Man versetzt mit weiteren 30 mL Natriumhypochloritlösung, mit denen man zuvor den Zentrifugenbecher und die Pipette ausgespült hat. Die Suspension wird ca. 4 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Becherglas wird zur Vermeidung unnötiger Geruchsbelästigung mit Parafilm verschlossen. Die Vollständigkeit der Zelllyse wird überprüft, indem 200 µL der Suspension mit 800 µL Wasser versetzt werden und in der Mikroliterzentrifuge 5 min bei höchster Stufe zentrifugiert werden. Ein rein weißes Pellet zeigt vollständige Lyse an.

Die verbleibenden ca. 30 mL Ansatz werden analog behandelt und nach Verdünnung mit 100 mL Wasser in mehreren Portionen in der großen Laborzentrifuge bei höchster Stufe zentrifugiert. Der klare Überstand wird zur gesonderten Beseitigung zentral gesammelt. Das verbleibende Pellet wird mit 20 mL Wasser resuspendiert und erneut 5 min abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird ein weiteres Mal wiederholt. Die anfallenden Waschwässer können über den normalen Abfluss entsorgt werden. Das weitgehend hypochloritfreie Pellet wird nun in 10 mL Ethanol resuspendiert, erneut abzentrifugiert und nach Entfernen des klaren Überstands (Abfluss) im Zentrifugegefäß bis zur Massenkonstanz getrocknet (60°C).

Nachweis und biochemische Quantifizierung der Poly-β-Hydroxybuttersäure:

20 mg des trockenen Speicherstoffs werden in einem 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,6 mL 0,5 N NaOH versetzt. Mit einem Mikrospatel werden vorhandene Klumpen sorgfältig zerdrückt. Die Suspension wird bis zur vollständigen Auflösung bei 85°C inkubiert (ca. 1 h) und dabei von Zeit zu Zeit geschüttelt. Die abgekühlte klare Lösung wird mit 0,2 mL 1 N Salzsäure versetzt und gemischt. Der Enzymumsatz erfolgt in einer Plastikküvette und enthält in 1 mL: 880 µL Tris/HCl pH 8,0 (100 mM), 100 µL NAD-Lösung (33 mM), 10 µL Hydrolyseansatz (1/10 verdünnt). Es wird sorgfältig durchmischt, E_{340} wird ermittelt und notiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 µL β-Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (0,063 units) (aus *Rhodopseudomonas spheroides*) gestartet. Nach weiterer sorgfältiger

Durchmischung wird die Küvette mit Parafilm verschlossen und so lange bei 30°C inkubiert, bis keine signifikante Extinktionsänderung mehr zu beobachten ist. Der Extinktionsendwert ist zu notieren.

Bei der Anwendung dieser Methode traten Probleme auf. Die PHB-Isolierung verlief nicht zufriedenstellend. Eine vollständige Lyse konnte nach vier Stunden nicht immer erreicht werden, so dass eine verlängerte Bearbeitungszeit anfiel. Grund für den erhöhten Zeitaufwand könnte die Verwendung von 10 % iger Natriumhypochlorit-Lösung gewesen sein, da in der Literatur 25 % iges Natriumhypochlorit eingesetzt wurde. Es konnten nur 10 % ige Lösung käuflich erworben werden und wegen des Fehlens spezieller Vorrichtungen war die Herstellung der höheren Konzentration nicht möglich.

Ein Probevolumen von 130 mL im Becherglas wurde in 50 mL-Falcon-Röhrchen überführt. Wegen des Aufteilens der Probe und bei Vorliegen mehrerer Probeansätze nahm das Zentrifugieren (begrenzter Zentrifugierplatz) und Waschen sehr viel Zeit in Anspruch.

Der nach der Trocknung gewonnene Polyspeicherstoff ließ sich aufgrund statischer Aufladung nur mit großem Materialverlust in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführen.

Zur Lösung der genannten Probleme wurde abweichend vom Skript, die Lyse nicht im Becherglas, sondern in einem 50 mL-Falcon-Röhrchen durchgeführt. Dadurch wurde ein Materialverlust vermieden. Für die Zellyse wurde ein Volumen von 10 mL 10 % iger Natriumhypochlorit-Lösung verwendet und nach der erfolgreichen Lyse mit 33,33 mL bidest. Wasser verdünnt. So wurde für jede Probe nur 1 Falcon-Röhrchen benötigt und die portionsweise Aufteilung entfiel. Das Volumen an bidest. Wasser zur Verdünnung ergab sich aus dem Mischungsverhältnis im Skript. Allerdings bewirkte eine Verdünnung mit 40 mL bidest. Wasser eine erschwerte Zentrifugation. Auch bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Zentrifuge (2000 rpm, 2500 rpm, 3000 rpm, 3500 rpm, 4000 rpm, 6000 rpm, 8500 rpm) setzte sich bei einer Dauer von 5-15 Minuten der Feststoff nicht vollständig ab (unterschiedliche Polarität). Um die Dauer der Zellyse zu verringern wurde Wärmeenergie eingetragen. Das Falcon-Röhrchen wurde im Trockenschrank auf 50°C erhitzt und kurzzeitig für 45 Sekunden im Ultraschallbad behandelt.

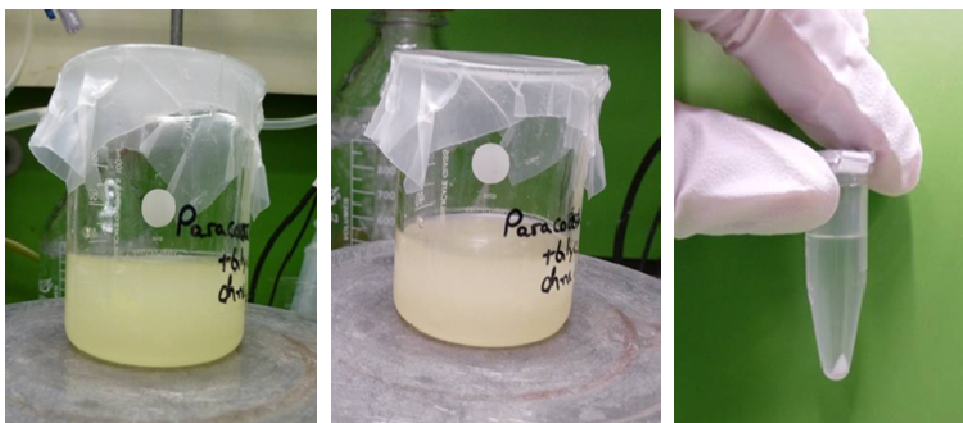


Abbildung 42: Becherglas mit Zellpellet und 10 % iger Natriumhypochlorit-Lösung zu Beginn (links) und nach 4 Stunden (Mitte). Überprüfung der Vollständigkeit der Zellyse (rechts).

Bei der alkalischen Hydrolyse wurde mit 0,6 mL an 0,5 N NaOH nach 1 Stunde bei 85°C keine klare Lösung gewonnen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit brachte keine Ver-

besserung. Es wurde die Auswirkung des Einsatzes verschieden hoch konzentrierter NaOH-Lösungen (2 M, 3 M, 4 M und 5 M) untersucht. Mit steigender Konzentration war eine Verringerung der Schwebestoffe zu beobachten und die nachgewiesene Konzentration an 3-Hydroxybuttersäure stieg.

Der Enzymumsatz in der Küvette mit 880 μ L Tris/HCl, 100 μ L NAD-Lösung, 10 μ L Hydrolyseansatz und 10 μ L β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (0,063 units, von *Pseudomonas lemoignei*) dauerte mehrere Stunden, der Zeitaufwand war deshalb zu groß.

Zur Lösung der genannten Probleme wurde eine 4 molare NaOH verwendet. Eine Reaktion zwischen der hochkonzentrierten NaOH und dem Material der verwendeten Gefäße (Falcon-Röhrchen aus Polypropylen) konnte anhand von Leerversuchen und durch Recherche in der Beständigkeitstabelle ausgeschlossen werden.

Um einen schnelleren Enzymumsatz zu erreichen (Dauer 1 Stunde) wurde das Volumen an β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (0,063 units, von *Pseudomonas lemoignei*) von 10 μ L auf 250 μ L erhöht und das Volumen an Tris/HCl von 880 μ L auf 640 μ L verringert. Nach Verbrauch der β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase-Lösung mit 0,063 units, wurde eine Lösung mit 0,2 units angesetzt. Der Enzymumsatz erfolgte in einer Küvette mit 640 μ L Tris/HCl (pH 8, 100 mM), 100 μ L NAD-Lösung (33 mM), 10 μ L Hydrolyseansatz und 100 μ L β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase (0,2 units).

Die optimierte Methode ist im Folgenden dargestellt und wurde für den Nachweis der Polyhydroxybuttersäure bei allen Versuchsansätzen der vorliegenden Arbeit angewendet.

Polyhydroxybuttersäure-Isolierung:

Nach Bestimmung der Feuchtmasse von 100 mL-Ansatz wurde in das 50 mL-Falcon (Polypropylen Röhrchen, Cellstar® Tubes, 50 mL, konischer Boden mit Stehrand, natur; Artikelnummer: 227261; Greiner Bio One) 10 mL 10 % ige Natriumhypochlorit-Lösung (Sodium hypochlorite solution, purum, $\approx$ 10 % (RT); Artikelnummer: 71696-2.5L; Sigma-Aldrich) gegeben. Anschließend wurde das Falcon 1 Stunde bei 50°C im Trockenschrank (Heraeus Instruments, Düsseldorf) erhitzt und von Zeit zu Zeit geschüttelt. Im Anschluss befand sich das Röhrchen 45 Sekunden im Ultraschallbad (Branson 5210). Nach der Verdünnung mit 33,33 mL bidest. Wasser wurde 15 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert (Thermo Scientific Heraeus Multifuge 1S-R). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 20 mL bidest. Wasser gewaschen, anschließend 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt. Nach Zugabe von 10 mL Ethanol erfolgte eine erneute Zentrifugation von 15 Minuten bei 3500 rpm. Das Pellet wurde dann bei 60°C über Nacht getrocknet.

Alkalische Hydrolyse:

Nach Zugabe von 900 μ L 4 M NaOH wurde das Falcon 1 Stunde bei 85°C im Trockenschrank (Heraeus Instruments, Düsseldorf) erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe von 600 μ L 4 M HCl. Beim Vorhandensein von Schwebestoffen wurde zentrifugiert (Thermo Scientific Heraeus Multifuge 1S-R, 15 Minuten, 3500 rpm).

Enzymumsatz:

In eine Küvette (Halbmikro, REF 67.742, Polystyrol/Polystyrene, 10 x 4 x 45 mm, Sarstedt, Nümbrecht) wurden 790 μ L Tris/HCl-Lösung, 100 μ L NAD-Lösung (33 mM) und 10 μ L Hydrolyseansatz gegeben. Nach dem Durchmischen (Rührspatel 120 mm, PP; Bestell-

nummer: 81.970; Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht) wurde die Extinktion bei 340 nm (Spectrophotometer DR 2800; Hach Lange GmbH) gemessen. Nach Zugabe von 100 μ L β -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase Lösung (0,2 units) wurde gut durchgemischt und die Küvette mit Parafilm verschlossen. Diese wurde bei 30°C im Schüttelschrank (HT Infors, Infors AG, CH-4103 Bottmingen, Switzerland, 150 rpm) inkubiert. Die Extinktion (Extinktionswert konstant) wurde nach 40 Minuten gemessen. Nullwert: Küvette mit Wasser, Leerwert: 10 μ L Wasser sonst verfahren wie Probe.

In den Abbildungen 43 bis 50 sind die einzelnen Schritte der Polyhydroxybuttersäure-Isolierung, Alkalischen Hydrolyse und des Enzymumsatz bildlich dargestellt.

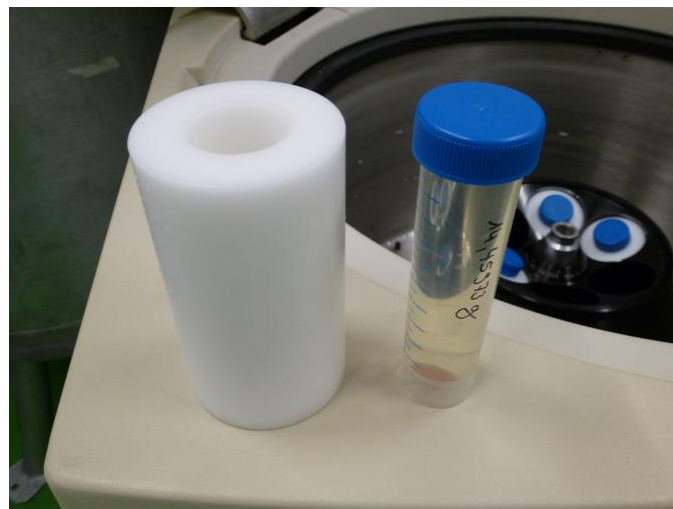


Abbildung 43: Feuchtmasse durch Zentrifugation von 100 mL Ansatz.



Abbildung 44: Zellpellet mit 10 % iger Natriumhypochlorit-Lösung (links), Zellaufschluss durch chemische Lyse bei 50°C im Trockenschrank (Mitte) und Falcon nach 1 Stunde bei 50°C im Trockenschrank (rechts).

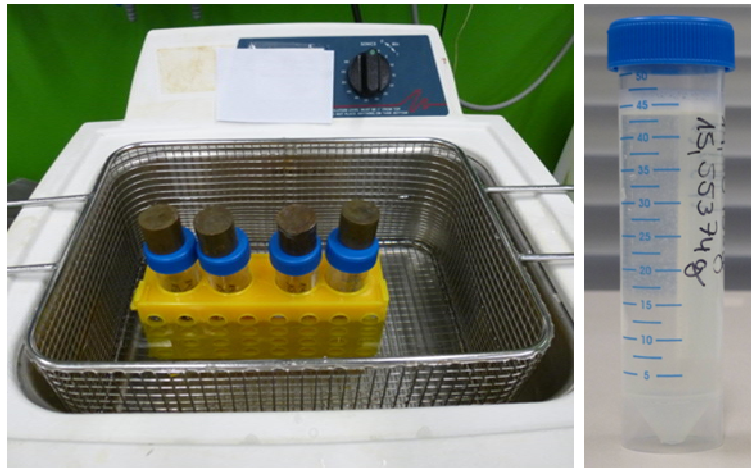


Abbildung 45: Falcons 45 Sekunden im Ultraschallbad (links) und Verdünnung mit bidest. Wasser nach erfolgreicher Lyse (rechts).



Abbildung 46: Zentrifugation (links) und Falcon nach 15 minütiger Zentrifugation bei 3500 rpm (rechts).



Abbildung 47: Polyhydroxybuttersäure-Isolierung: Falcon mit dem gewonnenen Poly- β -hydroxybuttersäure-Speicherstoff *Paracoccus denitrificans* (links) und *Cupriavidus necator* (rechts).

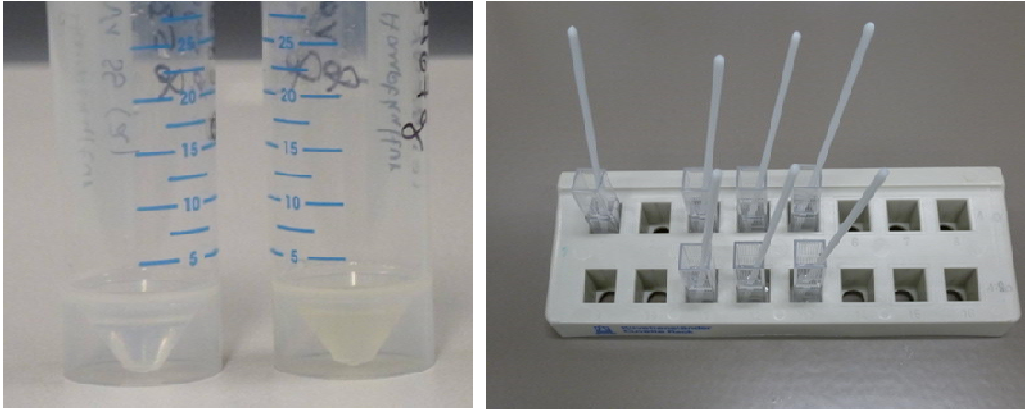


Abbildung 48: Alkalische Hydrolyse: Falcon nach Zugabe von 4 M HCl (links), Enzymumsatz: Durchmischen der Küvetten nach Zugabe von 790 μ L Tris/HCl, 100 μ L NAD, 10 μ L Hydrolyseansatz und 100 μ L β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase Lösung (0,2 units) (rechts).

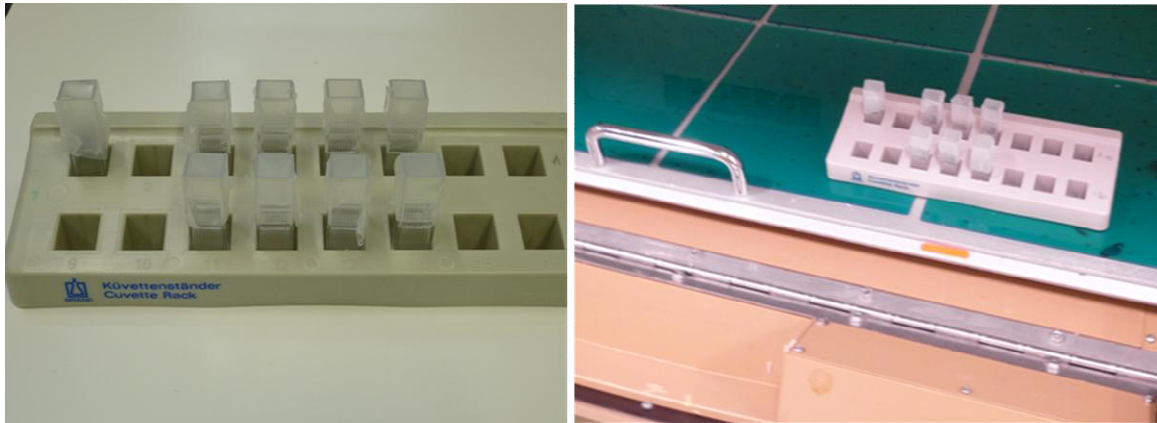


Abbildung 49: Küvetten nach Durchmischung mit Parafilm verschlossen (links), Küvetten nach Inkubation bei 30°C im Schüttelschrank (rechts).



Abbildung 50: Messung der Extinktionswerte mit dem Photometer.

Da der Enzymtest nur die (R)-drehenden 3-Hydroxybuttersäuren erfasst, wurden die ermittelten Werte mit zwei multipliziert.

Tabelle 4 zeigt die ermittelten Mengen an 3-Hydroxybuttersäure in der Biomasse von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* bei unterschiedlich langen Versuchszeiten

in den Medien nach [Steinbüchel](#) und Mothes. Die Auswertung erfolgte mit dem Lambert-Beer'schen-Gesetz bzw. mittels Standardgerade. Je nach Auswertungstyp unterscheiden sich die Ergebnisse.

Tabelle 4: Gebildete 3-Hydroxybuttersäure während der Kulturbedingung Sauerstoffeintrag durch Rühren bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*.

	Versuchs- dauer [h]	3-Hydroxybuttersäure [mg/L] Lambert-Beer'sches-Gesetz	3-Hydroxybuttersäure [mg/L] Standardgerade
<i>Paracoccus denitrificans</i>	71,8	128 (16 %/TG)	178 (23 %/TG)
	70,8	386 (38 %/TG)	586 (57 %/TG)
	71	118 (13 %/TG)	174 (20 %/TG)
	95	204 (17 %/TG)	310 (26 %/TG)
<i>Cupriavidus necator</i>	71,8	90 (8 %/TG)	136 (13 %/TG)
	70,8	132 (16 %/TG)	202 (25 %/TG)
	71	220 (27 %/TG)	324 (40 %/TG)
	95	242 (28 %/TG)	372 (43 %/TG)

3.1.2.3 Quantitativer Gaschromatographischer Nachweis von mikrobiell gebildeter Polyhydroxybuttersäure

Alkalische Hydrolyse der Polyhydroxybuttersäure und Nachweis der monomeren 3-Hydroxybuttersäure mittels Gaschromatographie.

Die bei der Kultivierung von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* gebildete Polyhydroxybuttersäure sollte gaschromatographisch nachgewiesen werden. Dabei wurden keine Verfahren aus der Literatur herangezogen, sondern es kamen zwei unveröffentlichte institutseigene Methoden zum Einsatz (Dr. Möller, 2013, 2014). Auch die gaschromatographischen Messungen wurden von Herrn Dr. Manfred Möller durchgeführt. Das erste Verfahren ist im Folgenden dargestellt.

Chemikalien: Chloroform getrocknet mit Na₂SO₄, 2-Hydroxybuttersäure (2-OH-Buttersäure) als interner Standard, 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure) Standard, Methanol mit 20 % Schwefelsäure (z.B. 200 mL Methanol im Eisbad kühlen und unter Rühren vorsichtig 50 mL konz. Schwefelsäure eintropfen. Lösung mit Natriumsulfat trocknen.)

Stammlösung 3-Hydroxybuttersäure: 2,42 g 3-Hydroxybuttersäure-Natriumsalz mit Millipore auf 100 mL auffüllen = 20 g Buttersäure/L

Stammlösung 2-Hydroxybuttersäure (interner Standard): 3,025 g 2-Hydroxybuttersäure-Natriumsalz mit Millipore auf 100 mL auffüllen = 25 g Buttersäure/L

Tabelle 5: Herstellung der Standards für die gaschromatographische Messung der Methode 1.

Soll-Konzentration 3-OH-Buttersäure	3-OH-Buttersäure- Stammlösung	2-OH-Buttersäure- Stammlösung	Endvolumen
mg/L	mL		
0	0	0,40	50
100	0,125	0,20	25
500	0,625	0,20	25
1000	1,250	0,20	25
2500	3,125	0,20	25
5000	6,250	0,20	25
10000	12,500	0,20	25

Durchführung:

Für die Kalibration wird jeweils 1 mL der Standardlösung mit internem Standard ins Headspacevial pipettiert und über Nacht bei 65°C getrocknet. Für die Probenaufarbeitung wird nur 1 mL des Blindwertes mit internem Standard ins Headspacevial pipettiert und über Nacht bei 65°C getrocknet. Dann wird jeweils ca. 10 mg getrocknete Probe zugegeben.

In die Headspacevials wird jeweils 5 mL CHCl₃ (getrocknet) und 5 mL des Methanols mit 20 % Schwefelsäure gegeben, das Vial wird verschlossen und anschließend 2 Stunden im Wasserbad gekocht. Zu den abgekühlten Proben werden jeweils 5 mL Millipore gegeben, geschüttelt und der Überstand mittels einer Pasteurpipette an einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Chloroformphase wird in ein Spitzbodenvial überführt, mit ausreichend

getrocknetem Natriumsulfat versetzt und das trockene Chloroform in ein Autosamplerfläschchen abgefüllt. Zur Analyse wird die Chloroformphase 100-fach verdünnt.

Erfahrungsgemäß treten bei einer Konzentration im Bereich über 500 mg/L Polyhydroxybuttersäure Überbefunde auf. Zur Eliminierung dieses Problems wurde eine zweite Methode entwickelt.

Das zweite Verfahren sieht wie folgt aus: Die Standardlösung enthält ca. 2,42 g 3-OH-Buttersäure-Natrium-Salz (entspricht 2000 mg 3-OH-Buttersäure) versetzt mit 100 mL Millipore.

Tabelle 6: Herstellung der Standards für die gaschromatographische Messung der Methode 2.

	Standard μL	PHB Einwaage
Blindwert	0	2,2 mg 6,0 mg 10,5 mg
Standard 0,1 mg	5	
Standard 0,5 mg	25	
Standard 1,0 mg	50	
Standard 5,0 mg	250	
Standard 10,0 mg	500	

Durchführung:

Standard beziehungsweise Polyhydroxybuttersäure (PHB) Einwaagen mit 10 mg 2-Hydroxybuttersäure in 2 mL 1 N Natronlauge (500 mg 2-Hydroxybuttersäure in 100 mL Natronlauge) 2 Stunden bei 85°C hydrolysieren. Nach dem Abkühlen wird mit 3 mL 1 N Salzsäure angesäuert und im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wird dreimal mit je 3 mL Diethylether extrahiert. Der Überstand wird ins Zentrifugenglas überführt und mit Natriumsulfat getrocknet. Danach werden 50 μL des Gemisches mit 100 μL TMSH-Reagenz im Vial versetzt. Zur Kontrolle wird ein Reagenzienblindwert herangezogen.

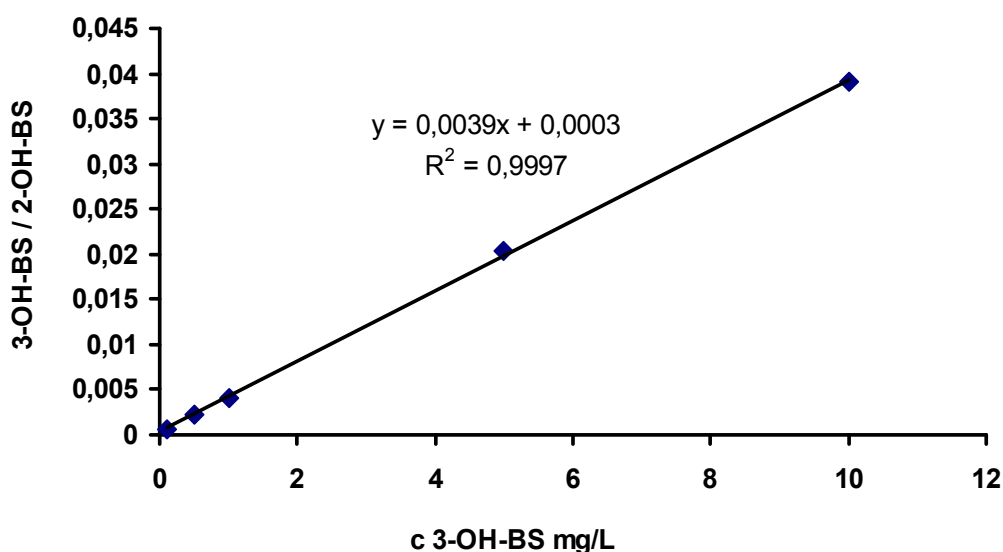


Abbildung 51: Standardgerade Kalibration über den Quotient m/z 103.

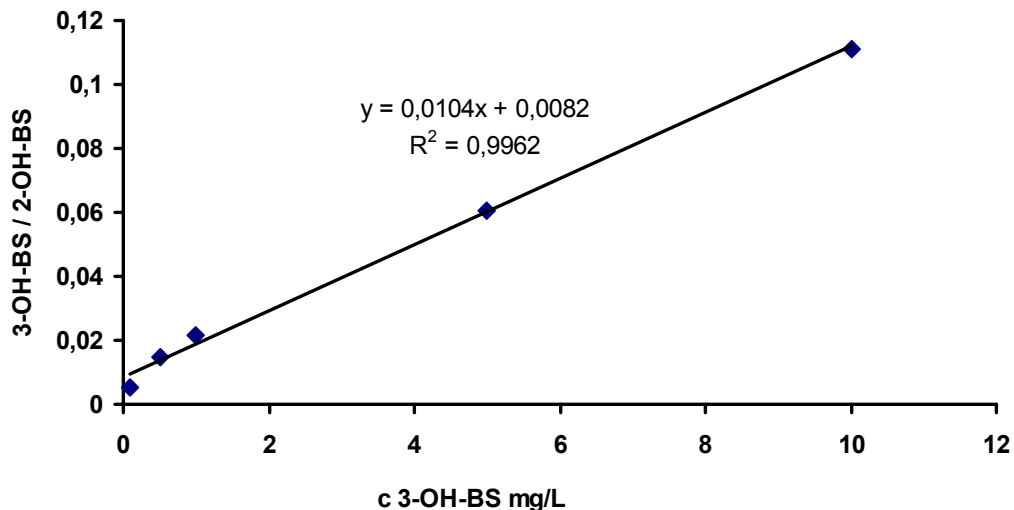


Abbildung 52: Standardgerade Kalibration über den Quotient m/z 74.

Beide beschriebenen Methoden wurden für den Nachweis der Polyhydroxybuttersäure bei der vorliegenden Arbeit angewendet.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mikrobiologisch gebildete Polyhydroxybuttersäure in den untersuchten Bakterien durch die drei angewandten Verfahren, Mikroskopie, Enzymreaktion und Gaschromatographie nachgewiesen werden kann. Es konnten Polyhydroxybuttersäure-Granula im Zellinneren von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* mikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Alternativ sollte der Speicherstoff über eine spezifische Enzymreaktion nachgewiesen werden. Bei der Verwendung des Verfahrens nach dem Praktikumsskript (TU-Freiburg, 2009) konnten, wie im Kapitel „Enzymatischer Nachweis von Polyhydroxybuttersäure bei Bakterien“ aufgeführt, keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Die dort beschriebene Abänderung des Verfahrens führte zu einer Verbesserung der Ergebnisse und zu einer vereinfachten Handhabung. Schließlich kam durch Variation verschiedener Parameter und Laborgeräte ein optimiertes Verfahren zustande, das dann im Labormaßstab eingesetzt wurde. Zur Bestätigung der quantitativen Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen wurde die Gaschromatographie eingesetzt. Die bei beiden beschriebenen Verfahren ermittelten Polyhydroxybuttersäure-Werte wiesen eine ähnliche Größenordnung auf wie die mittels Enzymreaktion gemessenen Werte.

3.2 Mikrobielle Speicherung von Phosphor

Die Phosphorentfernung aus einem Medium kann entweder chemisch durch Ausfällung mit Salzen als Phosphat oder mikrobiell mittels Mikroorganismen durch Speicherung als Polyphosphat in der Zelle erfolgen.

3.2.1 Optimierung der selektiven Phosphatanreicherung in Klärschlamm-biozönosen

Es wurde auf der Diplomarbeit von Petra Schacht „Mikrobiologische Gewinnung von langkettigen Polyphosphaten“ (2011) aufgebaut, in der Versuchsreihen mit unterschiedlichen Anreicherungen von Mikroorganismen (Faul-, Rücklauf-, Belebt- und BioP-Schlamm) durchgeführt wurden. Verglichen wurden Phosphataufnahme, Acetatverbrauch und Biomassenbildung.

Der Fokus lag dabei darauf, welchen zeitlichen Rahmen die Spezialkulturen für die Phosphatfestlegung und die Akklimatisierung („Lag-Phase“) benötigen. Außerdem sollte ermittelt werden, in welchem Umfang die Zugabe von Acetat den zeitlichen Verlauf beeinflusst.

Es wurden weiterführende Untersuchungen an Mischkulturen aus Faulschlamm der Kläranlage Aachen Soers bezüglich der Phosphataufnahme bzw. Polyphosphatspeicherung durchgeführt.

Zunächst wurden die Auswirkungen der Medienzusammensetzung von Minimal- und Reaktionsmedium auf das Verhalten der Bakterien im Schlamm untersucht.



Abbildung 53: Wachstum der Mischkultur im Minimalmedium (links) und im Reaktionsmedium (rechts) nach 192 Stunden.

Während des Untersuchungszeitraums von 196 Stunden wurden im Wechsel Sauerstoff und Stickstoff zugeführt (1. aerobe Phase 24 Stunden, 2. aerobe Phase 72 Stunden, 3. aerobe Phase 28 Stunden, 1. anaerobe Phase 48 Stunden, 2. anaerobe Phase 24 Stunden).

In den Abbildungen 54 und 55 sind die Änderungen des Phosphat-, Acetat- und Ammoniumgehalts sowie des pH-Werts in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt.

Es wurde von einer Phosphatkonzentration von ~ 800 mg/L ausgegangen. Nach der ersten aeroben Phase lag der Wert bei ~ 550 mg/L, am Ende der ersten anaeroben Phase bei ~ 650 mg/L. Im zweiten aeroben Zeitraum fiel der Wert auf ~ 400 mg/L und erreichte nach

der zweiten anaeroben Phase den Wert ~ 380 mg/L. Bei Versuchsende ergab sich ein Phosphatgehalt von ~ 400 mg/L.

Im Untersuchungszeitraum wurde dreimal Acetat zugegeben, zu Beginn, nach 8 und nach 30 Stunden. Der Acetatwert betrug anfangs ~ 15.500 mg/L, vor Versuchsabbruch ~ 60 mg/L.

Der Ammoniumgehalt lag zu Untersuchungsbeginn zwischen ~ 350 und 450 mg/L und war nach 144 Stunden nicht mehr nachweisbar. Nach 149 Stunden wurden ca. $0,03$ g Ammonium zugegeben. Bei Versuchsende lag der Wert bei $\sim 2,5$ mg/L.

Anfangs lag der pH-Wert bei ~ 8 und erreichte gegen Ende einen Wert von $\sim 9,8$.

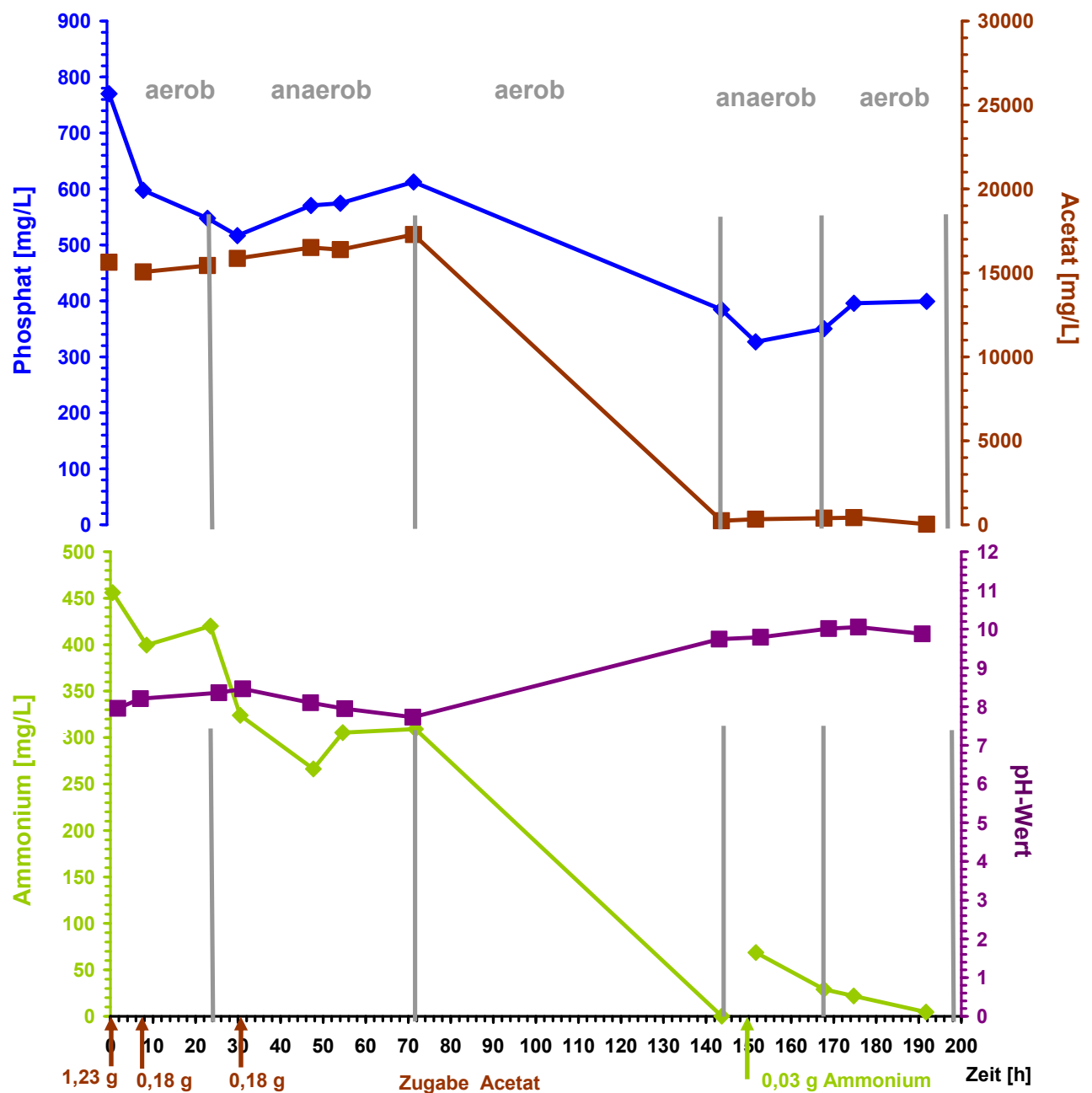


Abbildung 54: Substratverwertung der Mischkultur im Minimalmedium: Phosphat-, Acetat-, Ammoniumgehalt, pH-Wert.

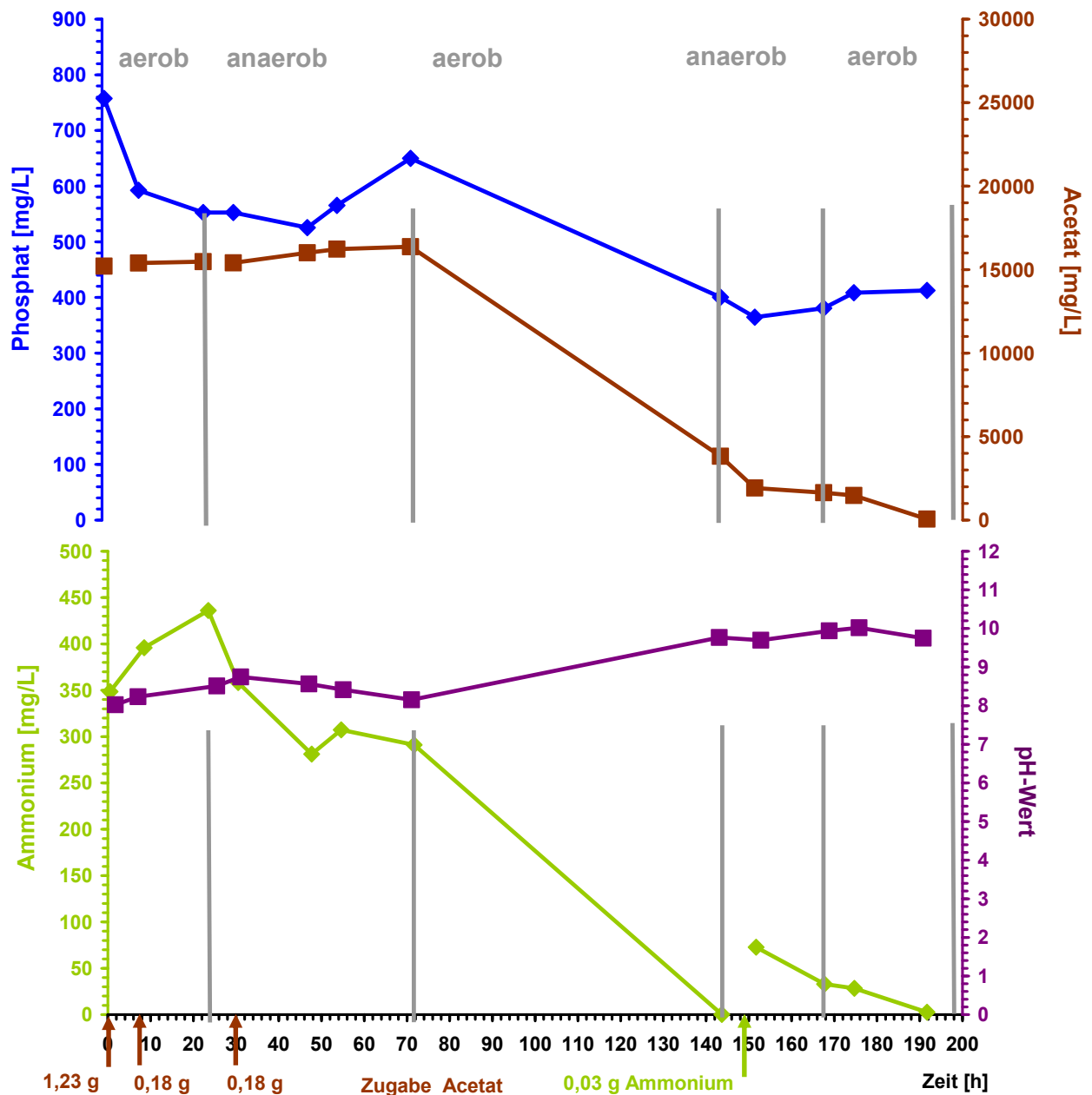


Abbildung 55: Substratverwertung der Mischkultur im Reaktionsmedium: Phosphat-, Acetat-, Ammoniumgehalt, pH-Wert.

Schlussfolgerung

Es ergaben sich keine feststellbaren Unterschiede bezüglich Bakterienwachstum und Phosphateliminierung im Medium. Deswegen wurde in den folgenden Untersuchungen häufig das Reaktionsmedium eingesetzt.

3.2.1.1 Ausschluss der chemischen Phosphor-Fällung

Es sollte untersucht werden, ob die Phosphatfestlegung auf die Aktivität von Mikroorganismen zurückzuführen ist.

3.2.1.1.1 Klärschlamm-biozönose

Dies kann mit der folgenden Grafik 56 belegt werden. Sie zeigt die Phosphataufnahme durch Mikroorganismen bei einer Ausgangskonzentration von 100 mg/L Phosphat. Die Kultivierung der Klärschlamm-biozönose erfolgte im Minimalmedium bei Raumtemperatur und alternierender Begasung mit technischer Luft und Stickstoff vier Tage lang im 26 Stunden-Rhythmus.

Der Phosphatgehalt fiel von anfänglich 98 mg/L auf abschließend 30 mg/L. Während im ersten aeroben Zeitraum Phosphat aufgenommen wurde (15 mg/L), war in der ersten anaeroben Phase eine leichte Phosphatrücklösung zu verzeichnen (8 mg/L). In der zweiten aeroben Phase kam es zu einer Phosphataufnahme von 71 mg/L, während bei Versuchsende in der zweiten anaeroben Phase eine leichte Rücklösung von 10 mg/L festzustellen war. Es wurde im Beobachtungszeitraum viermal jeweils ca. 700 mg/L Acetat zugegeben. Bei Versuchsende war kein Acetat mehr nachweisbar. Der Ammoniumgehalt sank von 318 mg/L zu Beginn auf 6,4 mg/L bei Versuchsende. Der pH-Wert stieg während des Untersuchungszeitraums von 8 auf 9.

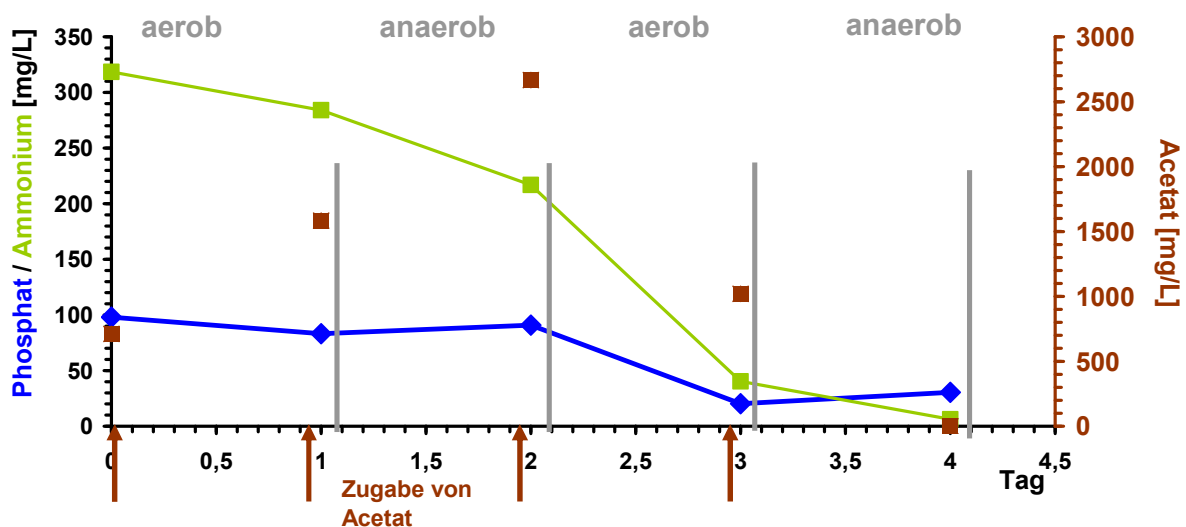


Abbildung 56: Dargestellt ist die Abnahme des gelösten Ortho-Phosphats sowie der Verbrauch von Ammonium und Acetat bzw. Glucose über die Zeit bei der Klärschlamm-biozönose.

3.2.1.1.2 Autoklavierte Klärschlamm-biozönose

Des Weiteren wurden nach Inaktivierung der Klärschlamm-biozönose mittels thermischem Verfahren (Autoklave, 120 °C, 15 Minuten) in einer 500 mL-Duranflasche 240 mL Reaktionsmedium und 10 mL Faulschlamm 146 Stunden bei alternierender Begasung mit technischer Luft beziehungsweise Stickstoff inkubiert.

Die Abbildung 57 zeigt, am Beispiel der totautoklavierten Mischkultur, die Verwertung der Substrate Acetat, Ammonium und Phosphat im Untersuchungszeitraum von 146 Stunden.

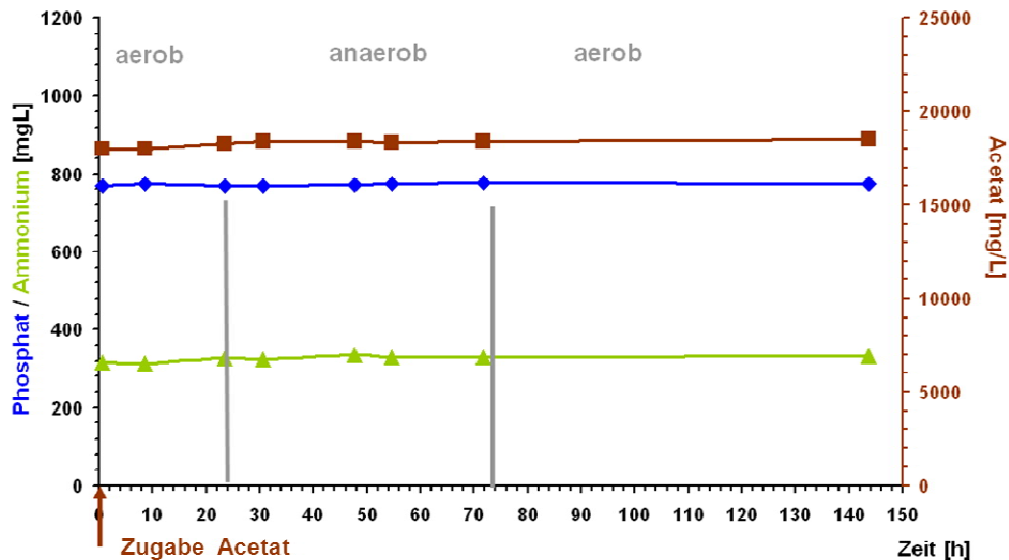


Abbildung 57: Totautoklavierte Mischkultur im Reaktionsmedium. Verlauf von Phosphat-, Acetat- und Ammoniumgehalt.

3.2.1.1.3 Abgetötete Klärschlammbezönose mit Natriumazid

Nach Abtötung der Klärschlammbezönose mittels chemischem Verfahren (Natriumazid, 0,5 %) wurde in einer 500 mL-Duranflasche 240 mL Reaktionsmedium und 10 mL Faulschlamm 146 Stunden bei alternierender Begasung mit technischer Luft beziehungsweise Stickstoff inkubiert.

Die Abbildung 58 zeigt, am Beispiel der mittels Natriumazid abgetöteten Mischkultur, die Verwertung der Substrate Acetat, Ammonium und Phosphat im Untersuchungszeitraum von 146 Stunden.

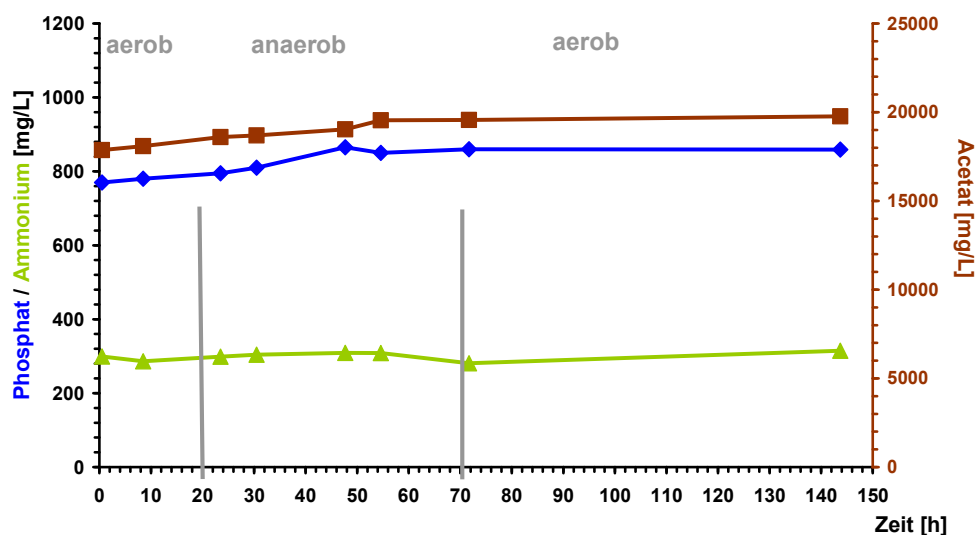


Abbildung 58: Mischkultur (abgetötet mit Natriumazid) im Reaktionsmedium. Verlauf von Phosphat-, Acetat- und Ammoniumgehalt.

Schlussfolgerung

Bei der aktiven, unbeeinflussten Klärschlammbezönose kam es im Untersuchungszeitraum zur Biomassebildung. Dies zeigt sich in der aufgetretenen Trübung. Es kam zur Biomassenbildung mit Phosphataufnahme, allerdings war kein luxury uptake zu beobachten. Daneben

stellte sich im Alkalischen neben der mikrobiellen Polyphosphatbildung eine biologisch induzierte chemische Fällung ein. Bei der Klärschlammbiozönose betrug die Massenbilanz 58 mmol Kohlenstoff, 17 mmol Stickstoff und 0,7 mmol Phosphor. Dies entspricht einem C/N/P-Verhältnis von 100/30/1.

Wurde die Klärschlammbiozönose totautoklaviert oder durch Natriumazid abgetötet zeigte sich keine Veränderung des Mediums im Zeitablauf. Während des Untersuchungszeitraums blieben der Substratgehalt im Medium weitgehend unverändert und der pH-Wert konstant. Dabei wurde keine Phosphataufnahme beziehungsweise Polyphosphatspeicherung beobachtet. .

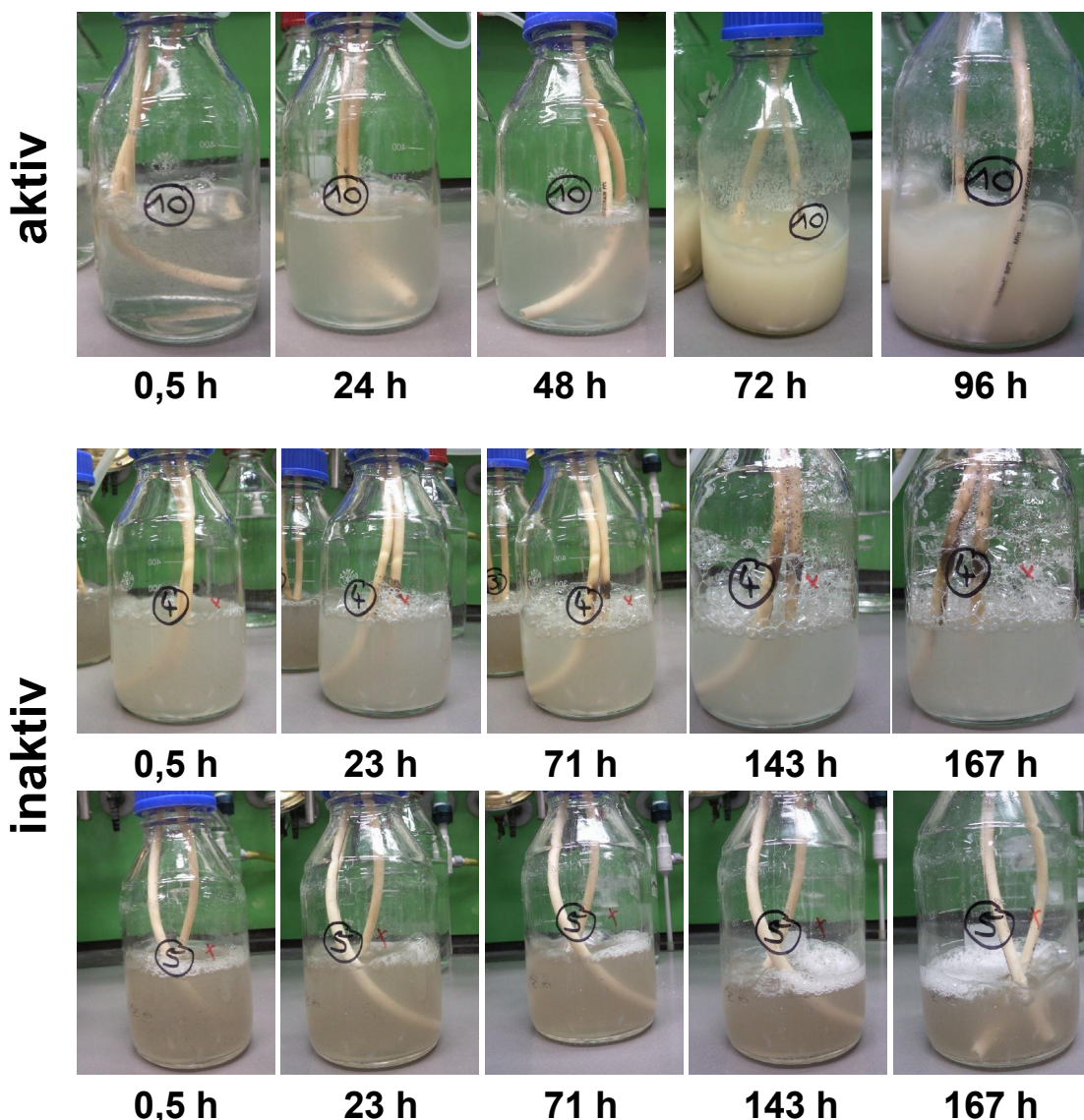


Abbildung 59: Verhalten von aktiver (oben), totautoklavierter (Mitte) und mittels Natriumazid abgetöteter (unten) Klärschlammbiozönose im Zeitablauf.

3.2.1.2 Einflussfaktor pH-Wert auf die Phosphatelimination im Medium

In den vorangegangenen Untersuchungen lag der pH-Wert stets zwischen 8 und 10. Es kam neben der Polyphosphatbildung in der Mischkultur auch zu Phosphatausfällungen als Struvit, was die Massenbilanz (C/N/P-Verhältnis) zeigt.

Deshalb sollte festgestellt werden, ob der pH-Wert während des gesamten Zeitraums der Phosphatfestlegung im Medium konstant gehalten werden kann, zum einen durch manuelle Zugabe von Salzsäure und zum anderen durch Verwendung eines Imidazol-Puffers.

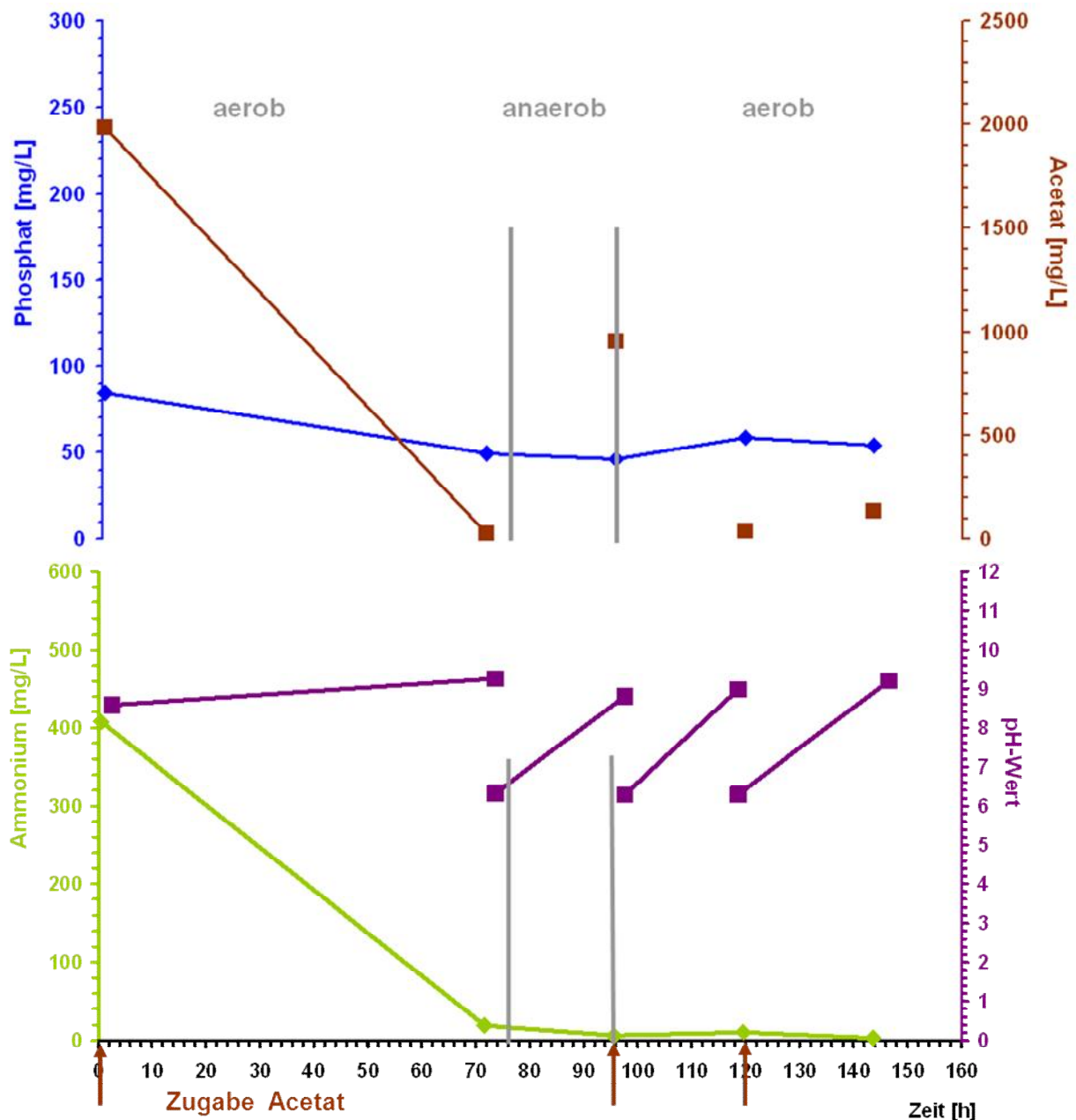


Abbildung 60: Faulschlammbiozönose während der Versuchsdauer von 148 Stunden bei manuellem Einsatz von Salzsäure.

Die Abbildung 60 zeigt den Versuchsansatz, dessen pH-Wert durch manuelle Zugabe von Salzsäure während des gesamten Untersuchungszeitraums im neutralen Bereich (~ 7) gehalten werden sollte.

In den ersten 72 Stunden war unter aeroben Bedingungen ein leichter Anstieg des pH-Werts von 8,6 auf 9,3 zu verzeichnen. Nach 73,5 Stunden wurde Salzsäure zugegeben und der pH-Wert 6,3 eingestellt. Auch nach 97,5 und 118,5 Stunden erfolgte eine Salzsäurezugabe, da der pH-Wert wieder im Alkalischen lag. Es wurde jeweils vor und nach der Zugabe der pH-Wert gemessen. Der Phosphatgehalt sank von 84,6 mg/L zu Beginn auf 54 mg/L bei Versuchsabbruch. Die Acetatkonzentration nahm in der ersten aeroben Phase nach anfänglicher Zugabe kontinuierlich ab (Ausgangswert 1985,7 mg/L) und erreichte nach zwei weiteren Zugaben einen Wert von 132,2 mg/L am Ende. Der Ammoniumgehalt fiel von 408,0 mg/L zu Beginn auf 3,7 mg/L bei Versuchsabbruch.

Schlussfolgerung

Phosphat wird intrazellulär als Polyphosphat festgelegt, begleitet von einer biologisch induzierten Phosphatfällung mit Ammonium als Struvit, bedingt durch den alkalischen pH-Wert.

Die Abbildung 61 zeigt den Versuchsansatz dessen pH-Wert durch Einsatz des Imidazol-Puffers während des gesamten Untersuchungszeitraums im neutralen Bereich (~ 7) gehalten werden sollte.

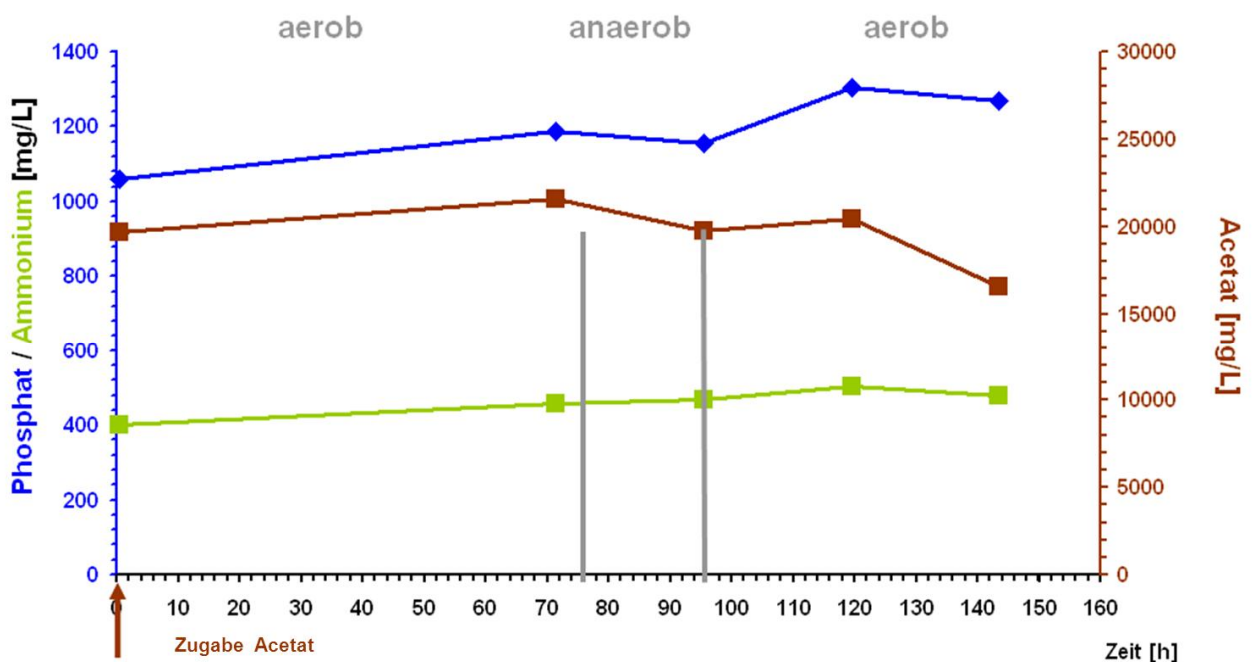


Abbildung 61: Faulschlammbiozönose während der Versuchsdauer von 148 Stunden bei Einsatz von Imidazol-Puffer.

Schlussfolgerung

Während der Versuchsdauer von 148 Stunden wurde ein pH-Wert von 6,8 gemessen. Es ist zu vermuten, dass der Imidazol-Puffer toxisch auf die Mischkultur wirkte. Dies wird durch den Verlauf der Phosphat-, Acetat- und Ammoniumkonzentrationen gestützt.

3.2.1.3 Einfluss der Co-Substrate wie Acetat, Glucose bzw. Essigsäure auf die Phosphatelimination im Medium

Da der pH-Wert bei den vorangegangenen Versuchen wegen des Einsatzes von Acetat als Substrat nicht ständig im neutralen Bereich gehalten werden konnte und es zu ungewünschten Phosphorausfällungen kam, sollte festgestellt werden, wie sich der Einsatz von Glucose bzw. Essigsäure als Substrat auf den pH-Wert auswirkt.

Darüber hinaus sollte der Einfluss dieser Substrate auf das Wachstum der Mikroorganismen in der Faulschlammbiozönose und die Phosphatfestlegung untersucht werden.

Die Versuchsansätze enthielten in einer 500 mL-Duranflasche 240 mL Reaktionsmedium und 10 mL Faulschlamm bei Variation des Substrateinsatzes. Der Untersuchungszeitraum betrug 170 Stunden bei alternierender Zuführung von Sauerstoff bzw. Stickstoff.

3.2.1.3.1 Acetat

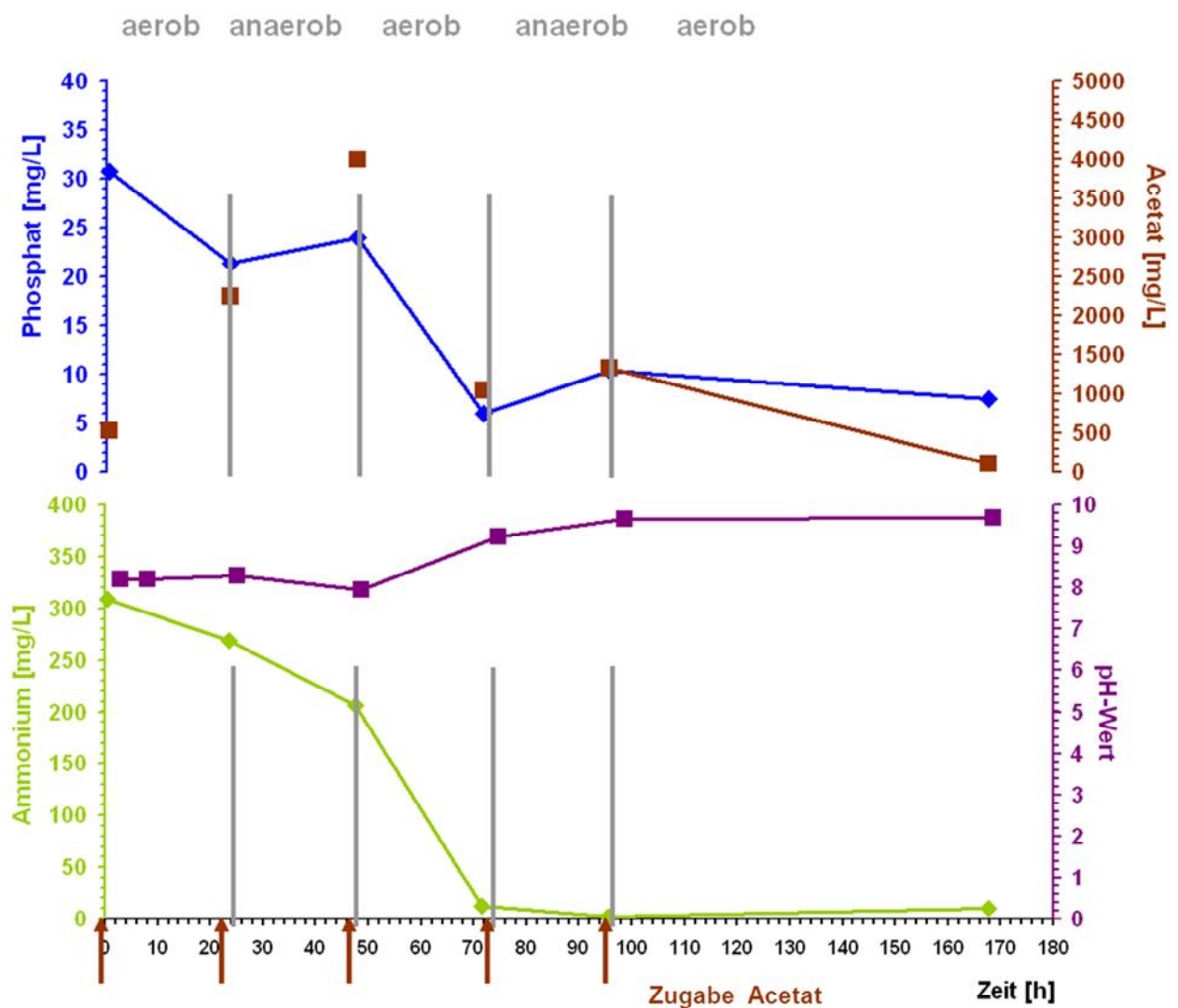


Abbildung 62: Substratverwertung der Mischkultur im Minimalmedium bei fünfmaliger Acetatzugabe.

Die Abbildung 62 zeigt den Versuchsansatz mit Acetat als Substrat. Der Phosphatwert betrug anfangs 30,7 mg/L und lag bei Versuchsabbruch bei 7,6 mg/L. Es wurde im Beobachtungszeitraum siebenmal Acetat zugegeben. Der Acetatwert fiel von 533,7 mg/L zu Beginn auf 114,5 mg/L am Versuchsende. Der pH-Wert stieg von anfangs 8,2 auf 9,7 bei Versuchsende.

Es wurde auch untersucht, ob die Bakterientätigkeit durch Einsatz der Reinkultur *Rhodococcus equi* 7512 im Vergleich zur Mischkultur gefördert werden kann und so die Phosphateliminierung zu optimieren wäre (siehe Anhang). Unter gleichen Versuchsbedingungen ist bei Verwendung der Reinkultur keine höhere Phosphatfestlegung erkennbar und somit ist ein analoges Verhalten von Misch- und Reinkultur zu beobachten.

3.2.1.3.2 Glucose

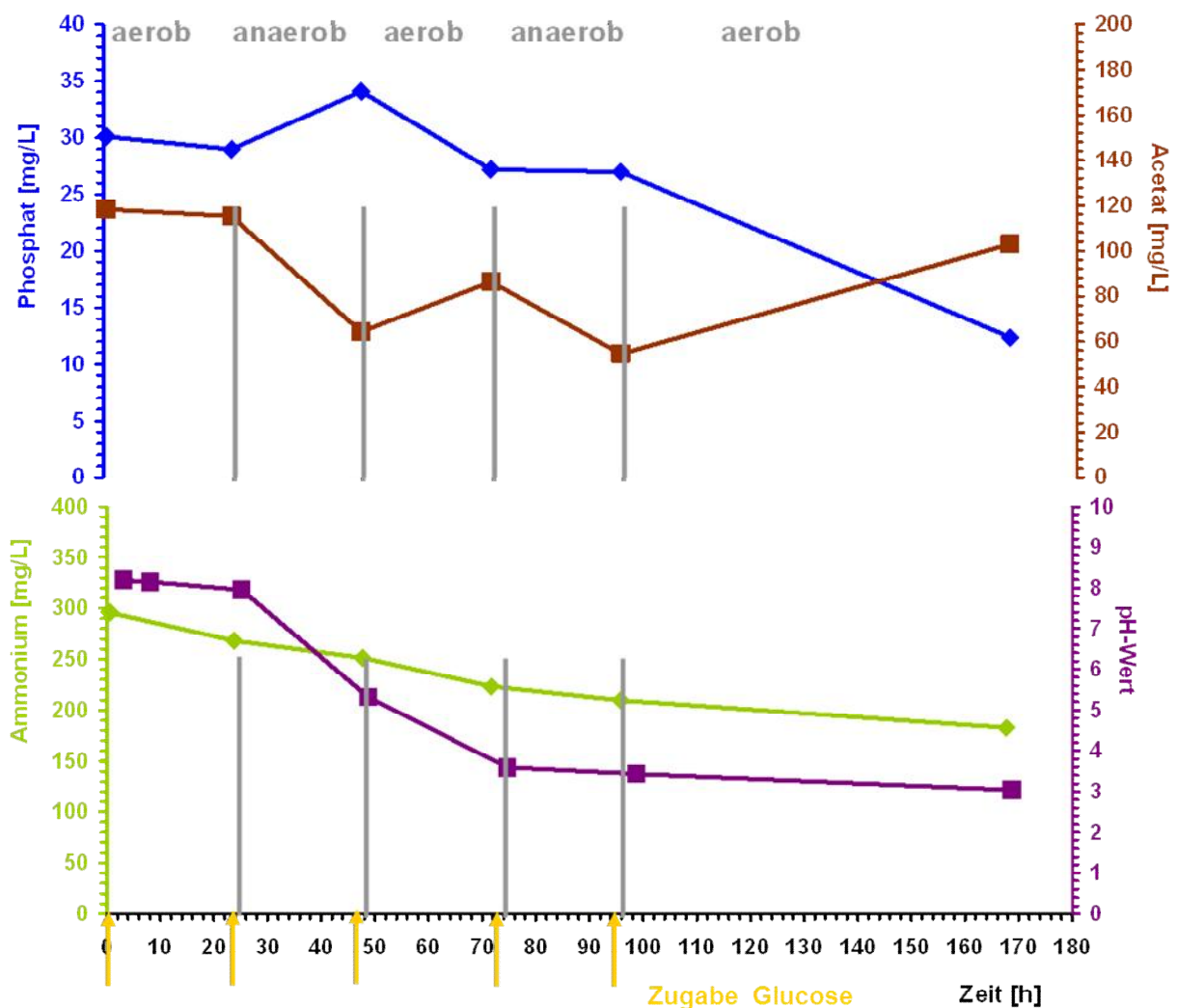


Abbildung 63: Substratverwertung der Mischkultur im Minimalmedium bei fünfmaliger Glucosezugabe.

Die Abbildung 63 zeigt den Versuchsansatz mit Glucose als Substrat. Die Phosphatkonzentration sank von 30,1 mg/L zu Beginn auf 12,4 mg/L bei Versuchsabbruch. Es wurde im Beobachtungszeitraum fünfmal Glucose zugegeben. Gemessen wurde aber der Acetatgehalt. Der Acetatwert fiel von anfangs 118,5 mg/L auf 103,1 mg/L am Versuchsende.

Der Ammoniumwert verringerte sich von 296 mg/L auf 183 mg/L. Der pH-Wert fiel von zunächst 8,2 auf 3,1 bei Versuchsabbruch.

3.2.1.3.3 Essigsäure

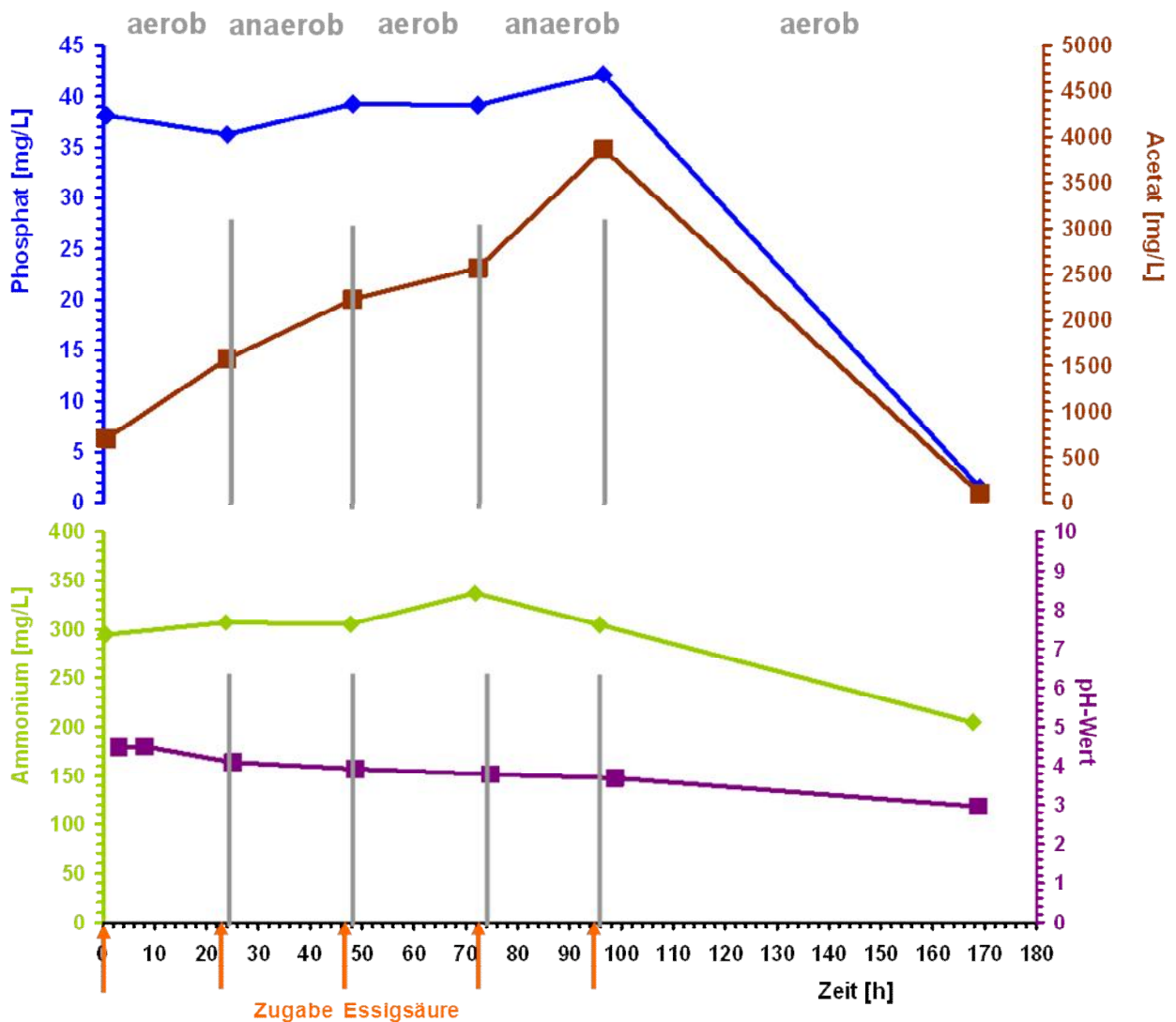


Abbildung 64: Substratverwertung der Mischkultur im Minimalmedium bei fünfmaliger Essigsäurezugabe.

Die Abbildung 64 zeigt den Versuchsansatz mit Essigsäure als Substrat. Der Phosphatgehalt variierte in den ersten 90 Stunden geringfügig zwischen 38 und 42 mg/L. Erst in der zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraums nahm er kontinuierlich ab und lag bei Versuchsende bei 1,5 mg/L. Im Beobachtungszeitraum wurde fünfmal Essigsäure zugegeben. Gemessen wurde aber der Acetatgehalt. Der Acetatgehalt fiel von 707,2 mg/L zu Beginn auf 104,4 mg/L bei Versuchsabbruch. Der Ammoniumwert verringerte sich von 294,8 mg/L auf 205 mg/L. Der pH-Wert fiel von anfangs 4,5 auf 3,0 am Versuchsende.

Schlussfolgerung

Bei alkalischem pH-Wert mit Acetat als Kohlenstoffquelle kam es neben der intrazellulären Polyphosphatbildung zu einer Magnesium-Ammonium-Phosphatfällung (Struvit).

Die Substrate Acetat und Glucose wurden ohne Lag-Phase verstoffwechselt. Mit Essigsäure als Substrat war ein signifikantes Wachstum erst nach ca. 90 Stunden nachweisbar.

In Tabelle 7 ist der Phosphorgehalt bezogen auf die Trockensubstanz für die Klärschlamm-biozönose mit den Substraten Acetat, Glucose und Essigsäure dargestellt. Beim Einsatz von Acetat ergab sich bei einer Trockensubstanz von 258,9 mg ein Phosphorwert von 1,6 mg. Dies entspricht 0,6 % der Trockenmasse. Bei Einsatz des Umrechnungsfaktors 3,0662 für Phosphat ergibt sich ein Phosphatgehalt von 4,9 mg. Dies entspricht 1,9 % Phosphat in der Trockenmasse.

Wurde Glucose eingesetzt, ergab sich bei einer Trockenmasse von 325,1 mg ein Phosphorwert von 3,8 mg. Dies entspricht 1,2 % der Trockenmasse. Bei Einsatz des Umrechnungsfaktors ergibt sich ein Phosphatgehalt von 11,7 mg. Dies entspricht 3,6 % Phosphat in der Trockenmasse.

Wurde Essigsäure als Substrat verwendet, ergab sich bei 333,6 mg Trockensubstanz ein Phosphorwert von 3,6 mg. Dies entspricht 1,1 % Phosphor in der Trockenmasse. Nach Einsatz des Umrechnungsfaktors, ergaben sich 11 mg Phosphat in der Trockensubstanz. Dies entspricht einem Phosphatanteil von 3,3 %.

Tabelle 7: Trockengewicht und Phosphorgehalt in der Trockensubstanz bei den Ansätzen mit Acetat, Glucose und Essigsäure als Substrat nach fünftägiger Kultivierung.

Ansatz mit	Trockengewicht [mg]	Phosphor (P) in der Trockensubstanz (TS)
Acetat	258,9	1,6 mg P/258,9 mg TS (0,6 %)
Glucose	325,1	3,8 mg P/325,1 mg TS (1,2 %)
Essigsäure	333,6	3,6 mg P/333,6 mg TS (1,1 %)

Die mikrobielle Phosphatfestlegung der Klärschlamm-biozönosen erfolgte bei Wachstum unter aeroben Bedingungen. Unter anaeroben Bedingungen stagnierte das mikrobielle Wachstum und es kommt zu einer Phosphatrücklösung.

Waren die Mikroorganismen längere Zeit einem bestimmten pH-Wert ausgesetzt, kam es zu einer Populationsverschiebung. Bei alkalischem pH-Wert und Acetat als Substrat, waren am Ende des Untersuchungszeitraums ausschließlich Bakterien nachzuweisen. Bei saurem pH-Wert und Glucose bzw. Essigsäure als Substrat, setzen sich bei Versuchsabbruch Hefen durch, die eindeutig mikroskopisch nachzuweisen sind (siehe Abbildung 65).

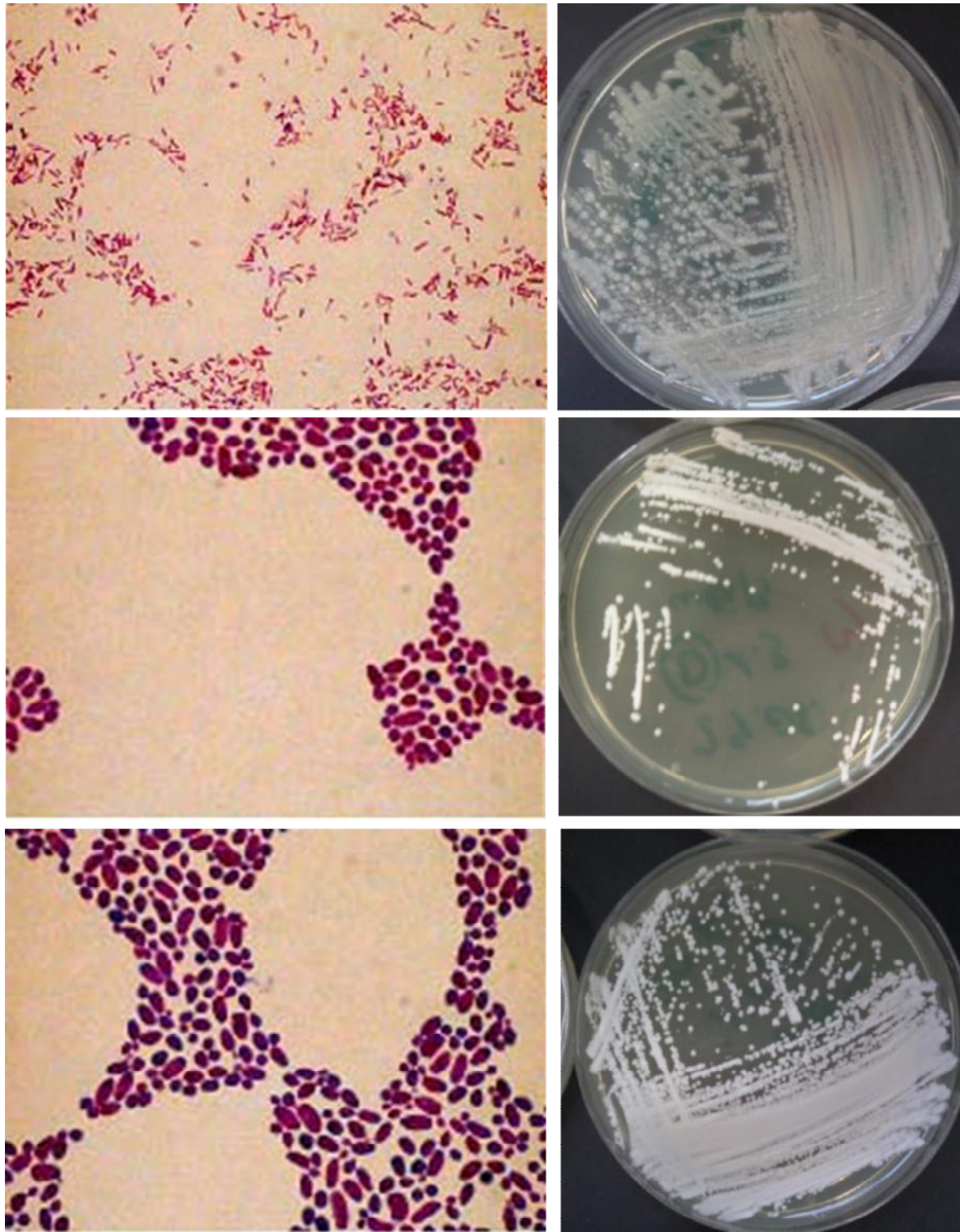


Abbildung 65: Exemplarisch Grampräparat nach 5 Tagen, Ansatz mit Acetat, pH ~ 9 (oben), Ansatz mit Glucose, pH ~ 2,5 (Mitte) und Ansatz mit Essigsäure, pH ~ 2,5 (unten).

3.2.1.4 Variation der Phosphatzugabe

Es sollte die maximal mögliche Aufnahmemenge an Phosphat durch die Faulschlamm-biozönose ermittelt werden. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob sich eine einmalige Phosphatzugabe von 100 mg/L zu Beginn günstiger auf die festgelegte Phosphatmenge innerhalb von vier Tagen auswirkt als eine dreimalige Zugabe von je 30 mg/L zu Beginn, nach 6 und nach 19 Tagen.

Die folgenden Grafiken zeigen die Phosphataufnahme bei den Versuchsansätzen mit den Ausgangskonzentrationen 30 mg/L (mit dreimaliger Zufütterung) und 100 mg/L an Phosphat im Medium und mit Essigsäure als Substrat. Neben dem Phosphatgehalt wurden auch der Gehalt an Acetat, Ammonium und Protein, sowie der pH-Wert während des Untersuchungszeitraums von 170 bis 840 Stunden bestimmt.

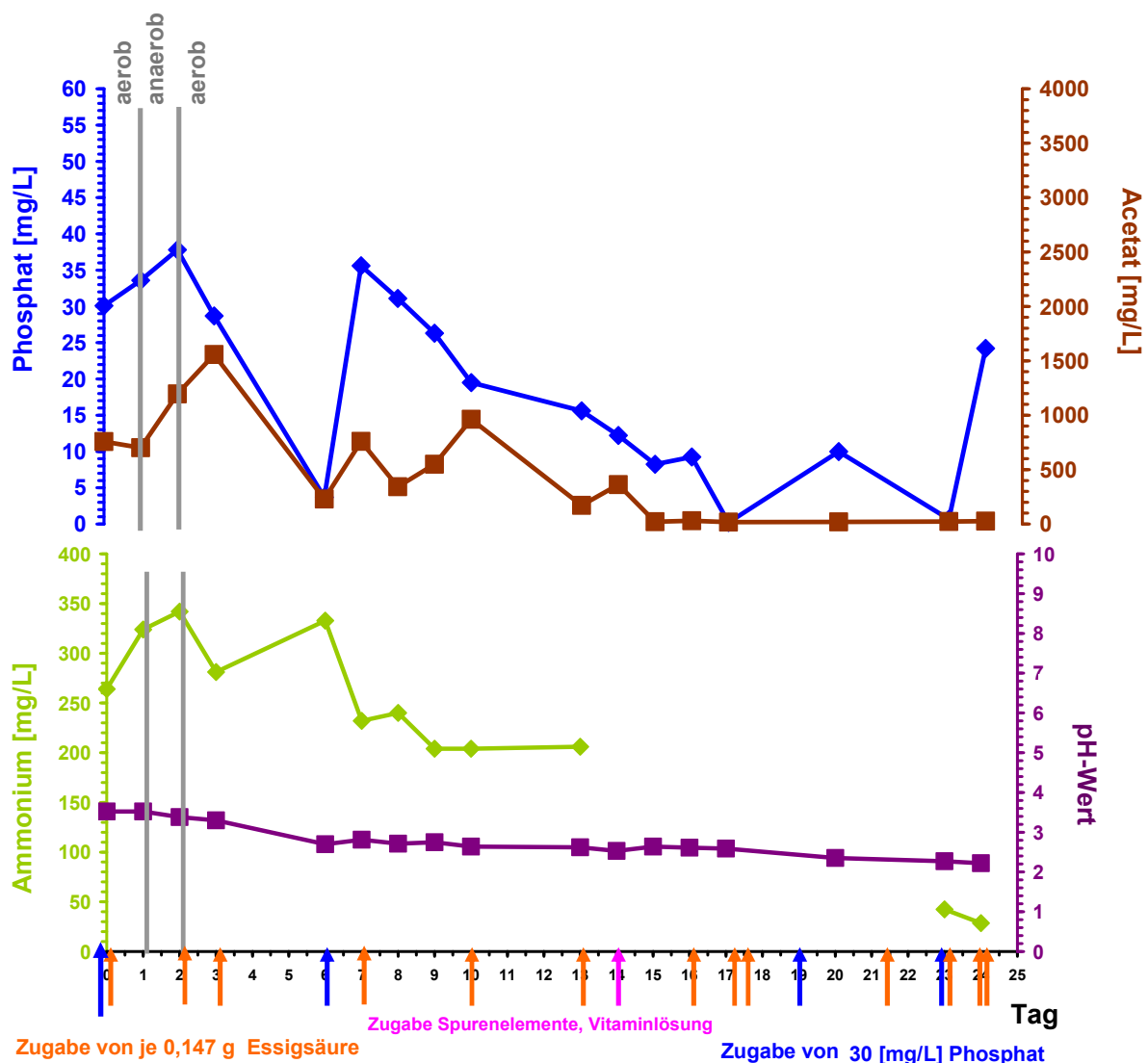


Abbildung 66: Substratverwertung der Mischkultur RSAS im Minimalmedium bei mehrmaliger Phosphatzugabe: Phosphat-, Acetat-, Ammoniumgehalt und pH-Wert.

Die Abbildung 66 zeigt den Versuchsansatz mit einer Phosphatausgangskonzentration von 30 mg/L und dreimaliger Zufütterung. Der Phosphatgehalt fiel in den ersten 6 Tagen von 30,1 mg/L auf 3,7 mg/L. Nach einer Phosphatzugabe wurde nach 7 Tagen ein Wert von 35,6 mg/L erreicht. Nachdem der Phosphatwert nach 17 Tagen 0,2 mg/L betrug, stieg er

nach Zugabe am 19. Tag. Nach 20 Tagen wurden 10 mg/L gemessen. Bei Versuchsabbruch erreichte die Phosphatkonzentration 24,2 mg/L. Der Acetatgehalt bewegte sich von anfangs 757,3 mg/L nach 26,3 mg/L bei Versuchsabbruch. Die Ammoniumkonzentration sank von 264 mg/L zu Beginn auf 28,6 mg/L am Ende. Der pH-Wert betrug am Anfang 3,5 und bei Abbruch 2.

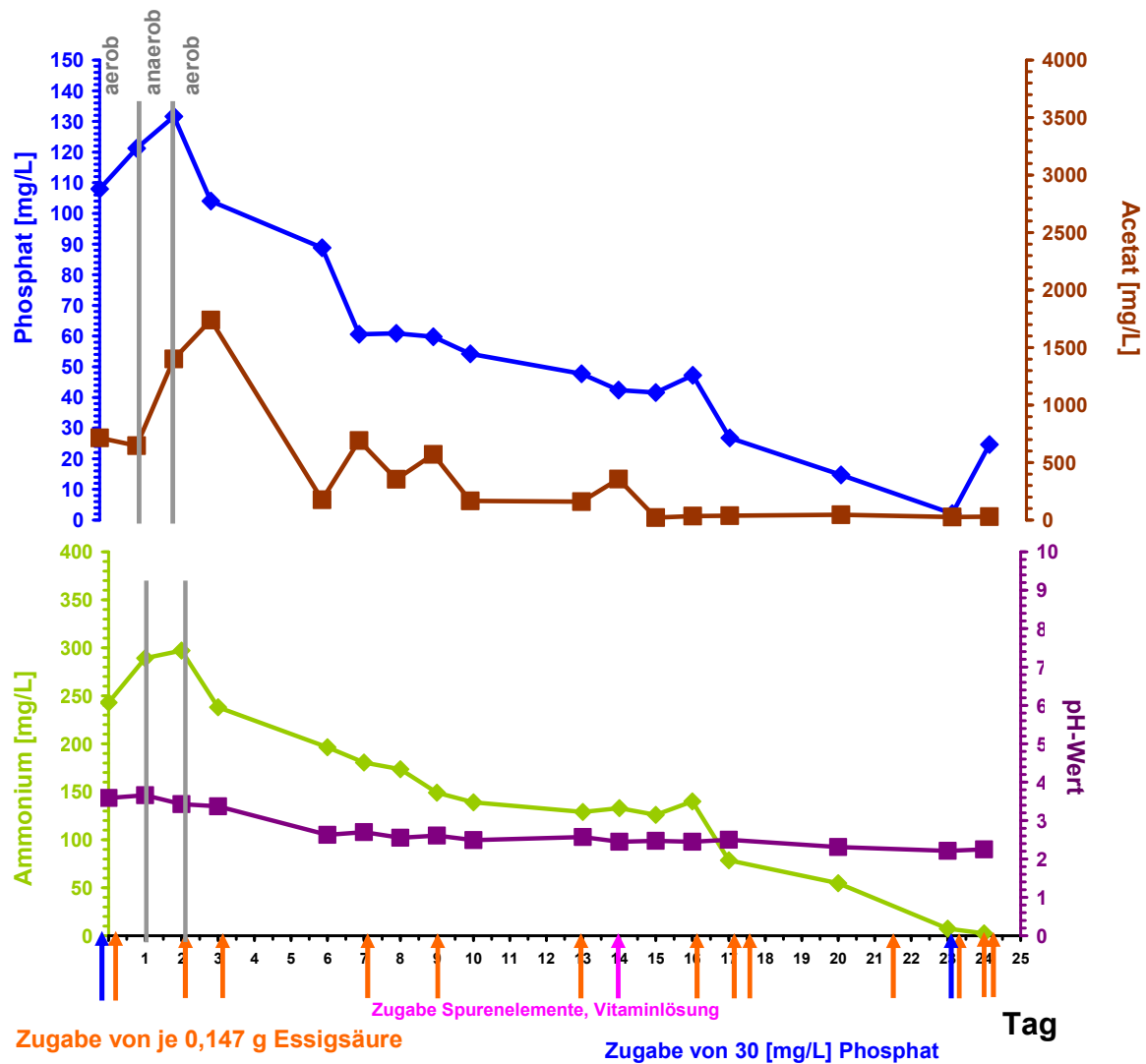


Abbildung 67: Substratverwertung der Mischkultur RSAS im Minimalmedium bei einmaliger Phosphatzugabe: Phosphat-, Acetat-, Ammoniumgehalt und pH-Wert.

Die obige Abbildung 67 zeigt den Versuchsansatz mit einer Phosphatausgangskonzentration von 100 mg/L ohne weitere Zufütterung. Der Phosphatwert sank von anfangs 108 mg/L auf 2,09 mg/L nach 23 Tagen. Der Acetatgehalt betrug zu Beginn 714,7 mg/L und bei Versuchsabbruch 29,6 mg/L. Der Ammoniumwert fiel von anfangs 243 mg/L auf 2,5 mg/L bei Abbruch. Der pH-Wert nahm von 4 auf 2 ab.

Schlussfolgerung

Bei alternierend aeroben und anaeroben Bedingungen im Labormaßstab bei Versuchszeiten bis zu 25 Tagen mit Essigsäure als Substrat konnten maximal 100 mg/L Phosphat im

Medium entfernt werden. Dabei war es unerheblich, ob die Anfangskonzentration im Medium bei 30 mg/L (mit dreimaliger Zufütterung von Phosphat) oder 100 mg/L Phosphat lag.

Bei Verwendung von Acetat als Substrat konnte ein analoges Verhalten bezüglich der maximalen Phosphatentfernung von 100 mg/L im Medium festgestellt werden. Allerdings brauchten die Mikroorganismen der Mischkultur weniger Zeit für die Akklimationisierung.

3.2.1.5 Polyphosphatbildung in der Klärschlammbiozönose

Am Beispiel des Rücklaufschlammes der Kläranlage Aachen-Soers wurde untersucht, inwieweit die Klärschlammbiozönose in der Lage ist, Polyphosphat zu bilden und zu speichern. Außerdem sollte die gebildete Menge des Speicherstoffes qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden.

Wachstumsverlauf

Die Kultivierung erfolgte in einer 500 mL-Duranflasche mit 240 mL Reaktionsmedium und 10 mL Rücklaufschlamm 72 Stunden lang. Während des Untersuchungszeitraums wurde alternierend 24 Stunden lang Sauerstoff beziehungsweise Stickstoff zugeführt.

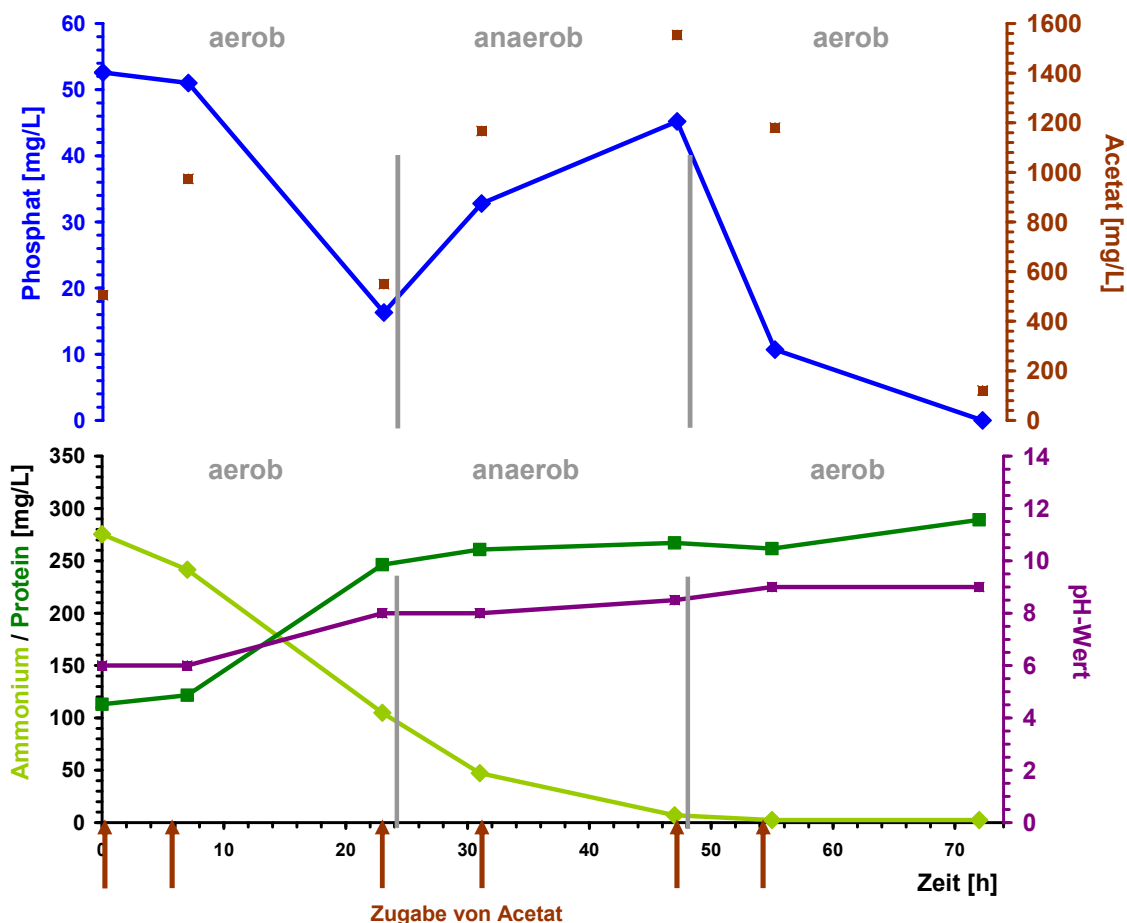


Abbildung 68: Substratverwertung der Klärschlammbiozönose während der Versuchsdauer von 72 Stunden.

Es kam zu einer fast vollständigen Phosphatfestlegung. Der Wert von anfänglich 52,6 mg/L fiel auf abschließend 0,15 mg/L Ortho-Phosphat. Während im aeroben Zeitraum Phosphat aufgenommen wurde, war in der anaeroben Phase eine Phosphatrücklösung zu ver-

zeichnen. Es wurde im Beobachtungszeitraum sechsmal Acetat zu Beginn, nach 6, 23, 31, 47 und 54 Stunden zugegeben. Bei Versuchsende konnten 120,6 mg/L Acetat nachgewiesen werden. Der Ammoniumwert betrug zu Beginn 275,5 mg/L und erreichte 2,5 mg/L bei Versuchsende. Der Proteingehalt stieg von 113,1 mg/L bis zum Ende auf 289,1 mg/L. Der pH-Wert lag zu Beginn bei 6 und am Ende bei 9,0.

Der Phosphatgehalt in der Biomasse sowie die Phosphat-Reduktion im Medium sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Trockengewicht und Phosphatgehalt in der Trockensubstanz bei der Klärschlamm-biozönose mit Acetat als Substrat nach dreitägiger Kultivierung.

Phosphat-Reduktion im Medium [mg/L]	Trockengewicht [mg/L]	Phosphat (P) in der Trockensubstanz (TG)
52,6	1.380	45,4 mg P/1.380 mg TG (3 %)

Schlussfolgerung

Bei der Klärschlamm-biozönose betrug die Massenbilanz nach 72 Stunden 98,5 mmol Kohlenstoff, 15 mmol Stickstoff und 0,6 mmol Phosphor. Dies entspricht einem C/N/P-Verhältnis von 100/15/0,6.

Das reduzierte Phosphat aus dem Medium fand sich fast vollständig in der Biomasse der Mischkultur wieder.

Qualitativer und quantitativer Nachweis von Phosphat und Polyphosphat

Der qualitative Nachweis der gebildeten Polyphosphate erfolgte mikroskopisch (Neisser-Färbung) und fluoreszenzphotometrisch.

Dabei konnten nach Kultivierung im alkalischen Milieu ausschließlich Bakterien nachgewiesen werden, die bei genauerer Betrachtung Einsschlüsse von Polyphosphaten aufwiesen. Allerdings sind die Speicherstoffgranula unter dem Mikroskop bei 100 facher Vergrößerung nur schwer erkennbar.

Die Abbildung 69 zeigt die mikroskopische Aufnahme der Mischkultur nach Anwendung von Neisser- und Sudanschwarzfärbung.

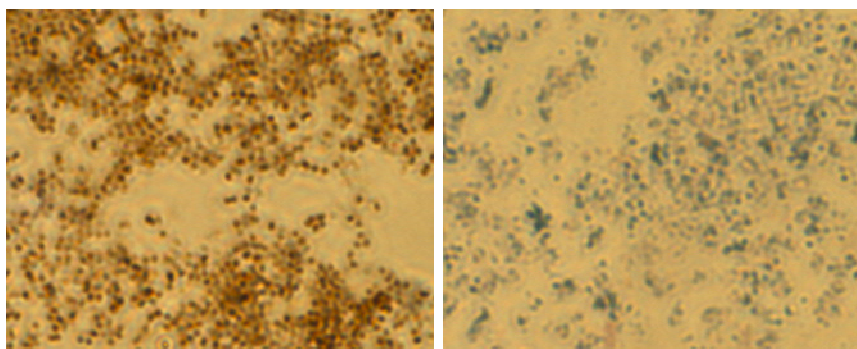


Abbildung 69: Neisser- (links) und Sudanschwarzfärbung (rechts) der Klärschlamm-biozönose.

Nach Extraktion der mikrobiell gebildeten Polyphosphate nach Clark et al. (1986) wurden die Fraktionen 1 bis 3 fluoressenzphotometrisch untersucht.

Während bei Fraktion 1 (kurzkettige Polyphosphate) keine Wellenlängenveränderung sichtbar war, kam es bei den Fraktionen 2 und 3 (mittellang- und langkettige Polyphosphate) zu einer Wellenlängenverschiebung.

Die Abbildung 70 zeigt die Aufnahme des Wellenlängenscans der Extrakte nach der fluoressenzphotometrischen Messung.

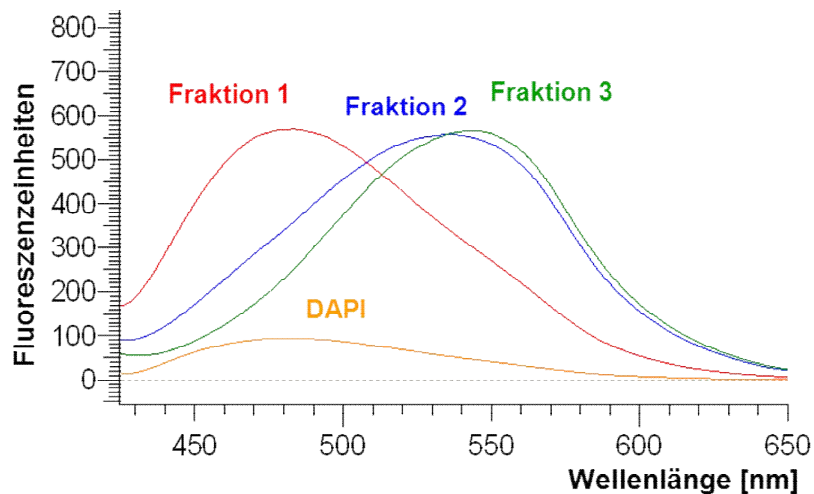


Abbildung 70: Wellenlängenscan der Klärschlamm-biozönose.

Des Weiteren wurde die quantitative Polyphosphatausbeute der Fraktionen 1 bis 3 mittels Fluoreszenzphotometer bestimmt. Die Kalibration erfolgte mit Hilfe der Polyphosphat-standards Budit 4 (Kettenlänge ~ 30) und Pentanatriumtriphosphat (Kettenlänge ~3).

In Tabelle 9 sind die Messergebnisse der quantitativen Untersuchung mit Standardgerade Budit 4 bzw. Pentanatriumtriphosphat dargestellt.

Tabelle 9: Quantitative fluoressenzphotometrische Messung der Polyphosphate aus der Klärschlamm-biozönose.

Gesamtumsatz Polyphosphat (Fluoressenzphotometer)	[mg/L] (Standardgerade Budit 4)	[mg/L] (Standardgerade Pentanatrium- triphosphat)
Fraktion 1	7,7	7,7
Fraktion 2	19,3	19,6
Fraktion 3	20,2	20,2
Summe Fraktion 1-3	47,2	47,5

Schlussfolgerung

Die während der Kultivierung gebildeten Polyphosphate in der Klärschlamm-biozönose konnten qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. In der Biomasse wurde der reduzierte Phosphatgehalt aus dem Medium fast vollständig als Polyphosphat gespeichert.

3.2.2 Phosphatanreicherung bei *Cunninghamella elegans*

In 3.2.1 wurde die Phosphatelimination bzw. Polyphosphatspeicherung durch Mischpopulation von Klärschlamm-Mikroorganismen untersucht. Dabei war die maximal mögliche Eliminierungsmenge von 100 mg/L Phosphat ermittelt worden. Es kam während des Beobachtungszeitraums neben der Polyphosphatspeicherung im Faulschlamm auch zu Phosphatausfällungen im Medium. Nun sollte festgestellt werden, ob die Phosphataufnahme durch den Pilz *Cunninghamella elegans* gesteigert werden kann, so dass eine Eliminierungsmenge im g-Bereich möglich wird. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob *Cunninghamella elegans* in der Lage ist, Polyphosphate zu speichern.

3.2.2.1 Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen und Phosphataufnahmekapazität bei *Cunninghamella elegans* im Medium nach Hesseltine und Anderson

Es sollte festgestellt werden, ob die Stämme 1908, 8271 und 63299 von *Cunninghamella elegans* in der Lage sind, Phosphat aufzunehmen und welcher zeitliche Rahmen für die Aufnahme erforderlich ist. Zum Einsatz kam das Medium nach Hesseltine und Anderson aus der 2003 im Brazilian Journal of Microbiology erschienenen Arbeit von M.A.B. Lima et al. mit dem Titel: „Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*“.

Die Ansätze standen bei Raumtemperatur mit täglichem Hell-Dunkel-Wechsel im Labor. Das Wachstum und die Phosphataufnahme der vier Stämme von *Cunninghamella elegans* wurden über einen Zeitraum von 77 Tagen untersucht. Der Ansatz enthielt 100 mL Medium nach Hesseltine und Anderson mit 1 mL Inokulum (zwischen 5×10^4 und 2×10^5 Sporen). Es wurde nach 19, 29 und 36 Tagen jeweils 0,6 g Glucose zugegeben. Nach 30 und 37 Tagen erfolgte eine Zugabe von jeweils 20 mg Asparagin und 2,5 mg $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$.

In Abbildung 71 ist der Phosphatgehalt in Abhängigkeit von der Zeit für den Stamm 1908 von *Cunninghamella elegans* graphisch dargestellt. Die Darstellungen für die Stämme 8271 und 63299 befinden sich im Anhang (Abbildung 122 und 123).

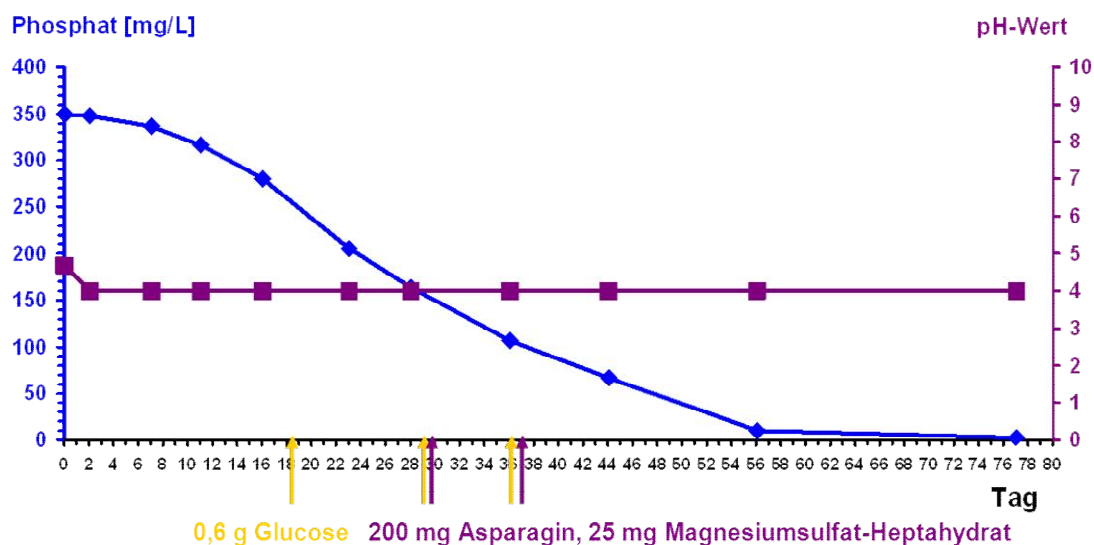


Abbildung 71: Phosphataufnahme und pH-Wert während des Wachstums von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Medium nach Hesseltine und Anderson (mit Nachdosierung von Glucose und Asparagin).

Der Phosphatgehalt fiel von anfänglich 35,0 mg/100 mL auf 0,25 mg/100 mL bei Versuchsabbruch. Zu Beginn lag der pH-Wert bei 4,7 und blieb nach kurzer Zeit bei 4 konstant. Nach Versuchsabbruch wurden die Pilze von der wässrigen Lösung abgetrennt und das Trockengewicht bestimmt. Die Wachstumscharakteristika der *Cunninghamella elegans* Stämme 1908, 8271 und 63299 befinden sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Wachstumscharakteristika von *Cunninghamella elegans* bei Nachdosierung von Glucose und Asparagin.

<i>Cunninghamella elegans</i> Stamm	1908	8271	63299
Inokulum (mL): Sporen	$1,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$8,5 \times 10^4$
Phosphat: Tag 0 → 77 [mg/100 mL]	35,0 → 0,25	35,0 → 0,3	35,0 → 24,2
pH-Wert: Tag 0 → 77 [mg/100 mL]	4,7 → 4,0	4,7 → 4,0	4,7 → 3,0
Trockengewicht: nach 77 Tagen [mg]	734,2	752,1	596,0

Während der *Cunninghamella elegans* Stamm 8271 ein analoges Wachstums- und Phosphataufnahmeverhalten zu Stamm 1908 zeigte, stagnierte die Phosphataufnahme bei Stamm 63299 nach 77 Tagen bei 24 mg/100 mL.

3.2.2.2 Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen und der Phosphataufnahme bei *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt

Es sollte untersucht werden, ob bei Kultivierung von *Cunninghamella elegans* im Medium mit Hefeextrakt eine höhere Phosphataufnahme bei kürzerer Versuchsdauer erreicht werden kann und wie sich die Variation der Hefeextraktmenge auf das Pilzwachstum auswirkt.

Dazu wurde der Stamm 1908 im Medium mit Hefeextrakt bei variierender Hefeextraktkonzentration drei Tage im Schüttelschrank bei 30°C inkubiert.

In Abbildung 72 ist der Phosphatgehalt bei einer Hefeextraktkonzentration von 4 g/L in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

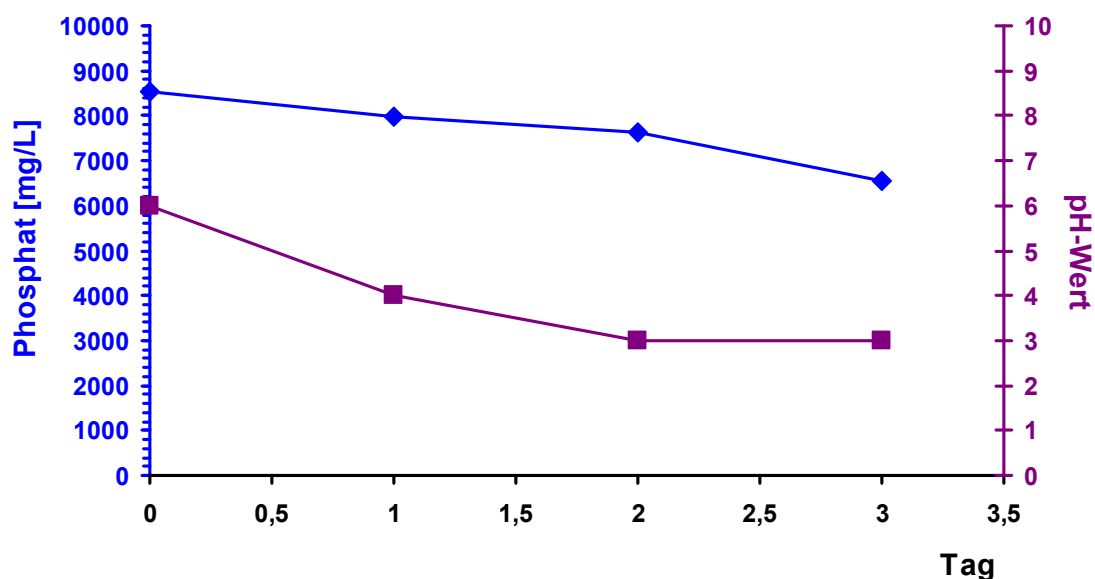


Abbildung 72: Phosphataufnahme und pH-Wert während des Wachstums von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt.

Während des Untersuchungszeitraums sank der Phosphatwert von anfänglich 8.540 mg/L auf 7.965 mg/L nach einem Tag, weiter auf 7.640 mg/L nach zwei Tagen und auf 6.550 mg/L nach drei Tagen. Der pH-Wert veränderte sich von 6 bei Beginn, über 4 nach einem Tag, auf 3 nach zwei Tagen und blieb bis Versuchsende konstant.

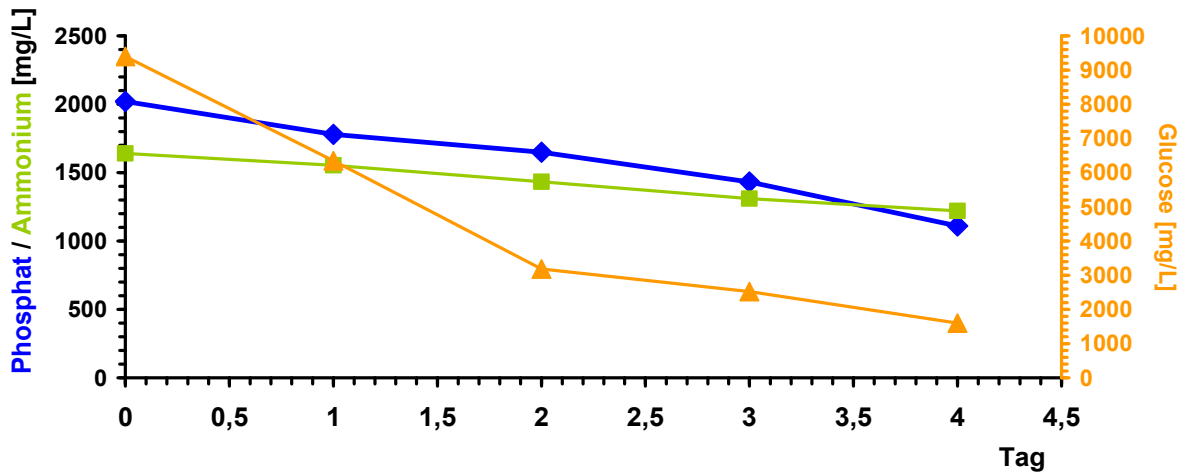


Abbildung 73: Dargestellt ist die Abnahme des gelösten Ortho-Phosphats sowie der Verbrauch von Ammonium und Acetat bzw. Glucose über die Zeit bei *Cunninghamhamella elegans* (Stamm 1908).

In Abbildung 73 ist die Substratverwertung von *Cunninghamhamella elegans* bei einer Hefeextraktkonzentration von 3 g/L in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Inkubation des Pilzes *Cunninghamhamella elegans* erfolgte vier Tage im Schüttelschrank bei 30°C im Medium mit Hefeextrakt. In diesem Zeitraum war eine Phosphatabnahme im Medium von 910 mg/L zu verzeichnen. Der Phosphatgehalt fiel dabei von 2020 mg/L auf 1110 mg/L. Während des Beobachtungszeitraums sank der Glucosegehalt von anfänglich 9400 mg/L auf abschließend 1600 mg/L. Der Ammoniumverbrauch lag bei 420 mg/L. Der pH-Wert veränderte sich während vier Tagen von 6 auf 3.

Die Abbildung 74 zeigt die Ansätze bei variiert Hefeextraktkonzentration bei Versuchsende.

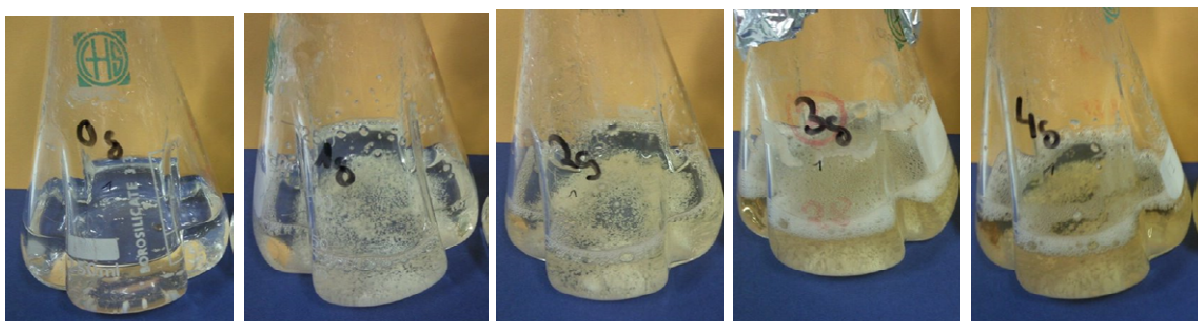


Abbildung 74: Wachstum von *Cunninghamhamella elegans* (Stamm 1908) nach drei Tagen bei variierender Hefeextrakt-Konzentration im Medium.

Schlussfolgerung

Die Darstellung 74 belegt, dass das Wachstum von *Cunninghamhamella elegans* durch höhere Hefeextraktkonzentration gefördert wird.

3.2.2.3 Einfluss der Substrate Glucose, Glycerin und Acetat auf das Wachstumsverhalten von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt

Es sollte festgestellt werden, wie sich der Einsatz der unterschiedlichen Substrate Glucose, Glycerin und Acetat auf das Pilzwachstum und die Phosphataufnahme auswirkt. Die Ansätze enthielten 100 mL Medium mit einer Hefeextraktkonzentration von 2,5 g/L und 1 mL Sporensuspension ($5,25 \times 10^4$ Sporen/mL). Die Kultivierung erfolgte zwei Tage bei 30°C im Schüttelschrank.

Beim Ansatz mit Glucose fiel der Phosphatgehalt von anfänglich 1.760 mg/L auf 1.690 mg/L nach 20 Stunden, auf 1.600 mg/L nach 27 Stunden und auf 1.380 mg/L nach 45 Stunden. Der Ammoniumgehalt sank von zunächst 1.890 mg/L auf 1.770 mg/L nach 20 Stunden, auf 1.720 mg/L nach 27 Stunden und auf 1.670 mg/L nach 45 Stunden. Die Konzentration der Glucose fiel von anfänglich 17.220 mg/L auf 15.970 mg/L nach 20 Stunden, auf 14.960 mg/L nach 27 Stunden und auf 12.540 mg/L bei Versuchsende. Der pH-Wert sank von 5 zu Beginn auf 4 nach 20 Stunden, auf 3 nach 27 Stunden und 2,5 nach 45 Stunden.

Beim Ansatz mit Glycerin sank der Phosphatwert von zunächst 1.860 mg/L auf 1.750 mg/L nach 20 Stunden, auf 1.600 mg/L nach 27 Stunden und stieg auf 1.750 mg/L bei Versuchsabbruch. Der Ammoniumgehalt fiel von anfänglich 2.590 mg/L auf 2.530 mg/L nach 20 Stunden, auf 2.500 mg/L nach 27 Stunden und 2.470 mg/L nach 45 Stunden. Die Glycerinkonzentration fiel von 10.960 mg/L zu Beginn auf 10.140 mg/L nach 20 Stunden, auf 9.900 mg/L nach 27 Stunden und 9.240 mg/L bei Versuchsende. Der pH-Wert stieg von 5 zu Beginn auf 6 nach 20 Stunden und blieb konstant bis zum Versuchsabbruch.

Beim Ansatz mit Acetat sank der Phosphatwert von anfänglich 2.240 mg/L auf 2.010 mg/L nach 20 Stunden, auf 1.970 mg/L nach 27 Stunden und stieg auf 2.090 mg/L bei Versuchsabbruch an. Der Ammoniumgehalt fiel von zunächst 1.910 mg/L auf 1.900 mg/L nach 20 Stunden, auf 1.790 mg/L nach 27 Stunden und auf 1.770 mg/L nach 45 Stunden. Die Acetatkonzentration nahm von anfänglich 1.878 mg/L auf 1.426 mg/L nach 20 Stunden ab, betrug nach 27 Stunden 1.280 mg/L und 137 mg/L bei Versuchsende. Der pH-Wert stieg von zunächst 6 auf 7 nach 20 Stunden, blieb bis 27 Stunden unverändert und betrug nach 45 Stunden 8. Im Anhang sind die Wachstumszustände in den Ansätzen nach 45 Stunden festgehalten (Abbildung 128).

Tabelle 11: Verbrauch an Glucose/Glycerin/Acetat, Ammonium und Phosphat im Medium und gebildete Trockenmasse innerhalb von zwei Tagen durch *Cunninghamella elegans*.

Ansatz mit Glucose/ Glycerin/ Acetat	0 h [mg/L]	45 h [mg/L]	Reduktion [mg/L]	C/N/P [mmol]	C/N/P Verhältnis
Glucose/ (C)	17.220	12.540	4.680	(156)	(100)
Glycerin/ (C)	10.960	9.240	1.720	(56)	(100)
Acetat (C)	1.878	137	1.741	(59)	(100)
Ammonium (N)	1.890	1.670	220	(12)	(8)
	2.590	2.470	120	(7)	(12)
	1.910	1.770	140	(8)	(14)
Phosphat (P)	1.760	1.380	380	(4)	(3)
	1.860	1.750	110	(1)	(2)
	2.240	2.090	150	(2)	(3)

Tabelle 11 zeigt die Massenbilanz für die Ansätze mit Glucose, Glycerin und Acetat. Beim Ansatz mit Glucose liegt ein C/N/P-Verhältnis von 100/8/3 vor, beim Ansatz mit Glycerin beträgt das C/N/P-Verhältnis 100/12/2 und der Ansatz mit Acetat weist ein C/N/P-Verhältnis von 100/14/3 auf.

Schlussfolgerung

Wurde *Cunninghamella elegans* mit Glucose kultiviert, konnte bezüglich der Biomassebildung und Phosphateliminierung das beste Ergebnis erzielt werden.

3.2.2.4 Einfluss der Kulturbedingungen im Schüttelschrank und Begasung mit technischer Luft auf das Wachstum von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908)

Im Folgenden wurde der Einfluss von Kultivierung im Schüttelschrank und aktiver Belüftung durch technische Luft auf die Biomassenbildung und Phosphataufnahme von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) untersucht. Die Inkubation der Biomasse von *Cunninghamella elegans* im Schüttelschrank erfolgte während einer Dauer von vier Tagen bei 30°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm. Der Ansatz enthielt 250 mL Medium mit Hefeextrakt und 1 mL Sporensuspension ($9,56 \times 10^4$ Sporen/mL). Die Kultivierung mit Druckluft erfolgte ebenfalls vier Tage lang bei 30°C. Die Zufuhr der technischen Luft fand über zwei Schläuche statt, bei gleichzeitigem Einsatz des Magnetrührers. Medium und Sporensuspension entsprachen dem Ansatz im Schüttelschrank. Da in Schüttelkulturen der Sauerstoffeintrag in das Medium limitiert ist, sollten durch Belüftung ein besseres Wachstum und eine erhöhte Phosphorspeicherung erreicht werden. Die Ergebnisse der Ansätze sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Phosphor-Reduktion im Medium und Phosphorfestlegung in der Trockenmasse bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.

Ansatz	Phosphor-Reduktion [mg/250mL]	Phosphor [mg] in Trockenmasse	Phosphor/ Trockenmasse [%]
Im Schüttelschrank	45,0	47,8 / 2.325 mg TG	2,1
Belüftung mit Druckluft	55,0	57,0 / 2.400 mg TG	2,4



Abbildung 75: Kultivierung des Pilzes *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Schüttelschrank (links) und aktive Belüftung mit technischer Luft (rechts).

Schlussfolgerung

Beim Vergleich der Kulturbedingungen Schüttelschrank und Belüftung mit technischer Luft ergibt sich eine höhere Phosphatfestlegung und Biomassenbildung bei Belüftung.

3.2.2.5 Einfluss der Versuchszeit auf das Wachstum von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908)

Während in den vorausgegangenen Kapiteln *Cunninghamella elegans* maximal vier Tage kultiviert wurde, sollte nun festgestellt werden, wie sich die Inkubation von acht Tagen im Schüttelschrank auf die Biomassenbildung und Phosphataufnahme bei *Cunninghamella elegans* auswirkt.

Im Fokus der Untersuchung stand der Verbrauch an Phosphat, Glucose und Ammonium sowie die pH-Wert-Veränderung im Medium. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelschrank bei 30°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm. Der Ansatz enthielt 100 mL Medium mit Hefeextrakt und 1 mL Sporensuspension ($9,56 \times 10^4$ Sporen/mL). Die folgende Abbildung 76 zeigt die Substratverwertung von *Cunninghamella elegans* über acht Tage.

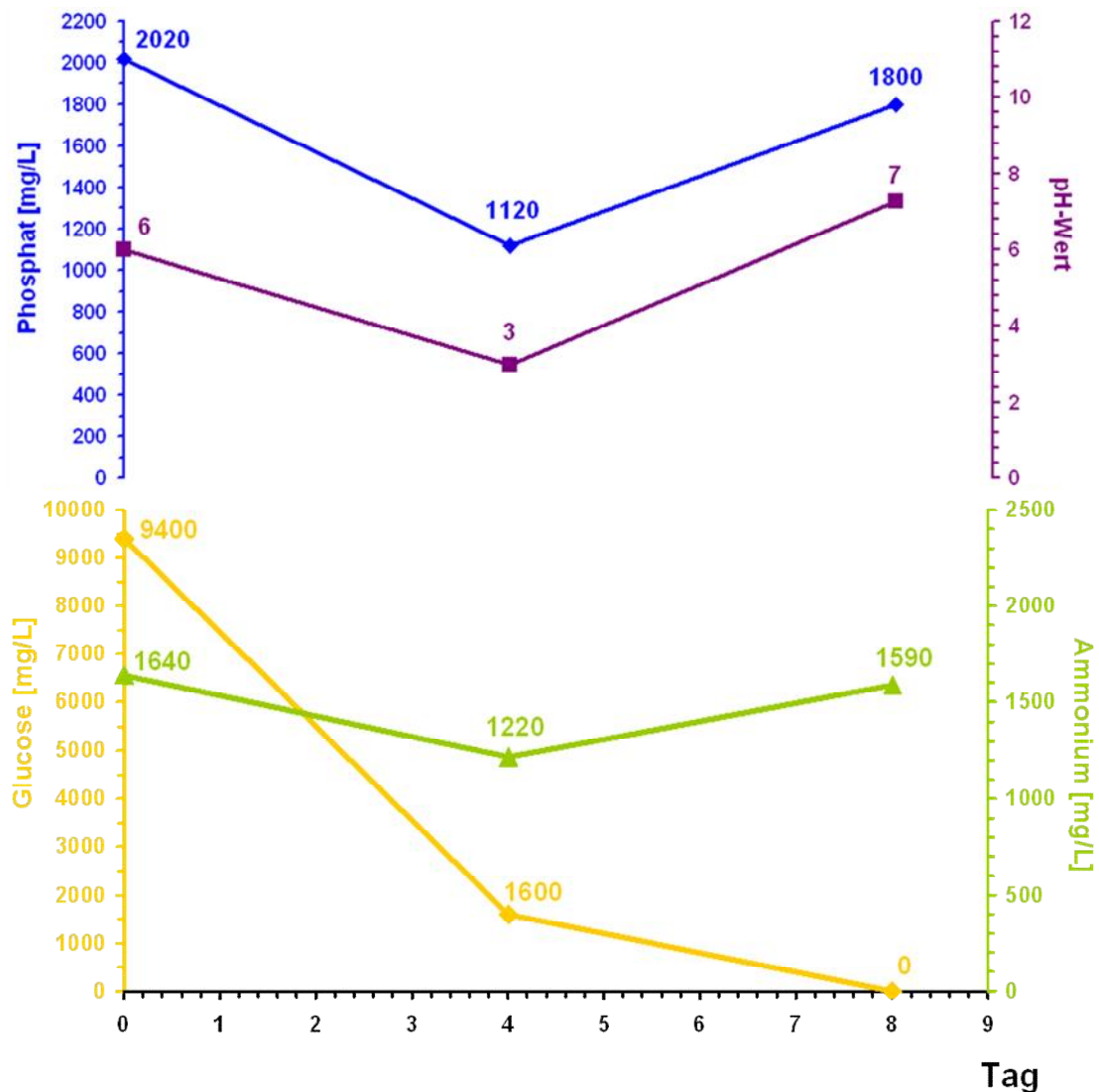


Abbildung 76: Substratverwertung von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) innerhalb von 8 Tagen.

Der Phosphatgehalt sank zunächst von anfänglich 2.020 mg/L auf 1.120 mg/L nach vier Tagen. Dann stieg er kontinuierlich bis auf 1.800 mg/L nach acht Tagen an. Der pH-Wert veränderte sich von 6 bei Versuchsbeginn über 3 nach vier Tagen und betrug bei Versuchsende 7. Die Glucosekonzentration im Medium fiel von 9.400 mg/L zu Beginn auf 1.600 mg/L nach vier Tagen und verringerte sich weiter, bis nach acht Tagen ein Nachweis nicht mehr möglich war. Der Ammoniumwert lag bei Versuchsbeginn bei 1.640 mg/L und sank auf 1.220 mg/L nach vier Tagen. Dann stieg er kontinuierlich bis auf 1.590 mg/L bei Versuchsabbruch an.

Schlussfolgerung

Die Kurven weisen eine biphasische Charakteristik auf. Nach einer aeroben Wachstumsphase (Abnahme von Glucose, Phosphat und Ammonium) stagniert das Wachstum. Nach vollständigem Verbrauch der Kohlenstoffquelle (Glucose) kam es zu einer Phosphatrücklösung, die mit einer partiellen Zelllyse einherging. Die Zellkugeln sind teilweise zerstört, die leeren Hüllen schwimmen an der Oberfläche, was zu einer Phosphat- und Ammoniumfreisetzung ins Medium führte und den pH-Wert von 3 auf 7 steigen ließ. Dies deutet auf einen anaeroben Gärungsstoffwechsel hin (Verwertung von Säuren und Proteinen, Energie aus der Hydrolyse von Polyphosphaten, Phosphorrücklösung), da während des Versuchs keine Zuführung von Sauerstoff erfolgt. Die Phosphorrücklösung lässt auf eine intrazelluläre Polyphosphat-Speicherung schließen. Die unerwünschte Autolyse hat den Nachteil, dass neben dem Wiederanstieg des Phosphatwertes auch die Trennung der Biomasse vom Medium erschwert wird. Somit ist die Ermittlung des optimalen Zeitpunkts für den Versuchsabbruch entscheidend (siehe Abbildung 77).



Abbildung 77: Wachstumsscharakteristik von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) nach 8 Tagen Inkubation im Schüttelschrank im Medium mit Hefeextrakt.

3.2.2.6 Wachstum und Phosphataufnahme in den verschiedenen *Cunninghamella elegans*-Stämmen 1908, IFM 46109, 8271 und 63299

Im Rahmen der Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob die *Cunninghamella elegans*-Stämme 1908, IFM 46109, 8271 und 63299 bezüglich der Phosphataufnahme sowie der Biomassenbildung ein analoges Verhalten zeigen. Zu diesem Zweck wurden das C/N/P-Verhältnis der vier Stämme und die Elementenzusammensetzung mittels ICP-MS aus dem Medium und der Trockenmasse bestimmt.

Die Kultivierung der Stämme erfolgte im Medium mit Hefeextrakt bei 30°C im Schüttelschrank. Die Ansätze enthielten 100 mL Medium mit Hefeextrakt und 1 mL Sporensuspension (Stamm 1908: $8,7 \times 10^6$ Sporen/mL, Stamm IFM 46109: $4,9 \times 10^7$ Sporen/mL, Stamm 8271: $1,1 \times 10^7$ Sporen/mL und Stamm 63299: $3,3 \times 10^6$ Sporen/mL). Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 4,5 Tage.

In den folgenden Abbildungen 78 bis 81 sind die Wachstumskurven für die genannten *Cunninghamella elegans*-Stämme dargestellt.

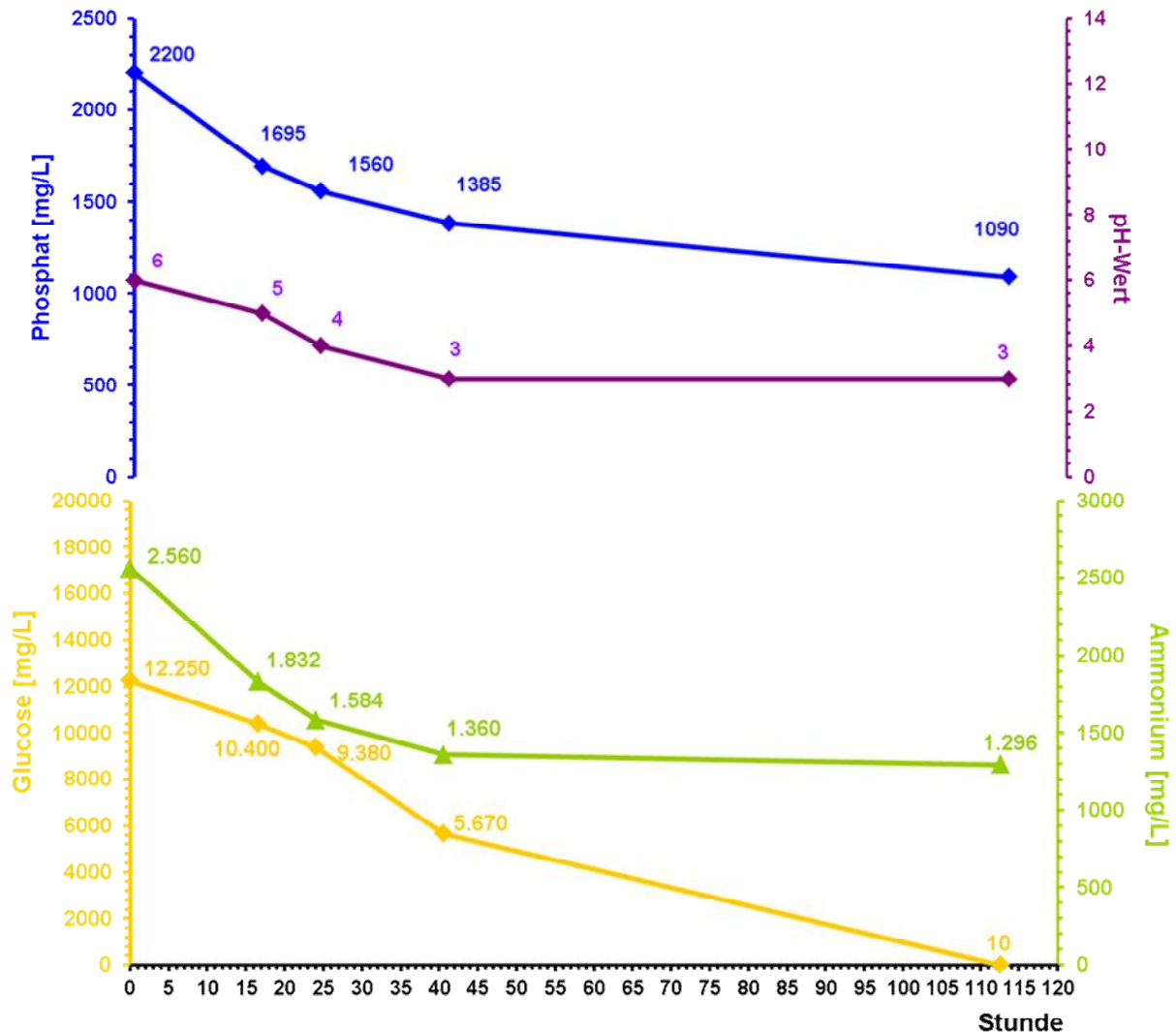


Abbildung 78: Entwicklung von Phosphat, pH-Wert, Glucose und Ammonium beim *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) während einer Versuchsdauer von 113 Stunden.

Die Abbildung 78 zeigt die Entwicklung des Phosphat-, Glucose- und Ammoniumgehalts sowie des pH-Wertes beim *Cunninghamella elegans*-Stamm 1908. Der Phosphatgehalt sank im Untersuchungszeitraum von 2.200 mg/L auf 1.090 mg/L. Der pH-Wert veränderte sich von 6 bei Versuchsbeginn bis auf 3 am Versuchsende. Der Glucosegehalt fiel von anfänglich 12.250 mg/L auf 10 mg/L bei Versuchsabbruch. Der Ammoniumgehalt sank von 2.560 mg/L auf 1.296 mg/L.

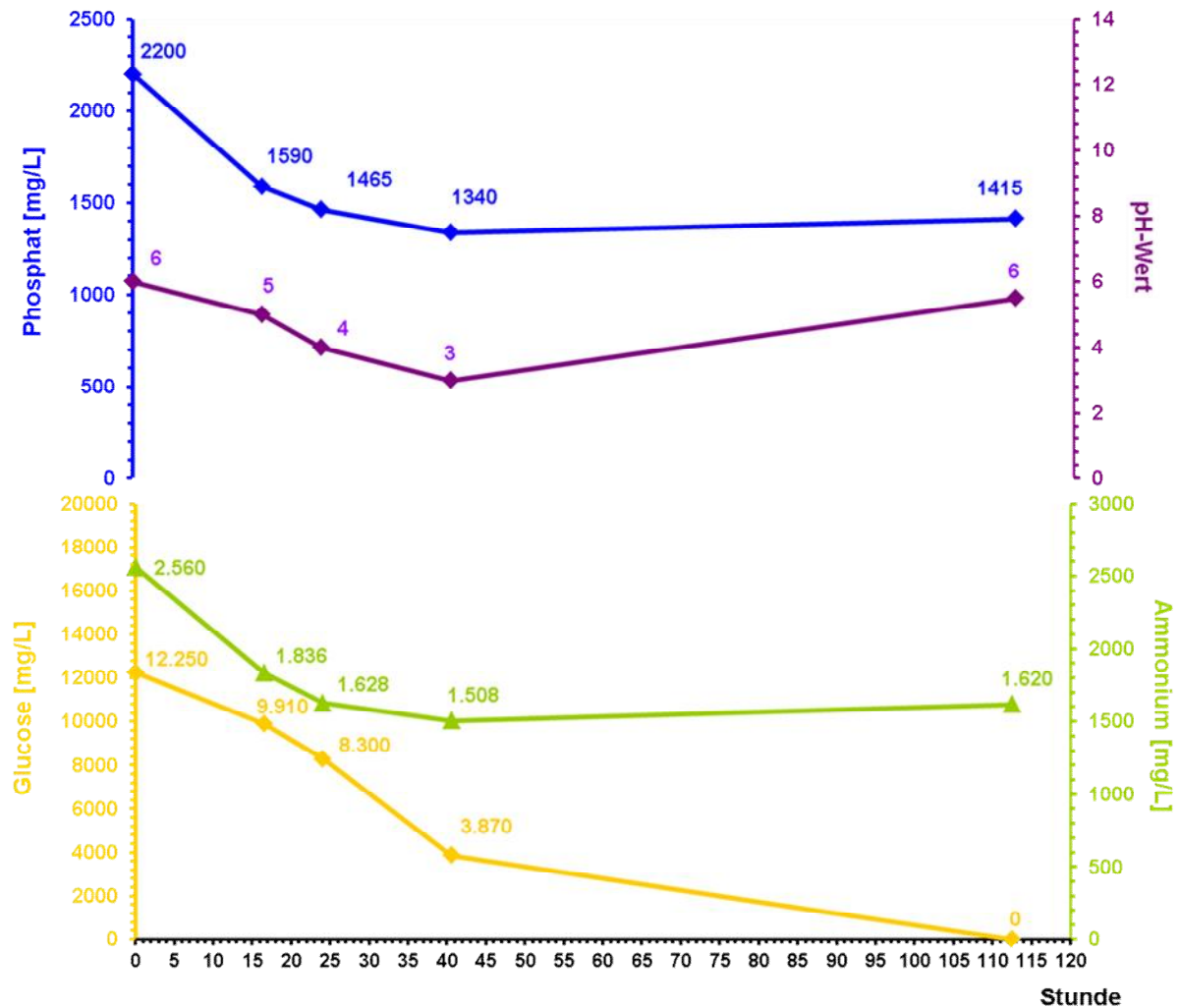


Abbildung 79: Entwicklung von Phosphat, pH-Wert, Glucose und Ammonium beim *Cunninghamella elegans* (Stamm IFM 46109) während einer Versuchsdauer von 113 Stunden.

Der Phosphatgehalt im Ansatz des *Cunninghamella elegans*-Stamms IFM 46109 sank von 2.200 mg/L zu Versuchsbeginn auf 1.340 mg/L nach einer Inkubationszeit von 40 Stunden und stieg bis Versuchsabbruch auf 1.415 mg/L an (siehe Abbildung 79). Beim pH-Wert war ein analoges Verhalten erkennbar. Er sank zunächst von 6 auf 3 nach 40 Stunden und erhöhte sich bis Versuchsende wieder auf 6.

Der Glucosegehalt betrug zu Beginn 12.250 mg/L und war nach 113 Stunden nicht mehr nachweisbar. Der Ammoniumgehalt fiel von zunächst 2.560 mg/L auf 1.508 mg/L nach 40 Stunden, um bei Versuchsende 1.620 mg/L zu erreichen.

Der Wiederanstieg von Phosphat-, Ammoniumgehalt und pH-Wert bis Versuchsabbruch sowie der Verbrauch an Glucose deuten auf eine Zellyse hin (siehe Kapitel 3.2.2.5).

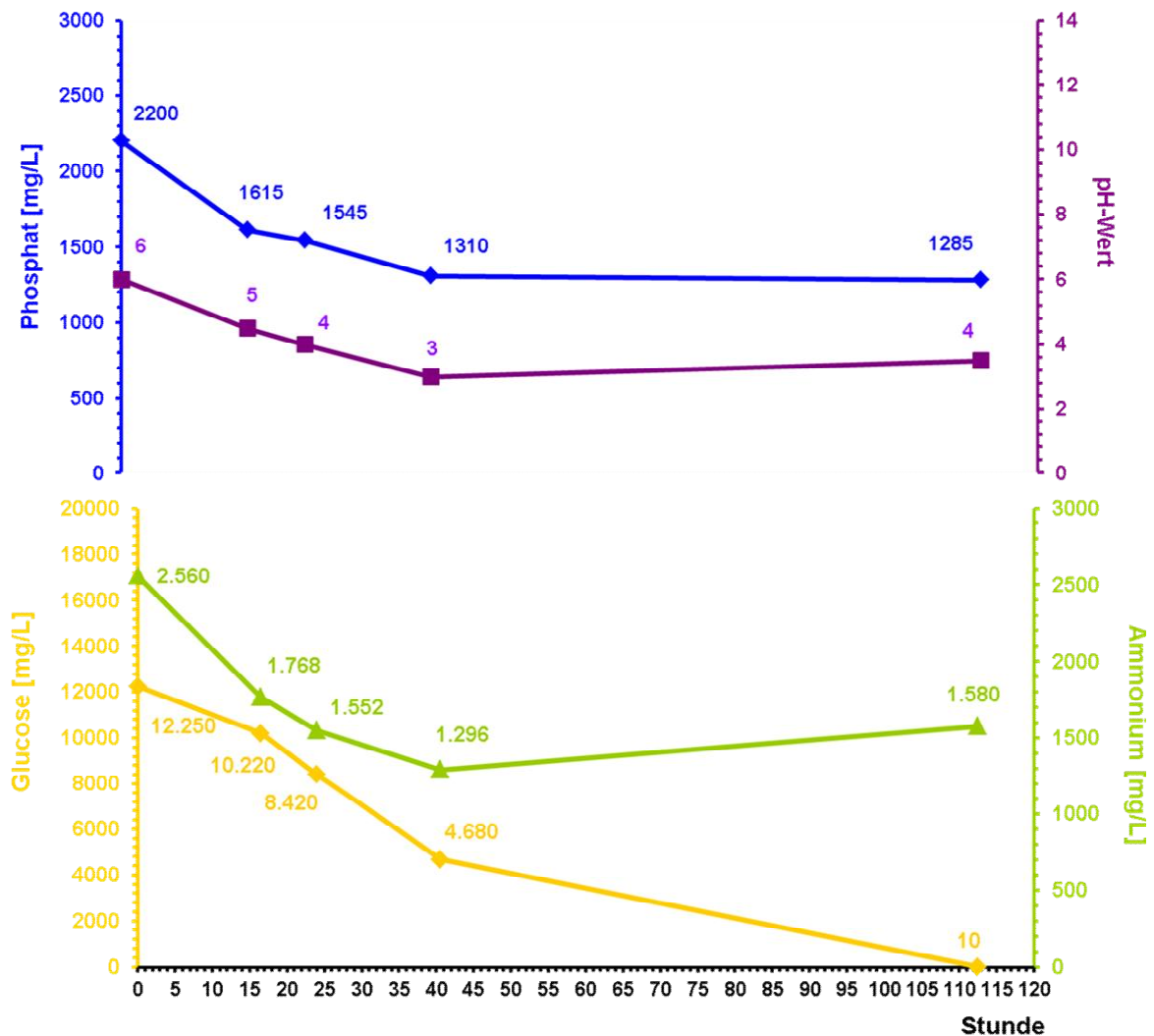


Abbildung 80: Entwicklung von Phosphat, pH-Wert, Glucose und Ammonium beim *Cunninghamella elegans* (Stamm 8271) während einer Versuchsdauer von 113 Stunden.

In Abbildung 80 nahm der Phosphatgehalt von 2.200 mg/L zu Beginn auf 1.285 mg/L ab. Der pH-Wert sank von 6 auf 3 nach 40 Stunden und erreichte einen Wert von 4 am Versuchsende. Der Glucosegehalt wurde während des Untersuchungszeitraums fast vollständig aufgebraucht (12.250 mg/L zu Beginn und 10 mg/L nach 113 Stunden). Der Ammoniumgehalt sank von 2.560 mg/L auf 1.296 mg/L nach 40 Stunden, um bei Versuchsabbruch 1.580 mg/L zu erreichen.

Die Entwicklung des Ammoniumgehalts und pH-Wertes beim *Cunninghamella elegans*-Stamm 8271 lassen auf eine beginnende Zellyse schließen, zumal der Glucosegehalt fast vollständig aufgebraucht war.

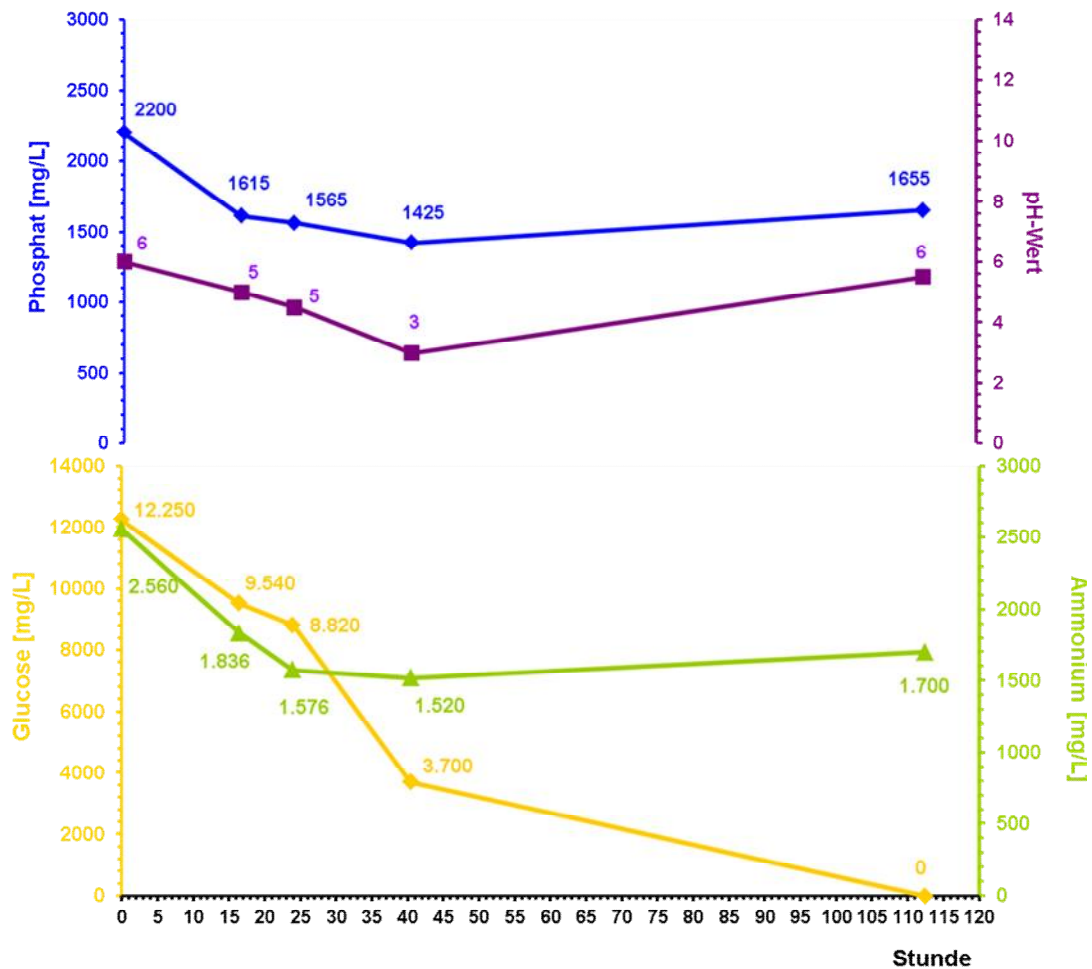


Abbildung 81: Entwicklung von Phosphat, pH-Wert, Glucose und Ammonium beim *Cunninghamella elegans* (Stamm 63299) während einer Versuchsdauer von 113 Stunden.

Beim *Cunninghamella elegans*-Stamm 63299 sank der Phosphatgehalt von 2.200 mg/L auf 1.425 mg/L nach 40 Stunden und stieg bis zum Versuchsende auf 1.655 mg/L an. Der pH-Wert fiel von 6 auf 3 nach 40 Stunden und erreichte bei Versuchsende wieder seinen Anfangswert. Der Glucosegehalt betrug anfangs 12.250 mg/L und war bei Versuchsende nicht mehr nachweisbar. Der Ammoniumgehalt sank von zunächst 2.560 mg/L auf 1.520 mg/L nach 40 Stunden und stieg bis zum Ende auf 1.700 mg/L an. Die Entwicklung der beschriebenen Werte lässt auch hier auf das Vorliegen einer Zellyse schließen.

Schlussfolgerung

Am Versuchsende stellten sich die vier Ansätze wie folgt dar.

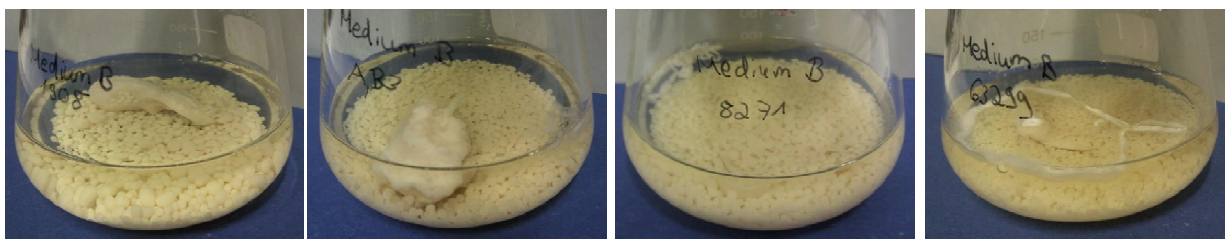


Abbildung 82: Wachstumscharakteristik der vier *Cunninghamella elegans*-Stämme 1908, IFM 46109, 8271, 63299 im Medium mit Hefeextrakt.

3.2.2.7 Festlegung des Phosphats in der Biomasse von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908)

Durch das Waschen der Biomasse von *Cunninghamella elegans* mit bidest. Wasser eines pH-Wertes von 5,5 bzw. 2 sollte ermittelt werden, in wie weit es sich bei der Phosphataufnahme durch den Pilz um eine Adsorption an der Zellwand oder eine intrazelluläre Speicherung handelt. Die Kultivierung der Biomasse erfolgte im Schüttelschrank bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm über vier Tage. Tabelle 13 zeigt die Phosphor-Reduktion im Medium und den Phosphorgehalt in der Trockenmasse. Die Ausgangskonzentration von Phosphor im Medium betrug 30 mg/100 mL.

Tabelle 13: Phosphor-Reduktion im Medium und Phosphorgehalt in der Trockenmasse bei *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) ungewaschen und gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5 und pH 2.

Ansätze von <i>Cunninghamella elegans</i>	Phosphor-Reduktion [mg/100 mL]	Phosphor [mg] in Trockenmasse	Phosphor/Trockenmasse [%]	Waschwasser Phosphor [mg/100 mL]
ungewaschen	18,0	19,1 / 930 mg TG	2,1	-
gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5	18,0	15,0 / 920 mg TG	1,6	3
gewaschen mit bidest. Wasser pH 2	20,0	15,0 / 950 mg TG	1,6	2

Schlussfolgerung

Bei den Versuchsansätzen konnte belegt werden, dass der Phosphorgehalt im Medium nach vier Tagen vollständig in der oder an die Biomasse gebunden ist (Trockengewicht).

In den Waschwässern konnten nur geringe Phosphorkonzentrationen nachgewiesen werden. Die folgende Abbildung 83 zeigt die Biomasse von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) vor und nach dem Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5. Auffällig ist dabei die leichte Farbänderung der Biomasse. Nach Analyse des Waschwassers konnten neben dem Phosphor auch Calcium, Kalium und Magnesium nachgewiesen werden.



Abbildung 83: *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) ungewaschen (links) und nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (rechts).

3.2.2.8 Phosphatkonzentration in der Biomasse und dem umgebenen Medium von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908 und IFM 46109)

Nach 113 Stunden wurden die Hefekugeln der *Cunninghamella elegans*-Stämme 1908 und IFM 46109 entnommen und der pH-Wert im Inneren der Kugeln und in der umgebenden Lösung gemessen.

Bei Stamm 1908 lagen die pH-Werte bei 3,19 im Inneren bzw. 3,13 in der Lösung. Stamm IFM 46109 wies pH-Werte von 6,54 bzw. 6,54 auf.

Nach 24-stündiger Trocknung der Biomasse bei 105°C im Trockenschrank wurde das Trockengewicht der zwei Stämme bestimmt.

Das Trockengewicht betrug 699,5 mg für Stamm 1908 und 650,1 mg für Stamm IFM 46109.

Es wurden mittels Ionenchromatographie die Anionen in den Pilzkugeln und in der umgebenden Lösung bei Versuchsende ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 14 zusammengefasst.

Ionengromatographisch ergab sich bei den beiden Stämmen 1908 und IFM 46109 ein Phosphatwert von 108,9 bzw. 180,1 mg/100 mL im Inneren der Hefekugeln und 119,0 bzw. 143,1 mg/100 mL in der umgebenden Lösung der Hefekugeln.

Tabelle 14: Ergebnisse der Ionenchromatographie von den *Cunninghamella elegans*-Stämmen 1908 und IFM 46109.

	Stamm 1908		Stamm IFM 46109	
Anion	in der umgebenden Lösung [mg/L]	Inneren der Hefekugeln [mg/L]	in der umgebenden Lösung [mg/L]	Inneren der Hefekugeln [mg/L]
Fluorid	16,7	14,3	14,7	16,0
Chlorid	6.570,0	4.009,5	3.888,8	5.034,6
Nitrit	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Bromid	1,2	9,1	4,0	5,5
Nitrat	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Phosphat	1.190,3	1.088,6	1.430,7	1.801,4
Sulfat	30,9	28,5	46,5	55,1

Die Elementenzusammensetzung mittels ICP-MS wurde aus den wässrigen Phasen, Medium bei Versuchsbeginn, in der Pilzkugel und in der umgebenden Lösung bei Versuchsende sowie aus der Trockenmasse bestimmt (siehe Tabelle 15 und 16).

Der mittels ICP-MS gemessene Phosphorwert bei den beiden *Cunninghamella elegans*-Stämmen 1908 und IFM 46109 betrug 25,6 bzw. 28,1 mg/100 mL im Inneren der Hefekugeln und 58,5 bzw. 33,3 mg/100 mL in der umgebenden Lösung der Hefekugeln und betrug nach Umrechnung in Phosphat (Umrechnungsfaktor 3,0662) 78,5 bzw. 86,2 mg/100 mL im Inneren der Hefekugeln und 179,4 bzw. 102,1 mg/100 mL in der umgebenden Lösung der Hefekugeln. So ist ein Vergleich mit den Phosphatwerten der Ionenchromatographie möglich.

Tabelle 15: Elementarnachweis (ICP-MS) des *Cunninghamella elegans*-Stamms 1908.

	in der umgebenden Lösung [mg/L]	im Inneren der Hefekugeln [mg/L]	in der Trockensubstanz [mg/kg]	im Medium [mg/L]
Aluminium	0,031	0,028	18,400	0,029
Arsen	< 0,005	< 0,005	< 0,600	< 0,005
Bor	0,135	0,063	< 13,000	0,064
Barium	< 0,002	0,002	< 1,100	< 0,002
Beryllium	< 0,005	< 0,005	< 0,800	< 0,005
Cadmium	<0,002	< 0,002	< 0,040	< 0,002
Calcium	3,161	1,826	635,600	7,113
Cobalt	0,007	0,003	0,711	0,009
Chrom	< 0,002	< 0,002	< 0,200	0,002
Kupfer	< 0,002	0,023	0,898	0,004
Eisen	< 0,008	< 0,008	< 0,800	< 0,008
Magnesium	3,102	1,563	771,200	6,198
Mangan	< 0,002	< 0,002	0,997	0,008
Molybdän	< 0,002	0,049	< 0,200	0,002
Nickel	< 0,002	< 0,002	< 0,200	< 0,002
Phosphor	585,200	256,200	25.618,800	550,900
Blei	< 0,002	0,008	< 0,600	< 0,002
Rubidium	0,553	0,234	0,829	0,257
Selen	0,052	0,029	< 0,400	< 0,008
Zinn	< 0,002	< 0,002	< 0,600	< 0,002
Strontium	0,019	0,010	2,926	0,031
Tellur	< 0,002	< 0,002	< 0,400	< 0,002
Thallium	< 0,002	< 0,002	< 0,040	< 0,002
Vanadium	< 0,002	< 0,002	0,037	< 0,002
Zink	0,240	0,167	109,900	0,866

Tabelle 16: Elementarnachweis (ICP-MS) des *Cunninghamella elegans*-Stamms IFM 46109.

	in der umgebenden Lösung [mg/L]	im Inneren der Hefekugeln [mg/L]	in der Trockensubstanz [mg/kg]	im Medium [mg/L]
Aluminium	0,034	0,020	6,641	0,029
Arsen	< 0,005	< 0,005	< 0,400	< 0,005
Bor	0,082	< 0,05	< 8,500	0,064
Barium	< 0,002	< 0,002	< 0,700	< 0,002
Beryllium	< 0,005	< 0,005	< 0,600	< 0,005
Cadmium	< 0,002	< 0,002	< 0,030	< 0,002
Calcium	0,546	0,786	925,700	7,113
Cobalt	0,005	0,005	0,602	0,009
Chrom	< 0,002	< 0,002	2,371	0,002
Kupfer	< 0,002	0,030	1,013	0,004
Eisen	< 0,008	< 0,008	42,300	< 0,008
Magnesium	0,736	0,499	1.277,300	6,198
Mangan	< 0,002	< 0,002	1,192	0,008
Molybdän	< 0,002	< 0,002	< 0,090	0,002
Nickel	< 0,002	< 0,002	< 0,090	< 0,002
Phosphor	333,100	281,000	23.410,600	550,900
Blei	< 0,002	0,003	< 0,400	< 0,002
Rubidium	0,253	0,211	3,689	0,257
Selen	0,021	0,026	< 0,300	< 0,008
Zinn	< 0,002	< 0,002	< 0,040	< 0,002
Strontium	0,003	0,004	4,425	0,031
Tellur	< 0,002	< 0,002	< 0,300	< 0,002
Thallium	< 0,002	< 0,002	< 0,030	< 0,002
Vanadium	0,002	0,002	0,081	< 0,002
Zink	0,109	0,107	132,400	0,866

3.2.2.9 Bilanzierung Phosphataufnahme bei den verschiedenen Pilzen *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908), *Absidia corymbifera*, *Mucor plumbeus*, *Mucor racemosus* und *Rhizopus stolonifer*

Es sollte untersucht werden, ob anstelle von *Cunninghamella elegans* auch andere Pilze der Gruppe der Zygomyceten in der Lage sind, Phosphat im Medium zu eliminieren bzw. diese als Polyphosphate zu speichern.

Untersucht wurden *Absidia corymbifera*, *Mucor plumbeus*, *Mucor racemosus* und *Rhizopus stolonifer*. Die genannten Pilze gehören zu den am häufigsten isolierten Zygomyceten. Die Zygomyceten weisen ein aerobes Wachstum auf und kommen weltweit in mehreren 100

Arten vor. Sie leben vor allem im Erdboden und auf verrottenden Pflanzen (Vgl. Haase, 2012).

Die Kultivierung der Pilze erfolgte im 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Medium mit und ohne Hefeextrakt und 1 mL Sporensuspension (*Cunninghamella elegans* Stamm 1908: $14,7 \times 10^4$ Sporen/mL, *Cunninghamella elegans* Stamm IFM 46109: $28,8 \times 10^4$ Sporen/mL, *Cunninghamella elegans* Stamm 8271: $10,6 \times 10^4$ Sporen/mL, *Cunninghamella elegans* Stamm 63299: $3,3 \times 10^4$ Sporen/mL, *Absidia corymbifera*: $12,3 \times 10^4$ Sporen/mL, *Mucor plumbeus*: $2,8 \times 10^4$ Sporen/mL, *Mucor racemosus*: $9,5 \times 10^4$ Sporen/mL, *Rhizopus stolonifer*: $3,8 \times 10^4$ Sporen/mL). Bei 30°C im Schüttelschrank. Der Untersuchungszeitraum betrug 7 Tage.

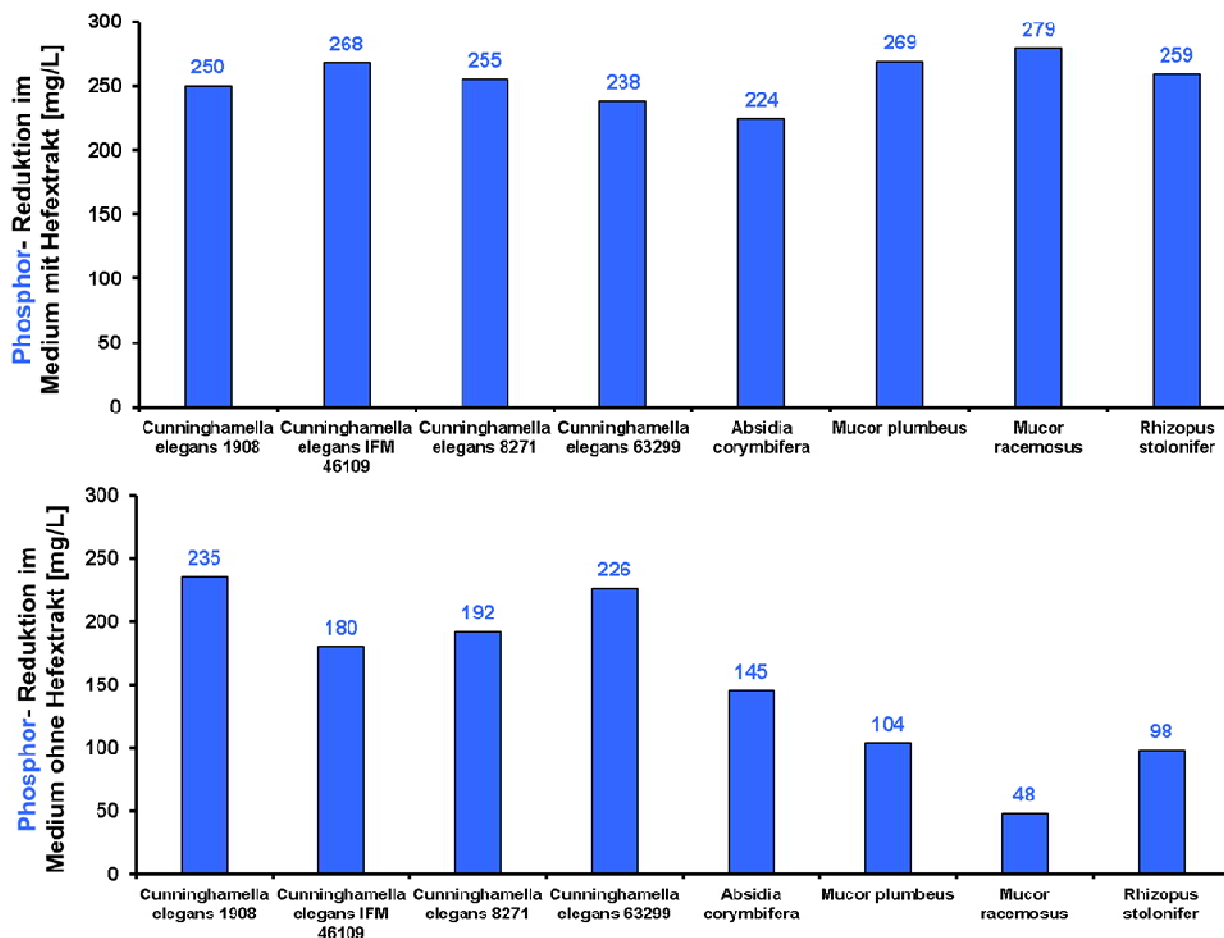


Abbildung 84: Phosphorreduktion von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908, IFM 46109, 8271, 63299), *Absidia corymbifera*, *Mucor plumbeus*, *Mucor racemosus* und *Rhizopus stolonifer* nach sieben tägiger Inkubation im Medium mit und ohne Hefeextrakt.

Bei allen Versuchsansätzen im Medium mit Hefeextrakt kam es nach sieben Tagen zu einer Phosphorreduktion zwischen 224 und 279 mg/L. Der pH-Wert betrug am Anfang 6 und bei Versuchsabbruch zwischen 3 und 3,5. Hingegen konnte im Medium ohne Hefeextrakt eine Phosphorreduktion zwischen 48 und 235 mg/L erreicht werden. Der pH-Wert betrug anfangs 5 und bei Versuchsende zwischen 4 und 4,5.

Die Bilder der Ansätze bei Versuchsabbruch befinden sich im Anhang (Abbildungen 129 bis 136). Die Morphologie der Pilze ist unabhängig von der Art der Kultivierung im Medium mit

und ohne Hefeextrakt. Wegen ihrer unterschiedlichen Wuchsformen konnten die Biomassen der *Cunninghamella elegans*-Stämme und *Absidia corymbifera* sowie *Rhizopus stolonifer* durch Filtration im Faltenfilter leichter vom Medium abgetrennt werden. Bei *Mucor plumbeus* und *Mucor racemosus* war die Biomassenabtrennung aufwendiger (z.B. durch zentrifugieren).

Exemplarisch werden in den Tabellen 17 und 18 die Pilze *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) und *Absidia corymbifera* bezüglich der Phosphorabnahme im Medium mit Hefeextrakt bzw. der Phosphoraufnahme in der Biomasse sowie die gebildete Menge an Polyphosphaten nach Extraktion (Clark et al., 1986) näher betrachtet.

Bei Versuchsabbruch ergab sich bei *Cunninghamella elegans* ein C/N/P-Verhältnis von 100/9/2,3 und bei *Absidia corymbifera* ein C/N/P-Verhältnis von 100/9/1,9.

Tabelle 17: Phosphorbilanz und Biomassenbildung bei den Pilzen *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) und *Absidia corymbifera*.

Ansatz	Phosphor-Reduktion im Medium [mg/L]	Phosphor im Trockengewicht (TG) [mg]	Phosphor/ TG [%]
<i>Cunninghamella elegans</i>	250	136 mg / 5001 mg TG	2,7
<i>Absidia corymbifera</i>	224	85 mg / 4437 mg TG	1,9

Tabelle 18: Quantitative fluoreszenzphotometrische Messung der Polyphosphate bei den Pilzen *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) und *Absidia corymbifera*. Die Kalibration erfolgte mit den Standards Budit 4 und Pentanatriumtriphosphat.

Gesamtumsatz Polyphosphat (Fluoreszenzphotometer)	[mg/L] (Standardgerade Budit 4)		[mg/L] (Standardgerade Pentanatrium-triphosphat)	
Fraktion 1	27,3	12,4	23,7	9,9
Fraktion 2	37,5	23,3	31,2	21,4
Fraktion 3	69,0	43,5	72,6	41,5
Summe Fraktion 1-3	133,8	79,2	127,5	72,8

Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass im Labormaßstab bei optimalen Kulturbedingungen alle untersuchten Pilze in der Lage waren, Phosphat aus synthetischen Medien zu eliminieren und intrazellulär als Polyphosphat festzulegen. Die mikrobiell hergestellten Polyphosphate konnten in der vorliegenden Arbeit isoliert und nachgewiesen werden.

3.2.3 Phosphatelimination bei Prozesswässern mittels Klärschlamm-biozönose

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die Phosphateliminierung in synthetischen Medien bzw. die Polyphosphatspeicherung in den Zellen bei Mischpopulationen aus Klärschlamm-Mikroorganismen und beim Pilz *Cunninghamella elegans* dargestellt wurde, sollen nun alternative Phosphatquellen aus der Praxis untersucht werden. Als Grundlage für die Phosphateliminierung bzw. Polyphosphatbildung mittels Klärschlamm-biozönose dienten drei Prozesswässer der Firma Budenheim und ein Produktionswasser der Brauerei Erding.

3.2.3.1 Mikrobiologische Polyphosphatbildung aus Prozesswässern der Firma Budenheim

Untersucht wurden Waschwässer der Firma Budenheim, die bei der Phosphatgewinnung anfallen. Ziel waren die mikrobiologische Aufbereitung durch die Reduktion des gelösten Phosphats im Prozesswasser und die Festlegung von Phosphor als intrazelluläres Polyphosphat.

Die Zusammensetzung der drei Prozesswässer wird im Folgenden dargestellt. Alle drei Proben enthielten große Mengen an Phosphat und geringe Konzentrationen an Schwermetallen und wiesen einen sauren pH-Wert sowie eine hohe Leitfähigkeit auf (Tabellen 19 bis 21).

Tabelle 19: Chemisch/physikalische Eigenschaften der unfiltrierten Proben sowie Gehalt an Ammonium.

Parameter	Waschwasser Budenheim 1	Waschwasser Budenheim 2	Waschwasser Budenheim 3
pH-Wert	2,8	3,2	2,5
Leitfähigkeit [mS/cm]	15,1	18,6	11,5
Ammonium [mg/L]	5,8	11,8	10,3

Tabelle 20: Ionenchromatographie, Nachweis von Anionen aus filtrierten Proben.

Anion [mg/L]	Waschwasser Budenheim 1	Waschwasser Budenheim 2	Waschwasser Budenheim 3
Fluorid	n. a.	n. a.	n. a.
Chlorid	3.616	3.973	2.109
Nitrit	n. a.	n. a.	n. a.
Bromid	n. a.	n. a.	n. a.
Nitrat	29	31	36
Sulfat	185	295	261
Phosphat	16.500	23.700	14.500

Tabelle 21: Elementnachweis der unfiltrierten Proben mittels ICPMS, Darstellung sämtlicher Elemente in µg/kg.

Analyt [µg/kg]	Waschwasser Budenheim 1	Waschwasser Budenheim 2	Waschwasser Budenheim 3
Aluminium	78.090	52.960	32.420
Arsen	< 40	< 40	< 40
Barium	343	438	332
Beryllium	< 60	< 60	< 60
Blei	205	107	231
Bor	20.000	7.430	8.136
Cadmium	< 3	< 3	< 3
Calcium	4.512.700	5.419.700	2.067.900
Chrom	394	301	409
Cobalt	123	108	171
Eisen	149.200	156.800	108.600
Kalium	453.400	1.053.000	663.600
Kupfer	93	126	83
Magnesium	57.960	75.070	161.900
Mangan	11.400	9.959	17.200
Molybdän	55	65	79
Natrium	975.400	1.921.000	1.006.000
Nickel	893	853	1.240
Phosphor	5.356.000	7.760.000	4.313.000
Rubidium	54	187	73
Selen	< 30	< 30	< 30
Strontium	2.455	3.000	1.435
Tellur	< 30	< 30	< 30
Thallium	< 3	< 3	< 3
Vanadium	38,83	37,55	< 3
Zink	51.200	7.739	4.305
Zinn	< 40	< 40	< 40

Der mittels Ionenchromatographie gemessene Phosphatwert bei den drei Prozesswässern betrug 16,5 mg/L für Waschwasser 1, 23,7 mg/L für Waschwasser 2 und 14,5 mg/L für Waschwasser 3. Die gewonnenen Phosphorwerte mittels ICP-MS betrugen für Prozesswasser 1 5,4 g/L, für Prozesswasser 2 7,8 g/L und für Prozesswasser 3 4,3 g/L.

Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Analytik wurde für jede der drei verschiedenen Waschwasserproben 240 mL Reaktionsmedium und 10 mL der Spezialkultur FSAS angesetzt. Während der Versuchsdauer von 72 Stunden wurde alternierend Sauerstoff bzw. Stickstoff im 24-Stunden-Rhythmus zugeführt. Es erfolgte eine sechsmalige Acetatzugabe im Untersuchungszeitraum. Die jeweilige Zugabemenge der Acetatlösung wurde bezogen auf die anfängliche Phosphatkonzentration im Waschwasser und variierte entsprechend.

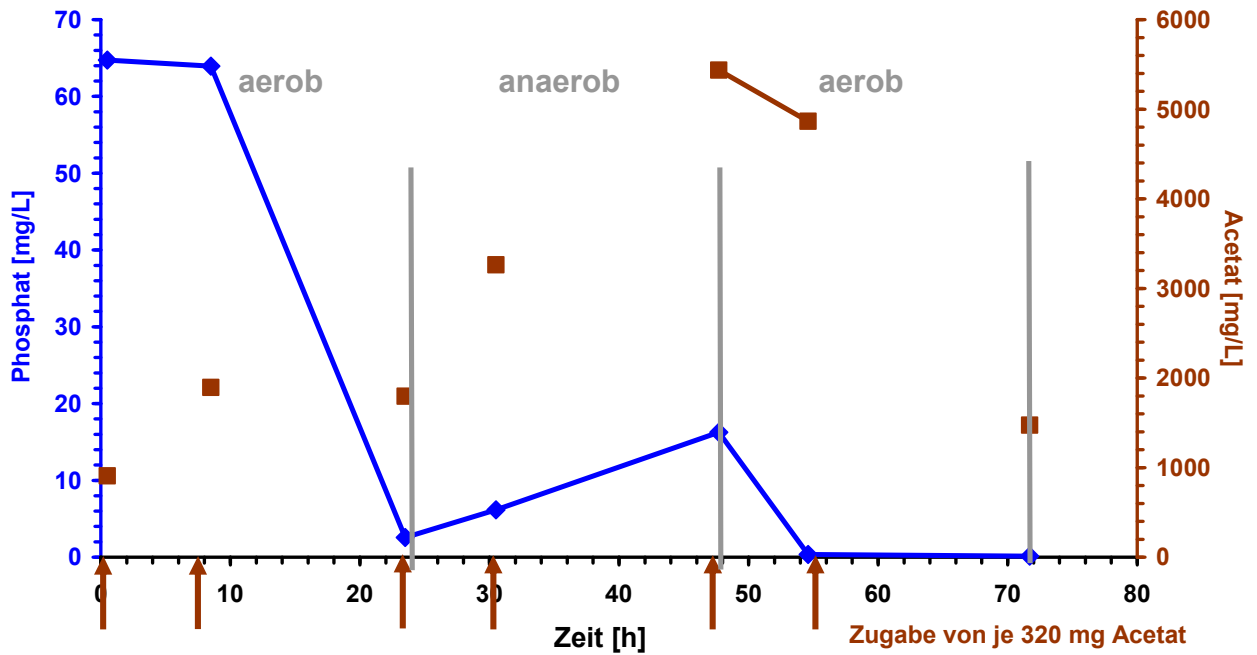


Abbildung 85: Phosphatfestlegung von Spezialkultur FSAS im Reaktionsmedium mit Budenheim-Waschwasser 1.

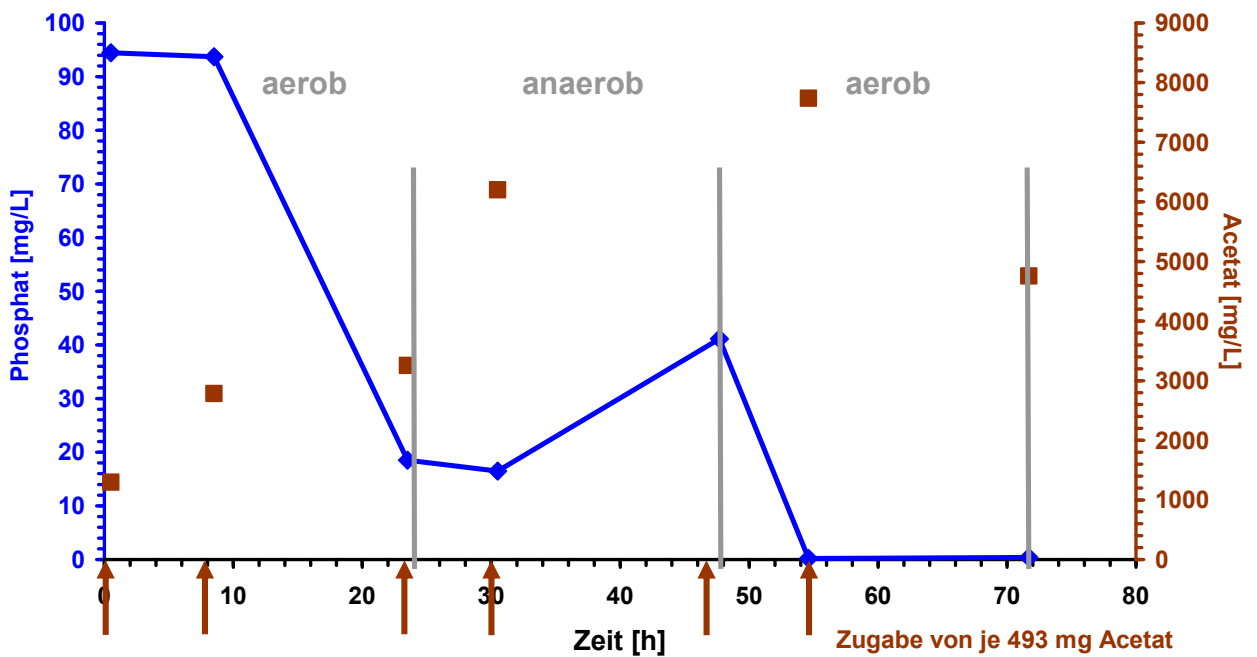


Abbildung 86: Phosphatfestlegung von Spezialkultur FSAS im Reaktionsmedium mit Budenheim-Waschwasser 2.

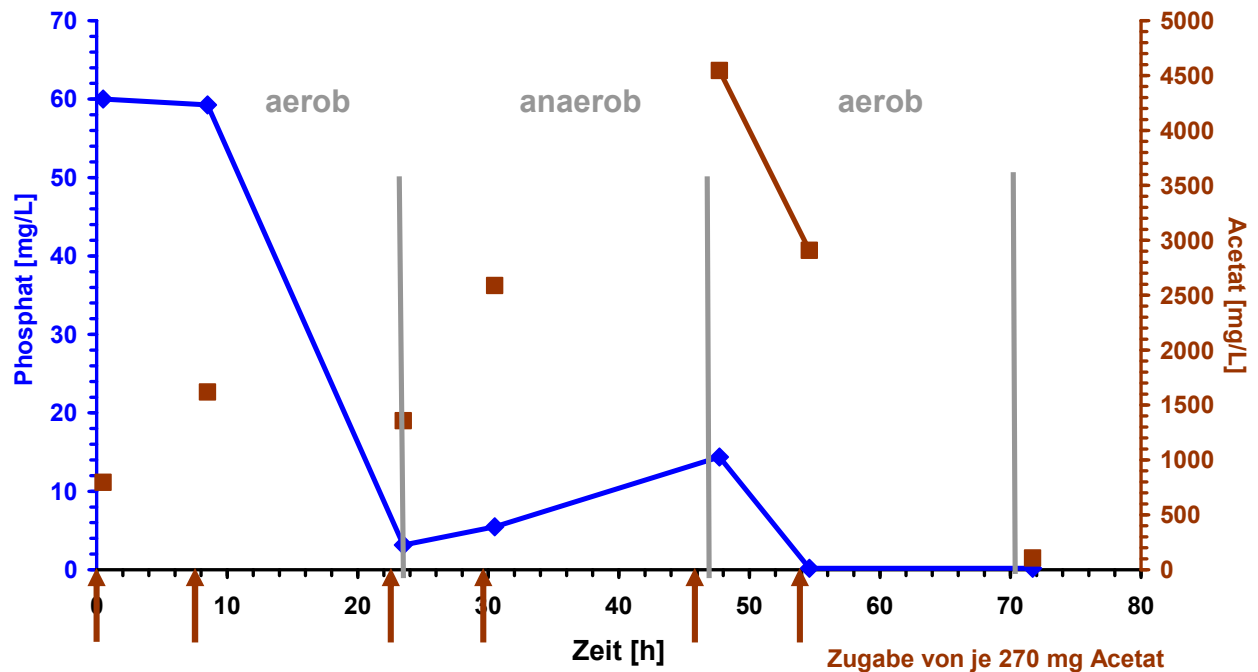


Abbildung 87: Phosphatfestlegung von Spezialkultur FSAS im Reaktionsmedium mit Budenheim-Waschwasser 3.

Der Phosphatwert von anfänglich 64,7 mg/L bei Waschwasser 1 fiel auf abschließend 0,2 mg/L Ortho-Phosphat. Während im aeroben Zeitraum Phosphat aufgenommen wurde, war in der anaeroben Phase eine Phosphatrücklösung zu verzeichnen (siehe Abbildung 85). Im Untersuchungszeitraum wurde sechsmal jeweils 320 mg Acetat zu Beginn, nach 8, 23, 30, 47 und 55 Stunden zugegeben. Nach 72 Stunden wurde ein Acetatwert von 1474,8 mg/L gemessen. Die Kultur FSAS mit sechsmaliger Acetatzugabe reduziert das frei verfügbare Ortho-Phosphat im Prozesswasser 1 um 99,7 % innerhalb von 72 Stunden.

Beim Waschwasser 2 (Abbildung 86) wurde von einem Phosphatgehalt von 94,5 mg/L ausgegangen. Am Ende des Untersuchungszeitraums lag der Wert bei 0,4 mg/L. In der aeroben Phase erfolgte eine Phosphataufnahme, im anaeroben Zeitraum wurde Phosphat rückgelöst. Zu Beginn, nach 8, 23, 30, 47 und 55 Stunden wurde jeweils 493 mg Acetat zugegeben. Am Ende des Untersuchungszeitraums wurde ein Acetatwert von 4755,1 mg/L gemessen. Die Kultur FSAS mit sechsmaliger Acetatzugabe reduziert das frei verfügbare Ortho-Phosphat im Prozesswasser 2 um 99,6 % innerhalb von 72 Stunden.

In Abbildung 87 kam es zu einer fast vollständigen Phosphatfestlegung von 99,7 %. Der Wert von anfänglich 60 mg/L fiel auf abschließend 0,2 mg/L Ortho-Phosphat. Zu Beginn, nach 8, 23, 30, 47 und 55 Stunden wurde jeweils 270 mg Acetat zugegeben. Am Ende des Untersuchungszeitraums wurde ein Acetatwert von 106,6 mg/L gemessen. Die Kultur FSAS mit sechsmaliger Acetatzugabe reduziert das frei verfügbare Ortho-Phosphat im Prozesswasser 3 um 99,7 % innerhalb von 72 Stunden.



Abbildung 88: Aussehen der Ansätze mit Budenheim-Waschwasser 1 bis 3 nach 72 Stunden (bei jeweils 2 Parallel-Ansätzen).

Die folgende Abbildung 89 zeigt die intrazellulär gebundenen Polyphosphate differenziert nach ihrer Kettenlänge sowie in ihrem prozentualen Anteilen zueinander nach Extraktion von Clark et al. (1986).

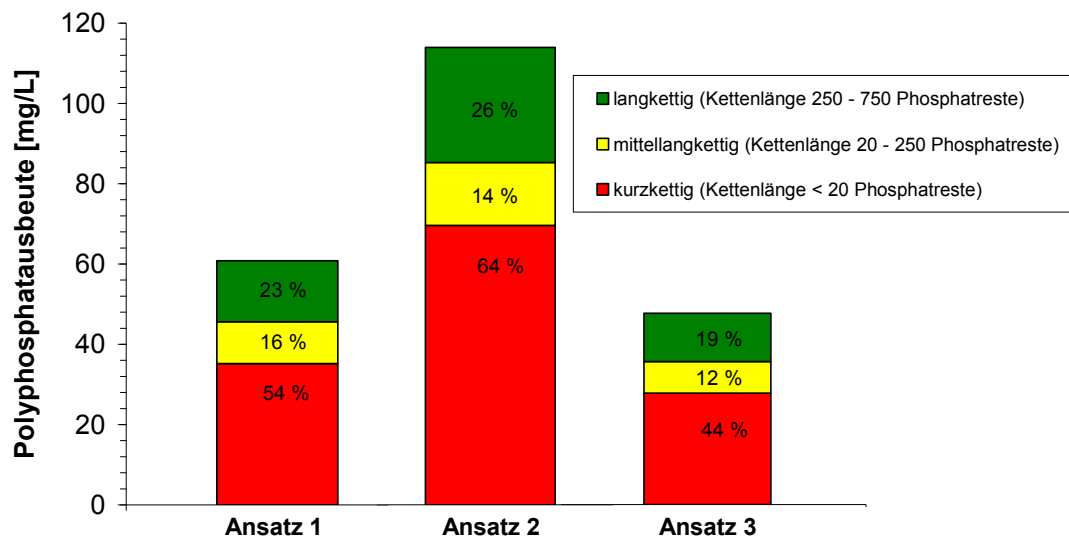


Abbildung 89: Zusammensetzung der Polyphosphate nach unterschiedlicher Kettenlänge bei der Spezialkultur FSAS mit Budenheim-Wasser.

Schlussfolgerung

In allen drei Ansätzen konnte das aus den Prozesswässern frei verfügbare Ortho-Phosphat um nahezu 100 % eliminiert werden. Es wurde intrazellulär als Polyphosphat festgelegt. Dabei ist zu beachten, dass nach Extraktion die kurzkettigen Polyphosphate den größten Anteil ausmachen (ca. 50 %). Der Anteil der langkettigen Polyphosphate liegt im Bereich von 20-30 %, während der Anteil der mittellangkettigen den Bereich von 10-20 % abdeckt.

3.2.3.2 Mikrobiologische Polyphosphatbildung aus Produktionswasser der Brauerei Erding

Untersucht wurde eine Produktionswasserprobe der Brauerei Erding. Ziel der mikrobiologischen Aufarbeitung war die Reduktion des gelösten Phosphats im Prozesswasser und dessen Festlegung als intrazelluläres Polyphosphat.

Die Zusammensetzung des Produktionswassers wird im Folgenden dargestellt. Die Probe enthielt eine geringe Phosphatmenge und niedrige Konzentrationen an Schwermetallen (Tabellen 22 bis 24).

Tabelle 22: Elementnachweis der unfiltrierten Proben mittels ICPMS, Darstellung sämtlicher Elemente in µg/kg.

Analyt [µg/kg]	Produktionswasser Brauerei Erding
Aluminium	93,0
Arsen	< 5
Barium	29,4
Beryllium	< 5
Blei	2,1
Bor	241
Cadmium	< 2
Calcium	70.700
Chrom	< 2
Cobalt	5,7
Eisen	273
Kalium	-
Kupfer	3,9
Magnesium	34.400
Mangan	60,1
Molybdän	57,5
Natrium	-
Nickel	5,4
Phosphor	15.900
Rubidium	5,4
Selen	< 8
Strontium	804
Tellur	< 2
Thallium	< 2
Vanadium	< 2
Zink	105
Zinn	5,3

Tabelle 23: Chemisch/physikalische Eigenschaften der unfiltrierten Proben sowie Gehalt an Ammonium.

Parameter	Produktionswasser Brauerei Erding
pH-Wert	8,25
Leitfähigkeit [mS/cm]	3,02
Ammonium [mg/L]	4,08

Tabelle 24: Ionenchromatographie, Nachweis von Anionen aus filtrierten Proben.

Anion [mg/L]	Produktionswasser Brauerei Erding
Fluorid	n. a.
Chlorid	310,7
Nitrit	n. a.
Bromid	n. a.
Nitrat	n. a.
Sulfat	n. a.
Phosphat	64,2

Der mittels Ionenchromatographie gemessene Phosphatwert betrug 64,2 mg/L. Der gewonnene Phosphorwert mittels ICP-MS betrug 15,9 mg/L.

Der Ansatz enthielt 240 mL Minimalmedium und 10 mL Klärschlamm. Während der Untersuchungsdauer wurde alternierend Sauerstoff bzw. Stickstoff im 24-Stunden-Rhythmus zugeführt. Beim Produktionswasser Erding stieg der Phosphatgehalt in der ersten aeroben Phase von 33,8 mg/L auf 35,1 mg/L. Am Ende des anaeroben Zeitraums lag der Ortho-Phosphatwert bei 9,3 mg/L. In der zweiten aeroben Phase stieg der Phosphatwert auf 17,4 mg/L. Während des Untersuchungszeitraums wurde zu Beginn, nach 24, 45 und 54 Stunden jeweils 147 mg Acetat zugegeben. Am Ende des Untersuchungszeitraums wurde ein Acetatwert von 3013,7 mg/L gemessen. Zusätzlich wurden der Ammonium-, Proteingehalt und der pH-Wert während des Untersuchungszeitraums von 72 Stunden betrachtet. Zu Beginn der Untersuchung lag der Ammoniumgehalt bei 304,8 mg/L und war bei Versuchsabbruch nicht mehr nachweisbar. Der pH-Wert lag während der gesamten Untersuchung im alkalischen Bereich. Der Proteingehalt stieg von anfänglich 35,7 mg/L auf 97,6 mg/L am Ende. Die Klärschlamm-biozönose mit viermaliger Acetatzugabe reduzierte das frei verfügbare Ortho-Phosphat um 48,5 % innerhalb von 72 Stunden. Abbildung 90 zeigt das Verhalten des beschriebenen Ansatzes.

Schlussfolgerung

In den getesteten Ansätzen der Brauerei Erding waren Polyphosphate nicht eindeutig nachzuweisen. Dies kann auf den nur geringen Phosphatgehalt (< 35 mg/L) und den hohen Ammoniumgehalt (250 mg/L) zurückzuführen sein. Da in dem Ansatz bei Versuchsende weder Nitrat noch Nitrit nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass unter den anaeroben Bedingungen das gebildete Nitrat zur Denitrifikation zur Verfügung stand, was die optimale Phosphateliminierung behinderte.

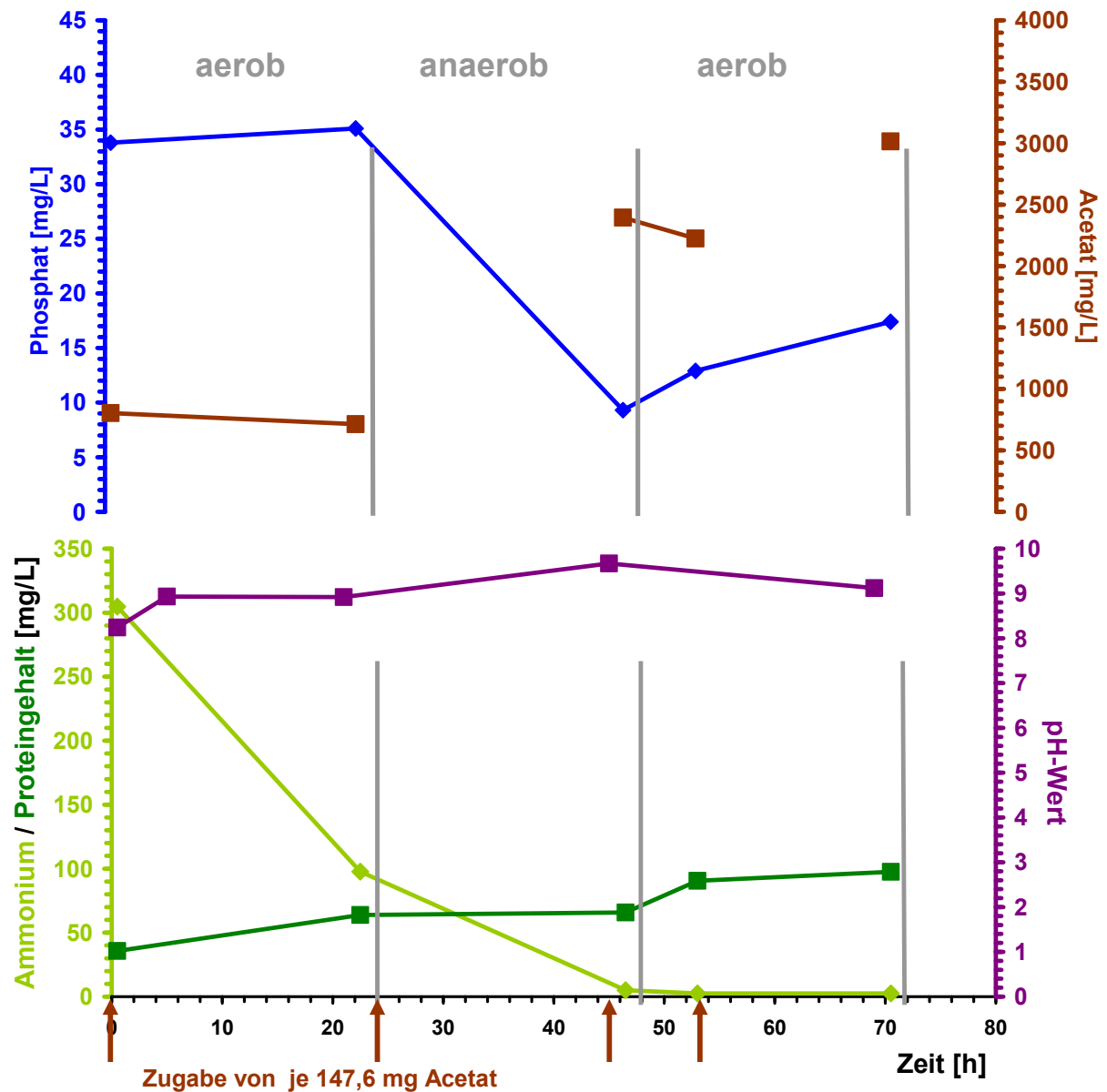


Abbildung 90: Phosphatfestlegung von Spezialkultur RSAS im Minimalmedium mit Produktionswasser der Brauerei Erding.



Abbildung 91: Aussehen des Ansatzes mit Prozesswasser der Brauerei Erding nach 70 Stunden.

3.3 Mikrobielle Speicherung von Polyhydroxybuttersäure

3.3.1 Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen und die Polyhydroxybuttersäurebildung

Es sollte festgestellt werden, ob die Bakterien *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* in der Lage sind, Polyhydroxybuttersäuren zu bilden und welcher zeitliche Rahmen dazu benötigt wird. Als Vorlage für die im Folgenden beschriebenen Vorversuche diente die Veröffentlichung von Mothes et al. (2007). Zunächst wurden die einzelnen Bestandteile des Mediums separat eingewogen und autoklaviert. Das Medium konnte aber nicht, wie in der Literatur beschrieben, eingesetzt werden, da es zu Ausfällungen einzelner Bestandteile kam. Ursächlich dafür schien die in der Veröffentlichung gewählte Eisenverbindung zu sein, so dass diese für die weiteren Untersuchungen durch Ammoniumeisen (III)-citrat ersetzt wurde. In einer 5000 mL-Duranflasche wurden 2000 mL Medium und 13 mL Bakteriensuspension 72 Stunden lang mit technischer Luft begast. Im Versuchszeitraum kam es zu einer starken Schaumbildung, die eine Schaumableitung über eine zusätzliche Duranflasche notwendig machte. Die Wachstumsparameter wie Glycerin-, Ammoniumverbrauch, Trockenmasse- und Polyhydroxybuttersäurebildung von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* sind in der folgenden Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Wachstum und Polyhydroxybuttersäurebildung bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*.

Untersuchte Parameter	Versuchsdauer [h]	<i>Paracoccus denitrificans</i>			<i>Cupriavidus necator</i>		
		Anfang	Ende	Δ	Anfang	Ende	Δ
		[mg/L] / (%)					
Glycerin	72	2.200	0	2.200	1.700	1.300	400
Ammonium	72	452	162	290	472	110	362
pH-Wert	72	7	6		7	7	
Trockenmasse	72		573			400	
PHB _{GC} -Nachweis	72		83 (15)			16 (4)	

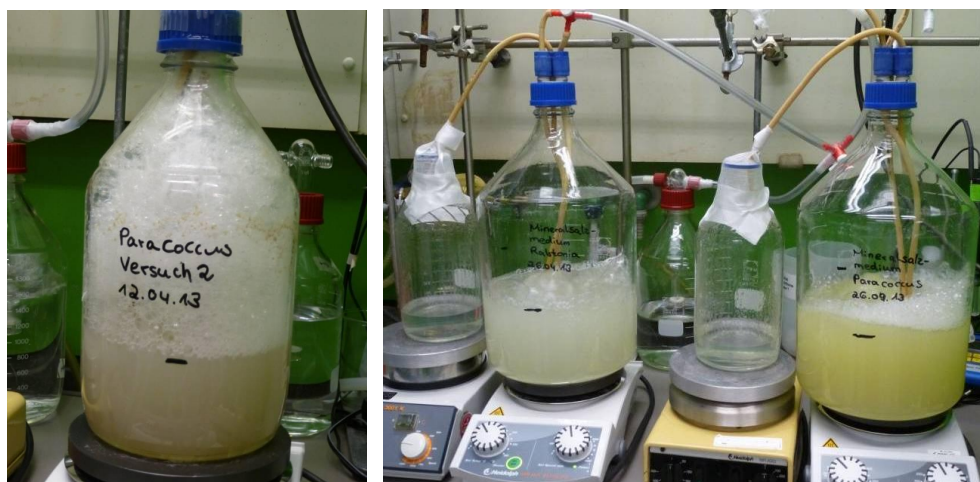


Abbildung 92: Ansatz ohne Schaumableitung (linkes Bild). Ansätze mit Schaumableitung (rechtes Bild) bei Versuchsabbruch: *Cupriavidus necator* (links) und *Paracoccus denitrificans* (rechts).

3.3.1.1 Wachstumsverhalten von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* im Medium nach Mothes bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen

Ausgegangen wird von Vorkulturen, die drei Tage im Medium nach Mothes mit Ammonium kultiviert wurden. Die Hauptkulturen wurden mit 50 mL Vorkultur angeimpft, die zuvor mit bidest. Wasser gewaschen wurde. Die Hauptkultur wurde zwei Tage im Medium nach Mothes ohne Ammonium kultiviert. Untersucht wurde die Inkubation im Schüttelschrank, der Sauerstoffeintrag durch Rühren und die Begasung mit technischer Luft im 250 mL Ansatz. Um die Schaumbildung zu unterbinden, wurde den Ansätzen ein Tropfen Silikonöl als Antischaummittel zugesetzt. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit Substratverbrauch, Biomasse und Polyhydroxybuttersäure-Bildung von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* sind in den Tabellen 26 bis 28 für die unterschiedlichen Kulturbedingungen zusammengefasst.

Tabelle 26: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Glyceringehalts im Medium bei Inkubation im Schüttelschrank durch *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).

<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur				Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur		
	0 h	24 h	48 h	72 / 0 h	24 h	48 h	Δ		
	[mg/L]						mmol	C/N/P	
Glycerin (C)	13.000 -	8.000 -	6.000 -	6.000 22.000	- 22.000	- 20.000	7.000 2.000	(228) (65,2)	(100) (100)
Ammonium (N)	260 -	167 -	130 -	130 4	- 4	- 0	130 4	(7,2) (0,2)	(3,2) (0,3)
Phosphor (P)	246 -	229 -	182 -	202 252	- 251	- 215	44 37	(1,4) (1,2)	(0,6) (1,8)
pH-Wert	6 -	5 -	5 -	4,5 6	- 6	- 6	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	-	490 -	-	- 50	-	(19,2) (2,0)	-
Proteingehalt (C)	153 -	-	-	555 362	-	- 438	402 76	(15,8) (3,0)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	-	90 (18% TG)	-	0 (0 % TG)	-	(3,5) (0)	-
Optische Dichte (600nm)	0,3 -	2,1 -	3,7 -	1,7 0,2	- 0,2	- 0,3	1,4 0,1	-	-
<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur				Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur		
	0 h	24 h	48 h	72 / 0 h	24 h	48 h	Δ		
	[mg/L]						mmol	C/N/P	
Glycerin (C)	11.000 -	9.000 -	7.000 -	6.000 22.000	- 22.000	- 20.000	5.000 2.000	(163) (65,2)	(100) (100)
Ammonium (N)	266 -	244 -	202 -	140 5	- 0	- 0	126 5	(7) (0,3)	(4,3) (0,5)
Phosphor (P)	273 -	260 -	228 -	180 256	- 247	- 220	93 33	(3) (1,2)	(1,8) (1,8)
pH-Wert	6 -	6 -	6 -	5 6	- 6	- 6	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	-	650 -	-	- 850	-	(25,5) (33,3)	-
Proteingehalt (C)	122 -	-	-	383 183	-	- 716	261 533	(10,2) (20,9)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	-	210 (32% TG)	-	252 (30 % TG)	-	(8,1) (9,7)	-
Optische Dichte (600nm)	0,4 -	0,9 -	2,0 -	1,8 0,3	- 2,0	- 1,6	1,4 1,3	-	-

Bei der Inkubation im Schüttelschrank nahm bei der Vorkultur von *Paracoccus denitrificans* die optische Dichte nach 48 Stunden ab. Ein weiterer Verbrauch von Glycerin, Ammonium und Phosphor fand nicht mehr statt. In den beiden Hauptkultur-Ansätzen unter Stickstoff-Limitierung blieb die optische Dichte konstant. Polyhydroxybuttersäure wurde unter diesen Bedingungen nur von *Cupriavidus necator* mit 30 %/TG gebildet.

Tabelle 27: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Glyceringehalts im Medium bei Sauerstoffeintrag durch Rühren durch *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).

<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur				Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur		
	0 h	24 h	48 h	72 / 0 h	24 h	48 h	Δ		
	[mg/L]						mmol	C/N/P	
Glycerin (C)	14.000 -	10.000 -	10.000 -	9.000 25.000	- 25.000	- 24.000	5.000 1.000	(162,9) (32,6)	(100) (100)
Ammonium (N)	234 -	230 -	214 -	188 5	- 0	- 0	46 5	(2,6) (0,3)	(1,6) (0,9)
Phosphor (P)	254 -	237 -	235 -	186 258	- 253	- 249	68 39	(2,2) (0,3)	(1,3) (0,9)
pH-Wert	6 -	6 -	6 -	5 6	- 6	- 6	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	-	800 -	-	- 531	-	(31,3) (20,8)	-
Proteingehalt (C)	253 -	-	-	535 283	-	- 497	282 214	(11,1) (8,4)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	-	306 (38%TG)	-	318 (60 % TG)	-	(11,8) (12,2)	-
Optische Dichte (600nm)	0,3 -	1,1 -	2,9 -	2,5 0,4	- 0,7	- 1,6	2,2 1,2	-	-
<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur				Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur		
	0 h	24 h	48 h	72 / 0 h	24 h	48 h	Δ		
	[mg/L]						mmol	C/N/P	
Glycerin (C)	15.000 -	12.000 -	11.000 -	11.000 23.000	- 23.000	- 22.000	4.000 1.000	(130,3) (32,6)	(100) (100)
Ammonium (N)	242 -	230 -	228 -	216 5	- 0	- 0	26 5	(1,4) (0,3)	(1,1) (0,9)
Phosphor (P)	250 -	248 -	238 -	229 262	- 261	- 237	21 25	(0,7) (0,8)	(0,5) (2,5)
pH-Wert	6 -	6 -	6 -	6 6	- 6	- 6	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	-	470 -	-	- 415	-	(18,4) (16,3)	-
Proteingehalt (C)	130 -	-	-	392 132	-	- 366	262 234	(10,3) (9,2)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	-	262 (56%TG)	-	158 (38 % TG)	-	(10,1) (6,1)	-
Optische Dichte (600nm)	0,3 --	0,9 -	1,8 -	1,3 0,2	- 0,5	- 1,0	1,0 0,8	-	-

Die Vorkulturen in den Rühransätzen zeigten ein analoges Verhalten bezüglich der optischen Dichte und des Substratverbrauchs. In der Hauptkultur nahm nach 48 Stunden die optische Dichte bei *Paracoccus denitrificans* von 0,4 auf 1,6 und bei *Cupriavidus necator* von 0,2 auf 1,0 zu. Beide Arten produzieren unter diesen Bedingungen Polyhydroxybuttersäure: *Paracoccus denitrificans* 60 %/TG und *Cupriavidus necator* 38 %/TG.

Tabelle 28: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Glyceringehalts im Medium bei Belüftung mit technischer Luft durch *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).

<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur				Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur		
	0 h	24 h	48 h	72 / 0 h	24 h	48 h	Δ		
	[mg/L]							mmol	C/N/P
Glycerin (C)	10.000 -	9.000 -	9.000 -	9.000 24.000	- 24.000	- 20.000	1.000 4.000	(32,6) (130,3)	(100) (100)
Ammonium (N)	266 -	178 -	170 -	176 5	- 0	- 0	90 5	(5,0) (0,3)	(15,3) (0,2)
Phosphor (P)	247 -	245 -	245 -	244 266	- 259	- 227	3 39	(0,1) (1,3)	(0,3) (1,0)
pH-Wert	6 -	5 -	5 -	4,5 6	- 6	- 6	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	-	770 -	-	- 200	-	(30,2) (7,8)	-
Proteingehalt (C)	154 -	-	-	867 562	-	- 686	713 124	(27,9) (4,9)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	-	110 (14%TG)	-	20 (10 % TG)	-	(4,2) (0,8)	-
Optische Dichte (600nm)	0,3 -	2,1 -	2,7 -	2,4 0,3	- 0,4	- 0,5	2,1 0,2	-	-

<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur				Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur		
	0 h	24 h	48 h	72 / 0 h	24 h	48 h	Δ		
	[mg/L]							mmol	C/N/P
Glycerin (C)	12.000 -	11.000 -	9.000 -	8.000 24.000	- 22.000	- 20.000	4.000 4.000	(130,3) (130,3)	(100) (100)
Ammonium (N)	246 -	226 -	171 -	148 5	- 0	- 0	98 5	(5,4) (0,3)	(4,2) (0,2)
Phosphor (P)	243 -	226 -	197 -	213 347	- 338	- 295	30 52	(1,0) (1,7)	(0,7) (1,3)
pH-Wert	6 -	6 -	5,5 -	5 6	- 6	- 6	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	-	940 -	-	- 320	-	(36,8) (12,5)	-
Proteingehalt (C)	176 -	-	-	697 302	-	- 466	521 164	(20,4) (6,4)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	-	438 (46%TG)	-	172 (54 % TG)	-	(16,8) (6,6)	-
Optische Dichte (600nm)	0,5 -	1,7 -	3,9 -	3,0 0,5	- 0,8	- 1,0	2,5 0,5	-	-

Die Vorkulturen von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* zeigten unter diesen Kultivierungsbedingungen (erhöhter Sauerstoff-Eintrag) ab 48 Stunden keinen nennenswerten Verbrauch von Glycerin, Ammonium und Phosphor, die optische Dichte nahm ab. In der Hauptkultur von *Cupriavidus necator* stieg die optische Dichte nach 48 Stunden von 0,5 auf 1,0 an, der Polyhydroxybuttersäuregehalt erhöhte sich auf 54 %/TG. *Paracoccus denitrificans* wuchs nicht und der Polyhydroxybuttersäuregehalt erreichte nur 10 %/TG.

In der Abbildung 93 ist der Zustand der Ansätze nach drei Tagen Vorkultur dargestellt.



Abbildung 93: Vorkulturen bei Versuchsabbruch, *Paracoccus denitrificans* (links), *Cupriavidus necator* (rechts), Ansatz im Schüttelschrank (links), Ansatz Sauerstoffeintrag durch Rühren (Mitte) und Ansatz Begasung mit technischer Luft (rechts).

In den Tabellen 29 bis 31 sind die Stoffbilanzen des Substratverbrauchs, die Biomasse und die Polyhydroxybuttersäure-Erträge zusammengefasst.

Die molaren C/N/P-Verhältnisse in den Vorkulturen liegen bei 100/1/0,5 und in den stickstofflimitierten Hauptkulturen bei 100/0,4/1,4 (siehe Tabelle 29).

Tabelle 29: Bilanzierung des Substratverbrauchs von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*. C: Kohlenstoff, N: Stickstoff, P: Phosphor.

Kulturbedingung	Organismus	Substratverbrauch	C	N	P
			[mmol]		
Schüttelschrank	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur	228,0	7,2	1,4
		Hauptkultur	65,2	0,2	1,2
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur	163,0	7,0	3,0
		Hauptkultur	65,2	0,3	1,2
Rühransatz	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur	162,9	2,6	2,2
		Hauptkultur	32,6	0,3	0,3
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur	130,3	1,4	0,7
		Hauptkultur	32,6	0,3	0,8
Technische Luft	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur	32,6	5,0	0,1
		Hauptkultur	130,3	0,3	1,3
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur	130,3	5,4	1,0
		Hauptkultur	130,3	0,3	1,7

Aus Tabelle 30 wird ersichtlich, dass die auf mol-Kohlenstoff bezogenen Biomasseparameter Protein und Polyhydroxybuttersäure ($C_4H_8O_3$) in der Summe das Trockengewicht ($C_4H_8O_2N$) ergeben. Bei Trockenmasse und Protein wurde die Formel $C_4H_8O_2N$ mit der molaren Masse von 102,1 g/mol zugrunde gelegt (Abschlussbericht, Scherzer, 2008).

Tabelle 30: Bilanzierung der Biomasse und von PHBS von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*. C_{Protein} : Kohlenstoff im Protein, C_{TG} : Kohlenstoff in Trockengewicht, C_{PHBS} : Kohlenstoff in Polyhydroxybuttersäure.

Kulturbedingung	Organismus	Ertrag	C_{Protein}	C_{TG}	C_{PHBS}
			[mmol]		
Schüttelschrank	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur	15,8	19,2	3,5
		Hauptkultur	3,0	2,0	<0,1
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur	10,2	25,5	8,1
		Hauptkultur	20,9	33,3	9,7
Rühransatz	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur	11,1	31,3	11,8
		Hauptkultur	8,4	20,8	12,2
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur	10,3	18,4	10,1
		Hauptkultur	9,2	16,3	6,1
Technische Luft	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur	27,9	30,2	4,2
		Hauptkultur	4,9	7,8	0,8
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur	20,4	36,8	16,8
		Hauptkultur	6,4	12,5	6,6

Die höchste Ausbeute an Polyhydroxybuttersäure wurde im Rühransatz bei *Paracoccus denitrificans* mit 60 % und einem molaren Ertragskoeffizient von 0,37 erreicht. Bei Kultivierung mit technischer Luft wurde die höchste Ausbeute bei *Cupriavidus necator* mit 54 % und einem niedrigen molaren Ertragskoeffizient von 0,05 erreicht (siehe Tabelle 31).

Tabelle 31: Bilanzierung Substratverbrauch, Biomasse und PHBS von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*. C_{Substrat} : Kohlenstoff im Substrat, C_{PHBS} : Kohlenstoff in Polyhydroxybuttersäure.

Kulturbedingung	Organismus	Substrat/ Ertrag	C _{Substrat}	C _{PHBS}	% PHBS/TG
			[mmol]		
Schüttelschrank	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur	228,0	3,5	18
		Hauptkultur	65,2	<0,1	<1
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur	163,0	8,1	32
		Hauptkultur	65,2	9,7	30
Rühransatz	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur	162,9	11,8	38
		Hauptkultur	32,6	12,2	60
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur	130,3	10,1	56
		Hauptkultur	32,6	6,1	38
Technische Luft	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur	32,6	4,2	14
		Hauptkultur	130,3	0,8	10
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur	130,3	16,8	46
		Hauptkultur	130,3	6,6	54

Schlussfolgerung

Durch die verschiedenen Kulturbedingungen wurde die Polyhydroxybuttersäure-Speicherung in den beiden Bakterienarten unterschiedlich beeinflusst. Unter Stickstofflimitierung wurde die höchste Polyhydroxybuttersäure-Speicherung bei *Paracoccus denitrificans* mit 60 %/TG im Rühransatz und bei *Cupriavidus necator* mit 54 %/TG unter Belüftung mit technischer Luft erreicht.

3.3.1.2 Wachstumsverhalten von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* im Medium nach Mothes bei Einsatz von Glucose und Acetat als Substrat

Es sollte festgestellt werden, wie sich der Einsatz von Glucose und Acetat auf das Wachstum der Bakterien und die Polyhydroxybuttersäurebildung auswirkt.

Ausgegangen wurde von Vorkulturen, die drei Tage im Medium nach Mothes mit Ammonium kultiviert wurden. Die Hauptkulturen wurden diesmal mit 250 mL Vorkultur angeimpft (Vorkultur wurde zuvor mit bidest. Wasser gewaschen) und einen Tag im Medium nach Mothes ohne Ammonium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei Sauerstoffeintrag durch Rühren im 250 mL Ansatz.

In der Abbildung 94 ist der Zustand der Ansätze nach einem Tag Vorkultur dargestellt.



Abbildung 94: Ansätze bei Versuchsabbruch, Vorkulturen (oben), Hauptkulturen (unten), *Paracoccus denitrificans* (links) und *Cupriavidus necator* (rechts) im Medium mit Acetat und Glucose.

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit Substratverbrauch, Biomassebildung und Polyhydroxybuttersäurebildung von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* sind in den Tabellen 32 und 33 für die unterschiedlichen Substrate Glucose und Acetat zusammengefasst.

Tabelle 32: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Glucosegehalts im Medium bei Sauerstoffeintrag durch Rühren durch *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).

Paracoccus denitrificans	Vorkultur		Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur	
	0 h	72 / 0 h	24 h	Δ		
	[mg/L]				mmol	C/N/P
Glucose (C)	10.000 -	9.000 20.000	- 18.000	1.000 2.000	(33,3) (66,6)	(100) (100)
Ammonium (N)	248 -	194 6	- 0	54 6	(3) (0,3)	(9,0) (0,5)
Phosphor (P)	273 -	256 288	- 271	17 17	(0,5) (0,5)	(0,8) (0,8)
pH-Wert	6 -	5 6	- 6	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	- 980	-	- (38,4)	-
Proteingehalt (C)	417 -	1.019 989	- 1.123	602 134	(23,6) (5,2)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	300 (31%TG)	-	- (11,5)	-
Optische Dichte (600nm)	0,5	2,3 2,3	- 2,4	1,8 0,1	-	-

Cupriavidus necator	Vorkultur		Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur	
	0 h	72 / 0 h	24 h	Δ		
	[mg/L]				mmol	C/N/P
Glucose (C)	10.000 -	8.000 21.000	- 18.000	2.000 3.000	(66,6) (99,9)	(100) (100)
Ammonium (N)	252 -	202 6	- 0	50 6	(2,8) (0,3)	(4,2) (0,3)
Phosphor (P)	269 -	208 284	- 275	61 9	(2,0) (0,3)	(3,0) (0,3)
pH-Wert	6 -	6 6	- 5	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	- 340	-	- (13,3)	-
Proteingehalt (C)	482 -	996 814	- 869	514 55	(20,1) (2,2)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	40 (12%TG)	-	- (1,5)	-
Optische Dichte (600nm)	0,4	2,0 2,0	- 2,1	1,6 0,1	-	-

Im Medium mit Glucose unter Stickstoff-Limitierung war bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* ein ähnliches Wachstums-Verhalten zu beobachten. In den Vorkulturen nahm die optische Dichte nach 48 Stunden ab, in den Hauptkulturen blieb diese konstant. In den Hauptkulturen führte der Substratumsatz nur zu einer geringen Polyhydroxybuttersäure-Speicherung, bei *Paracoccus denitrificans* 31 %/TG und bei *Cupriavidus necator* 12 %/TG.

Tabelle 33: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Acetatgehalts im Medium bei Sauerstoffeintrag durch Rühren durch *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).

Paracoccus denitrificans	Vorkultur		Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur	
	0 h	72 / 0 h	24 h	Δ		
	[mg/L]				mmol	C/N/P
Acetat (C)	11.800 -	8.100 3.500	- 0.600	3.700 2.900	(125,4) (98,3)	(100) (100)
Ammonium (N)	252 -	134 8	- 0	118 8	(6,6) (0,4)	(5,2) (0,5)
Phosphor (P)	279 -	255 308	- 299	24 9	(0,8) (0,3)	(0,6) (0,3)
pH-Wert	6 -	8 6	- 6	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	- 790	-	- (31)	-
Proteingehalt (C)	195 -	749 658	- 736	554 78	(21,7) (3,1)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	120 (15%TG)	-	- (4,6)	-
Optische Dichte (600nm)	0,5	1,8 1,8	- 1,9	1,3 0,1	-	-

Cupriavidus necator	Vorkultur		Hauptkultur		Vorkultur / Hauptkultur	
	0 h	72 / 0 h	24 h	Δ		
	[mg/L]				mmol	C/N/P
Acetat (C)	12.000 -	7.300 5.000	- 3.200	4.700 1.800	(159,3) (61,0)	(100) (100)
Ammonium (N)	250 -	132 6	- 0	118 6	(6,6) (0,3)	(4,1) (0,6)
Phosphor (P)	267 -	230 305	- 298	37 7	(1,2) (0,2)	(0,8) (0,4)
pH-Wert	6 -	8 6	- 5	-	-	-
Trockengewicht (C)	-	-	- 770	-	- (30,2)	-
Proteingehalt (C)	184 -	561 433	- 554	377 121	(14,8) (4,7)	-
3-OH-Buttersäure (enzymatisch) (C)	-	-	376 (49%TG)	-	- (14,5)	-
Optische Dichte (600nm)	0,4	2,5 2,5	- 3,1	2,1 0,6	-	-

Das Wachstumsverhalten mit Natriumacetat als Kohlenstoffquelle verhielt sich analog. Der pH-Wert der Vorkulturen stieg bedingt durch den Acetat-Verbrauch von anfangs 6 auf 8 bei Versuchsende.

In der Hauptkultur von *Cupriavidus necator* stieg die optische Dichte nach 24 Stunden von 2,5 auf 3,1. Bei dem geringen Biomasse-Ertrag wurde 49 % PHBS/TG gespeichert. Bei *Paracoccus denitrificans* blieb die optische Dichte konstant. Bei analoger Biomasse wurde nur 15 % PHBS/TS gespeichert.

In den Tabellen 34 bis 36 sind die Ergebnisse der Bilanzierungen für die unterschiedlichen Kohlenstoff-Quellen Glycerin, Glucose und Acetat im Rühransatz zusammengefasst.

Tabelle 34: Bilanzierung des Substratverbrauchs von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* im Rühransatz mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. C: Kohlenstoff, N: Stickstoff, P: Phosphor.

Kulturbedingung	Organismus	Substratverbrauch	C	N	P
			[mmol]		
Glycerin	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur _(72h)	162,9	2,6	2,2
		Hauptkultur _(48h)	32,6	0,3	0,3
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur _(72h)	130,3	1,4	0,7
		Hauptkultur _(48h)	32,6	0,3	0,8
Glucose	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur _(72h)	33,3	3,0	0,5
		Hauptkultur _(24h)	66,6	0,3	0,5
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur _(72h)	66,6	2,8	2,0
		Hauptkultur _(24h)	99,9	0,3	0,3
Acetat	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur _(72h)	125,4	6,6	0,8
		Hauptkultur _(24h)	98,3	0,4	0,3
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur _(72h)	159,3	6,6	1,3
		Hauptkultur _(24h)	61,0	0,3	0,2

Tabelle 35: Bilanzierung der Biomasse und von PHBS von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* im Rühransatz mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. C_{Protein}: Kohlenstoff im Protein, C_{TG}: Kohlenstoff in Trockengewicht, C_{PHBS}: Kohlenstoff in Polyhydroxybuttersäure.

Kulturbedingung	Organismus	Ertrag	C _{Protein}	C _{TS}	C _{PHBS}
			[mmol]		
Glycerin	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur _(72h)	11,1	31,3	11,8
		Hauptkultur _(48h)	8,4	20,8	12,2
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur _(72h)	10,3	18,4	10,1
		Hauptkultur _(48h)	9,2	16,3	6,1
Glucose	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur _(72h)	23,6	-	-
		Hauptkultur _(24h)	5,2	38,4	11,5
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur _(72h)	20,1	-	-
		Hauptkultur _(24h)	2,2	13,3	1,5
Acetat	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur _(72h)	21,7	-	-
		Hauptkultur _(24h)	3,1	31,0	4,6
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur _(72h)	14,8	-	-
		Hauptkultur _(24h)	4,7	30,2	14,5

Tabelle 36: Bilanzierung Substratverbrauch, Biomasse und PHBS von *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* im Rühransatz mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen.
C_{Substrat}: Kohlenstoff im Substrat, C_{PHBS}: Kohlenstoff in Polyhydroxybuttersäure.

Kulturbedingung	Organismus	Substrat/ Ertrag	C _{Substrat}	C _{PHBS}	% PHBS/TS
			[mmol]		
Glycerin	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur _(72h)	162,9	11,8	38
		Hauptkultur _(48h)	32,6	12,2	60
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur _(72h)	130,3	10,1	56
		Hauptkultur _(48h)	32,6	6,1	38
Glucose	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur _(72h)	33,3	-	-
		Hauptkultur _(24h)	66,6	11,5	31,0
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur _(72h)	66,6	-	-
		Hauptkultur _(24h)	99,9	1,5	12,0
Acetat	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Vorkultur _(72h)	125,4	-	-
		Hauptkultur _(24h)	98,3	4,6	15
	<i>Cupriavidus necator</i>	Vorkultur _(72h)	159,3	-	-
		Hauptkultur _(24h)	61,0	14,5	49

Mit Glucose zeigte *Paracoccus denitrificans* ein besseres Wachstum und produzierte 31 % PHBS/TG, *Cupriavidus necator* wuchs deutlich schlechter und bildete nur 12 % PHBS/TG.

Mit Acetat zeigte *Paracoccus denitrificans* ein schlechteres Wachstum und produziert nur 15 % PHBS/TG; *Cupriavidus necator* wuchs deutlich besser und bildete 49 % PHBS/TG.

Schlussfolgerung

Bei Vergleich der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen im Rühransatz wurde bei *Paracoccus denitrificans* die höchste Ausbeute an Polyhydroxybuttersäure mit 60 % bei Einsatz von Glycerin und einem molaren Ertragskoeffizienten von 0,37 erreicht.

Bei *Cupriavidus necator* zeigte sich die größte Ausbeute bei Einsatz von Acetat mit 49 %. Der molare Ertragskoeffizient betrug 0,24.

3.3.2 Polyhydroxybuttersäurebildung durch *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* im Medium nach Steinbüchel et al. (2013) und Mothes et al. (2007) bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen

Untersucht wurde der Einfluss der Medien nach Steinbüchel et al. (2013) und Mothes et al. (2007) auf das Bakteriumwachstum sowie die PHB-Anreicherung bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*.

Die beiden Medien unterscheiden sich im Wesentlichen durch einen unterschiedlichen Phosphorgehalt, der im Medium nach Steinbüchel um das Sechsfache höher liegt.

Zudem wurde der Einfluss der Kulturbedingungen, wie Sauerstoffeintrag durch Rühren, Kultivierung im Schüttelschrank, Belüftung durch Druckluft und Sauerstoff auf die Biomasse der Bakterien und die Polyhydroxybuttersäure-Bildung untersucht. Um die Schaumbildung zu unterbinden, wurde den Ansätzen ein Tropfen Silikonöl als Antischaummittel zugesetzt.

Im Folgenden werden für die verschiedenen Kultivierungsbedingungen bei den beiden Bakterienstämmen die untersuchten Parameter tabellarisch dargestellt.

Tabelle 37: Wachstum und PHB-Bildung in den Rühransätzen mit den Medien **Steinbüchel und **Mothes**.**

Untersuchte Parameter	Versuchsdauer [h]	<i>Paracoccus denitrificans</i>			<i>Cupriavidus necator</i>		
		Anfang	Ende	Δ	Anfang	Ende	Δ
		[mg/L] / (%)					
Glycerin	71,8	3.160	1.640	1.520	2.760	1.600	1.160
	70,8	3.080	480	2.600	2.720	1.240	1.480
	71	5.810	4.540	1.270	4.830	3.520	1.310
	95	5.890	2.620	3.270	5.890	3.840	2.050
Ammonium	71,8	354	170	184	372	258	114
	70,8	291	101	190	247	192	54
	71	90	47	43	88	56	32
	95	262	131	131	256	186	70
Phosphor	71,8	1.842	1.796	46	1.543	1.467	76
	70,8	296	281	14	298	222	76
	71	260	252	8	246	245	1
	95	239	233	6	254	240	14
Phosphor in Trockenmasse	71,8		19,9 (2,5)			22,3 (2,1)	
	70,8		13,5 (1,3)			13,7 (1,7)	
	71		13,5 (1,5)			8,6 (1,1)	
	95		15,6 (1,3)			12,0 (1,4)	
Trockenmasse	71,8		790			1.070	
	70,8		1.022			819	
	71		886			802	
	95		1.179			868	
Feuchtmasse	71,8		6.209			5.071	
	70,8		7.138			5.793	
	71		9.959			5.357	
	95		11.408			7.671	
Protein	71,8	206	231	25	194	690	425
	70,8	233	437	203	197	624	427
	71	254	534	280	243	556	313
	95	352	821	469	302	569	267
PHB _{GC} -Nachweis	71,8		194 (24,6)			293 (27,4)	
	70,8		508 (49,7)			270 (33,0)	
	71		202 (22,8)			410 (51,1)	
	95		407 (34,5)			431 (49,7)	
OD _{600nm}	71,8	0,3	1,6	1,3	0,3	2,5	2,2
	70,8	0,3	3,1	2,8	0,4	1,3	0,9
	71	0,6	2,6	2,0	0,4	2,3	1,9
	95	0,6	3,2	2,6	0,3	1,5	1,2
pH-Wert	71,8	7,5	7,0		7,0	7,0	
	70,8	6,5	5,5		6,5	6,0	
	71	6,0	5,5		6,0	5,5	
	95	6,0	5,5		6,0	5,5	

Tabelle 38: Wachstum und PHB-Bildung nach Inkubation im Schüttelschrank mit den Medien Steinbüchel und Mothes.

Untersuchte Parameter	Versuchsdauer [h]	<i>Paracoccus denitrificans</i>			<i>Cupriavidus necator</i>		
		Anfang	Ende	Δ	Anfang	Ende	Δ
		[mg/L] / (%)					
Glycerin	23,5 _(VK)	2.600	720	1.880	3.140	2.860	280
	70	2.090	0	2.090	2.070	0	2.070
	69,8	3.280	0	3.280	3.400	1.280	2.120
	69,8	2.520	840	1.680	2.400	1.040	1.360
	119	7.600	20	7.580	6.050	110	5.940
Ammonium	23,5 _(VK)	280	178	102	266	262	4
	70	276	176	100	372	228	144
	69,8	334	193	141	354	188	166
	69,8	270	169	101	254	186	68
	119	320	134	186	392	61	331
Phosphor	23,5 _(VK)	1.489	1.474	15	1.480	1.471	9
	70	1.273	1.268	5	1.684	1.478	206
	69,8	1.444	1.408	36	1.412	1.392	20
	69,8	292	207	85	303	224	79
	119	1.746	1.375	372	1.685	1.283	402
Phosphor in Trockenmasse	23,5 _(VK)		27,2 (2,7)			10,3 (2,2)	
	70		25,4 (3,1)			21,5 (2,1)	
	69,8		29,9 (2,9)			28,5 (2,3)	
	69,8		16,5 (1,9)			16,0 (1,7)	
	119		38,3 (2,9)			33,5 (2,4)	
Trockenmasse	23,5 _(VK)		1.024			478	
	70		820			1.044	
	69,8		1.027			1.221	
	69,8		862			917	
	119		1.344			1.378	
Feuchtmasse	23,5 _(VK)		11.946			5.918	
	70		10.494			9.757	
	69,8		12.905			6.293	
	69,8		9.364			6.135	
	119		15.478			11.652	
Protein	23,5 _(VK)	260	494	234	325	433	108
	70	239	325	86	284	786	502
	69,8	186	328	142	212	889	677
	69,8	227	693	466	192	515	323
	119	399	564	165	217	1.198	981
PHB _{GC-Nachweis}	23,5 _(VK)		78 (7,6)			73 (15,3)	
	70		0 (0)			148 (14,2)	
	69,8		16 (1,6)			131 (10,7)	
	69,8		190 (22)			291 (31,7)	
	119		3 (0,2)			63 (4,6)	
OD _{600nm}	23,5 _(VK)	0,6	2,1	1,5	0,6	1,0	0,4
	70	0,5	1,6	1,1	0,4	2,8	2,4
	69,8	0,4	2,3	1,9	0,3	3,1	2,8
	69,8	0,4	2,6	2,2	0,2	1,2	1,0
	119	0,7	3,0	2,3	0,2	3,0	2,8
pH-Wert	23,5 _(VK)	7,0	6,5		7,0	6,5	
	70	7,0	6,0		7,0	6,0	
	69,8	7,0	7,0		7,0	7,0	
	69,8	6,5	5,0		6,5	6,0	
	119	7,5	6,0		7,5	6,0	

Tabelle 39: Wachstum und PHB-Bildung bei Begasung mit technischer Luft mit den Medien Steinbüchel und Mothes.

Untersuchte Parameter	Versuchsdauer [h]	<i>Paracoccus denitrificans</i>			<i>Cupriavidus necator</i>		
		Anfang	Ende	Δ	Anfang	Ende	Δ
		[mg/L] / (%)					
Glycerin	68,5	2.600	0	2.600	2.560	0	2.560
	70,5	2.560	400	2.160	3.330	1.320	2.010
Ammonium	68,5	343	166	177	335	86	249
	70,5	267	35	232	251	142	109
Phosphor	68,5	1.951	1.746	205	1.848	1.451	397
	70,5	312	303	9	342	287	55
Phosphor in Trockenmasse	68,5		22,7 (2,9)			22,3 (2,1)	
	70,5		7,2 (1,5)			15,7 (1,7)	
Trockenmasse	68,5		787			1.066	
	70,5		487			927	
Feuchtmasse	68,5		9.590			6.851	
	70,5		11.480			7.143	
Protein	68,5	170	267	97	194	902	707
	70,5	257	580	313	203	502	298
PHB _{GC} -Nachweis	68,5		13 (1,6)			108 (10)	
	70,5		131 (27)			191 (21)	
OD _{600nm}	68,5	0,3	1,7	1,4	0,2	2,5	2,3
	70,5	0,3	3,3	3,0	0,2	2,3	2,1
pH-Wert	68,5	7,0	7,0		7,5	7,0	
	70,5	6,0	4,5		6,5	5,0	

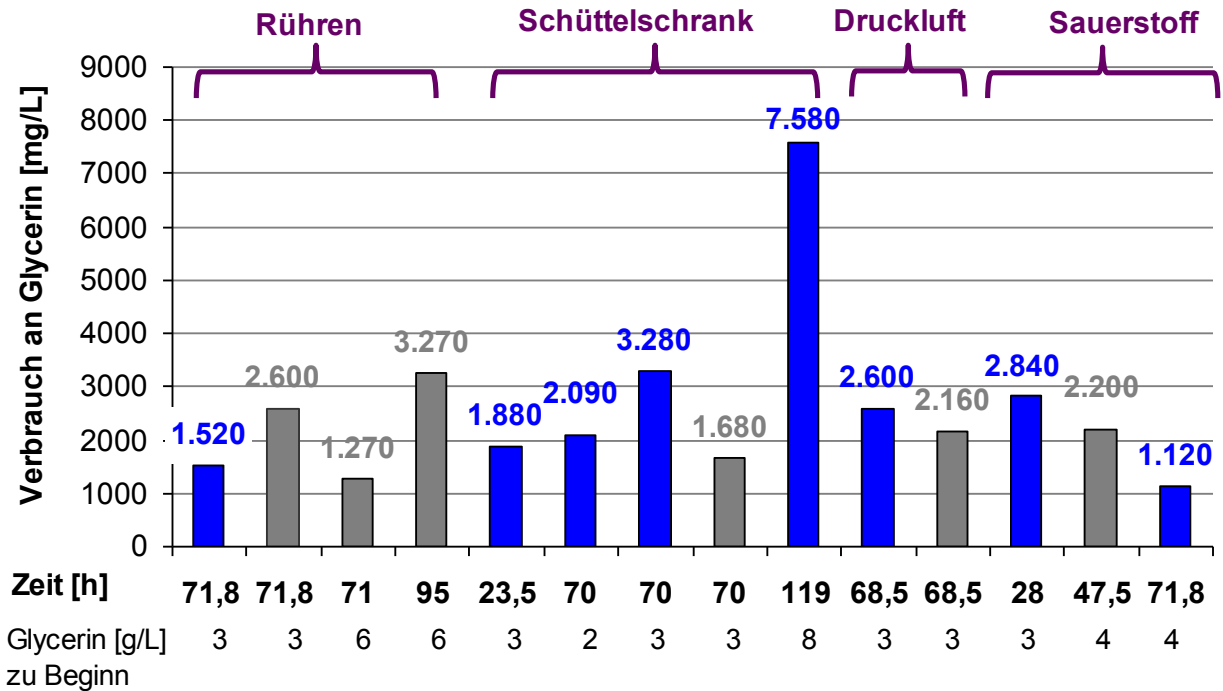
Tabelle 40: Wachstum und PHB-Bildung bei Begasung mit Sauerstoff mit den Medien Steinbüchel und Mothes.

Untersuchte Parameter	Versuchsdauer [h]	<i>Paracoccus denitrificans</i>			<i>Cupriavidus necator</i>		
		Anfang	Ende	Δ	Anfang	Ende	Δ
		[mg/L] / (%)					
Glycerin	28,0	3.240	400	2.840	3.640	2.680	960
	47,5	4.250	2.050	2.200	7.700	4.340	3.360
	71,8	4.360	3.240	1.120	6.160	5.160	1.000
Ammonium	28,0	342	198	144	321	212	109
	47,5	260	174	86	276	156	120
	71,8	335	135	200	252	168	84
Phosphor	28,0	1.862	1.611	251	1.866	1.550	316
	47,5	262	249	13	253	241	12
	71,8	1.489	1.385	104	304	212	92
Phosphor in Trockenmasse	28,0		26,9 (2,3)			-	
	47,5		13,4 (1,1)			10,0 (1,6)	
	71,8		22,3 (2,2)			11,6 (1,8)	
Trockenmasse	28,0		1.177			323	
	47,5		1.193			644	
	71,8		1.008			644	
Feuchtmasse	28,0		11.996			3.454	
	47,5		11.712			4.646	
	71,8		10.424			5.100	
Protein	28,0	175	776	601	207	432	225
	47,5	287	738	451	258	525	267
	71,8	220	897	677	220	641	421
PHB _{GC} -Nachweis	28,0		371 (31,5)			21 (6,4)	
	47,5		507 (42,5)			148 (22,9)	
	71,8		202 (20,0)			168 (26,1)	
OD _{600nm}	28,0	0,5	2,9	2,4	0,2	0,8	0,6
	47,5	0,5	2,8	2,3	0,6	1,6	1,0
	71,8	0,5	2,3	1,8	0,4	1,6	1,2
pH-Wert	28,0	7,0	7,0		7,5	7,0	
	47,5	6,0	5,0		6,0	5,5	
	71,8	7,0	7,0		6,5	6,0	

3.3.2.1 Substratverbrauch (Glycerin, Ammonium, Phosphor) in mg/L bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*

Im Einzelnen wird der Substratverbrauch bei den vier Kultivierungsbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Kultivierung im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie beim Einsatz der oben genannten Medien graphisch dargestellt.

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

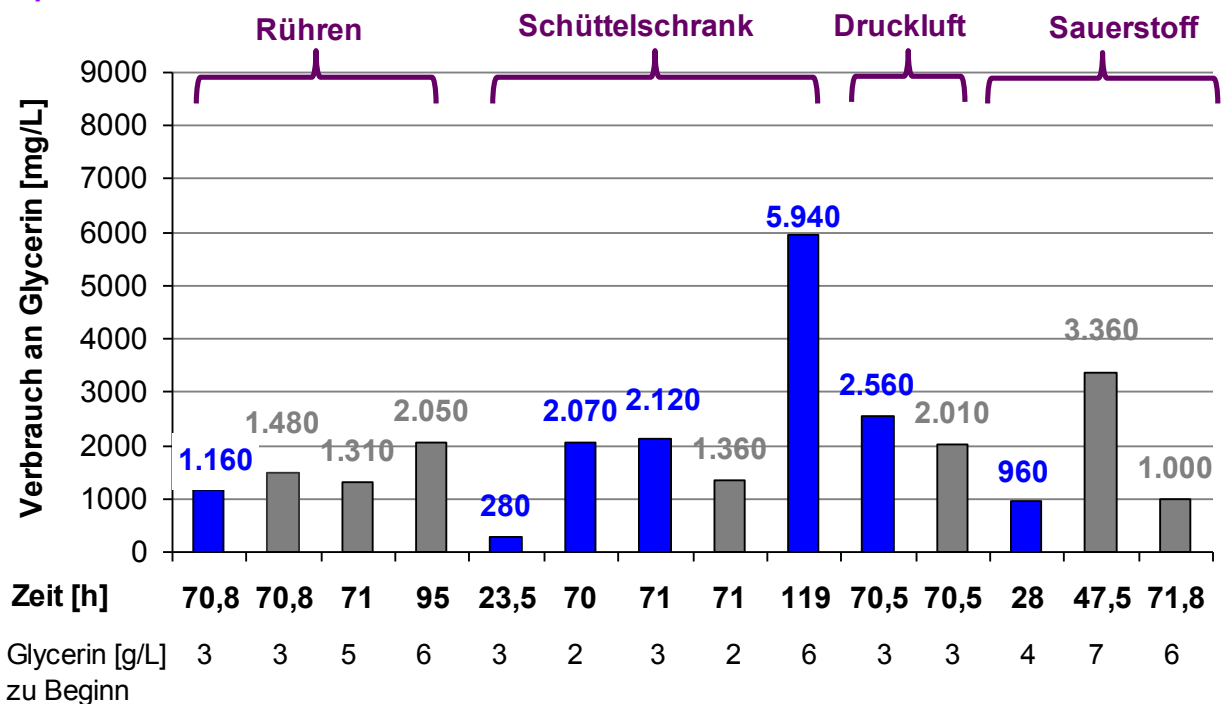
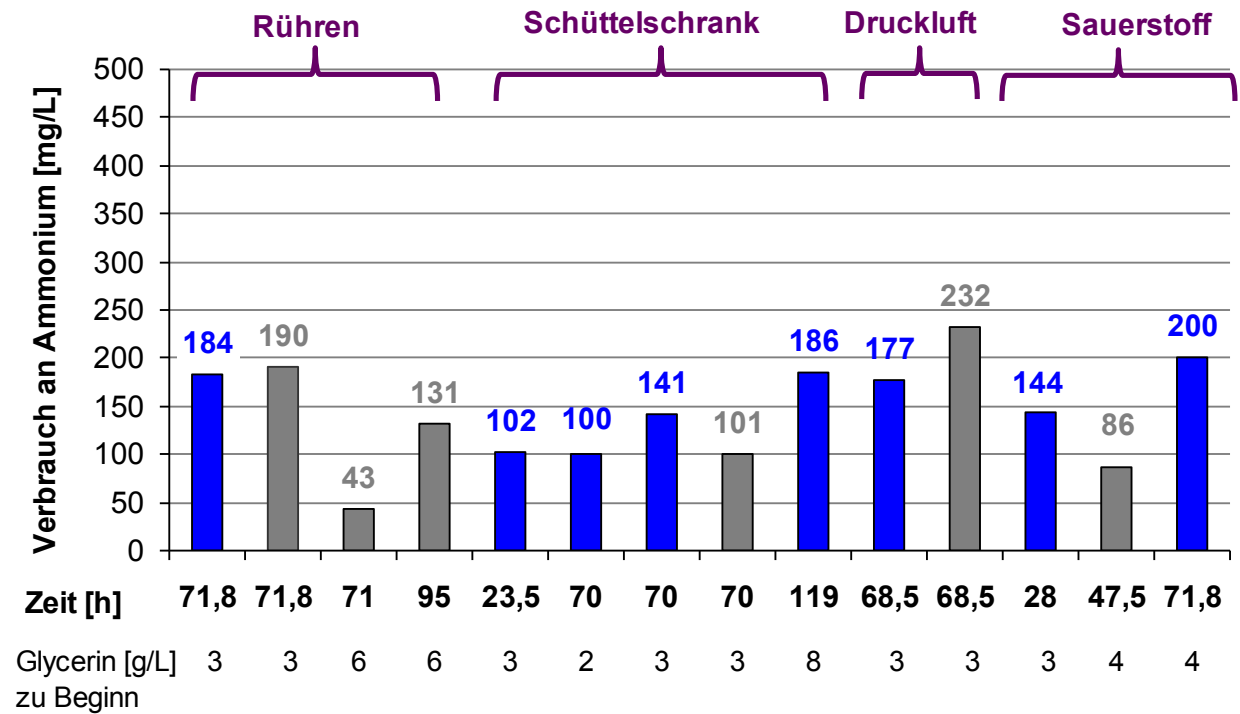


Abbildung 95: Verbrauch an Glycerin in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach [Steinbüchel](#) bzw. [Mothes](#).

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

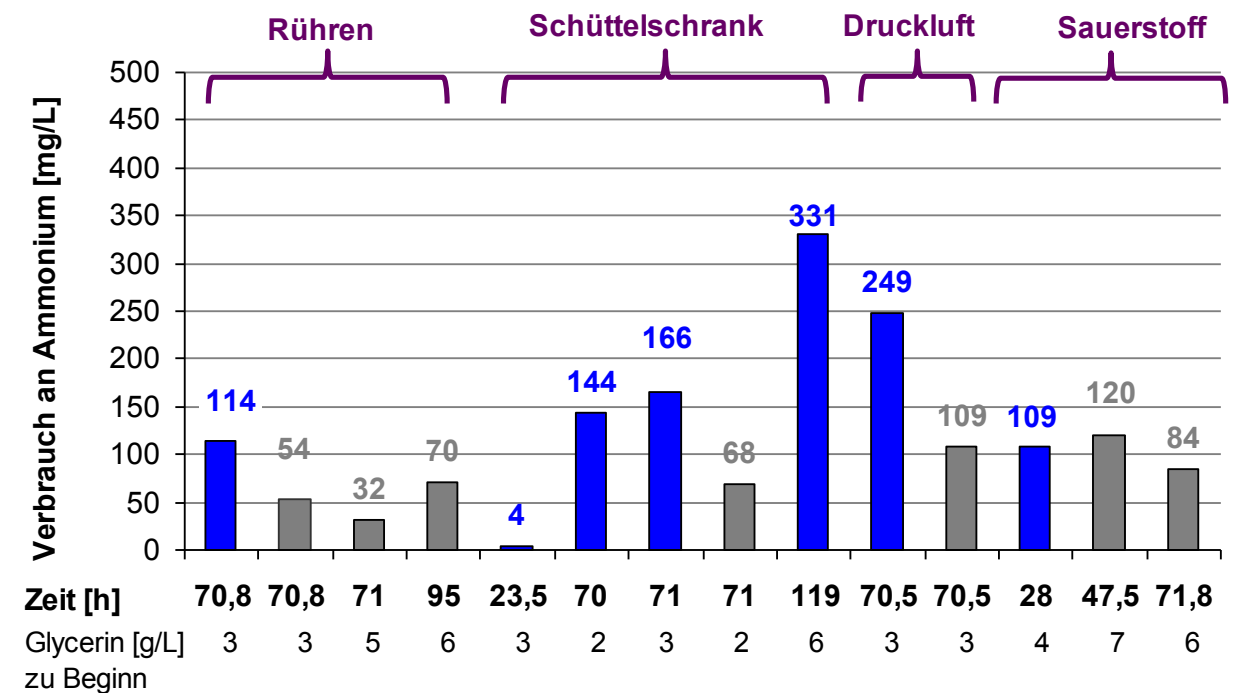
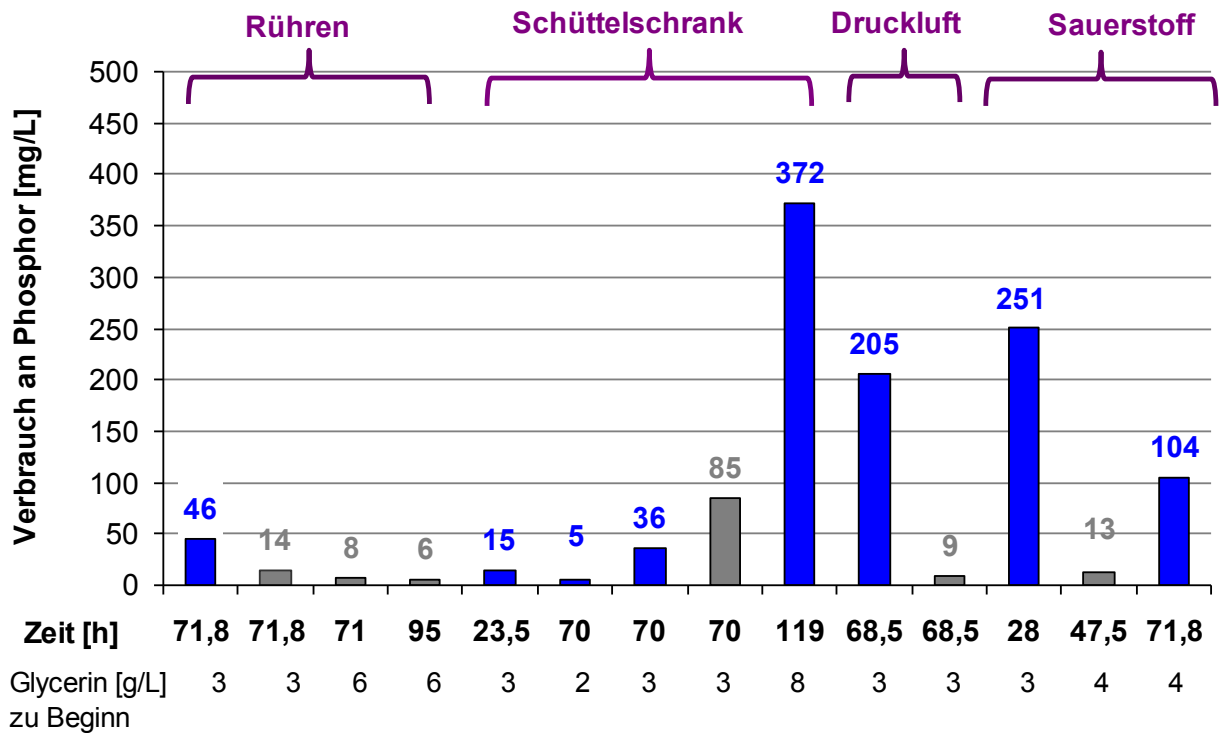


Abbildung 96: Verbrauch an Ammonium in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoff-eintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

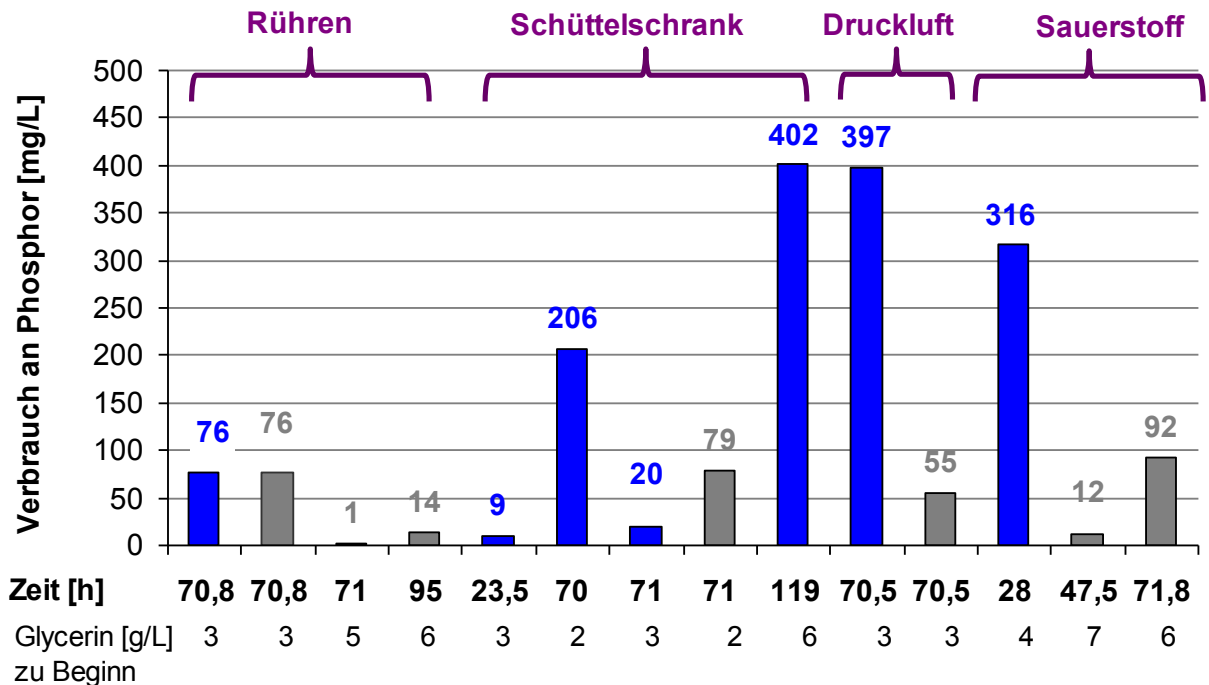
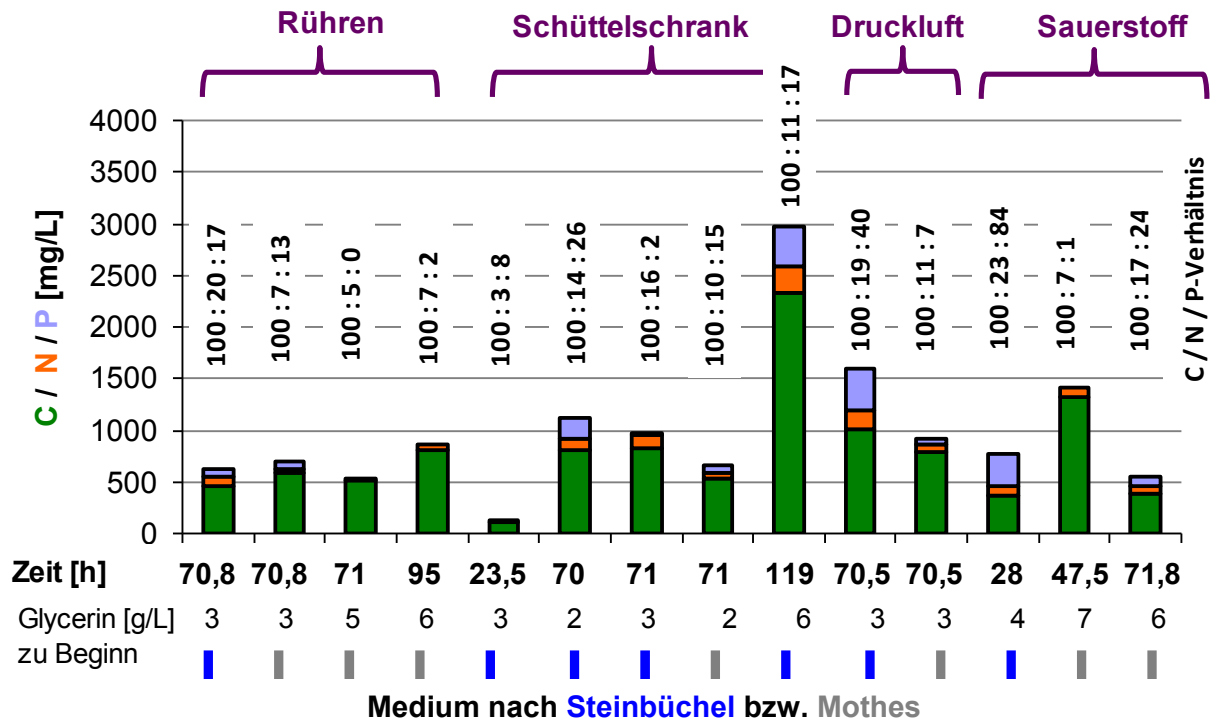


Abbildung 97: Verbrauch an Phosphor in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

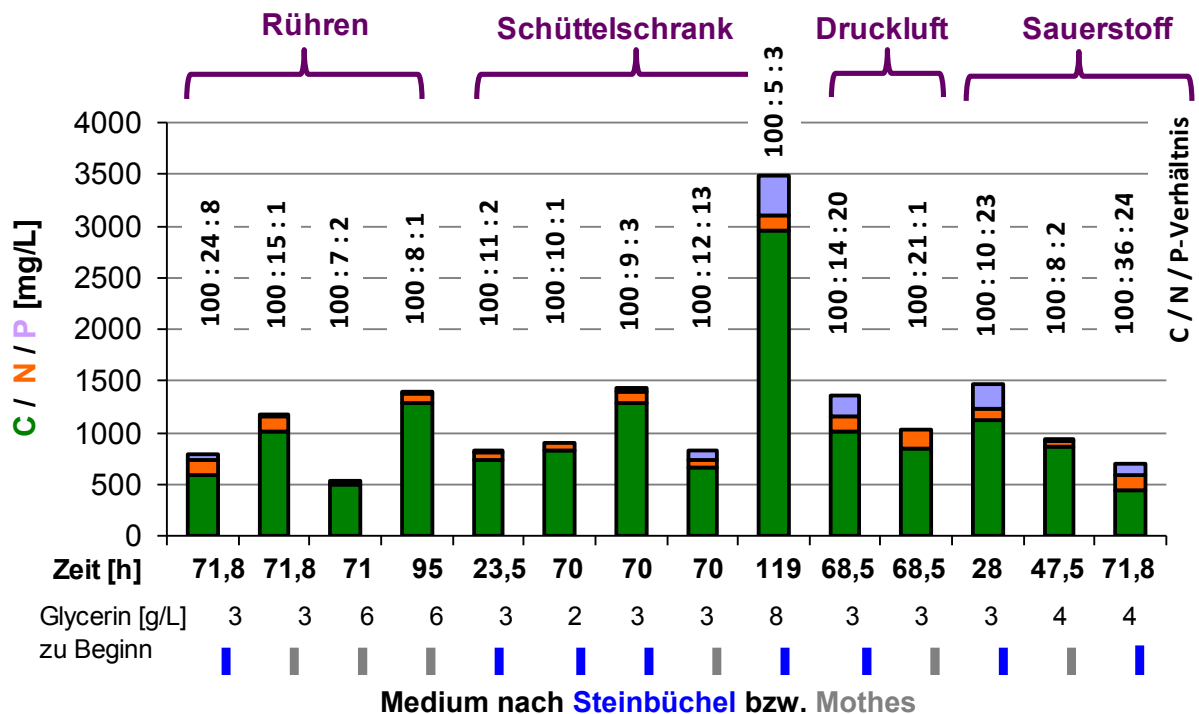
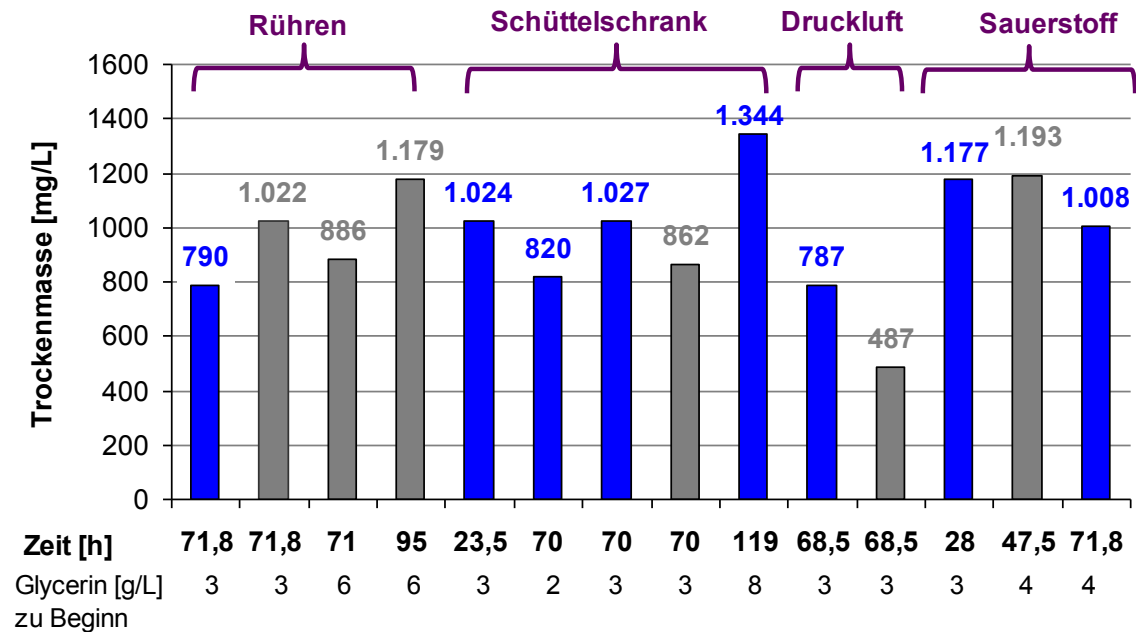


Abbildung 98: Verbrauch an Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.

3.3.2.2 Zusammensetzung der gebildeten Biomasse (Organik) in mg/L bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*

Im Einzelnen wird die Biomassebildung und deren Zusammensetzung bei den vier Kultivierungsbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Kultivierung im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie beim Einsatz der oben genannten Medien graphisch dargestellt. Bei Trockenmasse und Proteingehalt wurde die Formel $C_4H_8O_2N$ mit der Molaren Masse von 102,1 g/mol zugrunde gelegt (Abschlussbericht, Scherzer, 2008).

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

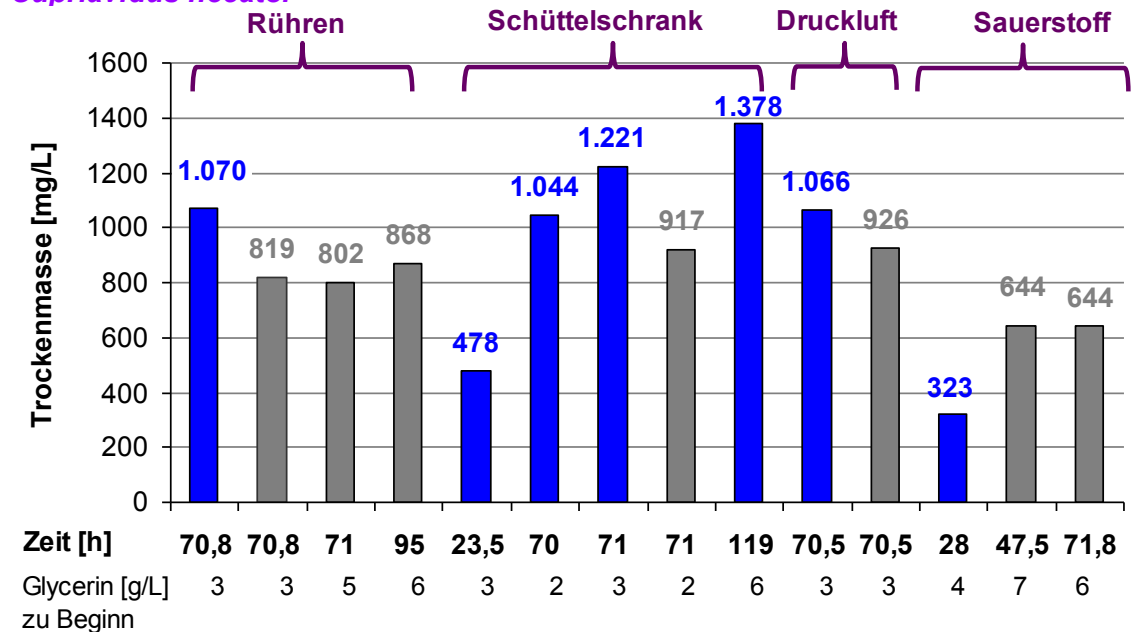
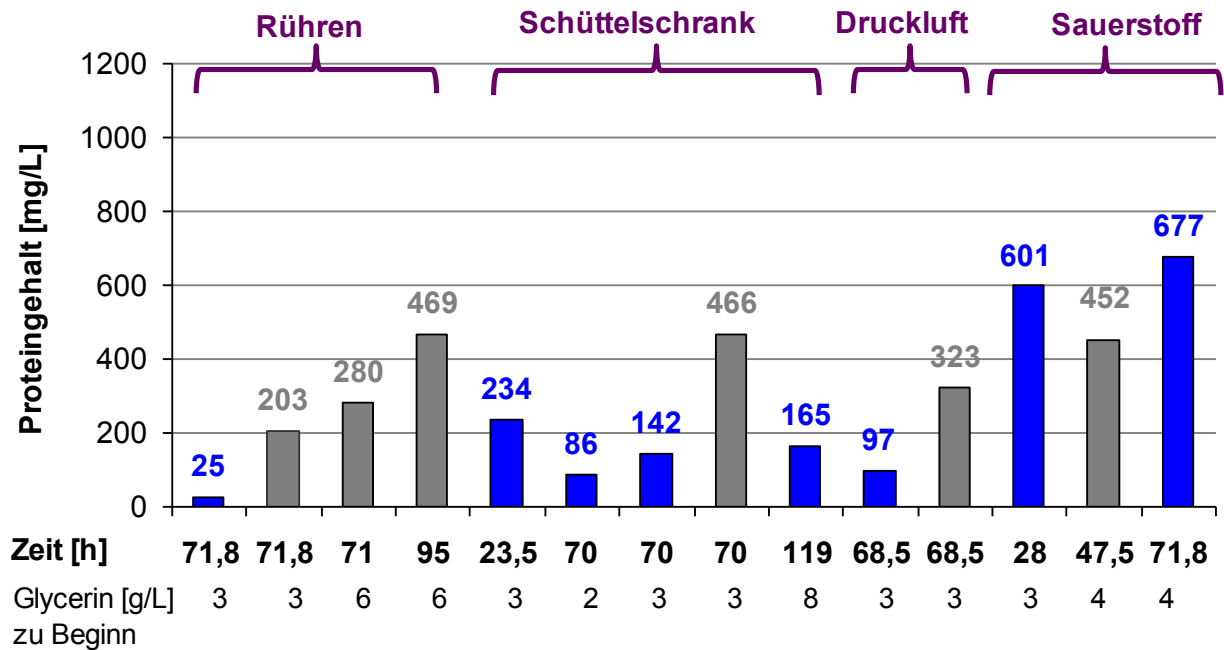


Abbildung 99: Gebildete Trockenmasse in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

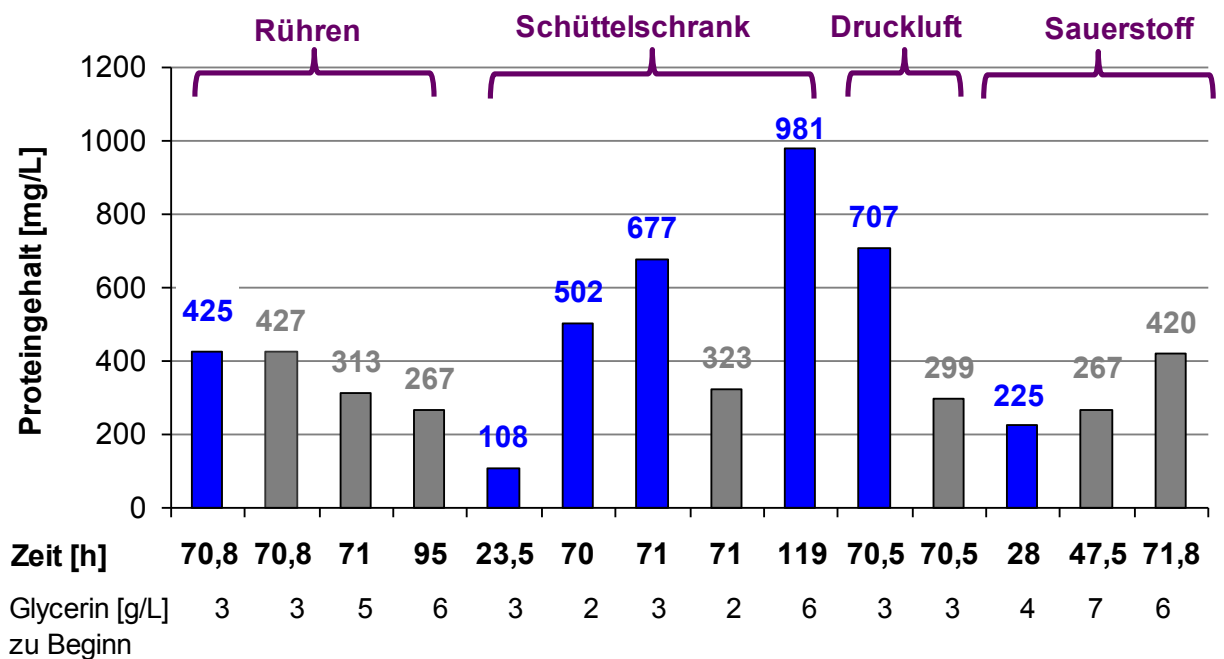
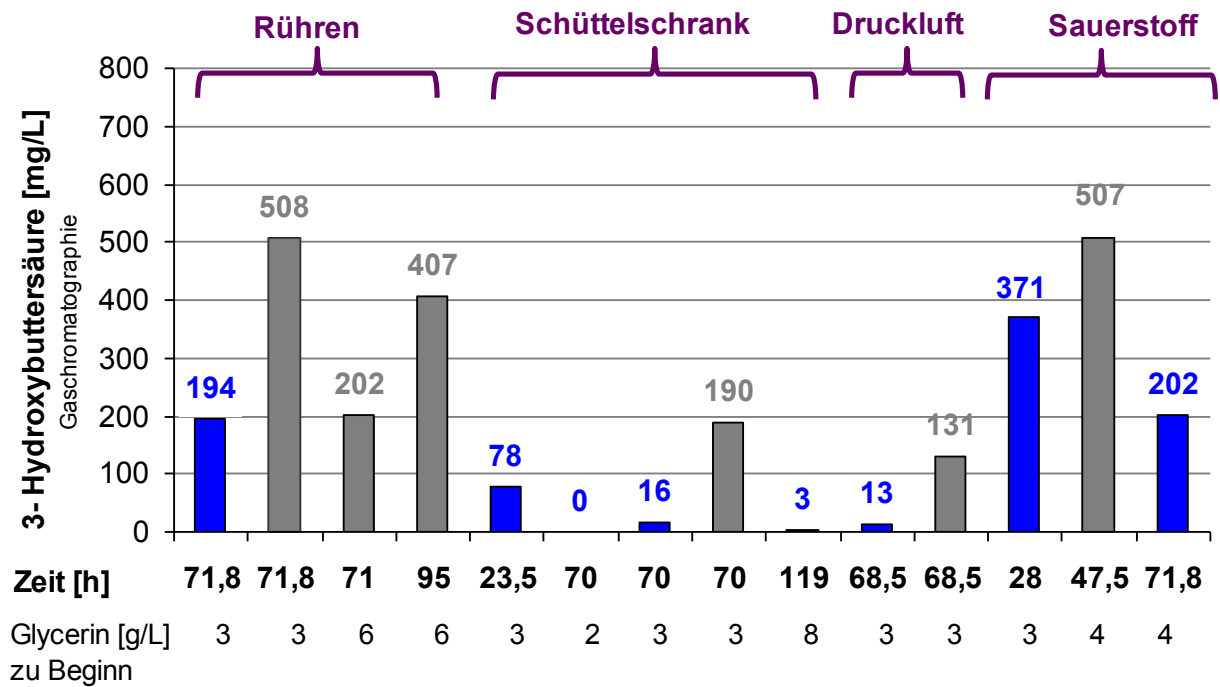


Abbildung 100: Zunahme des Proteingehalts in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach [Steinbüchel](#) bzw. [Mothés](#).

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

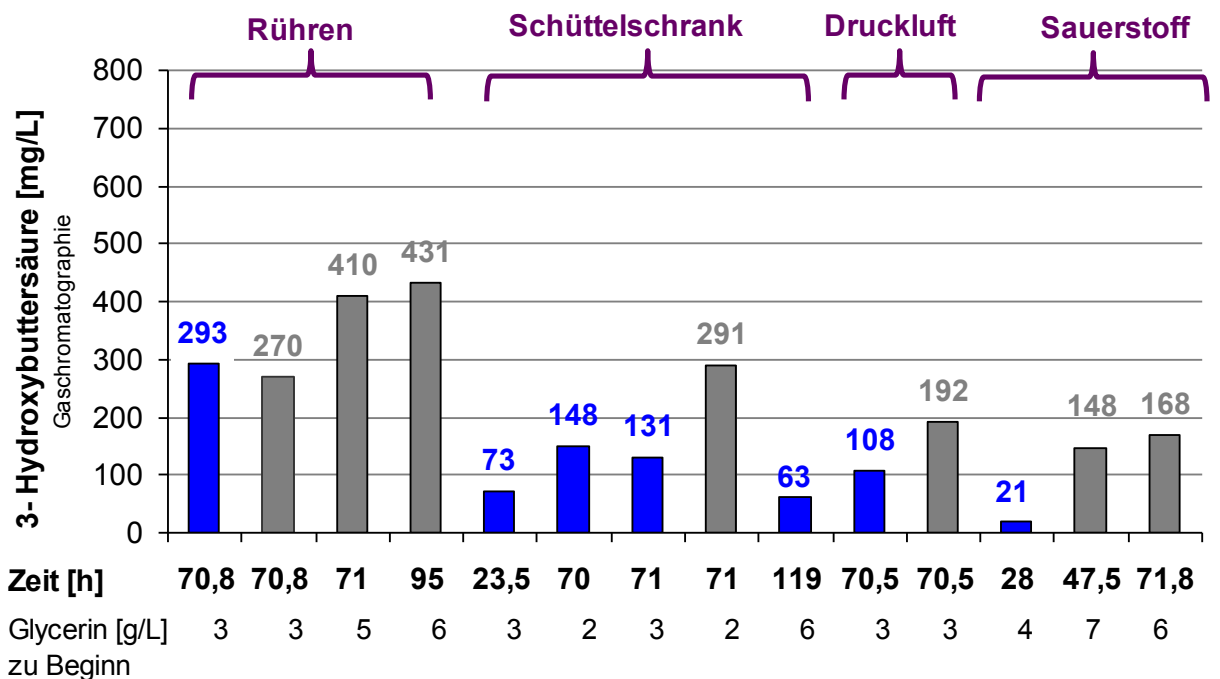
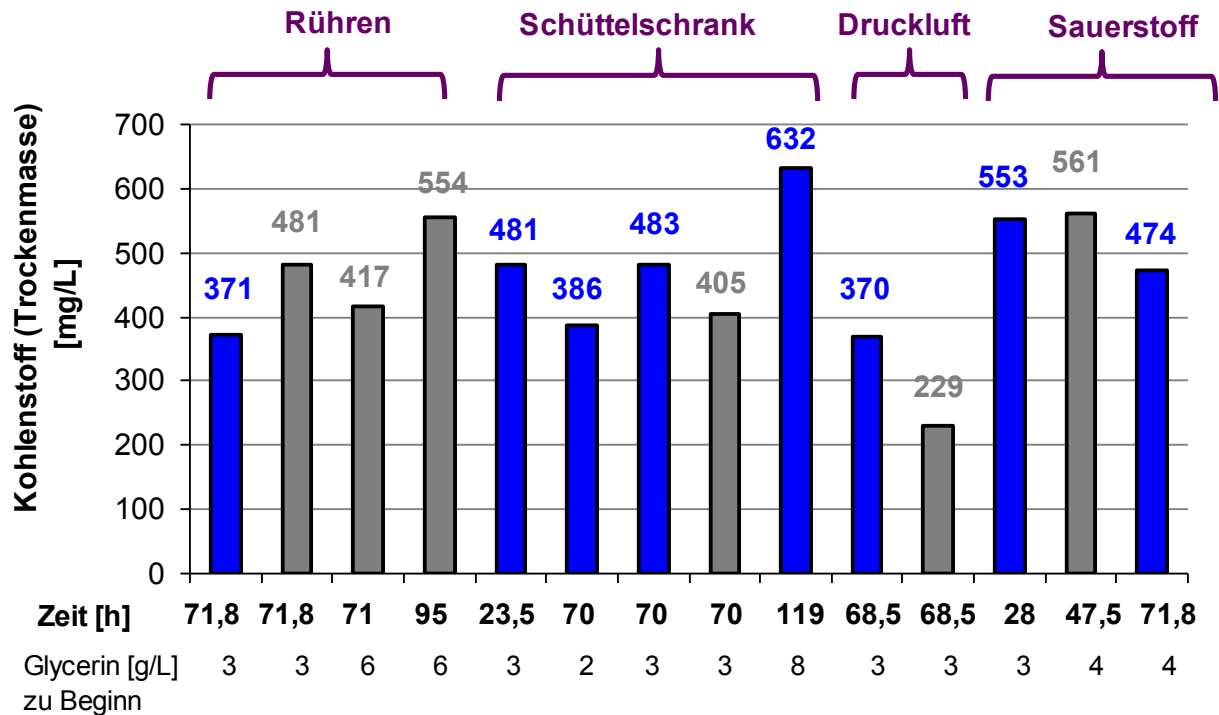


Abbildung 101: Gebildete 3-Polyhydroxybuttersäure (gaschromatographische Untersuchung) in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

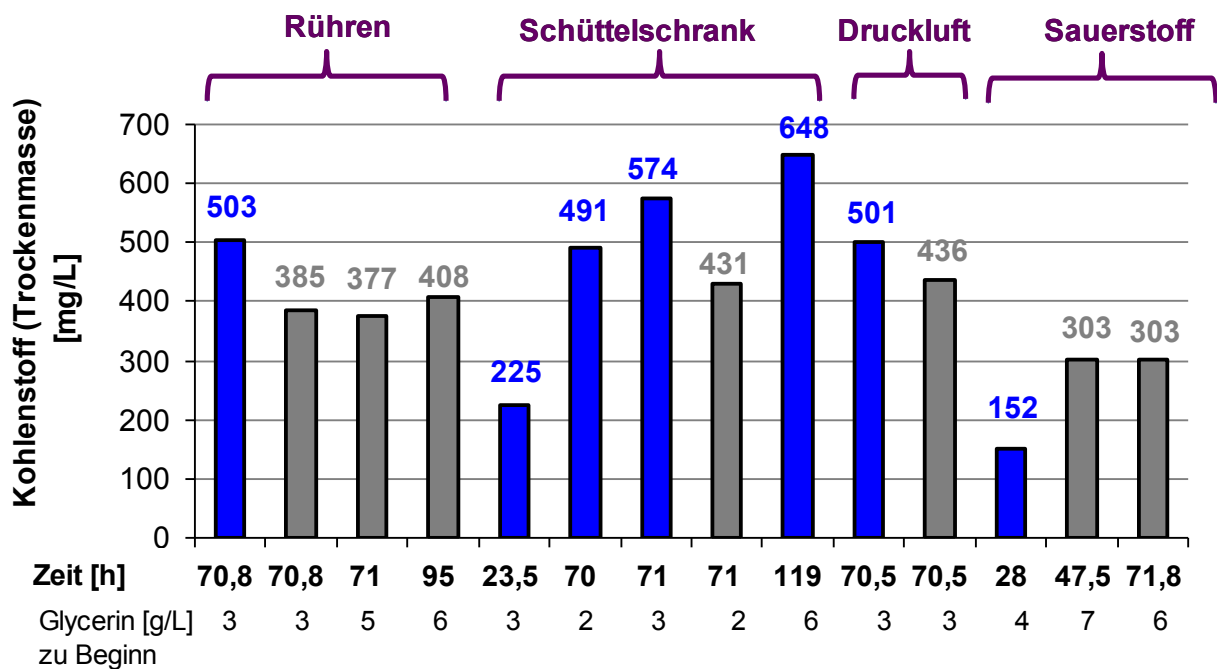
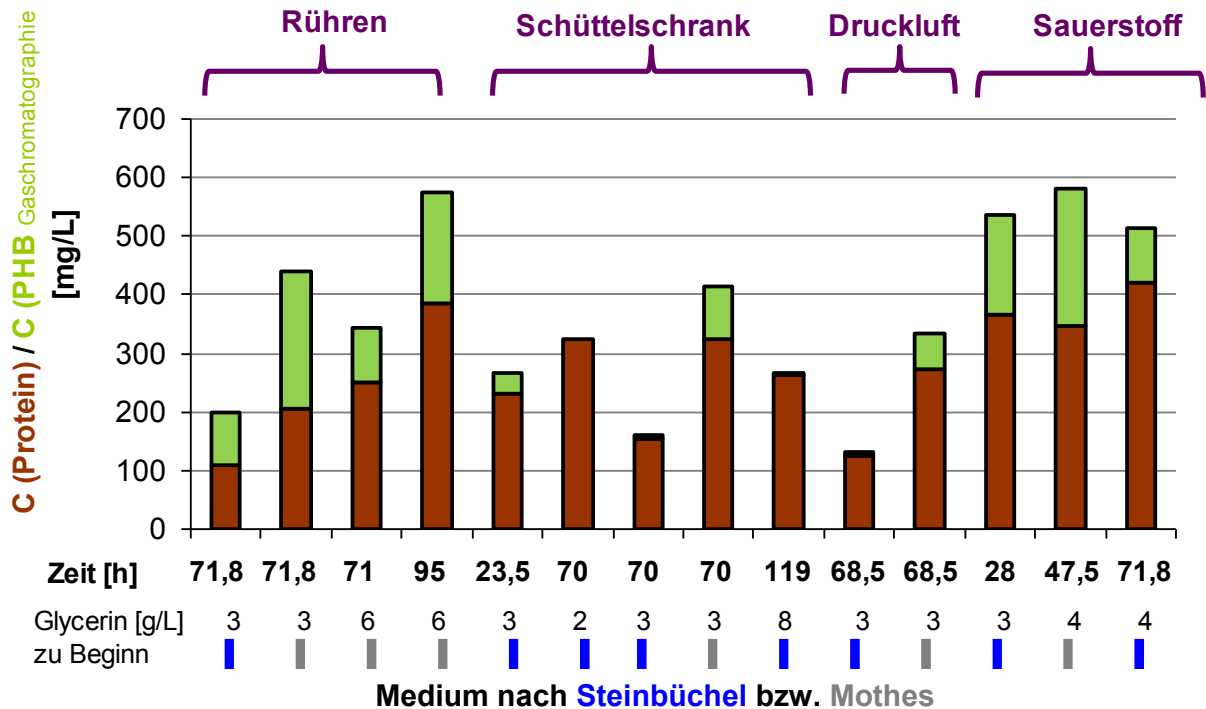


Abbildung 102: Gebildeter Kohlenstoff in der Trockenmasse in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach [Steinbüchel](#) bzw. [Mothés](#).

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

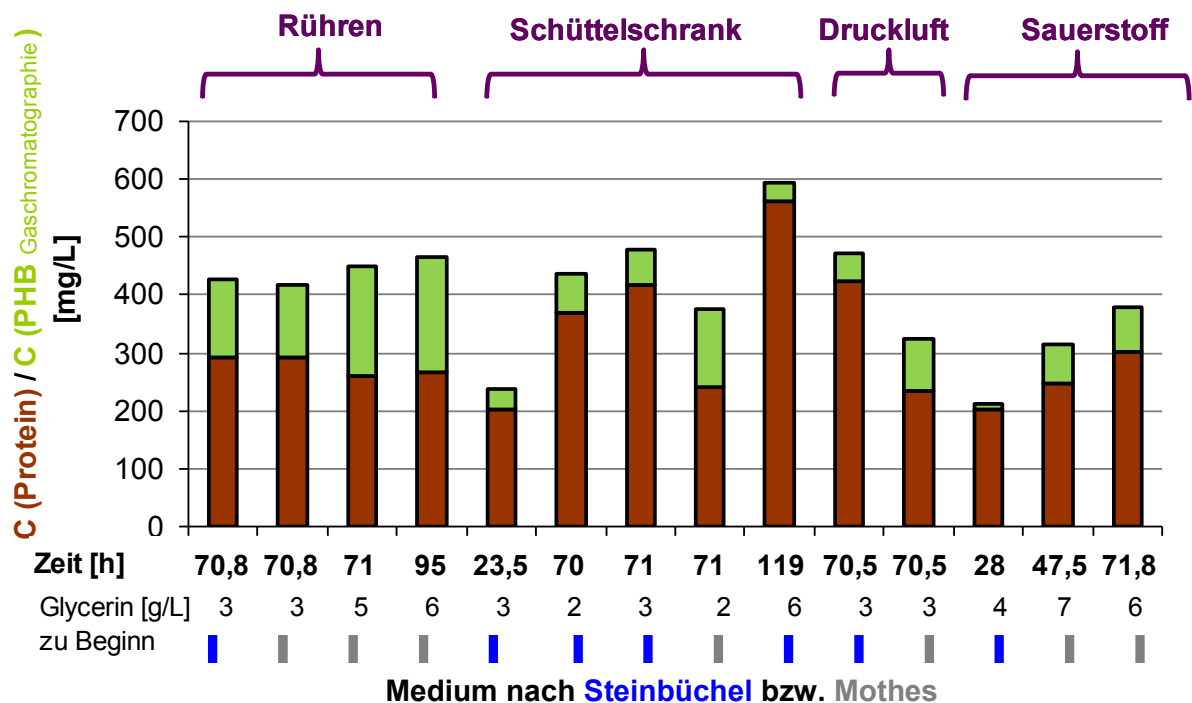


Abbildung 103: Gebildeter Kohlenstoff in Protein und 3-Hydroxybuttersäure in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.

3.3.2.3 Elementverteilung in der Biomasse in mg/kg bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*

Im Einzelnen wird die Elementzusammensetzung in der gebildeten Biomasse bei den vier Kultivierungsbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren (Tabelle 41), Kultivierung im Schüttelschrank (Anhang, Tabelle 44), Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff (Anhang, Tabelle 45) sowie beim Einsatz der genannten Medien tabellarisch dargestellt.

Tabelle 41: ICP-MS Messung der Trockensubstanz bei den Rühransätzen bei Versuchsabbruch in den Medien Steinbüchel und Mothes.

	<i>Paracoccus denitrificans</i> mg/kg				<i>Cupriavidus necator</i> mg/kg			
Aluminium	19	1	10	< 0,7	8	2	18	< 1,1
Arsen	< 1,1	< 0,8	< 1,	< 0,7	< 1,0	< 1,1	< 1,2	< 1,1
Barium	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	1	1	1	< 0,5
Beryllium	< 1,1	< 0,8	< 1,	< 0,7	< 1,0	< 1,1	< 1,2	< 1,1
Blei	1	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Bor	< 11,0	< 0,8	< 9,6	< 7,0	< 9,4	< 11,0	< 12,0	< 11,0
Cadmium	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Calcium	595	283	288	429	123	< 101,0	< 116,0	< 102,0
Chrom	< 0,5	< 0,4	0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Cobalt	< 0,5	< 0,4	< 0,4	0,4	1	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Eisen	282	< 1,3	138	107	239	140	154	155
Kalium	17.007	11.181	15.680	13.329	5.833	5.796	3.127	4.693
Kupfer	9	25	83	40	8	18,1	19	21
Magnesium	2.253	1.976	2.069	2.142	2.042	1.848	1.425	2.093
Mangan	< 0,5	121	77	93	< 0,4	10	6	9
Molybdän	1	2	5	3	1	3	4	3
Natrium	19.620	1.171	12.500	1.397	5.937	421	4.906	473
Nickel	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	6	0,8	< 0,5	< 0,5
Phosphor	251.356	13.206	15.287	13.262	20.872	16.716	10.679	13.768
Rubidium	1	1	1	1	1	1	< 0,5	1
Selen	< 1,7	< 1,3	< 1,6	< 1,2	< 1,5	< 1,7	< 1,9	< 1,7
Strontium	< 0,5	1	< 0,4	1	< 0,4	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Tellur	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Thallium	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Vanadium	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Zink	102	90	128	91	71	66	78	90
Zinn	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,5	< 0,5	< 0,5
[h]	71,8	70,8	71	95	71,8	70,8	71	95

Schlussfolgerung

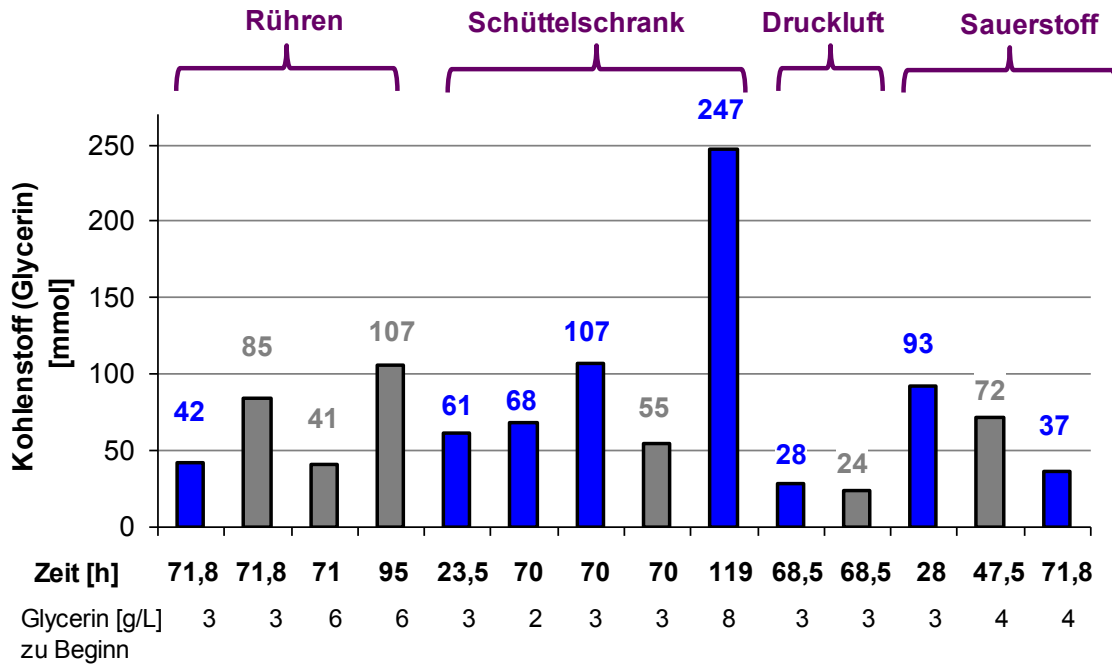
Es war keine Schwermetallbelastung nachweisbar. Die Biomassen enthielten wichtige Elemente wie Calcium, Kalium, Magnesium, Natrium, Phosphor und Zink. Die Konzentrationen an Phosphor und Calcium unterschieden sich je nach Medium.

3.3.3 Bilanzierung

3.3.3.1 Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorverbrauch in mmol bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*

Im Einzelnen wird das Kohlenstoff/Stickstoff/Phosphor-Verhältnis bei den vier Kultivierungsbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Kultivierung im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie beim Einsatz der oben genannten Medien graphisch dargestellt.

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

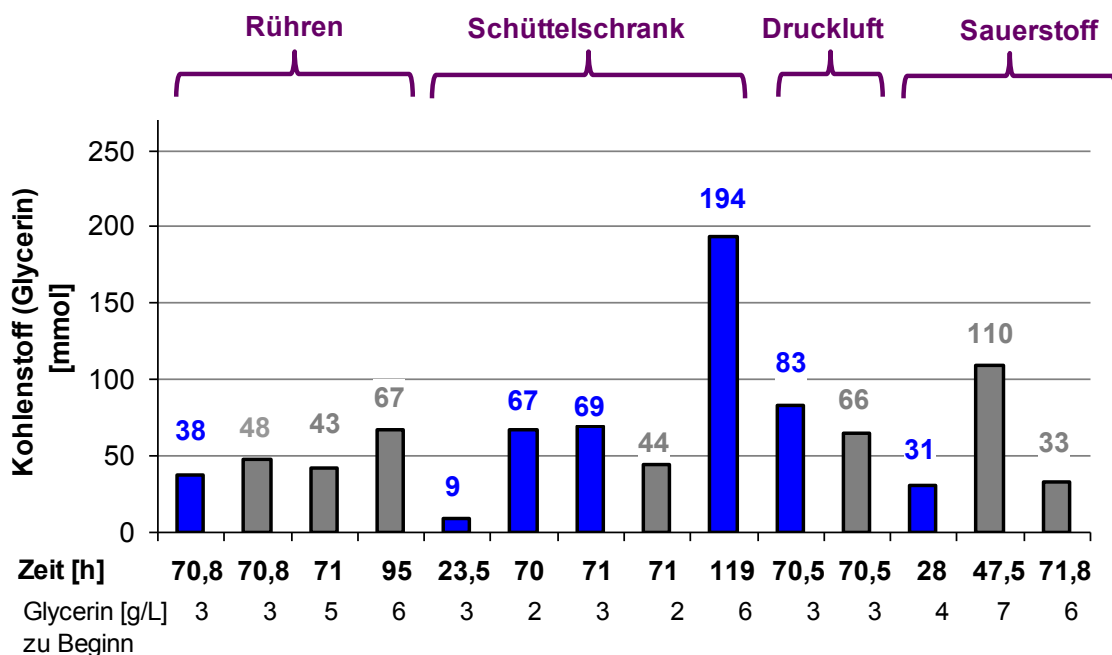
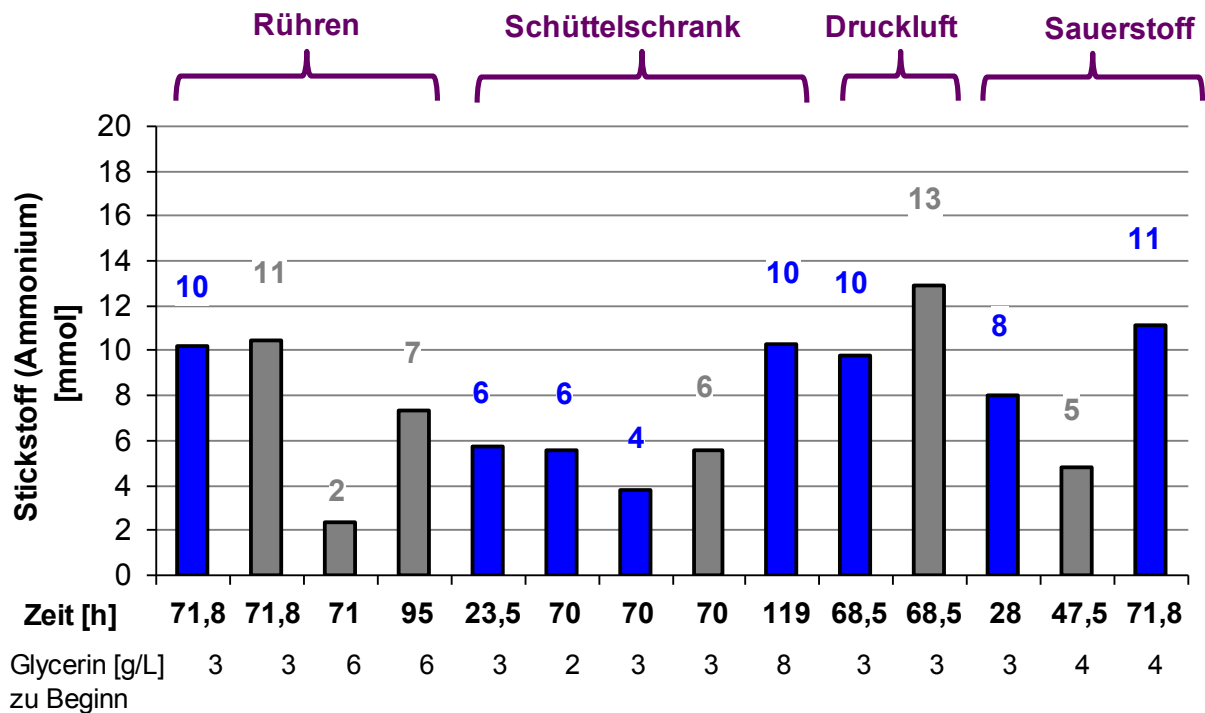


Abbildung 104: Verbrauch an Kohlenstoff in Glycerin in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach [Steinbüchel](#) bzw. [Mothes](#).

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

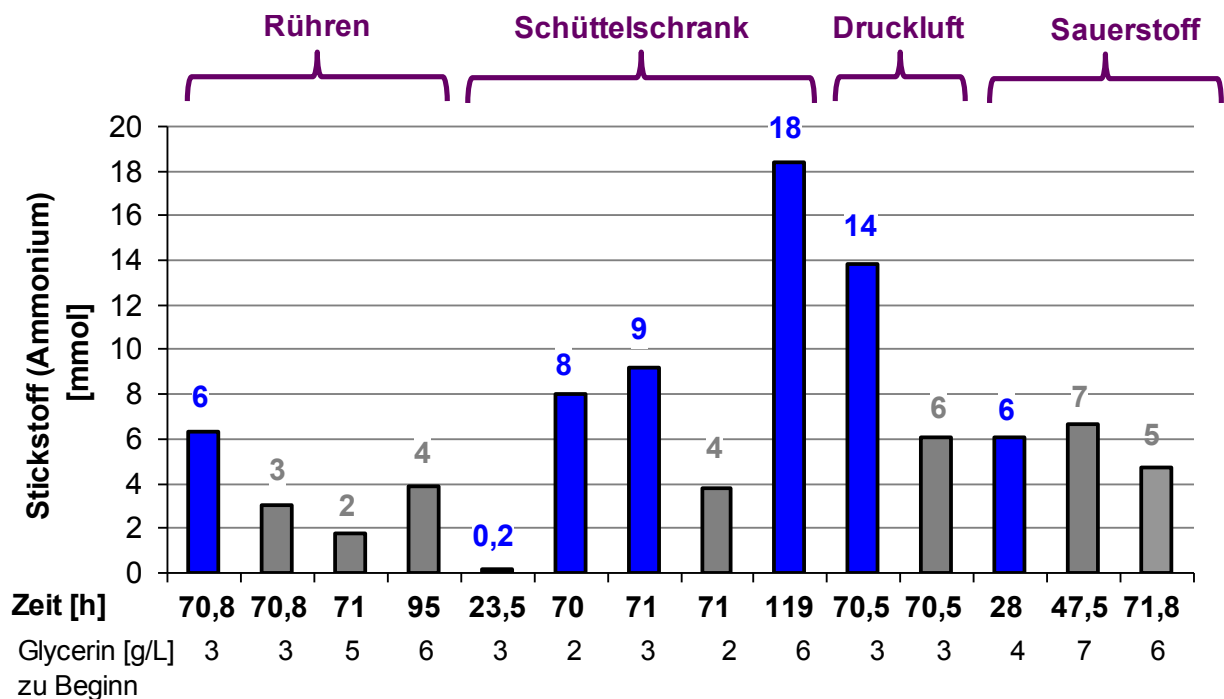
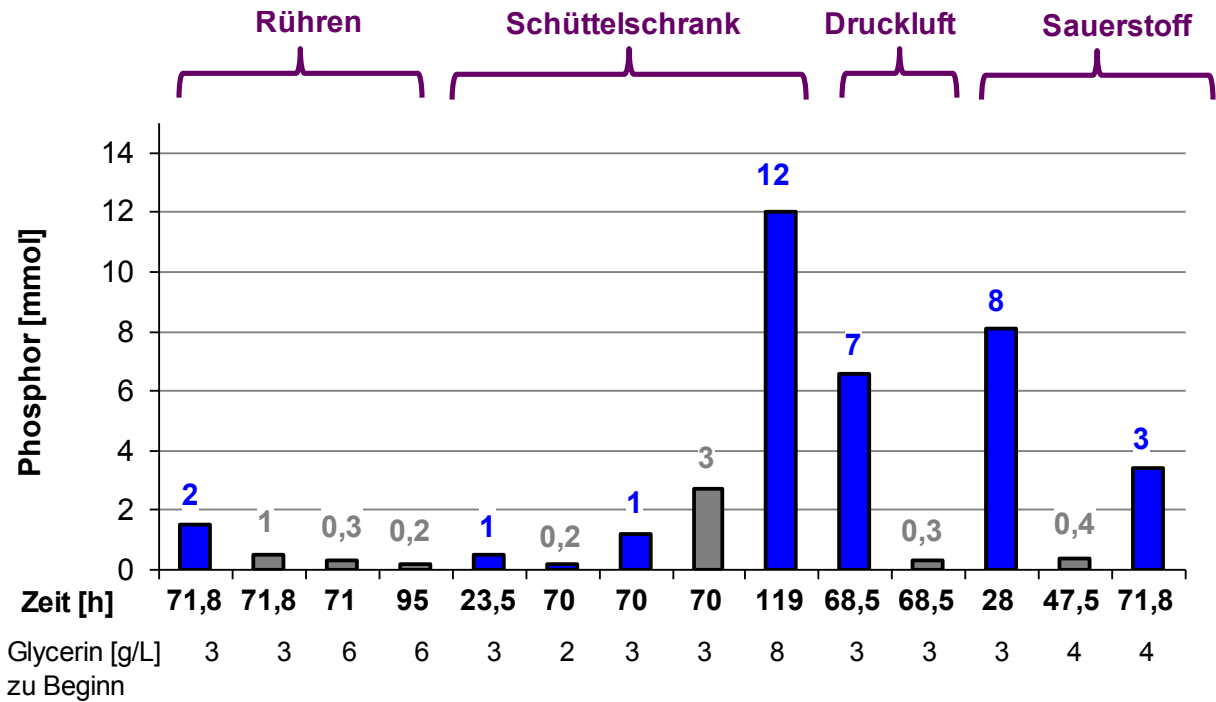


Abbildung 105: Verbrauch an Stickstoff in Ammonium in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

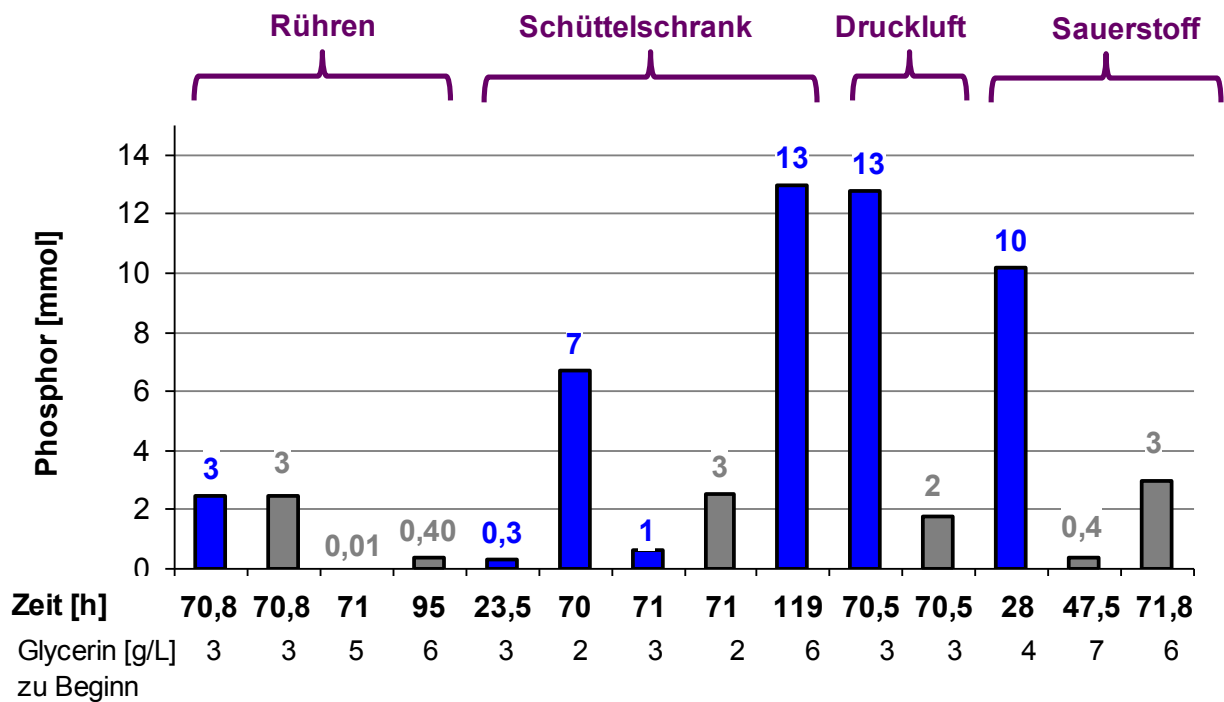
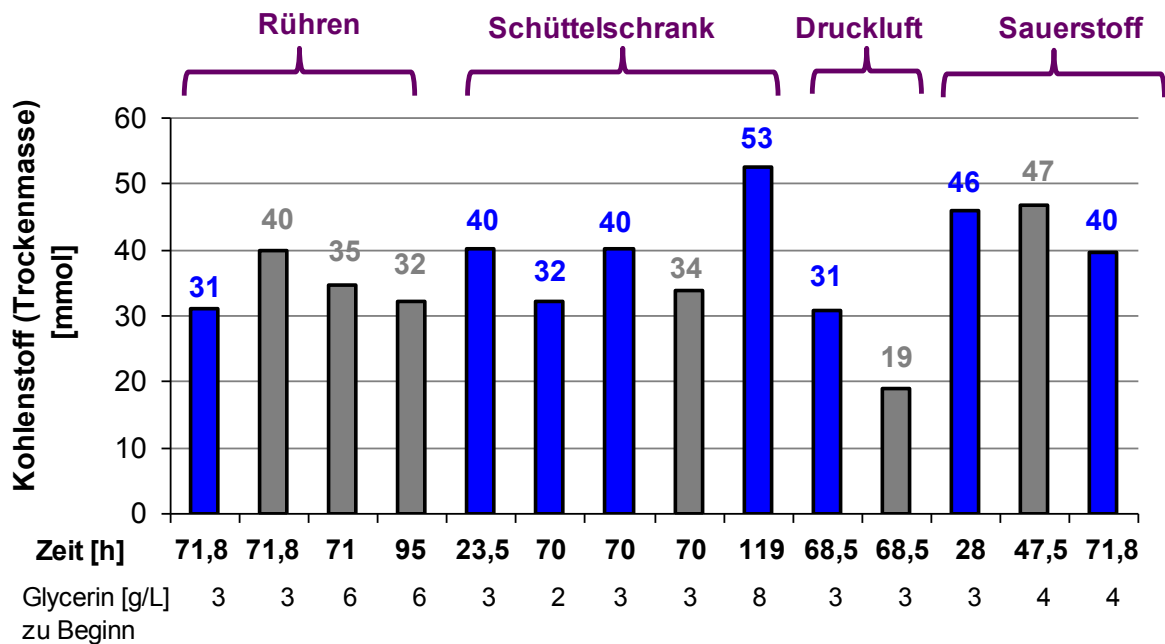


Abbildung 106: Verbrauch an Phosphor in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.

3.3.3.2 Gebildete Biomasse in mmol bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*

Im Einzelnen wird die Zusammensetzung des Kohlenstoffs in der gebildeten Biomasse bei den vier Kultivierungsbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Kultivierung im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie beim Einsatz der oben genannten Medien graphisch dargestellt.

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

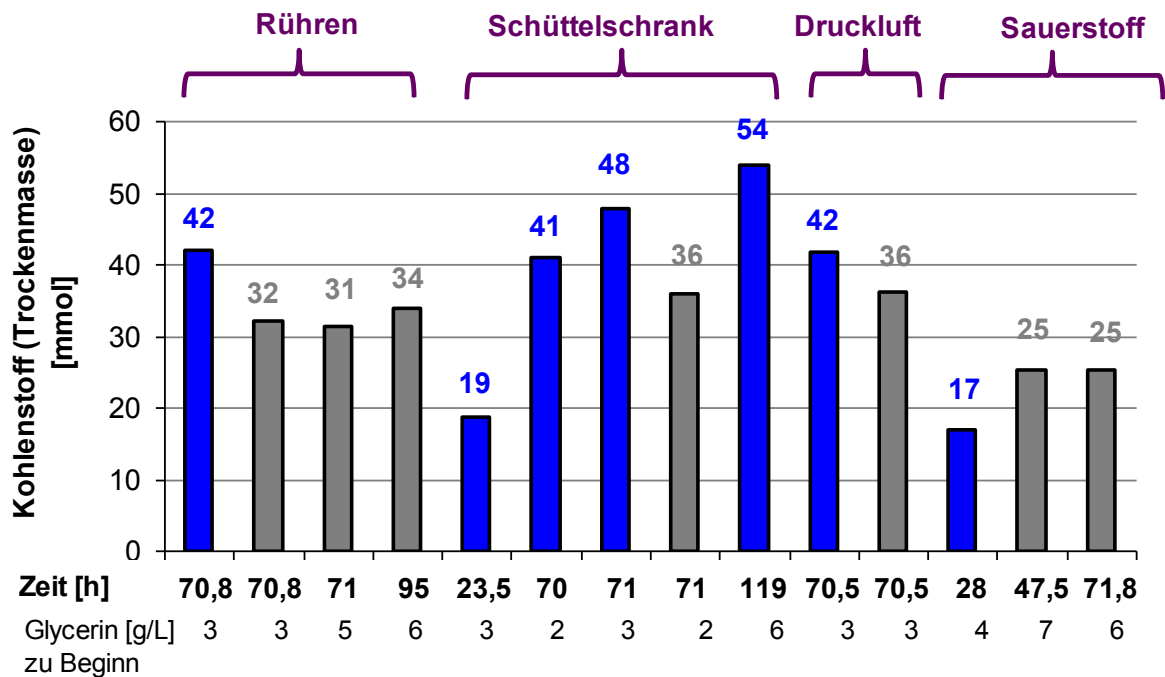
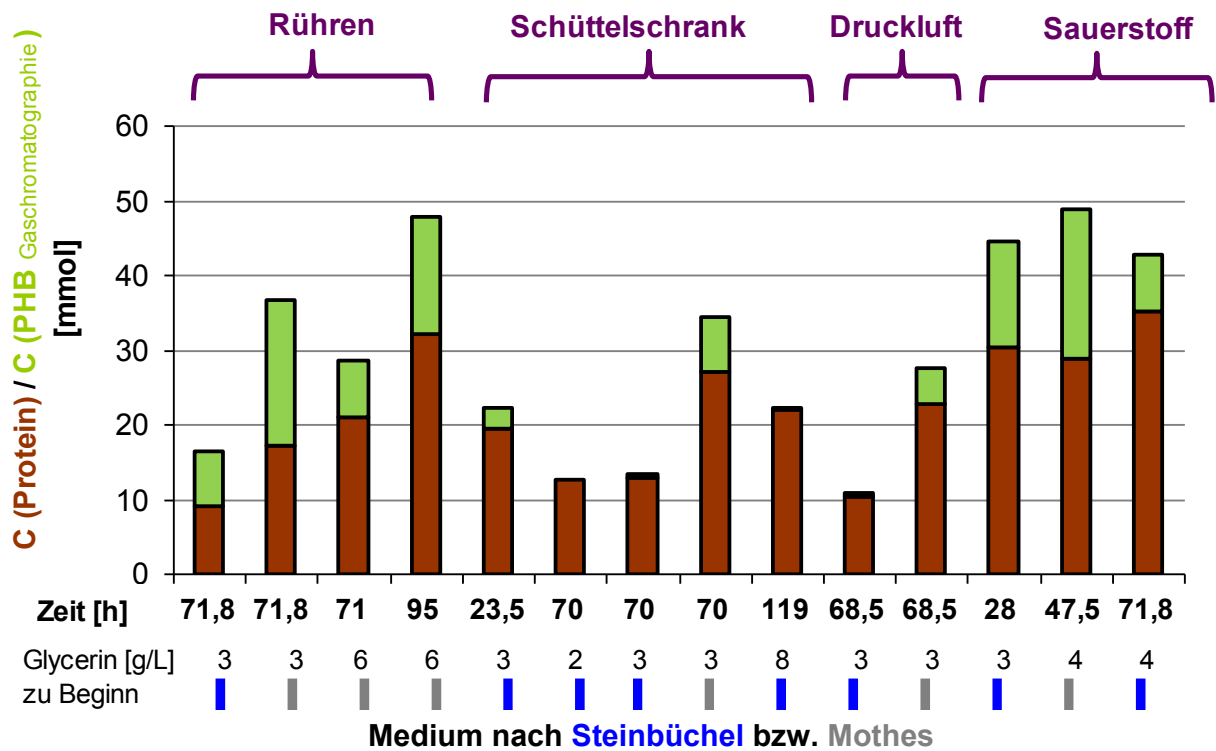


Abbildung 107: Gebildeter Kohlenstoff in der Trockenmasse in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach [Steinbüchel](#) bzw. [Mothes](#).

Paracoccus denitrificans



Cupriavidus necator

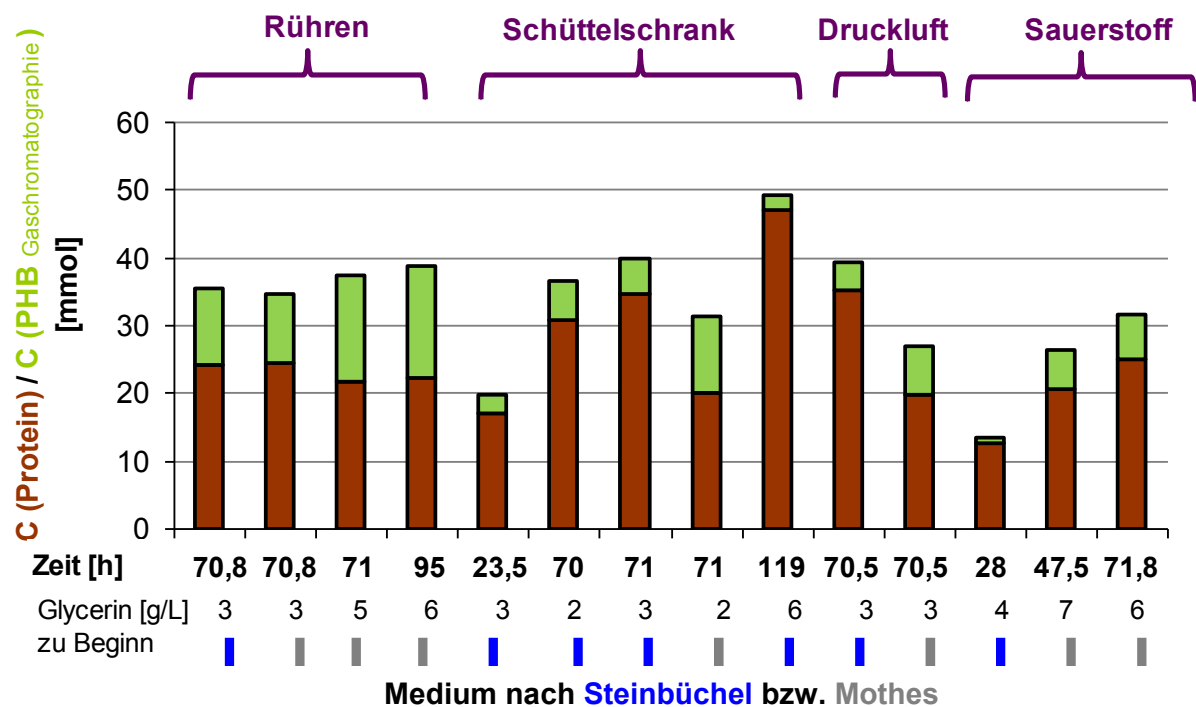


Abbildung 108: Gebildeter Kohlenstoff in Protein und 3-Hydroxybuttersäure in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.

4. Diskussion

4.1 Nachweismethoden für die polymeren Verbindungen Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure

4.1.1 Nachweismethoden für Polyphosphat

Polyphosphat wird in Form von Granula in den Zellen gespeichert und zeigt eine blauschwarze Färbung. Diese mikroskopisch sichtbaren blauschwarzen Granula dienen als charakteristisches Merkmal für Polyphosphate (Kunst et al., 2000).

Bei der mikroskopischen Untersuchung waren die Granulaeinschlüsse der Bakterienzellen auch bei größtmöglicher Einstellung des Mikroskops (100-fach) nur schwer erkennbar.

Werden die Untersuchungsergebnisse der Neisser- und DAPI-Färbung verglichen, ergab sich bezüglich der Polyphosphate keine form- und mengenmäßige Übereinstimmung. Die unterschiedliche Probenvorbereitung könnte eine mögliche Erklärung liefern. Bei der Neisser-Färbung wird das Präparat hitzefixiert, während die DAPI-Färbung im flüssigen Zustand erfolgt. Die fehlende Übereinstimmung der Ergebnisse bei beiden Färbungen wurde auch in der Literatur festgestellt (Aprea, 2006).

Desweiteren wird in der Veröffentlichung von Serafim et al. (2002) über Probleme bei der Darstellung der intrazellulär gespeicherten Polyphosphate in Mikroorganismen berichtet. Sowohl Polyphosphate als auch Lipide fluoreszieren mit DAPI bei hohen Konzentrationen in der Farbe gelb, wenn auch in unterschiedlicher Intensität, so dass eine eindeutige Unterscheidung nicht immer gewährleistet ist. Daher wurden die Ergebnisse mittels alternativer Methoden verifiziert.

In der Literatur finden sich mehrere Aussagen über eine Lokalisierung von Polyphosphaten außerhalb der Zellmembran. Als Grund für dieses extrazelluläre Auftreten gibt es verschiedene Thesen und Vermutungen. Ursächlich könnte eine Beschädigung der Zellmembran sein, aber auch die Biosynthese der Polyphosphate über verschiedene Stoffwechselwege. Auch bezüglich der Kettenlängen gibt es verschiedene Annahmen. Kurze Ketten seien eher intrazellulär zu finden, längere Ketten eher in und an der Zellwand, beziehungsweise kurzkettige Polyphosphate könnten durch Abbau aus langkettigen entstanden sein (Tijssen et al., 1983, Tijssen et al. 1985, Elesbao et al., 2002).

Die unter 3.1.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, obwohl Fortschritte in der Polyphosphatforschung erzielt wurden, dass die Quantifizierung der gebildeten Polyphosphate in Mikroorganismen noch schwierig ist, da sie zuvor extrahiert und gereinigt werden müssen und durch Hydrolyse (Autolyse) es zu Verlusten kommen kann (Kulakova et al., 2011).

Es fehlen weitgehend Verfahren zur konkreten Bestimmung von Größe, Kettenlänge und Menge der Polyphosphate (Steinbüchel, 2006, Kornberg, 1995).

An der Aussagefähigkeit der seit Jahren in der Literatur beschriebenen und angewandten quantitativen Nachweisverfahren für Polyphosphate und deren kettenlängenspezifischer Fraktionierung bestehen gewisse Zweifel. Trotz dieser Unsicherheit wurde für die Extraktion von Polyphosphaten auf die Ausführungen von Clark et al. (1986) zurückgegriffen und sich an den dort festgelegten Kettenlängenbereichen bei der Fraktionierung orientiert. Dieses Extraktionsverfahren wurde bei Bakterien angewendet und wurde erstmals auch bei Pilzen, wie *Cunninghamella elegans*, eingesetzt.

Wurde die Biomasse nach Clark et al. (1986) extrahiert, konnten sowohl kurz-, mittellang- als auch langkettige Polyphosphate nachgewiesen werden. Ihre qualitative und quantitative Bestimmung erfolgte mit dem Fluoreszenzphotometer, wobei die kurzkettigen Polyphosphate

keine Wellenlängenverschiebung verursachten, während die mittellang und langkettigen eine Änderung der Wellenlänge hervorriefen. Die im kurzkettigen Bereich ausgebliebene Verschiebung geht wahrscheinlich auf die fehlende oder zu geringe Polyphosphatmenge zurück, so dass die charakteristische Wellenlängenverschiebung für Polyphosphate als konzentrationsabhängig anzusehen ist.

Eine Aussage über die exakte Kettenlänge der Polyphosphate erweist sich als schwierig, da bei der fluoreszenzphotometrischen Messung alle Polyphosphate im DAPI-Polyphosphat-Komplex eine Wellenlängenverschiebung im Bereich von 550 nm hervorrufen.

Des Weiteren wurden die einzelnen Fraktionen mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Dabei wurden die Banden der verschiedenen Fraktionen, mit Ausnahme von Fraktion 1, durch Anfärbung mit Toluidinblau sichtbar. Auch in der Veröffentlichung von Smith et al. (2007) wurden Polyphosphate mit Toluidinblau angefärbt. Die sichtbaren Banden erschienen dort nach Kettenlänge differenziert. Darüber hinaus wurden die Polyphosphate mit DAPI, p-phenylendiamin und EDTA pH 8,0 angefärbt.

Da einheitliche Standards fehlen, sind die verschiedenen Nachweisverfahren für Polyphosphat unzureichend. Nur bei gleichzeitiger Betrachtung der Ergebnisse aller Untersuchungsverfahren ist für den Prozessablauf eine gesicherte Aussage zu treffen.

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen standen am Markt für die Anwendung im Labormaßstab keine Polyphosphate im langkettigen Bereich zur Verfügung, so dass nur mit dem kurzkettigen Pentanatriumtriphosphat (N~3) und mittellangkettigen Natriumpolyphosphat (N~28) als Standard gearbeitet werden konnte.

4.1.2 Nachweismethoden für Polyhydroxybuttersäure

Die unter 3.1.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Nachweisverfahren für Polyhydroxybuttersäure als zufriedenstellend und anwendbar einzustufen sind, zumal geeignete Standardsubstanzen existierten. Durch Variation verschiedener Parameter konnte im Labormaßstab ein optimiertes Verfahren etabliert werden, das stufenweise entwickelt wurde, und daher bereits unter 3.1.2.2 ausführlich beschrieben ist.

In der Literatur werden für die Polyhydroxybuttersäure-Isolierung auch andere Methoden angewendet. Nach Heinrich et al. (2012) wird die Biomasse mit 10 % iger Natriumhypochlorit-Lösung versetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wird Wasser zugegeben und es soll eine Phasentrennung erfolgen.

Beim Extraktionsverfahren nach Choi et al. (1999) wird die Biomasse mit 0,2 N Natronlauge versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend ist für 20 Minuten zu zentrifugieren (2500 x g) und der Überstand abzunehmen. Nach Lufttrocknung soll die Polyhydroxybuttersäure als weißer Feststoff vorliegen.

Für diese Extraktion können Lösungsmittel, wie Chloroform und Dichlorethan, verwendet werden. Wegen der hohen Viskosität der Polyhydroxyalkanoate ist eine große Lösungsmittelmenge erforderlich, was diese Gewinnungsmethode unwirtschaftlich macht. Wird Natriumhypochlorit als Lösungsmittel eingesetzt, wird der Polyhydroxyalkanoat-Abbau beschleunigt und es kann eine Polymerreinheit von mehr als 95 % erreicht werden (Panchal et al., 2013).

Die gaschromatographisch und enzymatisch ermittelten Werte wiesen eine ähnliche Größenordnung auf, wobei zu beachten ist, dass der Enzymtest nur die (R)-3-Hydroxybuttersäure erfasst. Unter der Prämisse, dass R- und L- drehende 3-Hydroxybuttersäuren im gleichen Verhältnis vorliegen, wurden die ermittelten Werte beim Enzymtest mit zwei multipliziert.

Für eine große Anzahl von Routineuntersuchungen im Labormaßstab wäre die gaschromatographische der enzymatischen Bestimmung wegen der hohen Enzymkosten vorzuziehen.

4.2 Diskussionen zur Phosphateliminierung und Speicherung von Polyphosphat in Mikroorganismen

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Phosphatfestlegung durch Aktivitäten von Mikroorganismen in der Klärschlamm-biozönose hervorgerufen wird. Dabei spielt die alternierende Belüftung mit Sauerstoff und Stickstoff eine zentrale Rolle, wobei aerob Phosphat festgelegt wird, im anaeroben Bereich hingegen Phosphat freigesetzt wird. Dieses Prinzip wurde mehrfach in der Literatur beschrieben (Czitrich, 2005, Baumann, 2003).

Die intrazellulär gespeicherten Polyphosphat-Granula stellen nicht nur einen Phosphat- sondern auch einen Energiespeicher dar. Falls Elektronenakzeptoren, wie Sauerstoff und Nitrat zur Energielieferung nicht vorhanden sind, kann der Polyphosphatspeicher genutzt werden, um den Energiemangel zeitweise auszugleichen (Grohmann et al., 2011).

Die Phosphataufnahme bei *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) erfolgte in der aeroben Wachstumsphase und stagnierte nach dem Verbrauch der Kohlenstoffquelle. Es kam nach dem vollständigen Verbrauch der Kohlenstoffquelle zu einer Phosphorrücklösung, die mit einer partiellen Zellyse einherging. Die Phosphorrücklösung deutet auf eine intrazelluläre Polyphosphatspeicherung hin. In Anlehnung an die Veröffentlichung von K.-H. Riemay und R. Tröger (1978) kann eine Pilzkultur in Abhängigkeit von Umweltfaktoren (z.B. Nährstoffangebot, Temperatur) ein Wachstumsmaximum erreichen. Wachstum und Abbau halten sich hier die Waage. Nährstoffe sind weitgehend aufgebraucht und Stoffwechselprodukte beeinflussen das Wachstum negativ. Setzt sich in der Pilzkultur der Abbau durch, liegt eine Autolyse vor. Zu unterscheiden ist zwischen natürlicher, das heißt alterungsbedingter, und induzierter Autolyse, die durch Indikatoren wie Sauerstoff- und Glucosemangel oder Säuren und Toluol hervorgerufen werden kann. Bei der Pilzzelle setzt die Enzymregulation aus, die Zellstruktur wird zerstört und die Inhaltsstoffe der Zelle werden freigesetzt. Es handelt sich bei der Autolyse so um einen mortalen bzw. postmortalen Prozess.

Eine höhere Phosphorkonzentration im Medium führte nachweislich nicht zu einer höheren Phosphoraufnahme in der Biomasse. Bei höheren Phosphorkonzentrationen im Medium könnten allerdings Adsorptionseffekte und Fällungsreaktionen beim Filtrieren der wässrigen Proben zu einer Verfälschung der Messwerte führen, die sich in der Bilanzierung niederschlagen. Durch Waschen mit bidest. Wasser konnte der an der Biomassenoberfläche adsorbierte Phosphor entfernt werden. Im Waschwasser der Pilzkulturen konnte neben Phosphor auch Calcium, Kalium und Magnesium nachgewiesen werden.

In Tabelle 42 ist die mikrobielle C/N/P-Bilanz des optimal eingestellten Substratverbrauchs bei Klärschlamm-biozönose und *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) dargestellt. Beide Mikroorganismen konnten unter optimalen Wachstumsbedingungen Phosphat vorwiegend als Polyphosphat in der Zelle speichern. Bei der Klärschlamm-biozönose betrug die Massenbilanz 58 mmol Kohlenstoff, 17 mmol Stickstoff und 0,7 mmol Phosphor. Dies entspricht einem C/N/P-Verhältnis von 100/30/1. Hingegen wies *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) Werte von 260 mmol Kohlenstoff, 23 mmol Stickstoff und 10 mmol Phosphor auf. Dies entspricht einem C/N/P-Verhältnis von 100/9/4.

Bei der aeroben Abwasserbehandlung in der Kläranlage sollte das C/N/P-Verhältnis zwischen 100/10/1 und 100/5/1 liegen (Winkler, 2012).

Neben der intrazellulären Speicherung als Polyphosphat fiel Phosphat in Form von Salzen, wie beispielsweise Magnesium-Ammonium-Phosphat (Struvit), aus. Die relativ hohen Stickstoffwerte in der Bilanz der Klärschlamm-biozönose sind teilweise auf diese Ausfällung

zurückzuführen. Begünstigt wird die Ausfällung durch einen alkalischen pH-Wert, der bei der Verwendung von Acetat als Substrat gegeben ist.

Die Ausfällung wird zur Phosphorrückgewinnung aus Schlämmen in Kläranlagen genutzt (Weideler et al., 2008).

Tabelle 42: Substratverwertung im Medium von Acetat/ Glucose, Ammonium und Phosphat bei Klärschlamm-biozönose und *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908).

Klärschlamm-biozönose <i>Cunninghamella elegans</i>	0 h [mg/L]	96 h [mg/L]	Reduktion [mg/L]	C/N/P [mmol]	C/N/P Verhältnis	
Acetat / Glucose (C)	1.720 9.400	18 1.600	1.702 7.800	(58) (260)	(100) (100)	60 mg Phosphat / 3000 mg/L Trockenmasse (TG) (2 % Phosphat / TG) 783 mg Phosphat / 9.000 mg/L Trockenmasse (TG) (9 % Phosphat / TG))
Ammonium (N)	318 1.640	6 1.220	312 420	(17) (23)	(30) (9)	
Phosphat (P)	98 2.020	30 1.110	68 910	(0,7) (10)	(1) (4)	



Abbildung 109: Aussehen der Versuchsansätze von Klärschlamm-biozönose (links) und *Cunninghamella elegans*-Stamm 1908 (rechts) nach 4 Tagen.

Beim Vergleich von Klärschlamm-biozönose mit *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) sind wesentliche Unterschiede festzustellen.

Die mit Polyphosphat angereicherte *Cunninghamella elegans*-Biomasse lässt sich durch Filtration bzw. Sedimentation relativ einfach separieren (siehe Abbildung 109 und im Anhang Abbildungen 124-127). Hingegen ist die Klärschlamm-biozönose-Biomasse nur durch zentrifugieren abzutrennen. Bei der Klärschlamm-biozönose können für die Phosphateliminierung im Medium maximal 100 mg/L Phosphat in bis zu 35 Tagen eingesetzt werden, um die größtmögliche Menge an gebildetem Polyphosphat in der Zelle zu speichern. Hingegen liegt die maximal eingesetzte Ausgangskonzentration im Medium bei *Cunninghamella elegans* bei ca. 1000 mg/L Phosphat in 5 Tagen. Die zehnmal höhere Phosphateliminierung im Medium geht mit einer entsprechend höheren Biomasse-Bildung einher.

Der 2,3 fach höhere Biomasse-Ertrag bei *Cunninghamella elegans* stellt sich bereits nach 4 Tagen Wachstum ein (7000 mg/L Trockengewicht, während bei Klärschlamm-biozönose 3000 mg/L in 35 Tagen erreicht werden). *Cunninghamella elegans* ist in der Lage, zwischen 5 und 10 % Phosphat in der Biomasse (Trockengewicht) festzulegen, während die Klärschlamm-biozönose 1 bis 3 % Phosphat in der Trockenmasse fixiert.

Die Polyphosphatfixierung erfolgte bei *Cunninghamella elegans* sowohl intra- wie extrazellulär, während bei der Klärschlammbiozönose darüber hinaus auch eine chemische Ausfällung (Struvit-Fällung) zu beobachten ist. Diese ist bei Verwendung von Acetat als Substrat auf den alkalischen pH-Wert im Medium zurückzuführen.

Beim Vergleich der Anzuchtbedingungen von *Cunninghamella elegans* und Klärschlamm-biozönose erweisen sich sowohl die Kultivierung als auch die Phosphateliminierung im Untersuchungszeitraum bei *Cunninghamella elegans* als unproblematisch. Hingegen ist der Einsatz der Klärschlammbiozönose arbeitsintensiver (alternierende Begasung, Zugabe von Acetat, Fällungsprodukte, Biomassenabtrennung).

Für eine erhöhte Biomassenbildung und Phosphataufnahme ist der Zusatz von Hefeextrakt (2-6 g/L) zum Medium bei *Cunninghamella elegans* zwingend. Dies führt aber zu erhöhten Anzuchtkosten. Bezogen auf die eingesetzten Chemikalien im synthetischen Medium ist der Einsatz von Klärschlammbiozönose preiswert. Ob dieses Medium als Minimal- oder Reaktionsmedium (vereinfachtes Medium ohne Vitamine und Spurenelemente) eingesetzt wird, hat keinen gravierenden Einfluss auf die Phosphateliminierung.

Als Problem erwies sich die Kultivierung von *Cunninghamella elegans* bei Belüftung mit technischer Luft, da sich die Druckluftzufuhr im Ansatz während des Untersuchungszeitraums veränderte. Die Zufuhr wurde unregelmäßig bzw. entfiel ganz aufgrund des Pilzwachstums an den Schlauchenden. Dadurch war die Form der Biomasse unterschiedlich ausgeprägt, da keine gleichmäßige Bewegung wie bei den Ansätzen im Schüttelschrank gegeben war.

Bisher wird der Polyphosphatstoffwechsel in Kläranlagen unter dem Aspekt der biologischen Phosphatentfernung aus Abwasser genutzt, dem Polyphosphat selbst und seinem breiten Anwendungsspektrum wird dabei kaum Aufmerksamkeit zuteil. Dies ist vor allem dadurch bedingt, dass Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Polyphosphat aus der Zelle unzulänglich sind und noch großer Forschungsbedarf besteht. Dennoch erscheint es durchaus sinnvoll, zukünftig auch mikrobiell gebildete Polyphosphate zu nutzen.

Für die Gewinnung mikrobiell gebildeter Polyphosphate schlägt Kuroda et al. (2002) die Erhitzung der Biomasse auf 70°C vor, wobei die Polyphosphatketten in Lösung gehen. Sie können dann mittels Calciumsalzen ausgefällt werden.

Neben der Phosphatrückgewinnung aus kommunalem Abwasser stellt die Rückgewinnung aus anfallenden Industrieabwässern eine Alternative dar. In diesem Fall ist der Einsatz von *Cunninghamella elegans* sinnvoller, da größere Phosphatmengen in kürzerer Zeit entfernt und festgelegt werden können.

Studien zur wirtschaftlichen Machbarkeit der Prozesse zur Phosphorrückgewinnung (Molinos-Senante et al., 2011) zeigen wesentliche Probleme auf. Erfahrungen im industriellen Maßstab fehlen weitgehend und die Kosten für zurückgewonnenes Phosphat sind noch wesentlich höher als die Kosten für abgebautes Rohphosphat, was durch aufwendige Verfahrenskosten bedingt ist.

Die Weltmarktpreise für Rohphosphat liegen zwischen 70 und 90 Euro pro Tonne (Rohstoffbörsenpreise 2014).

4.3 Diskussion zur Speicherung und Gewinnung von Polyhydroxybuttersäure in den Bakterien *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*

Das Problem der Schaumbildung bei starker Belüftung wurde mittels Schaumableitung bzw. durch Zugabe des Antischaummittels Silikonöl behoben, da Schaumbildung sich negativ auf die Polyhydroxybuttersäurebildung auswirkt (Scherzer, 2008). Der durch die Belüftung induzierte Volumenverlust von ca. 100 mL wurde täglich ausgeglichen.

Das Ziel einer maximal möglichen Polyhydroxybuttersäure- und gleichzeitig einer größtmöglichen Biomassebildung konnte unter den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank und Belüftung mit technischer Luft und Sauerstoff nicht erreicht werden. Dabei ist zu beachten, dass die Ergebnisse der der Arbeit zugrundeliegenden Versuche nicht direkt vergleichbar sind, da einzelne Parameter während der Kultivierung differierten.

Zur Beurteilung der Untersuchungsergebnisse wurde die Kohlenstoffbilanz im Medium und in der Biomasse ermittelt. Es wurde teilweise ein höherer Kohlenstoffverbrauch im Medium bilanziert als in der Biomasse gebildet wurde.

Ein ca. 2,5 fach höherer Kohlenstoffverbrauch als bei geringeren Versuchszeiten und den alternativen Kulturbedingungen wurde bei der Inkubation im Schüttelschrank im Medium nach Steinbüchel und einer Versuchsdauer von 119 Stunden ermittelt. Dies ist wahrscheinlich auf die Kohlenstoffveratmung durch die Bakterien zurückzuführen.

Die höchste Ausbeute an 3-Hydroxybuttersäure bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* betrug 50 % des Trockengewichts.

Laut Literaturangabe sind bis zu 90 % Polyhydroxybuttersäurebildung der Biomasse möglich. Die als Makromoleküle in der Bakterienzelle gebildeten Polyhydroxyalkanoate stehen den Mikroorganismen als Nährstoffquelle zur Verfügung, wenn andere Quellen, wie Kohlenstoff, erschöpft sind und das Wachstum der Population nicht stattfinden kann. Somit ermöglicht die intrazelluläre Speicherung von Polyhydroxyalkanoaten das Überleben der Bakterien bei ungünstigen Umweltbedingungen (Castro-Sowinski et al., 2010).

Für eine Evaluation der Effizienz der Polyhydroxybuttersäureproduktion wurde die mikrobiell gebildete Kohlenstoffmenge dem Verbrauch an Kohlenstoff als Substrat in den entsprechenden Ansätzen gegenübergestellt. In den Abbildungen 110 und 111 sind die Ertragskoeffizienten für *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* bei unterschiedlichen Kulturbedingungen und Versuchszeiten dargestellt. Ermittelt wurden diese Koeffizienten als Verhältnis des gebildeten Kohlenstoffs in der Zellmasse und der verbrauchten Masse an limitiertem Kohlenstoffsubstrat, jeweils angegeben in mmol (Dellweg, 1994).

Der Kohlenstoffgehalt in der Trockenmasse setzt sich aus der Summe von Kohlenstoff im Protein und in der Polyhydroxybuttersäure zusammen. Der Idealfall, dass die Menge des verbrauchten Substrats der gebildeten Trockenmasse entspricht, konnte bei *Paracoccus denitrificans* unter Zufuhr von Sauerstoff bei einer Versuchszeit von 71,8 Stunden erreicht werden, wobei die 3-Hydroxybuttersäure neben dem Protein nur ein Fünftel ausmacht. Bei *Cupriavidus necator* wurde beim Rühransatz und einer Versuchsdauer von 70,8 Stunden ein vergleichbares Ergebnis erzielt.

Beim Ansatz im Schüttelschrank wurde bei einer Versuchszeit von 23,5 Stunden bei *Cupriavidus necator* ein Ertragskoeffizient von 2 erreicht, wobei jedoch mit Vorkultur gearbeitet wurde.

Paracoccus denitrificans

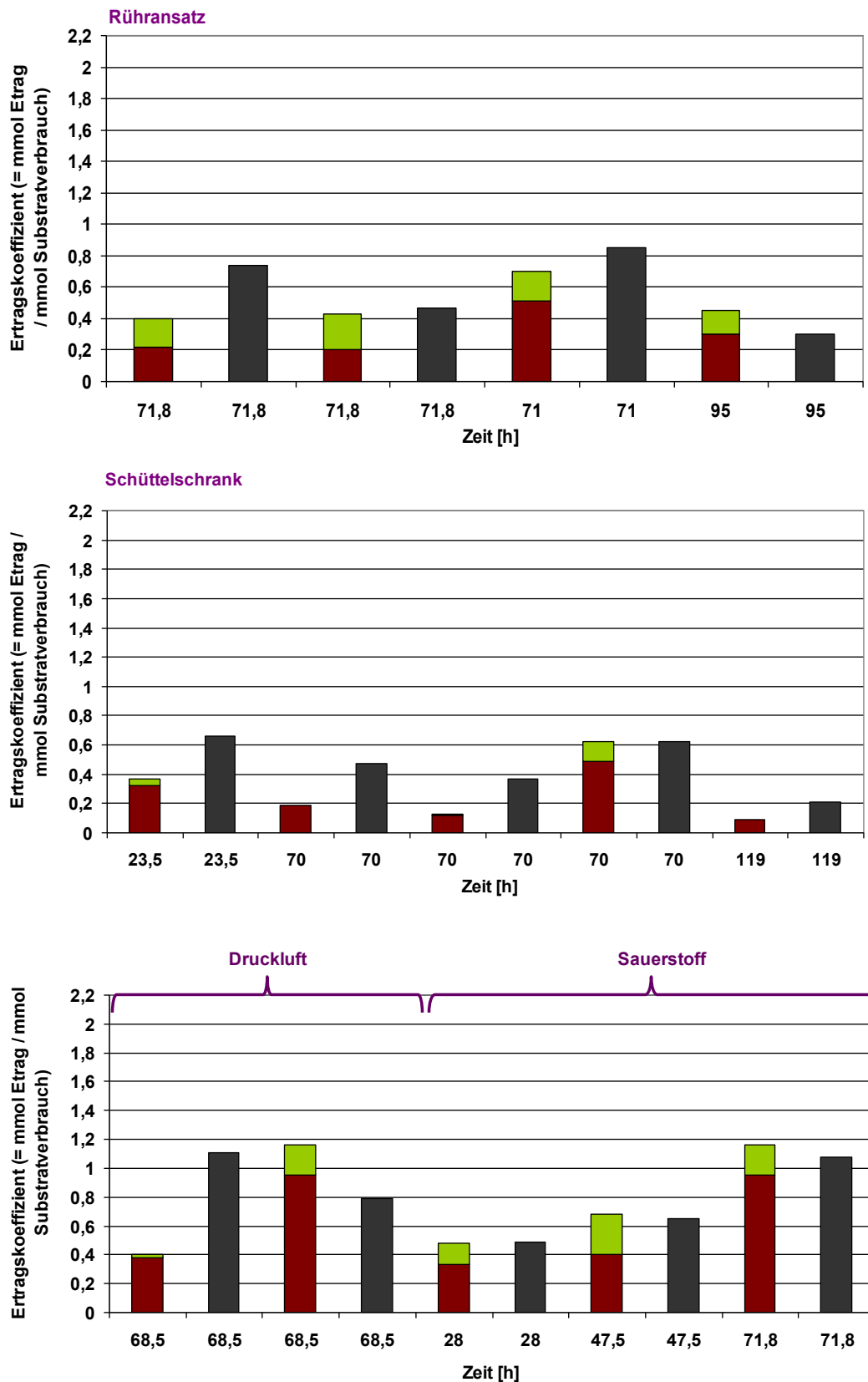


Abbildung 110: Ertragskoeffizient aus mmol Kohlenstoff Ertrag zu mmol Kohlenstoff Substratverbrauch.
Kohlenstoff (Protein, Polyhydroxybuttersäure, Trockenmasse).

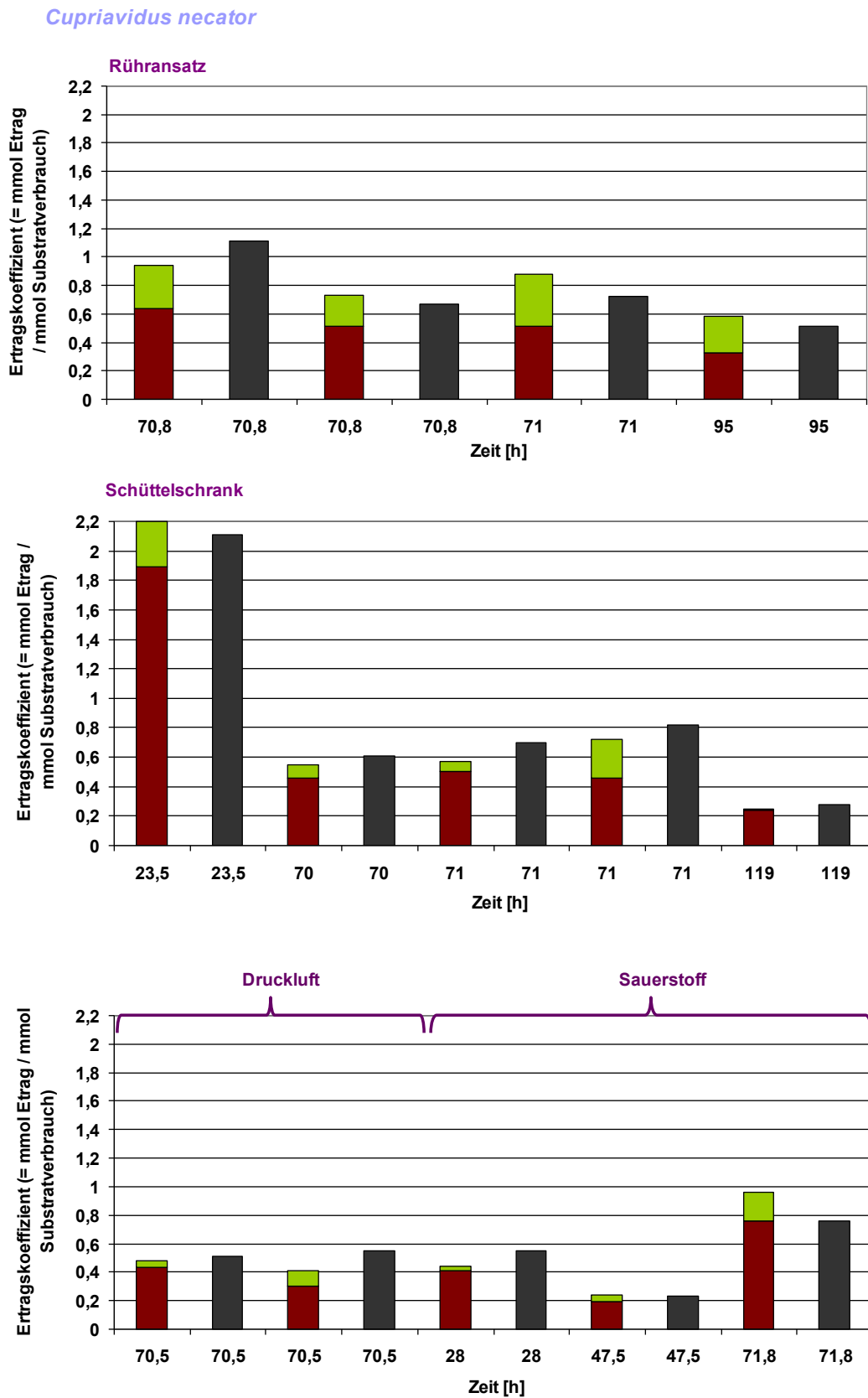


Abbildung 111: Ertragskoeffizient aus mmol Kohlenstoff Ertrag zu mmol Kohlenstoff Substratverbrauch.
Kohlenstoff (Protein, Polyhydroxybuttersäure, Trockenmasse).

Trotz teilweise günstiger Kohlenstoffbilanzierung konnte das eigentliche Ziel, möglichst viel 3-Hydroxybuttersäure zu bilden, nicht befriedigend erreicht werden. Hinsichtlich der eingesetzten Substrate im synthetischen Medium müssen auch deren Kosten berücksichtigt werden.

Nach Urtuvia et al. 2014 bewegen sich die Herstellungskosten bei industrieller Produktion von Polyhydroxyalkanoaten mit Glucose oder Zucker als Substraten in einer Spanne von 1,50 bis 5,00 Euro je Kilogramm, während der Produktpreis für Polypropylen zwischen 0,20 und 0,40 Euro je Kilogramm liegt. Dabei bestimmen die Rohmaterialkosten, insbesondere die Kohlenstoffquelle, zu 50 Prozent den Produktpreis. Die Produktionsmenge von Polyhydroxyalkanoaten beträgt zwischen 1.000 und 20.000 Tonnen pro Jahr, während 300.000 Tonnen Polypropylen pro Jahr hergestellt werden. Weltweit produzieren Unternehmen zurzeit Polyhydroxyalkanoate in relativ kleinem Maßstab, beispielsweise P&G in den USA, Biomer in Deutschland, Tianan Biologic in China und PHB Industrial in Brasilien. Zur Senkung der Produktionskosten wird von Polyhydroxyalkanoaten wird von den Autoren der Einsatz von Xylose, einem Holzzucker, als Substrat vorgeschlagen, da dieses Substrat in den Wäldern des amerikanischen Kontinents in großen Mengen zu gewinnen ist.

Weitere Studien enthalten Alternativvorschläge für kostengünstige Kohlenstoffquellen. Nach Bhuwal et al. (2013) wird Abwasser aus der Papier- und Pappeindustrie bei der Polyhydroxyalkanoat-Produktion als Kohlenstoffquelle eingesetzt.

Nach Pittmann et al. (2013) könnten Kläranlagen Bioplastik aus Primärschlamm produzieren, wobei ein wirtschaftliches Verfahren noch zu entwickeln sei.

Unter dem Nachhaltigkeitsaspekt schlagen Gasser et al (2014) den Einsatz von Weizenstroh als kostengünstiges Substrat für die Polyhydroxyalkanoat-Produktion vor.

Im Gegensatz zu den biotechnologischen Verfahren, bei denen Produkte wie Antibiotika und technische Enzyme extrazellulär synthetisiert werden, ist bei den intrazellulär gebildeten Polyhydroxyalkanoaten ein weiterer Verfahrensschritt zu deren Freisetzung aus der Zelle notwendig. Dieser zusätzliche Arbeitsschritt bei der Polymer-Herstellung im industriellen Maßstab schlägt sich in den Produktionskosten nieder. Voraussetzung für die wirtschaftliche Polyhydroxyalkanoat-Produktion ist eine hohe Zelldichte. Die Gewinnung der Polyhydroxyalkanoate aus der Biomasse kann mittels chemischer, enzymatischer und mechanischer Zellaufschlussmethoden erfolgen. Als traditionelle Methoden der Polyhydroxyalkanoat-Rückgewinnung gelten die Lösungsmittlextraktionen mit Chloroform und die Behandlung mit Natriumhypochlorit. Wird Natriumhypochlorit angewendet, kann die vorliegende Biomasse ungetrocknet eingesetzt werden, während ansonsten die Trocknung den Prozess effektiver macht, was aber zusätzlich Zeit und Energie kostet. Im abschließenden Verfahrensschritt müssen die Polymere von Verunreinigungen getrennt und gereinigt werden (Madkour et al., 2013).

In der Praxis wird weltweit an Pilotprojekten für die großtechnische Herstellung von Poly-3-Hydroxybuttersäure gearbeitet. Exemplarisch seien Firmen in China genannt, die Fermentationsprozesse zur Herstellung von Poly-3-Hydroxybuttersäure entwickelt haben und dabei vorwiegend *Cupriavidus necator* einsetzen (Takors et al., 2013).

Allerdings ist die Herstellung mikrobiell gebildeter Polyhydroxyalkanoate im Vergleich zu erdölbasiertem Plastik aufgrund der hohen Kosten und geringen Polymerausbeuten im industriellen Maßstab noch begrenzt. Es müssen deshalb Anstrengungen unternommen werden, um kostengünstige Substratquellen, verbesserte Kultivierungsbedingungen und die

Rückgewinnung möglichst reiner Polymere zu erreichen. So könnten die Produktionskosten gesenkt werden und die Polyhydroxyalkanoate schließlich wirtschaftlich zu den traditionellen Kunststoffen aufschließen (Panchal et al., 2013, Choi et al., 1999).

Die angewendeten Technologien sollten beispielsweise ein hohes Zelldichtewachstum in kurzer Zeit, die kontrollierbare Lyse von Polyhydroxyalkanoat-Speicherzellen und Polyhydroxyalkanoat-Granula für eine leichte Abtrennung ermöglichen (Chen, 2010).

5. Zusammenfassung und Fazit

Es wurden Versuchsreihen zur mikrobiellen Speicherung von Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure durchgeführt und im Labormaßstab untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt darauf, optimale Kultivierungsbedingungen für die Mikroorganismen zu schaffen, um eine möglichst große Biomassebildung zu erzielen. Die untersuchten Mikroorganismen wurden für jeden Speicherstoff individuell ausgewählt. Angestrebt waren Ausbeuten – wenn möglich – im Grammbereich. Darüber hinaus sollte die Bildung der Speicherstoffe angeregt werden, um in einem vertretbaren Zeitraum bei unterschiedlichem Akklimatisierungsverhalten der verschiedenen Mikroorganismen eine möglichst hohe Festlegung in der Biomasse zu erreichen. Des Weiteren sollten die gebildeten Speicherstoffe nachgewiesen werden. Dazu wurden bestehende Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Speicherstoffe optimiert bzw. weiterentwickelt.

Der Speicherstoff Polyphosphat konnte mittels Mikroskopie, Fluoreszenzphotometrie und Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Polyphosphate erfolgte nach Extraktion und durch Messung als Ortho-Phosphat. Allerdings bestehen bei den Nachweisverfahren methodische Schwierigkeiten bezüglich der Bestimmung der einzelnen Kettenlängen der Polyphosphate und deren Quantifizierung bedingt durch das Fehlen einheitlicher Standards. Die Ergebnisse sind deshalb kritisch zu betrachten und eine weitere Optimierung der Nachweisverfahren ist anzustreben. Dennoch ist bei simultaner Betrachtung der Ergebnisse des Prozessablaufs aller angewendeten Nachweisverfahren eine Übereinstimmung festzustellen, so dass die verschiedenen Methoden in der Kombination als zielführend angesehen werden können.

Es konnte Polyhydroxybuttersäure aus dem Zellinneren der Bakterien isoliert und quantitativ als 3-Hydroxybuttersäure nachgewiesen werden. Der qualitative und quantitative Nachweis erfolgte mikroskopisch, enzymatisch und mittels Gaschromatographie. Die Nachweisverfahren für Polyhydroxybuttersäure brachten zufriedenstellende Ergebnisse, da geeignete Standardsubstanzen vorlagen.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag darauf, möglichst viel Phosphat in Form von Polyphosphat festzulegen und die Kettenlängen zu analysieren. Die Mehrzahl der gebildeten Polyphosphate lag im mittel- und langkettigen Bereich. Die in der Arbeit genannten Ergebnisse wurden bei Verwendung synthetischer Medien im Labormaßstab ermittelt, wobei die Prozessoptimierung der intrazellulären Speicherstoffbildung und die Optimierung der Nachweisverfahren durch Eliminierung möglicher Störfaktoren im Vordergrund standen.

Das Prinzip der mikrobiellen Phosphatelimination wird in Kläranlagen bereits angewendet, wobei die Phosphorbelastung der Abwässer in den letzten Jahren durch verschiedene Maßnahmen, wie Einsatz phosphatfreier Waschmittel, zurückgegangen ist und so der Einsatz der untersuchten Mikroorganismen in anbetracht der in der Arbeit ermittelten maximalen Phosphataufnahmekapazität durchaus geeignet ist.

In den Versuchsansätzen wurden die maximal mögliche Phosphataufnahmemenge aus dem Medium sowie die maximale Polyphosphatkonzentration in den Zellen der Mikroorganismen ermittelt. Wesentlich war dabei die Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorbilanzierung im Medium. Untersucht wurde die mikrobielle Bildung von Polyphosphaten durch Mischkulturen aus Klärschlamm und alternativ durch den Pilz *Cunninghamella elegans*. Dabei wurde der

Einfluss unterschiedlicher Bedingungen wie aerob bzw. anaerob, Substrateinsatz und pH-Wert auf das Bakterien- und Pilzwachstum untersucht.

Bei der Klärschlammbiozönose kam es, bedingt durch den pH-Wert, im Untersuchungszeitraum zu einer Populationsverschiebung. Bei einem pH-Wert im alkalischen Bereich waren Bakterien, bei einem sauren pH-Wert hingegen Hefen mikroskopisch nachzuweisen. Zudem kam es bei alkalischem pH-Wert neben der intrazellulären Phosphatspeicherung zu einer Phosphatausfällung (Struvit). Der Versuch, einen konstanten pH-Wert im neutralen Bereich während des Versuchszeitraums zu erreichen, schlug fehl.

Die mikrobielle Phosphatfestlegung erfolgte beim Wachstum der Mischkultur und unter aeroben Bedingungen, während das Wachstum in anaeroben Phasen stagnierte und Phosphat rückgelöst wurde. Die Substrate Acetat und Glucose wurden ohne Lag-Phase sofort verstoffwechselt. Für die Phosphateliminierung im Medium konnte maximal 100 mg/L Phosphat eingesetzt werden, um die größtmögliche Menge an gebildetem Polyphosphat in der Zelle zu erreichen. Dabei wurden relativ lange Versuchszeiten (bis zu 35 Tagen) bis zur vollständigen Phosphateliminierung im Medium benötigt. Die Klärschlammbiozönose war in der Lage, maximal 3 % Phosphat in der Biomasse (Trockengewicht) zu fixieren.

Die Phosphataufnahme von *Cunninghamella elegans* fand ebenfalls in der aeroben Wachstumsphase statt. Nach vollständigem Verbrauch des Substrats Glucose kam es zu einer Phosphatrücklösung, die von einer partiellen Zelllyse begleitet wurde. Die Phosphatelimination im Medium konnte durch den Pilz *Cunninghamella elegans* gesteigert werden. Für die Phosphateliminierung im Medium konnte maximal 1000 mg/L Phosphat eingesetzt werden, um die größtmögliche Menge an gebildetem Polyphosphat in der Zelle zu erreichen. Aufgrund des schnellen Wachstums von *Cunninghamella elegans* konnten die Versuchszeiten auf 5 Tage verkürzt werden. *Cunninghamella elegans* war in der Lage maximal 10 % Phosphat in der Biomasse (Trockengewicht) festzulegen. Neben der höheren Phosphatfestlegung war auch ein 2,3-mal größerer Biomasseertrag zu verzeichnen. Aufgrund der kugelförmigen Ausprägungsform der Pilzkolonien konnte die Biomasse durch Filtration leicht vom Medium getrennt werden.

Eine mögliche Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf großtechnische Maßstäbe sollte nun untersucht werden. Erforderlich ist eine Kosten-Nutzen-Analyse. Dabei spielen die eingesetzten Bestandteile des Mediums eine entscheidende Rolle. Vor allem bei der Anzucht des Pilzes *Cunninghamella elegans* führt der Einsatz von Hefeextrakt zu erhöhten Anzuchtkosten. Deshalb ist die Möglichkeit des Einsatzes von Abfallstoffen aus der Industrie zu prüfen. Als erster Schritt in diese Richtung wurden in der Arbeit alternative Phosphatquellen aus der Praxis untersucht. Das aus den Prozesswässern der Firma Budenheim freiverfügbare Ortho-Phosphat konnte mittels Klärschlammbiozönose vollständig entfernt und intrazellulär als Polyphosphat festgelegt werden. Um die Eignung vorliegender Prozesswässer zu prüfen, sind jedoch umfangreiche Untersuchungen notwendig. Zudem müssen die Nachweisverfahren für Polyphosphate weiterentwickelt werden.

Langfristig kommt der Phosphatrückgewinnung, nicht nur wegen begrenzter Phosphorvorkommen weltweit, zunehmende Bedeutung zu. Das Anwachsen der Weltbevölkerung führt zu einem zunehmenden Nahrungsmittelbedarf. Hinzu kommt die steigende Nachfrage nach Rohstoffen seitens der Schwellenländer. Auch aktuelle politische Entwicklungen, wie die Unruhen in Nordafrika, einem wichtigen Abbaug Gebiet für Rohphosphate, können zu einer Verknappung dieses Rohstoffs führen.

Die mikrobielle Bildung von Polyhydroxybuttersäure wurde durch die Bakterien *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator* untersucht. Dabei wurde der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen, wie Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Belüftung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie der Einsatz unterschiedlicher Substrate (Glycerin, Glucose, Acetat) auf die Biomasse- und Polyhydroxybuttersäurebildung der Bakterien untersucht.

Trotz unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen konnten ein hoher Ertrag an Biomasse und ein ebenso hoher 3-Hydroxybuttersäureertrag nicht gleichzeitig erreicht werden. Eine Optimierung der Verfahren ist deshalb notwendig.

Die Bakterienanreicherung führte zu einem hohen Substratverbrauch an Kohlenstoff im Medium. Er war wesentlich höher als der Kohlenstoffgehalt in der Biomasse. Der Schwerpunkt der Arbeit lag darauf, möglichst viel Kohlenstoff als Protein und Polyhydroxybuttersäure festzulegen.

Wird die erstellte Bilanzierung der Biomasse der Bakterien analysiert, zeigt sich, dass die Summe aus Kohlenstoff im Protein und in der Polyhydroxybuttersäure den Kohlenstoffgehalt in der Trockenmasse ergibt.

Die höchste Polyhydroxybuttersäureausbeute, die in den Versuchsreihen erreicht wurde, betrug ungefähr die Hälfte des Trockengewichts.

Die industrielle Produktion von 3-Hydroxybuttersäure wird seit Jahren von Konzernen in diversen Ländern weltweit betrieben. Allerdings sind die Produktionskapazitäten aus wirtschaftlichen Gründen beschränkt. Die auf unterschiedlichem Weg produzierten Mengen sind deshalb überschaubar und nicht ausreichend, um erdölbasierte Kunststoffe zu ersetzen.

Zurzeit besteht nach einem Bericht der Stuttgarter Zeitung vom 31.10.2014 ein großes Problem mit Mikroplastik im Abwasser. Das Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung stellt fest, dass Kläranlagen mit Mikroplastik (Teilchen von weniger als fünf Millimetern Größe) überfordert sind. Diese Partikel stammen aus Kosmetika mit Peeling-Effekt oder sind Teile von Plastikgegenständen. Mikroplastik kann Schadstoffe an sich binden und in die Nahrungskette gelangen. Allerdings kann eine teure Schlussfiltration nach Meinung des Instituts das Problem weitgehend lösen. Da von zwölf untersuchten Kläranlagen nur eine über diese Filtration verfügte, besteht seitens der Kläranlagen Handlungsbedarf. Langfristig könnte der vermehrte Einsatz von mikrobiell produzierter Polyhydroxybuttersäure auch in diesem Bereich sinnvoll sein und Investitionskosten sparen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die mikrobiell gebildeten Speicherstoffe Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure aus Umweltschutzgründen und angesichts der begrenzten Rohstoffvorkommen (Rohphosphat, Erdöl) an Bedeutung gewinnen werden, woraus jedoch ein erhöhter Forschungsbedarf im großtechnischen Maßstab erwächst.

Um eine wirtschaftliche Einsatzmöglichkeit der Speicherstoffe zu erreichen, sind eine hohe Zelldichte an Mikroorganismen und damit eine hohe Ausbeute unumgänglich.

Trotz der Fortschritte in der Speicherstoffforschung ist die Isolierung und Quantifizierung der gebildeten Speicherstoffe aus den Mikroorganismen noch schwierig, da sich bei Extrahierung und Reinigung Verluste und Strukturveränderungen ergeben können.

Die Bildung und Gewinnung der mikrobiellen Speicherstoffe Polyphosphat und Polyhydroxybuttersäure ist zurzeit noch nicht wirtschaftlich und nur bedingt technisch realisierbar.

6. Literatur

Anderson, A.J., Dawes, E.A., Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Microbiological Reviews*, (1990), p. 450 - 472.

Aprèa, Giuseppe, Evaluation of the causes implicated in fermentation delay and complete fermentation failure during the manufacture of "Mozzarella di Bufala", *Università degli studi di Napoli "Federico II"*, (2006), p. 42 - 49.

Aschar-Sobbi, R., Abramov A. Y., Diao, C., Kargacin, M. E., Kargacin, G. J., French, R. J. and Pavlov, E., High Sensitivity, Quantitative Measurements of Polyphosphate Using a new DAPI-Based Approach, *J Fluoresc* (2008) 18: p. 859-866.

Bark, K.: Enzyme des Polyphosphatstoffwechsels unterschiedlicher Bakterien im Zusammenhang mit der biologischen Phosphatelimination aus Abwasser. Veröffentlichungen aus dem Fachgebiet Hygiene der Technischen Universität Berlin und dem Institut für Hygiene der Freien Universität Berlin 16; Dott, W. und Rüden, H. (Hrsg.), ISBN 3-7983-1502-7, Berlin (1992). S. 1-18.

Baumann, P.: Phosphatelimination aus Abwasser, ISBN 3-486-26508-3, Oldenburg Industrieverlag GmbH, München (2003).

Bhuwal, A.K., Singh, G., Aggarwal, N.K., Goyal, V., Yadav, A., Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper and Cardboard Industry Wastes, Hindawi Publishing Corporation, *International Journal of Biomaterials*, ID 752821 (2013), p. 1 - 10.

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V., Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging, *Express Polymer Letters* Vol. 8, No. 11, (2014), p. 791 - 808.

Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Herausgeber: Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Phosphat: Mineralischer Rohstoff und unverzichtbarer Nährstoff für die Ernährungssicherheit weltweit, (2013), S. 3 - 8.

Castro-Sowinski, S., Burdman, S., Matan, O., Okon, Y., Natural Functions of Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Editor: Chen, Guo-Qiang, Series Editor: Steinbüchel Alexander, *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Microbiology Monographs, Volume 14, ISBN 978-3-642-03286-8, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010), p. 40 - 41, 52.

Chemische Fabrik Budenheim:

Internet: 16.03.2015

http://www.european-business-connect.de/Katalog/4-Industrie/3424-Hersteller_reiner_Phosphorsaeure_und_Phosphaten/5028-Chemische_Fabrik_Budenheim_KG/firmen_detail.html

Chemische Fabrik Budenheim:

Internet: 16.03.2015

<http://www.patent-de.com/20030410/DE10145093A1.html>

Chen, Guo-Qiang, Introduction of Bacterial Plastics PHA, PLA, PBS, PE, PTT, and PPP, Editor: Chen, Guo-Qiang, Series Editor: Steinbüchel Alexander, *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Microbiology Monographs, Volume 14, ISBN 978-3-642-03286-8, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010), p. 2 - 3, 11.

Chen, Guo-Qiang, *Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates*, Editor: Chen, Guo-Qiang, Series Editor: Steinbüchel Alexander, *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Microbiology Monographs, Volume 14, ISBN 978-3-642-03286-8, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010), p. 18.

Chen, Guo-Qiang, *Industrial Production of PHA*, Editor: Chen, Guo-Qiang, Series Editor: Steinbüchel Alexander, *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Microbiology Monographs, Volume 14, ISBN 978-3-642-03286-8, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010), p. 130 - 131.

Choi, Jong-il, Lee, Sang Yup, *Efficient and Economical Recovery of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Recombinant *Escherichia coli* by Simple Digestion with Chemicals*, John Wiley & Sons, Inc., (1999), p. 546 - 553.

Choi, Jong-il, Lee, Sang Yup, *Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation*, Appl Microbiol Biotechnol 51: p. 13 - 21, Springer-Verlag, (1999).

Clark, J.E., Beegen, H. and Wood, H.G, *Isolation of Intact Chains of Polyphosphate from "*Propionibacterium shermanii*" Grown on Glucose or Lactate*, Journal of Bacteriology, Vol. 168, No. 3, Dec. (1986), p. 1212 - 1219.

Cordell, D., White, S., *Peak Phosphorus: Clarifying the Key Issues of a Vigorous Debate about Long-Term Phosphorus Security*, Sustainability (2011), 3, p. 2027 - 2049.

Cordell, D., Schmid Neset, T.-S., Prior, T., *The phosphorus mass balance: identifying "hotspots" in the food system as a roadmap to phosphorus security*, Current Opinion in Biotechnology, (2012), 23, p. 839 - 845.

Czitrich, O.: *Grundlagen der biologischen Abwasserreinigung. Wissenschaftlicher Aufsatz*, Verlag für akademische Texte, ISBN 978-3-638-77729-2, GRIN Verlag (2005).

Desmidt, E., Ghyselbrecht, K., Zhang, Y., Pinoy, L., Van der Bruggen, B., Verstraete, W., Rabaey, K., Meesschaert, B., *Global Phosphorus Scarcity and Full-Scale P-Recovery Techniques: A Review*, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, Volume 45, Issue: 4, (2015), p. 336 - 384.

Dellweg, Hanswerner, *Biotechnologie verständlich*, ISBN 978-3-642-63403-1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, (1994), S. 179.

Diaz, Julia. M., Ingall, Ellery. D., *Fluorometric Quantification of Natural Inorganic Polyphosphate*, Environ. Sci. Technol. (2010), 44, p. 4665 - 4671.

Dott, W., Dossin, M., Schacht, P., *Bioleaching von Schwermetallen und selektive Biorückgewinnung von Phosphat aus Klärschlammasche*, Berliner Recycling- und Rohstoffkonferenz 29. und 30. Juni 2011: Recycling und Rohstoffe - Band 4, Karl J. Thomé-Kozmiensky, Daniel Goldmann. - Neuruppin: TK Verlag Karl Thomé-Kozmiensky, ISBN 978-3-935317-67-2, (2011), S. 385-391.

Dott, W., Dossin, M., Schacht, P., *Ressourcentechnologie, Nützliche Helferlein, Beim Bioleaching von Schwermetallen und der selektiven Rückgewinnung von Phosphat aus Klärschlammasche kommen Mikroben zum Einsatz*, ReSource, Fachzeitschrift für nachhaltiges Wirtschaften, 25. Jahrgang, ISSN 1868-9531, 3 / (2012), S. 40 - 44.

Dott, W., Dossin, M., Schacht, P., Simultaneous leaching of heavy metals and bioaccumulation of phosphorus from sludge combustion – A new way of resource reclaiming, Istanbul International Solid Waste, Water and Wastewater Congress Mai 2013, (2013), p. 97, ISBN: 978-605-6326-912

Elesbao do Nascimento Shari'a, A., Elesbao do Nascimento Shari'a, A., de Lima, M.A.B., de Campos-Takaki, G.M., de Souza, W., Polyphosphate in Zygomycetes: A Cytochemical Study, Brazilian Journal of Microbiology, 33, (2002), p. 119 - 126.

Fritsche, W.: Umweltmikrobiologie Grundlagen und Anwendungen, ISBN 3-437-35008-0, Gustav Fischer Verlag, Jena (1998). S. 144 - 148.

Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H., Extraction of extracellular polymers from activated sludge using acation exchange resin, Water Research 30 (8), (1996), p. 1749 - 1758.

Gasser, E., Ballmann, P., Dröge, S., Bohn, J., König, H., Microbial production of biopolymers from the renewable resource wheat straw, Journal of Applied Microbiology 117, (2014), p. 1035 - 1044.

Gaxiola, R. A., Edwards, M., Elser, J. J., A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops as part of a comprehensive strategy for sustainable agriculture, Chemosphere 84, (2011), p. 840 - 845.

Gottschalk, G, Welt der Bakterien: Die unsichtbaren Beherrscher unseres Planeten, ISBN 978-3-527-32520-7, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, (2012).

Grohmann, A. N., Jekel, M., Grohmann, A., Szewzyk, R. and Szewzyk, U., Wasser: Chemie, Mikrobiologie und nachhaltige Nutzung, ISBN 978-3-11-021308-9, Walter de Gruyter GmbH Berlin / New York, (2011), S. 250 - 251.

Hasse, G., Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Filamentös wachsende Pilze (Fadenpilze), Kapitel 79, ISBN 13 978-3-642-24166-6, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, (2012), S. 609.

Hazer, B., Steinbüchel, A., Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications, Appl Microbiol Biotechnol 74, (2007), p. 1 - 12.

Heinrich, D. Madkour, M.H., Al-Ghamdi, M.A., Shabbaj, I.I. and Steinbüchel, A., Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite, AMB Express a SpringerOpen Journal, (2012), 2:59, p. 1 - 6.

Hesseltine, C. W., Anderson, R. F., Microbiological Produktion of Carotenóides I. Zygosporé and Carotene produced by Intraspecific and crosses of Choanephoraceae in Liquid Media, Mycology, (1957), 49: p. 449 - 452.

Kempken, F., Kempken, R., Gentechnik bei Pflanzen, Chancen und Risiken, 4. Auflage, Springer Spektrum, Springer-verlag Berlin Heidelberg, (2012), S. 175.

Kornberg, A., Inorganic Polyphosphate: Toward Making a Forgotten Polymer Unforgettable, Journal of Bacteriology, Vol. 177, No. 3, (1995), p. 491 - 496.

Küster-Thiel, Rechentafel für die chemische Analytik, 105. Auflage, bearbeitet von Alfred Ruland, Walter de Gruyter, Berlin, New York, (2003), S. 13-35.

Kulaev, IS, Vagabov VM, Kulakovskaya TV, The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates, Second Edition, ISBN 04 70 85810 9, Wiley John & Sons, (2004), p. 5, 188-190.

Kulakova, A.N., Hobbs, D., Smithen, M., Pavlov, E., Gilbert, J.A., Quinn, J.P., McGrath, J.W., Direct Quantification of Inorganic Polyphosphate in Microbial Cells Using 4'-6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI), Environ. Sci. Technol, 45, (2011), p. 7799 - 7803.

Kulakovskaya, T. V., Vagabov, V. M., Kulaev, I. S., Review, Inorganic polyphosphate in industry, agriculture and medicine: Modern state and outlook, Process Biochemistry 47, (2012), p. 1 - 10.

Kunst, S., Helmer, C., Knoop, S., Betriebsprobleme auf Kläranlagen durch Blähschlamm, Schwimmschlamm, Schaum. Handbuch zur Identifizierung und Bekämpfung fädiger Bakterien, ISBN 3-540-64490-3, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2000), S. 36 - 37.

Kuroda, A., Takiguchi, N., Gotanda, T., Nomura, K., Kato, J., Ikeda, T., Ohtake, H., A Simple Method to Release Polyphosphate from Activated Sludge for Phosphorus Reuse and Recycling, Biotechnology and Bioengineering, VOL. 78, NO. 3, Wiley Periodicals, Inc., (2002), p. 333 - 338.

Lima de, M.A.B., Nascimento do, A.E., Souza de, W., Fukushima, K., Campos-Takaki de, G.M., Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*, Brazilian Journal of Microbiology, (2003), 34: p. 363 - 372.

Madkour, M.H., Heinrich, D., Alghamdi, M.A., Shabbaj, I.I., Steinbüchel, A., PHA Recovery from Biomass, Biomacromolecules 14, (2013), p. 2963 - 2972.

Möller, Manfred, zwei unveröffentlichte institutseigene Methoden zur gaschromatographischen Messung von Polyhydroxybuttersäure (2013, 2014).

Molinos-Senante, M., Hernández-Sancho, F., Sala-Garrido, R., Garrido-Baserba, M., Economic Feasibility Study for Phosphorus Recovery Processes, AMBIO: A Journal of the Human Environment, (2011), 40(4): p. 408 - 416.

Mothes, G., Schnorpfeil, C., Ackermann, J.-U., Production of PHB from Crude Glycerol, Eng. Life Sci., (2007), 7, No. 5, p. 475-479.

Munk, K., u. a., Mikrobiologie, ISBN 978-3-13-144861-3, Thieme Verlag Stuttgart, (2008), S. 529.

Olivera, E. R., Arcos, M., Naharro, G., and Luengo, J.M., Unusual PHA Biosynthesis, Editor: Chen, Guo-Qiang, Series Editor: Steinbüchel Alexander, Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, Microbiology Monographs, Volume 14, ISBN 978-3-642-03286-8, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2010), p. 134.

Panchal, B., Bagdadi, A., Roy, I., Chapter 12, Polyhydroxyalkanoates: The Natural Polymers Produced by Bacterial Fermentation, Editors: Thomas, S., Visakh, P.M., Mathew, Aji.P., Advances in Natural Polymers, Advanced Structured Materials, Volume 18, ISBN 978-3-642-20939-0, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2013), p. 398, 402 - 404, 414 - 416.

Pittmann, T., Steinmetz, H., Produktion von Bioplastik auf kommunalen Kläranlagen, Wasser und Abfall 5, (2013), S. 37 - 41.

Praktikumsskript, (Modulname: Mikrobiologisch biochemisches Praktikum; Modulcode: MIBIPRA.BA.Nr. 156; Vers. (2009); Versuch Nr. 8 Speicherstoffe: Produktion von Poly- β -Hydroxybuttersäure. http://tu-freiberg.de/fakult2/bio/ag_mikrobio/lehre/Versuch8.pdf).

Riemay, K.-H. und Tröger, R., Sammelbericht Autolyse bei Pilzen, I. Autolyse bei Coprinus und in Pilzkulturen, Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 18, 7, (1978), S. 523 - 540.

Rohstoffbörsenpreise, Weltmarktpreis Rohphosphat, (2014), <http://www.indexmundi.com/de/rohstoffpreise/?ware=rohphosphat&wahrung=eur>

Schacht, Petra, Diplomarbeit: „Mikrobiologische Gewinnung von langkettigen Polyphosphaten“, erstellt an der Fachhochschule NTA Isny (2011).

Scherzer, Dietrich, BASF AG, (Koordination), Fachlicher Abschlussbericht zum Forschungsprojekt, BioPro, Biopolymere auf Basis von Polyhydroxyalkanoaten (PHA)-Verfahrensentwicklung für die wirtschaftliche Produktion, BASF AG: FKZ: 22000505, Fraunhofer IZM: FKZ: 22007905, Siemens AG: FKZ: 22007805, Industrielles Forschungsprojekt im Förderprogramm „Nachwachsende Rohstoffe“ bei der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR) -Projekträger beim BMVEL-, Laufzeit: 40 Monate (September 2005 - Dezember 2008).

Scholz, R. W., Ulrich, A. E., Eilittä, M., Roy, A., Sustainable use of phosphorus: a finite resource, Science of the Total Environment 461 - 462, (2013), p. 799 - 803.

Schönberg, A., Samiei, K., Kern, H., Raupenstrauch, H., Der RecoPhos-Prozess-Rückgewinnung von Phosphor aus Klärschlammasche, Österr Wasser- und Abfallw (2014), 66: S. 403 - 407.

Serafim, L.S., Lemos, P.C., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H., Reis, M.A.M., Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms, Journal of Microbiological Methods 51, (2002), p. 1 - 18.

Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., Biological degradation of plastics: A comprehensive review, Biotechnology Advances 26, (2008), p. 246 - 265.

Smith, Stephanie A., Morrissey, James H., Sensitive fluorescence detection of polyphosphate in polyacrylamide gels using 4,6-diamidino-2-phenylindol, Electrophoresis (2007), 28, p. 3461 - 3465.

Steinbüchel, A., Non-biodegradable biopolymers from renewable resources: perspectives and impacts, Current Opinion in Biotechnology 16, (2005), p. 607 - 613.

Steinbüchel, A., Kapitel 22 Biopolymere und Vorstufen, Hrsg. Antranikian, G., Mikrobiologie, ISBN-13 978-3-540-24083-9, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, (2006), S. 390 - 391.

Steinbüchel, A., Oppermann-Sanio, F.B., Ewering, C. und Pötter, M., Mikrobiologisches Praktikum, Versuche und Theorie, 2. Auflage, ISBN 978-3-642-25150-4, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, (2013), S. 143 - 145, 369.

Stuttgarter Zeitung, Umweltschutz, Mikroplastik in Kläranlagen, Redaktion Wissenschaft, 31. Oktober 2014.

Stuttgarter Zeitung, Umweltschutz, EU-Kompromiss bei Plastiktüten in Sicht, 19. November 2014.

Stuttgarter Zeitung, Die Spur der Plastiktüte, Umwelt, In den Weltmeeren sammeln sich jährlich acht Millionen Tonnen Kunststoffmüll neu an, Roland Knauer, 13. Februar 2015.

Stuttgarter Zeitung, Kampf gegen Plastiktüten, Umweltschutz, Die EU-Minister fordern die Staaten zum Handeln auf. Die Bundesregierung hat noch keine konkreten Pläne beschlossen, 03. März 2015.

Takors, R. (Hrsg.), Sahm, H., Antranikian, K.-P., Industrielle Mikrobiologie, ISBN 978-3-8274-3039-7, Springer Spektrum, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, (2013), S. 226 - 228, 237 - 241, 284 - 285.

Weideler, A., Krampe, J., Steinmetz, H., Phosphorrückgewinnung aus kommunalem Klärschlamm als Magnesium-Ammonium-Phosphat (MAP), Wasser + Abfall 1-2, (2008), S. 23 - 26.

Tijssen, J. P. F., Dubbelman, T. M. A. R., Steveninck, J. Van, Isolation and Characterization of Polyphosphates from the Yeast cell surface, Biochimica et Biophysica Acta, 760, (1983), p. 143 - 148.

Tijssen, J. P. F., Steveninck, J. Van, Cytochemical Staining of a Yeast Polyphosphate Fraction, Localized Outside the Plasma Membrane, Protoplasma 125, (1985), p. 124 - 128.

Ulrich, A. E., Frossard, E., On the history of a reoccurring concept: Phosphorus scarcity, Science of the Total Environment 490, (2014), p. 694 - 707.

Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., Seeger, M., Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates, International Journal of Biological Macromolecules 70, (2014), p. 208 - 213.

Vassilev, N., Martos, E., Mendes, G., Martos, V., Vassileva, M., Biochar of animal origin: a sustainable solution to the global problem of high-grade rock phosphate scarcity, J Sci Food Agric, (2013), 93, p. 1799 - 1804.

Weltin, D., Hoffmeister, D., Untersuchungen zur bakteriellen Phosphataufnahme, Physiologische Untersuchungen an Reinkulturen, Hoffmeister, D., Dynamik der extra- u. intrazellulären Phosphorverbindungen bei der biologischen Phosphatelimination, Veröffentlichungen aus dem Fachgebiet Hygiene der Technischen Universität Berlin und dem Institut für Hygiene der Freien Universität Berlin 16; Dott, W. und Rüden, H. (Hrsg.), ISBN 3798315701, Berlin (1993). S. 55 - 56.

Werner, W., Ökologische Aspekte des Phosphor-Kreislaufs, UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 11, (6), (1999), S. 343 - 351.

Winkler, Michael, Praxisbericht: Laboranalytik & Prozess-Messtechnik Abwasserreinigung, Nährstoffe, Optimale Nährstoffverhältnisse für die Abwasserreinigung, Firma Hach-Lange, (2012), S. 3.

Zessner, M., Egle, L., Rechberger, H., Phosphor-Recycling aus technischer, ökologischer und ökonomischer Sicht, 18. Alpenländisches Expertenforum 2013, ISBN: 978-3-902559-98-2, (2013), S. 61 - 66.

Zhang, H.-L., Fang, W., Wang, Y.-P., Sheng, G.-P., Zeng, R.J., Li, W.-W., Yu, H.-Q., Phosphorus Removal in an Enhanced Biological Phosphorus Removal Process: Roles of Extracellular Polymeric Substances, Environmental Science & Technology, (2013), p. 47, 11482 - 11489.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anaerober Stoffwechsel aus Umwelt-Mikrobiologie, Wolfgang Fritsche, Kapitel 8, Seite 145, Abb. 8.6., © Gustav Fischer Verlag Jena, 1998.....	3
Abbildung 2: Beispiel für eine Strukturformel von Polyphosphat, wobei M für ein Wasser-stoffatom oder Metallkation steht, aus The Biochemistry of Inorganic polyphosphates, second Edition, Kulaev et al., content 1, page 5, figure 1.2, © John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO 19 8SQ, England, 2004.....	3
Abbildung 3: Strukturformel von 3-Hydroxybuttersäure aus Industrielle Mikrobiologie, Hrsg. Takors et al. Kapitel 11, Seite 238, Abb.11.5, Autor Steinbüchel et al. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013, with permission of Springer.....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Biosynthesewegs von 3-Hydroxybuttersäure aus Mikrobiologisches Praktikum, Steinbüchel et al., 2. Auflage, Kapitel 3, Seite 144, Abb. 3.80, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013, with permission of Springer.....	7
Abbildung 5: Anaerober (oben) und Aerober (unten) Stoffwechsel aus Umwelt-Mikrobiologie, Wolfgang Fritsche, Kapitel 8, Seite 145, Abb. 8.6., © Gustav Fischer Verlag Jena, 1998.....	9
Abbildung 6: Schema Phosphatverhalten in unterschiedlichem Milieu aus Umwelt-Mikrobiologie, Wolfgang Fritsche, Kapitel 8, Seite 147, Abb. 8.7., © Gustav Fischer Verlag Jena, 1998.....	10
Abbildung 7: Kultivierung der Mischkulturen bei alternierender Begasung mit Druckluft und Stickstoff.....	14
Abbildung 8: Kultivierung der Pilze im Schüttelschrank.....	15
Abbildung 9: Kultivierung der Pilze bei Begasung mit Druckluft.....	16
Abbildung 10: Kultivierung der Bakterien im Schüttelschrank.....	16
Abbildung 11: Kultivierung der Bakterien mit Sauerstoffeintrag durch Rühren.....	17
Abbildung 12: Kultivierung der Bakterien bei Begasung mit Druckluft.....	18
Abbildung 13: Kultivierung der Bakterien bei Begasung mit Sauerstoff.....	19
Abbildung 14: <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) nach sechstägiger Kultivierung mit Druckluft (links), Reagenzglas mit dem Ansatz nach sechstägiger Inkubation mit Druckluft (Mitte) und <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) nach dreitägiger Kultivierung mit Druckluft (rechts).....	29
Abbildung 15: Mikroskopische Untersuchungen von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) nach Behandlung mit KOH-Lösung ohne Neutralisation. Neisser-Färbung (oben) und DAPI-Färbung (unten).....	30
Abbildung 16: Neisser-Färbung von 1. <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908), 2. <i>Absidia corymbifera</i> , 3. <i>Rhizopus stolonifer</i> , nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (Mitte) und pH 2 (unten).....	31
Abbildung 17: Neisser-Färbung von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) im Medium (oben), nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (Mitte) und pH 2 (unten).....	32
Abbildung 18: DAPI-Färbung von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) im Medium (oben), nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (Mitte) und pH 2 (unten).....	33
Abbildung 19: Nativpräparat von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) (oben) und Neisser-Färbung des Pellets vor der Polyphosphatextraktion (unten). Präparat ohne Ultraschallbehandlung.....	34
Abbildung 20: Neisser-Färbung nach Polyphosphatextraktion von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) ungewaschen, Fraktion 1 (oben), Fraktion 2 (Mitte) und Fraktion 3 (unten).....	35
Abbildung 21: DAPI-Färbung: Überstand von Fraktion 1 (oben links), Fraktion 2 (oben rechts) und Fraktion 3 (unten) von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) nach Waschen mit bidest. Wasser pH 2.....	36
Abbildung 22: Gelelektrophoresekammer (links), Gelelektrophoresekammer mit TBE-Gel (Mitte) und Fertiggel TBE 20 %, Probenpuffer mit und ohne Farbstoff, nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 60 Minuten (rechts).....	37

Abbildung 23: Gel nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 90 Minuten. TBE-Gel-Bahnen (N=10) nach dem Färben mit Toluidinblau (links) und nach mehrmaligen Spülen mit Entfärbelösung (rechts). Die Proben wurden nach Extraktion mit Millipore verdünnt. Bahnen 1 bis 4: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff. Bahnen 5 bis 10: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff.	38
Abbildung 24: Gel nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 45 Minuten. TBE-Gel-Bahnen (N=10) nach mehrmaligen Spülen mit Entfärbelösung. Die Proben wurden nach Extraktion nicht mit Millipore verdünnt. Bahnen 1 und 2: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff. Bahnen 3 bis 5: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 6 bis 8: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 8, 9 und 10 enthalten dieselbe Probe.	38
Abbildung 25: Gel nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 30 (links) bzw. 65 (rechts) Minuten. TBU-Gele-Bahnen (N=10) mehrmaligen Spülen mit Entfärbelösung. Die Proben wurden nach Extraktion nicht mit Millipore verdünnt. Bahnen 1 und 2: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff. Bahnen 3 bis 5: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 6 bis 8: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 9 und 10: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff.	39
Abbildung 26: Gel nach Laufzeit der Gelelektrophorese von 60 Minuten. TBE-Gel-Bahnen (N=10) nach dem Färben mit Toluidinblau (links) und nach mehrmaligen Spülen mit Entfärbelösung (rechts). Die Proben wurden nach Extraktion mit Hilfe der Abdampfanlage eingengt. Bahnen 1 und 2: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff. Bahnen 3 bis 5: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 6 bis 8: Fraktionen 1 bis 3 mit Probenpuffer ohne Farbstoff. Bahnen 9 und 10: Standard mit Probenpuffer mit und ohne Farbstoff.	40
Abbildung 27: Wellenlängenscan, orange: DAPI, blau/schwarz: Polyphosphatstandard (10 mg/0,6 mL), Pentanatriumtriphosphat (links) und Budit 4 (rechts).	42
Abbildung 28: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat: 50–500 mg/L (Stammlösung angesetzt in bidest. Wasser, Standards mit bidest. Wasser aufgefüllt) + 300 µL DAPI (0,2 mg/mL), Messung jeweils nach 10 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln.	43
Abbildung 29: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat: 50–500 mg/L + Puffer (Stammlösung angesetzt in HEPES, Standards aufgefüllt mit Millipore) + 300 µL DAPI (0,2 mg/mL).	43
Abbildung 30: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat: 0,05–0,5 mg/L + Puffer (Stammlösung angesetzt in Millipore, pH 7 Einstellung mit HEPES, Standards aufgefüllt mit Millipore) + 100 µL DAPI (2 mg/mL).	44
Abbildung 31: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat: 0,05–0,5 mg/L + Puffer (Stammlösung angesetzt in Millipore, pH 7 Einstellung mit HEPES, Standards aufgefüllt mit HEPES) + 100 µL DAPI (2 mg/mL).	44
Abbildung 32: Standardgerade Pentanatriumtriphosphat, Kettenlänge ≥ 3 , [50–1000 µg/L], Stammlösung angesetzt in Millipore, Einstellung pH 7 mit HEPES, Standards aufgefüllt mit HEPES, + 100 µL DAPI (2 mg/mL).	45
Abbildung 33: Standardgerade Budit 4, Kettenlänge ≥ 20 , [50–1000 µg/L], Stammlösung angesetzt in Millipore, Einstellung pH 7 mit HEPES, Standards aufgefüllt mit HEPES, + 100 µL DAPI (2 mg/mL).	45
Abbildung 34: links: Wellenlängenscan des Pilzes im Medium mit Hefeextrakt und DAPI, rechts: Mikroskopische Untersuchung des Pilzes im Medium mit DAPI.	46
Abbildung 35: Wellenlängenscan von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908), im Rohextrakt.	47
Abbildung 36: links: Küvette mit Pilz und DAPI nach und vor der fluoreszenzphotometrischen Messung, rechts: Küvetten mit unterschiedlicher Pilzkonsistenz und DAPI nach der fluoreszenzphotometrischen Messung.	47
Abbildung 37: Wellenlängenscan von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) nach Extraktion der Polyphosphate.	48
Abbildung 38: Wellenlängenscans der Fraktionen 1 bis 3 nach Polyphosphat-Extraktion von 1. <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908), 2. <i>Absidia corymbifera</i> , 3. <i>Rhizopus stolonifer</i> , gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (links) bzw. pH 2 (rechts).	49
Abbildung 39: Zusammensetzung der Polyphosphate bei der Klärschlamm-biozönose nach unterschiedlicher Kettenlänge (kurzkettig, mittellangkettig und langkettig).	50
Abbildung 40: Sudanschwarz-Färbung von <i>Paracoccus denitrificans</i> .	52

Abbildung 41: Sudanschwarz-Färbung von <i>Cupriavidus necator</i>	52
Abbildung 42: Becherglas mit Zellpellet und 10 % iger Natriumhypochlorit-Lösung zu Beginn (links) und nach 4 Stunden (Mitte). Überprüfung der Vollständigkeit der Zellyse (rechts).....	54
Abbildung 43: Feuchtmasse durch Zentrifugation von 100 mL Ansatz.....	56
Abbildung 44: Zellpellet mit 10 % iger Natriumhypochlorit-Lösung (links), Zellaufschluss durch chemische Lyse bei 50°C im Trockenschrank (Mitte) und Falcon nach 1 Stunde bei 50°C im Trockenschrank (rechts).....	56
Abbildung 45: Falcons 45 Sekunden im Ultraschallbad (links) und Verdünnung mit bidest. Wasser nach erfolgreicher Lyse (rechts).....	57
Abbildung 46: Zentrifugation (links) und Falcon nach 15 minütiger Zentrifugation bei 3500 rpm (rechts).....	57
Abbildung 47: Polyhydroxybuttersäure-Isolierung: Falcon mit dem gewonnenen Poly-β-hydroxybuttersäure-Speicherstoff <i>Paracoccus denitrificans</i> (links) und <i>Cupriavidus necator</i> (rechts).....	57
Abbildung 48: Alkalische Hydrolyse: Falcon nach Zugabe von 4 M HCl (links), Enzymsatz: Durchmischen der Küvetten nach Zugabe von 790 µL Tris/HCl, 100 µL NAD, 10 µL Hydrolyseansatz und 100 µL β-Hydroxybutyrate Dehydrogenase Lösung (0,2 units) (rechts).....	58
Abbildung 49: Küvetten nach Durchmischung mit Parafilm verschlossen (links), Küvetten nach Inkubation bei 30°C im Schüttelschrank (rechts).....	58
Abbildung 50: Messung der Extinktionswerte mit dem Photometer.....	58
Abbildung 51: Standardgerade Kalibration über den Quotient m/z 103.....	61
Abbildung 52: Standardgerade Kalibration über den Quotient m/z 74.....	62
Abbildung 53: Wachstum der Mischkultur im Minimalmedium (links) und im Reaktionsmedium (rechts) nach 192 Stunden.....	63
Abbildung 54: Substratverwertung der Mischkultur im Minimalmedium: Phosphat-, Acetat-, Ammoniumgehalt, pH-Wert.....	64
Abbildung 55: Substratverwertung der Mischkultur im Reaktionsmedium: Phosphat-, Acetat-, Ammoniumgehalt, pH-Wert.....	65
Abbildung 56: Dargestellt ist die Abnahme des gelösten Ortho-Phosphats sowie der Verbrauch von Ammonium und Acetat bzw. Glucose über die Zeit bei der Klärschlammbiozönose.....	66
Abbildung 57: Totautoklavierte Mischkultur im Reaktionsmedium. Verlauf von Phosphat-, Acetat- und Ammoniumgehalt.....	67
Abbildung 58: Mischkultur (abgetötet mit Natriumazid) im Reaktionsmedium. Verlauf von Phosphat-, Acetat- und Ammoniumgehalt.....	67
Abbildung 59: Verhalten von aktiver (oben), totautoklavierter (Mitte) und mittels Natriumazid abgetöteter (unten) Klärschlammbiozönose im Zeitablauf.....	68
Abbildung 60: Faulschlammbiozönose während der Versuchsdauer von 148 Stunden bei manuellem Einsatz von Salzsäure.....	69
Abbildung 61: Faulschlammbiozönose während der Versuchsdauer von 148 Stunden bei Einsatz von Imidazol-Puffer.....	70
Abbildung 62: Substratverwertung der Mischkultur im Minimalmedium bei fünfmaliger Acetatzugabe.....	71
Abbildung 63: Substratverwertung der Mischkultur im Minimalmedium bei fünfmaliger Glucosezugabe.....	72
Abbildung 64: Substratverwertung der Mischkultur im Minimalmedium bei fünfmaliger Essigsäurezugabe.....	73
Abbildung 65: Exemplarisch Grampräparat nach 5 Tagen, Ansatz mit Acetat, pH ~ 9 (oben), Ansatz mit Glucose, pH ~ 2,5 (Mitte) und Ansatz mit Essigsäure, pH ~ 2,5 (unten).....	75
Abbildung 66: Substratverwertung der Mischkultur RSAS im Minimalmedium bei mehrmaliger Phosphatzugabe: Phosphat-, Acetat-, Ammoniumgehalt und pH-Wert.....	76

Abbildung 67: Substratverwertung der Mischkultur RSAS im Minimalmedium bei einmaliger Phosphatzugabe: Phosphat-, Acetat-, Ammoniumgehalt und pH-Wert.....	77
Abbildung 68: Substratverwertung der Klärschlamm-biozönose während der Versuchsdauer von 72 Stunden.	78
Abbildung 69: Neisser- (links) und Sudanschwarzfärbung (rechts) der Klärschlamm-biozönose.....	79
Abbildung 70: Wellenlängenscan der Klärschlamm-biozönose.....	80
Abbildung 71: Phosphataufnahme und pH-Wert während des Wachstums von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) im Medium nach Hesseltine und Anderson (mit Nachdosierung von Glucose und Asparagin).....	81
Abbildung 72: Phosphataufnahme und pH-Wert während des Wachstums von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt.....	82
Abbildung 73: Dargestellt ist die Abnahme des gelösten Ortho-Phosphats sowie der Verbrauch von Ammonium und Acetat bzw. Glucose über die Zeit bei <i>Cunninghamella elegans</i>	83
Abbildung 74: Wachstum von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) nach drei Tagen bei variierender Hefeextrakt-Konzentration im Medium.....	83
Abbildung 75: Kultivierung des Pilzes <i>Cunninghamella elegans</i> im Schüttelschrank (links) und aktive Belüftung mit technischer Luft (rechts).....	85
Abbildung 76: Substratverwertung von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) innerhalb von 8 Tagen.....	86
Abbildung 77: Wachstumscharakteristik von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) nach 8 Tagen Inkubation im Schüttelschrank im Medium mit Hefeextrakt.....	87
Abbildung 78: Entwicklung von Phosphat, pH-Wert, Glucose und Ammonium beim <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) während einer Versuchsdauer von 113 Stunden.....	88
Abbildung 79: Entwicklung von Phosphat, pH-Wert, Glucose und Ammonium beim <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm IFM 46109) während einer Versuchsdauer von 113 Stunden.....	89
Abbildung 80: Entwicklung von Phosphat, pH-Wert, Glucose und Ammonium beim <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 8271) während einer Versuchsdauer von 113 Stunden.....	90
Abbildung 81: Entwicklung von Phosphat, pH-Wert, Glucose und Ammonium beim <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 63299) während einer Versuchsdauer von 113 Stunden.....	91
Abbildung 82: Wachstumscharakteristik der vier <i>Cunninghamella elegans</i> -Stämme 1908, IFM 46109, 8271, 63299 im Medium mit Hefeextrakt.....	91
Abbildung 83: <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) ungewaschen (links) und nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5 (rechts).....	92
Abbildung 84: Phosphorreduktion von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908, IFM 46109, 8271, 63299), <i>Absidia corymbifera</i> , <i>Mucor plumbeus</i> , <i>Mucor racemosus</i> und <i>Rhizopus stolonifer</i> nach siebentägiger Inkubation im Medium mit und ohne Hefeextrakt.....	96
Abbildung 85: Phosphatfestlegung von Spezialkultur FSAS im Reaktionsmedium mit Budenheim-Waschwasser 1.....	100
Abbildung 86: Phosphatfestlegung von Spezialkultur FSAS im Reaktionsmedium mit Budenheim-Waschwasser 2.....	100
Abbildung 87: Phosphatfestlegung von Spezialkultur FSAS im Reaktionsmedium mit Budenheim-Waschwasser 3.....	101
Abbildung 88: Aussehen der Ansätze mit Budenheim-Waschwasser 1 bis 3 nach 72 Stunden (bei jeweils 2 Parallel-Ansätzen).....	102
Abbildung 89: Zusammensetzung der Polyphosphate nach unterschiedlicher Kettenlänge bei der Spezialkultur FSAS mit Budenheim-Wasser.	102
Abbildung 90: Phosphatfestlegung von Spezialkultur RSAS im Minimalmedium mit Produktionswasser der Brauerei Erding.....	105
Abbildung 91: Aussehen des Ansatzes mit Prozesswasser der Brauerei Erding nach 70 Stunden.	105

Abbildung 92: Ansatz ohne Schaumableitung (linkes Bild). Ansätze mit Schaumableitung (rechtes Bild) bei Versuchsabbruch: <i>Cupriavidus necator</i> (links) und <i>Paracoccus denitrificans</i> (rechts).....	106
Abbildung 93: Vorkulturen bei Versuchsabbruch, <i>Paracoccus denitrificans</i> (links), <i>Cupriavidus necator</i> (rechts), Ansatz im Schüttelschrank (links), Ansatz Sauerstoffeintrag durch Rühren (Mitte) und Ansatz Begasung mit technischer Luft (rechts).....	110
Abbildung 94: Ansätze bei Versuchsabbruch, Vorkulturen (oben), Hauptkulturen (unten), <i>Paracoccus denitrificans</i> (links) und <i>Cupriavidus necator</i> (rechts) im Medium mit Acetat und Glucose.....	112
Abbildung 95: Verbrauch an Glycerin in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	121
Abbildung 96: Verbrauch an Ammonium in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	122
Abbildung 97: Verbrauch an Phosphor in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	123
Abbildung 98: Verbrauch an Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	124
Abbildung 99: Gebildete Trockenmasse in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	125
Abbildung 100: Zunahme des Proteingehalts in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	126
Abbildung 101: Gebildete 3-Polyhydroxybuttersäure (gaschromatographische Untersuchung) in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	127
Abbildung 102: Gebildeter Kohlenstoff in der Trockenmasse in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	128
Abbildung 103: Gebildeter Kohlenstoff in Protein und 3-Hydroxybuttersäure in mg/L während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	129
Abbildung 104: Verbrauch an Kohlenstoff in Glycerin in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	131
Abbildung 105: Verbrauch an Stickstoff in Ammonium in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	132
Abbildung 106: Verbrauch an Phosphor in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	133
Abbildung 107: Gebildeter Kohlenstoff in der Trockenmasse in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	134
Abbildung 108: Gebildeter Kohlenstoff in Protein und 3-Hydroxybuttersäure in mmol während den Kulturbedingungen Sauerstoffeintrag durch Rühren, Inkubation im Schüttelschrank, Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff sowie in den Medien nach Steinbüchel bzw. Mothes.....	135
Abbildung 109: Aussehen der Versuchsansätze von Klärschlammbiozönose (links) und <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) (rechts) nach 4 Tagen.....	140

Abbildung 110: Ertragskoeffizient aus mmol Kohlenstoff Ertrag zu mmol Kohlenstoff Substratverbrauch. Kohlenstoff (Protein, Polyhydroxybuttersäure, Trockenmasse).....	143
Abbildung 111: Ertragskoeffizient aus mmol Kohlenstoff Ertrag zu mmol Kohlenstoff Substratverbrauch. Kohlenstoff (Protein, Polyhydroxybuttersäure, Trockenmasse).....	144
Abbildung 112: Wachstumsverlauf und Substratverwertung in der Klärschlamm-biozönose.....	165
Abbildung 113: Wachstum der Mischkultur (links) im Minimalmedium nach 192 Stunden, sowie exemplarisches Partikel aus dem Ansatz (rechts).....	165
Abbildung 114: Wachstumsverlauf und Substratverwertung in der Reinkultur <i>Rhodococcus equi</i> 7512.....	166
Abbildung 115: Wachstum der Reinkultur <i>Rhodococcus equi</i> 7512 (links) im Minimalmedium nach 192 Stunden, sowie exemplarisches Partikel aus dem Ansatz (rechts).....	166
Abbildung 116: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert ~ 7,0 während der Versuchsdauer. Manueller Einsatz von Salzsäure.....	167
Abbildung 117: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert ~ 7,6 während der Versuchsdauer. Manueller Einsatz von Salzsäure.....	168
Abbildung 118: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert 7,3 während der Versuchsdauer. Einsatz von Imidazolpuffer.....	169
Abbildung 119: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert 7,7 während der Versuchsdauer. Einsatz von Imidazolpuffer.....	169
Abbildung 120: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert ~ 6 (links), 7,0 (mitte) und 7,8 (rechts) während der Versuchsdauer. Manueller Einsatz von Salzsäure.....	170
Abbildung 121: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert ~ 6 (links), 7,0 (mitte) und 7,8 (rechts) während der Versuchsdauer. Einsatz von Imidazolpuffer.....	170
Abbildung 122: Phosphataufnahme und pH-Wert während des Wachstums von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 8271) im Medium nach Hesseltine und Anderson (mit Nachdosierung von Glucose und Asparagin).....	171
Abbildung 123: Phosphataufnahme und pH-Wert während des Wachstums von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 63299) im Medium nach Hesseltine und Anderson (mit Nachdosierung von Glucose und Asparagin).....	171
Abbildung 124: Wachstumscharakteristika von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) nach Kultivierung im Medium mit Hefeextrakt im Schüttelschrank.....	172
Abbildung 125: Wachstumscharakteristika von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) nach Kultivierung im Medium mit Hefeextrakt und Begasung mit technischer Luft.....	172
Abbildung 126: Wachstumscharakteristik von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) bei unterschiedlicher Sporenmenge Inkubation im Schüttelschrank.....	173
Abbildung 127: Wachstumscharakteristik von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) bei unterschiedlicher Sporenmenge nach 68 Stunden Inkubation im Schüttelschrank.....	173
Abbildung 128: Wachstumscharakteristik von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) mit Glucose (oben links), Glycerin (oben rechts) und Acetat (unten Mitte) nach 2 Tagen.....	174
Abbildung 129: Ansätze bei Versuchsabbruch, <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).....	175
Abbildung 130: Ansätze bei Versuchsabbruch, <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 63299) im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).....	175
Abbildung 131: Ansätze bei Versuchsabbruch, <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 8271) im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).....	175
Abbildung 132: Ansätze bei Versuchsabbruch, <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm IFM 46109) im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).....	175
Abbildung 133: Ansätze bei Versuchsabbruch, <i>Absidia corymbifera</i> im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).....	176

Abbildung 134: Ansätze bei Versuchsabbruch, <i>Mucor plumbeus</i> im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).....	176
Abbildung 135: Ansätze bei Versuchsabbruch, <i>Mucor racemosus</i> ^T im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).....	176
Abbildung 136: Ansätze bei Versuchsabbruch, <i>Rhizopus stolonifer</i> im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).....	176
Abbildung 137: Nativpräparate von <i>Cunninghamella elegans</i> (oben), <i>Absidia corymbifera</i> (Mitte) und <i>Mucor plumbeus</i> (unten).....	177
Abbildung 138: Neisser-Färbung von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) (links) und <i>Absidia corymbifera</i> (rechts).....	178
Abbildung 139: DAPI-Färbung von <i>Mucor plumbeus</i>	178
Abbildung 140: Polyphosphatextraktion von <i>Cunninghamella elegans</i> gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5, oben links Fraktion 1, oben rechts Fraktion 2, unten Mitte Fraktion 3.	179
Abbildung 141: Polyphosphatextraktion von <i>Cunninghamella elegans</i> gewaschen mit bidest. Wasser pH 2, oben links Fraktion 1, oben rechts Fraktion 2, unten Mitte Fraktion 3.....	180
Abbildung 142: TBE-Gel nach Behandlung mit Entfärbelösung, Bahnen 1, 2, 9 und 10: Standard (Kettenlänge ~ 28), Probenpuffer mit bzw. ohne Farbstoff. Bahnen 3-5: Fraktionen 1, 2 und 3 von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) (nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5), Bahnen 6-8: Fraktionen 1, 2 und 3 von <i>Absidia corymbifera</i> (nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5).....	181
Abbildung 143: TBE-Gel nach Behandlung mit Entfärbelösung, <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) und <i>Absidia corymbifera</i> nach Waschen mit bidest. Wasser pH 2, Bahnverteilung wie in Legende der Abbildung 142.....	181
Abbildung 144: TBE-Gel nach Behandlung mit Entfärbelösung, Bahnen 1 bis 4: Standard (Kettenlänge ~ 28), Probenpuffer mit bzw. ohne Farbstoff, Bahnen 5-7: Fraktionen 1, 2 und 3 von <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm IFM 46109) (nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5), Bahnen 8-10: Fraktionen 1, 2 und 3 von <i>Rhizopus stolonifer</i> (nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5).....	182
Abbildung 145: TBE-Gel nach Behandlung mit Entfärbelösung, <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm IFM 46109) und <i>Rhizopus stolonifer</i> nach Waschen mit bidest. Wasser pH 2, Bahnverteilung wie in Legende der Abbildung 144.....	182
Abbildung 146: Falcon nach der Zellyse mit 10 % iger Natriumhypochlorit-Lösung, Verdünnung mit bidest. Wasser und Zentrifugation bei 3500 rpm.....	183
Abbildung 147: <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) mit bidest. Wasser pH 5,5 gewaschen (links) und mit bidest. Wasser pH 2 gewaschen (rechts) unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung mit Öl.	184
Abbildung 148: <i>Absidia corymbifera</i> mit bidest. Wasser pH 5,5 gewaschen (links) und mit bidest. Wasser pH 2 gewaschen (rechts) unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung mit Öl.....	184

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiel für ein Pipettierschema (TBE-Gel 20 %, Einstellungen: 170 V, 15 mA, 50 Watt, Laufzeit 60 min).....	25
Tabelle 2: Einstellungen am Fluoreszenzphotometer für den qualitativen Nachweis der Polyphosphate.....	41
Tabelle 3: Einstellungen am Fluoreszenzphotometer für den quantitativen Nachweis der Polyphosphate.....	42
Tabelle 4: Gebildete 3-Hydroxybuttersäure während der Kulturbedingung Sauerstoffeintrag durch Rühren bei <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i>	59
Tabelle 5: Herstellung der Standards für die gaschromatographische Messung der Methode 1.....	60
Tabelle 6: Herstellung der Standards für die gaschromatographische Messung der Methode 2.....	61
Tabelle 7: Trockengewicht und Phosphorgehalt in der Trockensubstanz bei den Ansätzen mit Acetat, Glucose und Essigsäure als Substrat nach fünftägiger Kultivierung.....	74
Tabelle 8: Trockengewicht und Phosphatgehalt in der Trockensubstanz bei der Klärschlamm-biozönose mit Acetat als Substrat nach dreitägiger Kultivierung.....	79
Tabelle 9: Quantitative fluoreszenzphotometrische Messung der Polyphosphate aus der Klärschlamm-biozönose.....	80
Tabelle 10: Wachstumscharakteristika von <i>Cunninghamella elegans</i> bei Nachdosierung von Glucose und Asparagin.....	82
Tabelle 11: Verbrauch an Glucose/Glycerin/Acetat, Ammonium und Phosphat im Medium und gebildete Trockenmasse innerhalb von zwei Tagen durch <i>Cunninghamella elegans</i>	84
Tabelle 12: Phosphor-Reduktion im Medium und Phosphorfestlegung in der Trockenmasse bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.....	85
Tabelle 13: Phosphor-Reduktion im Medium und Phosphorgehalt in der Trockenmasse bei <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) ungewaschen und gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5 und pH 2.....	92
Tabelle 14: Ergebnisse der Ionenchromatographie von den <i>Cunninghamella elegans</i> -Stämmen 1908 und IFM 46109.....	93
Tabelle 15: Elementarnachweis (ICP-MS) des <i>Cunninghamella elegans</i> -Stamms 1908.....	94
Tabelle 16: Elementarnachweis (ICP-MS) des <i>Cunninghamella elegans</i> -Stamms IFM 46109.....	95
Tabelle 17: Phosphorbilanz und Biomassenbildung bei den Pilzen <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) und <i>Absidia corymbifera</i>	97
Tabelle 18: Quantitative fluoreszenzphotometrische Messung der Polyphosphate bei den Pilzen <i>Cunninghamella elegans</i> (Stamm 1908) und <i>Absidia corymbifera</i> . Die Kalibration erfolgte mit den Standards Budit 4 und Pentanatriumtriphosphat.....	97
Tabelle 19: Chemisch/physikalische Eigenschaften der unfiltrierten Proben sowie Gehalt an Ammonium.....	98
Tabelle 20: Ionenchromatographie, Nachweis von Anionen aus filtrierten Proben.....	98
Tabelle 21: Elementnachweis der unfiltrierten Proben mittels ICPMS, Darstellung sämtlicher Elemente in µg/kg.....	99
Tabelle 22: Elementnachweis der unfiltrierten Proben mittels ICPMS, Darstellung sämtlicher Elemente in µg/kg.....	103
Tabelle 23: Chemisch/physikalische Eigenschaften der unfiltrierten Proben sowie Gehalt an Ammonium.....	104
Tabelle 24: Ionenchromatographie, Nachweis von Anionen aus filtrierten Proben.....	104
Tabelle 25: Wachstum und Polyhydroxybuttersäurebildung bei <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i>	106

Tabelle 26: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Glyceringehalts im Medium bei Inkubation im Schüttelschrank durch <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).....	107
Tabelle 27: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Glyceringehalts im Medium bei Sauerstoffeintrag durch Rühren durch <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).....	108
Tabelle 28: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Glyceringehalts im Medium bei Belüftung mit technischer Luft durch <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).....	109
Tabelle 29: Bilanzierung des Substratverbrauchs von <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> . C: Kohlenstoff, N: Stickstoff, P: Phosphor.....	110
Tabelle 30: Bilanzierung der Biomasse und von PHBS von <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> . C _{Protein} : Kohlenstoff im Protein, C _{TG} : Kohlenstoff in Trockengewicht, C _{PHBS} : Kohlenstoff in Polyhydroxybuttersäure.....	111
Tabelle 31: Bilanzierung Substratverbrauch, Biomasse und PHBS von <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> . C _{Substrat} : Kohlenstoff im Substrat, C _{PHBS} : Kohlenstoff in Polyhydroxybuttersäure.....	111
Tabelle 32: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Glucosegehalts im Medium bei Sauerstoffeintrag durch Rühren durch <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).....	113
Tabelle 33: Veränderung des Phosphor-, Ammonium- und Acetatgehalts im Medium bei Sauerstoffeintrag durch Rühren durch <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> sowie gebildetes Trockengewicht (TG) und 3-Hydroxybuttersäure (3-OH-Buttersäure).....	114
Tabelle 34: Bilanzierung des Substratverbrauchs von <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> im Rühransatz mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. C: Kohlenstoff, N: Stickstoff, P: Phosphor.....	115
Tabelle 35: Bilanzierung der Biomasse und von PHBS von <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> im Rühransatz mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. C _{Protein} : Kohlenstoff im Protein, C _{TG} : Kohlenstoff in Trockengewicht, C _{PHBS} : Kohlenstoff in Polyhydroxybuttersäure.....	115
Tabelle 36: Bilanzierung Substratverbrauch, Biomasse und PHBS von <i>Paracoccus denitrificans</i> und <i>Cupriavidus necator</i> im Rühransatz mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. C _{Substrat} : Kohlenstoff im Substrat, C _{PHBS} : Kohlenstoff in Polyhydroxybuttersäure.....	116
Tabelle 37: Wachstum und PHB-Bildung in den Rühransätzen mit den Medien Steinbüchel und Mothes.....	117
Tabelle 38: Wachstum und PHB-Bildung nach Inkubation im Schüttelschrank mit den Medien Steinbüchel und Mothes.....	118
Tabelle 39: Wachstum und PHB-Bildung bei Begasung mit technischer Luft mit den Medien Steinbüchel und Mothes.....	119
Tabelle 40: Wachstum und PHB-Bildung bei Begasung mit Sauerstoff mit den Medien Steinbüchel und Mothes.....	120
Tabelle 41: ICP-MS Messung der Trockensubstanz bei den Rühransätzen bei Versuchsabbruch in den Medien Steinbüchel und Mothes.....	130
Tabelle 42: Substratverwertung im Medium von Acetat/Glucose, Ammonium und Phosphat bei Klärschlammbiozönose und <i>Cunninghamella elegans</i>	140
Tabelle 43: Konzentrationen von Puffer und Salzsäure bei den pH-Werten 6,2, 7,0 und 7,6.....	169
Tabelle 44: ICP-MS Messung der Trockensubstanz bei den Schüttelansätzen bei Versuchsabbruch in den Medien Steinbüchel und Mothes.....	185
Tabelle 45: ICP-MS Messung der Trockensubstanz bei Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff bei Versuchsabbruch in den Medien Steinbüchel und Mothes.....	186

9. Anhang

9.1 Mikrobielle Speicherung von Phosphor

9.1.1 Wachstumsverhalten von Rein- und Mischkultur im Vergleich

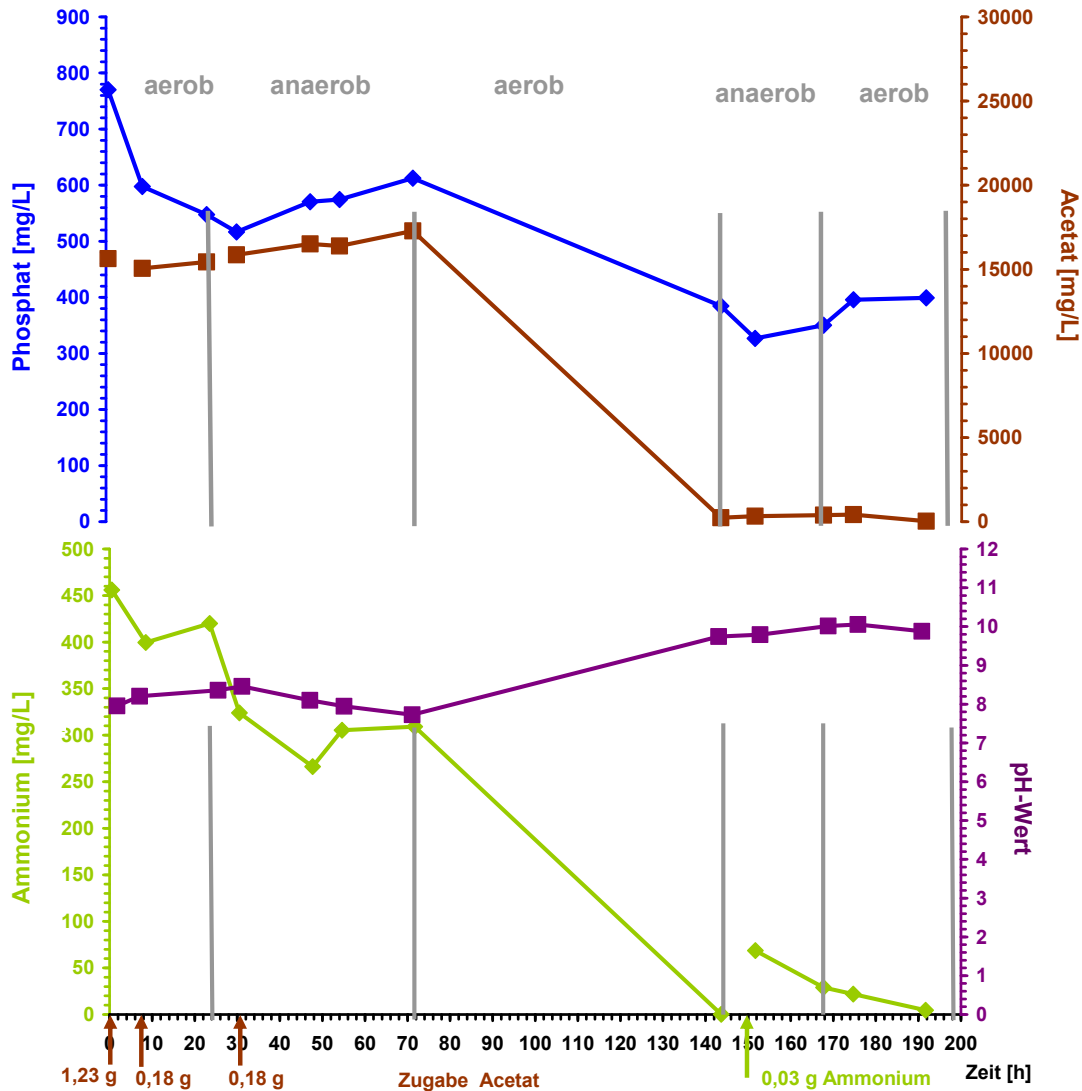


Abbildung 112 : Wachstumsverlauf und Substratverwertung in der Klärschlamm-biozönose.

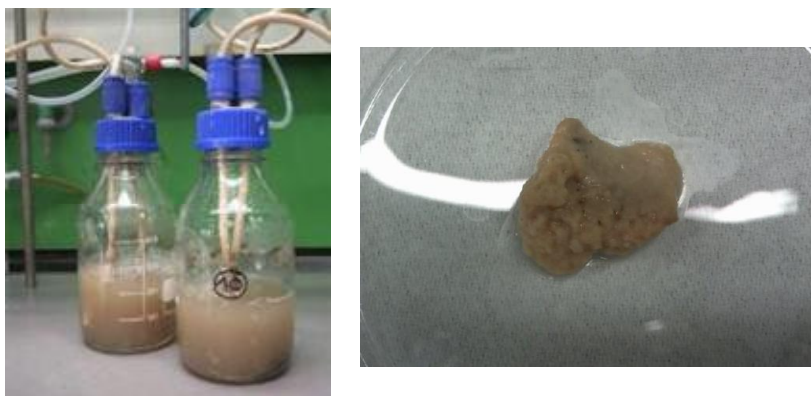


Abbildung 113: Wachstum der Mischkultur (links) im Minimalmedium nach 192 Stunden, sowie exemplarisches Partikel aus dem Ansatz (rechts).

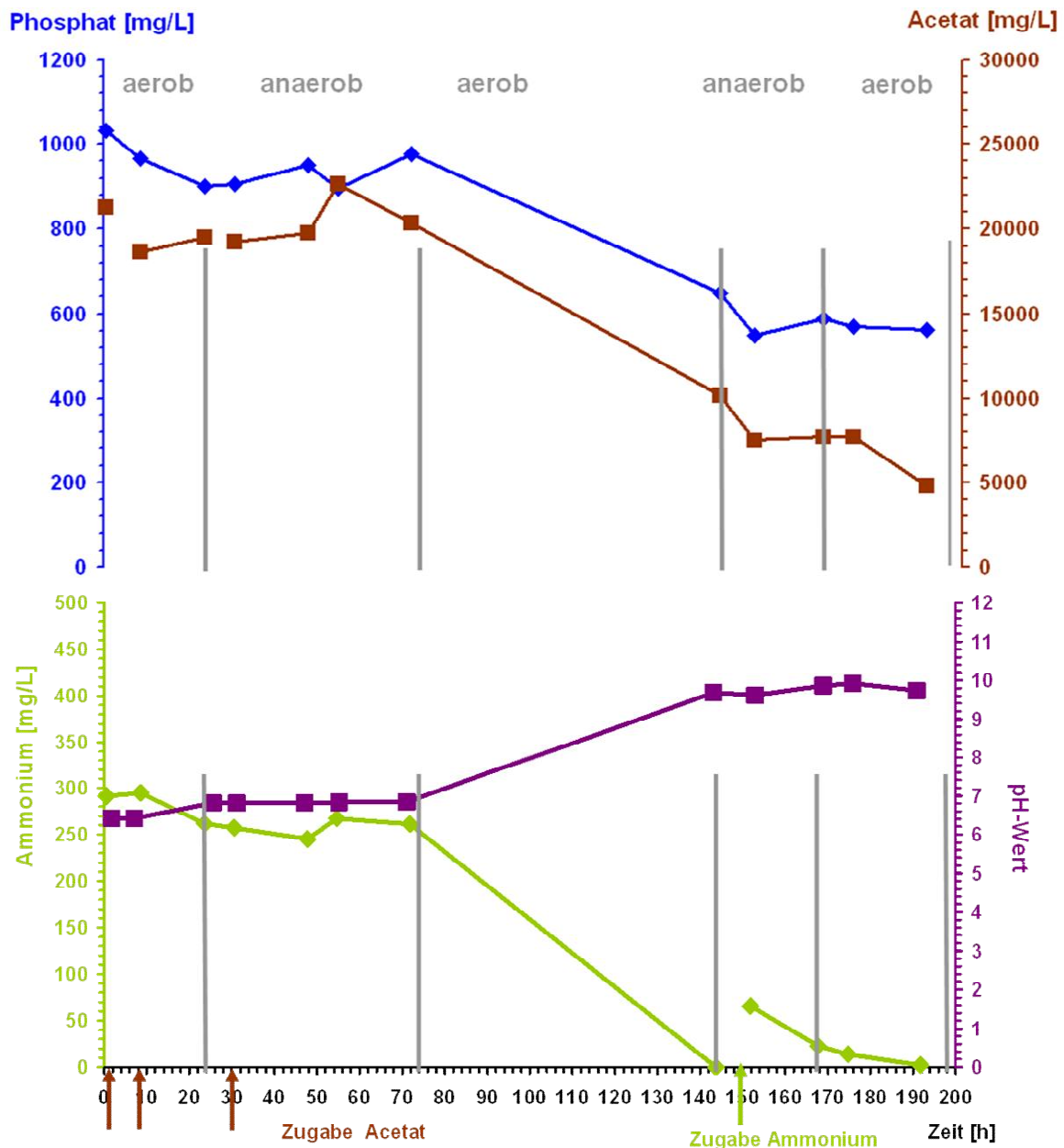


Abbildung 114: Wachstumsverlauf und Substratverwertung in der Reinkultur *Rhodococcus equi* 7512.



Abbildung 115: Wachstum der Reinkultur *Rhodococcus equi* 7512 (links) im Minimalmedium nach 192 Stunden, sowie exemplarisches Partikel aus dem Ansatz (rechts).

9.1.2 pH-Wert Einstellung während der Kultivierung der Klärschlammbiozönose

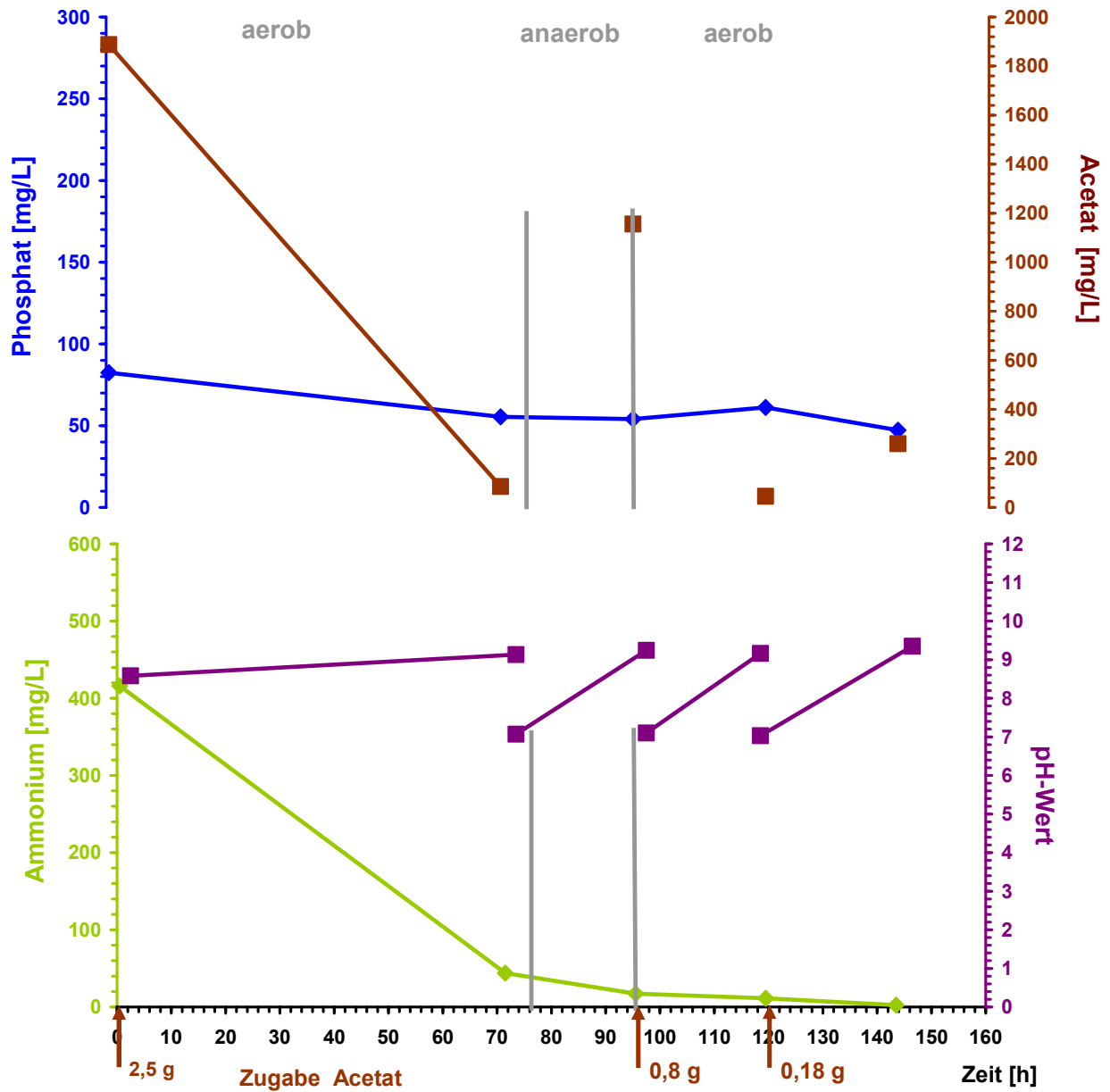


Abbildung 116: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert ~ 7,0 während der Versuchsdauer. Manueller Einsatz von Salzsäure.

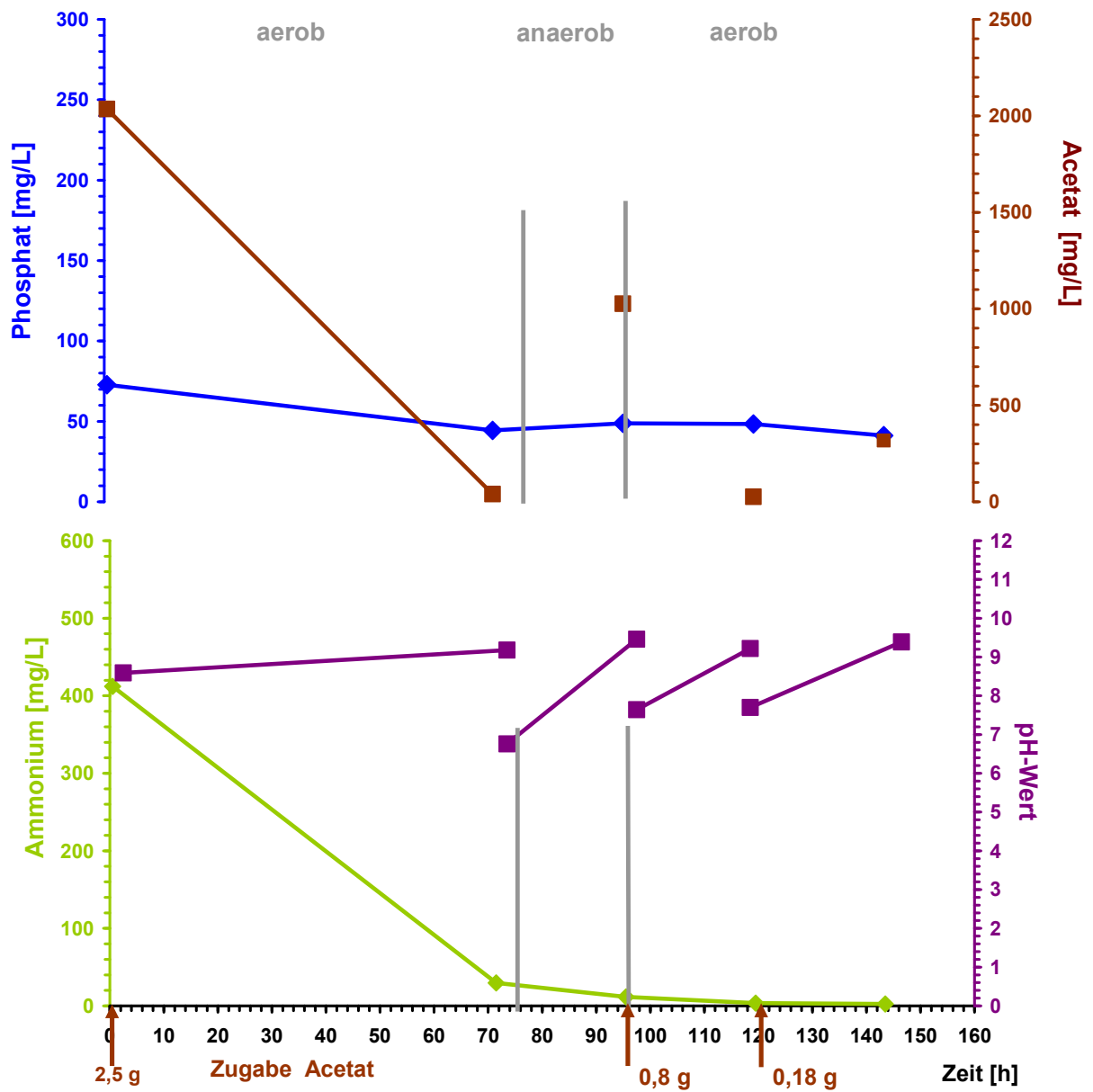


Abbildung 117: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert ~ 7,6 während der Versuchsdauer. Manueller Einsatz von Salzsäure.

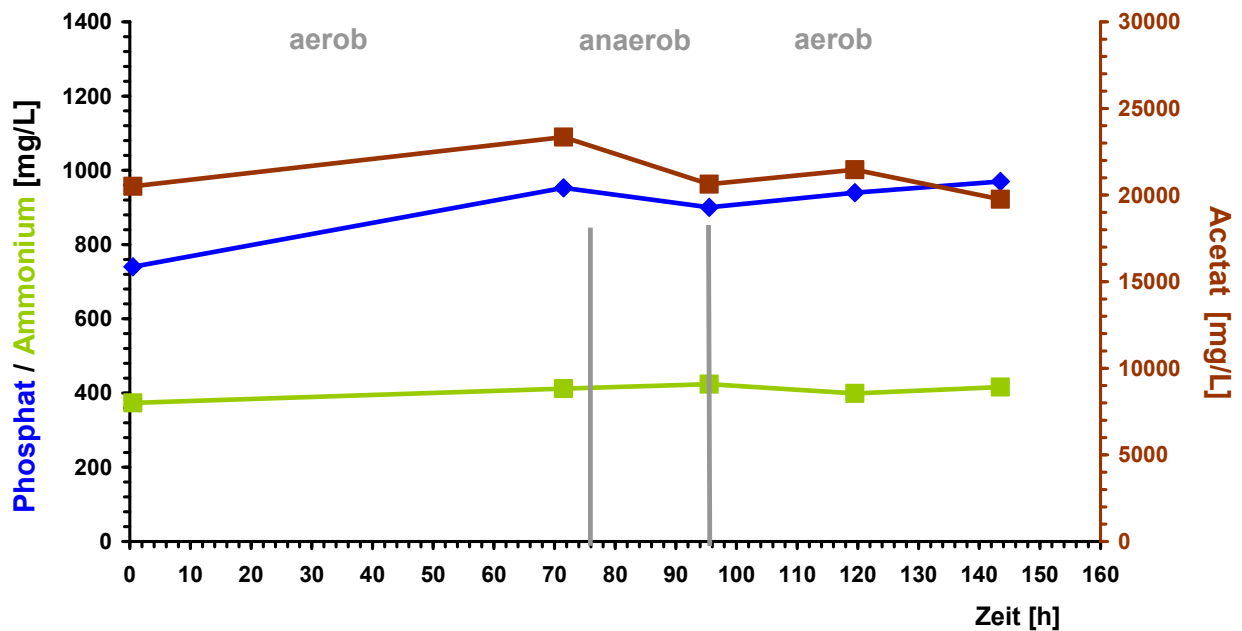


Abbildung 118: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert 7,3 während der Versuchsdauer. Einsatz von Imidazolpuffer.

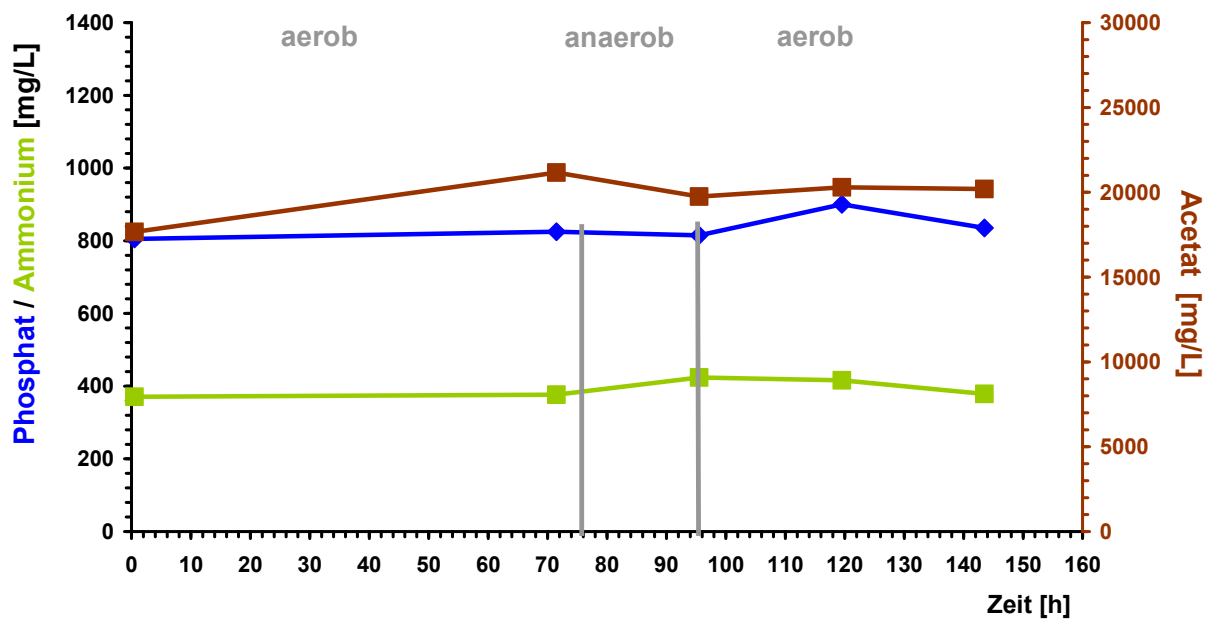


Abbildung 119: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert 7,7 während der Versuchsdauer. Einsatz von Imidazolpuffer.

Tabelle 43: Konzentrationen von Puffer und Salzsäure bei den pH-Werten 6,2, 7,0 und 7,6.

250 mL-Ansatz	pH = 6,2	pH = 7,0	pH = 7,6
Imidazolpuffer [mL] (Stammlösung: 13,62 g/100 mL)	6,25	6,25	6,25
1 molare HCl [mL]	10,75	6,00	2,33

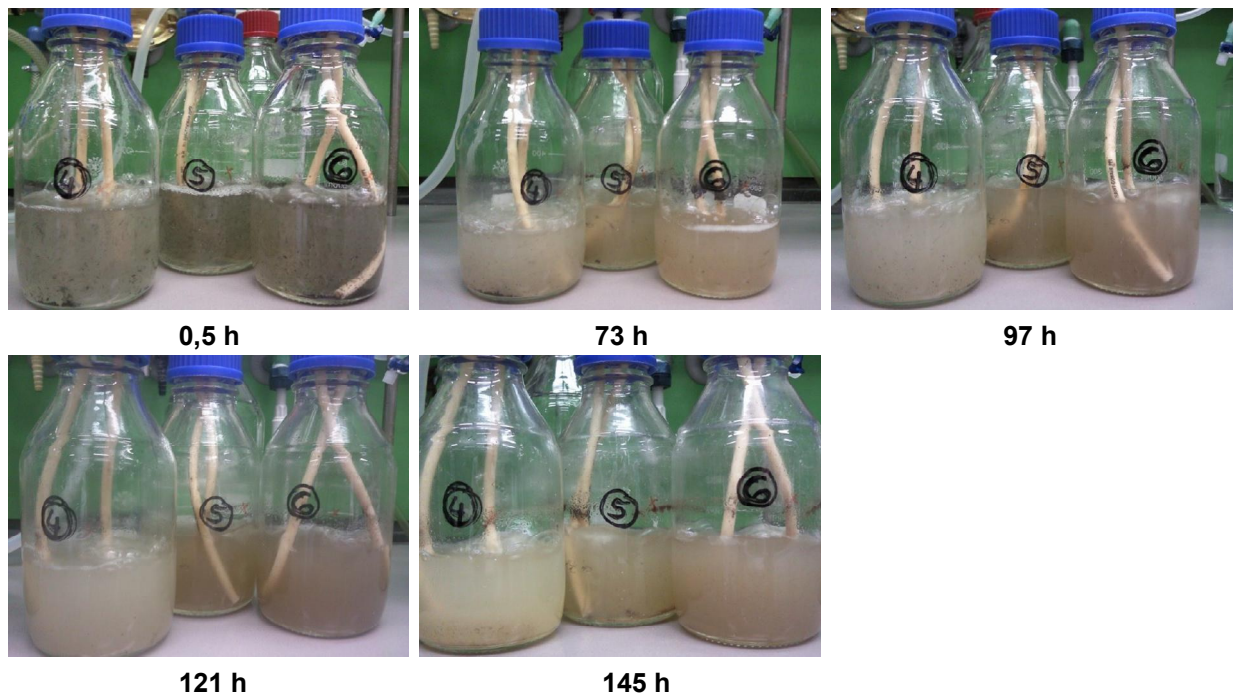


Abbildung 120: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert ~ 6 (links), 7,0 (mitte) und 7,8 (rechts) während der Versuchsdauer. Manueller Einsatz von Salzsäure.

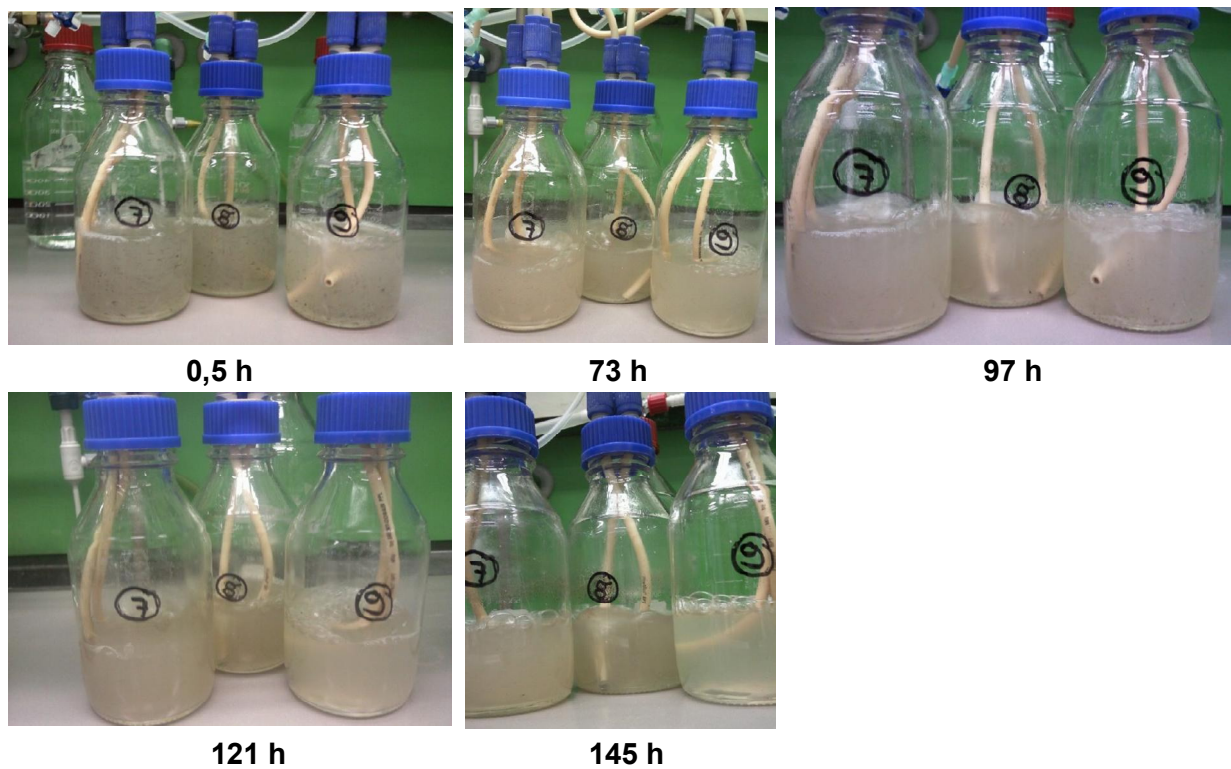


Abbildung 121: Reaktionsmedium mit 50 mL FSAS, gewünschter pH-Wert ~ 6 (links), 7,0 (mitte) und 7,8 (rechts) während der Versuchsdauer. Einsatz von Imidazolpuffer.

9.1.3 Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen und Phosphataufnahmekapazität bei *Cunninghamella elegans* im Medium nach Hesseltine und Anderson

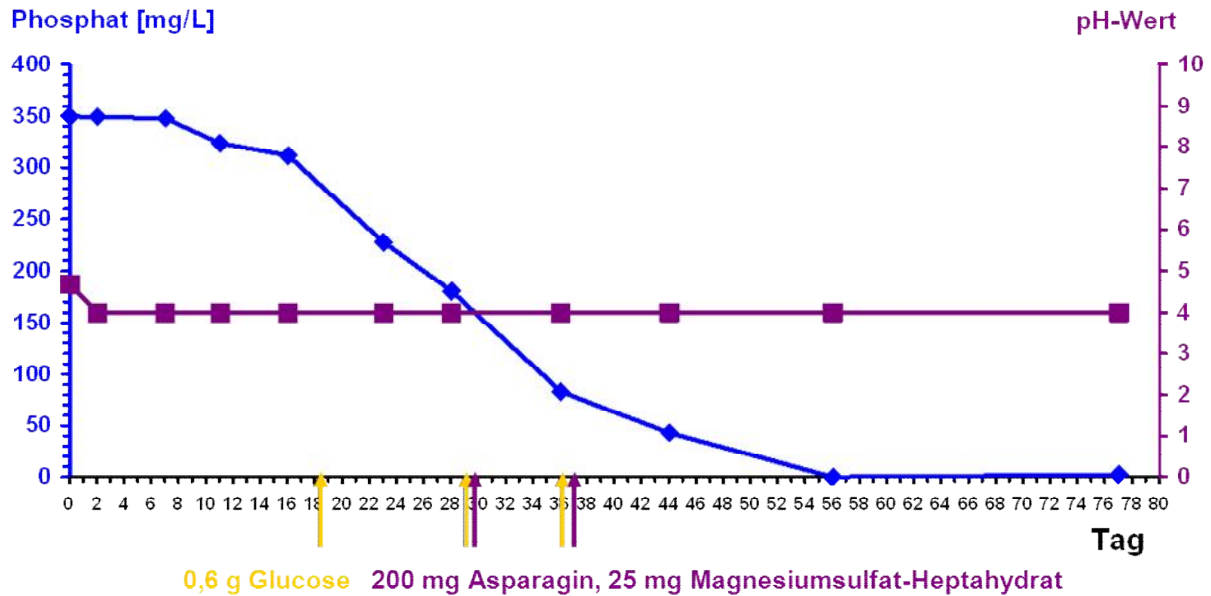


Abbildung 122: Phosphataufnahme und pH-Wert während des Wachstums von *Cunninghamella elegans* (Stamm 8271) im Medium nach Hesseltine und Anderson (mit Nachdosierung von Glucose und Asparagin).

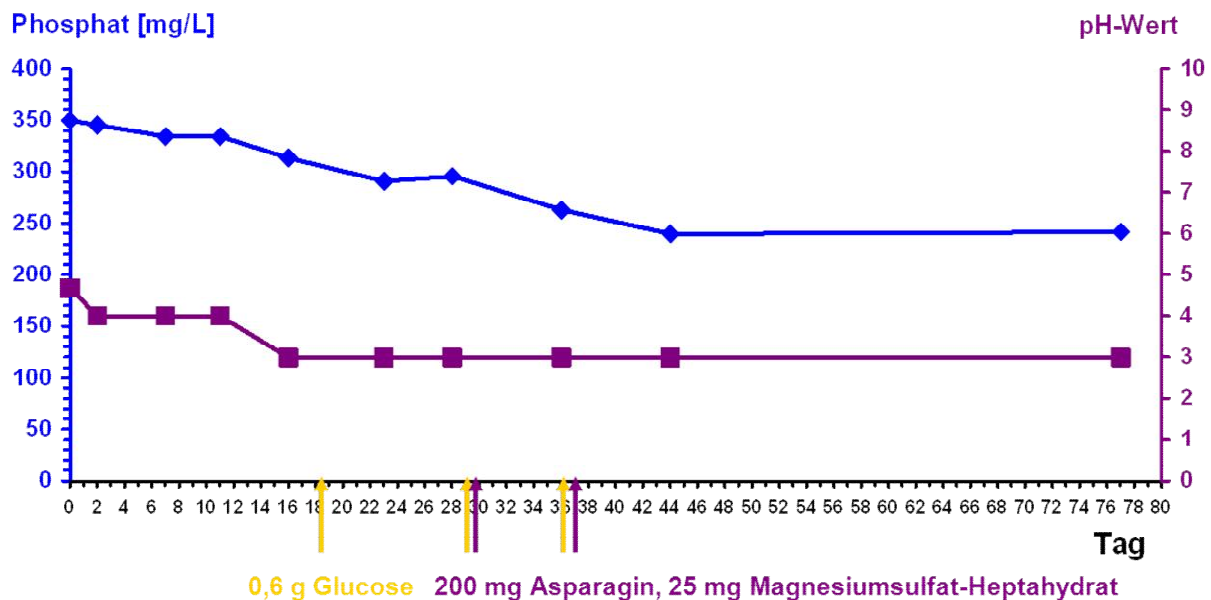


Abbildung 123: Phosphataufnahme und pH-Wert während des Wachstums von *Cunninghamella elegans* (Stamm 63299) im Medium nach Hesseltine und Anderson (mit Nachdosierung von Glucose und Asparagin).

9.1.4 Unterschiedliches Wachstumsaussehen von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908)

Je nach Einsatz von Feuchtmasse oder Pilzsporen ergibt sich ein unterschiedliches Aussehen der Hefekugeln (groß, klein, Klumpen). Hin und wieder ist eine Schaumbildung zu beobachten.



Abbildung 124: Wachstumscharakteristika von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) nach Kultivierung im Medium mit Hefeextrakt im Schüttelschrank.



Abbildung 125: Wachstumscharakteristika von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) nach Kultivierung im Medium mit Hefeextrakt und Begasung mit technischer Luft.

Die folgenden Abbildungen 126 und 127 zeigen die Ansätze mit unterschiedlichen Sporen-Animpfmengen von 5 bis 1000 μL des Pilzes *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt unter identischen Kultivierungsbedingungen.

Die Zahl der Animpfmenge wirkt sich kaum auf die Biomassenbildung (Trockensubstanz) aus, obwohl die Ausprägungsform der Pilzkolonien unterschiedlich ist.

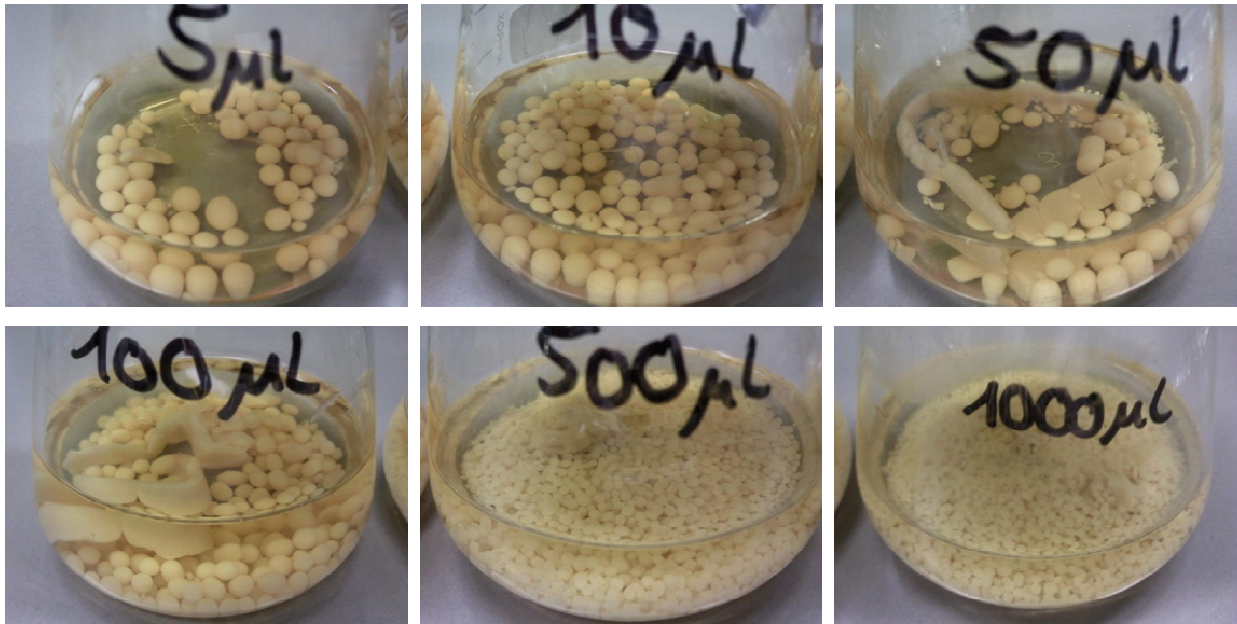


Abbildung 126: Wachstumscharakteristik von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) bei unterschiedlicher Sporenmenge Inkubation im Schüttelschrank.

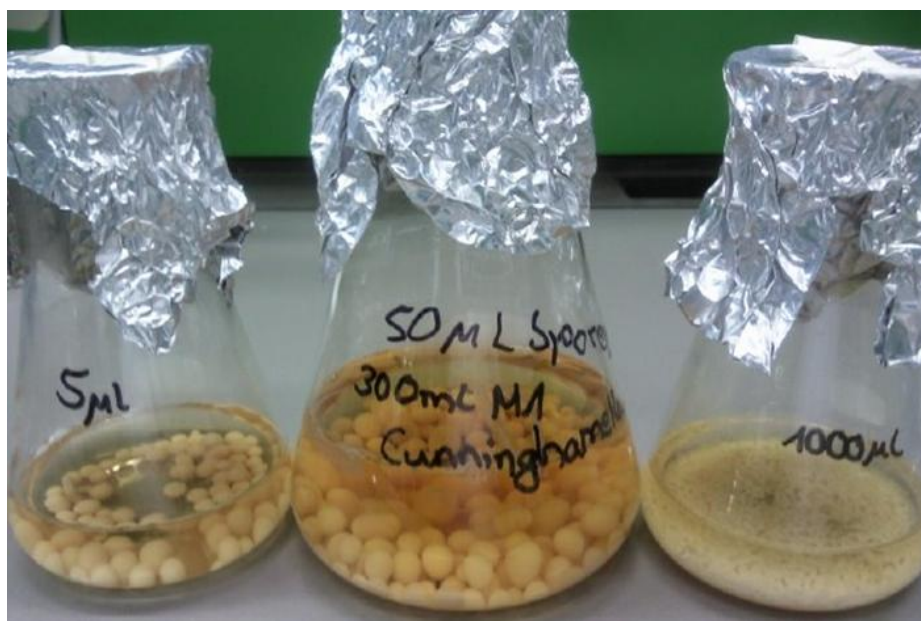


Abbildung 127: Wachstumscharakteristik von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) bei unterschiedlicher Sporenmenge nach 68 Stunden Inkubation im Schüttelschrank.

9.1.5 Einfluss der Substrate Glucose, Glycerin und Acetat auf das Wachstumsverhalten von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt

In der Abbildung 128 sind die Wachstumszustände in den Ansätzen nach 45 Stunden festgehalten.

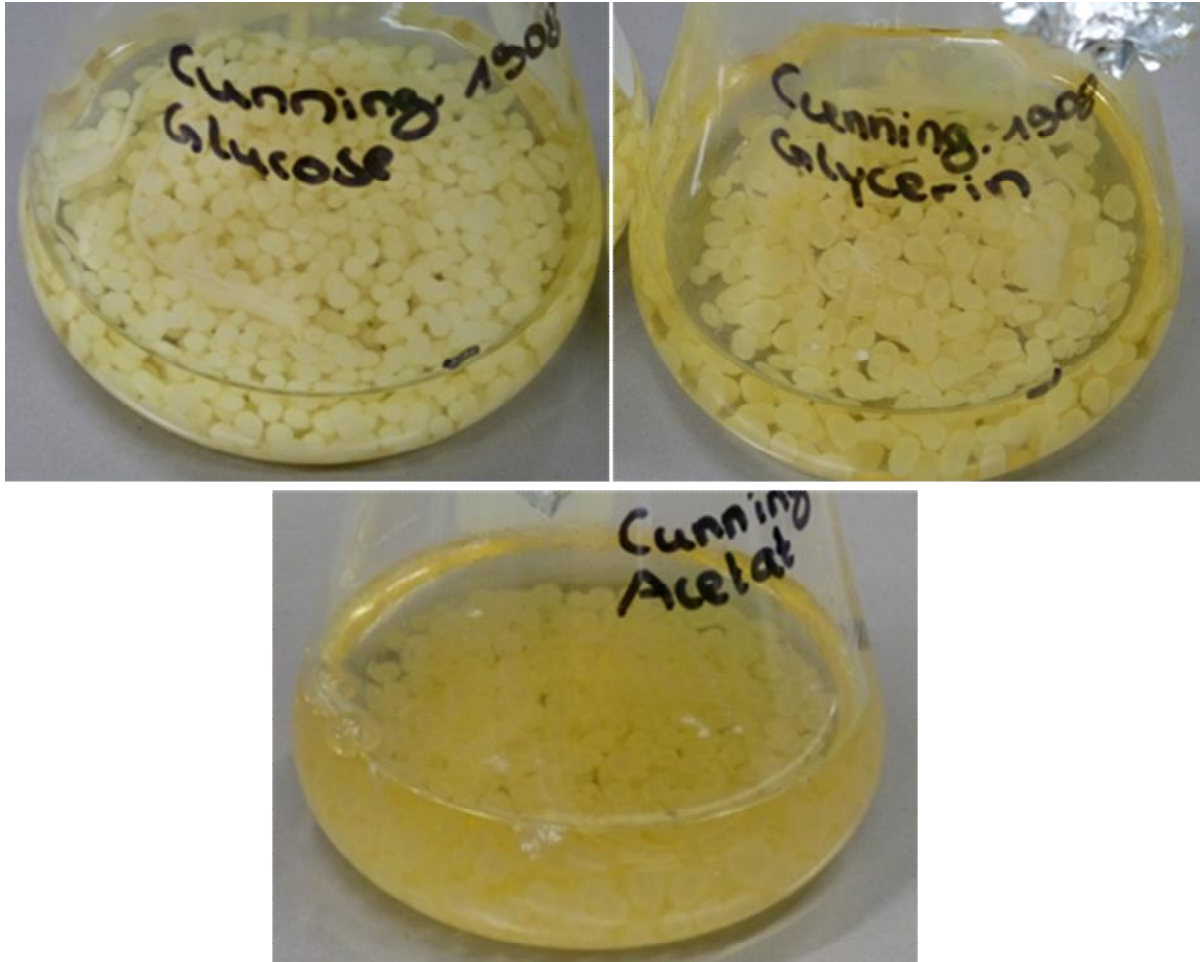


Abbildung 128: Wachstumscharakteristik von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) mit Glucose (oben links), Glycerin (oben rechts) und Acetat (unten Mitte) nach 2 Tagen.

Es fällt auf, dass bei *Cunninghamella elegans* im Medium mit Acetat die kugelförmigen Kolonien durchsichtig erscheinen. Zudem sind Hinweise auf eine bevorstehende Lyse erkennbar.

9.1.6 Wachstumsverhalten von *Cunninghamella elegans*, *Absidia corymbifera*, *Mucor plumbeus*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus*^T in den Medien mit und ohne Hefeextrakt bei Inkubation im Schüttelschrank

Die Morphologie der Pilze verändert sich nicht bei Einsatz des Mediums mit und ohne Hefeextrakt.



Abbildung 129: Ansätze bei Versuchsabbruch, *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).

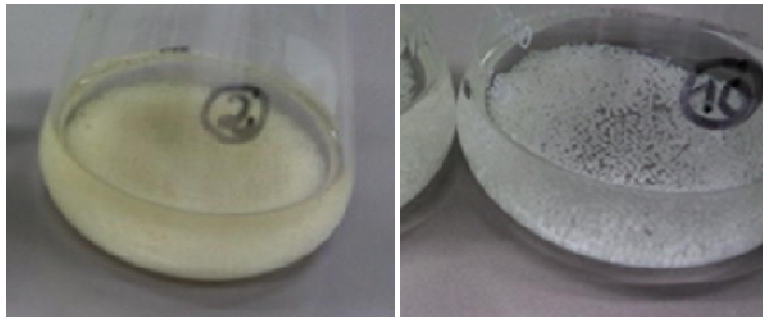


Abbildung 130: Ansätze bei Versuchsabbruch, *Cunninghamella elegans* (Stamm 63299) im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).

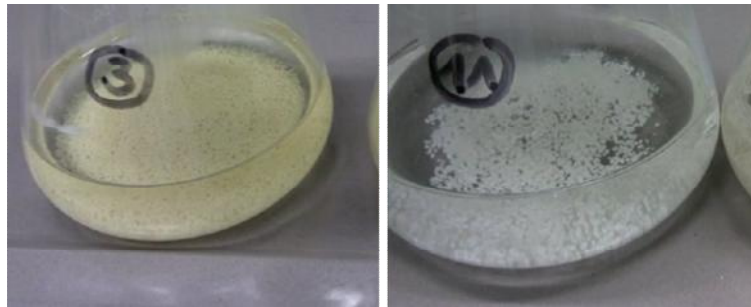


Abbildung 131: Ansätze bei Versuchsabbruch, *Cunninghamella elegans* (Stamm 8271) im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).

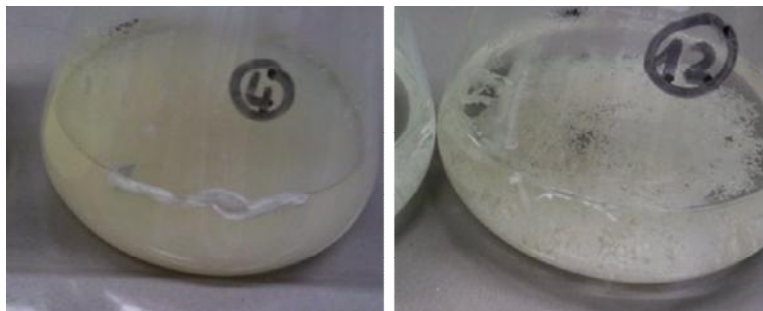


Abbildung 132: Ansätze bei Versuchsabbruch, *Cunninghamella elegans* (Stamm IFM 46109) im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).

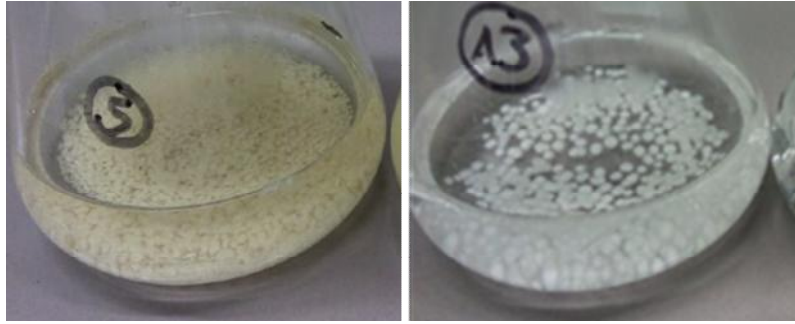


Abbildung 133: Ansätze bei Versuchsabbruch, *Absidia corymbifera* im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).



Abbildung 134: Ansätze bei Versuchsabbruch, *Mucor plumbeus* im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).

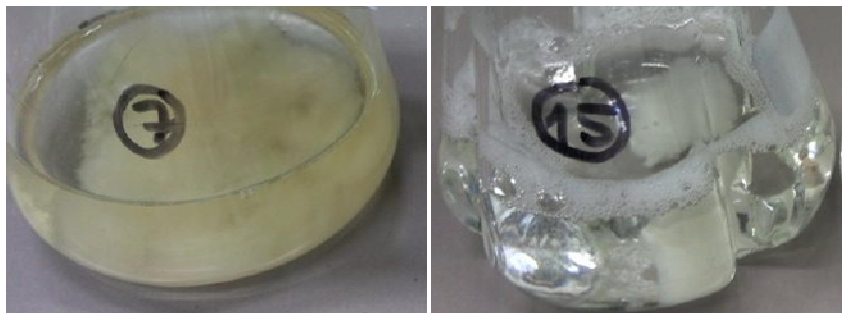


Abbildung 135: Ansätze bei Versuchsabbruch, *Mucor racemosus*^T im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).



Abbildung 136: Ansätze bei Versuchsabbruch, *Rhizopus stolonifer* im Medium mit Hefeextrakt (links) und im Medium ohne Hefeextrakt (rechts).

9.1.7 Mikroskopische Untersuchungen von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908), *Absidia corymbifera* und *Mucor plumbeus*

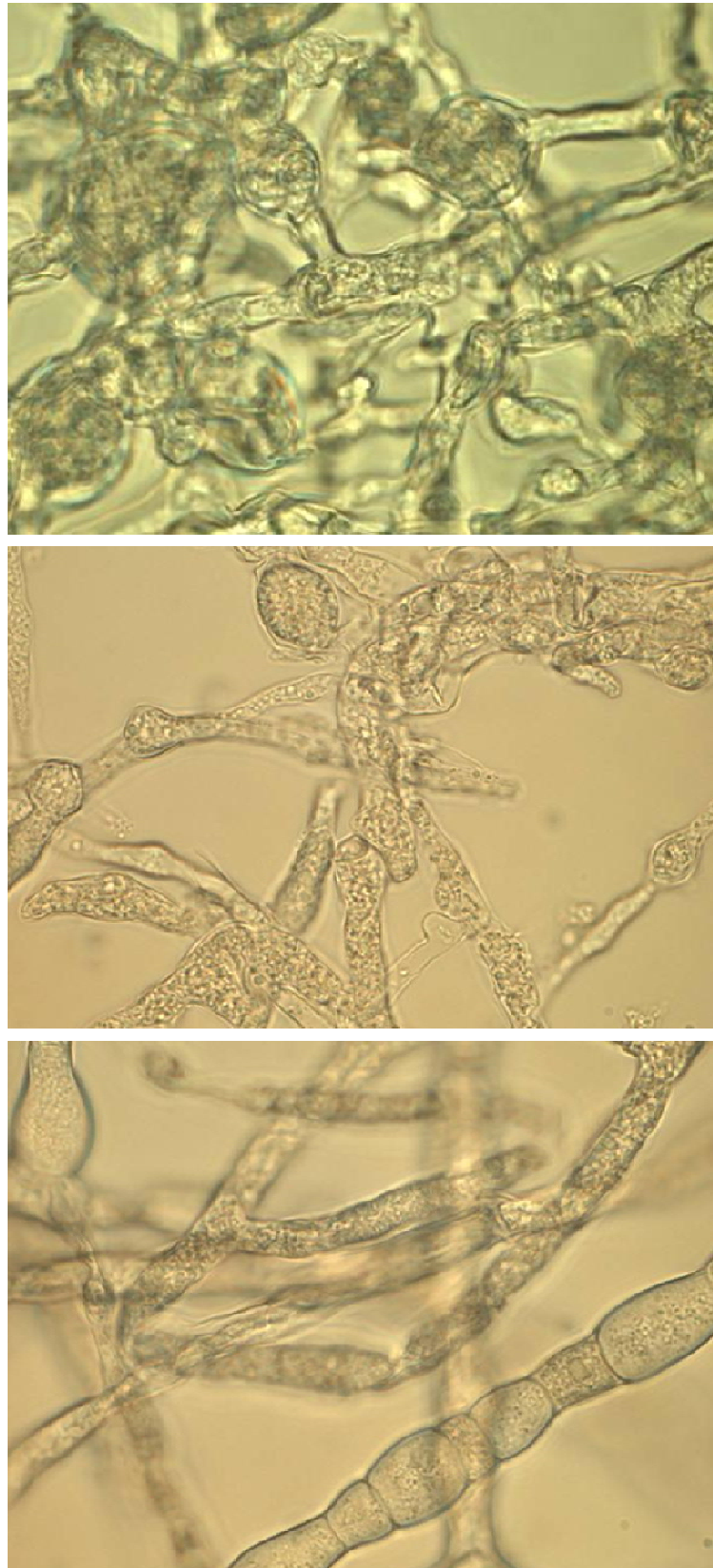


Abbildung 137: Nativpräparate von *Cunninghamella elegans* (oben), *Absidia corymbifera* (Mitte) und *Mucor plumbeus* (unten).



Abbildung 138: Neisser-Färbung von *Cunninghamella elegans*-Stamm 1908 (links) und *Absidia corymbifera* (rechts).

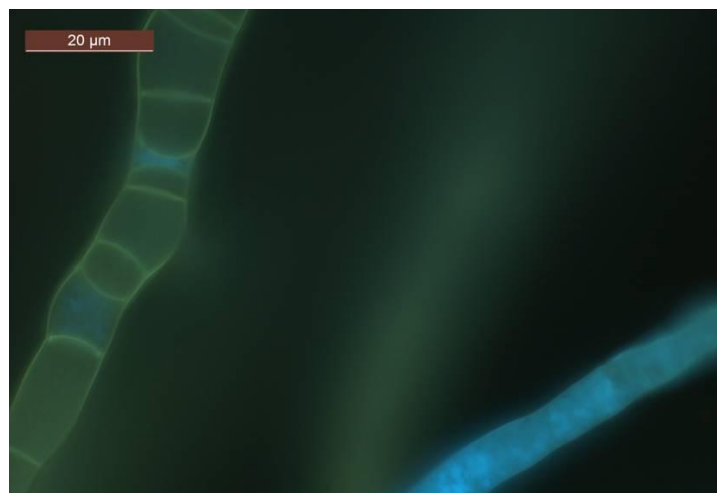
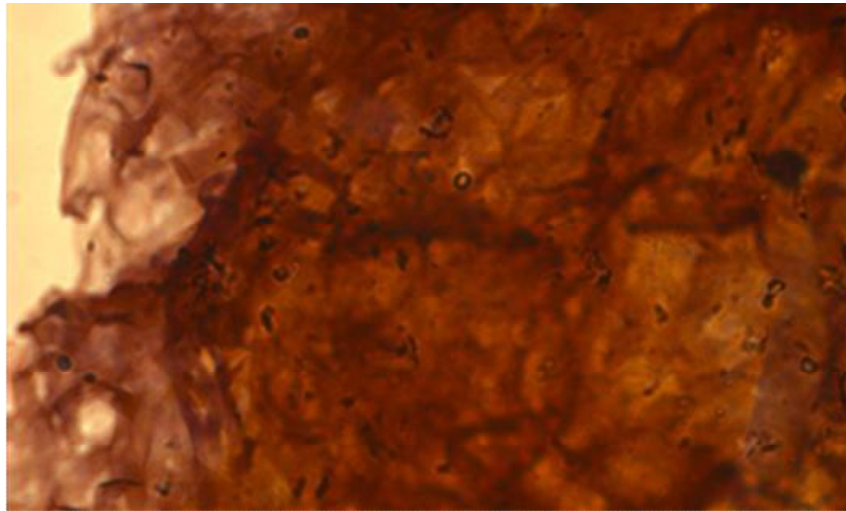
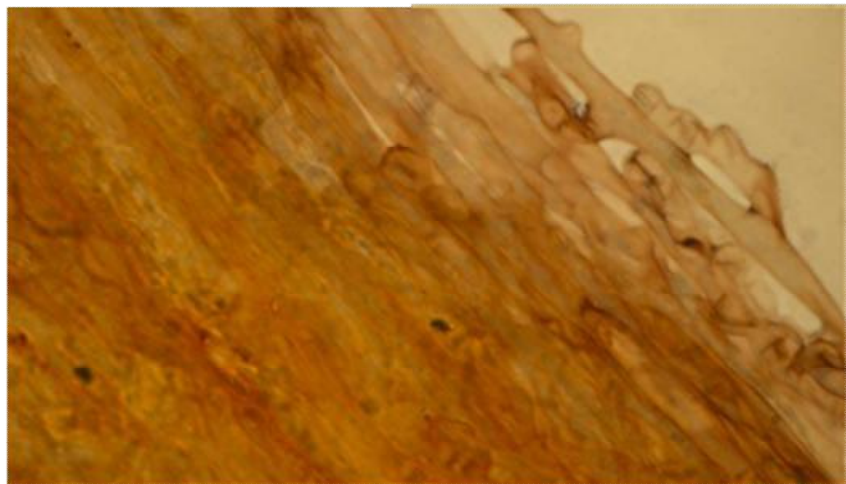


Abbildung 139: DAPI-Färbung von *Mucor plumbeus*.

Fraktion 1



Fraktion 2



Fraktion 3

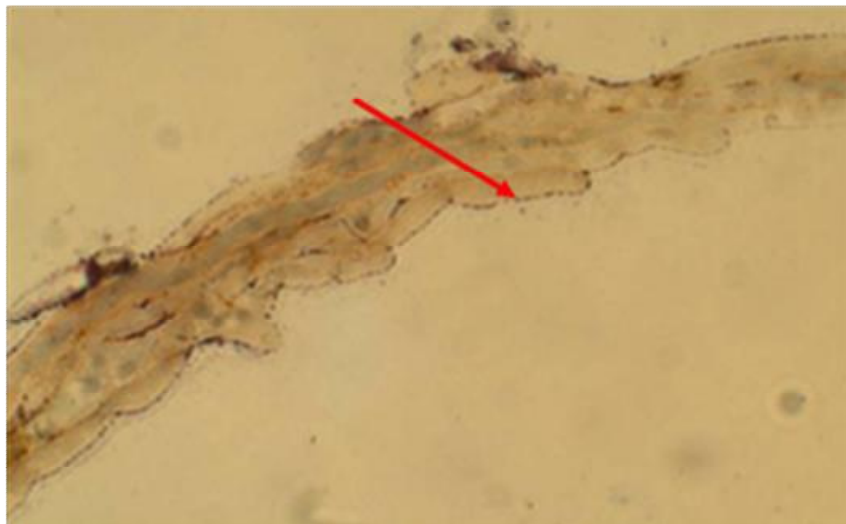
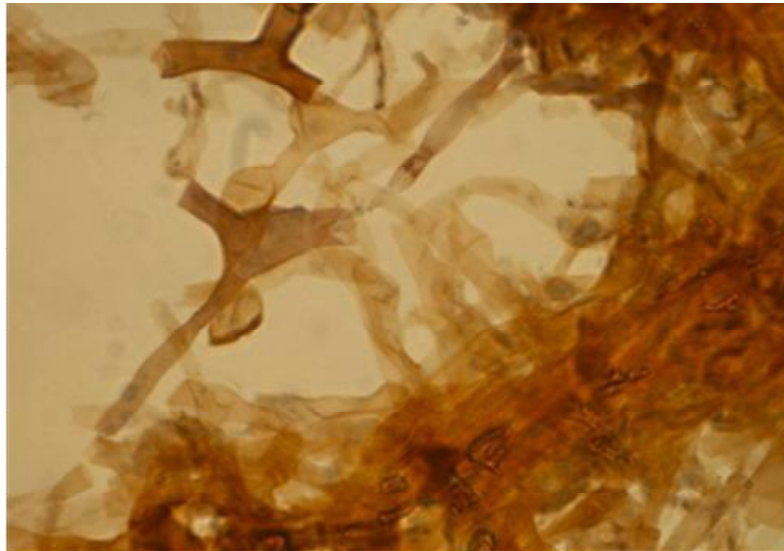


Abbildung 140: Polyphosphatextraktion von *Cunninghamhamella elegans* gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5, oben links Fraktion 1, oben rechts Fraktion 2, unten Mitte Fraktion 3.

Fraktion 1



Fraktion 2



Fraktion 3

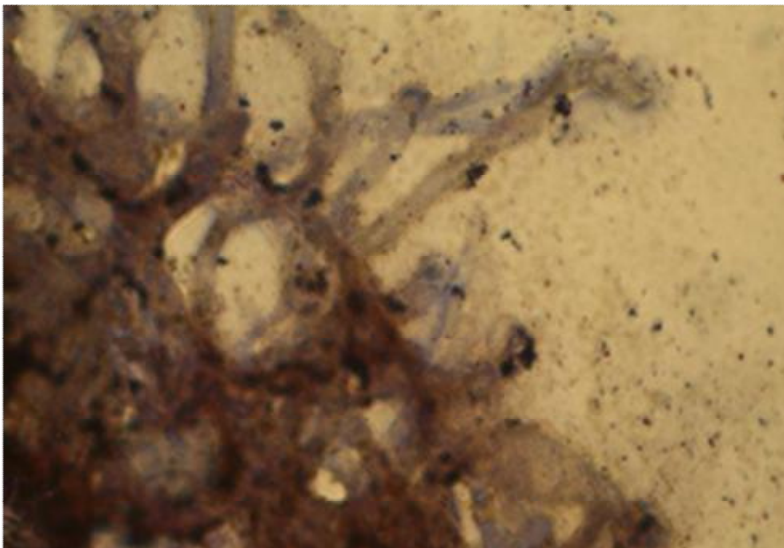


Abbildung 141: Polyphosphatextraktion von *Cunninghamella elegans* gewaschen mit bidest. Wasser pH 2, oben links Fraktion 1, oben rechts Fraktion 2, unten Mitte Fraktion 3.

9.1.8 Polyphosphat- Nachweis mittels Gelelektrophorese bei den Pilzen *Cunninghamella elegans*, *Absidia corymbifera* und *Rhizopus stolonifer*

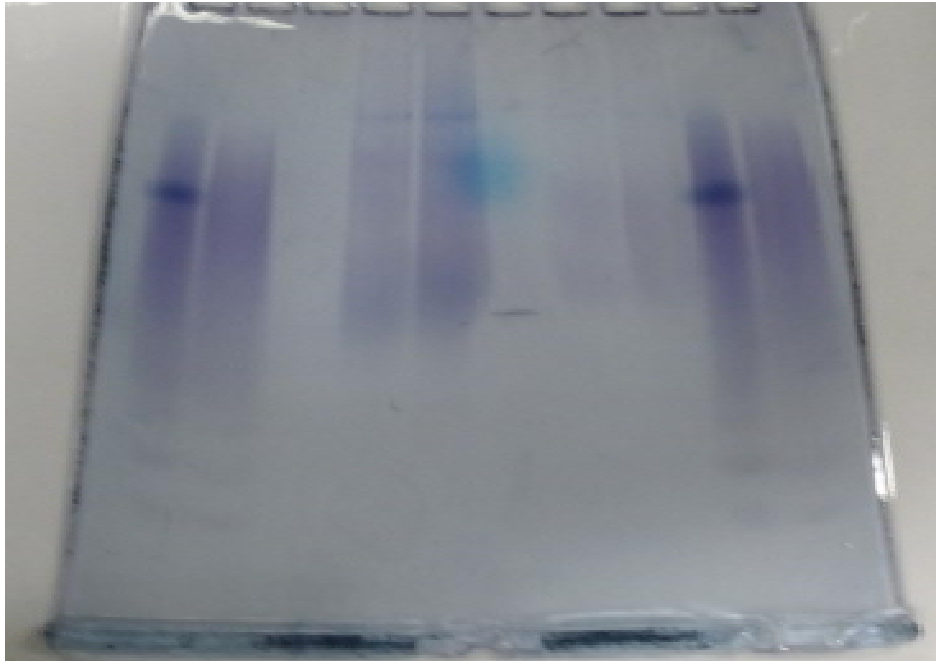


Abbildung 142: TBE- Gel nach Behandlung mit Entfärbelösung, Bahnen 1, 2, 9 und 10: Standard (Kettenlänge ~ 28), Probenpuffer mit bzw. ohne Farbstoff
Bahnen 3-5: Fraktionen 1, 2 und 3 von *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) (nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5),
Bahnen 6-8: Fraktionen 1, 2 und 3 von *Absidia corymbifera* (nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5).

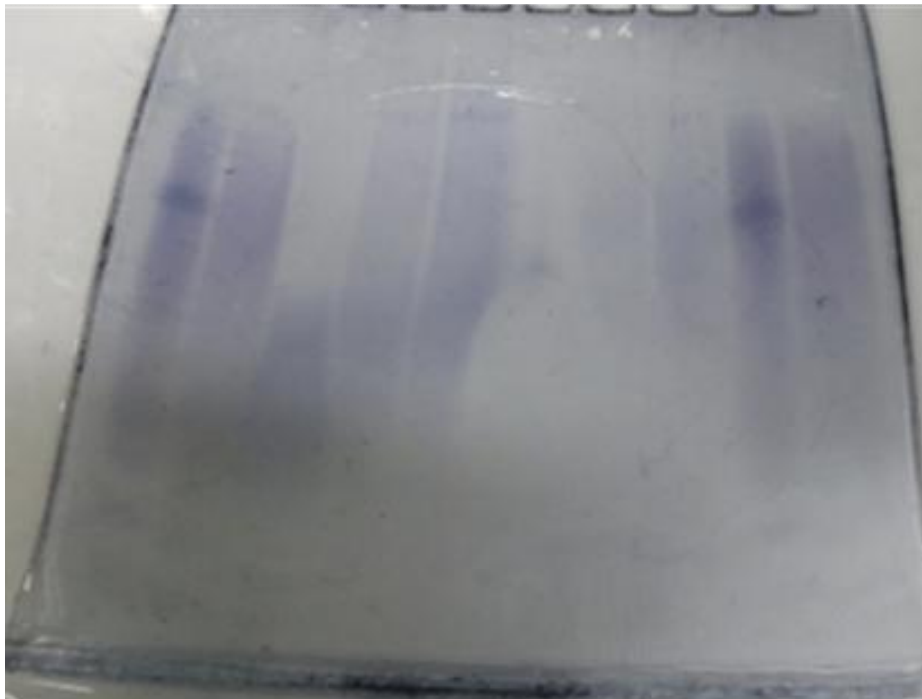


Abbildung 143: TBE- Gel nach Behandlung mit Entfärbelösung, *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) und *Absidia corymbifera* nach Waschen mit bidest. Wasser pH 2, Bahnenverteilung wie in Legende der Abbildung 142.

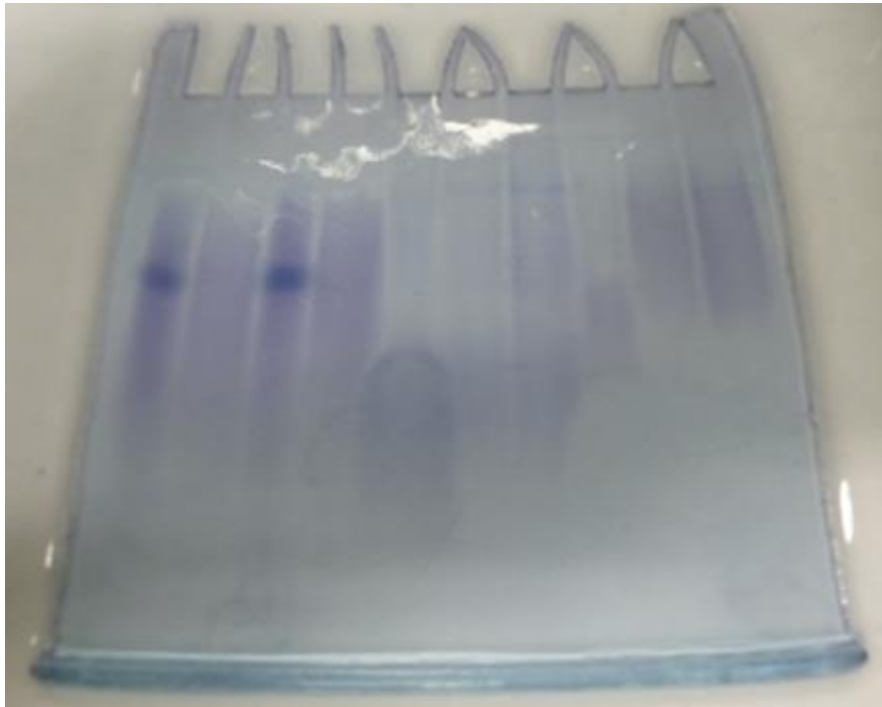


Abbildung 144: TBE- Gel nach Behandlung mit Entfärbelösung,
Bahnen 1 bis 4: Standard (Kettenlänge ~ 28), Probenpuffer mit bzw. ohne
Farbstoff
Bahnen 5-7: Fraktionen 1, 2 und 3 von *Cunninghamhamella elegans* (Stamm IFM
46109) (nach Waschen mit bidest. Wasser pH 5,5),
Bahnen 8-10: Fraktionen 1, 2 und 3 von *Rhizopus stolonifer* (nach Waschen mit
bidest. Wasser pH 5,5).

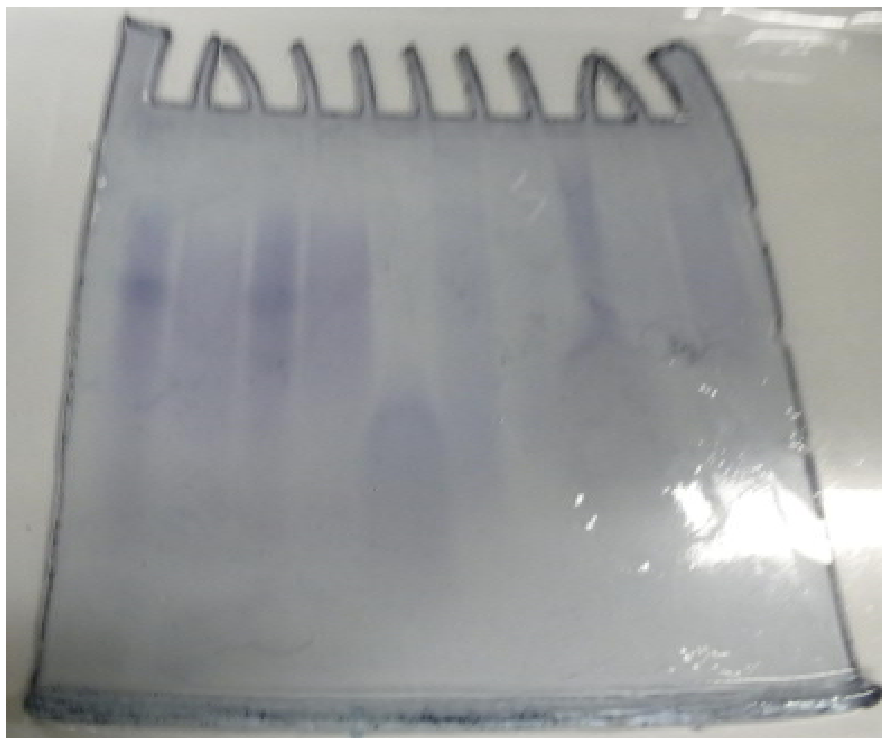


Abbildung 145: TBE- Gel nach Behandlung mit Entfärbelösung, *Cunninghamhamella elegans*
(Stamm IFM 46109) und *Rhizopus stolonifer* nach Waschen mit bidest.
Wasser pH 2, Bahnenverteilung wie in Legende der Abbildung 144.

9.2 Mikrobielle Speicherung von Polyhydroxybuttersäure

9.2.1 Polyhydroxybuttersäure-Isolierung bei dem Pilz *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908)

Der gewonnene Polyspeicherstoff setzt sich nach mehreren Stunden oder Zentrifugation nur teilweise bis gar nicht ab. → Hoher Verlust an Ausbeute, da die Pilze auch so nur sehr geringe Mengen an Poly-3-Hydroxybuttersäure speichern.

Problem Phasentrennung: In der Literatur wird 25 % iges Natriumhypochlorit verwendet. Käuflich erwerben kann man aber nur 10 % iges. Die Herstellung ist sehr aufwendig und man braucht spezielle Vorrichtungen, deshalb nicht möglich.

Versuch die unterschiedlichen Polaritäten mit folgenden Substanzen zu beeinflussen:

DMF (Dimethylformamid), Kochsalz, Ethanol und Octanol.

DMF → Feststoff steigt nach oben

Kochsalz → Feststoff steigt nach oben (deutlichster Effekt)

Ethanol → Feststoff löst sich auf

Octanol → deutlich 2-Phasenbildung aber Feststoff löst sich auf.

Die Abbildung 146 zeigt das Falcon nach Zentrifugation. Der gewonnene feine Polyspeicherstoff ist in Schwebe und lässt sich nicht absetzen. 3-Hydroxybuttersäure konnte weder enzymatisch noch mittels Gaschromatographie nachgewiesen werden.

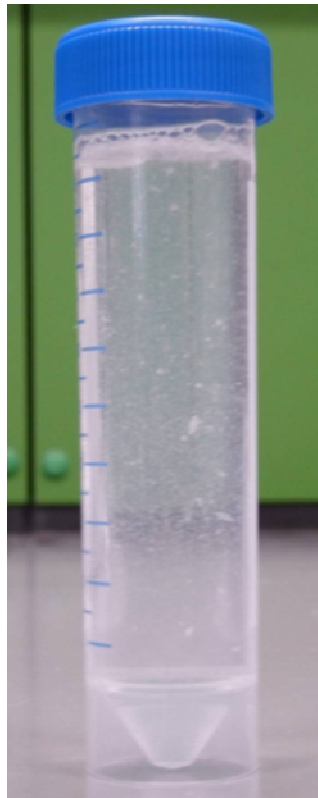


Abbildung 146: Falcon nach der Zellyse mit 10 % iger Natriumhypochlorit-Lösung, Verdünnung mit bidest. Wasser und Zentrifugation bei 3500 rpm.

9.2.2 Mikroskopischer Polyhydroxybuttersäure- Nachweis mittels Sudanschwarz-Färbung bei *Cunninghamella elegans* und *Absidia corymbifera*

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigen die Pilze *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) und *Absidia corymbifera* gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5 und pH 2.

Problematisch ist hierbei die Pilzdicke trotz kurzer Ultraschallbehandlung. Das Entfärben des Sudanschwarzes ist nur durch mehrmaliges spülen mit Xylol möglich. Es kann deshalb zu Verfälschungen der Farben kommen.

Die Pilzzellen gewaschen mit bidest. Wasser pH 5,5 weisen keine dunkelblauen Polyhydroxybuttersäure Granula auf.

Hingegen zeigen die gewaschen Proben mit bidest. Wasser pH 2 dunkelblaue Granula im Myzel bzw. in der Suspension.

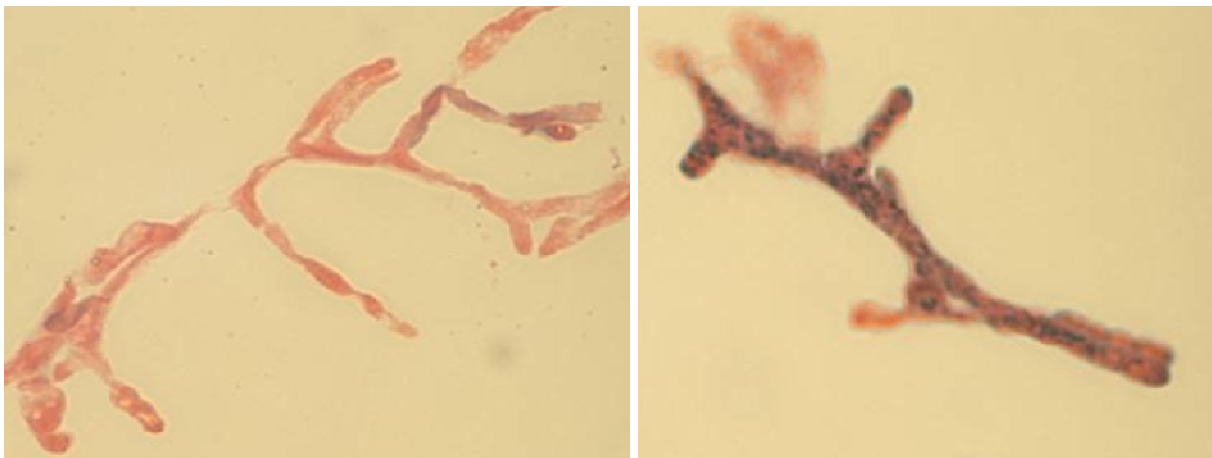


Abbildung 147: *Cunninghamella elegans* (Stamm 1908) mit bidest. Wasser pH 5,5 gewaschen (links) und mit bidest. Wasser pH 2 gewaschen (rechts) unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung mit Öl.

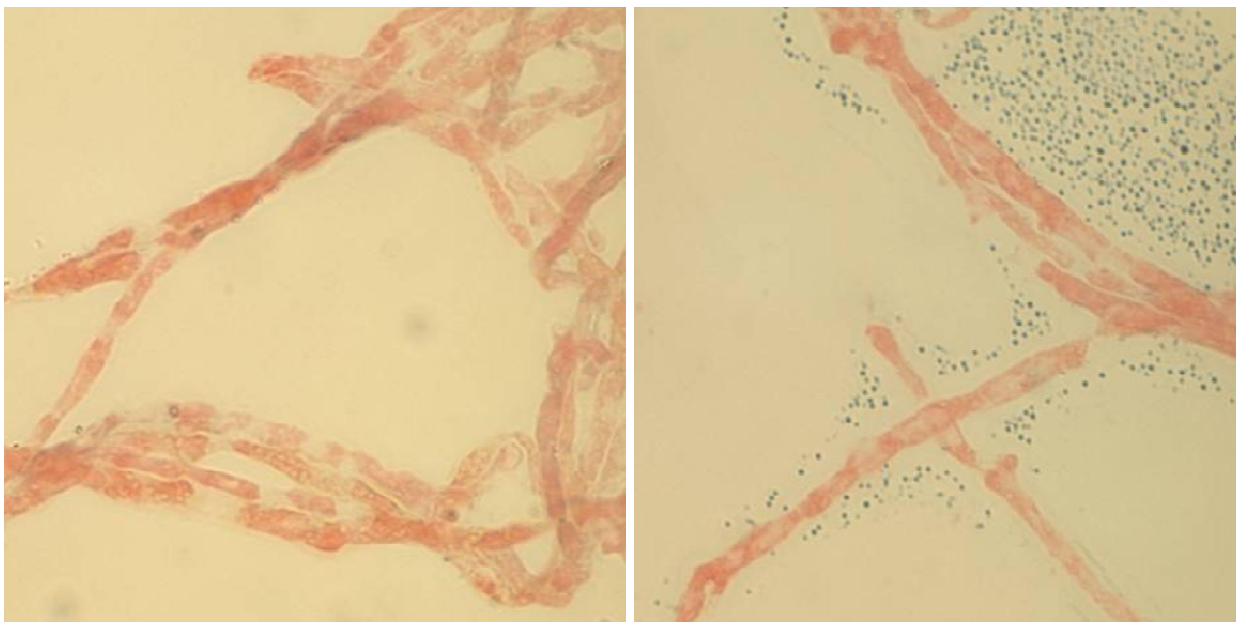


Abbildung 148: *Absidia corymbifera* mit bidest. Wasser pH 5,5 gewaschen (links) und mit bidest. Wasser pH 2 gewaschen (rechts) unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung mit Öl.

9.2.3 Elementverteilung in der Biomasse bei *Paracoccus denitrificans* und *Cupriavidus necator*

Tabelle 44: ICP-MS Messung der Trockensubstanz bei den Schüttelansätzen bei Versuchsabbruch in den Medien **Steinbüchel** und Mothes.

	<i>Paracoccus denitrificans</i> mg/kg					<i>Cupriavidus necator</i> mg/kg				
Aluminium	< 0,8	< 1	1	1	< 0,7	< 1,8	< 0,9	0,9	5	5
Arsen	< 0,8	< 1	< 0,8	< 1,0	< 0,7	< 1,8	< 0,9	< 0,6	< 1,0	< 0,6
Barium	< 0,4	3	< 0,3	1	0,4	< 0,8	< 0,4	< 0,3	1	< 0,3
Beryllium	< 0,8	< 1	< 0,8	< 1,0	< 0,7	< 1,8	< 0,9	< 6,0	< 1,0	< 0,6
Blei	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3	< 0,8	< 0,4	< 0,3	1	< 0,3
Bor	< 8,0	< 9,9	< 7,4	< 9,5	< 6,5	< 1,8	< 8,8	< 6,0	< 10,0	< 5,5
Cadmium	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3	< 0,8	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3
Calcium	550	686	507	417	572	< 176,0	260	136	116	320
Chrom	< 0,4	0,4	< 0,3	0,4	< 0,3	< 0,8	< 0,4	< 0,3	2	0,4
Cobalt	< 0,4	< 0,4	0,4	< 0,4	0,4	< 0,8	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3
Eisen	128	144	172	50	173	276	148	91	649	155
Kalium	19.049	13.204	15.775	6.887	12.330	7.442	8.060	8.832	8.879	10.688
Kupfer	1	1,8	1,3	68	1,2	8	2	1	14,1	1
Magnesium	2.822	4.375	3.664	1.713	3.806	2.423	2.455	1.827	1.805	2.594
Mangan	3	3	3	98	3	2	1	< 0,3	13	1
Molybdän	736	715	1	7	1	2	1	0,6	4	0,4
Natrium	18.100	20.300	24.400	1.363	20.600	9.544	7.410	11.300	1.001	8.978
Nickel	< 0,4	< 0,4	1	< 0,4	< 0,3	< 0,8	< 0,4	3	1	< 0,3
Phosphor	26.604	30.997	29.128	19.155	28.516	21.571	20.581	23.324	17.400	24.311
Rubidium	1	1	1	0,7	1	< 0,8	1	1	1	0,9
Selen	< 1,3	< 1,6	< 1,2	< 1,6	< 1,1	< 2,9	< 1,5	< 1,0	< 1,6	< 0,9
Strontium	< 0,4	0,5	0,3	0,9	0,4	< 0,8	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3
Tellur	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3	< 0,8	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3
Thallium	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3	< 0,8	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3
Vanadium	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3	< 0,8	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3
Zink	40	50	47	79	57	65	49	47	56	38
Zinn	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3	< 0,8	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,3
[h]	23,5	70	69,8	69,8	119	23,5	70	69,8	69,8	119

Tabelle 45: ICP-MS Messung der Trockensubstanz bei Begasung mit technischer Luft und Sauerstoff bei Versuchsabbruch in den Medien **Steinbüchel und Mothes.**

	<i>Paracoccus denitrificans</i> mg/kg					<i>Cupriavidus necator</i> mg/kg				
Aluminium	2	14	11	5	4	6	3	-	< 1,6	5
Arsen	< 1,2	< 0,8	< 0,9	< 0,7	< 0,9	< 0,9	< 0,8	-	< 1,6	< 1,5
Barium	< 0,5	< 0,4	< 0,4	1	1	< 0,4	< 0,4	-	< 0,7	2
Beryllium	< 1,2	< 0,8	< 0,9	< 0,7	< 0,9	< 0,9	< 0,8	-	< 1,6	< 1,5
Blei	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,4	< 0,4	-	< 0,7	< 0,6
Bor	< 12,0	< 7,9	< 8,9	< 6,8	< 8,9	< 8,6	< 7,8	-	< 1,6	< 15,0
Cadmium	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,4	< 0,4	-	< 0,7	< 0,6
Calcium	598	< 79,0	514	326	417	244	< 78,0	-	< 159	< 150,0
Chrom	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,4	1	-	< 0,7	< 0,6
Cobalt	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	1	< 0,4	< 0,4	-	< 0,7	< 0,6
Eisen	244	< 1,3	143	60	184	162	123	-	149	182
Kalium	13.517	5.565	15.537	8.735	12.043	8.973	10.367	-	7.571	6.589
Kupfer	10	94	6	43	5	6	63	-	8,7	11
Magnesium	3.267	610	2.063	2.061	1.787	2.101	2.340	-	2.323	1.671
Mangan	< 0,5	27	3	78	4	< 0,4	10	-	5	6
Molybdän	2	59	1	2	1	2	20	-	5	4
Natrium	23.380	598	21.325	1.776	21.500	6.896	557	-	517	252
Nickel	< 0,5	0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,4	< 0,4	-	1	< 600
Phosphor	28.849	14.822	22.806	11.267	22.087	20.910	16.988	-	15.469	18.002
Rubidium	2	1	1	9	1	1	1	-	1	< 0,6
Selen	< 1,8	< 1,3	< 1,5	< 1,1	< 1,5	< 1,4	< 1,3	-	< 2,6	< 2,4
Strontium	< 0,5	< 0,4	0,4	1	< 0,4	< 0,4	< 0,4	-	< 0,7	< 0,6
Tellur	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,4	< 0,4	-	< 0,7	< 0,6
Thallium	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	0,4	< 0,4	-	< 0,7	< 0,6
Vanadium	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,4	< 0,4	-	< 0,7	< 0,6
Zink	86	34	55	49	65	68	40	-	80	89
Zinn	< 0,5	< 0,4	< 0,4	< 0,3	< 0,4	< 0,4	< 0,4	-	< 0,7	< 0,6
[h]	68,5	70,5	28	47,5	71,8	68,5	70,5	28	47,5	71,8