

6. Zusammenfassung

In der umweltschutzbezogenen biologischen Analytik werden kontinuierlich arbeitende Meßmethoden mit rasch und empfindlich reagierenden Testorganismen benötigt.

Photobacterium phosphoreum hat sich als ein außerordentlich rasch anzeigender und empfindlicher Testorganismus bei der Prüfung nachteiliger Stoffe in Wasser und Abwasser im Kurzzeittest bewährt. Meßkriterium ist dabei die Abnahme der Biolumineszenz einer standardisierten Kultur bei Kontakt mit nachteiligen Stoffen. Der Test wird diskontinuierlich durchgeführt. Nachteilig ist neben dem hohen manuellen Aufwand zur Durchführung des Tests die Notwendigkeit der Benutzung teurer, konservierter Bakterienchargen, die nur für wenige Testansätze ausreichen.

Voraussetzung für eine Automatisierung des Tests wäre eine kontinuierliche Anzucht der Photobakterien, die dann jederzeit "frisch", mit gleicher Stoffwechselaktivität und erheblich preiswerter zur Verfügung stehen würden.

Es wurde daher eine kontinuierliche Kultur mit *Photobacterium phosphoreum* angelegt und auf ihre Eignung zur kontinuierlichen Bereitstellung empfindlicher Bakterienchargen untersucht. Erfahrungen mit der kontinuierlichen Kultivierung von Photobakterien sind gering. Eine Anzucht von *Photobacterium phosphoreum* im Metabolistaten wurde bisher nicht beschrieben.

Photobacterium phosphoreum besitzt die besondere Eigenschaft der Biolumineszenz und senkt infolge Säurebildung den pH-Wert des Kulturmediums ab.

Es wurde deshalb die Anzucht im Metabolistaten gewählt, in dem die Kultur über die Lichtabgabe der Bakterien und über den pH-Wert gesteuert werden konnte.

Es wurde das Medium nach KREBS ohne und mit 0,1 und 0,2%igem Glucose-Zusatz und das Medium nach McELROY verwendet.

Bei beiden Steuerungsarten wurden Lumineszenz, Redoxpotential und pH-Wert kontinuierlich mit Hilfe eines Computers (PC) registriert; zudem wurden aus dem Fermenterinhalt Proben entnommen und die Lebendkeimzahl bestimmt.

Die höchste Lumineszenz der Bakterien wurde in der belüfteten lichtgesteuerten kontinuierlichen Kultur im Medium nach KREBS mit etwa 8 bis 9 mV-Äquivalenten im "steady state" erreicht, während in der über den pH-Wert gesteuerten belüfteten kontinuierlichen Kultur die Lumineszenz im gleichen Medium maximal nur etwa 6,5 mV betrug.

In der unbelüfteten Kultur mit Medium nach KREBS mit 0,1 % Glucosezusatz lag die Lumineszenz nur zwischen 1,5 und 3,5 mV.

In der belüfteten kontinuierlichen Kultur mit Medium nach McELROY wurde die höchste Lumineszenz bei etwa 6 mV registriert. Es wurde jedoch kein "steady state" erreicht.

Die Entwicklung der Keimzahl verhielt sich entsprechend. Bei einer viermal höheren Beimpungsdosis (20 ml) als bei Medium nach KREBS (5 ml) stieg die Keimzahl im Medium nach McELROY auf etwa 10^9 KBE/ml an und sank danach aber wieder. Die Keimzahl von 10^9 KBE/ml wurde auch im Medium nach KREBS sowohl in der belüfteten als auch pH-Wert-gesteuerten kontinuierlichen Kultur im "steady state" erreicht.

Die unbelüftete kontinuierliche Kultur mit Medium nach KREBS mit 0,1 % Glucose-Zusatz erbrachte nur eine Keimzahl von etwa 10^8 KBE/ml.

Die Lumineszenz der Kultur konnte stets erst nach dem Wachstum der Mikroorganismen registriert werden. Mit dem Wachstum der Mikroorganismen (Keimzahlvermehrung) nahm der Sauerstoffgehalt in der Kultur ab. Als Maß hierfür wurde das Absinken der Redoxspannung über eine Elektrode kontinuierlich gemessen.

Der pH-Wert sank bei den lichtgesteuerten kontinuierlichen Kulturen langsam aber stetig von 6,62 bzw. 7,1 auf 6,3 bzw. 6,5 nach 160 bzw. 350 Stunden ab. In der über den pH-Wert-gesteuerten kontinuierlichen Kultur blieb er aufgrund der Steuerungsart weitgehend konstant.

Es wurden außerdem in Proben aus dem Fermenter Stoffwechselprodukte bestimmt. Die Produkte der gemischten Säuregärung mit Glucose als Substrat, nämlich Pyruvat, L-(+)-Lactat und Formiat konnten in belüfteten Kulturen nicht in nennenswerten Mengen nachgewiesen werden, L-(+)-Lactat auch nicht in unbelüfteten Kulturen mit Glucose-Zusatz.

Pyruvat wurde im "steady state" in unbelüfteten kontinuierlichen Kulturen im Medium nach KREBS mit 0,2 % Glucose-Zusatz in zwei- bis dreimal so hohen Konzentrationen (etwa 50 mg/l) nachgewiesen wie im gleichen Medium mit nur 0,1 % Glucose-Zusatz.

Formiat wurde über etwa 200 Stunden in unbelüfteten kontinuierlichen Kulturen im Medium nach KREBS mit 0,1 % und 0,2 % Glucose-Zusatz in etwa gleichen Konzentrationen nachgewiesen (180-200 mg/l).

Acetat konnte in belüfteten kontinuierlichen Kulturen ohne Glucosezusatz in weit höherer Konzentration nachgewiesen werden (etwa 1100 mg/l) als in unbelüfteten mit 0,2 % Glucose-Zusatz (etwa 160 mg/l).

Die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Phenol als Referenzsubstanz, ausgedrückt durch die EC50 (mg Phenol/l), lag in den ersten 80 Stunden des "steady state" in der lichtgesteuerten kontinuierlichen Kultur bei etwa 35 mg Phenol/l.

Es kann festgestellt werden, daß sich der Metabolistat zur Anzucht von *Photobacterium phosphoreum* eignet. Sowohl die licht- als auch die pH-Wert-gesteuerte kontinuierliche Kultur liefert eine hohe Ausbeute an Mikroorganismen, die im Bereich von 10^9 KBE/ml liegt.

Die lichtgesteuerte kontinuierliche Kultur lieferte befriedigend empfindliche, sehr hell leuchtende Bakterien, die in bakteriellen Kurzzeittests zur Prüfung nachteiliger Stoffe

in Wasser eingesetzt werden können. Die etwa in den ersten 80 Stunden des "steady state" ermittelte EC50 (30 Minuten) von etwa 35 mg Phenol/l steht in befriedigender Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen, in denen die konservierten Bakterienchargen eingesetzt wurden.

Bakterien aus über den pH-Wert gesteuerten Kulturen waren in ihrer Lichtabgabe weniger intensiv. Der Vorteil dieser Steuerungsart lag jedoch in der Bereitstellung von Bakteriensuspensionen, die in ihrem pH-Wert besonders stabil waren. Dieses Material eignete sich wiederum zum Einsatz in der Prüfung nachteiliger gasförmiger Stoffe und komplexer Luftproben in Oberflächen- und Flüssigkultur-Prüfansätzen.

Frank Schuster: Installation and operation of a continuous culture of *Photobacterium phosphoreum* and optimizing the culture conditions.

7. Summary

For biological analysis related to environmental protection monitoring methods and sensitive test organisms are necessary. *Photobacterium phosphoreum* has proved to be an extraordinary rapid indicator and sensitive microorganism for short-time tests of detrimental compounds in water and sewage.

The decrease of bioluminescence of a standardized culture at contact with detrimental compounds is used as measuring criterion.

The routine test is carried out discontinuously. Besides a high manual expenditure for realization of the test expensive preserved charges of the bacteria have to be used suitable only for a few tests. A continuous cultivation of the *Photobacteria* for the automation of the test would be desirable. In this way *Photobacterium phosphoreum* with constant metabolic activity could be freshly supplied at any time, considerably less expensive than the preserved bacteria.

For this reason a continuous culture of *Photobacterium phosphoreum* was established and investigated for its suitability in supplying sensitive bacterial suspensions. There is only little experience with the continuous cultivation of photobacteria. The cultivation of *Photobacterium phosphoreum* in a metabolistat has not been described before. *Photobacterium phosphoreum* owns the particular property of bioluminescence. The bacterium produces acids which decrease the pH-value of the culture medium. Therefore the continuous culture of *Photobacterium phosphoreum* was performed in a metabolistat. The fermenter system was controlled by either luminescence or by pH-value. A medium according to KREBS with or without addition of 0.1 and 0.2 % glucose was used or the medium according to McELROY. During the continuous cultivation, controlled either by luminescence or

acid production, the parameters luminescence, redoxpotential and pH-value were continuously measured and recorded by means of a computer (PC); in samples periodically taken from the fermenter colony forming units (cfu) per milliliter were determined.

In selected samples also metabolic compounds were determined.

In the aerated luminescence-controlled continuous culture with KREBS-medium the maximum luminescence of the bacteria with 8 to 9 mV-equivalents in the steady state was attained. In the pH-controlled aerated culture the maximum luminescence attained only 6.5 mV. In the non-aerated culture with KREBS-medium plus 0.1 % glucose the luminescence amounted from 1.5 to only 3.5 mV.

In the aerated continuous culture with McELROY-medium a maximum luminescence was attained at about 6 mV, but no steady state was established.

The number of the bacteria in this culture developed in the same way. At a four time higher inoculation of the McELROY-medium than of the KREBS-medium a count of up to about 10^9 cfu/ml was determined, which, however, decreased soon after the maximum. The colony count during the steady state in aerated cultures with KREBS-medium remained at 10^9 cfu/ml controlled by luminescence of pH-value, respectively.

Non-aerated cultures with KREBS-medium and 0.1 % glucose added produced 10^8 cfu/ml.

In these cultures luminescence was not registered before a certain cell count had been attained. During the increase of bacteria after inoculation the content of air in the culture decreased followed indirectly by the measurement of the redoxpotential.

In luminescence-controlled continuous cultures the pH-value decreased slightly but continuously from 6.62 respectively 7.10 to 6.30 respectively 6.50 after 160 respectively 370 hours. In pH-controlled cultures the pH-value remained constant.

The products of glucose fermentation: pyruvate, L-(+)-lactate and formate could not be detected at appreciable amounts in aerated cultures. During the steady state in non-aerated cultures with KREBS-medium plus 0.2 % glucose pyruvate was determined in 2 to 3 fold concentrations (about 50 mg/l) than in cultures with 0.1 % glucose in the medium.

Formate was determined at a level of 180 to 200 mg/l in 0.1 and 0.2 % glucose containing medium during 200 hours. Acetate was found in considerably higher concentrations of about 1100 mg/l in aerated cultures without glucose in comparison with about 160 mg/l of non-aerated cultures containing 0.2 % glucose.

The sensitivity of the bacteria to phenol as a reference compound, expressed by the EC50 (mg phenol/l), was determined in luminescence-controlled cultures at 35 mg phenol/l during the first 80 hours of the steady state.

The luminescence- or pH-controlled metabolostat has proved as a appropriate fermenter system to cultivate *Photobacterium phosphoreum* continuously and to produce bacterial suspensions with high cell numbers of about 10^9 cfu/ml.

The luminescence-controlled cultures supplies sufficient sensitive bacterial cells of high light emission, applicable for short-time tests to examine detrimental compounds in water. The EC50 of about 35 mg phenol/l of these bacteria corresponds well with the results obtained by the tests with the preserved bacterial charges.

Continuous cultures controlled by the pH-value were less luminescent. The advantage of this kind of control is that bacterial suspensions with a more stable pH-value are provided. These are suitable for the examination of detrimental gaseous compounds or complex air samples with surface culture and broth culture tests as well.