

# Lemnaceen in kontinuierlicher Kultur

Autor(en): **Erismann, K.H. / Finger, A.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **78 (1968)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-54871>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Lemnaceen in kontinuierlicher Kultur

Von K. H. Erismann und A. Finger

(Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern)

Manuskript eingegangen am 7. September 1967

## Einleitung

Kontinuierliche Kulturen von Mikroorganismen spielen eine bedeutende Rolle in physiologischen und biochemischen Untersuchungen verschiedenster Art. Sie sind ein ebenso bequemes wie notwendiges Hilfsmittel zur Bereitstellung von Versuchsmaterial gleichbleibender Qualität, können aber auch selbst Gegenstand der Untersuchung sein, so beim Studium des physiologischen *steady state* und seiner biochemischen Fließgleichgewichte. Ausserhalb der Grundlagenforschung haben die kontinuierlichen Kulturen eine wichtige Anwendung in industriellen Verfahren zur Gewinnung mikrobieller Stoffwechselprodukte gefunden (vgl. Málek, 1966).

Die wesentlichen Merkmale eines zur kontinuierlichen Kultur geeigneten Organismus sind geringe Grösse, planktonische Lebensweise, vegetative Vermehrung und Unabhängigkeit der einzelnen Individuen voneinander. Zahlreiche einzellige Mikroorganismen weisen diese Eigenschaften auf. Die Technik der kontinuierlichen Kultur erstreckte sich deshalb bis heute ausschliesslich auf Bakterien, einzellige Algen und Pilze. Eher ungewöhnlich, wenn nicht unmöglich, erscheint die Verwendung von Blütenpflanzen.

Die Zahl derer, die hierzu in Frage kommen, ist freilich sehr klein. Sie umfasst einige wenige vom gewohnten Habitus der Blütenpflanzen stark abweichende Arten, die sämtliche der Familie der *Lemnaceen* (Wasserlinsen) angehören, einer meist den *Spadiciflorae* (Monocotyledoneae) zugeordneten Gruppe freischwimmender Wasserpflanzen (Hillman, 1961; Landolt, 1957). Die bekanntesten unter ihnen sind *Lemna minor* L. und *Spirodela polyrrhiza* L., welche auf unsern Teichen oft massenhaft vorkommen und hellgrüne geschlossene Decken bilden. Diese nur wenige Millimeter grossen Pflanzen besitzen viele biologisch interessante Eigenschaften. Dazu gehören nicht zuletzt diejenigen, die sie für experimentelle Zwecke besonders geeignet machen: Anspruchslosigkeit in bezug auf die Kulturbedingungen, relativ rasche vegetative Vermehrung und geringe Grösse, welche erlaubt, mit ihnen ähnlich umzugehen wie mit Mikroorganismen.

Auf die besondern Vorzüge dieser Pflanzengruppe hat bereits Hansteen (1899) bei der Darstellung der wohl ersten experimentellen (biochemischen) Arbeit mit einer Wasserlinse (*Lemna minor*) nachdrücklich hingewiesen. Seither sind da und dort *Lemnaceen* als Versuchsorganismen für die verschiedensten Zwecke verwendet worden, ohne dass die experimentellen Möglichkeiten je voll ausgenützt worden wären. (Übersichten über die experimentellen Arbeiten mit *Lemnaceen* finden sich bei Landolt, 1957; Kandeler, 1960/61; Hillman, 1961; Erismann, in Vorbereitung.) So hat man unseres Wissens bisher weder kontinuierliche Kulturen im

mikrobiologischen Sinn zur Bereitstellung von Versuchsmaterial verwirklicht, noch hat man Untersuchungen unter *steady state*-Bedingungen durchgeführt.

Unsere Versuche in dieser Richtung zeigten, dass mit relativ bescheidenem Aufwand beide Ziele erreicht werden können, obwohl die *Lemnaceen* den eingangs aufgestellten Anforderungen nicht in allen Teilen genügen.

So leben die meisten *Lemnaceen* nicht submers, sondern breiten sich schwimmend auf der Wasseroberfläche aus, was besondere Anpassungen der Kultur- und Versuchseinrichtungen (Erismann und Brunold, 1967) erfordert. Ferner unterscheidet sich der Mechanismus der vegetativen Vermehrung wesentlich von demjenigen der Mikroorganismen. Die Tochterpflanzen (Tochterglieder) entstehen in der Reproduktionszone des Muttergliedes. Sie wachsen links und rechts in sogenannten Taschen heran und bleiben mit dem Mutterglied noch mehrere Tage verbunden. In dieser Zeit bilden sie bereits selber eine neue Generation von Tochtergliedern. Auf diese Weise entstehen kleine drei- bis mehrgliedrige Kolonien, deren Grösse von den Kulturbedingungen abhängt. Sie zerfallen in der Masse in selbständige Tochterkolonien, wie sich die ausgereiften Tochterglieder vom Mutterglied lösen. Dies geschieht mit grosser Regelmässigkeit, so dass unter konstanten Verhältnissen und bei regelmässiger Erneuerung der Nährlösung ein exponentielles Wachstum der Population beobachtet werden kann (Erismann und Wegner, 1967). Unter günstigen Kulturbedingungen beträgt die Verdoppelungszeit der Gliederzahl weniger als 30 Stunden für *Lemna minor* Stamm Nr. 11'02.

Wir beschreiben nun nachfolgend eine Einrichtung zur kontinuierlichen Kultur von *Lemnaceen*, wie sie in unserem Labor hauptsächlich zur Anzucht grösserer Mengen von Versuchsmaterial unter definierten Kulturbedingungen verwendet wird. Sie ersetzt die viel umständlichere und für unsere Arbeiten unzulängliche Anzuchtmethode in Erlenmeyerkolben.

### Beschreibung der Anlage und ihrer Funktion

Das Prinzip der kontinuierlichen *Lemnaceen*-Kultur (KLL) beruht auf der Eigenschaft der meisten *Lemna*- und *Spirodela*-Arten, eine zusammenhängende Pflanzendecke auf dem Wasserspiegel zu bilden. Werden einzelne Kolonien um wenige Millimeter voneinander getrennt, dann nähern sie sich wieder bis zur Berührung infolge besonderer Spannungsverhältnisse in der verformten Flüssigkeitsoberfläche. In einem runden Gefäss nimmt die *Lemnaceen*-Decke, wenn sie in Drehung versetzt wird, die Form einer Kreisfläche an, deren Durchmesser bei exponentiellem Wachstum linear mit der Zeit zunimmt. Die Grösse dieser Fläche lässt sich nun leicht konstant halten, wenn man dafür sorgt, dass nach Überschreiten eines bestimmten Durchmessers die an der Peripherie schwimmenden Kolonien in ein zweites Gefäss abgeleitet werden. Die ausgeschiedene *Lemnaceen*-Menge entspricht dem Zuwachs der Kultur und kann von Zeit zu Zeit geerntet werden. In Analogie zum Chemostat oder Turbidostat bezeichnen wir eine solche die Fläche der Pflanzendecke konstant haltende Einrichtung als Planistat.

Das in unserem Labor entwickelte Gerät (Abb. 1) besteht im wesentlichen aus zwei kreisrunden aneinanderstossenden Kammern 1 und 2 von 45 cm Durchmesser und 8 cm Höhe, mit weissem Boden und durchsichtigen Wänden aus Plexiglas und einer

aufgekitteten Deckplatte aus Glas. Die Kammer 1, im folgenden als Kulturbecken bezeichnet, enthält die Ausgangskultur; Kammer 2 ist das Entnahmebecken, welchem die Pflanzen unter sterilen Bedingungen entnommen werden können. Ein 8 cm breiter Durchgang 3 verbindet beide Becken. Nährlösung und Gasegemisch treten bei 4 beziehungsweise 5 in das Kulturbecken ein, strömen durch 3 in das Entnahmebecken und verlassen dieses durch zwei Aussparungen 6 und 7 in der Beckenwand, welche in die Ablaufkammer 8 hinüberführen. Ein etwa 5 cm hohes Überlaufrohr 9 hält das Niveau der Nährlösung in beiden Becken konstant. Vor Beginn einer Kultur wird das ganze Gerät sorgfältig mit zweiprozentiger Javellelauge desinfiziert, dann mit sterilem Wasser reichlich ausgespült und mit Nährlösung aufgefüllt. Das Beimpfen geschieht durch den Schlauch 10, der am freien Ende ein Pyrex-Glasrohr von 30 mm Durchmesser mit Schlifdeckel trägt. Der Schlauch führt über einen trichterförmigen Ansatz von unten her in das Kulturbecken. Die

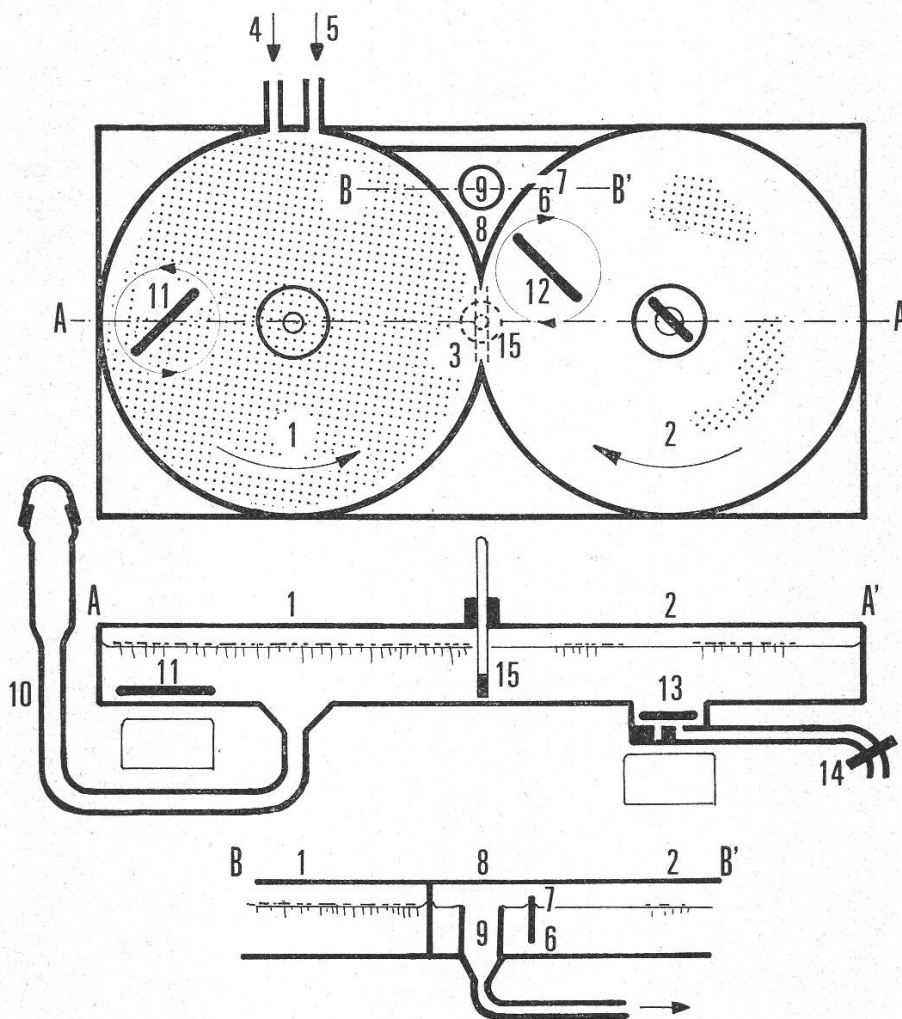


Abbildung 1

Einrichtung zur kontinuierlichen Kultur von *Lemnaceen*. 1 Kulturbecken; 2 Entnahmebecken; 3 Durchgang; 4, 5 Eintrittsstelle von Nährlösung und Gasegemisch; 6, 7 Durchtritt von Nährlösung und Gasegemisch in die Ablaufkammer; 8 Ablaufkammer; 9 Überlauf; 10 Impfrohr; 11, 12 exzentrisch angeordnete Magnetrüher; 13 Vorrichtung mit Magnetrüher zur sterilen Entnahme der Pflanzen; 14 Schlauchklemme; 15 Schieber

Impfkultur wird unter aseptischen Bedingungen in das Impfrohr gebracht. Dieses wird verschlossen und – indem man es nach unten neigt – möglichst tief unter das Niveau des Kulturbeckens gehalten. Dadurch schwimmen die Wasserlinsen nach oben und gelangen an die Oberfläche der Nährlösung. Die Manipulation kann mehrmals wiederholt werden.

Nach einigen Tagen bilden die Pflanzen eine zusammenhängende Decke. Diese wird mit der Nährlösung durch den 12 cm langen Stab des exzentrisch angeordneten Magnetrührers 11 in eine langsame komplizierte Drehbewegung versetzt. Dabei werden die Wasserlinsen derart durcheinandergerührt, dass alle Kolonien mit gleicher Wahrscheinlichkeit von Zeit zu Zeit an die Peripherie und wieder zurück ins Zentrum gelangen (Abb. 2). So erfolgt eine gründliche Durchmischung sowohl der Nährlösung als auch der *Lemna*-Kolonien innerhalb der sich langsam drehenden Decke.

Sobald nun die Wasserlinsen die ganze Oberfläche des Kulturbeckens bedecken, werden einzelne Kolonien in das Entnahmebecken gedrängt. Die Pflanzendecke wird gleichsam an der Peripherie geschält. Eine entgegengesetzt gerichtete Drehbewegung der Nährlösung im Entnahmebecken, verursacht durch einen zweiten Magnetrührer 12, unterstützt diesen Vorgang und trägt die abgelösten Kolonien von der Öffnung weg. Auf diese Weise sammelt sich der Zuwachs der Kultur im Entnahmebecken an.

Die aseptische Entnahme geschieht mit einer besondern Vorrichtung im Zentrum des Beckens 13. Die Vertiefung des Bodens enthält einen Magnetrührer über einer

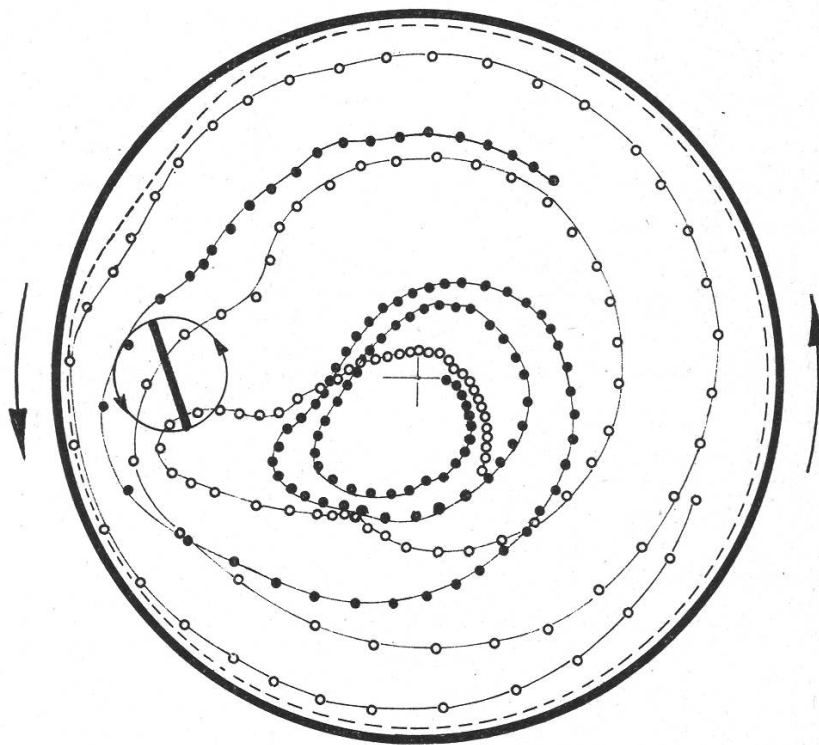


Abbildung 2

Bewegung einzelner *Lemna*-Kolonien in der rotierenden Pflanzendecke, aufgezeichnet nach kinematographischen Aufnahmen von je  $2\frac{1}{2}$  min Dauer. ●—● Spur einer Kolonie von der Peripherie ins Zentrum, ○—○ vom Zentrum zur Peripherie

speziell gestalteten Abflussöffnung. Durch die Drehung wird ein Wirbel erzeugt, der die Wasserlinsen in die Tiefe saugt. Öffnet man den Schlauchquetschhahn 14, dann fließen die Pflanzen mit der Nährlösung aus, ohne dass eine Infektion der Kultur befürchtet werden muss. Während der Entnahme wird ein Schieber 15 im Durchgang zwischen den beiden Becken auf die Höhe des Wasserspiegels gehoben. Dies verhindert ein massenhaftes Übertreten der Wasserlinsen ins Entnahmebecken mit der Strömung.

Nährlösung (Seite 14) und Gasmisch – gewöhnlich mit 2% CO<sub>2</sub> angereicherte Luft – werden der Kultur steril in einem kontinuierlichen Strom zugeführt (Nährlösung 0,5 l/h, Gasmisch 50 l/h). Die Temperaturkonstanz ist gewährleistet durch die Aufstellung der ganzen Einrichtung in einem temperaturkonstanten Raum. Die Kultur erhält Dauerlicht von vier Fluoreszenzröhren, welche über den Becken aufgehängt sind. Da die optimale Beleuchtungsstärke vom CO<sub>2</sub>-Angebot abhängt, muss sie von Fall zu Fall ermittelt werden. Gute Ergebnisse haben wir unter folgenden Bedingungen erhalten: 5000 Lux Beleuchtungsstärke, Begasung mit 2% CO<sub>2</sub>, modifizierte Hutner-Nährlösung «H<sub>8</sub>» (Seite 14), Temperatur 28 °C. Die Wachstumsrate

$$Q_{100} = \frac{\log GZ - \log GZ_0}{t - t_0} \cdot 100 \text{ beträgt in diesem Fall 3,3, das heisst, die Verdoppe-}$$

lungszeit  $g$  ist rund 30 Stunden. ( $GZ$  = Gliederzahl,  $t$  = Zeit in Stunden, Logarithmus zur Basis 2.) Der tägliche Ertrag erreicht in diesem Fall rund 75% der Pflanzendecke im Kulturbecken. Dies entspricht derjenigen Menge Wasserlinsen, die in 60 Erlenmeyerkolben (150 ml mit je 30 ml Nährlösung) mit der üblichen Kulturtechnik in einer Woche herangezogen werden kann.

### Diskussion

Die mikrobiologische kontinuierliche Kultur (MKK, vgl. hierzu FencI, 1966) ist dadurch gekennzeichnet, dass dauernd oder in Intervallen frische Nährlösung in das Kulturgefäss eintritt und es modifiziert durch den Stoffwechsel der wachsenden Kultur wieder verlässt.

Mit dem wegfließenden Medium wird ein Teil der Zellen aus dem Kulturgefäss ausgeschwemmt. Die sich vermehrende Population wird dadurch ständig dezimiert. Unter gewissen Bedingungen stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei welchem der Abgang die Vermehrung kompensiert.

Da der Zuwachs proportional der spezifischen Wachstumsrate  $\mu = \frac{\ln M - \ln M_0}{t - t_0}$

ist und der Abgang proportional der Verdünnungsrate  $D = \frac{F}{V}$ , gilt die folgende grundlegende Beziehung für das dynamische Gleichgewicht (*steady state*) des Systems:

$$\frac{dM}{dt} = \mu M - D M = 0 \tag{1}$$

( $M$  = Masse der Kultur,  $t$  = Zeit,  $F$  = Durchflussrate,  $V$  = Volumen des Mediums im Kulturgefäss.)

Daraus folgt  $\mu = D$ , das heisst, die spezifische Wachstumsrate ist gleich der Verdünnungsrate. Dies gilt für einen bestimmten Bereich derselben. Die Grenzen werden

gebildet durch einen untern kritischen Wert  $D_c^u$ , bei welchem die Kultur noch gerade vermehrungsfähig ist, und durch einen obern Wert  $D_c^o$ , bei dessen Überschreiten die Kultur ausgeschwemmt wird. Ferner ist  $D_c^o < u_{max}$  ( $\mu_{max}$  = höchstmögliche Wachstumsrate des betreffenden Organismus für das verwendete Medium).

Für die beschriebene *Lemnaceen*-Kultur gilt diese Gesetzmässigkeit nicht. Der Ertrag  $E$ , das heisst die pro Zeiteinheit aus dem Kulturbecken in das Entnahmegefäss übertretende Menge Wasserlinsen, ist weitgehend unabhängig von der Durchflussrate des Mediums. Es gilt für die KLK:

$$\frac{dM}{dt} = \mu M - E = 0 \quad (2)$$

Da die Beziehung  $\mu = D$  folglich keine Gültigkeit hat, besitzt die Verdünnungsrate  $D$  hier nicht die Bedeutung, die ihr in der mathematischen Analyse der MKK zukommt. Es scheint uns dennoch sinnvoll, den Durchfluss des Mediums in Anzahl Kulturvolumina pro Zeiteinheit ( $D = \frac{F}{V}$ ), das heisst als Verdünnungsrate anzugeben.

Wir behalten deshalb den Ausdruck bei, bezeichnen ihn aber mit  $D^*$ .

Aus dem Funktionsprinzip der KLK geht ferner hervor, dass im Gegensatz zu den MKK auch mit Verdünnungsraten  $D^* > \mu_{max}$  gearbeitet werden kann, ohne dass eine grössere Organismenmenge aus dem Kulturbecken geschwemmt wird, als dem Zuwachs  $\mu M$  entspricht. Die grösstmögliche Verdünnungsrate  $D^*_{max}$  wird bestimmt durch die Strömungsverhältnisse im Kulturgefäss. Es ist diejenige Verdünnungsrate, welche die Geschlossenheit der rotierenden Pflanzendecke im Kulturbecken gerade noch nicht zu zerstören vermag. In der Regel ist  $D^*_{max} \gg \mu_{max}$ .

Der kleinstmögliche Wert für  $D^*$  ist gleich zu definieren wie bei der MKK. Da die Pflanzen allein durch den «Wachstumsdruck» der rotierenden Decke in das angrenzende Entnahmegefäss hinübergeschoben werden, kommt der Strömung des Mediums wenig Bedeutung zu; die Verdünnungsrate kann somit in weiten Grenzen variiert werden.

Weiter definieren wir die optimale Verdünnungsrate  $D^*_{opt}$  als die kleinste Verdünnungsrate, welche bei gegebener Konzentration der Nährlösung eine spezifische Wachstumsrate  $\mu_{max}$  ermöglicht. Sie gewährleistet die maximale Ausnützung der Nährlösung. Bei höhern Verdünnungsraten fliesst ein Teil des Substrates ungenützt ab. Da man besonders für die Bereitstellung von Versuchsmaterial definierter Qualität den Ertrag im Entnahmebecken bis zum Gebrauch unter denselben Bedingungen halten möchte, wie sie im Kulturgefäss herrschen, wird man die Verdünnungsrate so hoch ansetzen, dass auch im Entnahmegefäss noch eine für  $\mu \sim \mu_{max}$  hinreichende Substratkonzentration gewährleistet ist.

Weiter geht aus der Beziehung (2) hervor, dass  $E = \mu M$ . Da ferner  $M = \text{konstant}$ , ist die in das Entnahmebecken übertretende Organismenmenge (Ertrag  $E$ ) direkt proportional der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$ . Diese ist aber abhängig von der im Kulturgefäss herrschenden Substratkonzentration  $S$ . Annäherungsweise kann diese Abhängigkeit dargestellt werden durch die Beziehung

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (3)$$

(Monod, 1942), wobei  $K_S$  die Sättigungskonstante bedeutet, das ist diejenige Substratkonzentration, bei welcher  $\mu = 1/2 \mu_{max}$ . Setzen wir für eine genügend hohe Verdünnungsrate  $S = S_0$ , so kann die Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  von der aktuellen Substratkonzentration  $S$  durch Variieren der Konzentration  $S_0$  im einströmenden Medium überprüft werden. Dies muss theoretisch seine Gültigkeit auch für einzelne Nährlösungskomponenten haben, zum Beispiel für die Stickstoffquellen und für das  $\text{CO}_2$  des Gasgemisches, sofern anstelle der Durchflussrate der Nährlösung diejenige der Luft eingesetzt und die Löslichkeit des  $\text{CO}_2$  in der Nährlösung berücksichtigt wird.

Für kleinere Verdünnungsraten werden die Verhältnisse komplizierter. Um sie untersuchen zu können, benötigen wir die Grösse  $X = \frac{M}{V}$ , welche uns erlaubt, die Substrataufnahme  $A_S = D^* (S_0 - S)$  mit der Vermehrung des organischen Materials zu vergleichen. ( $V =$  Volumen des Mediums,  $M =$  Masse der *Lemnaceen* im Kulturbecken.) Der Quotient  $\frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{dX}{-dS} = Y$  gibt ferner an, mit welcher *ökonomischen Wirksamkeit* das Substrat in organische Substanz umgewandelt wird.

Da  $\frac{dX}{dt} = \mu X$  und  $\mu = \mu_{max} \left( \frac{S}{K_S + S} \right)$ , gilt für die kontinuierliche Kultur im *steady state* analog (1) und (2) bezüglich der Veränderung der Substratkonzentration:

$$\frac{dS}{dt} = D^*(S_0 - S) - \mu_{max} \frac{X}{Y} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) = 0 \quad (4)$$

Innerhalb eines mehr oder weniger breiten optimalen Bereiches der Substratkonzentration, wo die maximale spezifische Wachstumsrate erreicht wird, ist die Substrataufnahme  $A_S = \mu_{max} \frac{X}{Y} =$  konstant. Hier gilt somit:

$$D^*(S_0 - S) = \mu_{max} \frac{X}{Y} \quad \text{und} \quad S = S_0 - \left( \frac{\mu_{max} \frac{X}{Y}}{D^*} \right) \quad (5)$$

Im suboptimalen Bereich lässt sich die Abhängigkeit der Substratkonzentration  $S$  von der Verdünnungsrate  $D^*$  nicht so einfach berechnen wie bei der MKK (vgl. hierzu Fencel, 1966), da im allgemeinen für die KKK  $D^* = \mu$  beziehungsweise  $D^* = \mu_{max} \cdot \left( \frac{S}{K_S + S} \right)$  nicht zutrifft.

In Abbildung 3 sind die theoretischen Verhältnisse im Planistat bei verschiedenen Verdünnungsraten  $D^*$  dargestellt. Den Berechnungen wurden folgende Annahmen zugrunde gelegt: a) Die Substratkonzentration in der zufließenden Nährlösung  $S_0 = 1 \text{ gl}^{-1}$  liege noch im optimalen Bereich, das heisst,  $S = S_0$  rufe noch keine Wachstumshemmung hervor; b) die Sättigungskonstante  $K_S$  sei  $0,01 \text{ gl}^{-1}$ ; c) der ökonomische Quotient  $Y = \frac{dX}{-dS}$  sei für alle Substratkonzentrationen gleich.



Es sei ferner  $\mu_{max} \frac{X}{Y} = \text{konstant} = f$ . Für die Verdünnungsrate  $D^*$ , welche auf der Abszisse logarithmisch aufgetragen ist, verwendeten wir den Betrag von  $f$  als Einheit. Für  $S$ ,  $M$ ,  $\mu M$  und  $g$  wurden die Einheiten auf der Ordinate willkürlich gewählt.

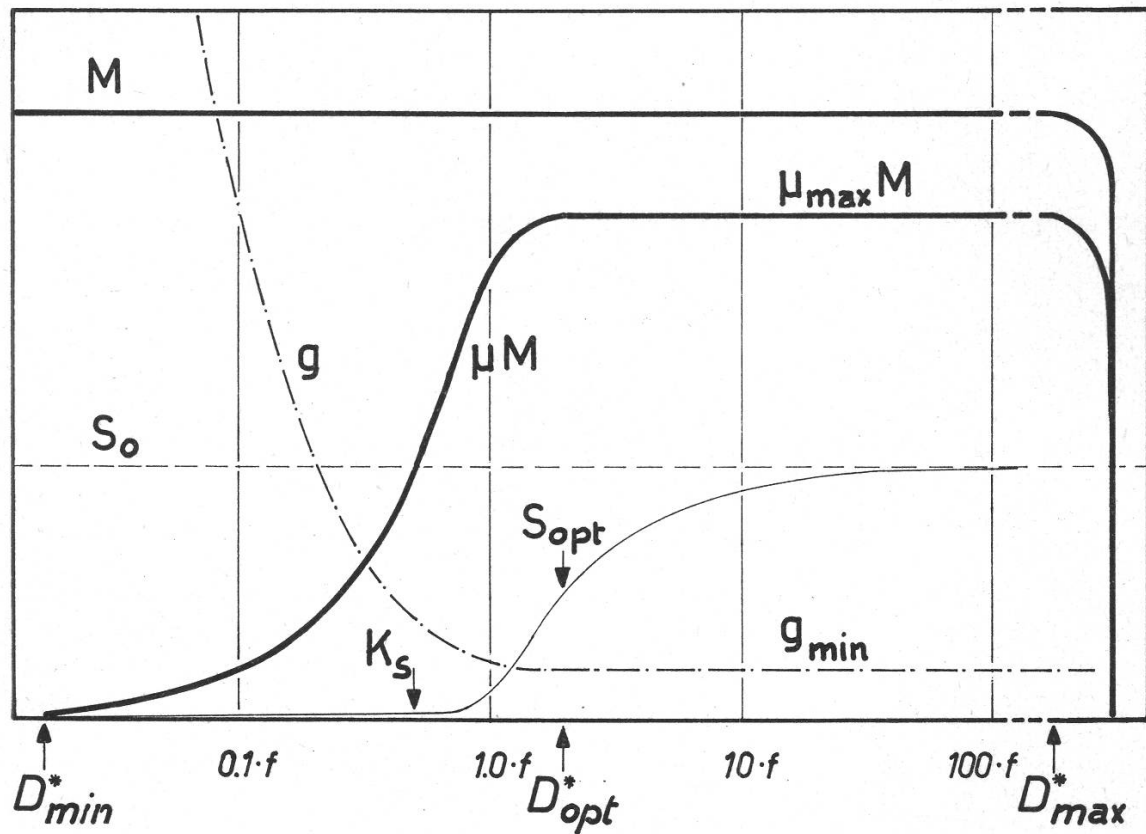


Abbildung 3

Die theoretischen Verhältnisse in der kontinuierlichen *Lemnaceen*-Kultur. Dargestellt ist die Abhängigkeit des Ertrages  $\mu M$ , der Substratkonzentration  $S$  und der Verdoppelungszeit  $g$  von der Verdünnungsrate  $D^*$ .  $M$  = Masse der Pflanzen im Kulturbecken,  $S_0$  = Substratkonzentration des einströmenden Mediums,  $K_s$  = Sättigungskonstante (Michaelis-Menten-Konstante)

Die Darstellung zeigt zwei charakteristische Bereiche. Ein erster erstreckt sich von der minimalen Verdünnungsrate  $D^*_{min}$ , bei welcher Wachstum noch gerade möglich ist, bis zu  $D^*_{opt}$ , wo die spezifische Wachstumsrate ihren höchsten Wert erreicht ( $\mu = \mu_{max}$ ). Der Zunahme von  $\mu$  entspricht eine Abnahme der Verdoppelungszeit  $g$  bis auf einen minimalen Betrag  $g_{min}$ . Das Substrat ist in diesem Bereich Minimumsfaktor und wird fast gänzlich aufgebraucht.  $S$  steigt deshalb mit zunehmender Verdünnungsrate nur sehr langsam auf den Wert  $S_{opt}$ , welcher den maximalen Ertrag  $E = \mu_{max}M$  ermöglicht.

Ein zweiter Bereich reicht von  $D^*_{opt}$  bis  $D^*_{max}$ . Er ist gekennzeichnet durch die konstante minimale Verdoppelungszeit  $g_{min}$  und den konstanten maximalen Ertrag. Die Substrataufnahme ist in dieser Phase konstant, infolgedessen steigt  $S$  nur noch als Funktion von  $D^*$  an und nähert sich asymptotisch dem Wert  $S_0$ . Die Masse der Organismen  $M$  im Kulturgefäß bleibt über beide Bereiche konstant.

Es muss betont werden, dass diese theoretischen Erörterungen nur unter zwei wichtigen Voraussetzungen gelten: a) Gliederzahl, Frischgewicht und Trockenmasse der *Lemnaceen* innerhalb der Decke bleiben je Flächeneinheit für alle Substratkonzentrationen konstant; b) es treten keine Wuchsformen auf, welche den Übertritt der Kolonien ins Entnahmebecken hindern. Störend kann sich zum Beispiel das Auftreten langer Wurzeln in Stickstoff-Mangelkulturen bemerkbar machen.

Für jede verwendete Kulturbedingung stellt sich im Stoffwechsel eines kontinuierlich kultivierten Organismus ein physiologischer *steady state* ein. Abweichungen von den erwarteten theoretischen Verhältnissen dürften Ausdruck spezieller physiologischer Zustände sein; sie sind deshalb von besonderem Interesse. Untersuchungen darüber sind im Gang.

Herrn H. Läufer, Mechaniker, und Herrn R. Strasser, Assistent am Pflanzenphysiologischen Institut, danken wir für die wertvolle Mitarbeit beim Entwurf und der Ausführung des Projektes.

Die 16-mm-Filmkamera, die uns zur kinematographischen Untersuchung des Durchmischungsprozesses in der rotierenden *Lemnaceen*-Decke diente und routinemässig zur Registrierung des *Lemnaceen*-Wachstums verwendet wird, verdanken wir der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Universität Bern.

### Zusammenfassung

1. Es wird eine automatische Einrichtung beschrieben, mit welcher auf der Nährlösung schwimmende *Lemnaceen* unter definierten Bedingungen kontinuierlich kultiviert werden können.
2. Das Prinzip dieser Kulturtechnik besteht darin, die Fläche einer wachsenden *Lemnaceen*-Decke konstant zu halten, indem die überzähligen Pflanzen von ihrem Rande in ein Sammelbecken abgeleitet werden.
3. Die Eigenschaften eines solchen Planistaten werden untersucht und mit denjenigen der mikrobiologischen kontinuierlichen Kultur verglichen. Der wichtigste Unterschied besteht darin, dass die das Kulturgefäss verlassende *Lemnaceen*-Menge von der Durchflussrate des Mediums unabhängig ist. Es kann deshalb eine Produktionsrate erzielt werden, die der maximalen spezifischen Wachstumsrate entspricht.
4. Die Anlage eignet sich zur Bereitstellung grosser Mengen jederzeit gleichwertigen Versuchsmaterials. Sie ermöglicht ferner, die bei Mikroorganismen erfolgreich verwendeten Methoden der physiologischen und biochemischen Untersuchung unter *steady state*-Bedingungen auf eine Gruppe von Blütenpflanzen zu übertragen.

### Summary

An automatic device for continuous culture of duckweeds (*Lemna minor*) under controlled conditions is described. On a slowly rotating nutrient medium in a shallow cylindrical vessel the growing population forms a circular area of increasing diameter. This area is kept constant by removing fronds from its periphery. The properties of the so-called "planistat" are discussed and compared with the properties of the continuous culture of microorganisms. The principal difference is, that in our system the mass of organisms leaving the culture vessel is independent of the outflow of medium. Therefore a maximum specific growth rate may be obtained. The apparatus is designed to produce large amounts of plant material of uniform quality. In principle

it should enable one to apply the methods of steady state investigations now used only for microorganisms to a higher plant.

#### Abkürzungen

$A_s$	= Substrataufnahmerate = $D(S_0 - S)$	$gl^{-1}t^{-1}$
$D$	= Verdünnungsrate = $\frac{F}{V}$	$t^{-1}$
$E$	= Ertrag = $\mu M$	$gt^{-1}$
$F$	= Durchflussrate des Mediums	$lt^{-1}$
$g$	= Verdoppelungszeit	$t$
$GZ$	= Gliederzahl	
$KLK$	= kontinuierliche <i>Lemnaceen</i> -Kultur	
$K_s$	= Sättigungskonstante (Michaelis-Menten-Konstante)	$gl^{-1}$
$M$	= Biomasse (Masse der Organismen im Kulturgefäß)	$g$
$MKK$	= mikrobiologische kontinuierliche Kultur	
$S_0$	= Substratkonzentration des einfließenden Mediums	$gl^{-1}$
$S$	= Substratkonzentration in der Kultur	$gl^{-1}$
$t$	= Zeit in Stunden	
$V$	= Volumen des Mediums im Kulturgefäß	
$X$	= Konzentration der Biomasse im Kulturgefäß = $\frac{M}{V}$	$gl^{-1}$
$Y$	= ökonomischer Quotient = $\frac{dX}{dS}$	
$\mu$	= spezifische Wachstumsrate	$t^{-1}$
$\rho$	= Wachstumsrate (nach Monod, 1950) = $\frac{1}{g} = \frac{\mu}{0,69}$	$t^{-1}$

Die gewählten Symbole entsprechen im wesentlichen den Empfehlungen des Zweiten Internationalen Symposiums über kontinuierliche Kulturen in Prag 1962 (Fenc1, 1963). Ausnahmen:  $A_s$ ,  $E$ ,  $M$ ,  $GZ$ ,  $KLK$ ,  $MKK$ .

#### Nährlösungen

Modifizierte Hutner-Nährlösungen (Hutner, 1953) für die kontinuierliche *Lemnaceen*-Kultur

Stammlösungen (in g/5 l Lösung)		Nährlösungskonzentrate (ml Stammlösung / l Konzentrat)		
		H <sub>8</sub>	E-NO <sub>3</sub>	E-NH <sub>4</sub>
1. Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	790,0	10	25	—
2. NH <sub>4</sub> Cl	356,0	—	—	25
3. NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400,0	10	—	—
4. MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1000,0	10	10	10
5. CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	490,0	—	—	10
6. KOH	30,2			
EDTA (Komplexon II)	52,3	10	10	10
FeCl <sub>3</sub>	32,3			
7. KOH	72,8			
EDTA (Komplexon II)	101,0			
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	66,0			
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	15,4	10	10	10
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	3,9			
CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,9			
8. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50,0	10	10	10
9. Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	50,0	10	10	10
10. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	617,0	10	10	10
11. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	381,2	10	10	10

Das pH wird gewöhnlich auf 6,0 eingestellt. Verdünnung des Nährlösungskonzentrates mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 bis 1:100 je nach Durchflussrate.

## Literatur

- Erismann K. H. Untersuchungen zur CO<sub>2</sub>-Assimilation von *Lemna minor* L. unter *steady state*-Bedingungen mit besonderer Berücksichtigung der Aminosäure- und Proteinsynthese (in Vorbereitung).
- und Brunold Ch. 1967. Die Probeentnahme in kinetischen Stoffwechseluntersuchungen mit Wasserlinsen *Lemna minor* L. (Lemnaceen). *Exper.* **23**, 235.
  - und Wegner F. 1967. Der Einfluss einer wachstumshemmenden Kinetinkonzentration auf Chlorophyllgehalt, Photosyntheserate und Stärkeproduktion von *Lemna minor* L. *Flora* (Jena), A 158, 433.
- Fencel Z. 1963. A uniform system of basic symbols for continuous cultivation of microorganisms. *Fol. microbiol.* **8**, 192.
- 1966. Theoretical analysis of continuous culture systems. In: "Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms", ed. by I. Málek and Z. Fencel. Acad. Press New York and London, 69.
- Hansteen B. 1899. Über Eiweissynthese in grünen Phanerogamen. *Jahrb. Wiss. Bot.* **33**, 417.
- Hutner S.H. 1953. Comparative physiology of heterotrophic growth in plants. In: "Growth and differentiation in plants", ed. by W.E. Loomis, Iowa State College Press, Ames, 417.
- Hillman W.S. 1961. The *lemnaceae* or duckweeds. A review of the descriptive and experimental literature. *Bot. Rev.* **27**, 221.
- Kandeler R. 1960/61. Lemnaceen als Forschungsobjekt. *Ber. Phys.-Med. Ges. Würzburg* **70**, 81.
- Landolt E. 1957. Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **67**, 271.
- Málek I. 1966. The role of continuous processes and their study in the present development of science and production. In: "Theoretical and methodological basis of continuous culture of microorganisms", ed. by I. Málek and Z. Fencel. Acad. Press New York and London, 11.
- Monod, J. 1942. *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann & C<sup>ie</sup>, Paris.
- 1950. La technique de culture continue. *Théorie et application*. *Ann. Inst. Pasteur* **79**, 390.