

Dipl.-Ing. Claudia Dössereck, Leonberg

Reaktionstechnische Untersuchungen zur konjugativen Genübertragung beim mikrobiellen Schadstoffabbau

Reihe **15**: Umwelttechnik

Nr. **184**

Inhaltsverzeichnis	Seite
Symbolverzeichnis	IX
Glossar	XIV
Zusammenfassung	XVIII
1 Einführung	1
1.1 Mechanismen der Genübertragung	2
1.2 Genetisches Potential von Plasmiden	6
1.3 Genübertragung in der Umwelt	7
2 Problemstellung	13
3 Konjugation bei Gram-negativen Bakterien	15
3.1 Phänomenologische Betrachtung der Konjugation	15
3.2 Molekularbiologie des konjugativen Gentransfers	18
3.3 Regulation des Gentransfers	21
4 Material und Methoden	24
4.1 Bakterien	24
4.2 Medien	24
4.3 Stammhaltung	25
4.4 Anzuchtschema	27
4.5 Bestimmung der Biomassekonzentration	27
4.5.1 Trübungsmessung	28
4.5.2 Gravimetrische Bestimmung	28
4.6 Bestimmung der Bakterienzellzahl	28
4.6.1 Quantifizierung der einzelnen Kreuzungspartner über Lebendzell- zahlbestimmung	29
4.6.2 Bestimmung der Gesamtzellzahl	30
4.6.3 Berechnung der spezifischen Wachstumsrate μ	31
4.7 Isolation eines nicht-flockulierenden Rezipienten	31
4.8 Isolation eines Rezipienten mit hoher Nalidixinsäureresistenz	32
4.8.1 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration und der Resistenz- stabilität gegen Nalidixinsäure	32
4.8.2 Isolation einer Spontanmutante	32
4.9 Konjugation in absatzweiser Kultur	34

4.9.1 Konjugation in der Suspension	34
4.9.2 Filterkreuzung	35
4.10 Kontinuierliche Prozeßführung	36
4.10.1 Aufbau der Fermenteranlage	36
4.10.2 Durchführung der kontinuierlichen Fermentation	37
4.11 Aufbau der 2-stufigen Anlage	38
4.12 Isolation und Quantifizierung des Biofilms	41
4.13 Modellsimulation und Parameterschätzung	41
4.14 Berechnung von Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten aus Literaturdaten	41
4.15 Chemikalien	43
4.16 Biologische Sicherheitsmaßnahmen	43
5 Modellsystem TOL-Plasmid pWWO	44
5.1 Das TOL-Plasmid und die phänotypischen Eigenschaften der Modell-Kreuzungspartner	44
5.2 Genetisches Potential des TOL-Plasmids zur <i>in vivo</i> Konstruktion von Hybridstämmen	46
6 Etablierung reproduzierbarer Bedingungen zum Nachweis von Konjugationsereignissen	48
6.1 Isolation eines nicht-flockulierenden Rezipienten	48
6.2 Etablierung von Probenahme und Nachweis der Konjugationsereignisse	49
6.2.1 Abstoppen des konjugativen DNA- Transfers	49
6.2.2 Verhinderung von Plattenkreuzung bei der Selektion der Transkonjuganten	50
6.2.2.1 Wirkung des Antibiotikums Nalidixinsäure	51
6.2.2.2 Selektion einer Nalidixinsäure-resistenten Mutante	51
6.2.2.3 Hemmwirkung von Nalidixinsäure bei der Plattenkreuzung	51
6.3 Quantifizierung der einzelnen Kreuzungspartner über Lebendzellzahlbestimmung	53
7 Reaktionskinetische Modellierung - Stand des Wissens	55
8 Reaktionstechnische Untersuchungen zur Konjugation in absatzweise und kontinuierlich geführten Experimenten	60
8.1 Kreuzungsexperimente bei absatzweiser Prozeßführung	60

VII

8.1.1 Wachstum der einzelnen Kreuzungspartner	60
8.1.2 Reaktionskinetisches Modell zur Konjugation bei absatzweiser Prozeßführung	65
8.1.3 Auswertung der experimentellen Beobachtungen	66
8.1.4 Fazit	72
8.2 Kreuzungsexperimente bei kontinuierlicher Prozeßführung	73
8.2.1 Prozeßaufbau und Start der Kreuzung	73
8.2.2 Mathematische Beschreibung der Konjugation in kontinuierlicher Anlage	74
8.2.3 Auswertung der experimentellen Beobachtungen	77
8.2.4 Fazit	84
9 Etablierung einer 2-stufigen kontinuierlichen Prozeßführung	85
9.1 Prozeßaufbau, Massenbilanzen und Stabilitätsbetrachtung	85
9.1.1 Prozeßaufbau	85
9.1.2 Massenbilanzen	88
9.1.3 Stabilitätsbetrachtung	90
9.1.4 Auslegung der Anlage	91
9.2 Koexistenz von Donor und Rezipient	95
9.3 Konjugation in der Kreuzungsstufe	97
9.3.1 Stationäre Transkonjugantenkonzentration	97
9.3.2 Variation der Rührerdrehzahl	98
9.3.2.1 Dehzahländerungen von 300 Upm -450 Upm - 600 Upm - 900 Upm -1500 Upm	99
9.3.3 Ermittlung der wahren Reaktionsgeschwindig- keitskonstante in der Suspension	102
9.3.3.1 Dynamisches Verhalten des Prozesses direkt nach Zuschalten der Stufe I	102
9.3.3.2 Biofilmbildung und Konjugation im Biofilm	110
9.3.3.2.1 Gegenüberstellung der Transkonjuganten- konzentration im Biofilm und in der Suspension	110
9.3.3.2.2 Abschätzung einer Reaktionsgeschwindigkeits- konstante für den Biofilm	112

VIII

9.3.3.3 Einfluß der Rührerdrehzahl auf die Konjugation zwischen suspendierten Kreuzungspartnern	116
9.4.3 Beurteilung der 2-stufigen kontinuierlichen Prozeßführung	118
10 Einsatz von Reporterenzymen zur quasi on-line Quantifizierung der Transferereignisse	120
10.1 Markierung und Nachweis der Kreuzungspartner und Transkonjuganten	120
10.2 Quantifizierung des Wachstums und der Ausbreitung des TOL-Plasmids in absatzweisen Kreuzungsexperimenten	121
11 Abschließende Betrachtung zur Konjugation im Biofilm - Perspektiven der Bioaugmentation	126
11.1 Beobachtungen in Standard-Labor-Kreuzungsexperimenten	126
11.2 Konjugation im realen Biofilm	133
11.3 Perspektiven zur Bioaugmentation	137
Anhang	143
Literaturverzeichnis	150