FORTSCHRITT-BERICHTE VDI

Dipl.-Ing. Claudia Dössereck, Leonberg

Reaktionstechnische Untersuchungen zur konjugativen Genübertragung beim mikrobiellen Schadstoffabbau

Reihe **15**: Umwelttechnik Nr. **184**

RVK00
HLuHB Darmstadt
13735689

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 Lebendzellzahlbestimmung 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 Resistenzstabilität 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 *in vivo* 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

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 Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 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 Transkonjugantenkonzentration im Biofilm und in der Suspension 110
9.3.3.2.2 Abschätzung einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für den Biofilm 112

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