

4543 - 372 6

**VERBESSERUNG DER ABBAULEISTUNG DES BAKTERIENSTAMMES
BN6 GEGENÜBER SULFONIERTE AROMATISCHEN VERBINDUNGEN**

VERGLEICH ZWISCHEN HYBRIDORGANISMUS UND MISCHKULTUR

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der
Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Rainer Ruß
aus Frankfurt am Main



Hauptberichter: Prof. Dr. H.-J. Knackmuss
Mitberichter: Prof. Dr. C. Syldatk
Tag der mündlichen Prüfung: 07. 11. 1996

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
1996

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 ZUSAMMENFASSUNG	10
2 EINLEITUNG	12
2.1 Azofarbstoffe	13
2.2 Aromatische Sulfonsäuren	19
2.3 Gentechnik in der Umweltmikrobiologie	21
2.4 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit	26
3 MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Bakterienstämme und Plasmide	27
3.2 Nährlösungen	29
3.2.1 Mineralmedium	29
3.2.2 Vitaminlösung	29
3.2.3 Antibiotika- und Aminosäurelösungen	30
3.2.4 Komplexmedien	30
3.3 Stammerhaltung	30
3.4 Zellanzuchten	31
3.4.1 Anzucht der Mischkultur aus Stamm BN6 und <i>Pseudomonas putida</i> NCIB9816	31
3.5 Kulturen in Bioreaktoren	31
3.5.1 Fermenter mit 1l Arbeitsvolumen	31
3.5.2 Fermenter mit 4l Arbeitsvolumen	31
3.6 Taxonomische Untersuchungen	32
3.6.1 Gram-Färbung	32
3.6.2 KOH-Test	32
3.6.3 BIOLOG-Identifizierungssystem	32
3.7 Messung des Bakterienwachstums	33
3.8 Biuret-Proteinbestimmung mit ganzen Zellen	33
3.9 Trockengewichtsbestimmung	33
3.10 Bestimmung von D-Glucose	33
3.11 Herstellung zellfreier Extrakte	34
3.12 Proteinbestimmung nach Bradford	34

3.13 Bestimmung von Enzymaktivitäten	35
3.13.1 1,2-Dihydroxynaphthalin-Dioxygenase	35
3.13.2 <i>trans</i> -2'-Hydroxybenzalpyruvat-Aldolase	35
3.13.3 Salicylaldehyd-Dehydrogenase	35
3.13.4 Salicylsäure-1-Monooxygenase	36
3.13.5 Brenzcatechin-2,3-Dioxygenase	36
3.13.6 Amaranth-Reduktase	36
3.13.7 Flavin-Reduktase	38
3.14 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	38
3.15 Enzymatische Präparation von 2-Hydroxychromen-2-carboxylat	41
3.16 Herstellung von <i>trans</i>-2'-Hydroxybenzalpyruvat	41
3.17 Darstellung von 4-Hydroxylaminobenzoat	42
3.18 UV/Vis-Spektroskopie	43
3.19 Molekulargenetische Methoden	43
3.19.1 Plasmidpräparationen aus <i>E.coli</i>	43
3.19.2 Plasmidpräparation über Dichtegradientenzentrifugation	43
3.19.3 Ermittlung der DNA-Konzentration und Reinheit	44
3.19.4 Enzymatische Behandlung von DNA	44
3.19.4.1 Spaltung mit Restriktionsenzymen	44
3.19.4.2 Klenow-Enzymbehandlung	45
3.19.4.3 Alkalische Phosphatasebehandlung	45
3.19.4.4 Ligation	45
3.19.5 Agarose-Gelelektrophorese	45
3.19.5.1 Elution von DNA aus Agarosegelen	46
3.19.6 Präzipitation von DNA	46
3.19.6.1 Ethanol-fällung	46
3.19.6.2 Isopropanol-fällung	46
3.19.6.3 Phenol/Chloroform-Extraktion	46
3.19.7 Transfer von DNA in <i>Escherichia coli</i>	46
3.19.7.1 Transformation von <i>E.coli</i> JM109 (TSS-Methode)	47
3.19.7.2 Transformation von <i>E.coli</i> S17-1 (MOPS-Methode)	47
3.19.8 Filterkreuzungen	47
3.20 Chemikalien und Biochemikalien	48
4 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	49
4.1 Die Idee der Flavin-Reduktase als Azoreduktase	49
4.2 Untersuchungen zu den Eigenschaften einer klonierten Flavin-Reduktase aus <i>Escherichia coli</i>	49
4.2.1 Messung der spezifischen Aktivität der Flavin-Reduktase in zellfreien Extrakten	49
4.2.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität zur Reduktion von Amaranth	50
4.2.3 Die Fähigkeit der Flavin-Reduktase zur Reduktion aromatischer Nitroverbindungen	52

4.3 Übertragung der Flavin-Reduktase-Aktivität auf den Bakterienstamm BN6	53
4.3.1 Subklonierung des Flavin-Reduktasegens (<i>fre</i>) in den Klonierungsvektor pJOE890	54
4.3.2 Subklonierung des <i>fre</i> -Gens in den „broad host range“ Expressionsvektor pRK415	56
4.3.3 Überlebensrate der Zellen des Stammes BN6 bei Filterkreuzungen	58
4.3.4 Übertragung des Plasmids pRJR34 auf den Bakterienstamm BN6	58
4.3.5 Bestimmung der spezifischen Aktivität der Flavin-Reduktase in zellfreien Extrakten von BN6 (pRJR34)	60
4.3.6 Einfluß verschiedener Substrate auf die Aktivität der klonierten Flavin- Reduktase in Rohextrakten des Stammes BN6 (pRJR34)	60
4.3.7 Bestimmung der Azoreduktase-Aktivität mit Amaranth als Substrat in zellfreien Extrakten des Stammes BN6 (pRJR34)	61
4.3.8 Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes BN6 (pRJR34)	62
4.4 Chemische Reduktion von Azofarbstoffen	63
4.4.1 Reduktive Spaltung der Azobrücke durch chemisch reduziertes FAD	63
4.4.2 Reduktion von Amaranth durch NADH	65
4.5 Auswahl wirtschaftlich relevanter Azofarbstoffe	65
4.5.1 Bestimmung der Absorptionsmaxima und molaren Extinktionskoeffizienten der untersuchten Azofarbstoffe	68
4.6 Reduktion von Azofarbstoffen durch zellfreie Extrakte	69
4.6.1 Reduktion verschiedener Azofarbstoffen durch zellfreie Extrakte des Stammes BN6	69
4.6.2 Reduktion verschiedener Azofarbstoffe durch zellfreie Extrakte des Stammes <i>E.coli</i> K38 (pEE1001)	70
4.7 Reduktion von Azofarbstoffen durch anaerobe Zellsuspensionen	70
4.7.1 Reduktion verschiedener Azofarbstoffe durch Zellsuspensionen des Bakterienstammes BN6	71
4.7.2 Reduktion von Azofarbstoffen durch andere Bakterienkulturen	72
4.7.2.1 Reduktion von Azofarbstoffen durch <i>Escherichia coli</i>	72
4.7.2.2 Reduktion von Azofarbstoffen durch eine TNT-reduzierende anaerobe Mischpopulation	74
4.7.3 Reduktion von Amaranth oder Mordant Yellow 3 durch ganze Zellen des Stammes BN6 (pRJR34)	75
4.7.4 Versuche zur Steigerung der Azoreduktionsrate durch Zugabe von Flavinen oder die Zellmembran permeabilisierende Substanzen	76
4.8 Das Verhalten des Stammes BN6 unter anaeroben Bedingungen	80
4.9 Versuche zur aeroben Reduktion von Azofarbstoffen durch den Stamm BN6	81
4.9.1 Versuche mit Festmedien	81
4.9.2 Versuche in Flüssigkultur	82
4.10 Konstruktion eines BN6 Hybridstammes mit der Fähigkeit zur Mineralisierung von Naphthalin-2-sulfonsäure	83
4.10.1 Charakterisierung des Stammes BN6 mittels des BIOLOG Bakterien-Identifizierungssystems	83
4.10.2 Versuche zur Übertragung der genetischen Information für die Salicylatverwertung auf den Bakterienstamm BN6 durch <i>in-vivo</i> -Methoden	84
4.10.2.1 Kreuzungsexperimente zwischen Salicylat verwertenden Bakterienstämmen und dem Stamm BN6	84
4.10.2.2 Versuche die Mobilität der Naphthalin Plasmide mit Hilfe des Plasmids RP1 zu steigern	87
4.10.2.3 Kreuzungsexperimente mit drei Partnern (triple matings)	89

4.10.2.4 Mischkulturen aus Salicylat verwertenden Bakterienstämmen und dem Stamm BN6	90
4.10.2.5 Kreuzungsexperimente und Etablierung von Mischkulturen mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> sp. G2 und Stamm BN6	91
4.10.2.6 Versuche zur <i>in vivo</i> Klonierung der <i>sal</i> -Gene mit Hilfe von ECM-Plasmiden	91
4.10.2.7 Anreicherung Salicylat verwertender Bakterien	92
4.10.2.7.1 Taxonomische Charakterisierung der Neuisolate	92
4.10.3 Konstruktion Salicylat verwertender BN6 Hybridstämme mit gentechnischen Methoden	93
4.10.3.1 Klonierung der <i>sal</i> -Gene in den Expressionsvektor pRK415	93
4.10.3.2 Übertragung der Fähigkeit zum Abbau von Salicylat auf den Stamm BN6	95
4.10.3.3 Übertragung des Plasmids pWW60-3026 auf den Stamm BN6	96
4.11 Vergleich zwischen BN6 Hybridstämmen und natürlicher Mischkultur	97
4.11.1 Vergleich des Wachstums der Mischkultur und der BN6 Hybridorganismen	98
4.11.1.1 Wachstum mit Naphthalin-2-sulfonsäure	98
4.11.1.2 Veränderung der Verdopplungszeiten nach Langzeitkultivierung mit Naphthalin-2-sulfonsäure	99
4.11.1.3 Wachstum mit verschiedenen Naphthalin-2-sulfonsäure-Konzentrationen	100
4.11.1.4 Wachstum mit Naphthalin-2-sulfonsäure und 6-Aminonaphthalin- 2-sulfonsäure	101
4.11.2 Wachstum von Stamm BN6 in Gegenwart von Salicylat	103
4.11.3 Stabilität des Salicylat ⁻ -Phänotyps der BN6 Hybridstämmen unter nichtselektiven Bedingungen	104
4.11.3.1 Wachstum mit Komplexmedium	104
4.11.3.2 Stabilität des Salicylat ⁻ -Phänotyps der BN6 Hybridstämmen bei Wachstum mit 6-Aminonaphthalin-2-sulfonsäure	107
4.11.4 Stabilität der Mischkultur unter nichtselektiven Bedingungen	110
4.11.5 Anteil der Stämme BN6 und <i>Ps. putida</i> NCIB9816 an der Mischkultur während des Wachstums mit Naphthalin-2-sulfonsäure	111
4.11.6 Substratumsätze mit Ruhezellen des BN6 Wildtyps, der BN6 Hybridstämme sowie der Mischkultur aus Stamm BN6 und <i>Ps.p.</i> NCIB9816	113
4.11.6.1 Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure	113
4.11.6.2 Umsatz substituierter Naphthalin-2-sulfonsäuren	115
4.11.7 Enzymaktivitäten in zellfreien Extrakten des BN6 Wildtyps, der BN6 Hybridstämme sowie der Mischkultur aus Stamm BN6 und <i>Ps.p.</i> NCIB9816	121
4.11.8 Versuche in kontinuierlicher Kultur	122
4.11.8.1 Wachstum des Stammes BN6 (pWW60-3026) in kontinuierlicher Kultur mit Naphthalin-2-sulfonsäure	123
4.11.8.2 Wachstum der Mischkultur aus Stamm BN6 und <i>Ps.p.</i> NCIB9816 in kontinuierlicher Kultur mit Naphthalin-2-sulfonsäure	125
4.11.8.3 Fedbatch Experimente mit BN6 (pWW60-3026)	127
4.11.8.4 Direkte Konkurrenz zwischen BN6 (pWW60-3026) und der Mischkultur unter kontinuierlichen Bedingungen	129
5 DISKUSSION	134
5.1 Untersuchungen zur Reduktion von Azofarbstoffen	134
5.1.1 Reduktion von Azofarbstoffen mit Hilfe einer klonierten Flavin-Reduktase	134
5.1.1.1 Vergleich der unter verschiedenen Bedingungen gemessenen Flavin- und Azoreduktaseaktivitäten	135

5.1.1.2 Relevanz der hochexprimierten Flavin-Reduktase für die <i>in vivo</i> Reduktion von Azofarbstoffen durch den Bakterienstamm BN6	137
5.1.2 Die Reduktion wirtschaftlich relevanter Azofarbstoffe	139
5.1.2.1 Eigenschaften des Komplexfarbstoffs Acid Black 52	142
5.2 Vergleich zwischen Hybridorganismus und Mischkultur	143
5.2.1 Die Übertragung von Plasmiden auf den Bakterienstamm BN6	143
5.2.2 Die Stabilität des Salicylat ⁺ -Phänotyps in den BN6 Hybridstämmen	144
5.2.3 Vergleich zwischen Mischkultur und Hybridstamm in absatzweiser Kultur	146
5.2.3.1 Der Umsatz substituierter Naphthalin-2-sulfonsäuren durch Ruhezellen	146
5.2.3.2 Wachstum mit Naphthalin-2-sulfonsäure	147
5.2.3.3 Wachstum mit substituierten Naphthalin-2-sulfonsäuren	147
5.2.3.4 Morphologie der Mischkultur aus Stamm BN6 und <i>Pseudomonas putida</i> NCIB9816	148
5.2.4 Vergleich zwischen Mischpopulation und Hybridstamm bei kontinuierlicher Kultivierung	149
5.2.5 Betrachtungen zum mikrobiellen Wachstum in absatzweiser oder kontinuierlicher Kultur	151
5.2.6 Konkurrenz zwischen Hybridorganismen und Mischkulturen	154
5.2.7 Konkurrenz zwischen einem BN6 Hybridstamm und der Mischkultur aus Stamm BN6 und <i>Ps. putida</i> NCIB9816	155
5.2.8 Abschließende Überlegungen	164
6 LITERATURVERZEICHNIS	165
7. ANHANG	180