

Aufbau und Inbetriebnahme einer Labor- Chemostaten-Anlage zur Kokultivierung mutualistischer Bakterienstämme

Bachelorarbeit

vorgelegt an der Fachhochschule Jena
Fachbereich Medizintechnik/ Biotechnologie
Studiengang Biotechnologie

Bearbeitungsort: Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena
Abteilung Bioorganische Chemie

Institutsbetreuer: Dr. C. Kost
Hochschulbetreuer: Prof. Dr. W. Künkel

Bearbeitet von: Tobias Weise
Matrikelnummer: 630424
Studiengang: Biotechnologie

Jena, August 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Mutualismus	1
1.2 Bakteriellcs Wachstum	2
1.3 Grundprinzip des Chemostaten	3
1.3.1 Biomassebilanz.....	4
1.3.2 Kontrolle und Anpassung der Verdünnung:	5
1.4 Markierungsstrategie	5
1.5 Zielstellung	6
2 Material und Methoden.....	7
2.1 Material.....	7
2.1.1 Bakterien und Plasmide	7
2.1.2 Primer und Enzyme	9
2.1.3 Geräte	9
2.1.4 Besondere Verbrauchsmaterialien.....	10
2.1.5 Puffer und Medien.....	11
2.2 Methoden zur Laborarbeit	12
2.2.1 Messung der optischen Dichte von Bakterien-Suspensionen	12
2.2.2 Anlegen einer -80 °C Glyzerol-Kultur	12
2.2.3 Herstellung von kompetenten Zellen mithilfe der Calciumchlorid-Methode	12
2.2.4 Transformation von kompetenten <i>E. Coli</i>	13
2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	14
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	15
2.2.7 Durchflusszytometrie	16
2.2.8 Bestimmung der Wachstumsrate von Bakterien-Kulturen.....	20
2.3 Konstruktion und Inbetriebnahme der Chemostaten-Anlage	21
2.3.1 Inkubationsbehälter.....	21
2.3.2 Medien austausch.....	21
2.3.3 Leitungssystem	22
2.3.4 Durchmischung des Kulturvolumen	23

2.3.5	Temperaturkontrolle	23
2.3.1	Steril-Filtration von Kulturmedium	24
2.3.2	Reinigung und Sterilisation	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Markierungsstrategie	26
3.1.1	Überprüfung der korrekten Tn7 Insertion mittels PCR	27
3.1.2	Überprüfung der Fluoreszenzmarkierung mittels Durchflusszytometrie	27
3.2	Konstruktion der Chemostaten-Anlage	28
3.2.1	Inkubationsbehälter	28
3.2.2	Medienaustausch	29
3.2.3	Leitungssystem	31
3.2.4	Temperaturkontrolle	32
3.2.5	Steril-Filtration von Kulturmedium	33
3.2.6	Montage/Demontage	34
3.2.7	Betrieb	35
3.3	Bestimmung Wachstumsrate <i>E. coli</i> EGFP 17	36
3.4	Reinigung und Sterilisation	36
3.5	Kultivierung einer <i>E.coli</i> -Monokultur	37
3.5.1	Erster Chemostaten-Lauf	37
3.5.2	Zweiter Chemostaten-Lauf	38
4	Diskussion	40
4.1	Markierungsstrategie	40
4.2	Konstruktion der Chemostaten-Anlage	40
4.2.1	Inkubationsbehälter	40
4.2.2	Medienaustausch	41
4.2.3	Durchmischung des Kulturvolumens	41
4.2.4	Reinigung und Sterilisation	42
4.3	Betrieb der Chemostaten-Anlage	43
4.3.1	Kultivierung einer <i>E. coli</i> - Monokultur	43
4.3.2	Biofilmbildung während der <i>E. coli</i> - Monokultur	43
5	Zusammenfassung	44
6	Ausblick	45

7	Anhang.....	46
7.1	Protokoll zur Vorbereitung und Montage der Chemostaten-Anlage	46
7.2	Protokoll zum Betrieb der Chemostaten-Anlage.....	50
7.3	Anhänge zu Versuchsdurchführungen	52
	Abkürzungsverzeichnis.....	55
	Abbildungsverzeichnis.....	56
	Tabellenverzeichnis.....	57
	Literaturverzeichnis	58
	Selbstständigkeitserklärung.....	59
	Danksagung	60

1 Einleitung

1.1 Mutualismus

In der Natur sind Organismen häufig gezwungen ein Habitat zu teilen, dabei treten sie unweigerlich in Interaktion miteinander. Die Interaktionen verkomplizieren sich Zusehens, je mehr Interaktionspartner beteiligt sind. Für den einzelnen Organismus kann die Symbiose zum eigenen Vorteil (+) bzw. Nachteil (-) gereichen, oder keinerlei Beeinflussung darstellen (Boucher, 1985). Wird ein Habitat mit zwei Interaktionspartnern betrachtet so ergeben sich 6 mögliche Beziehungen (Tab. 1).

Tabelle 1: Segmente des symbiotischen Kontinuums. Betrachtung zwei assoziierter Organismen; „+“ – potentielle Fitness steigt, „-“ – potentielle Fitness sinkt, „o“ – keine Beeinflussung (Boucher, 1985)

Symbol	Bezeichnung
- / -	Konkurrenz
- / o	Amensalismus
- / +	Agonismus
o / o	Neutralismus
o / +	Kommensalismus
+ / +	Mutualismus

Mit dem Satz „*Different kinds of organisms help each other out.*“ beschreibt D. H. Boucher im Buch „The biology of mutualism“ treffend den Grundgedanken der mutualistischen Interaktion. Als Mutualismus wird das Zusammenleben bzw. die Kooperation zweier Organismen bezeichnet, welche/s zum beiderseitigen Vorteil geschieht. Der Mutualismus kann durch den Austausch von Substraten und Metaboliten bestehen oder durch das Gewähren von Dienstleistungen, vgl. Schutz oder Bestäubung (Smith und Smith, 2006).

Mutualistische Interaktionen sind in der gesamten belebten Umwelt verbreitet. Um die Entstehung dieser, sowie die Interessenkonflikte in einem mutualistischen System zu verstehen, wurden in der Forschungsgruppe Bakterienstämme generiert, welche ein künstliches mutualistisches System bilden (Merker und Pande, 2010, unveröffentlicht).

Durch die gezielte Deletion einzelner Gene sind Mutanten (A, B) erzeugt worden, welche eine Auxotrophie (X⁻ bzw. Y⁻) für eine bestimmte Aminosäure (X bzw. Y) besitzen. Gleichzeitig produzieren beide Mutanten jeweils die essenzielle Aminosäure des Interaktionspartners (Abb. 1).

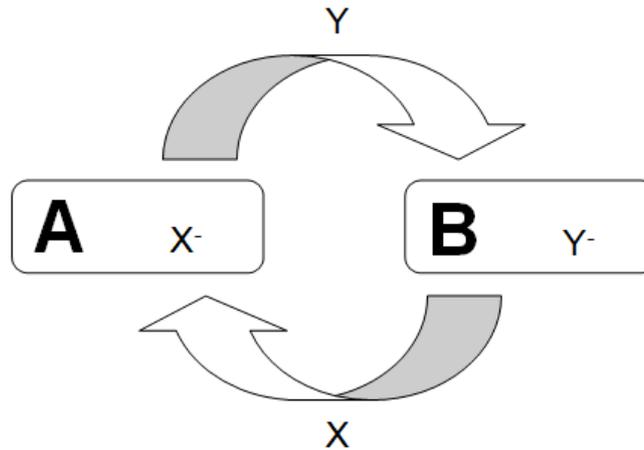


Abbildung 1: Entwurfsschema des Modellsystems; A,B – Interaktionspartner, X,Y – Aminosäuren, X⁻,Y⁻ - Auxotrophie für entsprechende Aminosäure; Pfeile symbolisieren die wechselseitige Zufütterung (*cross-feeding*) der entsprechenden Aminosäure.

Mit Hilfe dieses Modells sollen verschiedene Hypothesen geprüft werden: Ob durch die Interaktion ein synergetischer Effekt eintritt, mit welchem die relative *Fitness* der Kokultur gegenüber der einzelnen Interaktionspartner erhöht wird. Eine andere Hypothese ist die Entstehung und das Verhalten von Subpopulationen („Betrüger“), welche noch die Auxotrophie für eine Aminosäure besitzen, jedoch keine Aminosäuren des Interaktionspartners bilden. Um diese adaptiven Prozesse zu untersuchen, ist die Durchführung einer kontinuierlichen Kultur für diese Versuche vorteilhaft.

1.2 Bakteriellles Wachstum

Das Wachstum von Bakterien in einer diskontinuierlichen Kultur (Batch-Kultur) kann im Wesentlichen in vier Phasen unterteilt werden. Nach dem Animpfen der Kultur beginnt eine kurze Anpassungs-Phase (Lag-Phase), bei welcher sich die Bakterien-Population an die neuen Umgebungsbedingungen anpasst. Nach der Anpassungsphase geht die Kultur in eine Phase exponentiellen Wachstums (Log-Phase) über. Durch das Erreichen einer kritischen Populationsdichte bzw. einer Ressourcenlimitation stoppt das Wachstum der Kultur (Stationäre-Phase). Sind alle im Medium enthaltenen Ressourcen aufgebraucht tritt, die Kultur in die Sterbe-Phase ein (Madigan und Martinko, 2009).

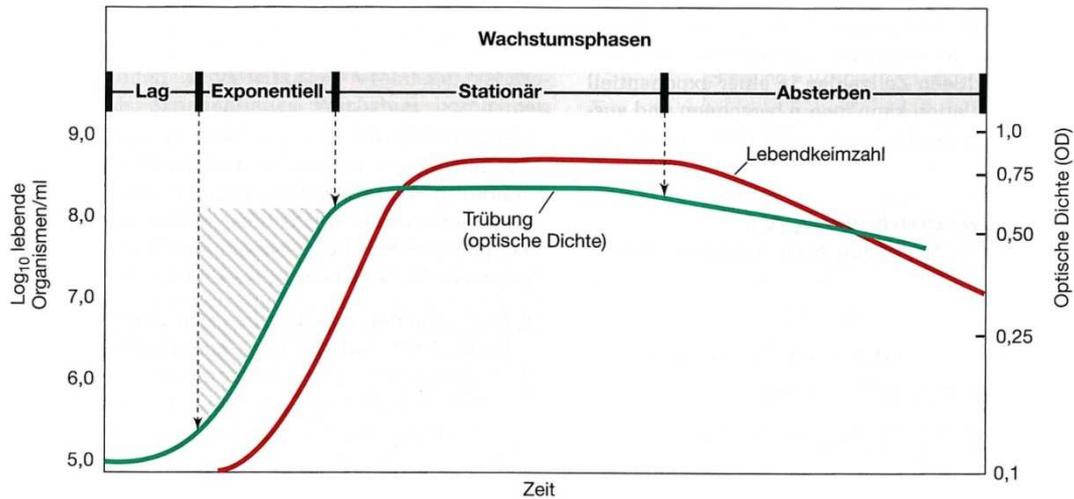


Abbildung 2: Typische Wachstumskurve einer bakteriellen Population (Madigan und Martinko, 2009).

Während der Log-Phase kann das Populationswachstum durch folgende Gleichung beschrieben werden (Berkholz, 2009):

$$c_x(t) = c_x(t_0) * e^{\mu * t}$$

Die Formel gibt die Biomassenkonzentration zum jeweiligen Zeitpunkt ($c_x(t)$) an. Berechnet wird diese aus der Animpfdichte ($c_x(t_0)$), sowie der Wachstumsrate (μ). Durch logarithmieren der obigen Formel wird eine lineare Gleichung der Form: „ $y = m * x + n$ “ erzeugt, deren Anstieg der Wachstumsrate „ μ “ entspricht:

$$\ln(c_x(t)) = \mu * t + \ln(c_x(t_0))$$

1.3 Grundprinzip des Chemostaten

Die bekannteste Methode zur Kultivierung von Bakterien stellt eine diskontinuierliche Kultur (*batch* – Kultur) dar. Die diskontinuierliche Kultur kann als ein geschlossenes System betrachtet werden, in welchem ein Volumen an Nährmedium vorgegeben ist. Durch die metabolischen Aktivitäten der Mikroorganismen wird die Zusammensetzung des Mediums stetig verändert. In einer diskontinuierlichen Kultur können Mikroorganismen also nur innerhalb eines bestimmten Zeitrahmens kultiviert werden, bevor alle Nährstoffe verbraucht, oder die Umgebungsbedingungen durch Stoffwechselprodukte so verschlechtert sind, dass das Wachstum der Kultur stagniert bzw. die Kultur abstirbt.

Für viele Experimente sind eine konstante Medienzusammensetzung und ein konstantes Wachstum von Mikroorganismen essenziell. Die kontinuierliche Kultur (Chemostat) bietet den Vorteil dass Bakterien über einen langen Zeitraum hinweg in einer konstanten Medienzusammensetzung, Populationsdichte sowie Wachstumsrate kultiviert werden können. Der Chemostat wird als „offenes System“ bezeichnet dass, kontinuierlich neues Medium aus einem Vorratsbehälter in das Kulturgefäß dosiert, während mit gleicher Flussgeschwindigkeit Kulturflüssigkeit abgeleitet wird (Madigan und Martinko, 2009).

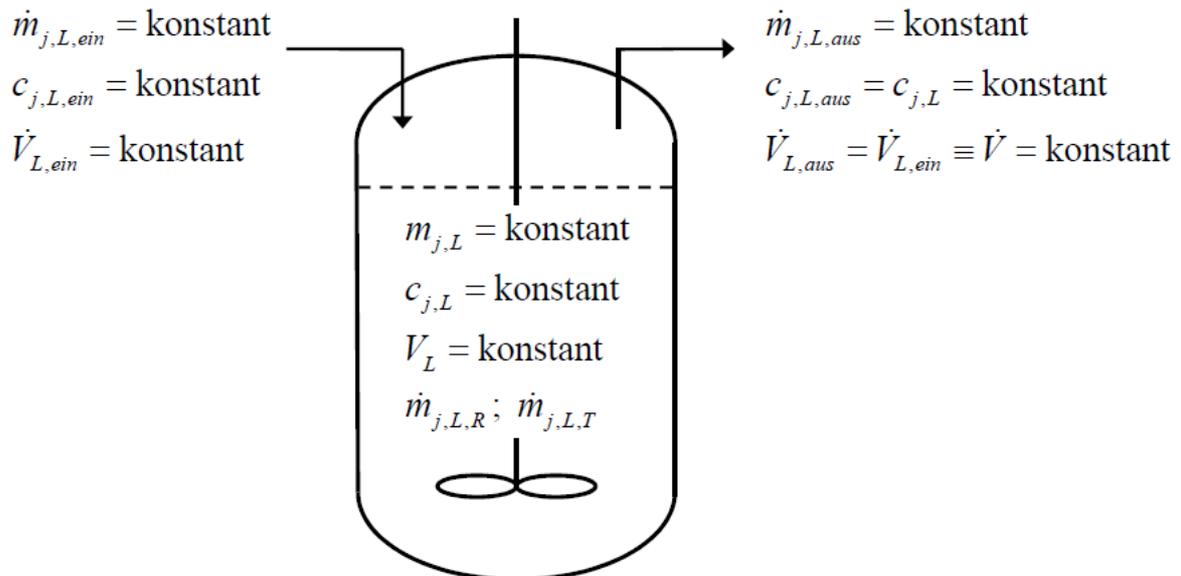


Abbildung 3: Prinzipskizze Chemostat (Berkholz 2009); Symbole: \dot{m} – Massenstrom, c – Konzentration, \dot{V} – Volumenstrom; Indices: j – Komponente „j“ (z.B.: Substrat), L – Flüssigphase (*liquid*), ein – Einstrom, aus – Ausstrom, R – Reaktionsprozess, T – Transportprozess (Berkholz, 2009).

1.3.1 Biomassebilanz

Die im Kulturvolumen enthaltene Bakterienpopulation wird konstant mit einer Verdünnungsrate „D“ verdünnt. Dem Auswaschen der Population aus dem Chemostaten steht nur das eigene Wachstum (Wachstumsrate „ μ “) entgegen. Um die Population im Chemostaten konstant zu halten, muss folglich gelten:

$$\mu = D \quad \left(\text{mit } D = \frac{\dot{V}_{L,ein}}{V_L}\right)$$

Diese Beziehung trifft jedoch nur unter der Voraussetzung zu, dass die Sterberate in der Population gegenüber der Wachstumsrate vernachlässigbar klein ist. Zusätzlich muss die Wachstumsrate „ μ “ unter der maximalen Wachstumsrate „ μ_{max} “ des verwendeten Stammes liegen (Berkholz, 2009). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind beide Bedingungen gegeben. Somit folgt die Biomassenbilanz des Chemostaten mit:

$$\mu = D = \frac{\dot{V}_{L,ein}}{V_L}$$

Die Bestimmung der Wachstumsrate (μ [h^{-1}]) ist essenziell für die Kultivierung von Bakterien-Suspensionen in einem Chemostaten. Für die Ermittlung der Wachstumsrate müssen alle Umgebungs-Parameter (z.B.: Medienzusammensetzung, pH-Wert, Temperatur, Belüftung, Rührung, ggf. Licht) bekannt und festgelegt sein. Die Wachstumsrate gilt nur für den untersuchten Bakterien-Stamm bei gegebenen Umgebungsbedingungen. Die Wachstumsrate wird in einer Batch-Kultur ermittelt.

1.3.2 Kontrolle und Anpassung der Verdünnung:

Das bakterielle Wachstum entspricht unter gegebenen Bedingungen folgender Formel (1.2): $\ln(c_x(t)) = \mu * t + \ln(c_x(t_0))$. Da im Chemostaten eine konstante Biomassekonzentration $c_x(t)$ gewünscht ist, wird $D=\mu$ gesetzt. Die Biomassekonzentration im Chemostaten wird folglich mit $\ln(c_x(t)) = (\mu - D) * t + \ln(c_x(t_0))$ beschrieben. Eine Veränderung der Biomassekonzentration zeigt an, dass μ und D nicht gleich groß sind. Steigt c_x , so ist $\mu > D$, sinkt c_x , so ist $\mu < D$. In einem Plot ($\ln(c_x(t))$ gegen t) wird diese Differenz als linearer Anstieg bzw. Abfall (Δ) sichtbar ($\Delta=\mu-D$). Da die Verdünnung D bekannt ist, kann aus dem Zusammenhang $\Delta=\mu-D$ somit die aktuelle Wachstumsrate berechnet und die Verdünnung angepasst werden ($\Delta=0$).

1.4 Markierungsstrategie

Um die Populationsentwicklung beider Interaktionspartner zusammen beobachten zu können, müssen beide Stämme mittels einer Methode eindeutig von einander zu unterscheiden sein. Diese Differenzierung kann methodisch auf mehreren Wegen erreicht werden. Eine Selektion mittels phänotypische Marker (z.B.: Fluoreszenzmarkierung) wurde in dieser Arbeit gegenüber selektiver Marker (z.B.: Antibiotika-Resistenzen, Auxotrophie-Marker) vorgezogen. Die Fluoreszenzmarkierung bietet den Vorteil eines minimierten Arbeits- und Messaufwand bei der Populationsbestimmung. Auch ist eine geringere Fehlerquote durch die Messung in einem Durchflusszytometer (2.2.7) gegenüber einer mikrobiologischen Methode (z.B. ausplattieren) gegeben.

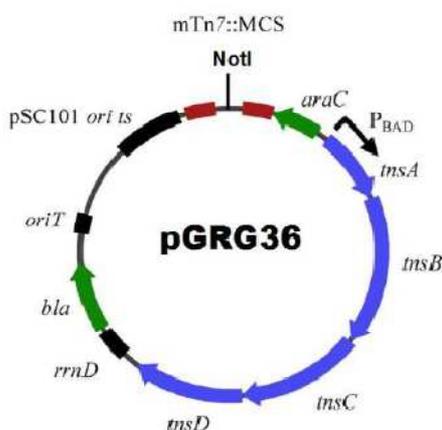


Abbildung 4: pGRG36 mit Tn7-Transposon und MCS (Scholz, 2011)

Die in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzmarkierung wurde im Rahmen einer Diplomarbeit (Scholz, 2011) innerhalb der Forschungsgruppe entwickelt. Für die Fluoreszenzmarkierung stellte Frau Scholz insgesamt drei pGRG36 Plasmide zur Verfügung in deren MCS (*multiple cloning site*) verschiedene Fluoreszenzproteine legiert worden sind (Abb. 4).

Das *Insert* der MCS wird durch das Tn7-Transposon in das Genom des Bakteriums integriert (McKenzie, 2006). Von dem jeweiligen Fluoreszenzprotein liegt anschließend in der *attTn7*-Region lediglich eine Kopie vor, weshalb die Markierung vergleichsweise schwach ausgeprägt ist. Die *attTn7*-Region ist eine konservierte Region, welche in den meisten gram-negativen Bakterien vorkommt (McKenzie, 2006). Sie beinhaltet keine essenziellen Gene, wodurch bei einer Integrierung in diese Region keine essenziellen Gene ausgeschaltet werden.

Die chromosomale Markierung bietet den Vorteil, dass die Funktion unabhängig von einem selektiven Druck (Antibiotika) erhalten bleibt und stabil vererbt wird. Zusätzlich ist die schwache Markierung vorteilhaft, da der Metabolismus des Organismus nur geringfügig beeinträchtigt ist (Scholz, 2011).

1.5 Zielstellung

Zweck der Praktikumsphase sowie der Bachelorarbeit ist die Konstruktion und Inbetriebnahme einer Labor-Chemostaten-Anlage zur Durchführung von Langzeitexperimenten mit verschiedenen Bakterienpopulationen. Die Chemostaten-Anlage soll zur replizierten Kokultur mutualistischer Bakterienstämme eingesetzt werden können. Die folgenden Aufgabenstellungen sollten in der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden:

1. Konstruktion einer Labor-Chemostaten-Anlage mit bis zu 24 parallelen Replikaten. Auf technische Regulations- bzw. Überwachungsmaßnahmen soll bis auf ein notwendiges Minimum verzichtet werden.
2. Verifikation des kontaminationsfreien Betriebes über einen größeren Zeitraum mit verschiedenen Kulturmedien.
3. Durchführung einer kontinuierlichen *E. coli* – Monokultur.
4. Durchführung einer kontinuierlichen *E. coli* – Kokultur.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterien und Plasmide

Im Folgenden sind alle für diese Arbeit verwendeten Plasmide und Bakterienstämme aufgeführt (Tab. 2 und Tab. 3).

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Charakteristik	Referenz/Quelle
pGRG36+mCherry	Ampr;pGRG36NotI-PA1/04/03-RBSII-mCherry-T0-T1	Scholz, 2011
pGRG36+EGFP	Ampr;pGRG36NotI-PA1/04/03-RBSII-EGFP-T0-T1	Scholz, 2011
pGRG36+mCitrine	Ampr;pGRG36NotI-PA1/04/03-RBSII-mCitrine-T0-T1	Scholz, 2011

Tabelle 3: Übersicht über verwendete E.coli-Stämme.

Bakterienstamm	Charakteristik	Referenz / Quelle
Δ HIS 419 <i>E.coli</i>	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>cyoD</i> , Δ <i>hisD</i>	Pande / unveröffentlicht
TRIP 1594 <i>E.coli</i>	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>pntB</i> , Δ <i>tripB</i>	Pande / unveröffentlicht
HIS 1594	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>pntB</i> , Δ <i>hisD</i>	Pande / unveröffentlicht
JW 2000	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>hisL</i>	Pande / unveröffentlicht
TRIP 718	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>sucD</i> , Δ <i>tripB</i>	Pande / unveröffentlicht
JW 3087	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>deoB</i>	Pande / unveröffentlicht
Δ HIS Δ 4346	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>tripR</i> , Δ <i>hisD</i>	Pande / unveröffentlicht
Δ HIS Δ lac	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>lacI</i> , Δ <i>hisD</i>	Pande / unveröffentlicht
TRIP2485 <i>E.coli</i>	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>purN</i> , Δ <i>tripB</i>	Pande / unveröffentlicht
HIS 2485 <i>E.coli</i>	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>purN</i> , Δ <i>hisD</i>	Pande / unveröffentlicht
HIS 718 <i>E.coli</i>	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>sucD</i> , Δ <i>hisD</i>	Pande / unveröffentlicht
HIS 2946 <i>E.coli</i>	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>glcD</i> , Δ <i>hisD</i>	Pande / unveröffentlicht
TRIP 419 <i>E.coli</i>	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>cyoD</i> , Δ <i>tripB</i>	Pande / unveröffentlicht
TRIP 2946	<i>F-</i> , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787 (:: <i>rrmB</i> -3), λ -, <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514, Δ <i>glcD</i> , Δ <i>tripB</i>	Pande / unveröffentlicht

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit generierten *E.coli*-Stämme.

Bakterienstamm	Charakteristik
Δ HIS 419 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
TRIP 1594 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
HIS 1594 Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
JW 2000 Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
TRIP 718 Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
JW 3087 Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
Δ HIS Δ 4346 Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
Δ HIS Δ lac Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
TRIP2485 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
HIS 2485 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
HIS 718 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
HIS 2946 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
TRIP 419 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
TRIP 2946 Δ lacI_attTn7::mCherry	Insertion der Plac_mCherry_Kassette in attTn7
Δ HIS 419 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
TRIP 1594 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
HIS 1594 Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
JW 2000 Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
TRIP 718 Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
JW 3087 Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
Δ HIS Δ 4346 Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
Δ HIS Δ lac Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
TRIP2485 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
HIS 2485 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
HIS 718 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
HIS 2946 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
TRIP 419 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
TRIP 2946 Δ lacI_attTn7::EGFP	Insertion der Plac_EGFP_Kassette in attTn7
Δ HIS 419 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
TRIP 1594 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
HIS 1594 Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
JW 2000 Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
TRIP 718 Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
JW 3087 Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
Δ HIS Δ 4346 Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
Δ HIS Δ lac Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
TRIP2485 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
HIS 2485 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7
HIS 718 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7::mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kassette in attTn7

HIS 2946 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7:: mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kasette in attTn7
TRIP 419 <i>E.coli</i> Δ lacI_attTn7:: mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kasette in attTn7
TRIP 2946 Δ lacI_attTn7:: mCitrine	Insertion der Plac_mCitrine_Kasette in attTn7

2.1.2 Primer und Enzyme

Im Folgenden sind alle verwendeten Primer und Enzyme aufgeführt (Tab. 5 und Tab. 6).

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Primer und deren Eigenschaften; T_M ist die mittlere Schmelztemperatur der Primer.

Primer	Amplifiziertes Fragment	Sequenz (5' – 3')	T_M [°C]	Referenz
attTn7 GlmS 1	in attTn7-Seite inseriertes Fragment	GATGCTGGTGGCGAAGC TGT	64,5	McKenzie et al. (2006)
attTn7 GlmS 2	in attTn7-Seite inseriertes Fragment	GATGACGGTTTGTCA- CATGGA	60,2	McKenzie et al. (2006)

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Enzyme.

Name	Konzentration [U/ μ l]	Puffer	Inkubations-temperatur [°C]	Hersteller
JumpStartTMTaq DNA Polymerase	2,5	PCR Puffer	72	Sigma-Aldrich

2.1.3 Geräte

Tabelle 7: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
24-Kanal-Kasettenschlauchdosierpumpe "205-SCA 24/90"	Watson Marlow GmbH, Rommerskirchen, Deutschland
Dunkelkammer "Biometra BDR-5 BioDoc Analyse"	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Durchflusszytometer "CyFlowSpace CY-S-3001"	Partec GmbH, Münster, Deutschland
Elektrophorese "BIO105 LVD"	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Inkubator „Heraeus B-12“	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Kreiselplattformschüttler „Innova 2500 platform shaker“	New Brunswick Scientific, New Jersey, Vereinigte Staaten
Labor-pH-Meter "inoLab pH Level 2"	WTW, Wuppertal, Deutschland
Laborwaage "BP 210S"	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Laborwaage "PB3002-S DeltaRange®"	Mettler Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Peristaltische Pumpe "PD 5001"	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reinstwasseranlage "TKA X-CAD"	Labor- & ReinstWasser Technik
Schüttelinkubator "Certomat® BS-1"	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Schüttelinkubator "Multitron II MT-25"	Infors AG, Botmingen, Schweiz

Schüttler „Vortex-Genie 2“ G-560E	Scientific Industries, New Yor, Vereinigte Staaten
Steril-Werkbank “Herasafe HSP-12”	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Thermocycler „GeneAmp PCR System 2700“	Applied Biosystems, Californien, Vereinigte Staaten
Thermomixer „Thermomixer Comfort Typ 5“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge „Centrifuge 5415 D“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge „Micro Centrifuge AL“	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tischzentrifuge „Micro Centrifuge SD“	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Umwälzthermostat „DC 10-B3“	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Vakuumpumpe 2585C-50	Welch, Ilmenau, Deutschland
Vakuumpumpe PC 2004 Vario	New England Biolabs, Ipswich, Vereinigtes Königreich
Vertikaler Standautoklav „Systec Vx-120“	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland

2.1.4 Besondere Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten besondere Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Einfaches Glasseiden-Thermoelement „401-941 Typ K“ (mit Miniatur-Stecker)	TC Direkt
Einmal-Injektions-Kanüle „Sterican® 0,80 x 120 mm“	B. Braun Melsungen AG
Einmal-Spritze „Omnifix®-F Tuberkulin“	B. Braun Melsungen AG
Einschraub-Verbinder „PM010611E“	John Guest
Gerader-Verbinder „PM0406E“	John Guest
Leitungs-Thermoelement „410-245 Typ K“ (gas-, wasser-, dampfdicht umspritzt, mit Thermoelement-Miniatur-Stecker)	TC Direkt
Luftfilter “Minisart Syringe filter, hydrophobic”; 16596-HYK	Sartorius Stedim Biotech
Luftfilter „Midisart 2000“; 17805-UPN	Fa. Sartorius Stedim Biotech
MPC-Blindkappe „MPC320-39“	ACF
MPC-Blindstopfen „MPC300-39M“	ACF
MPC-Schlaucholive „170-04T-39“	ACF
MPC-Schlaucholive „MPCC220-04T-39M“	ACF
Sterilfilter „Sartobran® P 300“	Fa. Sartorius Stedim Biotech
Winkelverbinder „PM0304E“	John Guest

2.1.5 Puffer und Medien

Tabelle 9: Übersicht über alle verwendeten Puffer, Medien und Chemikalien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium (Lennox); Firma Roth	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid eingestellt auf pH 7,0 ± 0,2
LB-Agar (Lennox); Firma Roth	15 g/l Agar-Agar 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid eingestellt auf pH 7,0 ± 0,2
MMAB (Minimal Medium für <i>Azospirillum brasiliense</i>)	5 g/l Fructose (Stammlösung 50 g/l) 3 g/l K ₂ HPO ₄ 1 g/l NaH ₂ PO ₄ 1 g/l NH ₄ Cl 50 mg/l Na ₂ MoO ₄ 0,15 g/l KCl 0,3 g/l MgSO ₄ (Stammlösung 60 g/l) 0,01 g/l CaCl ₂ (Stammlösung 20 g/l) 0,25 ml/l FeSO ₄ -EDTA (Stammlösung: 50 mmol/l FeSO ₄ ; 40 mmol/l EDTA) eingestellt auf pH 6,85 bis 7,00 (Fructose, MgSO ₄ , CaCl ₂ , FeSO ₄ und EDTA werden als Stammlösung separat Autoklaviert)
PCR-Puffer (10x)	500 mmol/l KCl 100 mmol/l Tris-HCl 15 mmol/l MgCl ₂ 0,01 % (w/v) Gelatine eingestellt auf pH 8,3
Agarose-Gel 1% (w/v)	1 g/l Agar-Agar in TAE-Puffer 0,5 mg/l Ethidiumbromid (Stammlösung 10 g/l)
TAE-Puffer	7,2 g/l Tris-Acetat 0,3 g/l EDTA eingestellt auf pH 8,3
Ladepuffer (6x) für Gelelektrophorese	60 % (v/v) Glycerol 17,5 g/l EDTA 6,3 g/l Bromphenolblau 1,576 g/l Tris-HCl (pH 7,6) 0,3 g/l Xylene cyanol FF

2.2 Methoden zur Laborarbeit

2.2.1 Messung der optischen Dichte von Bakterien-Suspensionen

Zur Messung der optischen Dichte von Bakterien-Suspensionen wurden 100 μ l der Bakterien-Suspension in eine 96-Well-Mikrotiter-Platte pipettiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte in einem Photometer (SpectraMax 190, Molecular Devices) als Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm. Zu jeder Messung wurde zusätzlich eine Referenz (reines Medium) aufgenommen. Die Differenz aus Messwert und Referenz ergab die optische Dichte der Bakterien-Suspension. Die Messergebnisse in dieser Arbeit lagen unterhalb OD = 0,7, somit war eine Verdünnung der Proben nicht notwendig.

2.2.2 Anlegen einer -80 °C Glycerol-Kultur

Der zur Herstellung einer Glycerol-Kultur ausgewählte Stamm wurde auf LB-Agar ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 30°C für 24 h wurde eine Kolonie zum Animpfen einer LB-Flüssigkultur ausgewählt. Die Flüssigkultur wurde bis zu einer OD von 0,5 – 0,7 bei 30°C für ca. 15 Stunden schüttelnd inkubiert. Die Bakterien-Suspension wurde anschließend 1:2 mit Glycerol (40 %) in einem 2 ml - Cryo-Röhrchen gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Herstellung von kompetenten Zellen mithilfe der Calciumchlorid-Methode

Das Erzeugen von kompetenten Zellen erfolgte entsprechend „*Protocol 25: Preparation and Transformation of Competent E.coli using Calcium Chloride*“ (Sambrook und Russel, 2001). Für die Kultivierung der *E. coli*-Stämme (Tab. 3) wurde LB-Medium bzw. LB-Agar verwendet.

Von dem betreffenden Stamm wurde ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agar angefertigt. Nach einer Inkubation bei 30°C für ca. 15 Stunden wurde eine Kolonie mittels Impföse in eine 3 ml-LB-Flüssigkultur überimpft. Die Flüssigkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,7 bei 30°C für ca. 15 Stunden schüttelnd inkubiert. Mit 100 μ l dieser Flüssigkultur wurden 15 ml LB-Medium bis zu einer OD von 0,6 bis 0,8 bei 30°C schüttelnd inokuliert. Nach dem Erreichen der optischen Dichte wurde die Kultur für 15 Minuten auf Eis gekühlt, anschließend die Bakterien durch Zentrifugation (2700g; 4°C; 10 Minuten) präzipitiert.

Das erhaltene Pellet wurde durch Dekantieren vom Medium getrennt und in 6 ml Waschlösung (80 mM MgCl₂; 20 mM CaCl₂) resuspendiert. Die Suspension wurde für weitere 15 Minuten auf Eis gelagert, anschließend die Waschlösung nach einer Zentrifugation (2700g; 4°C; 10 Minuten) dekantiert. Anschließend wurde das Pellet mit 600 μ l CaCl₂ Lösung (1 mol/l) resuspendiert und die Suspension bis zur Verwendung auf Eis gelagert bzw. bei -80 °C eingefroren.

2.2.4 Transformation von kompetenten *E. Coli*

Für die Transformation der ausgewählten *E.coli* Stämme (Tab. 3) wurde das „*Protocol for inserting transgene using Tn7*“ (G. J. McKenzie, 2006) verwendet. Laut Protokoll wurden zunächst je 1 µl der Plasmide (Tab. 2) zu 200 µl Suspension der kompetenten Zellen hinzugegeben (pGRG36+EGFP 47 ng/µl, pGRG36+mCherry 52 ng/µl, pGRG36+mCitrine 46 ng/µl). Nach einer Inkubation für 30 Minuten auf Eis erfolgte ein Hitzeschock unter Schütteln bei 42°C für exakt 90 Sekunden in einem Thermomixer. Nach dem Abkühlen der Proben in Eis für 2 Minuten und Zugabe von 500 µl LB-Medium erfolgte anschließend eine erneute Inkubation für 45 Minuten bei 30°C unter Schütteln. Durch eine kurze Zentrifugation wurde die Suspension auf ca. 100 µl eingengt und anschließend auf LB-Agar mit 0,1 mg/ml Ampicillin ausplattiert.

Die verwendeten pGRG36-Plasmide kodieren zusätzlich für eine Ampicillin-Resistenz. Durch das Ausplattieren auf ampicillinhaltigem LB-Agar sollte gewährleistet werden, dass nur Transformaten wachsen, welche das Plasmid aufgenommen haben. Es folgte eine Inkubation bei 30°C für ca. 17 Stunden.

Von jeder Transformante wurden vier Kolonien ausgewählt, von denen jeweils ein Verdünnungsausstrich auf ampicillinhaltigem LB-Agar angefertigt wurde. Die Ausstriche wurden ebenfalls bei 30°C für ca. 17 Stunden inkubiert. Das Fluoreszenzprotein sollte mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen 50 und 95 % in *attTn7*-Sequenz des Wirtsstammes inseriert worden sein (McKenzie, 2006).

Am Folgetag wurde dieser Verdünnungsausstrich auf LB-Agar (ohne Ampicillin) wiederholt und bei 42°C inkubiert. Bei einer Temperatur von 42°C wurde das Plasmid aufgrund seines temperaturabhängigen Replikationsursprunges vom Wirtsorganismus nicht repliziert. Das Plasmid wurde somit aus dem Stamm entfernt.

Von jedem Verdünnungsausstrich wurden nun zwei Kolonien ausgewählt, welche erneut auf LB-Agar übertragen wurden. Auf diese Weise konnten von jeder Transformante 8 Klone erhalten werden. Um die erfolgreiche Insertion zu überprüfen, wurde mit jedem Klon eine Kolonie-PCR (2.2.5) durchgeführt. Wurde eine ausreichende Anzahl von positiven Klonen gefunden, wurden dann die entsprechenden Klone im Durchflusszytometer auf ein ausreichend gutes Fluoreszenz-Signal hin untersucht (2.2.7).

2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die für die Fluoreszenzmarkierung ausgewählten *E. coli* Stämme (2.1.1, Tab. 3) wurden je mit einem Plasmid (2.1.1, Tab. 5) nach der Methode „*Tn7 Transgen Insertionsprotokoll*“ (2.2.4) transformiert. Die erzeugten Transformanten wurden mit Hilfe der PCR (2.2.5) auf die erfolgreiche Insertion untersucht.

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode um gezielt ein spezifisches DNA Fragment zu amplifizieren. Die Vervielfältigung erfolgt zyklisch in drei Schritten:

1. Denaturierung:

In diesem Schritt wird der PCR-Ansatz auf 94 bis 96°C erwärmt, um das doppelsträngige DNA-Template sowie die Primer in Einzelstränge aufzuspalten. Während des ersten Zyklus (Initialisierung) wird der Ansatz meist für eine längere Zeit erwärmt, um sicherzustellen dass alle DNA-Sequenzen als Einzelstrang vorliegen. Abhängig von der gewählten DNA-Polymerase muss auch diese für mehrere Minuten bei hoher Temperatur aktiviert werden.

2. Primerhybridisierung:

Nach der Denaturierung wird der PCR-Ansatz rasch auf die Hybridisierungstemperatur (*annealing*-Temperatur) abgekühlt, was die spezifische Anlagerung der Primer an die komplementären Regionen des Template-Stranges erlaubt.

3. Elongation:

In der dritten Phase bindet die DNA-Polymerase an Primer und Template-Strang und beginnt unter Verbrauch von dNTPs die Komplementierung des Doppelstranges. Die Arbeitstemperatur und Dauer der Elongation sind entsprechend der eingesetzten Polymerase zu wählen.

Die PCR wurde mit einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2700; Fa. Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Durchführung der Kolonie-PCR wurde ein Ansatzvolumen von 20 µl gewählt (Tab. 10):

Tabelle 10: Zusammensetzung Kolonie-PCR-Ansatz; Angaben für 1x 20µl.

Volumen [µl]	Substanz
16,2	Aqua dest. steril
2,0	PCR Puffer
0,4	dNTPs
0,4	Primer 1 (glmS1)
0,4	Primer 2 (glmS2)
0,4	Taq-Polymerase
0,2	MgCl ₂ (50 mM)

Zu dem Ansatz wurde eine kleine Menge Biomasse zugegeben, welche mittels Pipettenspitze von der jeweiligen Kolonie entnommen wurde. Der PCR-Ansatz wurde durch wiederholtes Aufziehen und Ausstoßen mit einer Pipette homogenisiert, anschließend verschlossen und in den Thermocycler eingebracht.

Tabelle 11: Programmierung des Thermocyclers; Schritte 2,3 und 4 wurden zum amplifizieren des gewünschten Fragments 30 x wiederholt.

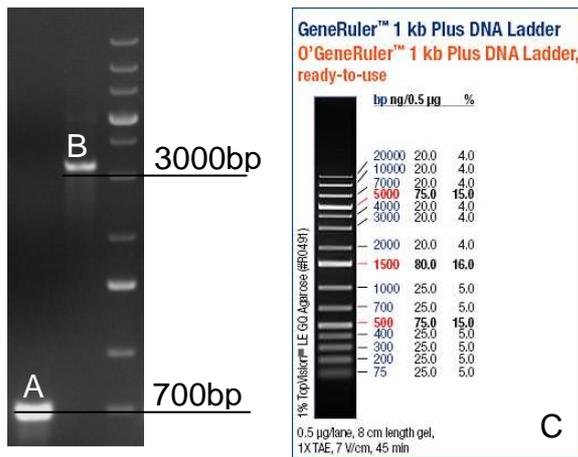
Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1	98	300
2	98	30
3	68	30
4	72	210
5	72	300
6	4	∞

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein analytisches Verfahren zur Trennung von DNA-Fragmenten. Als Träger dient hierzu ein 1 % (w/v) Agarose-Gel, in welchem die Proben aufgetragen wurden. Aufgrund des negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückrades der DNA wandert diese im elektrischen Feld zur Anode. Die Wandergeschwindigkeit des jeweiligen Fragments ist von der angelegten Spannung, der Konzentration des verwendeten Gels und der Größe des Fragments selbst abhängig. Kleinere Fragmente werden schneller als größere Fragmente durch das Gel transportiert.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarose-Gel mit 5 µl eines Ladepuffers vermischt. Der Ladepuffer enthält unter anderen Glycerin und Bromphenolblau. Glycerin erhöht die Dichte der Probe, so dass diese in die Probentasche des Gels sinkt. Bromphenolblau dient als Farbstoffmarker zur Bestimmung der Laufstrecke. Abhängig von der Größe des verwendeten Gels (60 bzw. 120 ml) wurde eine Spannung von 100 bzw. 120 V (bei 140 mA) angelegt.

Zusätzlich wurde das Gel mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt, um bei der Auswertung des Gels die DNA – Fragmente im UV-Licht sichtbar machen zu können. Zur Auswertung wurden die Laufstrecken der Proben-Banden mit den Marker-Banden verglichen.



Bei einer erfolgreichen Tn7 Insertion sollte die diagnostische PCR ein Fragment einer Größe von ca. 3 kb generieren. Bei fehlender Tn7 Insertion wird eine Fragmentgröße von lediglich ca. 700 bp erwartet. Von allen Stämmen welche eine korrekte Insertion aufwiesen, wurden Glyzerol-Kulturen (2.2.2) angelegt und eine Fluoreszenzmessung (2.2.7.3) durchgeführt.

Abbildung 5: Beispiel Elektrophorese; A negative Probe; B positive Probe; C Marker "GeneRuler 1kb plus DNA Ladder"

2.2.7 Durchflusszytometrie

Zur Verifizierung der Fluoreszenzmarkierung der transgenen *E.coli* Stämme (2.2.4) und zur Bestimmung der Gesamtzellzahl von Bakteriensuspensionen wurde das Durchflusszytometer "CyFlowSpace CY-S-3001" (Partec, Münster, Deutschland) verwendet.

2.2.7.1 Messprinzip

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Analyseverfahren, mit welchem verschiedene Parameter einer einzelnen Zelle, bzw. eines einzelnen Partikel simultan gemessen werden können. Der Vorteil der Durchflusszytometrie besteht in der hohen Analyserate und der statistischen Auswertbarkeit der ermittelten Messwerte. Die Zellen werden hierzu in einem Flüssigkeitsstrom (*sheath-fluid*) hydrodynamisch fokussiert und passieren einzeln einen Laser (Abb. 6).

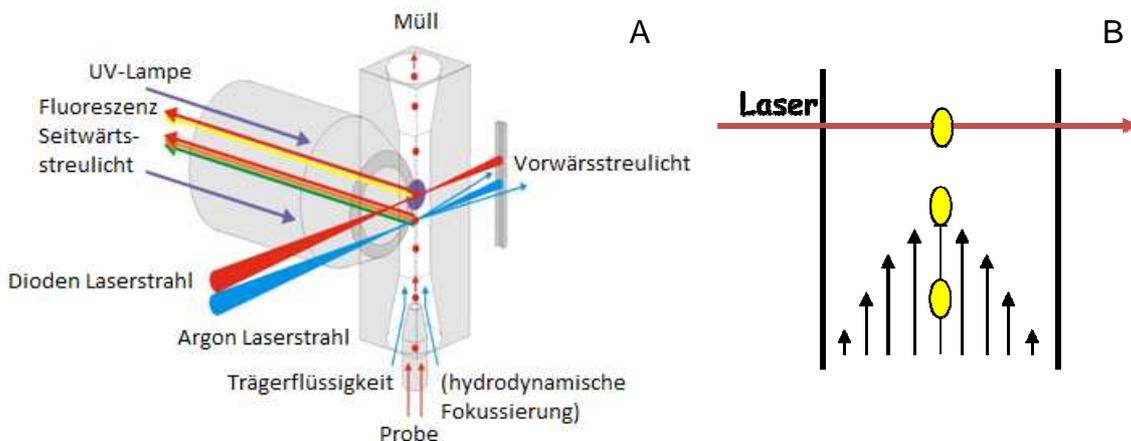


Abbildung 6: Messprinzip der Durchflusszytometrie. A: Aufbau der Messkapillare; B: Prinzip der Einzel-Zell-Detektion, gelbe Ovale repräsentieren Zellen/Partikel, schwarze Pfeile: Richtungsvektoren des Trägerflüssigkeitsstrom (im Zentrum der Kapillare am schnellsten), Laser zum Flüssigkeitsstrom 90° versetzt. (Partec, Münster, Deutschland)

Die Trägerflüssigkeit transportiert die Partikel durch die Messküvette. Die Geschwindigkeit der Trägerflüssigkeit ist in der Mitte schneller als an den Rändern, wodurch die Partikel den Laser einzeln aufgereiht passieren können (hydrodynamische Fokussierung) (Abb. 6 B).

Durch diesen Aufbau können zunächst zwei Arten von Signalen gemessen werden. Das Vorwärts-Streulicht (*forward scatter*, FSC) und das Seitwärts-Streulicht (*side scatter*, SSC). Durch das Signal des FSC können Aussagen über die Größe des Partikels getroffen werden. Der SSC hängt von der Form und der inneren Beschaffenheit (z.B. Granularität) des Partikels ab (Abb. 7 A, B).

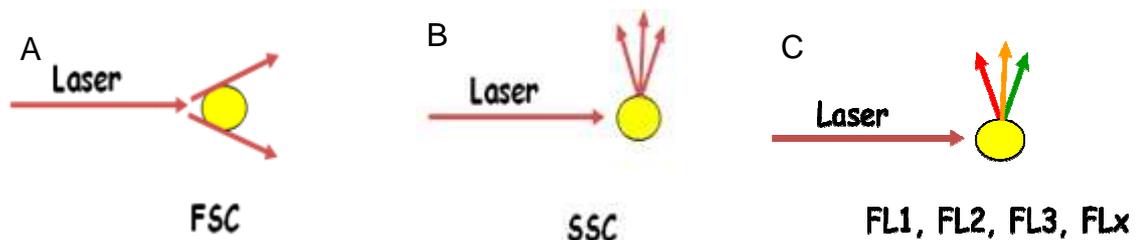


Abbildung 7: Schema der Laserstreuung: Vorwärtsstreuung (FSC), Laser trifft auf Partikel, Ausfallwinkel des Streulichtes $\ll 90^\circ$, Detektorsignal anhängig von Partikelvolumen bzw. -größe; B: Laser trifft auf Partikel, Ausfallwinkel des Streulichtes $\approx 90^\circ$, Detektorsignal anhängig von innerer Partikelbeschaffenheit; C: Laser trifft auf mit Fluorochrom markierten Partikel, Fluorochrom wird angeregt und emittiert Licht, Ausfallwinkel $\approx 90^\circ$ (Partec, Münster, Deutschland).

Zusätzlich zu den Streu-Signalen können durch den Einsatz von Lasern mit unterschiedlicher Wellenlänge auch fluoreszenzmarkierte Partikel zur Emission angeregt werden (Abb. 7 C). Das hierbei emittierte Licht wird über spezifische Bandpass-Filter zu einem Detektor geleitet. Diese Filter detektieren das Fluoreszenz-Signal in einem spezifischen Bereich um die gegebene Emissions-Wellenlänge. Das für die Versuche verwendete Setup von Lasern und Filtern ist in Abb.8 beschrieben.

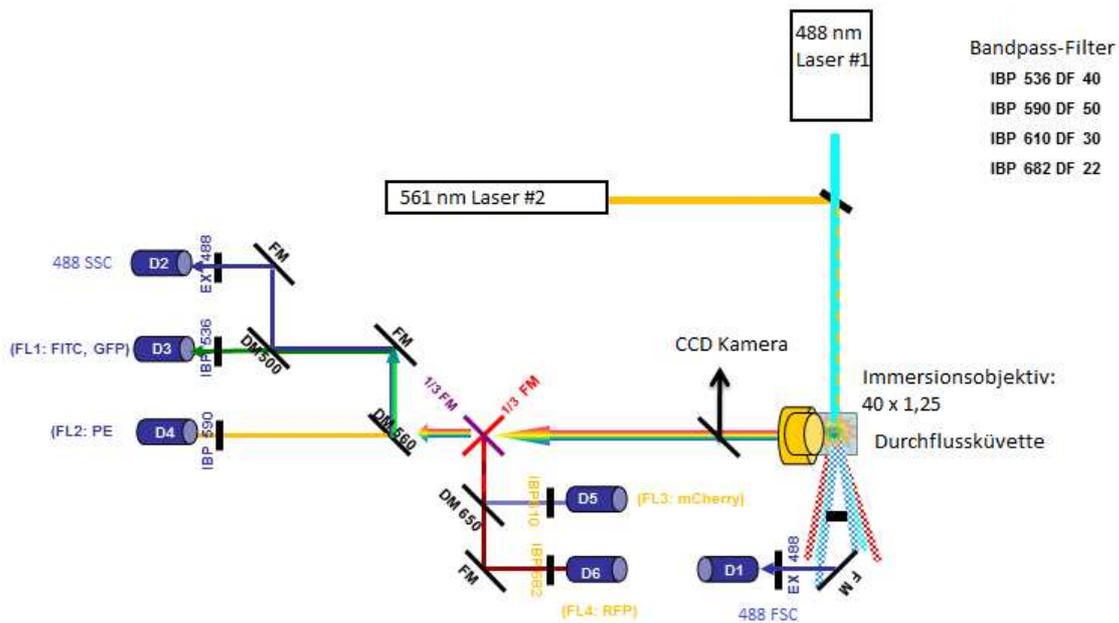


Abbildung 8: Strahlengang und Einstellungen des CyFlowSpace CY-S-3001, DM: Langpass-Spektralspiegel, IBP: Bandpass-Filter, FM: Total-Spiegel, FSC: Vorwärtsstreu-licht, SSC: Seitwärtsstreu-licht, D3: Detektor für Fluoreszenzsignal 1 (FL1, 536nm, z.B.: EGFP), D5: Detektor für Fluoreszenzsignal 3 (FL3, 682 nm, z. B.: mCherry) (Partec, Münster, Deutschland).

In dem für diese Arbeit zur Verfügung stehenden CyFlowSpace CY-S-3001 waren zwei Laser verbaut. Laser #1 ($\lambda = 488\text{nm}$) dient zur Ermittlung der Parameter FSC und SSC, sowie zur Fluoreszenzanregung von gelb bis grün fluoreszierenden Proteinen. Zugehöriger Bandpass-Filter ist FL1 IBP 536 DF 40 nm und FL2 IBP 590 DF 50 nm. Laser #2 ($\lambda = 561\text{nm}$) dient ausschließlich zur Anregung von Fluoreszenzmarkern im orangen bis roten Spektralbereich (IBP – Bandpassfilter; DF – Bandbreite). Zugehörige Bandpass-Filter sind FL3 IBP 610 DF 30 nm und FL4 IBP 682 DF 22 nm.

2.2.7.2 Messung der Populationsdichte

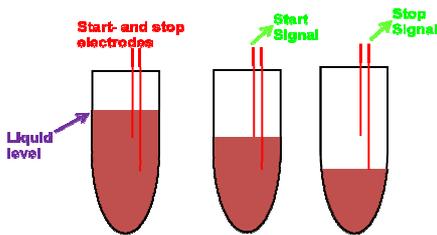


Abbildung 9: Probe wird in FCM injiziert, Flüssigkeitslevel passiert Start- danach Stop-Elektrode, gezählte Partikel entsprechen absoluter Anzahl pro 200 μl (Partec, Münster, Deutschland).

Mithilfe des oben beschriebenen Systems konnte die Populationsdichte einer Bakterienkultur bestimmt werden. Die Probenküvette ist auf Höhe der Elektroden zylindrisch. Zwischen dem Höhen Niveau der Start- und Stop-Elektrode befinden sich exakt 200 μl Probe (Abb. 9). Die in 200 μl Probe enthaltenen Partikel werden als Konzentration [ml^{-1}] ausgegeben.

Für die durchzuführenden Messungen wurde die Probe abhängig von der Ausgangskonzentration verdünnt. Übliche Verdünnungsraten für die Messung lagen zwischen 10^3 und 10^4 . Die Proben wurden vor der Messung mit 2 μl SYBR Green I (Lösung in DMSO 1:1000) versetzt und für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert.

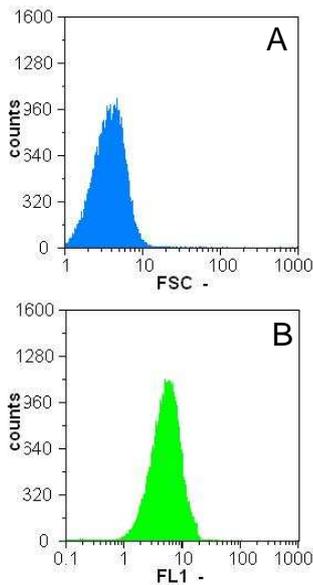


Abbildung 10: Histogramme der Signale FSC (A) und Bandpass-Filter FL1 (B); gemessene Partikel: *E.coli* (mit SYBR Green I gefärbt)

Die Verstärkung des Detektors für FSC wurde auf einen Wert eingestellt, bei welchem der gesamte Peak im Plot erschien (Abb. 10 A). Die Signalverstärkung für den Bandpass-Filter FL1 wurde so justiert, dass der resultierende Peak deutlich über einer Intensität von 1 im Plot abgebildet wurde (Abb. 10 B). Für die Einstellung der Zählgeschwindigkeit ($\leq 1000 \text{ s}^{-1}$) und Fluss-geschwindigkeit (≤ 5) des Durchfluss-zytometers wurde der Empfehlung des Herstellers gefolgt. Nach der Messung gibt die Software die Populationsdichte in $[\text{c}]=\text{ml}^{-1}$ aus.

2.2.7.3 Fluoreszenzmessung

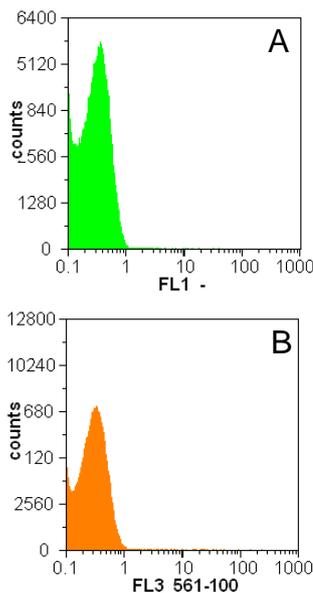


Abbildung 11: Einstellungen für Bandpass-Filter FL1(A) und FL3 (B)

Zur Fluoreszenzmessung der transgenen *E.coli* Stämme (2.2.4) ist zur Vorbereitung ein unmarkierter Referenzstamm (Kontrolle) notwendig. Die Proben wurden abhängig von der Ausgangskonzentration verdünnt (übliche Verdünnung 10^3 bis 10^4). Der FSC wurde analog Kapitel 2.2.7.2 eingestellt. Die Signalverstärkung für die Bandpass-Filter FL1 und FL3 wurde so justiert, dass der resultierende Peak einer Intensität von unter 1 im Plot abgebildet wurde (Abb. 11). Im Anschluss wurden alle Proben in gleicher Weise vorbereitet und gemessen. Hierbei wurden die Parametereinstellungen unverändert beibehalten. Ist ein *E. coli* Stamm markiert, so sollte der Peak von FL1 bzw. FL3 deutlich über „1“ im Plot abgebildet werden.

Zur Darstellung vieler Histogramme in einem Plot, wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessung als Boxplot aufgetragen. Dazu wurden die Histogramme (Abb. 12 A, B) mit Hilfe der CyFlow-Software als Tabelle exportiert. Hierbei wird das relative Fluoreszenz-Signal (zwischen 0,1 und 1000) gleichmäßig auf digitale „Kanäle“ (0 bis 250) verteilt.

Die Lage der Peaks in den Boxplots ist äquivalent zur Lage in den Histogrammen (Abb. 12). Die X-Achse [relative Fluoreszenzeinheiten] der Abb. 12 A und B entspricht nun der Y-Achse [Kanäle] der Abb. 12 C.

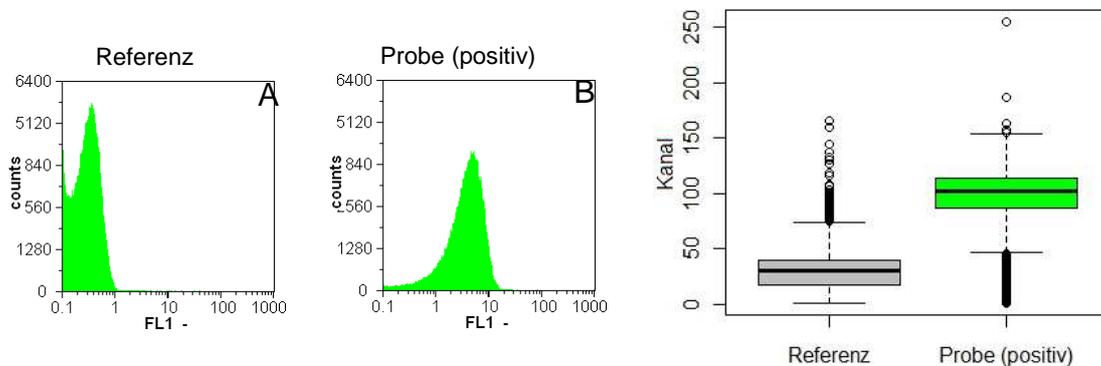


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Übertragung von Histogrammen in Boxplots. A, B: Histogramm der Referenz bzw. Probe, X-Achse [relative Fluoreszenzeinheiten], Y-Achse [Häufigkeit]. C: Darstellung von A und B als Boxplot, Y-Achse [Kanäle]. Median (horizontale Linie in Box), Interquartilsabstand (Box), 1,5x-Interquartilsabstand (Whisker), Ausreißer (Punkte), n = 250.

2.2.8 Bestimmung der Wachstumsrate von Bakterien-Kulturen

Zur Durchführung einer Chemostaten-Monokultur wurde der Stamm „CK 276 Keio WT *EGFP* 17“ ausgewählt. Um diesen Stamm in einem Chemostaten kultivieren zu können musste seine Wachstumsrate (μ) unter Kulturbedingungen bestimmt werden. Die Messung aller verwendeten *E.coli* Stämme (2.1.1) ist zeit- und materialaufwendig. Eine Bestimmung von μ in einer 96-DeepWell-Platte wäre aus Zeit- und Kostengründen zu prüfen. Aus diesem Grund sollte in diesem Versuch geklärt werden, ob die resultierenden Wachstumsraten in den Kulturflaschen bzw. 96-DeepWell-Platten vergleichbar, oder signifikant unterschiedlich sind.

Zur Bestimmung der Wachstumsrate wurde eine 100 ml Schott-Flasche verwendet, welche mit 30 ml MMAB befüllt war. Die Konstruktion des Deckels erlaubt die passive Belüftung der Kultur durch einen Sterilfilter (Minisart Syringe filter, hydrophobic, 0,22 μm) und die Probenahme via Kanüle durch ein Septum.

Aus der -80°C Glycerol-Kultur wurde ein Verdünnungsausstrich auf LB-Agar angefertigt. Der Ausstrich wurde für ca. 15 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde eine Kolonie ausgewählt und in eine 3 ml MMAB-Flüssigkultur transferiert. Diese Flüssigkultur wird bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,1$ bei 30°C schüttelnd inokuliert (Dauer ca. 15 h). Mit dieser Kultur erfolgt das Beimpfen der Versuchsflasche in einer 1:100 Verdünnung.

Im Versuch wurde die Populationsdichte über die Dauer des Experimentes periodisch alle 2 bis 3 Stunden mittels Durchflusszytometrie (2.2.7) bestimmt. Die Messwerte aus der Log-Phase wurden in einem Plot als Logarithmus der Zellzahl gegen die Zeit dargestellt. Durch das Verfahren der linearen Regression konnte so der Anstieg der Geraden ermittelt werden. Dieser Versuch wurde 5-fach repliziert.

2.3 Konstruktion und Inbetriebnahme der Chemostaten-Anlage

2.3.1 Inkubationsbehälter

Die Chemostaten-Flasche musste zu großen Teilen (insbesondere Deckel) für diese Anwendung angefertigt werden. Als Reaktionsgefäß dienten Gewindehalsflaschen (Schott Duran®, 100 ml, transparent). Die Anfertigung der Deckel erfolgte durch die Werkstatt des Max-Planck-Institutes. Als Grundmaterial wurde POM (Polyoxymethylen) verarbeitet. Die Form des Deckels erlaubt eine dichte Verschraubung mittels Schraubkappe (PBT, GL-Gewinde, Autoklavierbar) und Silikondichtung. POM gehört zu den thermoplastischen Kunststoffen. Es wird als technischer Kunststoff besonders für Präzisionsteile verwendet, da es eine hohe thermische Stabilität (bis 220 °C), hohe Steifigkeit sowie niedrige Reibwerte besitzt.

Die Schläuche des Leitungssystems für Medien- Zu- und Abführung können durch die Steckverbinder (Jean Guest, Schweden) ohne Werkzeug montiert sowie demon- tiert werden (Abb. 13).

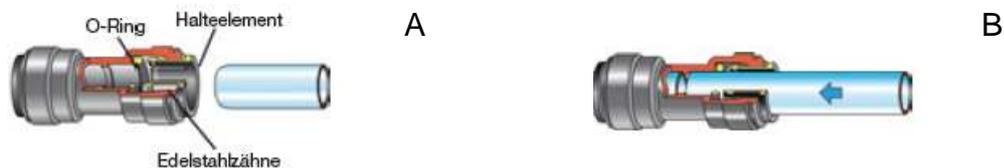


Abbildung 13: A: Schnellkupplung des "4-22mm Systems", B: Montage des Schlauches durch einstecken, Demontage durch zurückdrücken des Halteelements und Herausziehen des Schlauches (Jean Guest, Schweden).

2.3.2 Medien austausch

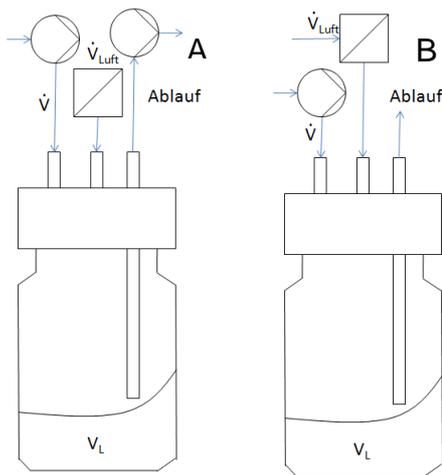
Entsprechend Kapitel 1.3 müssen die Volumenströme von Zu- und Ablauf gleich sein. Für die Medienzufuhr wurde eine 24-Kanal-Kassettschlauchdosierpumpe (Kapitel 2.1.3) gewählt. Mit dieser Pumpe können bis zu 24 Replikate parallel mit einer Förderleistung zwischen 0,05 und 7 ml/min versorgt werden.

Um die Verdünnung während des Betriebes korrekt einstellen zu können, war die Aufnahme einer Pumpenkennlinie nötig. An der Pumpe kann lediglich die Drehzahl eingegeben werden. Die tatsächliche Flussrate hängt also auch vom eingesetzten Schlauchmaterial ab. In diesem Versuch wurde ein Pumpenschlauch mit den Abmessungen von 2 mm x 1 mm verwendet.

Aufgrund folgender Annahmen wurde die Pumpenkennlinie für Flussraten ≤ 1 ml/min aufgenommen:

- Wachstumsrate μ zwischen 0,3 und 0,7 h^{-1}
- Kulturvolumen V_L zwischen 20 und 60 ml

Mithilfe der Formel $\mu = D = \frac{\dot{V}_L}{V_L}$ ergibt sich der zu überprüfende Flussratenbereich von 0,1 ml/min bis 0,7 ml/min.



Die Ergebnisse wurden in einem Plot (Förderleistung gegen Drehzahl) dargestellt. Durch das Verfahren der linearen Regression konnte eine Gleichung zur Umrechnung der gewünschten Förderleistung in die benötigte Pumpen-Drehzahl. Für den Austausch des „alten“ Mediums wurde eine pneumatische Lösung mittels Unter- bzw. Überdruck gewählt (Abb. 14).

Abbildung 14: Schema Medien-austausch. A: pneumatischer Medien-austausch via Unterdruck, Belüftung erfolgt passiv durch Sterilfilter; B: pneumatischer Medien-austausch via Überdruck, an Sterilfilter wird Druckluft (max. 1 bar; 0,2-1 l/min) angelegt. \dot{V} -Medienzulauf, V_L - Kulturvolumen, \dot{V}_{Luft} - Volumenstrom Druckluft, \square - Sterilfilter, \circ - peristaltische Pumpe

2.3.3 Leitungssystem

Für die Chemostaten-Anlage wurde ein Leitungssystem (Abb. 21) zur Medien- Zu- und Ableitung aus farbigen Teflon-Schläuchen (4 mm x 2 mm, PTFE) konstruiert. Als Schlauchmaterial für die Druckluftzuleitung (6 mm x 4 mm) wurde PUN (Polyurethan) gewählt.

Das Medium des Medienreservoirs wird mittels einer 24-Kanal-Kassettschlauchdosierpumpe auf die einzelnen Replikate verteilt. Als Pumpenschlauch dient ein PharMed-BPT-Schlauch (2:1 mm, Intertechnik Elze GmbH & Co. KG, Elze, Deutschland). Die Verbindung zwischen Teflon- und Pumpenschlauch wird durch Schlaucholiven sowie Steckverbinder (2.1.4, Jean Guest, Schweden) hergestellt.

2.3.4 Durchmischung des Kulturvolumen

Für die optimale Durchmischung des Kulturvolumens standen zwei Lösungen zur Verfügung. Bei den meisten Bioreaktoren wird auf eine „klassische“ Rührung mittels Rühranker zurück gegriffen.

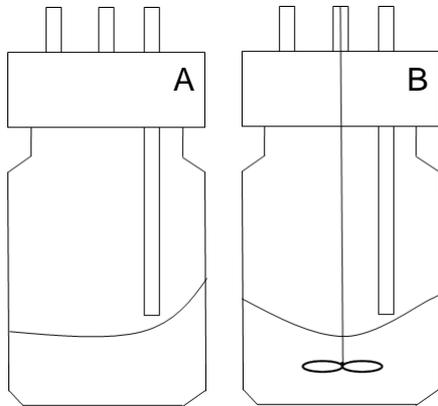


Abbildung 15: A: Schüttler, horizontale Schüttelbewegung formt „kreisende“ Welle; B: Rührer. Rotation des Rührankers produziert „Trichter“.

Das geringe Platzangebot auf den Deckeln der Chemostaten-Flaschen macht die Umsetzung der „klassischen“ Rührung (Abb. 15 B) außerordentlich schwierig. Selbst eine Rührung mittel Rührmagnet ist angesichts der hohen Replikanzahl nicht ratsam.

Aus diesem Grund wurde ein Plattformschüttler (Innova 2500) gewählt. Um den Flascheninhalt optimal zu durchmischen wurde sich an den Parametern einfacher Labor-Schüttelkulturen orientiert.

2.3.5 Temperaturkontrolle

Für die Durchführung der Chemostaten-Experimente ist eine Inkubationstemperatur vor $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ festgelegt. Die Wärmeversorgung soll jedoch so ausgelegt sein, dass ebenfalls eine Inkubationstemperatur von $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ erreicht wird, welche für zukünftige Experimente benötigt werden könnte.

In enger Zusammenarbeit mit der technischen Abteilung des Instituts wurde ein alternatives Klimatisierungs-System aus wasserdurchströmten Heizplatten konstruiert. Das System durchströmt mittels einer Umwälzpumpe parallel 4 Aluminiumprofile mit Wasser aus einem Heizbad. Auf den Profilen sind seriell jeweils 6 Halterungen für die Chemostaten-Flaschen angebracht (Abb. 16).

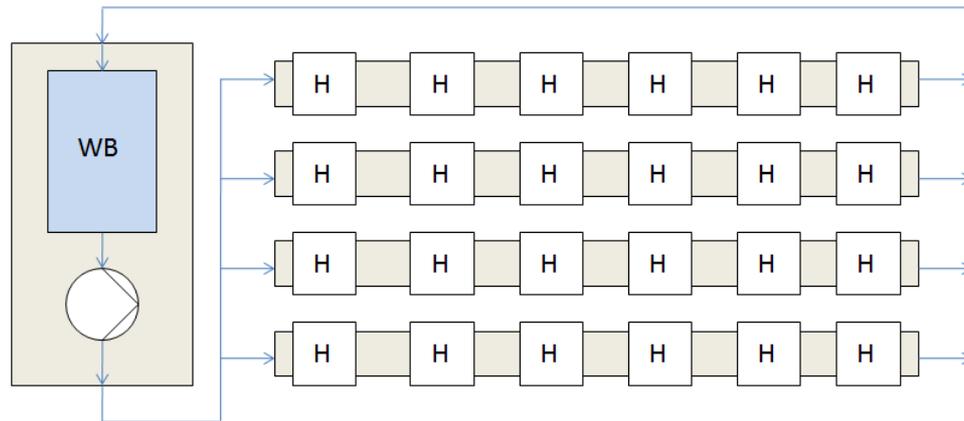


Abbildung 16: Aufsicht Klimatisierungssystem , WB – beheizbares Wasserbad, H – Heizplatte mit Halterung für Chemostaten-Flaschen,  - Umwälzpumpe, Pfeile bezeichnen die Strömungsrichtung

Die Aluminiumprofile mit den Heizplatten wurden auf dem Schüttler (Innova 2500 platform shaker) montiert. Das beheizbare Wasserbad und die Umwälzpumpe sind in einem Umwälzthermostaten zusammengefasst. Die Temperatur des Wasserbades konnte an der Steuerungseinheit des Umwälzthermostaten eingestellt.

2.3.1 Steril-Filtration von Kulturmedium

Für den Betrieb des Chemostaten wurden größere Volumina (< 15 l) an Medium benötigt. Der im Institut zur Verfügung stehende Autoklav, war zur Sterilisation dieser Volumina nicht ausgelegt. Um das Autoklavieren von Teilvolumina zu umgehen, wurde das Medium über eine Filter-Kapsule steril filtriert. Die hierzu verwendete Kapsule „Sartobran® P 300“ (2.1.4) besteht aus einem 0,45 µm-Vorfilter und einer 0,22 µm Filtermembran. Vorteile der Sterilfiltration sind, dass die Dauer des Medienansatzes deutlich gekürzt wurde und die Kapsule nach gründlichem Spülen autoklaviert und wiederverwendet werden kann.

Für die Beförderung des Mediums wurde eine peristaltische Pumpe “PD 5001”(Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Zur Filtration des Mediums wurde eine Apparatur bestehend aus Ansatztank, Pumpe, Filterkapsule, Medienresevoir und Verbindungsschläuchen aufgebaut. Die Verbindungsschläuche bestanden aus Silicon (9,5 mm x 6,4 mm) und waren durch MPC-Schnellkupplungen (2.1.4) miteinander verbunden. Für die Pumpe wurde ein BPT-Schlauch gleicher Abmessungen eingesetzt.

2.3.2 Reinigung und Sterilisation

Eine der größten Herausforderungen war es, zu gewährleisten, dass die konstruierte Anlage keimfrei zu betreiben ist. Eine der ersten Überlegungen war es die Reinigung und Desinfektion bei komplett montiertem Zustand durch den Einsatz verschiedener Chemikalien zu gewährleisten. Aufgrund der geringen Flussraten (0) und der Komplexität eines solchen Reinigungssystems wurde eine manuelle Reinigung mit anschließender thermischer Sterilisation (Autoklavierung) favorisiert.

Da es nicht möglich war das gesamte Leitungssystem (2.3.3) mit Flaschen und Medienreservoir fertig montiert zu autoklavieren, wurde es in logische Segmente getrennt. Diese Segmente ließen sich am Aufstellungsort einfach und schnell montieren, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Die gereinigten Bauteile des Chemostaten wurden gemäß Abb. 17 montiert und laut gebräuchlicher Laborpraxis an den Enden mit Aluminiumfolie abgedeckt und autoklaviert (121°C, 1 bar).

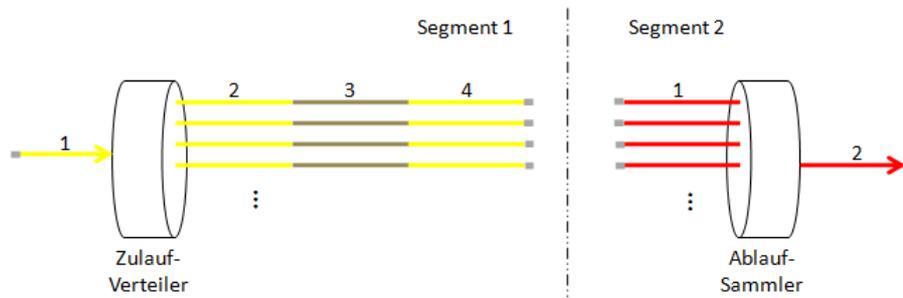


Abbildung 17: Sterilisationsvorbereitung des Leitungssystems Segment 1: 1 – Verbindung „Reservoir-Zulaufverteiler“, 2 – Verbindung „Zulaufverteiler-Pumpe“, 3 – Pumpenschlauch, 4 – Verbindung „Pumpe-Flasche“; Segment 2: 1 – Verbindung „Flasche-Ablaufsammler“, 2 – Verbindung „Ablaufsammler-Abfall“; ■ - Aluminiumabdeckung

Die verbleibenden Chemostaten-Bauteile (Flaschen, Medienreservoir) sind ebenfalls an allen Öffnungen mit Aluminiumfolie abgedeckt und autoklaviert worden. Erst nach dem autoklavieren wurde unter einer Steril-Arbeitsbank der BelüftungsfILTER (2.1.4) auf den entsprechenden Anschluss des Flaschendeckels aufgesetzt. Anschließend folgte die Montage (3.2.6) der Segmente.

Nach einem Chemostaten-Lauf wurde die Anlage demontiert (3.2.6). Vor Beginn der Reinigung mussten alle Bauteile, welche mit Biomasse in Berührung gekommen waren autoklaviert (121°C, 1 bar) werden. Nach der Dekontamination wurden Leitungssystem, Flaschen und Behälter gereinigt und anschließend autoklaviert.

Um sicher zu stellen, dass die Chemostaten-Anlage ohne Kontamination betrieben werden kann, wurden zwei Versuchsläufe (Steril-Läufe) mit unterschiedlichen Medien LB-Medium bzw. MMAB) durchgeführt. Die die Steril-Läufe wurden unter Versuchsbedingungen, jedoch ohne Testorganismen durchgeführt.

Überprüft wurde jeweils ein Zeitraum von ca. 120 Stunden (5 Tage). Die Durchführung erfolgt in 9 Replikaten, Versuchsbedingungen folgend:

Tabelle 12: Versuchsbedingungen für Sterilläufe

Bezeichnung	Symbol	Wert
Temperatur	T	30 °C
Drehzahl (Schüttler)	n	130 rpm
Verdünnungsrate	D	0,3481 h ⁻¹
Belüftung	\dot{V}_{air}	0,2 l/min

Die Verdünnungsrate entspricht dem Ergebnis aus Kapitel 3.3. Mit Hilfe dieser konnte das für den Versuch benötigte Medien-Volumen berechnet werden. Die verwendete Formel wurde aus der Gleichung zur Berechnung der Verdünnungsrate (1.3) und der Versuchsdauer hergeleitet:

$$V(\text{Res})[\text{l}] = D[\text{h}^{-1}] * V_{\text{L}}[\text{l}] * 9[\text{Replikate}] * 24 \left[\frac{\text{h}}{\text{Tag}} \right] * 5[\text{Tage}]$$

V(Res) bezeichnet das benötigte Volumen im Medienreservoir, D die gewählte Verdünnungsrate und V_{L} das Kulturvolumen in einem Replikat.

$$V(\text{Res}) = 0,3481 \text{ h}^{-1} * 0,0295 \text{ l} * 9 * 24 \left[\frac{\text{h}}{\text{Tag}} \right] * 5[\text{Tage}] = 11,09 \text{ l}$$

Für die Durchführung beider Versuche wurden folglich 15 l des entsprechenden Mediums hergestellt und sterilfiltriert (2.3.1).

Zur Beprobung werden zwischen 100 und 200 μl Medium durch das Septum im Flaschendeckel via Kanüle und Spritze (Kapitel 2.1.4) entnommen und in ein steriles 1,5 ml - Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Von den Proben wurden je 50 μl auf LB-Agar ausplattiert. Inkubation der Platten für mindestens 24 h bei 30°C.

3 Ergebnisse

3.1 Markierungsstrategie

Die für die Fluoreszenzmarkierung ausgewählten *E. coli* Stämme wurden jeweils mit den Fluoreszenzproteinen EGFP, mCherry sowie mCitrine markiert. Mithilfe einer analytischen PCR und der durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessung wurde die korrekte Markierung überprüft.

3.1.1 Überprüfung der korrekten Tn7 Insertion mittels PCR

Nach der erfolgten Transformation wurde eine Kolonie-PCR aller *E. coli* – Stämme vorgenommen. Von allen erhaltenen 42 Transformanden (14 Stämme x 3 Plasmide) wurden insgesamt 192 Kolonien überprüft. Unter den geprüften Kolonien wurden 77 gefunden, welche eine korrekte Insertion aufwiesen. Damit betrug die Erfolgsrate der Insertion 40,1 %.

Von den positiven Kolonien wurden 42 (1 Kolonie pro Transformande) -80 °C-Glycerolkulturen eingelagert.

3.1.2 Überprüfung der Fluoreszenzmarkierung mittels Durchflusszytometrie

Die positiv getesteten Transformanden wurden auf die Funkfunktion der Fluoreszenzmarkierung überprüft. Verglichen wurde die Autofluoreszenz des unmarkierten Referenzstammes mit der Fluoreszenzintensität der mit EGFP, mCherr und mCitrine markierter Stämme.

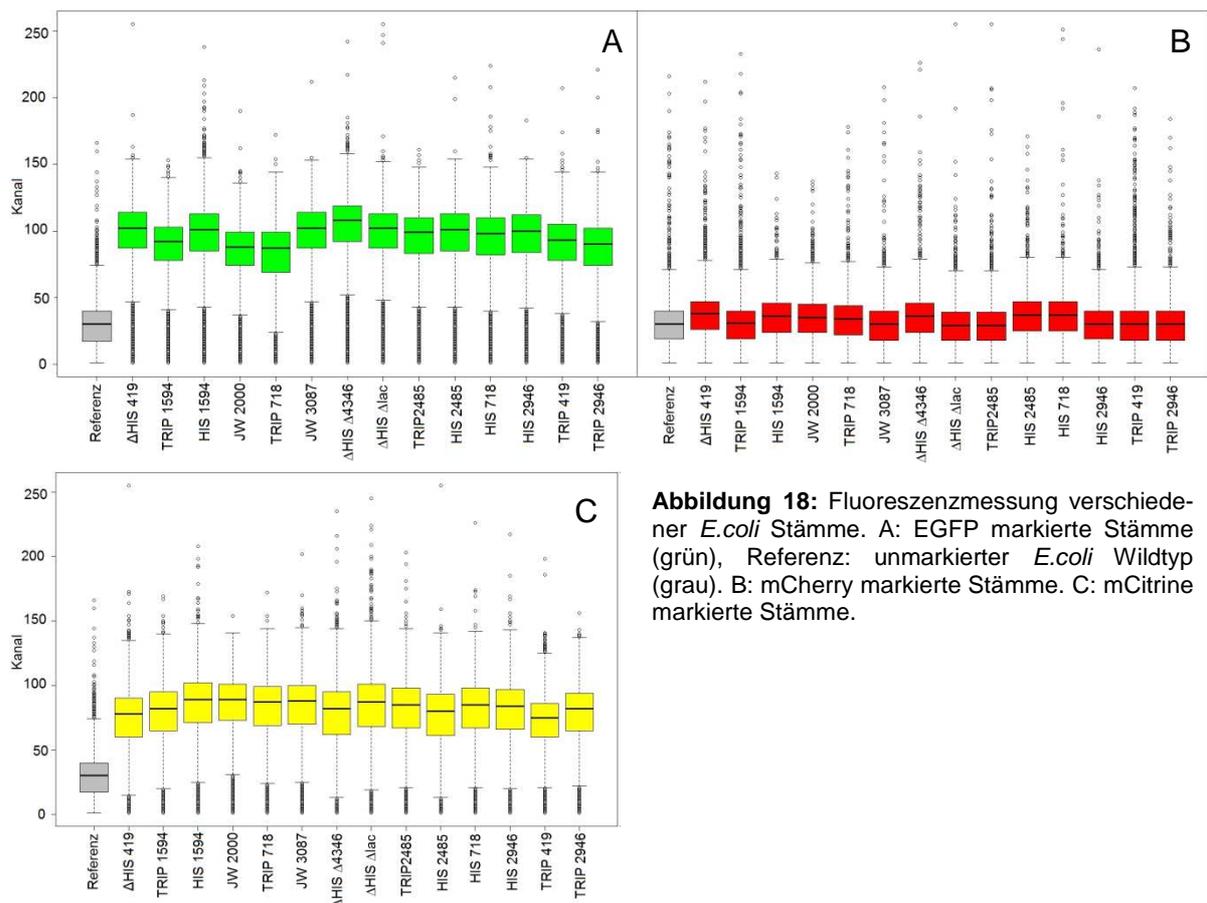


Abbildung 18: Fluoreszenzmessung verschiedener *E. coli* Stämme. A: EGFP markierte Stämme (grün), Referenz: unmarkierter *E. coli* Wildtyp (grau). B: mCherry markierte Stämme. C: mCitrine markierte Stämme.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mediane von Referenz (grau) und markiertem Stamm (grün bzw. gelb) eine deutlich differenzierte Lage im Plot aufweisen (Abb. 18 A und C). Die Autofluoreszenz der unmarkierten Referenz lag mit ≈ 30 RFE signifikant unter den markierten Stämmen (EGFP ≈ 100 RFE, mCitrine ≈ 75 RFE) (Zweiprobent-Test, $P < 0,05$).

Die mCherry-Markierung der *E. coli*-Stämme wurde nicht erfolgreich durchgeführt. Alle Mediane liegen auf dem Niveau des Referenzstammes (≈ 30 RFE) und es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Zweiprobent-Test, $P > 0,05$).

3.2 Konstruktion der Chemostaten-Anlage

Eine der Kernaufgaben dieser Arbeit bestand in der Konstruktion der Chemostaten-Anlage. In den folgenden Abschnitten sind die Entstehungsprozesse der einzelnen Anlagensegmente (Inkubationsbehälter, Leitungssystem, Klimatisierung, etc.), sowie der Zustand bei Beendigung dieser Arbeit, beschrieben.

3.2.1 Inkubationsbehälter

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Gewindehalsflaschen (Schott Duran®, 100 ml, transparent) als Reaktionsgefäße gewählt. Das Material bot für diese Anwendung mehrere Vorteile:

Aufgrund der hohen chemischen Beständigkeit des Duran-Glases konnte das Reaktionsgefäß mit allen üblichen Labor-Reinigungsautomaten gereinigt werden. Außerdem konnten durch die Transparenz des Materials alle biologischen Vorgänge gut beobachtet werden.

Die größte technische Herausforderung bestand in der Konstruktion des Deckels. Bis zur aktuellen Version (Abb. 19) wurden mehrere Prototypen getestet. Die größte Problematik war die Dichtheit der Replikate. So wurden verschiedene Materialien zur Dichtung (PTFE, Silicon, etc.) zwischen Deckel und Gewindehalsflasche erprobt. Hierbei stellte sich EPDM als bestes Dichtungsmaterial heraus. EPDM (Ethylen-Propylen-Dien-Monomer) ist ein synthetischer Kautschuk, welcher sich durch seine hohe Elastizität, auch bei hoher thermischer Belastung, auszeichnet.

Der Deckel wurde mit vier Bohrungen versehen (Abb. 19 **Abbildung 19**). Die Anschlüsse für die Medien- Zu- und Ableitung wurden mittels Gewinde (G 1/8“) auf der Oberseite aufgeschraubt (2.1.4). Das Rohr zur Medienableitung (Abb. 19 B-2) wurde in der aktuellen Version an der Unterseite ebenfalls eingeschraubt.

Die Konstruktion erlaubt so einen Wechsel des Rohrs und somit eine Änderung des Kulturvolumens. Als Rohrmaterial wurde PEEK (Polyetheretherketon) verarbeitet. In Vorgängermodellen befand sich Anstelle des Gewindes eine durchgängige 6 mm Bohrung, durch welche das Rohr zur Medienableitung eingeführt wurde. Diese Konstruktion bot eine einfachere Änderung des Kulturvolumens, jedoch wurde hierdurch die Dichtheit des Systems erheblich beeinträchtigt.

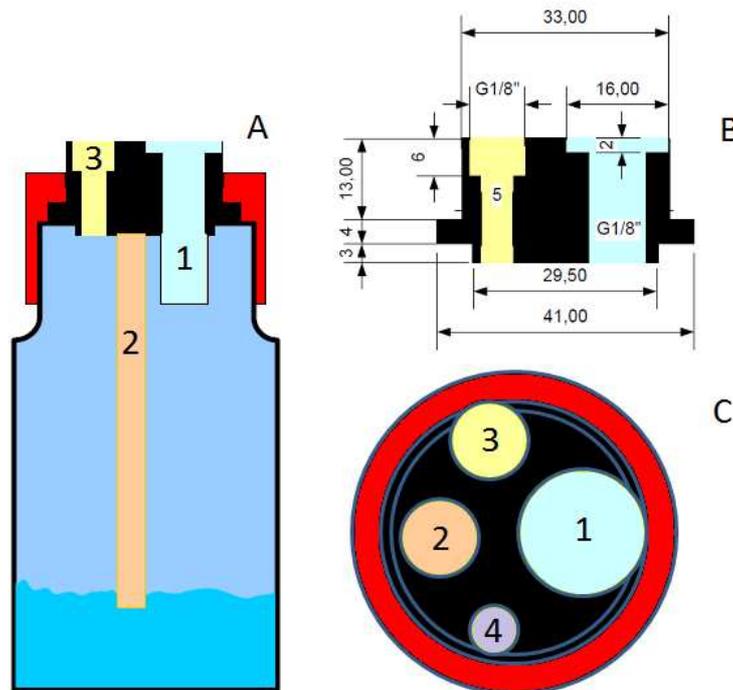


Abbildung 19: Darstellung der Chemostaten-Flasche. A: Seitenansicht Chemostaten-Flasche; B: technische Zeichnung des Flaschendeckels (Maßeinheit [mm]; Gewinde „G“ in Zoll). C: Aufsicht Flaschendeckel, 1 – Medienzulauf, 2- -Medienablauf, 3 – Druckluftzufuhr, 4 – Septum zur Beprobung. (Veit, 2011, geändert)

Für eine Probenahme des Flascheninhaltes war ein Septum (6 x 1 mm) unter einer Hohlschraube eingespannt (Abb. 19 A-4), um so den Flascheninhalt ohne Kontamination während des Betriebes des Chemostaten beproben zu können. Für das Proben-Septum musste ein Material identifiziert werden, welches ausreichend Elastizität bietet abzudichten, jedoch, trotz wiederholten durchstechen, keine Leckage aufwies. Als Septen-Material wurde Naturkautschuk mit einer PTFE-Beschichtung ausgewählt.

3.2.2 Medien austausch

Für die beschriebene Chemostaten-Flasche wurde ein System zum Austausch des Kulturmediums untersucht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

3.2.2.1 Medien-Zuführung

Die zur Medienversorgung eingesetzte Peristaltik-Pumpe lässt sich lediglich durch die Drehzahl justieren. Folglich ist die Förderleistung der Pumpe neben der Drehzahl auch vom verwendeten Schlauchmaterial (2 mm x 1 mm) abhängig. Um die Pumpendrehzahl in die Förderleistung umrechnen zu können, wurde eine Pumpenkennlinie für eine Förderleistung bis 0,7 ml/min aufgenommen (Abb. 20). Hierzu wurde das Fördervolumen aller 24 Kanäle über eine definierte Zeitspanne, bei bekannter Drehzahl, separat aufgefangen.

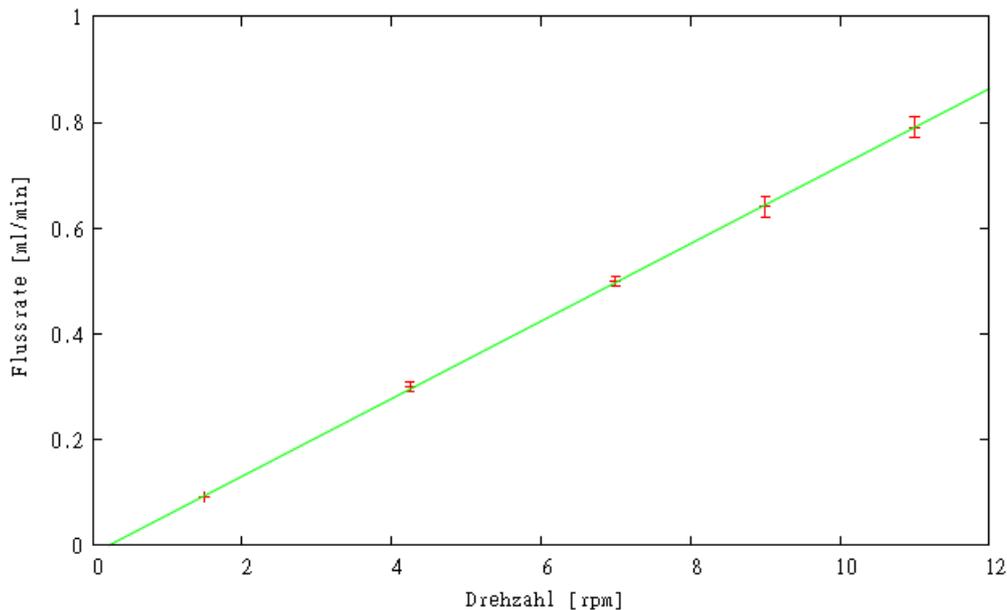


Abbildung 20: Pumpenkennlinie zur Umrechnung der Pumpendrehzahl in Förderleistung; Regressionsgerade mit dem Ansatz: $\dot{V} = a * U + b$, \dot{V} - Flussrate [ml/min], U - Drehzahl [rpm], $a = 0,0733 \frac{\text{ml}}{\text{min} * \text{rpm}}$, $b = -0,0162 \text{ ml/min}$; Fehlerbalken: Standardabweichung.

Die Datenpunkte in stellen die Mittelwerte aller 24 Pumpenkanäle dar (Abb. 20). Der lineare Zusammenhang wurde durch folgende Geradengleichung beschrieben:

$$\dot{V} \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right] = 0,0733 \frac{\text{ml}}{\text{min} * \text{rpm}} * U [\text{rpm}] - 0,0162 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$$

3.2.2.2 Medien-Abführung

Für die Abführung des Kulturmediums wurden zwei Methoden verglichen. Absaugung via Unterdruck oder Ableiten durch Beaufschlagung der Kulturflasche mit einem Überdruck. Durch den Zufluss an Medium steigt in der Chemostaten-Flasche das Kulturvolumen. Erreicht dieses das Ablaufröhrchen, so wird das überschüssige Medium abgesaugt (Abb. 14 A), bzw. mit dem Luftstrom abgeführt (Abb. 14 B).

Variante A war aufgrund des geringeren technischen Aufwandes einfacher umzusetzen, da eine ausreichend dimensionierte Unterdruck-Pumpe alle Replikate gleichzeitig versorgen konnte. Die Umsetzung bereitete jedoch einige Probleme: Zum Auffangen des Mediums mussten spezielle unterdruckresistente Behälter angeschafft werden, da konventionelle Behälter aufgrund des Unterdrucks kollabierten. Zusätzlich erhöhte sich durch den Unterdruck in der Chemostaten-Flasche das Kontaminationsrisiko, da durch minimalste Spalten und Unebenheiten in der Deckel-Konstruktion Keime eingesaugt werden konnten.

Alternativ dazu musste für Variante B jedes Replikat mit einer eigenen Druckluftversorgung, samt Flussbegrenzung, ausgestattet werden. Diese Variante bot jedoch mehrere Vorteile: Neben einem Kontaminationsschutz durch den angelegten Überdruck wurde auch der Wechsel von Abfallbehältern erheblich vereinfacht. Im Laufe der Konstruktion wurde festgestellt, dass Variante B das geeignetere Verfahren bei den beiden Varianten für diese Arbeit war. Aus diesem Grund wurde der Medienaustausch via Überdruck für das Chemostaten-System ausgewählt.

3.2.3 Leitungssystem

Das Leitungssystem des Chemostaten wurde in logische Segmente unterteilt. Die Medienzuleitung (Abb. 21 A), Medienableitung (Abb. 21 C) und die Druckluftzufuhr, welche für jede Kulturflasche mit einem eigenen Flussbegrenzer und Sterilfilter ausgestattet wurde.

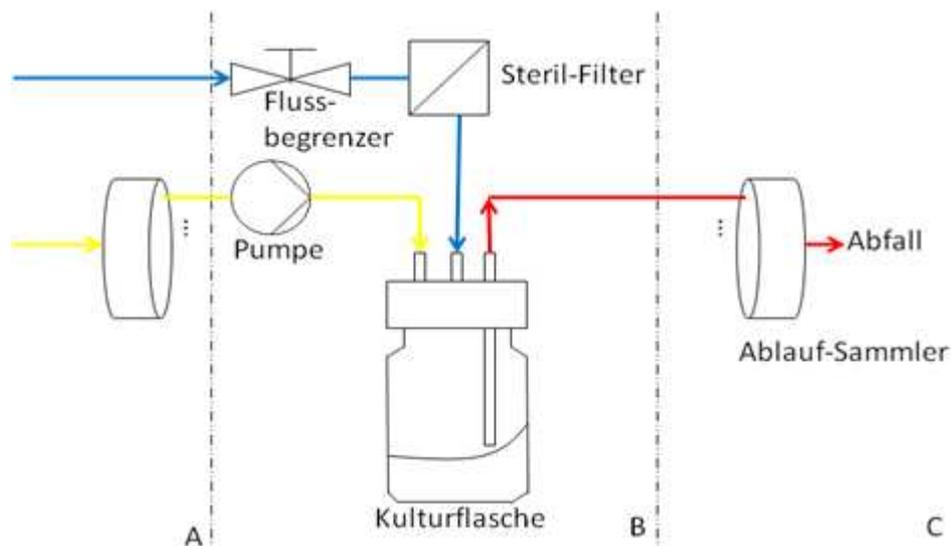


Abbildung 21: Schema des Leitungssystems des Chemostaten. A: Zulaufverteiler teilt den Medienstrom in 24 Kanäle für 24 Replikate auf. B: Darstellung nur einer Kulturflasche, jedes Replikat besitzt einen separaten Medienzuleitungs- und -abfluss sowie eine eigene Luftversorgung; C: Ablaufsammler. Medienzuleitung (gelb), Medienableitung (rot), Druckluftversorgung (blau); einströmende Luft (blau) verlässt Chemostat über Medienableitung (rot).

Durch den Zulaufverteiler wurde der Medienstrom vom Reservoir auf 24 separate Kanäle aufgespalten. Die Förderung des Mediums erfolgte durch eine 24-Kanal-Peristaltikpumpe. Die von der Haustechnik bereitgestellte Druckluft wurde über einen Druckminderer auf maximal 1 bar begrenzt. Nach der Teilung der Druckluftversorgung auf 24 Kanäle wurde der Volumenstrom auf 0,2 l/min begrenzt. Vor dem Einströmen der Luft in die Kulturflasche passierte diese einen Sterilfilter, welcher direkt via „Luer-Lock“ auf den Flaschendeckel angebracht wurde.

Das Medium verließ die Kulturflasche, zusammen mit dem Luftstrom, über die Medienableitung. Alle Kanäle wurden im Ablaufsammler zusammengefasst und in den Abfallbehälter abgeleitet.

3.2.4 Temperaturkontrolle

Um das in der Kulturflasche befindliche Medium auf die benötigte Temperatur von $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ einzustellen war eine Temperaturkontrolle notwendig. Für die technische Umsetzung stand zunächst eine Klimakammer Microclima 100 (snijders scientific, Tilburg, Niederlande) zur Verfügung. Hierbei stellte sich heraus, dass bei längerer Betriebsdauer des Schüttlers durch die Rotationsbewegung die Technik der Klimakammer (Kompressor, Wärmetauscher) und die Aufstellrollen in Mitleidenschaft gezogen wurden. Aus diesem Grund wurde eine alternative Klimatisierung nötig.

Da der Chemostat über größere Zeiträume (< 24 Stunden) unbeaufsichtigt lief, wurde der Temperaturverlauf mithilfe von Sensoren, welche in das Kulturmedium zweier Replikate eingebracht waren aufgezeichnet.

Die Abbildung zeigt den Temperaturverlauf, welche in Verbindung des Experimentes zur Kultivierung einer E. coli – Monokultur (3.5.2) aufgezeichnet wurde.

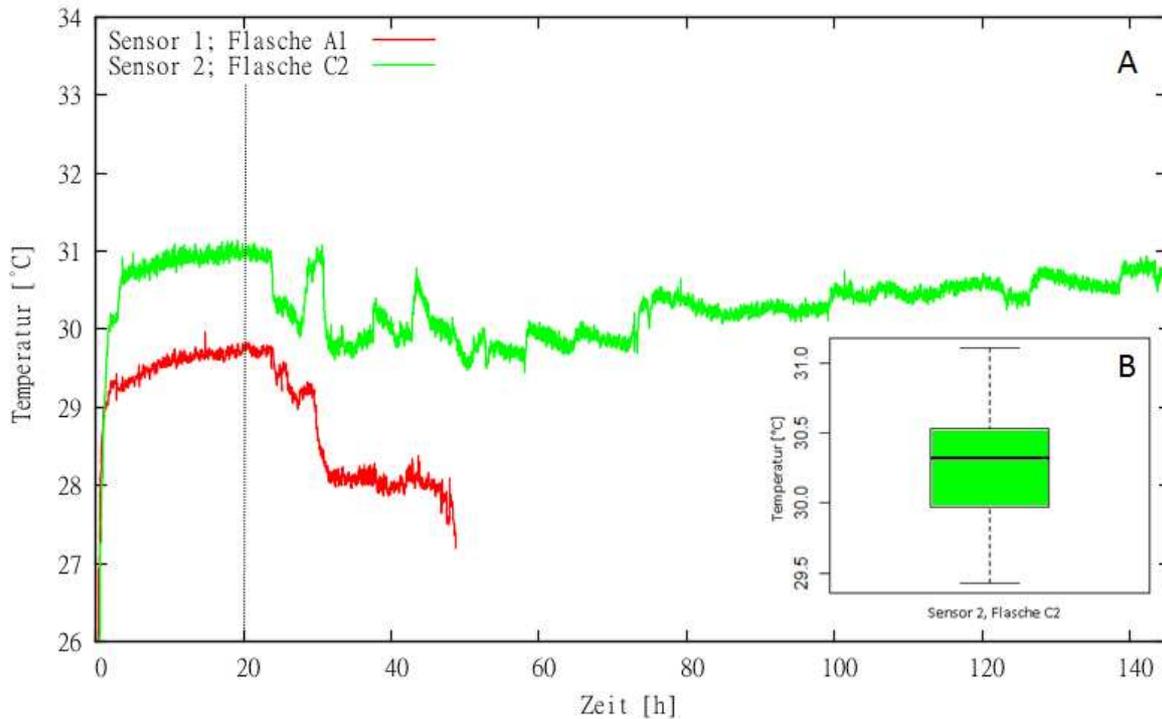


Abbildung 22: Temperaturaufzeichnung zweiter Chemostaten-Lauf. A: Temperaturaufzeichnung, Aufzeichnung von Sensor 1 Aufgrund von Leckage an Replikat A1 abgebrochen. Ab $t = 20$ h Beginn der Verdünnung ($D = 0,191 \text{ h}^{-1}$): B: Sensor 2 ab $t = 20$ h, $n = 22442$.

Die Temperaturüberwachung (Abb. 22, A) des Replikates A1 konnte Aufgrund einer Leckage am Flaschendeckel nicht weiter fortgeführt werden. Aufgrund der Leckage entwich die zugeführte Druckluft, wodurch die Medianabführung zum Erliegen kam. Der Temperaturabfall in A1 kurz vor Ende der Aufzeichnung ist auf die Flutung des Replikates mit Kulturmedium zurückzuführen. Die von Sensor 2 aufgezeichneten Daten belegen eine konstante Temperierung.

3.2.5 Steril-Filtration von Kulturmedium

Um ein ausreichendes Volumen an Kulturmedium für die durchgeführten Versuche herzustellen bzw. zu sterilisieren, wurde eine Filtrationsapparatur (Abb. 23) entwickelt. Zentrales Element stellte die Filterkapsule Sartobran® P 300 dar. Sie wurde für diesen Einsatz ausgewählt, da sie zur Hochdurchsatzfiltration großer Volumina, speziell von Puffern und Medien, konzipiert wurde. Ein zusätzlicher Vorteil der Kapsule besteht in ihrer Wiederverwendbarkeit. Nach gründlichem Spülen mit entionisiertem Wasser wurde die Kapsule autoklaviert und konnte somit zur erneuten Verwendung vorbereitet werden.

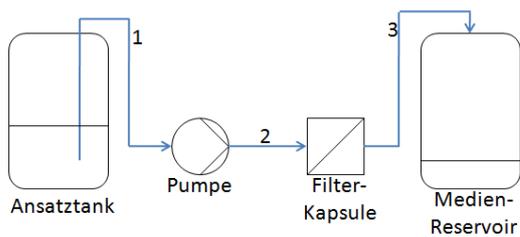


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Filtrationsapparatur; Verbindungsschläuche

1-3 aus Silicon (9,5 mm x 6,4 mm)

Der Flüssigkeitsweg (1 bis 3, sowie Pumpenschlauch und Filter) wurden bereits montiert autoklaviert. Die Enden der Stecke waren dabei mit Aluminiumfolie abgedeckt. Zur Filtration wurde der Verbindungsschlauch (Abb. 23, 3) zügig und keimfrei mit dem Medienreservoir verbunden.

Anschließend erfolgte die Filtration des Mediums aus dem Ansatztank. Nach der Filtration wurde das Leitungssystem mit destilliertem Wasser gründlich gespült (insbesondere Kapsule). Nach dem vollständigen Entleeren der Leitungssystem wurde dieses möglichst zeitnah autoklaviert.

Um die Filtration zu überprüfen, wurden bei jeder Medien-Filtration das Filtrat beprobt. Jeweils 50 µl des Filtrates wurden auf LB-Agar ausplattiert und bei 30 °C für mindestens 24 Stunden inkubiert. Jede Bestimmung wurde 3-fach repliziert. Dabei konnte keine Kontamination des Filtrates festgestellt werden.

3.2.6 Montage/Demontage

Für die Montage des Chemostaten-Systems wurde ein Protokoll entwickelt, um den Aufbau des Systems zu standardisieren und das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Das komplette Protokoll ist als Anhang (Kap. 7) beigefügt. In folgender Aufstellung sind die grundlegenden Schritte für die Montage bzw. Demontage des Chemostaten-Systems zusammengefasst:

1. Montage:

- a. Platzierung der Chemostaten-Flaschen in den Schüttler-Halterungen (Abb. 16)
- b. Anschluss der Druckluftversorgung (blau)
- c. Beaufschlagung der Flächen mit einem Volumenstrom von 0,2 l/min (Schritt diente der Kontaminationsprävention, Luftstrom durch Flasche verhindert hinein sinken von Keimen während Anschluss von Zu- und Ablauf)
- d. Einbau von Ablauf-Sammler in Halterung, Anschluss Ablauf-Schläuche (Abb. 17, Segment 2).
- e. Einbau des Zulauf-Verteilers in Halterung, Anschluss Zulaufschläuche; einzeln, einlegen des Pumpenschlauches vor dem Verbinden des Replikates (Abb.17, Segment 1).
- f. Anschluss von Medien-Reservoir und Abfallbehälter; Anschluss Temperatur-Sensoren

- g. Befüllen der Flaschen mit Medium (Pumpe: 90 rpm, Schüttler 130 rpm)
- h. Überprüfung auf Dichtheit des Systems bzw. korrekten Medien-Abfluss
- i. Deaktivierung der Pumpe, Abstellen der Druckluftversorgung (Grundzustand vor Beginn der Versuche.)

2. Demontage:

- a. Deaktivierung der Pumpe, Abstellen der Druckluftversorgung
- b. Trennen der Flaschen von Medien-Ableitung , Ausbau des Ablaufsammlers (Abb. 17, Segment 2)
- c. Trennen der Flaschen von Medien-Zuleitung, Ausbau des Zulaufverteilers (Abb. 17, Segment 1)
- d. Entfernen der Chemostat-Flaschen

3.2.7 Betrieb

Der Betrieb der Chemostaten-Anlage erfolgte im Rahmen dieser Arbeit weitestgehend zur Verifizierung und Validierung. Aus diesem Grund ist die Methodik zum Betreiben der Chemostaten-Anlage selbst ein Ergebnis des Entwicklungsprozesses. Das komplette Protokoll zum Betrieb ist als Anhang (7) beigefügt.

Der Chemostat wurde gereinigt, sterilisiert, aufgebaut und mit Kulturmedium befüllt (siehe 2.3.2, 3.2.6). Einige Stunden vor Beginn der Arbeiten am Chemostaten wurden der Plattform-Schüttler (auf 130 rpm) sowie der Umwälzthermostat aktiviert. Um die Kultivierungstemperatur (30 °C) in den Flaschen zu erreichen, musste, abhängig von Aufstellungsort und Druckluftversorgung, am Umwälzthermostat eine höhere Temperatur eingestellt werden (aktueller Aufstellungsort: D U1.009, Klimazelle 5; ohne Belüftung: 34°C, mit Belüftung 36°C).

Das Beimpfen erfolgte über eine Kanüle durch das Beprobungsseptum aus einer Vorkultur. Vor dem Starten der Verdünnung wurden die Kulturen bis zum Erreichen der gewünschten Populationsdichte als Übernachtskultur inokuliert. Die Druckluftversorgung ist in dieser Phase deaktiviert worden, um eine Aufkonzentrierung des Kulturmediums zu verhindern.

Nach dem Erreichen der gewünschten Zellpopulation wurde die Druckluftversorgung (0,2 l / min) sowie die Verdünnung gestartet. Die Verdünnungsrate wurde der Wachstumsrate gleichgesetzt (1.3). Die zur Verdünnung erforderliche Pumpendrehzahl wurde über die Pumpenkennlinie ermittelt. Während des Betriebes wurde die Populationsentwicklung beobachtet (2.2.1, 2.2.7) und angepasst (1.3.2).

3.3 Bestimmung Wachstumsrate *E. coli* EGFP 17

Wie im Kapitel 1.2 beschrieben wurde die Zellzahl logarithmiert und in einem Plot gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 24). In den Plots sind deutlich Geraden zu erkennen. Der Anstieg dieser Geraden entspricht der Wachstumsrate (μ). Weiterhin ist zu erkennen, dass die jeweils ersten Messpunkte ($t=0$) nicht auf diesen Geraden liegen. Es handelt sich hierbei folglich noch um die *Lag*-Phase der Kultur (1.2).

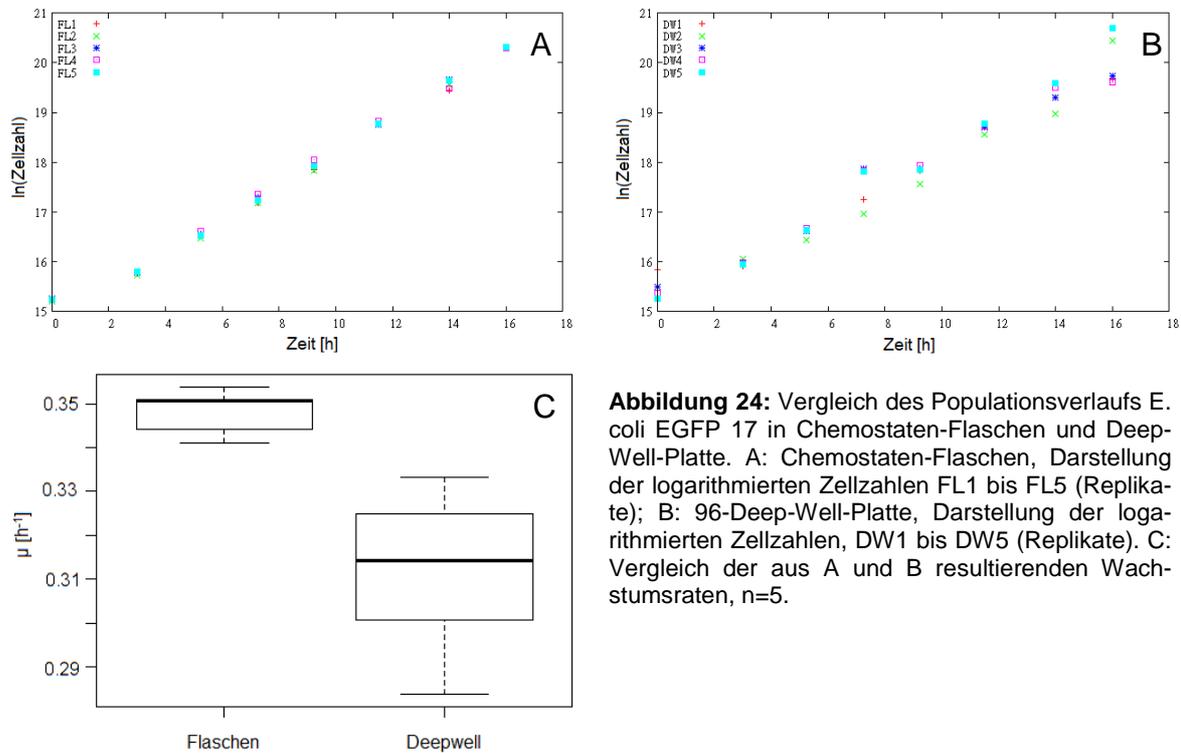


Abbildung 24: Vergleich des Populationsverlaufs *E. coli* EGFP 17 in Chemostaten-Flaschen und Deep-Well-Platte. A: Chemostaten-Flaschen, Darstellung der logarithmierten Zellzahlen FL1 bis FL5 (Replikate); B: 96-Deep-Well-Platte, Darstellung der logarithmierten Zellzahlen, DW1 bis DW5 (Replikate). C: Vergleich der aus A und B resultierenden Wachstumsraten, $n=5$.

Aus den Werten können Wachstumsraten μ mit $\mu(\text{FL}) = 0.3481 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 0.0054$) und $\mu(\text{DW}) = 0.3113 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 0.0197$) gemittelt werden. Die Auswertung des Wachstumsexperiments ergab, dass die beiden Ergebnisse signifikant unterschiedlich sind (Zweiprobentest, $df = 4.589$, $P < 0.05$).

Mithilfe dieses Versuches konnte die Wachstumsrate des *E. coli* Stammes „CK 276 Keio WT *EGFP* 17“ bestimmt werden. Zusätzlich wurde die Erkenntnis erlangt, dass zukünftige Wachstumsexperimente ausschließlich in den Kulturflaschen des Chemostats durchgeführt werden müssen.

3.4 Reinigung und Sterilisation

Um die Methoden zur Reinigung und Sterilisation (2.3.2) zu verifizieren wurden zwei Steril-Läufe mit unterschiedlichem Kultur-Medium (LB-Medium, MMAB) durchgeführt. Als Steril-Lauf wird in der Biotechnologie der Betrieb einer Anlage (meist Fermenter) bezeichnet, bei welchem der gesamte Prozessablauf unter realen Versuchsbedingungen, jedoch ohne Testorganismus durchgeführt wird.

Ziel des Steril-Laufes ist es den kontaminationsfreien Betrieb des Chemostaten-Systems nachzuweisen.

1. Steril-Lauf mit LB-Medium

Die Versuchsdauer betrug insgesamt 5 Tage. Unter allen Ausgewerteten Proben konnte keine Kontamination gefunden werden.

2. Steril-Lauf mit MMAB

In diesem Steril-Lauf sollte das Ergebnis des ersten bestätigt werden. Die Versuchsdauer betrug ebenfalls 5 Tage. Unter allen Ausgewerteten Proben konnte keine Kontamination gefunden werden.

3.5 Kultivierung einer *E.coli*-Monokultur

Nachdem die Chemostaten-Anlage konstruiert wurde, die Medienversorgung, Durchmischung und Temperaturkontrolle funktionsfähig waren sowie der kontaminationsfreie Betrieb verifiziert werden konnte, sollte begonnen werden die Kultivierung eines Bakterien-Stammes im Chemostaten durchzuführen.

3.5.1 Erster Chemostaten-Lauf

Der Chemostaten-Lauf wurde mit dem EGFP-markierten *E. coli* Stamm „CK276 Keio *EGFP17*“ durchgeführt. Die Replikate wurden 1:100 aus einer Vorkultur ($OD_{600} \approx 0,3$) beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden ($t=1$ h) wurde mit der Verdünnung ($D=0,3397 \text{ h}^{-1}$) begonnen. Zum Zeitpunkt $t=5$ h erfolgte eine Anpassung der Verdünnung ($D=0,0415 \text{ h}^{-1}$). Nach weiteren 3 Stunden ($t=8$ h) wurde die Verdünnung beendet ($D=0 \text{ h}^{-1}$).

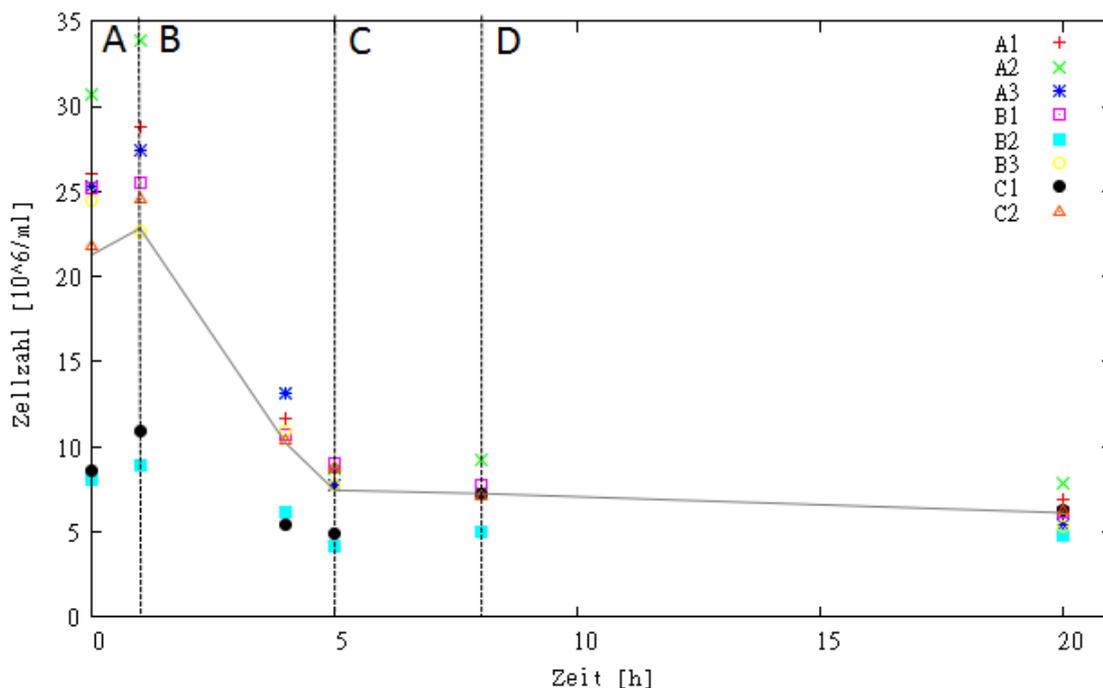


Abbildung 25: Verlauf der Populationsdichte während des ersten Chemostaten-Laufes; A: Ende der *batch*-Phase, B: Start der Verdünnung $D = 0,3397 \text{ h}^{-1}$. C: Anpassung der Verdünnung $D = 0,0415 \text{ h}^{-1}$; D: Abschaltung der Verdünnung $D=0$. A1 bis C2 (Replikate).

Es ist zu erkennen, dass die Zellzahl in den Replikaten nicht wie erwünscht konstant blieb (Abb. 25). Die Populationsdichte begann direkt nach dem Einschalten der Verdünnung (Abb. 25, B) steil abzusinken. Um das Auswaschen der Kultur zu vermeiden, erfolgte eine Anpassung der Verdünnungsrate (1.3.2). Durch die Anpassung verlangsamte sich der Konzentrationsabfall (Abb. 25, C). Da die Populationsdichte auf die Animpfkonzentration abgesunken war, sollte durch ein Pausieren der Verdünnung die Populationsdichte wieder erhöht werden (Abb. 25, D). Da keine Erholung der Populationsdichte eintrat, wurde der Versuch vorzeitig abgebrochen.

3.5.2 Zweiter Chemostaten-Lauf

Dieser Chemostaten-Lauf wurde ebenfalls mit dem EGFP-markierten *E. coli* Stamm „CK276 Keio EGFP17“ durchgeführt. Die Replikate wurden 1:50 mit einer Vorkultur ($OD_{600} \approx 0,3$) an geimpft. Nach einer Inkubation (*batch*-Modus) von 20 Stunden war in den Replikaten eine $OD_{600} \approx 0,3$ erreicht ($t=0$). Die Verdünnungsrate ($D = 0,191$) wurde über die gesamte Versuchsdauer konstant gehalten. Für diesen Versuch wurde neben der Zellzahlbestimmung eine parallele Bestimmung der optischen Dichte vorgenommen.

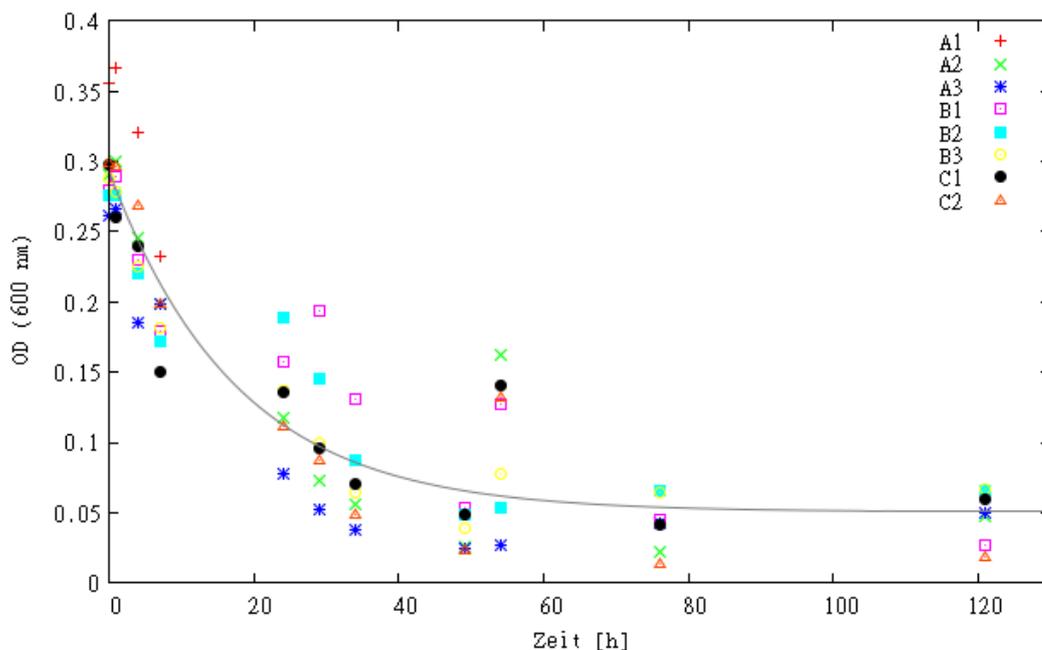


Abbildung 26: Verlauf der Populationsdichte während des zweiten Chemostaten-Laufes. Regressions-Kurve mit dem Ansatz $f(t) = a * e^{-b*t} + c$; $a = 0,242$, $b = 0,057$, $c = 0,051$, A1 bis C2 (Replikate).

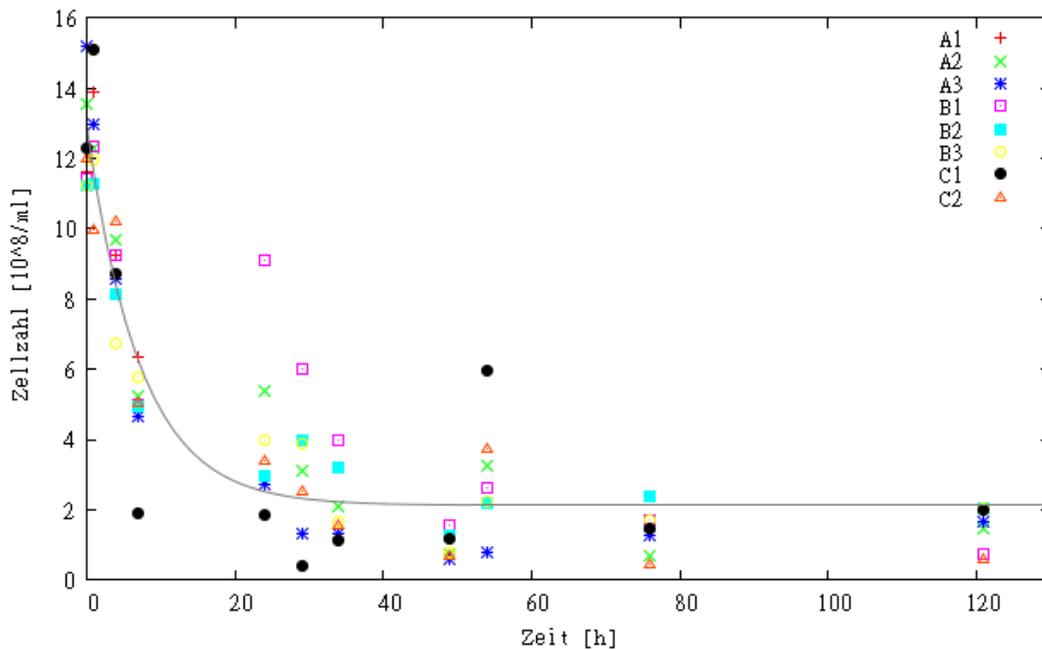


Abbildung 27: Verlauf der Populationsdichte während des zweiten Chemostaten-Laufes. Regressions-Kurve mit dem Ansatz $f(t) = a * e^{-b*t} + c$; $a = 10,8154$, $b = 0,1382$, $c = 2,1279$, A1 bis C2 (Replikate).

Die Verdünnung des Chemostaten wurde bei Erreichen einer $OD_{600} \approx 0,3$ eingeschaltet. Die Verdünnungsrate lag mit $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ unter der für diesen Stamm ermittelten ($0,35 \text{ h}^{-1}$, Kap 3.3). Die Verdünnung wurde über die gesamte Versuchsdauer konstant gehalten. Aus den Abbildungen ist zu entnehmen, dass die Populationsdichte innerhalb der ersten 72 Stunden abnimmt, danach jedoch auf $OD_{600} = 0,05$ bzw. $c = 2 * 10^8 \text{ ml}^{-1}$ konstant bleibt (Abb. 26 bzw. Abb. 27). Bereits nach 48 Stunden konnte in den Inkubationsgefäßen die Formation eines Biofilmes an den mit Kulturmedium benetzten Glasoberflächen beobachtet werden.

Der Versuch lief mit einer Dauer von ca. 5 Tagen wesentlich länger als im vorausgehenden Versuch (ca. 20 h). Zur Beendigung des Versuches führte eine Blockade (mikrobieller Bewuchs) im Verbindungsschlauch zwischen Ablaufsammler und Abfallbehälter.

4 Diskussion

Die Aufgabenstellungen dieser Arbeit waren die Konstruktion der Labor-Chemostaten-Anlage, Verifikation des kontaminationsfreien Betriebes sowie die Durchführung einer *E. coli* – Mono- bzw. Kokultur. Zusätzlich erfolgte die Fluoreszenzmarkierung verschiedener *E. coli* – Stämme / Mutanten als Vorbereitung auf die *E. coli* – Kokultur. Die angestrebte Kokultur konnte im gegebenen Zeitrahmen nicht realisiert werden. Die Ergebnisse der Aufgabenstellung werden in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert.

4.1 Markierungsstrategie

Aus den Ergebnissen der Durchflusszytometrie geht hervor, dass die Markierung mit den Fluoreszenzproteinen EGFP und mCitrine erfolgreich durchgeführt werden konnte. Jedoch konnte die Fluoreszenz der mCherry-markierten Stämme nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass sämtliche mCherry-Markierungen nicht erfolgreich waren schließt einen zufälligen Fehler aus. Die Ursache hierfür muss in einem systematischen Fehler begründet gewesen sein. Da laut PCR-Ergebnis die Gen-Kassette erfolgreich in das Genom übertragen wurde, kann davon ausgegangen werden, dass der verwendete Vektor funktionsfähig war. Möglich ist ein Funktionsverlust des Fluoreszenzproteins bzw. des Promotors aufgrund einer Punktmutation. Ob diese Vermutung zutreffend ist, nur durch eine Sequenzierung des betreffenden Gens überprüft werden. Eine wiederholte Präparation des Vektors mit anschließender Markierung der Modellorganismen war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

4.2 Konstruktion der Chemostaten-Anlage

4.2.1 Inkubationsbehälter

Die größte Herausforderung bei der Umsetzung der Deckel-Konstruktion bestand in der Abdichtung des Behälters. Es konnte Materialien gefunden werden, welche den Belastungen der wiederholten Autoklavierung standhalten können. Einige Bauteile des Flaschendeckels sind konstruktionsbedingt einem Verschleiß unterliegen. Diese gilt insbesondere für das Septen-Material, die O-Ringe und Halteelemente in den Schnellverbindern, sowie dem Schlauchmaterial welches in den Schnellverbindern durch Metall-Klammern arretiert wird.

Das Duran[®]-Glas der Inkubationsbehälter besitzt eine für Glas typisch niedrige Wärmeleitfähigkeit. Da die Wärmezufuhr durch die Heizplatten ausschließlich von unten realisiert wird, ist die Temperatur auf der Bodenoberfläche des Behälters höher als im Kulturmedium. Es ist nicht auszuschließen, dass die beobachtete Biofilmbildung hiermit im Zusammenhang steht, da sich adhärenzte *E. coli*-Kolonien näher an ihrem Temperaturoptimum ($\approx 37\text{ °C}$) befinden als *E. coli* in Suspension (bei 30 °C).

Da eine chemische Beeinflussung der Biofilmbildung aufgrund der geplanten Evolutionsexperimente keine Option ist, bleibt zur Hemmung des Biofilmes nur die Möglichkeit einer Oberflächenmodifikation bzw. -beschichtung.

Eine gebräuchliche Methode zur Oberflächenmodifikation ist das Aufbringen von Silan-Verbindungen. Hierzu wird Dimethyldichlorsilan (DMDCS) verwendet, um eine Antihafbeschichtung (Sambrook und Fritsch, 1989) auf Glasoberflächen zu erzeugen. Für eine Oberflächenbeschichtung könnte der Einsatz von Teflon überprüft werden.

4.2.2 Medien austausch

Eine Herausforderung bei der Justierung der Verdünnung stellt die Drehzahlregulierung der Pumpe (24-Kanal-Kasettenschlauchdosierpumpe) dar. Im unteren Drehzahlbereich kann die Pumpe lediglich in Schritten von 0,25 rpm reguliert werden. Hierdurch kann die benötigte Verdünnung nur näherungsweise eingestellt werden.

Gelöst werden könnte dieses Problem beispielsweise durch die Verwendung von Schlauchmaterial (Pumpenschlauch) mit geringerem Innendurchmesser. Durch den geringeren Innendurchmesser des Schlauches sinkt das pro Umdrehung geförderte Volumen. Aufgrund der gesenkten Flussrate muss zur Kompensation die Drehzahl erhöht werden. Die Verwendung eines größeren Drehzahlbereiches birgt den Vorteil, dass trotz der gegebenen Einstellintervalle die Einstellbarkeit der Verdünnung steigt.

In der Pumpenkennlinie (Abb. 20) würde eine Verkleinerung des Schlauchdurchmessers zu einem flacheren Anstieg der Regressionsgeraden führen. In der aktuell aufgenommenen Pumpenkennlinie beschreibt \dot{V} die Förderleistung [ml/min], U die Drehzahl der Pumpe. Der Anstieg a der Geraden spiegelt das Volumen wieder, welches bei einer Umdrehung der Pumpe gefördert wird. Der Abszissenabschnitt b sollte logischerweise den Wert 0 annehmen, da bei Stillstand der Pumpe auch die Förderleistung zum Erliegen kommt. Der Grund das $b < 0$ ist, wurde auf Messungenauigkeiten zurückgeführt.

4.2.3 Durchmischung des Kulturvolumens

Die Durchmischung des Kulturmediums durch einen Plattformschüttler zu realisieren war erheblich einfacher umzusetzen, als jedes Replikat mit einer eigenen Rührvorrichtung auszustatten.

Der verwendete Plattformschüttler besitzt eine horizontale Auslenkung von 2,5 cm und wurde auf eine Geschwindigkeit von 130 rpm eingestellt. Da die Umdrehungszahl die Höhe der kreisenden Welle bestimmt, beeinflusst sie somit direkt das enthaltene Flüssigkeitsvolumen.

Eine Änderung der Umdrehungszahl macht eine Neubestimmung des Kulturvolumens nötig. Mit den aktuellen Einstellungen und Verwendeten Materialien beträgt das Kulturvolumen 29,5 ml in den Reaktionsgefäßen.

Für die Konstruktion von Bioreaktoren ist im Allgemeinen die Verwendung von Rührungen mittels Rühranker oder Turbine gebräuchlich (Chmiel, 2006). Für kleinere Maßstäbe ist die Schüttelkultur üblich, da hierbei eine größere Flüssigkeitsoberfläche als vergleichsweise bei einer Rührung erzeugt werden kann. Die große Oberfläche verbessert den Gasaustausch zwischen Flüssig- und Gasphase, sodass bei einer Schüttelkultur (abhängig vom Kulturvolumen) meist keine aktive Begasung notwendig wird. Dieser Vorteil sollte sich bei der Konstruktion dieser Chemostaten-Anlage ausgenutzt werden.

4.2.4 Reinigung und Sterilisation

Methodisch betrachtet bietet die thermische Sterilisation der Anlage die sicherste Variante. Durch dieses Vorgehen wird jedoch der Auf- und Abbau der Anlage verkompliziert. Zur Durchführung eines Versuches ist es nötig, die Anlage vollständig zu demontieren, manuell zu reinigen und anschließend zu sterilisieren.

Bei der Montage der autoklavierten Segmente muss Sorge getragen werden, jede Kontamination am Aufstellungsort zu vermeiden. Im Vergleich würde eine chemische Desinfektion, bei welcher die Anlage montiert bliebe und mit reinigenden bzw. desinfizierenden Detergenzien (Alkohole, Laugen) durchspült würde, den Aufwand der Versuchs- Vor- und Nachbereitung erheblich verkleinern. Diese Variante birgt jedoch das Risiko, dass in Nischen im Flüssigkeitsweg (allg. als Totraum bezeichnet) oder unbenetzten Oberflächen (Deckelunterseite, Gewinde, etc.) Kontaminationen überdauern könnten. Zusätzlich müsste nach einer chemischen Desinfektion verifiziert werden, dass alle verwendeten Detergenzien entfernt werden konnten. Angesichts des verzweigten Leitungssystems und den geringen Durchsatzraten der Chemostaten-Anlage, würde die Konditionierung mit Kulturmedium nach der chemischen Desinfektion ein großes Medien-Volumen notwendig machen.

Die Tatsache, dass während aller Versuche die im Rahmen dieser Arbeit an der Chemostaten-Anlage durchgeführt wurden, keine Kontaminationen festgestellt werden konnten zeigt, dass die gewählte Methode der thermischen Sterilisation für diese Aufgabe ein geeigneter Prozess ist und den höheren Arbeitsaufwand rechtfertigt.

4.3 Betrieb der Chemostaten-Anlage

4.3.1 Kultivierung einer *E. coli* - Monokultur

Aufgrund der aufgetretenen Schwierigkeiten des ersten Chemostaten-Laufes wurde eine Beratung mit Dr. Horn (Abteilungsleiter Biotechnikum, Hans-Knöll-Institut, Jena, Deutschland) organisiert. Zu den wahrscheinlichsten Begründungen zählte die äußerst niedrige Populationsdichte zu Beginn des Laufes, welche für eine stabile Chemostatenkultur nicht ausgereicht haben könnte. Da auch nach Beendigung der Verdünnung die Populationsdichte nicht erneut anstieg, könnte auch zur Ursache haben, dass ein Fehler in der Medienzubereitung (z.B.: Spurenelemente) vorlag. Diese Hypothese konnte jedoch nicht überprüft werden, da das betreffende Medium bereits entsorgt wurde. Technische Ursachen konnten ebenfalls nicht gefunden werden. Die Überprüfung von Pumpenkennlinie, Schüttler, Belüftung und der Temperaturkontrolle ergaben keine Auffälligkeiten.

Im zweiten Chemostaten-Lauf wurde über die gesamte Versuchsdauer die Verdünnung konstant gehalten. Trotzdem sank die Populationsdichte zu Beginn der Kultur zunächst ab, stabilisierte sich jedoch später. Die Stabilisierung der Population auf niedrigem Niveau wird auf die Bildung des Biofilmes zurückgeführt, bei welchem Zellen von den obersten und sensibelsten Schichten kontinuierlich abgeschwemmt wurden. Die Kultur erreicht so einen statischen (eingeschwungenen) Zustand, obgleich die Population, nicht wie gewünscht in Suspension, sondern adhärent wächst.

4.3.2 Biofilmbildung während der *E. coli* - Monokultur

Das Bilden von Biofilmen ist bei kontinuierlichen Kulturen ein bekanntes Problem. Gerade *E. coli* und *Serratia marcescens* besitzen eine große adhärente Neigung. *Aerobacter aerogenes* eine mittlere, und *Bacillus cereus* sowie *B. subtilis* eine geringe adhärente Neigung (Dykhuizen und Hartl, 1983). Jedoch sollte diese Problematik erst nach einer wesentlich längeren Betriebsdauer ab ca. 100 h auftreten (Dykhuizen und Hartl, 1983).

Die Formation eines Biofilmes wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Einen großen Einfluss besitzt das „*quorum sensing*“ bei welchem durch bestimmte Änderungen in der Populationsdichte die Sezernierung von adhäsiven Polysacchariden angeregt wird (Madigan und Martinko, 2009). Mithilfe dieser Polysaccharide gelingt die Anhaftung selbst an glatte Oberflächen.

Durch die Schüttelkultur wird die Oberfläche an der Gefäßwandung erhöht, welche nur periodisch mit Kulturmedium überspült wird. In dem, dieser Oberfläche anhaftendem Flüssigkeitsfilm, herrscht ein höheres Sauerstoffangebot als im restlichen Kulturmedium und zusätzlich werden regelmäßig Substrate angespült. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Faktoren ebenfalls die Formation von Biofilmen unterstützen könnten (Madigan und Martinko, 2009).

Ein Nebeneffekt der Chemostaten-Kultur ist die Selektion auf Organismen, welche entweder eine erhöhte Teilungsrate, oder die Fähigkeit das Auswaschen zu Vermeiden besitzen. So erwerben Organismen einen Selektionsvorteil durch das Anhaften an die Behälterinnenwand, oder durch Agglomeration und die damit erhöhte Sedimentation der Organismen (Dykhuizen und Hartl, 1983).

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, wurde eine Labor-Chemostaten-Anlage konstruiert mit welcher eine Kokultur bakterieller Testsysteme möglich ist. Mit der Chemostaten-Anlage kann eine kontinuierliche Kultur in bis zu 24 Replikaten im Labormaßstab kultiviert werden. Zeitlich ist der Kultivierung keine Grenze gesetzt. In dieser Arbeit wurden die Segmente, Bauteile und Materialien der betrachteten Chemostaten-Anlage beschrieben und auf den Entwicklungsprozess innerhalb der Praxisphase eingegangen.

Die Markierung der, für die Chemostaten-Kultur vorgesehene *E. coli*-Stämme, konnte für 2 von 3 Fluoreszenzmarkierungen erfolgreich vorgenommen werden. Durch die fehlende dritte Markierung ist die Markierungsstrategie mit ihrem jetzigen Stand für die Kokultur ungeeignet. Da die Fluoreszenzmarkierung nicht Gegenstand der Zielstellung war, wurde keine Wiederholung der Fluoreszenzmarkierung durchgeführt, um den verbleibenden Zeitrahmen der Praxisphase für Versuche zu nutzen.

Mit der konstruierten Anlage konnten mehrere Versuche durchgeführt werden. Hervorzuheben ist hierbei, dass ein kontaminationsfreier Betrieb über 5 Tage nachgewiesen werden konnte, sowie die Durchführung einer *E. coli*-Mono-Kultur, ebenfalls bis zu einer Dauer von 5 Tagen. Die bei der Kultivierung aufgetretenen Probleme sind mikrobiologischer Natur und konnten im gegebenen Zeitrahmen nicht gelöst werden.

Aufgrund der oben genannten Umstände konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Kokultur durchgeführt werden. Für die Handhabung (Bedienung, Reinigung, Sterilisation) der Anlage sowie die Durchführung zukünftiger Chemostaten-Läufe wurden Protokolle in deutscher und englischer Sprache erstellt.

6 Ausblick

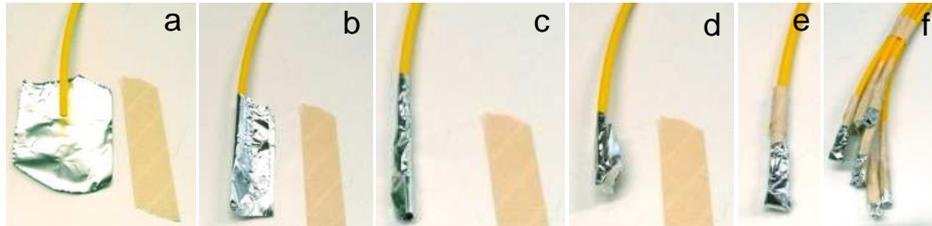
Die Überprüfung verschiedener Materialien bzw. Oberflächenmodifikationen zur Verminderung der Biofilm-Formation konnten aufgrund des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Sollte dieses Problem gelöst werden, könnte die Durchführung einer Kokultur angestrebt werden.

Durch das Phänomen der Biofilm-Formation wurde das Thema eines Experiments vorweggegriffen, welches sich derzeit in der Planung der Forschungsgruppe befindet. In zukünftigen Arbeiten soll die adhärente Kultivierung von mutualistischen Bakterienstämmen untersucht werden. Besonders interessant sind diese Experimente aufgrund der Tatsache, dass bei einer adhärenen Kultivierung die lokale Kooperation der Interaktionspartner von besonderer Bedeutung ist.

7 Anhang

7.1 Protokoll zur Vorbereitung und Montage der Chemostaten-Anlage

Vorbereitung des Leitungssystems / Inkubationsbehälter



- Leitungsende wird mit Aluminiumfolie axial umwickelt (a-c), überstehende Folientasche zur Leitung hin gebogen (d) und mit Autoklavenband fixiert (e).
- Autoklavenband muss am Schlauchmaterial haften um ein abrutschen der Aluminiumhülse zu verhindern.
- Alle einzeln verpackten Leitungsenden werden zu einem Bündel zusammengefasst (f).
- Alle freien Schlauchenden werden zur Autoklavierung auf diese Weise vorbereitet.

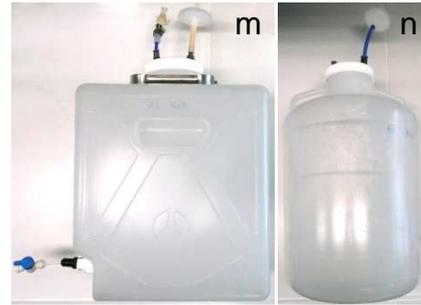
- Segmente für Medien-Zuleitung (g) und Medien-Ableitung (h) werden mit Autoklavenband zu Bündeln verpackt.
- Die Anschlüsse an Medien-Verteiler-Block (g) und Ablauf-Sammler-Block (h) sind ebenfalls mit Aluminiumfolie abzudecken.
- Die Autoklavierung erfolgt bei 121 °C und 1 bar (meist Programm „Festkörper“ bzw. „Instrumente“).



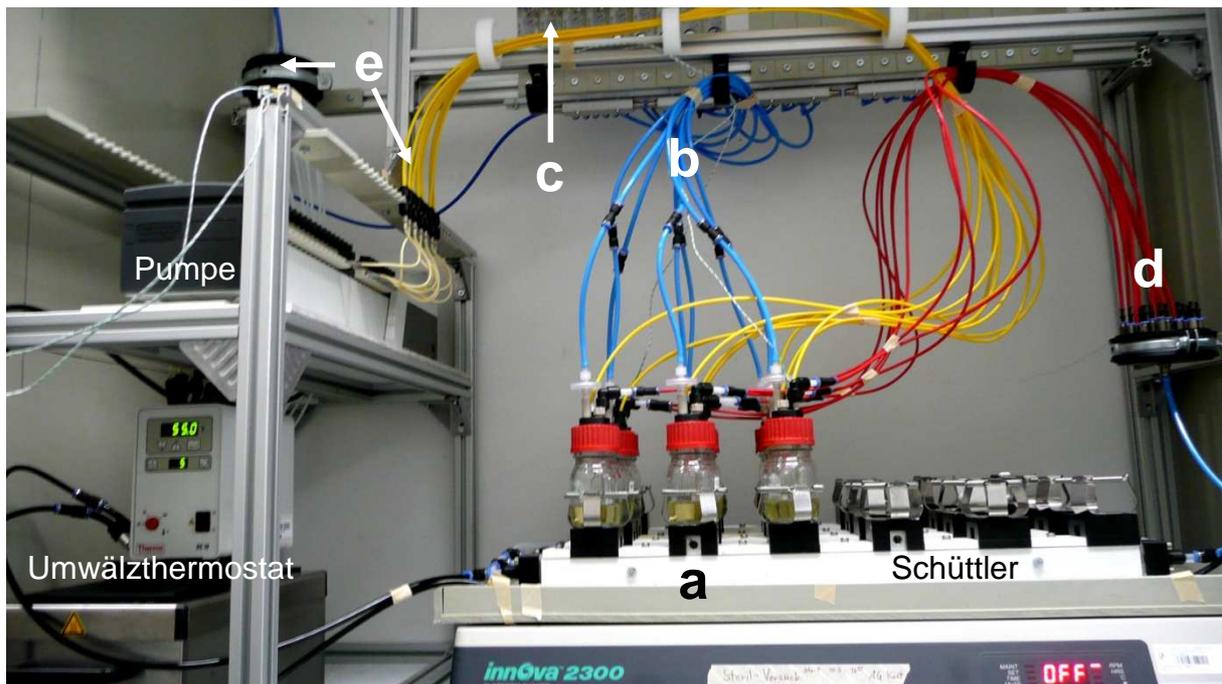
- Die offenen Anschlüsse der Chemostaten-Flasche werden mit Aluminiumfolie abgedeckt (i & j).
- Für die Autoklavierung werden die Aluminiumdeckel durch Autoklavenband gesichert (k).
- **Nach** der Autoklavierung wird der BelüftungsfILTER unter einer Steril-Arbeitsbank angebracht (l).



- Das gesäuberte Medien-Reservoir (m) wird am Auslassventil und an der oberen Einfüllöffnung mit Aluminiumfolie abgedeckt.
- Die Autoklavierung erfolgt mit Belüftungsfilter (Midisart 2000)
- Im Abfallbehälter (n) wird ein Volumen Chorsolin-Stammlösung vorgelegt, welches zusammen mit dem kommenden Medienabfall eine 1 % ige (v/v) Chorsolinlösung ergibt.



Montage



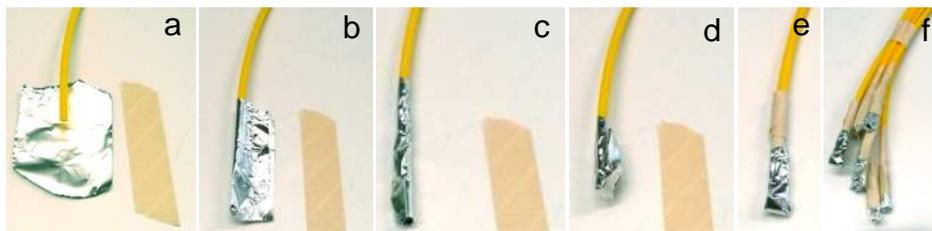
- Platzierung der Chemostaten-Flaschen in den Schüttler-Halterungen (a).
- Anschluss der Druckluftversorgung (b).
- Beaufschlagung der Flaschen mit einem Volumenstrom von 0,2 l/min (c) (Dieser Schritt dient der Kontaminationsprävention. Der Luftstrom durch die Flasche verhindert das Hineinsinken von Keimen während des Anschluss von Zu- und Ablauf).
- Einbau von Ablauf-Sammler in Halterung, Anschluss der Ablauf-Schläuche (d) (Beim Anschluss aller autoklavierten Schläuche sollten zur Kontaminationsprävention mit Alkohol desinfizierte Handschuhe getragen werden).
- Einbau des Zulauf-Verteilers in Halterung, Anschluss Zulaufschläuche (e) (Der Anschluss der Zulaufschläuche ist Aufgrund ihrer Länge und den verschiedenen Materialien schwerfällig. Empfohlen ist daher die Schläuche einzeln einzulegen und mit den Kulturflaschen zu verbinden).
- Anschluss von Medien-Reservoir und Abfallbehälter; Anschluss Temperatur-Sensoren
- Befüllen der Flaschen mit Medium (Pumpe: 90 rpm, Schüttler 130 rpm)
- Überprüfung auf Dichtheit des Systems bzw. korrekten Medien-Abfluss
- Deaktivierung der Pumpe, Abstellen der Druckluftversorgung (Grundzustand vor Beginn der Versuche.)

Demontage

- Deaktivierung der Pumpe, Abstellen der Druckluftversorgung
- Trennen der Flaschen von Medien-Ableitung , Ausbau des Ablaufsammlers
- Trennen der Flaschen von Medien-Zuleitung, Ausbau des Zulaufverteilers
- Entfernen der Chemostat-Flaschen

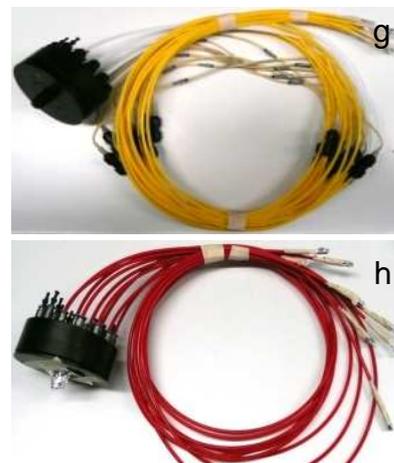
Protocol for preparation and assembly of the chemostat system

Preperation of line system / incubation vessel



- Wrap line ends with aluminum foil (a-c), bend overlaying foil on to the line (d) and secure it with autoclaving tape (e).
- To prevent slipping of the aluminum cover, the autoclaving tape has to be attached to the tubing material.
- Combine all line ends to a bundle (f).
- With this method all open line ends have to be prepared for autoclaving.

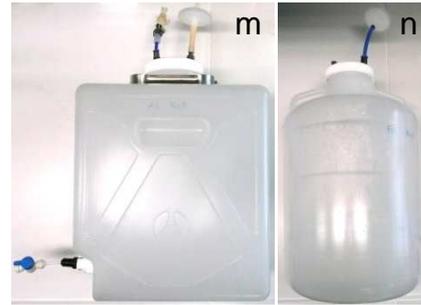
- Combine segments of feed line (g) and waste line (h) to bundles, using autoclaving tape.
- The connectors of the media multiplier (g) and waste collector block (h) need an aluminum cover, too.
- The autoclaving has to be done at 121 °C and 1 bar (e.g. program “Festkörper” or “Instrumente”).



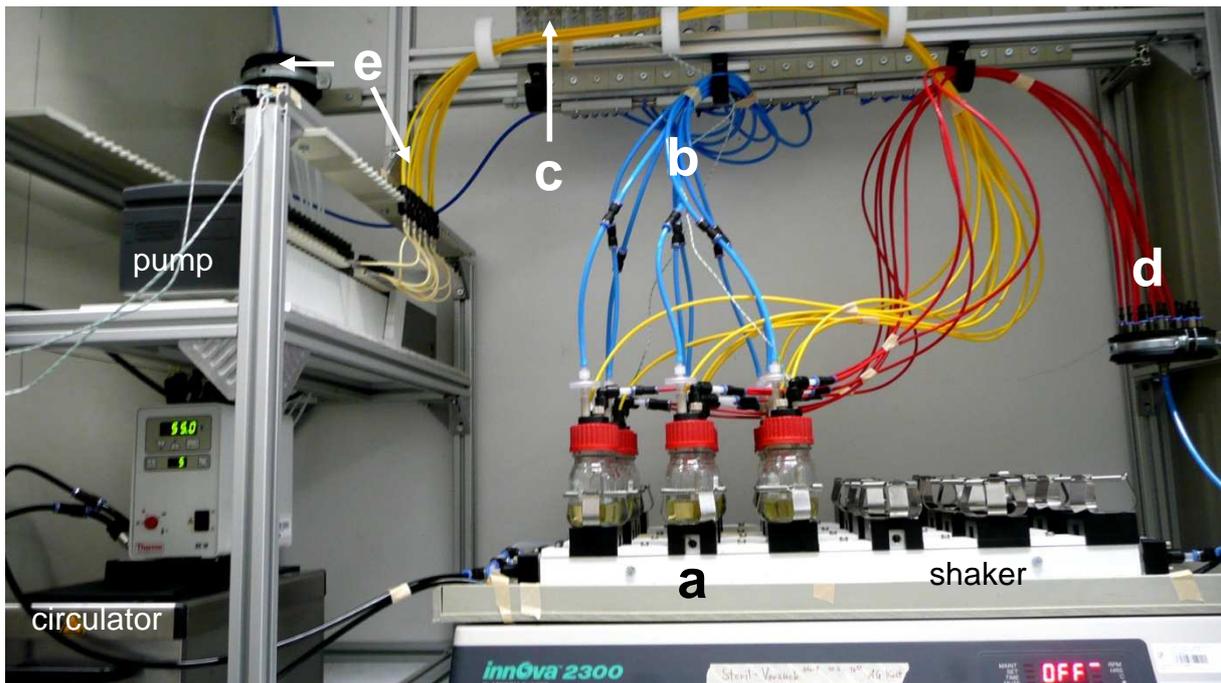
- Cover the connectors from the chemostat bottles with aluminum foil (i & j).
- Secure the covers for autoclaving with autoclaving tape (k).
- Attach venting filter (l) in a clean bench to the chemostat bottle, **after** autoclaving.



- Cover fill port and outlet of the cleaned media reservoir (m) with aluminum foil and autoclaving tape.
- Autoclave with attached venting filter (Midisart 2000).
- Fill waste bottle (n) with an amount of Chrosolin stock solution, which will result in a 1 % (v/v) Chorsolin solution after addition of media waste.



Assembling



- Put the chemostat bottles in the shaker fittings (a).
- Connect the air supply (b) (blue tubing).
- Set aeration up to 0.2 l/min (c) (The airstream avoids the subsidence of microorganisms while connecting of feed and waste lines).
- Place waste collector into fitting (d). Connect waste lines to chemostat bottles (During the connection, disinfected gloves should be worn).
- Place the media multiplier into fitting (e).
- Connect media reservoir, waste bottle and temperature sensors.
- Fill chemostat bottles with medium (pump at 90 rpm, shaker at 130 rpm)
- Check system for tightness.
- Stop pump, shaker and aeration (basic state before experiments).

Disassembling

- Stop pump, shaker and aeration.
- Separat chemostat bottles from waste lines and disassemble waste collector.
- Separat chemostat bottles from feed lines and disassemble feed multiplier.
- Remove chemostat bottles from shaker.

7.2 Protokoll zum Betrieb der Chemostaten-Anlage

Beimpfen / Anzucht-Phase

- Einige Stunden vor Beginn der Arbeiten am Chemostaten wird der Plattform-Schüttler (130 rpm) sowie das Umwälzthermostat aktiviert. Um die Kultivierungstemperatur (30 °C) in den Flaschen zu erreichen, muss, abhängig von Aufstellungsort und Druckluftversorgung, am Umwälzthermostat eine höhere Temperatur eingestellt werden (z.B.: Aufstellungsort: D U1.009, Klimazelle 5; ohne Belüftung: Umwälzthermostat auf 34°C, mit Belüftung 36°C).
- Das Beimpfen erfolgt über eine Kanüle durch das Beprobungsseptum aus einer Vorkultur ($OD_{600} \approx 0,3$). Vor dem Starten der Verdünnung werden die Kulturen bis zum Erreichen der gewünschten Populationsdichte (z.B. $OD_{600} \approx 0,2$) als Übernachtskultur inokuliert. Die Druckluftversorgung ist in dieser Phase deaktiviert, um eine Aufkonzentrierung des Kulturmediums zu verhindern.

Start der Chemostaten-Kultur

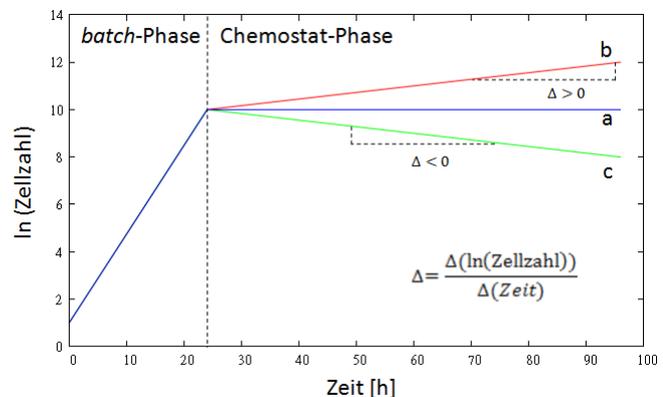
- Nach dem Erreichen der gewünschten Zellpopulation wird die Druckluftversorgung (0,2 l / min) sowie die Verdünnung gestartet. Die Verdünnungsrate (D) wird der Wachstumsrate (μ) gleichgesetzt. Aus der Gleichung $\mu = D = \frac{\dot{V}}{V_L}$ kann nun die Flussrate (\dot{V}) an Medium berechnet werden.
- Die zur Verdünnung erforderliche Pumpendrehzahl wird über die Pumpenkennlinie ermittelt:

$$\dot{V} \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right] = 0,0733 \frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot \text{rpm}} * U [\text{rpm}] - 0,0162 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$$

- \dot{V} - Flussrate [ml/min], U – Drehzahl [rpm].
- Während des Betriebes wird die Populationsentwicklung beobachtet und angepasst.

Anpassung der Verdünnungsrate

- In einem Plot werden die logarithmierten Zellzahlen (bzw. OD-Werte) gegen die Zeit aufgetragen.
- Ist $D = \mu$, so folgt $\Delta = 0$ (a). Ist $D \neq \mu$ wird $\Delta > 0$ (b) oder $\Delta < 0$ (c)
- Ist Δ berechnet, so kann mit dem bekannten D die aktuelle Wachstumsrate μ bestimmt werden ($\mu = \Delta + D$).
- Ist die aktuelle Wachstumsrate bekannt, so kann die Verdünnung (D) angepasst werden (siehe obiger Abschnitt).



Protocol for operating the chemostat system

Inoculation / batch phase

- Activate shaker and circulator a few hours before the experiment starts. To achieve the inoculation temperature (30 °C), the circulator has to be adjusted at a higher temperature. Adjustment depends on the current installation site. (e.g. installation site D U1.009, climate chamber 5: without aeration 34 °C, with aeration 36 °C).
- Inoculation should be done with a preculture ($OD_{600} \approx 0.3$) injecting the inoculum through the septum of the bottle lid using a needle. Before the dilution is started, the cultures have to grow overnight to gain the desired population density (e.g. $OD_{600} \approx 0.2$). During the overnight culture aeration is deactivated.

Starting the chemostat culture

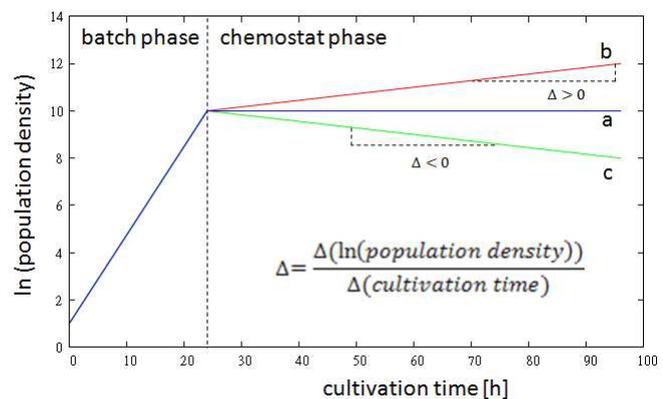
- Activate the aeration (0.2 l/min) after the desired population density has been reached.
- The dilution rate (D) is equated with the growth rate (μ). Calculate the required media flow rate (\dot{V}) using: $\mu = D = \frac{\dot{V}}{V_L}$.
- The corresponding pumping rotation speed (U) can be determined by using the following function:

$$\dot{V} \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right] = 0.0733 \frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot \text{rpm}} * U [\text{rpm}] - 0.0162 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$$

- Check the population density during the chemostat culture and adjust the dilution rate, if necessary.

Adjusting the dilution rate

- Plot logarithm of population density against cultivation time.
- If $D = \mu$, it follows that $\Delta = 0$ (a). If $D \neq \mu$, Δ becomes > 0 (b) or < 0 (c).
- If Δ has been determined, the current growth rate can be calculated using $\mu = \Delta + D$.
- Adjust the dilution for the current growth rate (see previous section).



7.3 Anhänge zu Versuchsdurchführungen

1. Werte zum Versuch „Bestimmung Wachstumsrate *E. coli* EGFP 17“ (3.3):

Tabelle 13: Populationsverlauf in Chemostatenflaschen; Kultivierung in 30 ml MMAB

Zeit [h]	FL1 [10^6 /ml]	FL2 [10^6 /ml]	FL3 [10^6 /ml]	FL4 [10^6 /ml]	FL5 [10^6 /ml]
0,00	4,0	4,0	4,2	4,1	4,2
3,00	7,1	6,8	7,2	7,3	7,4
5,25	15,6	14,3	15,3	16,5	15,1
7,25	29,0	28,7	32,0	34,6	30,8
9,25	56,3	55,7	60,8	69,0	60,8
11,50	140,2	146,0	139,9	150,0	142,1
14,00	281,5	310,3	349,2	291,9	341,4
16,00	649,4	654,7	667,1	658,5	669,8

Tabelle 14: Populationsverlauf in 96-DeepWell-Platte; Kultivierung in 1 ml MMAB

Zeit [h]	DW1 [10^6 /ml]	DW2 [10^6 /ml]	DW3 [10^6 /ml]	DW4 [10^6 /ml]	DW5 [10^6 /ml]
0,00	7,5	4,3	5,4	4,8	4,2
3,00	8,2	9,5	8,7	8,7	8,5
5,25	16,7	13,8	16,4	17,3	16,8
7,25	30,9	23,1	57,1	56,0	54,6
9,25	55,3	42,7	57,1	62,6	57,0
11,50	135,6	114,4	131,9	134,9	142,6
14,00	321,4	173,6	239,7	293,0	320,3
16,00	350,0	753,0	373,9	326,5	966,2

2. Werte zum Versuch „Reinigung und Sterilisation“ (3.4):

Tabelle 15: Ergebnisse 1. Sterillauf; geklammerte Werte: Medienversorgung unterbrochen, Probenahme trotzdem durchgeführt, A1 bis C3 (Replikate)

Zeit [h]	Lebendkeimzahl [KBE/ml]			B1	B2	B3	C1	C2	C3
	A1	A2	A3						
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	0	0	0	(0)	0	0	0
66	0	0	0	0	0	(0)	0	0	0
91	0	0	0	0	0	-	0	0	0
116	0	0	0	0	0	-	0	0	0

Tabelle 16: Ergebnisse zweiter Steril-Lauf, A1 bis C3 (Replikate)

Zeit [h]	Lebendkeimzahl [KBE/ml]								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3. Werte zum Versuch „Kultivierung einer *E.coli*-Monokultur“ (3.5):

Tabelle 17: Ergebnisse erste Chemostaten-Lauf; Proben 1:10000 verdünnt, SYBR Green I gefärbt, Messung im FCM, A1 bis C3 (Replikate)

Zeit [h]	A1 [10 ⁶ /ml]	A2 [10 ⁶ /ml]	A3 [10 ⁶ /ml]	B1 [10 ⁶ /ml]	B2 [10 ⁶ /ml]	B3 [10 ⁶ /ml]	C1 [10 ⁶ /ml]	C2 [10 ⁶ /ml]
0	26,0800	30,6726	25,2824	25,2400	8,0275	24,4850	8,6150	21,8349
1	28,7575	33,8426	27,4649	25,5626	8,9025	22,6749	10,9350	24,5674
4	11,6500	13,1800	13,1800	10,7600	6,1800	10,9100	5,4575	10,3675
5	8,4550	8,7550	7,7800	9,0050	4,1175	7,7850	4,9300	8,7925
8	7,1820	9,1960	7,3470	7,7860	5,0070	7,1880	7,2080	7,1230
20	6,8700	7,9025	5,4725	6,1125	4,8325	5,3200	6,2450	6,2500

Tabelle 18: Ergebnisse zweiter Chemostatenlauf; 100 µl Probe unverdünnt, OD₆₀₀, A1 bis C3 (Replikate)

Zeit [h]	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2
0	0,356	0,290	0,261	0,279	0,276	0,288	0,298	0,299
1	0,367	0,300	0,266	0,289	0,276	0,278	0,260	0,296
4	0,321	0,246	0,185	0,230	0,220	0,225	0,240	0,269
7	0,233	0,199	0,199	0,179	0,172	0,182	0,150	0,198
24	-	0,118	0,078	0,157	0,189	0,137	0,136	0,112
29	-	0,073	0,052	0,194	0,146	0,099	0,096	0,087
34	-	0,056	0,038	0,131	0,088	0,064	0,070	0,049
49	-	0,026	0,025	0,053	0,049	0,039	0,049	0,023
54	-	0,162	0,027	0,127	0,053	0,078	0,140	0,132
76	-	0,023	0,043	0,045	0,065	0,064	0,041	0,014
121	-	0,048	0,050	0,027	0,065	0,067	0,060	0,018

Tabelle 19: Ergebnisse zweiter Chemostatenlauf; Proben 1:10000 verdünnt, SYBR Green I gefärbt, Messung im FCM, A1 bis C3 (Replikate)

Zeit [h]	A1 [10 ⁸ /ml]	A2 [10 ⁸ /ml]	A3 [10 ⁸ /ml]	B1 [10 ⁸ /ml]	B2 [10 ⁸ /ml]	B3 [10 ⁸ /ml]	C1 [10 ⁸ /ml]	C2 [10 ⁸ /ml]
0	11,6105	13,5735	15,1875	11,4240	11,2440	11,2085	12,2905	12,0280
1	13,8955	12,2970	12,9685	12,3205	11,2810	11,9355	15,1030	9,9585
4	9,2710	9,6675	8,5765	9,2310	8,1510	6,7500	8,6925	10,2010
7	6,3270	5,2195	4,6710	5,0125	4,9420	5,7900	1,9090	5,0265
24	-	5,4015	2,7320	9,1230	2,9860	3,9725	1,8680	3,3830
29	-	3,1270	1,3170	6,0260	3,9930	3,8695	0,4185	2,5340
34	-	2,0995	1,3140	3,9645	3,2025	1,6790	1,1065	1,5565
49	-	0,7370	0,6015	1,5426	1,2915	0,7928	1,1687	0,6886
54	-	3,2527	0,7685	2,6187	2,2058	2,2568	5,9785	3,7255
76	-	0,6731	1,2926	1,7019	2,4002	1,6961	1,4751	0,4565
121	-	1,4415	1,6578	0,7403	2,0213	2,0496	1,9752	0,5774

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 20: Übersicht über verwendete Abkürzungen

Symbol	Bedeutung
AS	Aminosäure
<i>attTn7</i>	Insertions-Stelle von Transposon 7
Bp	Basenpaare
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	„deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate (Mischung aus Desoxyadenosintriphosphat „dATP“, Desoxythymidintriphosphat „dTTP“, Desoxyguanosintriphosphat „dGTP“ und Desoxycytidintriphosphat „dCTP“)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>EGFP</i>	„enhanced green fluorescent protein“ (verbessertes grün fluoreszierendes Protein)
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärts-Streulicht)
g	Erdbeschleunigung (Fallbeschleunigung bzw. Ortsvektor); $g=9,81 \text{ m/s}^2$
h	„hour“ (Stunde)
kb	Kilobase, Sequenz von 10^3 Nukleotiden
kDa	Kilodalton
<i>mCherry</i>	monomeres Fluoreszenzprotein (Emissionsmaximum $\lambda = 610 \text{ nm}$)
mCitirine	monomeres Fluoreszenzprotein (Emissionsmaximum $\lambda = 529 \text{ nm}$)
min	Minuten
MMAB	Minimalmedium für <i>Azospirillum brasiliense</i>
OD	optische Dichte (gemessen bei $\lambda = 600 \text{ nm}$)
PCR	„polymerase chain reaktion“ (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RFE	relative Fluoreszenzeinheiten
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärts-Streulicht)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T _M	Temperatur bei welcher mindestens 50% eines DNA Doppelstranges als Einzelstrang vorliegen

Abbildungsverzeichnis

Tabelle 21: Abbildungsverzeichnis

Abbildung Nr.:	Abbildungstext	Seite:
Abbildung 1:	Entwurfsschema des Modellsystems	2
Abbildung 2:	Typische Wachstumskurve einer bakteriellen Population (Madigan und Martinko, 2009).	3
Abbildung 3:	Prinzipskizze Chemostat (Berkholz 2009);	4
Abbildung 4:	pGRG36 mit Tn7-Transposon und MCS (Scholz, 2011)	5
Abbildung 5:	Beispiel Elektrophorese	16
Abbildung 6:	Messprinzip der Durchflusscytometrie	16
Abbildung 7:	Schema der Laserstreuung	17
Abbildung 8:	Strahlengang und Einstellungen des CyFlowSpace CY-S-3001	18
Abbildung 9:	Probe wird in FCM injiziert	18
Abbildung 10:	Histogramme der Signale FSC	19
Abbildung 11:	Einstellungen für Bandpass-Filter FL1(A) und FL3 (B)	19
Abbildung 12:	Schematische Darstellung der Übertragung von Histogrammen in Boxplots	20
Abbildung 13:	Schnellkupplung des "4-22mm Systems",	21
Abbildung 14:	Schema Medienaustausch.	22
Abbildung 15:	A: Schüttler, horizontale Schüttelbewegung formt „kreisende“ Welle; B: Rührer. Rotation des Rührankers produziert „Trichter“.	23
Abbildung 16:	Aufsicht Klimatisierungssystem	24
Abbildung 17:	Sterilisationsvorbereitung des Leitungssystems	25
Abbildung 18:	Fluoreszenzmessung verschiedener <i>E.coli</i> Stämme.	27
Abbildung 19:	Darstellung der Chemostaten-Flasche	29
Abbildung 20:	Pumpenkennlinie zur Umrechnung der Pumpendrehzahl in Förderleistung	30
Abbildung 21:	Schema des Leitungssystems des Chemostaten	31
Abbildung 22:	Temperaturaufzeichnung zweiter Chemostaten-Lauf.	33
Abbildung 23:	Schematische Darstellung der Filtrationsapparatur	34
Abbildung 24:	Vergleich des Populationsverlaufs <i>E. coli</i> EGFP 17 in Chemostaten-Flaschen und Deep-Well-Platte	36
Abbildung 25:	Verlauf der Populationsdichte während des ersten Chemostaten-Laufes	37
Abbildung 26:	Verlauf der Populationsdichte während des zweiten Chemostaten-Laufes	38
Abbildung 27:	Verlauf der Populationsdichte während des zweiten Chemostaten-Laufes	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 22: Tabellenverzeichnis

Tabelle Nr.:	Beschriftung:	Seite:
Tabelle 1:	Segmente des symbiotischen Kontinuums. Betrachtung zwei assoziierter Organismen; „+“ – potentielle Fitness steigt,	1
Tabelle 2:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.	7
Tabelle 3:	Übersicht über verwendete <i>E.coli</i> -Stämme.	7
Tabelle 4:	Übersicht über die in dieser Arbeit generierten <i>E.coli</i> -Stämme.	8
Tabelle 5:	Übersicht verwendeter Primer und deren Eigenschaften; T_M ist die mittlere Schmelztemperatur der Primer.	9
Tabelle 6:	Übersicht verwendeter Enzyme.	9
Tabelle 7:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte	9
Tabelle 8:	Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten besondere Verbrauchsmaterialien.	10
Tabelle 9:	Übersicht über alle verwendeten Puffer, Medien und Chemikalien.	11
Tabelle 10:	Zusammensetzung Kolonie-PCR-Ansatz; Angaben für 1x 20 μ l.	14
Tabelle 11:	Programmierung des Thermocyclers; Schritte 2,3 und 4 wurden zum amplifizieren des gewünschten Fragments 30 x wiederholt.	15
Tabelle 12:	Versuchsbedingungen für Sterilläufe	26
Tabelle 13:	Populationsverlauf in Chemostatenflaschen	52
Tabelle 14:	Populationsverlauf in 96-DeepWell-Platte	52
Tabelle 15:	Ergebnisse 1. Sterillauf	52
Tabelle 16:	Ergebnisse 2. Sterillauf	53
Tabelle 17:	Ergebnisse erster Chemostaten-Lauf	53
Tabelle 18:	Ergebnisse zweiter Chemostaten-Lauf (OD)	53
Tabelle 19:	Ergebnisse zweiter Chemostaten-Lauf (Zellzahl)	54
Tabelle 20:	Übersicht über verwendete Abkürzungen	55
Tabelle 21:	Abbildungsverzeichnis	56
Tabelle 22:	Tabellenverzeichnis	57

Literaturverzeichnis

Atlas, Ronald M. (op. 1997): Handbook of microbiological media. 2. Aufl. Boca Raton, Fla: CRC Press. Online verfügbar unter <http://www.worldcat.org/oclc/476605543>.

Boucher, Douglas H. (1985): The Biology of mutualism. Ecology and evolution. New York: Oxford University Press. Online verfügbar unter <http://www.worldcat.org/oclc/11971241>.

Chmiel, Horst (2006): Bioprozesstechnik. Einführung in die Bioverfahrenstechnik. 2., neu bearb. München: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl. Online verfügbar unter <http://www.worldcat.org/oclc/76782473>.

Dr. Danny Köhler (2010): Partec Flow Cytometry. Münster.

Madigan, Michael T.; Martinko, John M.; Brock, Thomas D. (2009): Brock - Mikrobiologie. 11., aktual. Aufl., [Nachdr.]. München [u.a.]: Pearson Studium. Online verfügbar unter <http://www.worldcat.org/oclc/316287958>.

McKenzie, Gregory J.; Craig, Nancy L. (2006): Fast, easy and efficient: site-specific insertion of transgenes into enterobacterial chromosomes using Tn7 without need for selection of the insertion event. In: *BMC Microbiol* 6, S. 39.

Prof. Dr.-Ing. Ralph Berkholtz (2009): Bioverfahrenstechnik I - Fermentationstechnik. Fachhochschule Jena.

Sambrook, Joseph; Fritsch, E. F.; Maniatis, Tom (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. Online verfügbar unter <http://www.worldcat.org/oclc/636723669>.

Sambrook, Joseph; Russell, David William (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Online verfügbar unter <http://www.worldcat.org/oclc/461928573>.

Sandra Scholz (2011): Establishing of a flexible labeling strategy for soil bacteria with Fluorescent proteins. Diplomarbeit. FSU Jena, Jena. Max-Planck-Institut für chemische Ökologie.

Smith, Robert Leo; Smith, T. M. (2006): Elements of ecology. 6. Aufl. San Francisco, Calif. ; Harlow: Benjamin Cummings. Online verfügbar unter <http://www.worldcat.org/oclc/475609894>.

Veit, Daniel (2011): Inkubationsbehälter (techn. Zeichnung). Max-Planck-Institut für chemische Ökologie. Jena.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Tobias Weise, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

.....
Jena, August 2011

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in der Abteilung für Bioorganische Chemie in der Forschungsgruppe von Dr. Christian Kost angefertigt. Aus diesem Grund möchte ich ihm für die Vergabe dieses spannenden Themas, die umfangreiche Betreuung während meiner Praxis-Phase und der Erstellung dieser Arbeit danken.

Vielen Dank an Prof. Dr. Waldemar Künkel für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit seitens der Fachhochschule Jena.

Bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Bioorganische Chemie sowie Prof. Boland und meinen Laborkollegen Holger Merker, Samay Pande, Sandra Scholz, Anne-Kathrin Dietel und Silvio Waschina für die freundschaftliche Atmosphäre und Hilfe bei allen Problemen.

Ein besonderer Dank geht an Daniel Veit und Frank Müller aus der Werkstatt des Institutes. Ihr Fachwissen, handwerkliche Fähigkeiten und tatkräftige Unterstützung waren mir eine besondere Hilfe, ohne welche ich im gegebenen Zeitraum nicht zu diesem Ergebnis gekommen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt abschließend meinen Eltern, welche mir durch ihre Unterstützung, mental und finanziell, mein Studienziel ermöglicht haben und mir immer zur Seite standen, vielen Dank!