

Die Anreicherung, Kultivierung und Vermehrung toluolabbauender Bakterien

Maturaarbeit (2019) im Fach Biologie an der Kantonsschule Sursee



Autor

Manuel Jenni, 6b
Chäppeliacher 11
6210 Sursee

Betreuer

Thierry Bregnard
Dornirein 1
6047 Kastanienbaum

14. Oktober 2019

Abstract

In dieser Maturaarbeit wurde untersucht, bei welcher Temperatur sich toluolabbauende Bakterien am schnellsten vermehren. Diese Bakterien und ähnliche Bakterienarten sind in der Lage, die Bestandteile von Rohöl abzubauen, was insbesondere bei Ölkatastrophen von Bedeutung ist.

Zuerst wurden toluolabbauende Bakterien aus der Wasserprobe einer Kläranlage angereichert. Diese Bakterien wurden dann auf Mineralsalzagarplatten überimpft und in Exsikkatoren mit einer Toluolatmosphäre inkubiert. Die Analyse der Anreicherungskulturen und Agarplatten bestätigte die Hypothese, dass toluolabbauende Bakterien im Belebungsbecken einer Kläranlage vorkommen und aus einer entsprechenden Probe angereichert und kultiviert werden können. Ebenfalls konnte aufgezeigt werden, dass verschiedene Bakterientypen Toluol abbauen.

In weiteren Versuchen wurden die Bakterien bei vier verschiedenen Temperaturen (4 °C, 23 °C, 35 °C, 40 °C) inkubiert um festzustellen, bei welcher dieser Temperaturen toluolabbauende Bakterien das schnellste Wachstum aufweisen. Das Bakterienwachstum wurde anhand der Trübung der Probe mit einem Photospektrometer gemessen.

Die Messungen zeigten, dass sich die Bakterien bei 35 °C am schnellsten vermehrten. Bei 23 °C vermehrten sich die Bakterien ebenfalls, jedoch nicht so schnell wie bei 35 °C. Bei 4 °C und 40 °C konnte dagegen kein Bakterienwachstum festgestellt werden.

Diese Resultate lassen sich damit erklären, dass Enzyme bei höherer Temperatur aktiver sind. Ihre Aktivität steigt mit der Temperatur. Folglich konnte das Toluol bei 35 °C schneller abgebaut werden als bei tieferen Temperaturen. Wird aber eine zu hohe Temperatur erreicht, beginnen die Enzyme zu denaturieren, was bei den Versuchen dazu führte, dass bei 40 °C kein Wachstum mehr feststellbar war.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ausgangslage: Ölpest im Golf von Mexiko	1
1.2	Zielsetzung und Eingrenzung	1
1.3	Verwendete Methoden.....	2
1.4	Das Stoffgemisch Erdöl	2
1.5	Der Stoff Toluol.....	2
1.6	Der mikrobielle Abbau von Toluol unter aeroben Bedingungen.....	3
2	Material und Methoden	4
2.1	Methode zur Anreicherung toluolabbauender Bakterien	4
2.1.1	Entnahme der Probe	4
2.1.2	Aufbau der Anreicherungskulturen	4
2.1.3	Überimpfung der Anreicherungskulturen und Herstellung des Nährmediums	5
2.1.4	Alternative Methode.....	6
2.2	Methode zur Ermittlung der optimalen Wachstumstemperaturen toluolabbauender Bakterien	7
2.2.1	Messung des Bakterienwachstums	7
2.2.2	Versuchsreihe 1.....	7
2.2.3	Versuchsreihe 2.....	8
2.2.4	Versuchsreihe 3.....	8
2.3	Methode zur Kultivierung toluolabbauender Bakterien auf Agarplatten	9
2.3.1	Herstellung der Nährböden.....	9
2.3.2	Beimpfung der Nährböden.....	9
2.3.3	Inkubation	9
2.3.4	Analyse der Agarplatten	10
3	Resultate	11
3.1	Bakterienwachstum in den Anreicherungskulturen	11
3.1.1	Anreicherungskulturen nach Eberspächer und Müller	11
3.1.2	Alternative Methode.....	12
3.2	Wachstum toluolabbauender Bakterien auf Agarplatten	13
3.3	Optimale Wachstumstemperaturen toluolabbauender Bakterien	14
3.3.1	Versuchsreihe 1.....	15
3.3.2	Versuchsreihe 2.....	15

3.3.3	Versuchsreihe 3.....	16
4	Diskussion.....	17
4.1	Anreicherung toluolabbauender Bakterien.....	17
4.1.1	Anreicherungskulturen nach Eberspächer und Müller	17
4.1.2	Alternativmethode.....	17
4.2	Wachstum toluolabbauender Bakterien auf Agarplatten.....	18
4.3	Optimale Vermehrungstemperaturen toluolabbauender Bakterien	18
4.3.1	Versuchsreihe 1.....	18
4.3.2	Versuchsreihe 2.....	18
4.3.3	Versuchsreihe 3.....	19
4.3.4	Folgeuntersuchungen.....	20
5	Reflexion.....	21
6	Bibliographie	23
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	25
	Danksagung.....	26
	Deklaration.....	27
	Anhang	28

1 Einleitung

1.1 Ausgangslage: Ölpest im Golf von Mexiko

Die Ölbohrplattform Deepwater Horizon erkundete im April 2010 ein Ölfeld vor der Küste Louisianas. Kurz vor Ende einer Bohrung in fünf Kilometer Tiefe erfolgte ein starker Druckanstieg im Bohrloch, woraus eine meterhohe Fontäne aus Erdöl, Erdgas, Schlamm und Wasser austrat. Das Erdgas vermischte sich mit der Umgebungsluft zu einem hochexplosiven Gemisch, welches wenige Sekunden später explodierte und dabei die gesamte Bohrplattform in Brand setzte. In den nachfolgenden zwei Monaten traten bis zum Verschliessen des Bohrlochs nach Schätzungen insgesamt über 700 Mio. Liter Erdöl aus.

Bei den Säuberungsarbeiten wurden verschiedene Methoden eingesetzt; unter anderem wurde das Öl direkt auf der Oberfläche abgebrannt oder mit Chemikalien auf dem Meeresgrund verteilt. Insgesamt wurden bei den Aufräumarbeiten über sieben Mio. Liter Chemikalien ins Meer gegeben [1]. Dies stellt einen erheblichen Eingriff in das lokale Ökosystem dar. Schonender wäre der Abbau des Rohöls durch natürliche Vorgänge, zum Beispiel durch Mikroorganismen.

Diese Arbeit befasst sich mit dem Gedanken, diese natürlichen Vorgänge zum Abbau des Erdöls im Labor künstlich nachzuahmen. Eine Möglichkeit wäre, grosse Mengen Mikroorganismen im Labor zu züchten und danach entweder in flüssiger oder getrockneter Form auf dem kontaminierten Katastrophengebiet auszubringen. Dieser Möglichkeit gehen auch Forscher der Universität Oldenburg nach. Sie erwähnen erstmals die Idee, «[...] gezielt grosse Mengen ölersetzer Organismen einzusetzen» [2]. Um solche Mikroorganismen schnell im Labor kultivieren zu können, muss aber bekannt sein, unter welchen Bedingungen sich diese Bakterien am schnellsten vermehren, da im Katastrophenfall nur wenig Zeit bleibt, bis das Erdöl durch Strömung und Wind über grosse Flächen verteilt wird. Bei der Ölpest im Golf von Mexiko verteilte sich das Öl innerhalb von zwei Wochen auf einer Fläche von fast 10'000 km². Dies entspricht ungefähr einem Viertel der Fläche der Schweiz.

Mit dem Einsatz einer grossen Menge im Labor gezüchteter Bakterien könnte nach einer Ölkatastrophe ein schneller und natürlicher Abbau des ausgetretenen Öls stattfinden. Dies würde die Schädigung der örtlichen Biozönose minimieren, da weniger toxische Chemikalien eingesetzt werden müssten. Wenn die Züchtung und Ausbringung solcher Bakterien gelingen könnte, würde dies einen wichtigen Beitrag zur Schonung der Natur leisten.

1.2 Zielsetzung und Eingrenzung

In dieser Arbeit sollen exemplarisch die optimalen Wachstumsbedingungen toluolabbauender Bakterien dargelegt werden. Untersucht wird die optimale Temperatur zur Vermehrung toluolabbauender Bakterien. Die Experimente sollen Antworten auf folgende Fragen liefern:

- Lassen sich toluolabbauende Mikroorganismen aus dem Belebungsbecken einer Kläranlage anreichern und isolieren?
- Welche Mikroorganismen bauen Toluol ab?
- Bei welcher Temperatur vermehren sich Anreicherungskulturen aus toluolabbauenden Mikroorganismen am schnellsten?

Nicht berücksichtigt wird dagegen die Frage, welche konkreten Bakterienarten Toluol abbauen. Ebenfalls wird auch nicht untersucht, welche anderen Faktoren das Wachstum toluolabbauender Bakterien beeinflussen können. Dazu gehören zum Beispiel die Sauerstoffkonzentration in der Probe sowie die Konzentration hinzugegebener Salze. Diese Fragestellungen würden den Rahmen dieser Maturaarbeit sprengen.

1.3 Verwendete Methoden

Zur Anreicherung und Isolierung toluolabbauender Bakterien wird die Methode aus einem Zeitschriftenartikel von J. Eberspächer und M. Müller [3] verwendet.

Als Grundlage für die Experimente dient zudem die Maturaarbeit von Nadine Sutter von 2007 [4], welche sich auch mit der Anreicherung, Isolierung und Beschreibung toluolabbauender Bakterien befasst.

1.4 Das Stoffgemisch Erdöl

Erdöl, unverarbeitet auch Rohöl, ist ein Stoffgemisch, das durch Umwandlungen organischer Stoffe im Meer über Jahrtausende entstanden ist. Dabei sinken Plankton und andere Meereslebewesen wie Algen auf den Meeresgrund ab und bilden einen Faulschlamm. Wenn das Meer ausreichend tief und ruhig ist, sodass sich die einzelnen Wasserschichten nur kaum mischen, entstehen sauerstoffarme Zonen, in welchen die Verwesung der Biomasse gestoppt ist. Durch die Ablagerung von Sedimentgesteinen auf den Faulschlamm im Laufe von Jahrtausenden steigt der Druck und die Biomasse senkt sich mehr in die Erdkruste ab. Dies hat eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur zur Folge. Mit steigender Temperatur wird zuerst das Wasser aus dem Sediment ausgetrieben und danach spalten sich die in der Biomasse vorhandenen organischen Komponenten in langkettige Kohlenstoffverbindungen. Bei höherer Temperatur spalten sich die langkettigen Verbindungen dann in kurzkettige, bei Raumtemperatur gasförmige Kohlenwasserstoffverbindungen wie Methan oder flüssige wie Pentan und Toluol auf [5].

Erdöl besteht also aus vielen verschiedenen Kohlenwasserstoffen.

1.5 Der Stoff Toluol

Toluol, auch Methylbenzol genannt, ist eine farblose Flüssigkeit mit charakteristischem Geruch. Die Eigenschaften ähneln denen von Benzol. Toluol löst sich schlecht in Wasser (0.52 g/l bei 20 °C [6]). Toluol gehört zur Gruppe der aromatischen Kohlenwasserstoffe und bildet zusammen mit Benzol, Ethylbenzol und den Xylenen die Gruppe der BTEX-Aromaten. Die BTEX-Aromaten dienen als Ausgangsstoffe für viele

alltägliche Produkte; nach der Synthese mit anderen Stoffen können daraus unter anderem Lacke und Lösemittel hergestellt werden. Toluol kommt in geringen Mengen in Erdöl vor und könnte direkt daraus gewonnen werden, was bei den aktuellen Ölpreisen aber noch nicht wirtschaftlich ist [6]. Stattdessen wird es hauptsächlich durch die Weiterverarbeitung von Heptan, ebenfalls einem Bestandteil von Erdöl, hergestellt.

Die verschiedenen Kohlenwasserstoffe im Erdöl werden von verschiedenen Bakterien abgebaut [7]. Folglich gibt es also spezialisierte Bakterien, die Toluol abbauen. Trotzdem sind die toluolabbauenden Bakterien repräsentativ für die Gesamtmenge der Bakterien, welche Erdöl abbauen können, da sich alle Kohlenwasserstoffe untereinander stark ähneln. Toluol wurde für die Versuche gewählt, da auf ein breites Vorwissen der betreuenden Lehrperson aufgebaut werden konnte, weil sich diese in ihrer Dissertationsarbeit bereits mit toluolabbauenden Mikroorganismen befasst hatte.

1.6 Der mikrobielle Abbau von Toluol unter aeroben Bedingungen

Toluol wird von verschiedenen Bakterien und Pilzen in sauerstoffreicher Umgebung abgebaut, vorausgesetzt es liegt nicht in toxischen Konzentrationen vor. Diese Mikroorganismen nutzen das Toluol als Energiequelle. Alle toluolabbauenden Mikroorganismen verwenden dabei Mono- und Dioxygenasen [8]. Diese Enzyme bauen ein oder zwei Sauerstoffatome in das Toluolmolekül in Form einer Hydroxidgruppe ein. Diese Hydroxidgruppe macht das Toluolmolekül polarer, was dazu führt, dass es sich leichter in Wasser löst. Der aromatische Ring wird dadurch leicht angreifbar und kann somit gespalten und weiter abgebaut werden [8].

Der Abbau geschieht hauptsächlich durch Bakterien, welche Toluol unter Verwendung von Sauerstoff über mehrere Schritte verstoffwechseln.

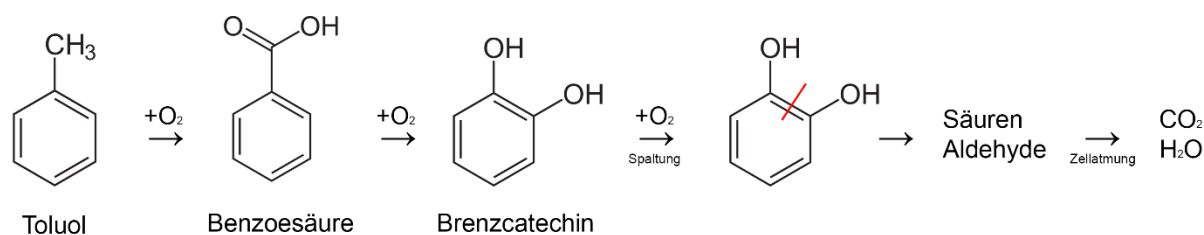


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des aeroben Abbaus von Toluol durch toluolabbauende Mikroorganismen

Im ersten Schritt entsteht Benzoessäure und im zweiten Schritt wird diese weiter zu Brenzcatechin, auch 1,2-Dihydroxybenzol, abgebaut. Zuletzt wird das Brenzcatechin in Säuren und Aldehyde gespalten, welche dann im Stoffwechsel der Mikroorganismen zur Energiegewinnung verwendet werden. Als Endprodukt entstehen bei der Zellatmung CO_2 und H_2O .

Es ergibt sich die folgende Reaktionsgleichung: $\text{C}_7\text{H}_8 + 9 \text{O}_2 \rightarrow 7 \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$

2 Material und Methoden

2.1 Methode zur Anreicherung toluolabbauender Bakterien

2.1.1 Entnahme der Probe

Die Proben wurden nach der Methode von Eberspächer und Müller [3] gewonnen. Dabei wurde mit einer Flasche (500ml) eine Wasserprobe aus dem Belebtecken der ARA *Oberes Wiggertal* in Dagmersellen entnommen. Das Belebtecken stellt die biologische Reinigungsstufe einer Kläranlage dar, bei der viele Mikroorganismen das Abwasser reinigen. Deshalb wurde angenommen, dass sich unter diesen mit grosser Wahrscheinlichkeit auch toluolabbauende Bakterien befinden. Aufgrund der vielen Mikroorganismen und Reststoffen des Abwassers wies die Probe eine starke Trübung auf. Die Reststoffe sedimentierten schon nach kurzer Zeit und bildeten einen Bodensatz, während sich oben relativ klares Wasser befand.

2.1.2 Aufbau der Anreicherungskulturen

Zur Anreicherung toluolabbauender Bakterien wurden drei Ansätze (A1-3) angefertigt. Pro Ansatz wurden ungefähr 125 ml der Probe aus der Kläranlage (*Abb. 2; 5*) in einen Erlenmeyerkolben (250 ml) gegeben. In die Anreicherungskulturen ragte jeweils ein Reagenzglas (1), das an der Öffnung des Erlenmeyerkolbens (2) von Watte festgehalten wurde. In das Reagenzglas wurde vorher auf der Höhe von ungefähr 5 cm ein Loch (3) geschmolzen und es wurde mit 3 ml Toluol (4) gefüllt. Die Watte, welche das Reagenzglas fixierte, verschloss gleichzeitig auch den Erlenmeyerkolben und verhinderte so das Ein- oder Austreten von

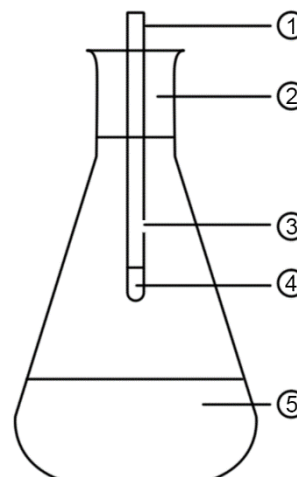


Abb. 2: Anreicherungskulturen mit Toluol

Mikroorganismen und unerwünschten Stoffen wie Staub. Trotzdem konnte noch ein Gasaustausch stattfinden, da für den Abbau von Toluol Sauerstoff benötigt wird (*vgl. Kapitel 1.6*). Weil Toluol einen niedrigen Dampfdruck (29.1 hPa bei 20 °C [6]) aufweist, wird es bereits bei Raumtemperatur gasförmig und diffundiert durch das Loch im Reagenzglas in den Erlenmeyerkolben, wo es sich im Wasser löste. Das gelöste Toluol sollte von toluolabbauenden Bakterien in der Probe als Energiequelle genutzt werden.

Laut Eberspächer und Müller [3] darf Toluol nicht direkt in die Probe pipettiert werden, da es sonst toxisch auf die Mikroorganismen in der Probe wirken und diese abtöten würde. Deshalb könnte dann kein Bakterienwachstum stattfinden.

Die Kontrolle (Abb. 3; 5) enthielt kein Reagenzglas mit Toluol und wurde nur mit Watte (6) verschlossen.

Die Proben wurden zwei Wochen bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach unter dem Mikroskop (Olympus CH20, 400-fache Vergrößerung) untersucht und mit der Kamera eines Mobiltelefons (Xiaomi Mi Mix 3, 12 MP) fotografiert.

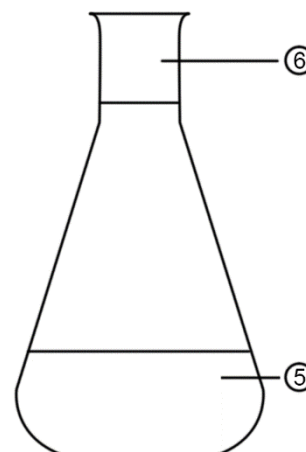


Abb. 3: Kontrolle

2.1.3 Überimpfung der Anreicherungskulturen und Herstellung des Nährmediums

In der Probe der Kläranlage war viel Biomaterial vorhanden, was eine zusätzliche potentielle Kohlenstoffquelle darstellte und damit die Ergebnisse der Versuche verfälscht hätte. Deshalb wurde der klare flüssige Teil der Anreicherungskulturen (A1-3) mit einer Pipette von den Ablagerungen getrennt und daraus wurden drei neue Anreicherungskulturen (A1b-3b) mit 3 ml Toluol hergestellt, welche bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Reststoffe wurden nicht weiterverwendet.

Nach 19 Tagen Inkubationszeit wurden 300 ml Nährmedium (Zusammensetzung: 0.33 g KH_2PO_4 , 0.83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.66 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.33 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.06 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1 Körnchen $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ pro 300 ml deionisiertem Wasser) zur Anreicherungskultur 1 hinzugefügt. Nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine deutliche Trübung beobachtet, was auf ein gutes Bakterienwachstum hindeutete. Auch zu den Anreicherungskulturen 2 und 3 (A2b u. A3b) wurden dann jeweils 300 ml Nährmedium hinzugegeben. Diese Anreicherungskulturen, fortan Stammkulturen 1-3 (S1-3) genannt, dienten als Grundlage für alle weiteren Experimente.

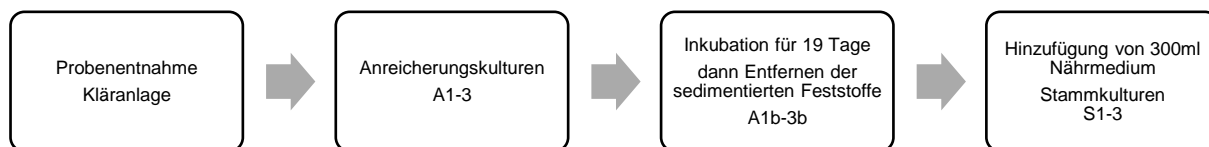


Abb. 4: Schematische Darstellung der Herstellung der Anreicherungskulturen

Die Stammkulturen wurden für fünf Tage stehen gelassen und danach wurde die optische Dichte bei 610 nm mithilfe eines Photospektrometers (Genesys 10UV, Thermo Fisher Scientific) gemessen, um das Bakterienwachstum der einzelnen Anreicherungskulturen zu vergleichen (vgl. Kapitel 2.2.1). Diese Messung ergab, dass die Anreicherungskultur 1 mit einer OD_{610} von 0.412 das grösste Bakterienwachstum aufwies.

Für weitere Experimente wurden zusätzlich 6 Liter Nährmedium hergestellt. Dieses wurde in Glasflaschen (500 ml) gefüllt und bei 7 °C im Kühlschrank gelagert.

2.1.4 Alternative Methode

Zusätzlich wurde noch eine eigene Methode zur Anreicherung toluolabbauender Bakterien entwickelt und getestet. Sie hatte zum Ziel, den Wachstumsvorgang der Bakterien zusätzlich zu beschleunigen.

Zur Vorbereitung des Experiments wurde 16 Stunden vor Beginn die Anreicherungskultur 4 angefertigt. Dabei wurden 100 ml der Stammkultur 3 in 400 ml Nährmedium überimpft. Daraus wurden am nächsten Tag sechs Ansätze nach eigener Methode angefertigt. Bei diesen wurden 40 ml der Anreicherungskultur 4 in jeweils sechs offene Petrischalen gegeben.

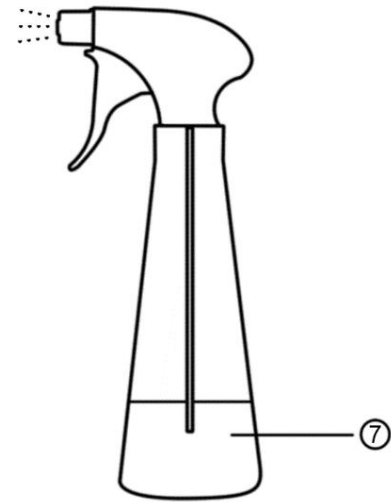


Abb. 5: Sprühdose

Diese sechs Petrischalen wurden in zwei Dreiergruppen (Dreiergruppe A und B) unterteilt und mit einer Sprühflasche (Abb. 5) besprüht, die Toluol (Abb. 5; 7) enthielt. Die Dreiergruppe A wurde stündlich mit 0.6 ml Toluol, die Dreiergruppe B mit 0.3 ml besprüht. Die Dreiergruppen befanden sich in zwei verschiedenen geschlossenen Exsikkatoren. So sollte ein Entweichen des Toluols nach dem Besprühen verhindert werden. Die Deckel der Exsikkatoren wurden zum Besprühen jeweils kurz angehoben.

Zum Vergleich wurden auch drei Ansätze nach der Methode von Eberspächer und Müller angefertigt [3]. Bei diesen wurde jeweils 40 ml der Anreicherungskultur 4 in Erlenmeyerkolben mit Reagenzgläsern mit 1.2 ml Toluol gegeben. Somit waren diese Ansätze insgesamt der gleichen Menge Toluol ausgesetzt wie die Dreiergruppe A.

Stündlich, direkt vor dem Besprühen der sechs Ansätze und für insgesamt zwei Stunden wurde von jedem Ansatz die optische Dichte gemessen (Kapitel 2.2.1).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch das Zerstäuben des Toluols in kleine Tropfen die toxische Wirkung auf Mikroorganismen vermindert wird. Gleichzeitig wurde erwartet, dass das Toluol schneller abgebaut wird, da es nicht wie bei der Methode nach Eberspächer und Müller [3] zuerst gasförmig werden muss. Stattdessen befindet es sich direkt auf der Wasseroberfläche und steht direkt zum Abbau zu Verfügung.

2.2 Methode zur Ermittlung der optimalen Wachstumstemperaturen toluolabbauender Bakterien

2.2.1 Messung des Bakterienwachstums

Das Bakterienwachstum wurde mithilfe eines Photospektrometers (Genesys 10UV, Thermo Fisher Scientific) bei einer optischen Dichte von 610 nm gemessen. Dieser sendet von einer Seite oranges Licht mit einer Wellenlänge von 610 nm (Abb. 6; 9) durch eine Probe (8) und misst, wie viel von diesem Licht auf der anderen Seite ankommt (10). So kann gemessen werden, wie viel Lichtstrahlung von der Probe absorbiert wird. Dieser Wert wird mit der Absorption des Nährmediums verglichen (Nullwert). So erhält man die Absorption, welche durch Mikroorganismen verursacht wird. Durch das Messen der optischen Dichte kann also das Bakterienwachstum quantifiziert werden.

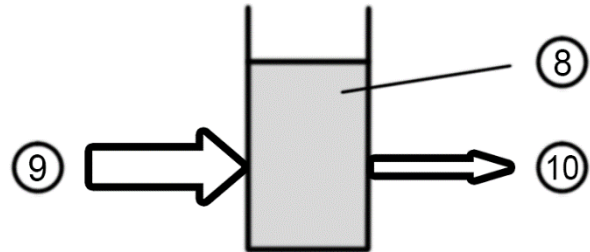


Abb. 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Photospektrometers

Es wurde immer 1 ml der Probe mit einer sterilen Pipette entnommen und in eine Küvette (Präzisions-Küvetten aus Quarzglas SUPRASIL 300 1 ml, Schichtdicke 1 cm, Hellma) gegeben. Die Seiten der Küvetten wurden immer vor dem Messen mit einem Papiertuch gereinigt, um eine Verfälschung der Messungen durch Verschmutzungen des Glases zu vermeiden.

2.2.2 Versuchsreihe 1

Als Inokulat für die Versuchsreihe 1 wurde die gut gewachsene Stammkultur 1 mit einer OD_{610} von 0.412 verwendet. Unter dem Mikroskop wurde ebenfalls festgestellt, dass sich dort viele Bakterien befanden. Daraus wurde die Anreicherungskultur 5 angefertigt. Bei dieser wurde mit einer Pipette 10 ml der Stammkultur 1 in 350 ml Medium überimpft. 16 Stunden später wurden neun weitere Ansätze, fortan Ansätze 1-9 genannt, angefertigt. Dabei wurden jeweils 40 ml der Anreicherungskultur 5 in Erlenmeyerkolben (100 ml) gefüllt. In das Reagenzglas wurde jeweils 1 ml Toluol gegeben.

Das Wachstum der Kulturen wurde bei drei Temperaturen verfolgt: bei 4 °C, 23 °C (Raumtemperatur) und 35 °C. Pro Temperatur wurden jeweils drei Ansätze inkubiert. Die Ansätze 1-3 wurden im Kühlschrank bei 4 °C, die Ansätze 4-6 bei Raumtemperatur (23 °C) gelagert. Die Ansätze 7-9 wurden in einen Wärmeschrank bei 35 °C gestellt.

Die optische Dichte wurde alle zwei Stunden gemessen; insgesamt wurden je sieben Messungen durchgeführt.

2.2.3 Versuchsreihe 2

Am Ende der Versuchsreihe 1 wurde festgestellt, dass für die optische Dichte ein sehr unterschiedlicher Wert gemessen wurde, abhängig davon, auf welcher Höhe im Erlenmeyerkolben die Probe entnommen wurde. Es wurde vermutet, dass diese Schwankungen durch tote Mikroorganismen aus der Stammkultur verursacht wurden. Deshalb wurde die Versuchsreihe 2 angefertigt. Dafür wurde die Anreicherungskultur 7 hergestellt. Bei dieser wurde als Inokulat wiederum die Stammkultur 1 mit einer OD_{610} von 0.745 verwendet. Von der Stammkultur 1 wurde 40 ml in 400 ml Nährmedium überimpft. Zwölf Stunden später wurden daraus wiederum neun Ansätze nach dem gleichen Verfahren wie bei Versuchsreihe 1 hergestellt, inkubiert und gemessen, nur dass vor dem Messen der optische Dichte jede Probe jeweils für fünf Sekunden auf einen Schüttler (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc.) gestellt wurde. So wurden die Bakterien in der Probe gleichmässig verteilt und es konnten konstantere Ergebnisse gemessen werden.

2.2.4 Versuchsreihe 3

Nach der Analyse der Ergebnisse von Versuchsreihe 2 wurde noch eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, bei der überprüft wurde, ob eine höhere Temperatur als 35 °C das Bakterienwachstum noch weiter beschleunigen würde. Als Inokulat für die Versuchsreihe 3 diente diesmal die Stammkultur 3 mit einer OD_{610} von 0.467. Davon wurden 40 ml in 200 ml Nährmedium überimpft. Daraus wurden zwölf Stunden später sechs Ansätze nach dem identischen Aufbau wie bei Versuchsreihe 2 angefertigt. Ansätze 1-3 wurden bei 35 °C, Ansätze 4-6 bei 40 °C inkubiert. Vor dem Messen der optische Dichte wurden die Proben ebenfalls geschüttelt. Die optische Dichte wurde alle zwei Stunden und insgesamt sechs Mal gemessen.

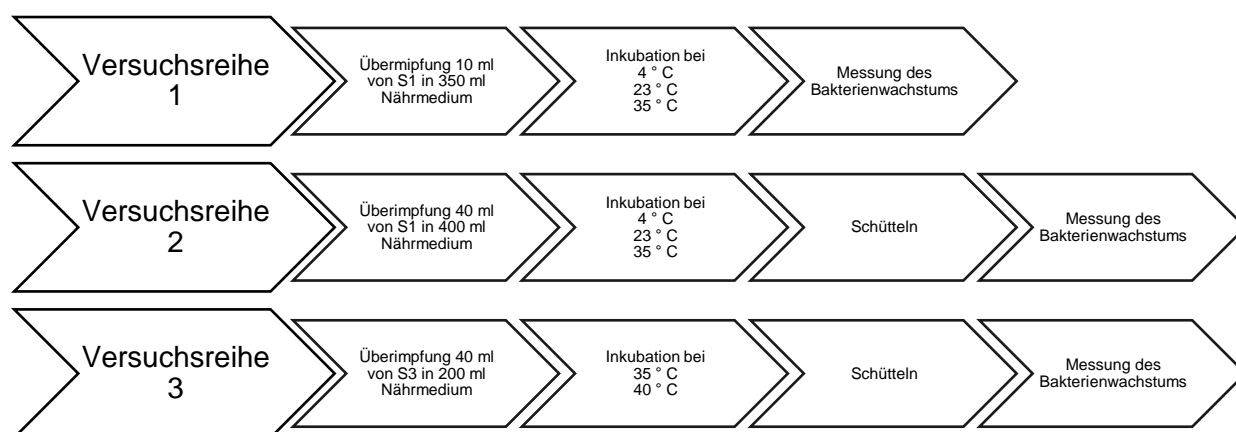


Abb. 7: Schematische Darstellung der Durchführung der Experimente zur Ermittlung der optimalen Wachstumstemperaturen toluolabbauender Bakterien

2.3 Methode zur Kultivierung toluolabbauender Bakterien auf Agarplatten

2.3.1 Herstellung der Nährböden

Zur Beschreibung toluolabbauender Bakterien sollten die Bakterien auf Agarplatten vermehrt werden, um eine detailliertere Analyse der einzelnen Bakterienstämme zu ermöglichen. Dafür wurde ein Nährmedium benötigt, welches keine Kohlenstoffquelle enthielt. Somit stand nur das später hinzugefügte Toluol als Energielieferant zur Verfügung. Das Nährmedium war folgendermassen zusammengesetzt [3]: 0.33 g KH_2PO_4 , 0.83 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.66 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.33 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.06 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1 Körnchen $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 10 g Agar-Agar (Kobe I) pro 300 ml deionisiertem Wasser. Die Zutaten wurden in einem Erlenmeyerkolben (500 ml) gemischt und danach zusammen mit dem Kippautomaten für 30 Minuten in einem Dampfdrucktopf bei 120 °C und ungefähr 1000 hPa sterilisiert. Danach wurde jeweils 20 ml in eine Glaspetrischale gegossen. Es wurden Glaspetrischalen anstatt solche aus Plastik gewählt, da Toluol eine zersetzende Wirkung auf Kunststoffe hat.

Insgesamt wurden 35 Agarplatten hergestellt.

2.3.2 Beimpfung der Nährböden

Zur Beimpfung der Nährböden wurden jeweils 2 ml der Anreicherungskulturen auf eine Agarplatte getropft und mit einem vorher sterilisierten Drigalskispatel gleichmässig verteilt, sodass die ganze Oberfläche der Platte bedeckt war. Pro Anreicherungskultur wurden drei Ansätze angefertigt, was insgesamt neun beimpfte Petrischalen ergab. Jedoch zersprang eine der Petrischalen, sodass von der Anreicherungskultur 2 nur 2 Agarplatten inkubiert wurden. Die restlichen, unbeimpften Agarplatten wurden verschlossen im Kühlschrank bei 8 °C gelagert.

2.3.3 Inkubation

Die Agarplatten (Abb. 8; 13) wurden direkt nach dem Beimpfen offen in verschlossene Exsikkatoren (11) gestellt, welche Glaspetrischalen (14) mit ungefähr 15 ml Toluol (12) enthielten. Das Toluol wurde wie bei den Anreicherungskulturen wegen des niedrigen Dampfdrucks gasförmig und bildete eine Toluolatmosphäre im Exsikkator. So konnten sich nur Bakterien fortpflanzen, welche Toluol abbauen und als Energiequelle nutzen.

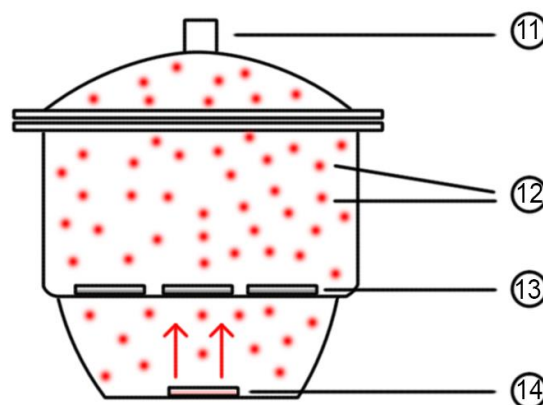


Abb. 8: Exsikkator mit Toluolatmosphäre (schematische Darstellung) und Agarplatten

Die Exsikkatoren wurden zusätzlich mit Parafilm verschlossen, um ein Verrutschen des Deckels zu verhindern. Sie wurden bei Raumtemperatur für 2 Wochen inkubiert. Ausserhalb der Exsikkatoren wurde zusätzlich eine geschlossene, unbeimpfte Agarplatte inkubiert. Dies diente zur Überprüfung der Sterilität der Nährböden.

2.3.4 Analyse der Agarplatten

Die Agarplatten wurden vier Wochen nach dem Beimpfen aus dem Exsikkator entfernt, fotografiert und unter dem Mikroskop untersucht. Zum Mikroskopieren wurde von allen Agarplatten jeweils eine geringe Menge Bakterien von der Oberfläche mit einer Impföse entfernt und auf einen Objektträger gegeben. Darauf wurde ein Tropfen destilliertes Wasser gegeben. Der Objektträger wurde dann für eine kurze Zeit in die Flamme eines Bunsenbrenners gehalten, bis die Probe ausgetrocknet war. Darauf wurde einen Tropfen Glycerin gegeben und die Probe wurde unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung unter einem Immersionsobjektiv untersucht. Die Ergebnisse wurden mit der Kamera festgehalten.

3 Resultate

3.1 Bakterienwachstum in den Anreicherungskulturen

3.1.1 Anreicherungskulturen nach Eberspächer und Müller

Als Indikator für das Bakterienwachstum in den Anreicherungskulturen diente die Messung der Trübung im Vergleich zur Kontrollprobe. Der Nachweis von Bakterien in den Stammkulturen geschah durch eine mikroskopische Analyse der einzelnen Kulturen und der Kontrolle.



Abb. 9: Stammkulturen (1-3) und Kontrolle (4) nach dreiwöchiger Inkubation

Die Abbildung 9 zeigt die Stammkulturen (1-3) und die Kontrolle (4) nach dreiwöchiger Inkubation. Auf der Abbildung weisen die Stammkulturen (Abb. 9; 1-3) eine starke Trübung in einem gelb-weißen Farbton auf. Die Kontrolle ist dagegen sehr klar.

Die Abbildung 10 zeigt eine mikroskopische Aufnahme der Stammkultur 2 nach dreiwöchiger Inkubation. Es liessen sich drei grosse Ansammlungen von Staphylokokken (haufenförmig gelagerte Kugelbakterien) [9] (Abb. 10; 5) erkennen. Weiter waren auch einzelne Kokken sowie Kokken in kleineren Gruppen im Hintergrund sichtbar. Die mikroskopische Analyse der Stammkultur 3 lieferte dieselben Ergebnisse.

Die Abbildung 11 zeigt eine mikroskopische Aufnahme der Stammkultur 1 nach dreiwöchiger Inkubation. Im Unterschied zu den Stammkulturen 2 und 3 waren keine Kokken, sondern Bazillen (Abb. 11; 6) sichtbar. Die Bazillen waren selten alleine, sondern mehrheitlich als Streptobazillen in Ketten

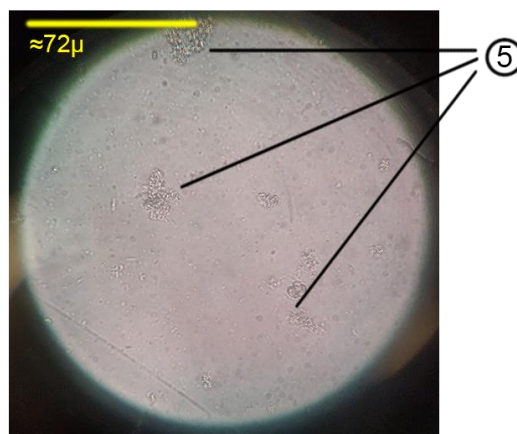


Abb. 10: Stammkultur 2 nach dreiwöchiger Inkubation (400-fach vergrössert)

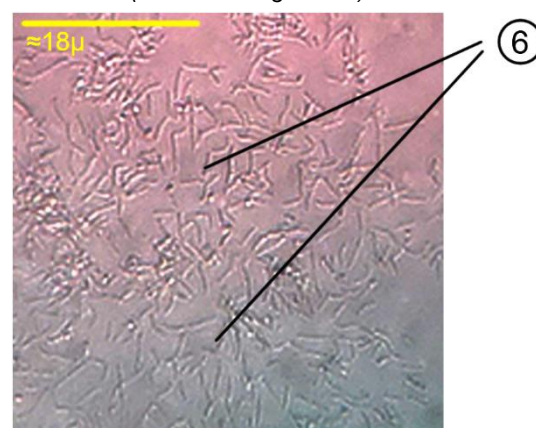


Abb. 11: Stammkultur 1 nach dreiwöchiger Inkubation (400-fach vergrössert)

sichtbar. Die Bakteriendichte war dabei deutlich höher als in den Stammkulturen 2 und 3.

3.1.2 Alternative Methode

Mit der selbst entwickelten Alternativmethode sollte getestet werden, ob die Anreicherung toluolabbauender Bakterien durch eine andere Form der Toluolzugabe beschleunigt werden kann. Es wurden sechs verschiedene Ansätze mittels einer Spraydose mit einer unterschiedlichen Menge Toluol besprüht. Zum Vergleich wurden gleichzeitig auch noch drei Ansätze im Erlenmeyerkolben nach der Methode von Eberspächer und Müller angefertigt.

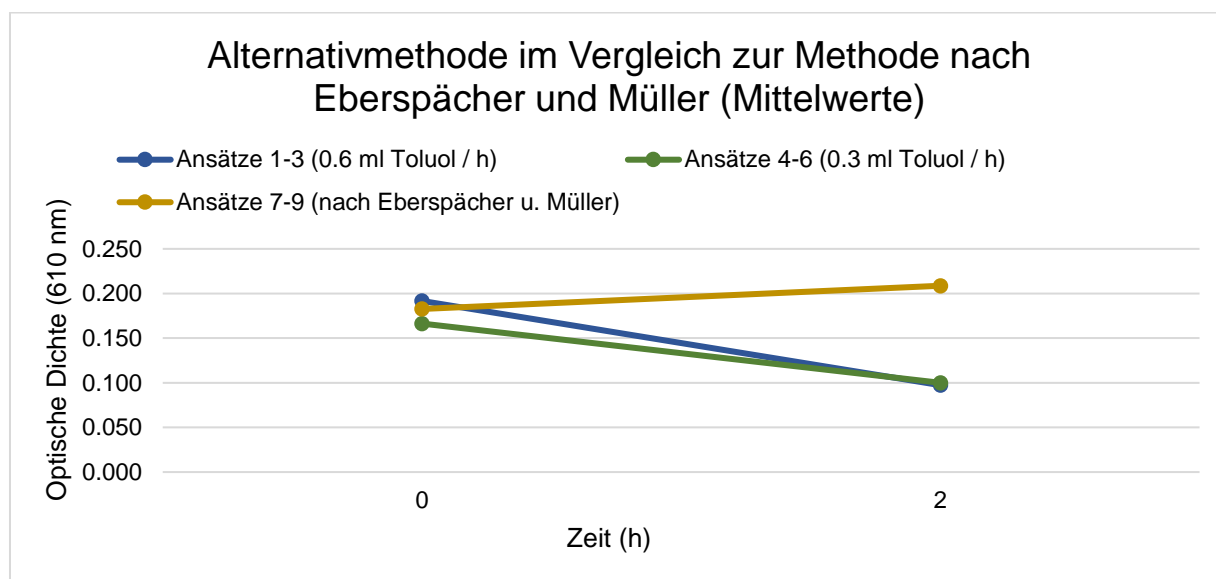


Abb. 12: Alternativmethode im Vergleich zur Methode nach Eberspächer und Müller (Mittelwerte)

Die Abbildung 12 zeigt die durchschnittliche optische Dichte aller gemessenen Ansätze. Es lässt sich erkennen, dass die optischen Dichten der mit Toluol besprühten Ansätze 1-6 innerhalb der ersten zwei Stunden fast um 50 Prozent abnahmen. Bei den Ansätzen 7-9 nach Eberspächer und Müller konnte dagegen ein leichtes Wachstum festgestellt werden.

3.2 Wachstum toluolabbauender Bakterien auf Agarplatten

Die Agarplatten wurden mit den drei Stammkulturen beimpft, für vier Wochen im Exsikkator in einer Toluolatmosphäre inkubiert und danach makro- und mikroskopisch untersucht.

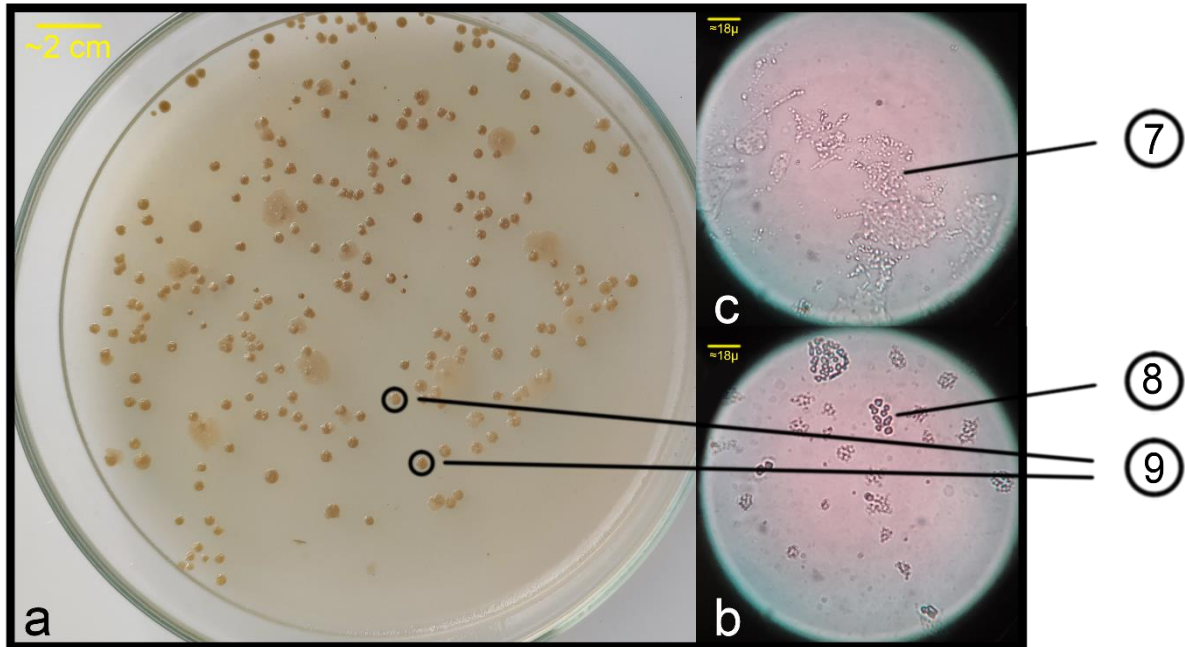


Abb. 13: Agarplatte nach vierwöchiger Inkubation, beimpft mit Stammkultur 2 (a) sowie mikroskopische Aufnahmen dieser Agarplatte (400-fach vergrößert; b und c)

Die Abbildung 13a zeigt eine mit Stammkultur 2 beimpfte Agarplatte. Es bildeten sich einzelne Kolonien (Abb. 13; 9) mit Durchmessern von ungefähr 5 mm bis über 1 cm. Bei den Bakterien handelte es sich zum Grossteil um Staphylokokken [9], welche sich alle sehr stark in Grösse und Form ähnelten. Es konnten Bakteriengruppen von unter zehn (Abb. 13b; 8) bis zu mehreren Dutzend einzelner Bakterien (Abb. 13c; 7) beobachtet werden.

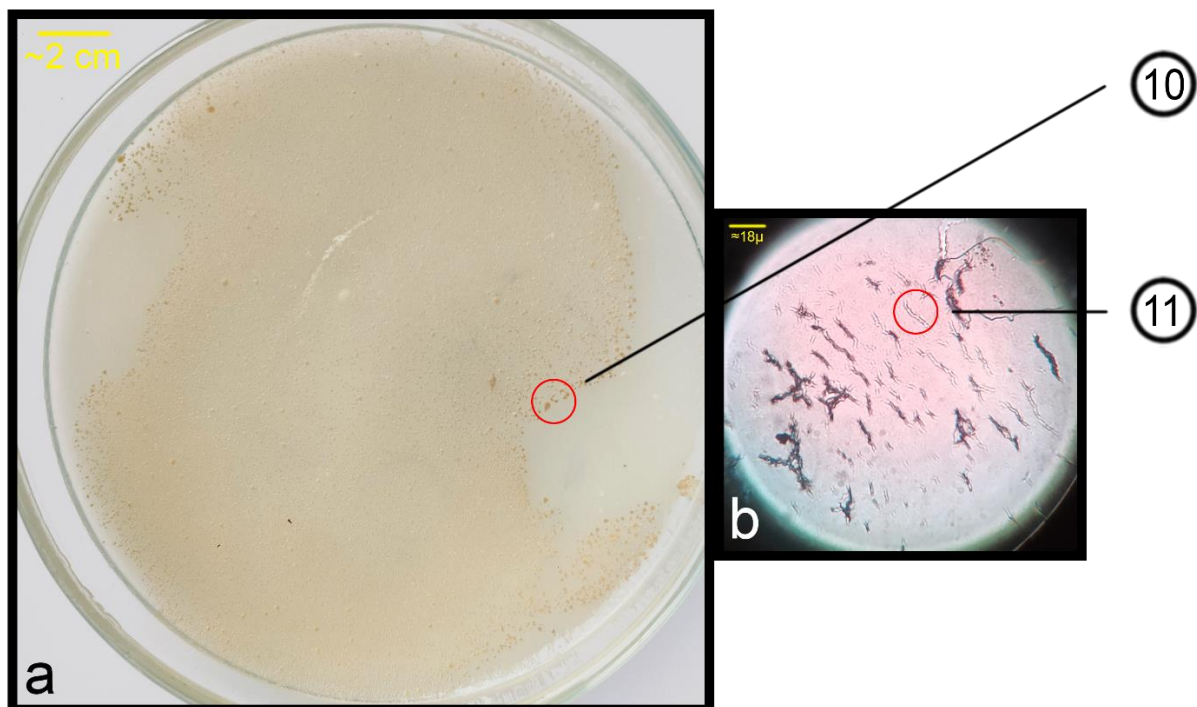


Abb. 14: Agarplatte nach vierwöchiger Inkubation, beimpft mit Stammkultur 1 (a) sowie mikroskopische Aufnahme dieser Agarplatte (400-fach vergrößert; b)

Die Abbildung 14 zeigt eine mit Stammkultur 1 beimpfte Agarplatte. Auf der Agarplatte ist ein Bakterienrasen [10] sichtbar; die einzelnen Kolonien (Abb. 14a; 10) sind nur an den Rändern auseinanderzuhalten. Die Bakterien wurden unter dem Mikroskop als Streptobazillen (kettenbildende Stäbchenbakterien) [11] identifiziert (Abb. 14b; 11). Die Bakterienketten bestanden zumeist aus vier bis acht einzelnen Bakterien.

Die Agarplatten, welche mit der Stammkultur 3 beimpft wurden, waren stark mit Pilzen verunreinigt. Sie konnten deshalb nicht weiter untersucht werden.

3.3 Optimale Wachstumstemperaturen toluolabbauender Bakterien

Die nachfolgenden Diagramme zeigen die Resultate der Experimente zur Ermittlung der optimalen Wachstumstemperaturen toluolabbauender Bakterien. Untersucht wurden die Temperaturen 4 °C, 23 °C und 35 °C (Versuchsreihe 1 und 2) sowie 35 °C und 40 °C (Versuchsreihe 3).

Die x-Achse der Diagramme zeigt jeweils die Zeit in Stunden, in welcher die Ansätze gemessen wurden. Die y-Achse zeigt jeweils die gemessene optische Dichte bei 610 nm.

Zur Bestimmung, ob sich die gemessenen Werte signifikant unterscheiden, wurden bei allen Diagrammen die statistischen Standardfehler eingetragen.

3.3.1 Versuchsreihe 1

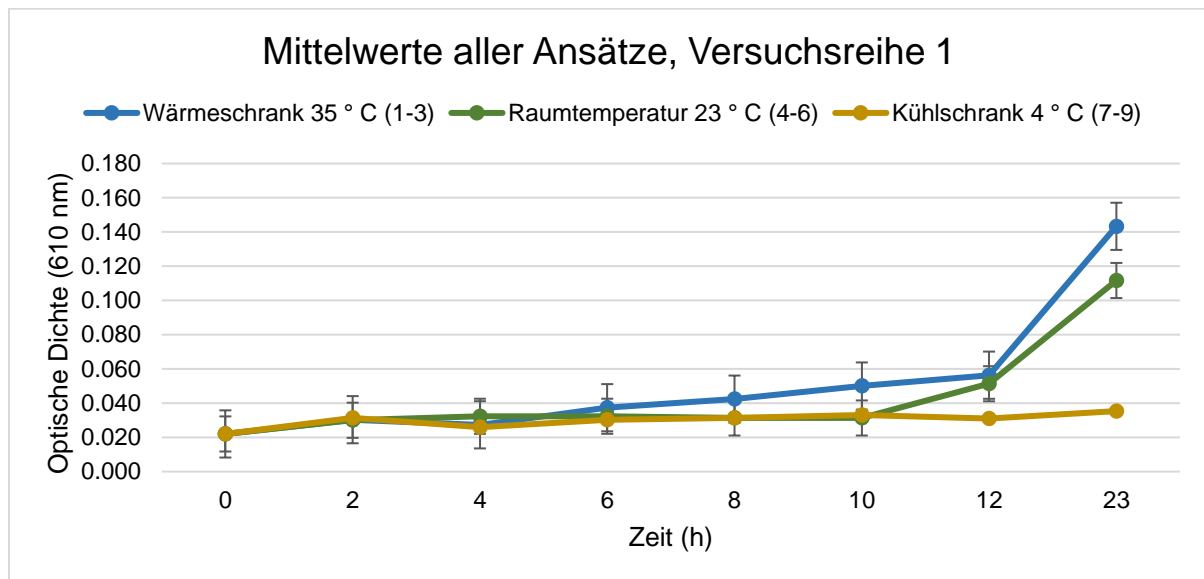


Abb. 15: Durchschnittliche optische Dichten der drei Versuchsgruppen aus Versuchsreihe 1

Die Abbildung 15 zeigt die Mittelwerte der optischen Dichten aller neun Ansätze der drei Versuchsgruppen, welche in Versuchsreihe 1 gemessen wurden. Ein eindeutiges Bakterienwachstum konnte nur bei den Ansätzen, welche im Wärmeschrank inkubiert wurden, beobachtet werden. Die optische Dichte dieser Ansätze nahm ab vier Stunden stetig zu, während sich die der anderen Ansätze relativ linear weiterentwickelte. Nur die optische Dichte der Ansätze, welche bei Raumtemperatur inkubiert wurden, stiegen in den letzten zwei Stunden noch stark an, sodass am Ende der Messungen die Ansätze 1-3 und 4-6 fast dieselbe Dichte aufweisen.

Durch eine weitere Messung, die 23 Stunden nach Versuchsbeginn durchgeführt wurde, vergrößerte sich der Unterschied zwischen den Ansätzen weiter. Die Ansätze aus dem Wärmeschrank wiesen das grösste Wachstum auf, danach folgten die Ansätze, welche bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die optischen Dichten der Ansätze aus dem Kühlschrank wiesen während des ganzen Messzeitraums kein wesentliches Wachstum auf.

3.3.2 Versuchsreihe 2

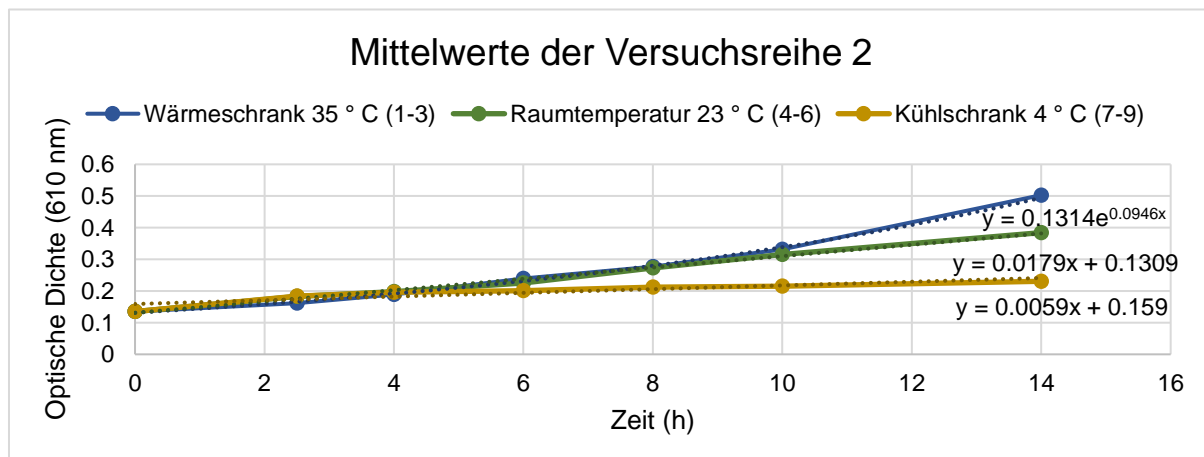


Abb. 16: Durchschnittliche optische Dichten der drei Versuchsgruppen aus Versuchsreihe 2

Die Abbildung 16 zeigt die Mittelwerte der optischen Dichten der neun Ansätze, die in der Versuchsgruppe 2 gemessen wurden. Zum besseren Vergleichen des Wachstums wurde annäherungsweise eine Funktion für die einzelnen Steigungskurven berechnet und eingetragen. Bei den Ansätzen aus dem Wärmeschrank und denjenigen, welche bei Raumtemperatur inkubiert wurden, konnte eindeutig ein Bakterienwachstum festgestellt werden, da sich deren optische Dichte im Laufe des gemessenen Zeitraums fast verdreifachte. Die optischen Dichten der Ansätze aus dem Kühlschrank veränderten sich dagegen fast gar nicht. Anhand der Funktionsgleichungen (Annäherungen) lässt sich erkennen, dass die optischen Dichten der Ansätze aus dem Kühlschrank und denjenigen bei Raumtemperatur eher linear verliefen. Die optischen Dichten der Ansätze aus dem Wärmeschrank verliefen hingegen exponentiell, was die Näherungsgleichung zeigt.

3.3.3 Versuchsreihe 3

In Versuchsreihe 3 wurde nach der Analyse der Resultate der Versuchsreihe 2 mit 40 °C noch eine weitere Temperatur untersucht. So sollte überprüft werden, ob die optimale Wachstumstemperatur toluolabbauender Bakterien noch höher als 35 °C beträgt.

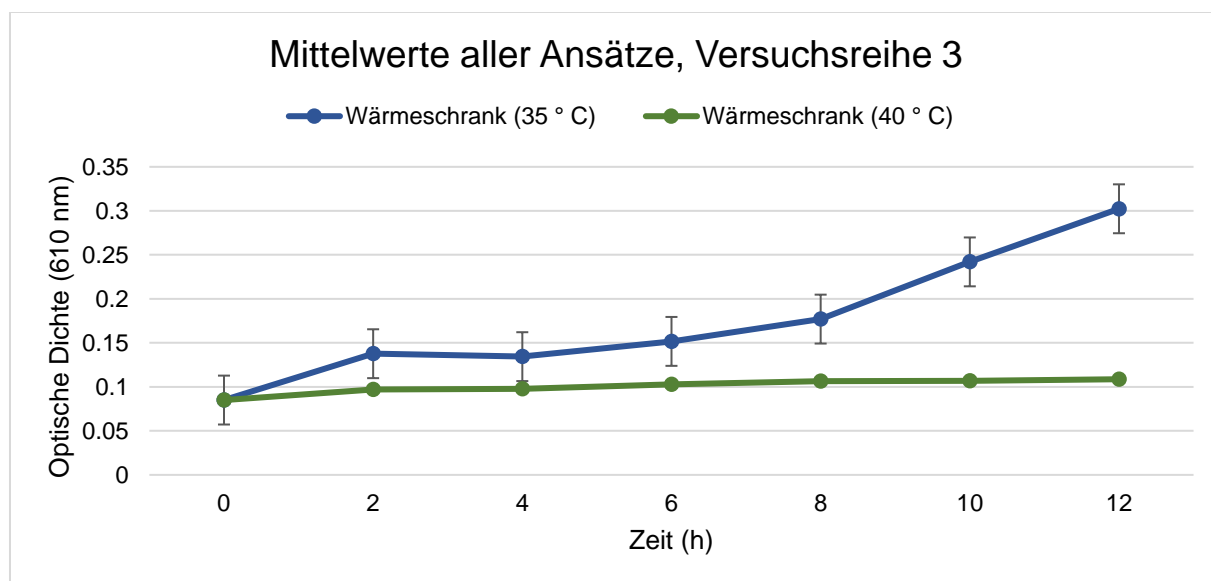


Abb. 17:

Die Abbildung 18 zeigt die Mittelwerte der optischen Dichten der sechs Ansätze der zwei Versuchsgruppen, welche in Versuchsreihe 3 gemessen wurden. Bei den Ansätzen 1-3, welche bei 35 °C inkubiert wurden, ist ein Bakterienwachstum ersichtlich. Die optische Dichte der Ansätze 4-6, welche bei 40 °C inkubiert wurden, änderte sich jedoch kaum. Deshalb kann ein Bakterienwachstum in diesen Ansätzen ausgeschlossen werden.

4 Diskussion

4.1 Anreicherung toluolabbauender Bakterien

4.1.1 Anreicherungskulturen nach Eberspächer und Müller

Die starke Trübung der Stammkulturen in der Abbildung 9 im Vergleich zur Kontrolle deutet auf ein gutes Bakterienwachstum hin. Die Hypothese, dass Bakterien in den Stammkulturen gewachsen sind, bestätigt sich durch die Analyse unter dem Mikroskop. Es lassen sich eindeutig Kokken und Bazillen erkennen (*Abb. 10 u. Abb. 11*). Da sich die Bakterien in Form und Grösse unterscheiden, kann man schlussfolgern, dass mehrere Bakterienarten Toluol abbauen.

Bei diesen Bakterien muss es sich zwingend um toluolabbauende Bakterien handeln. Die einzige verfügbare Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen in den Anreicherungskulturen war Toluol (ausser einer geringen Menge biologischer Reststoffe aus der Wasserprobe aus der Kläranlage), folglich müssen also alle Bakterien, welche sich in den Anreicherungskulturen vermehrt haben, Toluol abbauen können. Bakterien, die dazu nicht in der Lage sind, sterben ab und können sich nicht vermehren.

Dass aus der Wasserprobe aus einer Kläranlage toluolabbauende Bakterien angereichert werden konnten, lässt darauf schliessen, dass das Belebungsbecken dieser Anlage regelmässig mit Toluol kontaminiert wird. Folglich müssen sich dort Bakterien befinden, welche die notwendigen Enzyme zum Abbau von Toluol schon besitzen. Diese Bakterien konnten dann in der Anreicherungskultur das Toluol abbauen und als Energiequelle nutzen. Zusammen mit den hinzugefügten Nährstoffen, die im Nährmedium enthalten waren, ermöglichte dies den Bakterien die Vermehrung, die schliesslich die Trübung in den Stammkulturen verursachte.

In der Kontrolle war kein Toluol vorhanden, folglich existierte in dieser keine Energiequelle, die von Bakterien genutzt werden könnte. Deshalb starben alle Bakterien in der Kontrolle ab und es konnte kein Wachstum stattfinden.

So lässt sich die Frage, ob sich toluolabbauende Mikroorganismen aus der Probe der biologischen Stufe einer Kläranlage anreichern lassen, mit «ja» beantworten.

4.1.2 Alternativmethode

Die Resultate der Alternativmethode lassen darauf schliessen, dass die versprühte Menge Toluol lethal für die Bakterien war. Ein Sinken der optischen Dichte lässt sich nur durch ein Absterben der Bakterien erklären. Da die optische Dichte beider Ansätze ungefähr gleich viel abnahm, obwohl die Ansätze 4-6 stündlich mit einer doppelt so grossen Menge Toluol besprüht wurden, kann daraus gefolgert werden, dass schon eine Menge von 0.3 ml Toluol toxisch auf 40 ml Bakterien mit einer Oberfläche von 12.6 dm² wirken. Die als Kontrolle angefertigten Ansätze nach Eberspächer und Müller wiesen dagegen ein konstantes Wachstum auf.

4.2 Wachstum toluolabbauender Bakterien auf Agarplatten

Auf sechs der neun inkubierten Agarplatten konnten zwei verschiedene Bakterientypen, nämlich Staphylokokken (*Abb. 10*) und Streptobazillen (*Abb. 11*) identifiziert werden. Es handelt sich somit um die gleichen Typen, die auch schon in den Anreicherungskulturen bestimmt wurden. Auf den mit Stammkultur 2 beimpften Agarplatten wuchs somit ein anderer Bakterientyp als auf den Platten, die mit Stammkultur 3 beimpft wurden. Dies unterstützt die Hypothese, dass Toluol von verschiedenen Bakterien abgebaut wird.

Auf den Agarplatten, welche mit der Stammkultur 1 beimpft wurden, bildete sich jeweils ein Bakterienrasen [10]. In einem solchen ist die Bakteriendichte so hoch, dass keine einzelne Kulturen identifizierbar sind. Die einzelnen Bakterien beginnen sich zu teilen, sie treffen jedoch schon bald auf andere Bakterien, welche dies ebenfalls tun. So verbinden sich die einzelnen Kolonien und es entsteht eine grosse Fläche Bakterien.

4.3 Optimale Vermehrungstemperaturen toluolabbauender Bakterien

4.3.1 Versuchsreihe 1

Die Ergebnisse der Versuchsreihe 1 werden als nicht relevant interpretiert, da nicht bei allen Ansätzen ein eindeutiges Bakterienwachstum festgestellt werden konnte. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bereits zu früh mit den Experimenten begonnen wurde. Die Bakterien befanden sich vermutlich noch in der sog. Anlaufphase. In dieser analysieren die Bakterien ihre Umgebung auf Nährstoffe, bevor sie mit der Teilung beginnen. Danach stellen die Bakterien die erforderlichen Enzyme her, um diese Nährstoffe abzubauen [12]. Es ist auch möglich, dass am Anfang der Messungen zu wenige Bakterien in den Ansätzen vorhanden waren, als dass sich ein eindeutiges exponentielles Wachstum abzeichnen konnte.

4.3.2 Versuchsreihe 2

Anhand der Abbildung 16 lässt sich erkennen, dass die Bakterien im Wärmeschrank das grösste Wachstum aufwiesen. Danach folgten die Ansätze, die bei Raumtemperatur inkubiert wurden und zuletzt diejenigen aus dem Kühlschrank. Diese Resultate ergeben sich wahrscheinlich aus dem Lebensraum, aus dem die Bakterien entnommen wurden. Die Durchschnittstemperatur von Abwasser schwankt je nach Jahreszeit zwischen 10 und 20 °C [13]. Diese Bakterien haben also keinen Anlass dazu, ein Hitzeresistenzgen zu entwickeln, um auch noch bei Temperaturen von über 40 °C Toluol abbauen zu können. Man kann also davon ausgehen, dass die höchste biologische Aktivität dieser Bakterien bei Temperaturen unter 40 °C stattfindet. Diese Bakterien können folglich als mesophil klassifiziert werden. Mesophile Bakterien vermehren sich bei einer Temperatur von 20 °C bis 40 °C am schnellsten [14].

Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Temperatur beeinflusst, wie schnell das Toluol in den Anreicherungskulturen gasförmig wird und so zum Abbau für Bakterien bereitsteht. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit steigender Temperatur zu, da die einzelnen Teilchen dann energiereicher sind und häufiger

zusammenstossen. Als Faustregel kann man davon ausgehen, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Anstieg von 10 °C verdoppelt [15]. Das Toluol wurde folglich im Wärmeschrank ungefähr doppelt so schnell gasförmig wie bei Raumtemperatur und viermal so schnell wie im Kühlschrank.

Betrachtet man aber auf Abbildung 16 die Veränderung der optischen Dichte der einzelnen Ansätze von zehn zu vierzehn Stunden, wird ersichtlich, dass die Ansätze im Wärmeschrank durchschnittlich eine 2.5 Mal höhere optische Dichte aufwiesen als die der Ansätze bei Raumtemperatur. Würde das Wachstum allein durch das schnellere Verdampfen des Toluols beschleunigt, sollten die Ansätze aus dem Wärmeschrank nur eine doppelte Veränderung der optischen Dichte aufweisen. Folglich kann man daraus schliessen, dass sich die Bakterien auch in einem anderen Versuchsaufbau bei 35 °C schneller vermehren würden als bei Raumtemperatur und die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit nicht nur durch das unterschiedlich schnelle Verdampfen des Toluols verursacht wurde. Diese Hypothese wird auch durch die Messergebnisse der Ansätze aus dem Kühlschrank unterstützt. Wenn man diese mit den Messungen der Ansätze aus dem Wärmeschrank vergleicht, wird deutlich, dass die Ansätze bei 35 °C im letzten Messzeitraum etwa eine zehnfache Vergrößerung der optischen Dichte aufwiesen. Im zweitletzten Messzeitraum von acht bis zehn Stunden war die Veränderung der optischen Dichte sogar etwa 18 Mal so hoch wie im Kühlschrank (*siehe Tabelle 1*).

Tabelle 1: Durchschnittliche Veränderung der optischen Dichten der Ansätze zwischen den einzelnen Messpunkten

Zeit (h)	Optische Dichte Wärmeschrank (1-3)	Optische Dichte Kühlschrank (7-9)	Verhältnis
2.5	0.027	0.049	0.544
4	0.027	0.012	2.250
6	0.051	0.005	10.408
8	0.037	0.011	3.333
10	0.054	0.003	18.111
14	0.172	0.016	10.957

Würde nur die Teilchenbeschleunigung das Wachstum beeinflussen, sollte das Wachstum in den Ansätzen aus dem Wärmeschrank nur ungefähr viermal höher sein als bei den Ansätzen aus dem Kühlschrank.

4.3.3 Versuchsreihe 3

Die Ansätze der Versuchsreihe 3, welche bei 40 °C inkubiert wurden, wiesen kein Wachstum auf. Die Ansätze, welche bei 35 °C inkubiert wurden, wiesen ein ähnliches Wachstum auf wie auch schon bei der Versuchsreihe 1 und 2. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Bakterien durch die Hitze wahrscheinlich inaktiviert wurden. Eine Temperatur von 40 °C führt also nicht zu einer Beschleunigung des Wachstums im Vergleich zu 35 °C, stattdessen verhindert sie sogar eine Bakterienvermehrung.

4.3.4 Folgeuntersuchungen

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Temperaturen untersucht (4° C, 23° C, 35° C und 40 °C). Zur genaueren Bestimmung der optimalen Wachstumstemperaturen toluolabbauender Bakterien könnten noch weitere Temperaturen in kleineren Abständen gemessen werden. Diese Messungen sollten über einen längeren Zeitraum (mindestens 24 Stunden) durchgeführt werden, um die ideale Wachstumstemperatur noch genauer einzugrenzen.

Weiter gelten diese gemessenen optimalen Wachstumstemperaturen nur für toluolabbauende Bakterien aus der Kläranlage. Wie in Abschnitt 4.1.1 dargelegt, wird Toluol von verschiedenen Bakterien abgebaut. Es ist also gut möglich, dass in einem anderen Lebensraum andersartige toluolabbauende Bakterien vorkommen, die entsprechend auch andere optimale Wachstumstemperaturen haben können. So werden zum Beispiel Bakterien, welche Toluol nach einer Ölkatastrophe im Meer abbauen, ihren Stoffwechsel auf andere Umgebungstemperaturen ausgerichtet haben.

Ausserdem gibt es noch weitere Faktoren, welche die Vermehrung von Bakterien beeinflussen. Spannend wäre, die Vermehrung toluolabbauender Bakterien unter Zugabe von Sauerstoff zu beobachten, da Sauerstoff essentiell für den aeroben Abbau von Toluol ist. Weiter könnte die Zusammensetzung des dazugegebenen Nährmediums variiert werden, da die darin enthaltenen Salze den Stoffwechsel der Bakterien beeinflussen.

5 Reflexion

Mir war schon früh klar, dass ich eine Maturaarbeit im Fach Biologie mit praktischem Teil verfassen möchte. Es reizte mich, Erfahrungen in einem Labor zu sammeln, Versuche selbstständig durchzuführen und eigene Hypothesen zu überprüfen. Dafür nahm ich gerne das Risiko in Kauf, dass nicht alle Experimente auf Anhieb gelingen könnten wie geplant und manche Methoden nach Fehlschlägen angepasst werden müssten.

Erfreulicherweise ist die Maturaarbeit mehrheitlich erfolgreich verlaufen. Die meisten Versuche konnten wie gewünscht durchgeführt werden und fast alle angewandten Methoden erwiesen sich als geeignet zur Beantwortung der definierten Fragestellungen. Zum Beispiel war die Anreicherung toluolabbauender Bakterien aus der Probe aus der Kläranlage relativ einfach umzusetzen und das Wachstum dieser Bakterien konnte schon nach kurzer Inkubationszeit festgestellt werden. Vor Beginn der Versuche war noch nicht klar, ob sich überhaupt toluolabbauende Bakterien im Klärwasser befinden. Ebenfalls war nicht klar, ob sich die Bakterien auf dem verwendeten Nährboden vermehren würden, dies hat jedoch auch ohne Probleme geklappt.

Bei manchen Versuchen traten aber auch Schwierigkeiten auf. Deren Lösung erforderte oftmals viel Zeit, da ich den grössten Teil der Versuche alleine während der Sommerferien durchführte. Zum Beispiel gestaltete sich die Herstellung des Nährmediums als schwierig, da dieses beim Sterilisieren mehrmals überkocht und neu angefertigt werden musste. Auch die Untersuchung der bewachsenen Agarplatten war schwierig, da ich vorher noch nie Bakterien unter einem Immersionsobjektiv mikroskopiert hatte. Eine weitere Herausforderung war, abzuschätzen, wann ich mit den Hauptversuchen zur Ermittlung der optimalen Wachstumstemperaturen toluolabbauender Bakterien beginnen sollte. Der Zeitpunkt, in welchem die Bakterien gerade von der Anlaufphase in die exponentielle Phase wechselten, war schwer zu erkennen. Ich begann mit den meisten Messungen ein bisschen zu früh, sodass am Anfang nur ein schwaches Bakterienwachstum messbar war. Eine exponentielle Vermehrung war meist erst am Ende des Versuchszeitraums ersichtlich. Die Versuche mussten nach 16 Stunden abgebrochen werden, da es mir nicht möglich war, die ganze Nacht hindurch im Labor zu bleiben, um weitere Messungen durchzuführen. Ich nehme an, dass bei der Durchführung von weiteren Messungen noch ein deutlicherer Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsansätzen sichtbar geworden wäre. In weiteren Versuchen müsste man also über einen längeren Versuchszeitraum Messungen durchführen, um eindeutiger Ergebnisse zu erhalten. Ebenfalls könnten noch andere Konzepte zur Anreicherung toluolabbauender Bakterien getestet werden, wie zum Beispiel eine verbesserte Variante meiner eigenen Methode mit der Spraydose.

Der Arbeitsprozess im Labor war für mich sehr lehrreich. Für die Experimente war sehr genaues Planen und Ausführen der einzelnen Arbeitsschritte erforderlich. Gleichzeitig benötige es grosse Geduld und viel Disziplin, das Wachstum der Kulturen abzuwarten

und bis spät in die Nacht im Labor Messungen durchzuführen. Ich musste in den Sommerferien sehr selbstständig arbeiten, was eine Herausforderung darstellte, mir aber auch Spass machte. Für mich hat es sich bewährt, eine praktische Arbeit zu verfassen, da mich die spannenden Versuche immer wieder motiviert haben.

6 Bibliographie

- [1] Kempkens, W. 2013. Bakterien als kleine Helfer bei Ölkatastrophen im Meer. Abgerufen am 14.08.2019 unter <https://www.ingenieur.de/technik/forschung/bakterien-kleine-helfer-oelkatastrophen-im-meer/>
- [2] Dahm-Brey, C. 2018. Neues Bakterium aus Öl des Deepwater-Horizon-Unfalls beschrieben. Abgerufen am 19.07.2019 unter <https://www.innovations-report.de/html/berichte/biowissenschaften-chemie/neues-bakterium-aus-oel-des-deepwater-horizon-unfalls-beschrieben.html>
- [3] Müller, M., Eberspächer, J. Nachweis und Isolierung Toluol-abbauender Mikroorganismen aus Gewässerproben. PdN-Ch. 4/47, 10-13, 1998.
- [4] Sutter, N. 2007. Untersuchungen zur Schadstoffbelastung an ausgewählten Standorten anhand von toluolabbauenden Bakterien. Maturaarbeit, Kantonsschule Sursee
- [5] Berkowitz, N. Fossil Hydrocarbons: Chemistry and Technology. Academic Press, San Diego 1997.
- [6] Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Toluol. Abgerufen am 29.07.2019 unter <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Toluol&oldid=188762746> (Bearbeitungsstand: 20.05.2019)
- [7] Widdel, F. 2010. Abbau von Erdöl durch Bakterien – Grundlegende Gesichtspunkte aus mikrobiologischer Sicht. Abgerufen am 15.07.2019 unter <https://www.mpi-bremen.de/Abbau-von-Erdoel-durch-Bakterien-Grundlegende-Gesichtspunkte-aus-mikrobiologischer-Sicht.html>
- [8] Feil, C. 2006. Biochemie des anaeroben Toluol-Stoffwechsels von *Thauera aromatica*. Unv. Diss., Technische Universität Darmstadt
- [9] Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Kokken. Abgerufen am 16.07.2019 unter <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Kokken&oldid=189436872> (Bearbeitungsstand: 10.06.2019)
- [10] Spektrum der Wissenschaft. Lexikon der Biologie. Bakterienrasen. Abgerufen am 12.09.2019 unter <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/bakterienrasen/6863>
- [11] Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bazillen. Abgerufen am 22.07.2019 unter <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Bazillen&oldid=183169296> (Bearbeitungsstand: 29.11.2018)
- [12] DocCheck Flexikon. Wachstumsphasen einer Bakterienkultur. Abgerufen am 29.08.2019 unter https://flexikon.doccheck.com/de/Wachstumsphasen_einer_Bakterienkultur
- [13] Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Abwasserwärmerückgewinnung. Abgerufen am 24.08.2019 unter <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Abwasserw%C3%A4rmer%C3%BCckgewinnung&oldid=189079282> (Bearbeitungsstand: 30.05.2019)

[14] Flückiger, R. 2016 Allgemeines zu Mikroorganismen. Abgerufen am 26.09.2019 unter <https://almedica-hygiene.ch/lifestyle/mikroorganismen-hygiene/>

[15] Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. RGT-Regel. Abgerufen am 27.09.2019 unter <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=RGT-Regel&oldid=191813405>
(Bearbeitungsstand: 30.08.2019)

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des aeroben Abbaus von Toluol durch toluolabbauende Mikroorganismen.....	3
Abb. 2: Anreicherungskulturen mit Toluol	4
Abb. 3: Kontrolle	5
Abb. 4: Schematische Darstellung der Herstellung der Anreicherungskulturen.....	5
Abb. 5: Sprühdose	6
Abb. 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Photospektrometers...	7
Abb. 7: Schematische Darstellung der Durchführung der Experimente zur Ermittlung der optimalen Wachstumstemperaturen toluolabbauender Bakterien	8
Abb. 8: Exsikkator mit Toluolatmosphäre (schematische Darstellung) und Agarplatten	9
Abb. 9: Stammkulturen (1-3) und Kontrolle (4) nach dreiwöchiger Inkubation.....	11
Abb. 10: Stammkultur 2 nach dreiwöchiger Inkubation (400-fach vergrößert).....	11
Abb. 11: Stammkultur 1 nach dreiwöchiger Inkubation (400-fach vergrößert).....	11
Abb. 12: Alternativmethode im Vergleich zur Methode nach Eberspächer und Müller (Mittelwerte).....	12
Abb. 13: Agarplatte nach vierwöchiger Inkubation, beimpft mit Stammkultur 2 (a) sowie mikroskopische Aufnahmen dieser Agarplatte (400-fach vergrößert; b und c)	13
Abb. 14: Agarplatte nach vierwöchiger Inkubation, beimpft mit Stammkultur 1 (a) sowie mikroskopische Aufnahme dieser Agarplatte (400-fach vergrößert; b)	14
Abb. 15: Durchschnittliche optische Dichten der drei Versuchsgruppen aus Versuchsreihe 1	15
Abb. 16: Durchschnittliche optische Dichten der drei Versuchsgruppen aus Versuchsreihe 2.....	15
Abb. 17:	16

Danksagung

Deklaration

«Ich erkläre hiermit,

- dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen verfasst habe,
- dass ich auf eine eventuelle Mithilfe Dritter in der Arbeit ausdrücklich hinweise,
- dass ich vorgängig die Schulleitung und die betreuende Lehrperson informiere, wenn ich diese Maturaarbeit, bzw. Teile oder Zusammenfassungen davon veröffentlichen werde, oder Kopien dieser Arbeit zur weiteren Verbreitung an Dritte aushändigen werde.»

Ort: _____

Datum: _____

Unterschrift: _____

Anhang