

## Einzelprotokoll

### *Thema*

### **Bakterieller Abbau von natürlichen und petrochemischen Verunreinigungen**

### *Einleitung*

Die Stoffkreisläufe eines Ökosystems werden durch die verschiedensten Organismen (Produzenten, Konsumenten und Destruenten) aufrechterhalten. Die Verstoffwechslung von polymeren Metaboliten, d.h. der zur Assimilation und Dissimilation zur Verfügung stehenden Polymere nimmt bei diesen Stoffkreisläufen eine zentrale Rolle ein.

Neben natürlichen Biopolymeren (wie z.B. Polysacchariden, Lipiden, Proteinen) gibt es aber (dank des Menschen) schon seit einiger Zeit auch der Natur fremde Stoffe, welche nicht oder nur in geringem Maße von den Organismen eines Ökosystems verwertet werden können. Zu diesen Xenobiotika gehören z.B. Insektizide, Herbizide und polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK). Diese Stoffgruppe soll in unserem Versuch dazu dienen, neben dem Abbau eines natürlichen Biopolymers (Casein) durch einen Bakterienstamm auch den Abbau eines industriellen Schadstoffes nachzuweisen.

### *Prinzip*

Im ersten Teil des Versuches testen wir, in wie weit *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* das in ihrer Umgebung befindliche Casein abbauen können. Mit Hilfe von Salzsäure kann dann nach Bakterienwachstum das nicht verwertete Casein durch Ausfällen sichtbar gemacht werden.

Die für den zweiten Versuch mit Erdöl kontaminierte Erde wird in Reinform und in Suspension auf einem Minimalagar ausplattiert. Als einzige Kohlenstoffquelle dient den Mikroorganismen einmal Naphthalin und ein anderes Mal das Derivat  $\beta$ -Naphthol. Als Gegenprobe wird noch Glucose bei einer dritten Platte verwendet.

Naphthalin gehört zu den PAK's und ist als solches persistent, d.h. es wird in der Biosphäre nicht oder nur sehr langsam abgebaut, was durch seine geringe Wasserlöslichkeit noch verstärkt wird. Es ist zu 1400-17\*00mg/kg in Dieselkraftstoff vorhanden.

Mikroorganismen mit der Befähigung zum PAK-Abbau sind z.B. *Vibrio*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Thodococcus* und *Pseudomonas*. Die Mechanismen des Abbaus sind bei den einzelnen Spezies sehr verschieden. Bei unserem Versuch wird es dabei wahrscheinlich zu einer vollständigen Mineralisierung kommen (Substrat als einzige C-Quelle), wobei  $\text{CO}_2$  das Hauptprodukt darstellen wird.

Die bakterielle Metabolisierung von Naphthalin habe ich im Anhang aufgeführt.

### *Erwartungen*

Im ersten Teil des Versuches erwarte ich, dass der Exonuclease-produzierender *Bacillus subtilis* das Casein aus der Umgebung im Gegensatz zu *E. coli* verwerten kann und daher kein Casein um die *Bacillus* Kolonien herum ausfallen wird.

Beim zweiten Versuchsteil vermute ich (vorausgesetzt die Probe enthält *Pseudomonas*) dass Naphthalin (auf Grund des höheren Dampfdruckes) eine bessere C-Quelle als das Derivat darstellt.

## Material

### Biologisches Untersuchungsmaterial

- Escherichia coli Kultur, Stamm K12 aus Laborbestand
- Bacillus subtilis Kultur aus Laborbestand
- Erde aus den Fugen eines Parkplatzes (mit Verdacht auf petrochemische Verunreinigungen)

### Chemikalien

- Standard-Medium I von MERCK
- Minimalmedium mit und ohne Energiequelle (selbst hergestellt, Inhaltsstoffe s.u.)
- Standardmedium für E. coli und Bacillus sub. (selbst hergestellt, Inhaltsstoffe s.u.)
- HCl-Lösung ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ )
- Naphthalin (Dampfdruck 6,6 Pa bei 20°C, Schmelzpunkt 80-81°C, Siedepunkt 218°C, weitere Infos auf dem Gefahrenblatt im Anhang)
- $\beta$ -Naphthol (siehe Gefahrenblatt im Anhang)

### Geräte

- Petrischalen
- Erlenmeyerkolben 250ml/500ml
- Messzylinder 100ml
- Becherglas 100ml
- Impföse
- Drigalski-Spatel
- Magnetrührplatte + Rührfisch
- Alufolie
- Bunsenbrenner
- Analysenwaage (Messbereich: 0,0001g)
- pH-Meter
- Autoklav
- Schüttelwasserbad (Julabo SW-20G)
- Sterile Werkbank (LAF)
- Trockenschrank

## Methode

### Rezepte der anzusetzenden Nährböden

Standardmedium mit Agar und Casein

Stoff	Angaben für 1L (in g)	Umrechnung für 100ml (in g)
Pepton	10,00	1,00
Hefeextrakt	1,00	0,10
NaCl	2,00	0,20
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,20	0,02
Agar agar	15	1,5
Casein	5,00	0,50
Aqua dest.	1000ml	100ml

### Minimalnährboden mit und ohne Energiequelle

Stoff	Angaben für 1L (in g)	Umrechnung für 100ml (in g)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50	0,050
NaCl	2,00	0,20
NH <sub>4</sub> Cl	1,00	0,10
CaCl <sub>2</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,10	0,010
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,20	0,020
KCl	1,00	0,10
Aqua dest.	1000 mL	100 mL

Bei der Herstellung ist so vorzugehen, dass zunächst 100ml nach Rezept in einem Erlenmeyerkolben angesetzt werden und diese Lösung dann in Aliquots zu 40ml und 60ml in Erlenmeyerkolben aufzuteilen ist, **bevor** der Agar und die Glucose dazugegeben werden. Dieses frühe Portionieren hat den Vorteil, dass der Agar (welcher sich schnell am Boden absetzt) genau portioniert wird, der Minimalagar aber trotzdem nur 1x für die Menge von 3 Petrischalen hergestellt werden muss.

60ml Aliquot:

Stoff	Angaben für 1L (in g)	Umrechnung für 60ml (in g)
+ Agar agar	15	0,9

40ml Aliquot

Stoff	Angaben für 1L (in g)	Umrechnung für 40ml (in g)
+ Agar agar	15	0,6
+Glucose	3	0,12

### Versuchsdurchführung (1. Teil)

1. Für die Übernachtskulturen werden zwei Erlenmeyerkolben mit je 100ml Standard-Medium I (+0,02g Magnesiumsulfat pro 100ml) angesetzt und anschließend für 20min bei 128°C autoklaviert.
2. Nach Beimpfen der Kolben unter der Sterilwerkbank mit Hilfe einer abgeflämmten Impfföse mit E. coli K12 und Bacillus subtilis (ggf. von vorher ausgestrichenen Kolonien) werden die 24h bei 37°C im Wärmeschüttelbad belassen.
3. Die Chemikalien für das Standardmedium mit Agar und Casein (siehe S.2) werden auf der Analysenwaage eingewogen und quantitativ in einen Erlenmeyerkolben überführt.
4. Nachdem alle Stoffe (ggf. mit Magnetrührplatte) in Aqua dest. gelöst wurden wird der Kolben für 20min bei 128°C autoklaviert. Die abgeschlossene Sterilwerkbank anlaufen lassen
5. Nach Abkühlen des Nährbodens kann dieser unter der Sterilbank zu gleichen Teilen in zwei Petrischalen gegossen werden (1 Petrischale zur Probe).
6. Nachdem der Agar erstarrt ist (ggf. im Kühlschrank) die Platten bei 50°C eine halbe Stunde in den Trockenschrank geben. Anordnung so, dass der Boden jeder Platte oben liegt (schräg auf dem Deckel), um Kondenswasserbildung zu vermeiden.
7. Unter der Sterilbank mit Hilfe der Impfföse jede Platte mit einen Impfstrich der Übernachtskultur von Bacillus subtilis und E. coli versehen und am Boden markieren)
8. Die Platten verschlossen bei 30° im Brutschrank (Boden nach oben) für 24h inkubieren
9. Anschließend den Nährboden jeder Platte mit HCl-Lösung ( $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ ) fluten und beobachten, in welchen Bereichen Casein ausfällt (= trübe Färbung des Nährbodens)

## Versuchsdurchführung (2.Teil)

1. Das Minimalnährmedium mit und ohne Energiequelle herstellen (Rezept & Anleitung siehe S.3) und die Aliquots anschließend für 20min bei 128°C autoklavieren. Die Sterilwerkbank verschlossen vorlaufen lassen.
2. Drei Petrischalen für Glucose, Naphthalin und  $\beta$ -Naphthol beschriften und unter der Sterilbank vorbereiten.
3. Den für die Platten entsprechenden Nähragar (1x mit Glucose, 2x ohne) gießen und erstarren lassen (ggf. im Kühlschrank)
4. Die Platten für 30min bei 50°C im Trockenschrank (Anordnung siehe oben) trocknen lassen.
5. Einen Teil der Erdprobe mit Leitungswasser in einem Becherglas suspendieren
6. Auf den trockenen Platten wird nun je 1/3 der Agarfläche mit Hilfe einer abgeflämmten Pinzette mit Erde beimpft. Auf den restlichen 2/3 der Platte wird mit Hilfe des Drigalskispatels wenig Erdsuspension (~0,1ml) verteilt und trocknen gelassen.
7. In die entsprechende Petrischale für Naphthalin wird in den Deckel eine kleine Schale aus Alufolie mit einer Spatelspitze Naphthalin gegeben (Schale mit Boden nach oben lagern). Dies wird äquivalent für  $\beta$ -Naphthol durchgeführt. Die dritte Schale mit dem Glucose-Nährager erhält nichts (=Probe). Alle Schalen werden mit Parafilm nahezu (nicht vollständig) dicht verschlossen.
8. Alle Schalen werden solange bei 30°C im Brutschrank inkubiert, bis Kolonien auf allen Platten festzustellen sind (~1 Woche).

## *Ergebnis*

### **1.Teil**

Nachdem die Schalen mit Salzsäure geflutet wurden, ergab sich folgendes Bild, was die Caseinverwertung von *Bacillus subtilis* nachweist:

(Die Aufnahmen erfolgte mit einer Digitalkamera, wobei die Platte von unten angeleuchtet wurde)

## 2. Teil

Das Ergebnis des Kolonienwachstums auf den mit Erde kontaminierten Nährböden mit und ohne Energiequelle war nach 10 Tagen folgendes:

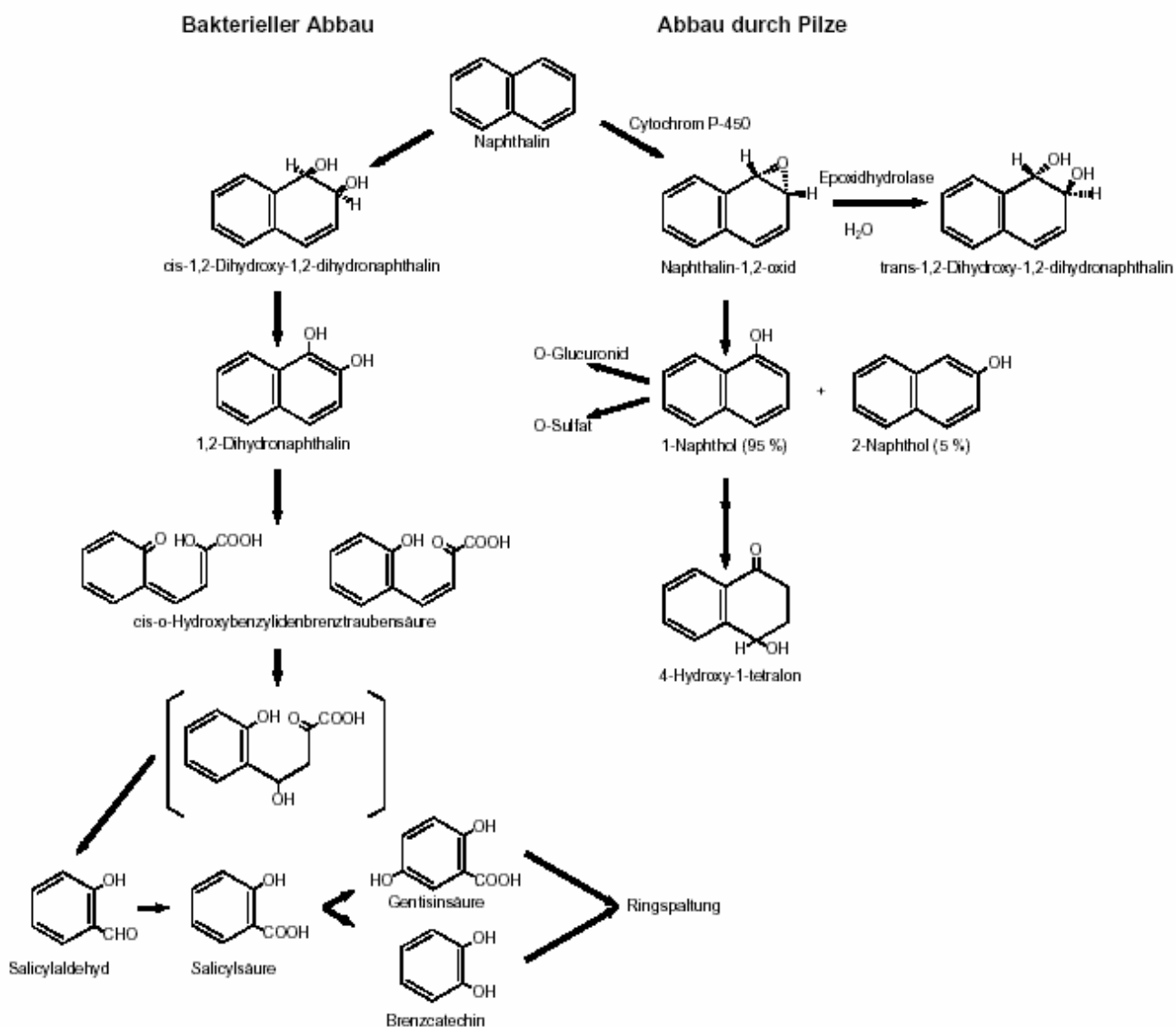
Alle Platten waren bewachsen, wobei besonders bei der Platte, bei welcher Naphthalin verwendet worden ist, ein größeres Kolonienwachstum im Bereich des Drittels mit der puren Erde zu beobachten war.

Daraus schließe ich, dass Naphthalin eine im Vergleich zu seinem Derivat bessere Kohlenstoffquelle darstellt. Dies erscheint logisch, da Naphthalin einen höheren Sublimationswert als  $\beta$ -Naphthol besitzt und somit schneller und reiner verdampft (und aufgenommen werden kann).

### *Quellen*

- Diverse Internetseiten, darunter die Onlinedatenbank von MERCK
- Eine online verfügbare Diplomarbeit von Georg Stenz zu dem Thema "Orientierende Erkundungen zur ubiquitären Belastung von Böden mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) von 1997

## Naphthalin-Abbau durch Bakterien und Pilze



Der Abbau dreikerniger PAK zeigt bei Bakterien das gleiche Grundmuster:

- Bildung eines *cis*-Dihydrodiols
- Dehydrierung zum Dihydroxy-Derivat
- extradiole Ringspaltung
- Pyruvat-Abspaltung (=Elimination des ersten Ringrestes)