



Finn Sombrutzki, \*1996  
Robin Hertel, \*1995

Elly-Heuss-Knapp-Schule,  
Neumünster

Eingang der Arbeit:  
September 2014

Zur Veröffentlichung angenommen:  
März 2015

## Hunger auf Kunststoff

### Untersuchungen zum Abbau von Polyethylen durch Mikroorganismen

Die Plastikverschmutzung in den Meeren stellt ein stetig wachsendes Problem für dieses Ökosystem dar. Das Ziel der Arbeit ist zu überprüfen, ob die Mikroorganismen *Rhodococcus ruber*, *Pestalotiopsis mikrospora*, *Candida maltosa* und *A. borkumensis*, Polyethylen abbauen können. Die Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten Mikroorganismen in der Lage sind, in nährstoffarmen Umgebungen mit Polyethylen zu wachsen.

#### 1 Einleitung

Kunststoffe stellen in unserer Umwelt ein stetig wachsendes Problem dar. Allein in den letzten 20 Jahren hat sich die Menge an weltweit produzierten Kunststoffverpackungen verdoppelt. Der Pro-Kopf-Verbrauch in Deutschland liegt bei etwa 33 Kilogramm pro Jahr [1].

Kunststoffe sind synthetisch hergestellte Polymere, die viele verschiedene Vertreter haben wie z. B. Polyesterol, Polyoxymethylen, Polyamid [5]. Sie alle zählen zu den Kohlenwasserstoffen. Einer dieser synthetischen Polymere ist Polyethylen. Dieses ist für Mikroorganismen schwer abbaubar, weil es keine enzymatischen Angriffspunkte, wie z. B. Alkohole (Hydroxylgruppe), organische Säuren (Carboxylgruppe), oder andere funktionelle Gruppen bietet (siehe Abb. 1). Aufgrund dieser Tatsachen ist unter den Kunststoffen wohl das Polyethylen eines der größten Herausforderungen für die Umwelt.

Da Mikroorganismen jedoch auch sehr vielseitig sind und sich der Umwelt anpassen, liegt die Überlegung nahe, ob es schon welche gibt, die Polyethylen abbauen können. Zahlreiche Forschergruppen beschäftigen sich bereits mit diesem überaus komplexen und vielseitigen Thema. Die Forscher des Department of Molecular Biophysics and Biochemistry der Yale University konnten beweisen, dass es für einige Pilze möglich ist, Polyurethane als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen [7].

Die Ähnlichkeit der Molekülstruktur zwischen dem Polyethylen und seinem Ausgangsstoff Erdöl war der Anlass, für die Untersuchungen Mikroorganismen auszuwählen, die ähnliche Strukturen wie Polyethylen oder andere Erdölprodukte abbauen können. Internetrecherchen ergaben, dass die Organismen *Candida maltosa*, *Alcanivorax borkumensis*, *Rhodococcus ruber* [8] und *Pestalotiopsis*

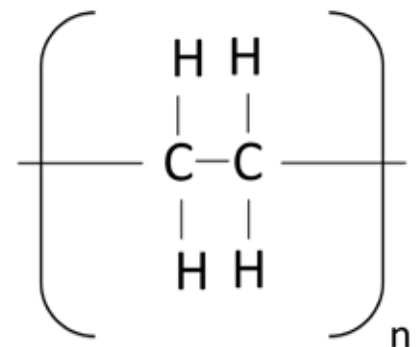


Abb. 1 Strukturformel des Grundgerüsts von Polyethylen.

*microspora* [7] diese Voraussetzungen bieten. Über die Kultivierungsversuche wurde zunächst das Wachstumsverhalten der Mikroorganismen mit Polyethylen als einzige Kohlenstoffquelle beobachtet. Darauf folgend wurden optische Beweise für einen Kunststoffabbau gesucht.

#### 2 Material und Methoden

Alle Mikroorganismen wurden bei der

DSMZ [2] bestellt. Aufgrund seiner marinen Herkunft erfolgte eine Konzentration auf *A. borkumensis*. Es sollte untersucht werden, ob er unter möglichst naturnahen Bedingungen Polyethylen abbaut. Deswegen wurde dieses Bakterium in einem Fermenter mit autoklaviertem Meerwasser kultiviert. Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops wurden optische Hinweise für einen Kunststoffabbau gesucht.

## 2.1 Anzucht und Archivierung der Mikroorganismen

Die vier Stämme wurden in Nährbouillons überführt. Jeder Mikroorganismus wurde in seinem spezifischen Nährmedium (siehe Tab. 1), entsprechend der DSMZ-Empfehlung, kultiviert. Diese Kulturen wurden für alle weiteren Versuche verwendet.

## 2.2 Wachstumsversuche in einer Benzin/Diesel Atmosphäre

Um die Mikroorganismen langsam auf längere Kohlenwasserstoffketten vorzubereiten, wurden sie in einer mit Diesel bzw. Benzin angereicherten Atmosphäre in einem Minimalmedium inkubiert. Diese Atmosphäre wurde in einem Exsikkator hergestellt (siehe Abb. 2). Die Minimalmedien enthielten alle Nährstoffe der Medienempfehlung der DSMZ [2] für die jeweiligen Mikroorganismen, auf die Kohlenstoffquellen wurde verzichtet. Die Mikroorganismen wurden sozusagen „gezwungen“, Diesel bzw. Benzin als Kohlenstoffquelle zu nutzen, da sie keine alternative Kohlenstoffquelle zur Verfügung hatten.

Sie wurden zusammen mit Bechergläsern, die Benzin bzw. Diesel enthielten, in die Exsikkatoren gestellt. Das heißt, es gab zwei verschiedene Ansätze: einen mit einer benzinhaltigen Atmosphäre und einen mit einer dieselhaltigen Atmosphäre. Zur Kontrolle, ob die Mikroorganismen überhaupt in einer solchen Umgebung überleben können, wurden sie auf dem entsprechenden Agar, einem Vollmedium, ausplattiert. Diese Platten wurden mit den anderen Erlenmeyerkolben in der Kraftstoffumgebung inkubiert. Nach drei Wochen wurde dann der Versuch zum Kunststoffabbau (siehe 2.3) gestartet. Als Negativkontrolle gab es noch eine Kultur (Vollnährmedium), die bei Raumtemperatur geschüttelt wurde.

Mikroorganismus	Nährmedium
<i>P. microspora</i>	M90
<i>A. borkumensis</i>	M809
<i>C. maltosa</i>	M129
<i>R. ruber</i>	M65

Tab. 1: Zur Anzucht der Mikroorganismen verwendete Nährmedien, genaue Rezeptur siehe [2].

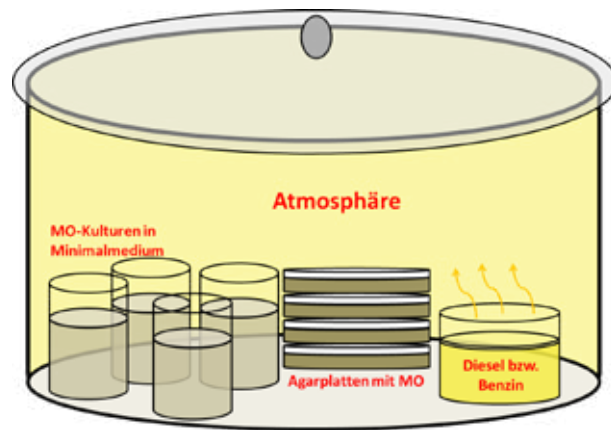


Abb. 2: Aufbau der Exsikkatoren zum Herstellen einer Diesel- bzw. Benzinatmosphäre, in welchen die Mikroorganismen *A. borkumensis*, *P. microspora*, *C. maltosa* und *R. ruber* auf Platten mit Vollnährmedium in Hinblick auf ihrer Verträglichkeit gegenüber der Atmosphäre und in Minimalmedien in Hinblick auf den Abbau von Diesel bzw. Benzin untersucht werden. Weiteres Ziel war die Angewöhnung an lange Kohlenwasserstoffe.

Mikroorganismus (MO)	MO in Minimalmedium unter Benzinatmosphäre	MO in Minimalmedium unter Dieselatmosphäre	MO in Vollnährmedium aus dem Inkubator
<i>P. microspora</i>	Probe 1	Probe 2	Probe 3
<i>R. ruber</i>	Probe 4	Probe 5	Probe 6
<i>C. maltosa</i>	Probe 7	Probe 8	Probe 9
<i>A. borkumensis</i>	Probe 10	Probe 11	Probe 12

Tab. 2: Die 12 verschiedenen Proben, die in die Reagenzgefäße gegeben wurden.

## 2.3 Wachstumsverhalten der Mikroorganismen mit PE als Kohlenstoffquelle

Für die Kunststoffabbauuntersuchungen wurde handelsübliche Polyethylen-Klarsichtfolie verwendet. Sie hat den Vorteil, eine große Oberfläche aufzuweisen und sehr dünn zu sein. Von den Kulturen aus den Exsikkatoren wurde dann jeweils 1 ml aus den Minimalmedien und 0,1 ml aus den Kulturen aus den Vollnährmedien entnommen und in ein Reagenzgefäß mit Minimalmedium gegeben. Bei *P. microspora* hatte sich in den Vorkulturen ein Myzel gebildet, weshalb

in diesem Fall vom Myzel ein Stückchen mithilfe einer Impföse überführt wurde. (vgl. Tab. 2).

Bevor der Kunststoff in die Reagenzgefäße gegeben werden konnte, musste sichergestellt werden, dass keine anderen Mikroorganismen mit hinein gelangen können. Dafür wurden die Kunststoffstücke eine Stunde in 70 % Ethanol eingelegt, um sie zu sterilisieren. Danach wurden diese nacheinander unter der Sterilwerkbank in drei sterile Gläser mit autoklaviertem demineralisiertem Wasser überführt, um Ethanol zu entfernen

(siehe Abb. 3). Dies war notwendig, um zu vermeiden, dass Ethanol die Mikroorganismen im Reagenzgefäß abtötet.

### 2.4 Die Fermentation von *A. borkumensis*

*A. borkumensis* wurde in drei Fermentern (siehe Abb. 4) kultiviert. Diese Fermenter bestehen aus einem Glasgefäß mit Schraubverschluss und mehreren Öffnungen im Deckel. Ein magnetischer Rührer sorgte für eine gute Durchmischung. Durch die eine Öffnung wurde ein Schlauch in die Bouillon gehängt, der über einem Sterilfilter mit einer Aquarienpumpe verbunden war, sodass eine ständige Sauerstoffzufuhr gewährleistet war. Ein Fermenter enthielt ein Vollmedium, in den beiden anderen war autoklaviertes Ostseewasser mit Kunststoffolie bzw. Diesel. In einem vierten Fermenter wurde nicht autoklaviertes Ostseewasser mit Kunststoffolie als Negativprobe kultiviert (siehe Tab. 3). Zum Ansetzen der Fermenter wurden diese zunächst mit 800 ml Medium befüllt, danach wurden die drei Fermenter autoklaviert. Im vierten sollten Mikroorganismen aus der Ostsee angereichert werden, weswegen dieser nicht autoklaviert wurde.

Die Kunststoffolie wurde in der gleichen Weise, wie unter 2.3. beschrieben, sterilisiert. Dann wurde der Deckel des Fermenters abgeschraubt und das Plastik hineingelegt. Der Diesel wurde durch eine der Öffnungen im Deckel hinein pipettiert. Es wurden die folgenden Arbeitsschritte weiterhin unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Die Schläuche für die Luftzufuhr wurden eine Stunde lang vor ihrer Installation in 70 % Ethanol eingelegt, um sie zu sterilisieren. Danach wurde das Ethanol mit sterilem Wasser abgespült und mit steriler Luft getrocknet. Die Schläuche wurden durch eine Öffnung im Deckel des Fermenters in die Bouillon gehängt. An das Ende, das aus dem Fermenter ragte, wurde umgehend ein Sterilfilter gesteckt. Die Fermenter wurden unter der Sterilwerkbank angeimpft. Sie wurden bei Raumtemperatur inkubiert und mittels eines Magnetrührers durchmischt.

### 2.5 Zellzahlentwicklung von *A. borkumensis* in 2 Liter Fermenter

Mithilfe des größeren 2 Liter Biostat®-Labor-Fermenters sollte der Plastikabbau

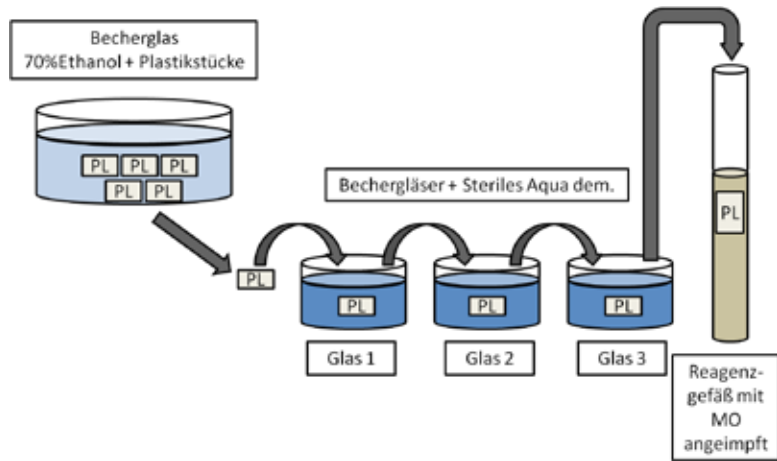


Abb. 3: Sterilisations- und Reinigungsverfahren der Kunststoffstücke 1) Sterilisation der Kunststoffstücke in 70 % Ethanol 2) Kunststoffstück herausnehmen und nacheinander in Glas 1, 2 und 3 das Ethanol in Sterilen Aqua dem. abspülen 3) Kunststoffstück in Reagenzgefäß geben.

Fermenter 1	Fermenter 2	Fermenter 3	Fermenter 4
<i>A. borkumensis</i> in Vollmedium	<i>A. borkumensis</i> in autoklaviertem Ostseewasser und PE	<i>A. borkumensis</i> in autoklaviertem Ostseewasser mit Diesel	Ostseewasser (unsteril) mit Kunststoffolie

Tab. 3: Darstellung der vier Fermenter und deren Inhalt zur Untersuchung des Abbauverhaltens *A. borkumensis* von Polyethylen.

in einem größeren Volumen untersucht werden. Als Medium wurde ebenfalls autoklaviertes und steril filtriertes Ostseewasser verwendet. Der Fermenter besteht aus einem Glasgefäß, in dem sich das Medium mit dem Kunststoff und dem Bakterium befindet, sowie einen Rührstab und einer Sauerstoffzufuhr. Zusätzlich wurde ein Probeentnahmehahn installiert.

### 2.5.1 Ansetzen des Fermenters

In das Glasgefäß wurde das steril filtrierte Ostseewasser gegeben. Danach wurde der restliche Aufbau auf den Fermenter gesetzt. Die Elektroden wurden kalibriert, die Luftzufuhr wurde mit einem Sterilfilter nach außen abgeschirmt und der vorbereitete Fermenter autoklaviert. Danach wurde die mit Ethanol sterilisierte Plastikfolie in den Fermenter gegeben. Der Fermenter wurde unter sterilen Bedingungen mit 10 ml einer *A. borkumensis* Starterkultur angeimpft.

### 2.5.2 Messungen im Fermenter

Es wurden regelmäßige Zählungen mit der Neubauer Improved Zählkammer durchgeführt (siehe Abb. 5). Zudem wurden die Proben auf Marine Broth Agar ausplattiert, um zu überprüfen, ob die gezählten Zellen noch leben.



Abb. 4: Technischer Aufbau der Fermenter zur Untersuchung des Abbauverhaltens *A. borkumensis* von Polyethylen.

### 2.6 Rasterelektronenmikroskopie der Proben aus den Fermentern

Um mögliche Hinweise für „Abbauspuren“ an den Plastikproben zu erhalten, wurden Proben unter dem REM der Technischen Fakultät der Universität Kiel untersucht.



Abb. 5: Mit einer Spritze werden aus dem Fermenter Proben gezogen, um die Dichte der Bakterien zu bestimmen.

Es wurden folgende fünf Proben vorbereitet:

- zwei Plastikstücke aus dem Fermenter mit sterilem Ostseewasser und *A. borkumensis*
- ein Plastikstück aus dem Fermenter mit Ostseewasser
- ein Plastikstück frisch von der Rolle
- eine Probe aus dem Fermenter mit Vollmedium

Aus dem Fermenter mit *A. borkumensis* und Polyethylen wurden zwei Proben gewählt, da in diesem der Plastikabbau untersucht werden sollte. In diesem Fall wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Plastikstücke aus dem unsterilen Wasser und das unbehandelte Plastik stellen zu der Fermenterprobe eine Kontrolle dar und zeigen, wie die Bakterien bzw. die Prozedur im Fermenter dem Plastik zusetzen. Zusätzlich dienen Bakterien aus optimalen Kultivierungsbedingungen als Vergleich.

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) müssen die Proben absolut wasserfrei sein, da im Vakuum gemessen wird. Dies wurde in zwei Schritten erreicht:

1. Behandlung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und
2. Kritische-Punkt-Trocknung mit  $\text{CO}_2$ .

Zur Präparation wurden am Tag zuvor die Proben in einer 1 % Formalin-Lösung chemisch fixiert. Am folgenden Tag



Abb. 6: Die vier Kulturen aus dem Exsikkator mit der Dieselatmosphäre.

wurde in den Proben das Wasser durch Alkohol ersetzt. Danach wurden die Proben unter 50 bar bei 4 °C acht Mal mit flüssigem  $\text{CO}_2$  gewaschen, um diese von Wasser zu befreien. Im folgenden Schritt wurde die Probe bis auf 40 °C erhitzt und auf 90 bar unter flüssiges  $\text{CO}_2$  gebracht. Nach dem Ablassen des  $\text{CO}_2$  konnten die Proben entnommen und auf die Objektträger für das REM geklebt werden. Anschließend wurden die Objektträger in einem Vakuum von 0,07 mbar in einer Argonatmosphäre mit Gold und Platin bedampft, wobei sich auf den Proben eine 20 nm dicke Beschichtung abgesetzt hat. Dadurch werden die Proben leitend und unter dem REM sichtbar.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wachstumsversuche in einer Benzin/Diesel Atmosphäre

##### 3.1.1 Die Platten

Im Exsikkator mit der Dieselatmosphäre waren die Platten gut bewachsen. *P. microspora* hat einige Myzelien ausgebildet, die im Kern schwarz waren und einen weißen Flaum hatten. Die restlichen Mikroorganismen bildeten einen dichten Kolonierasen: *R. ruber* einen orangen, *A. borkumensis* und *C. maltosa* einen weißen. Die Platten aus dem Exsikkator mit der Benzinatmosphäre waren verklebt und nicht voneinander zu trennen, zudem waren die Platten unbewachsen.

##### 3.1.2 Die Kulturen in den Minimalmedien

In den Medien aus dem Exsikkator mit

der Benzinatmosphäre war nach drei Wochen Inkubationszeit keine Trübung feststellbar. *P. microspora* Myzel schien sich gar nicht vergrößert zu haben. Unter dem Mikroskop konnten bei *C. maltosa*, *A. borkumensis* und *R. ruber* keine Zellen entdeckt werden. Bei *P. microspora* hatte sich das beim Animpfen dazugegebene Myzel nicht vergrößert. In den Kulturen aus der Benzinatmosphäre war nichts gewachsen.

In dem Exsikkator mit der Dieselatmosphäre waren die Mikroorganismen wesentlich besser (siehe Abb. 6). Die Medien wiesen eine deutlich erkennbare Trübung auf. *P. microspora* zeigte ein deutliches Myzel-Wachstum. Die Betrachtung unter dem Mikroskop bestätigte dies. Bei *R. ruber* waren kleine Stäbchen zu erkennen. *A. borkumensis* lagerte sich haufenförmig zu Kokken ab. *C. maltosa* war eindeutig als Hefe erkennbar. In Gruppen zusammengelagert konnte die Knospung festgestellt werden. *P. microspora* zeigte die pilztypischen Hyphen.

#### 3.2 Wachstumsverhalten der Mikroorganismen mit PE als Kohlenstoffquelle

Nach zwei Wochen wurden aus den Röhrcchen mit den Minimalmedien und dem Polyethylen aus den oberen Bereichen Flüssigkeit gezogen und mikroskopiert. Außerdem wurden zum Vergleich Kulturen aus Vollmedien unter dem Mikroskop betrachtet. Von den Proben

	<i>C. maltosa</i>	<i>A. borkumensis</i>	<i>R. ruber</i>	<i>P. mikrospora</i>
1 ml Flüssigkeit aus den Kulturen des Vollnährmediums				
Vollnährmedium in Minimalmedium + Kunststoff				
Minimalmedium aus Diesel Exsikkator in Minimalmedium + Kunststoff				
1 ml Minimalmedium aus Benzin Exsikkator in Minimalmedium + Kunststoff				

Tab. 4: Mikroskopische Aufnahmen der Kunststoffansätze.

wurden Fotos gemacht (siehe Tab. 4). Die mangelhafte Qualität der Kamera ist der Grund dafür, dass die Mikroorganismen auf den Fotos schlecht erkennbar sind. Das Phasenkontrastmikroskop zeigte deutlich bessere Bilder, jedoch konnten hiermit aus technischen Gründen keine Fotos gemacht werden. In den Kunststoffansätzen aus dem Exsikkator mit der Benzinatmosphäre waren keine Mikroorganismen gewachsen. *C. maltosa* wuchs im Vollmedium sehr gut. Sie bildete viele kugelförmige Zellen und es wurden einige knospende Zellen erkannt. In den Kunststoffansätzen waren nur wenige Zellen auffindbar. Die Kulturen aus dem Exsikkator mit der Dieselatmosphäre beinhalteten eine größere Anzahl von Zellen, jedoch war keine Knospung erkennbar. *A. borkumensis*-Zellen lagen im Vollmedium und in den Proben der Kunststoffansätze des Diesel-exsikkators als Kokken vor. In den anderen Ansätzen waren keine Zellen zu sehen. *R. ruber* Zellen wurden nur im Vollmedium gefunden. In allen anderen Zellen befanden sich keine Zellen. *P. mikrospora* bildete im Vollmedium viele Hyphen und ein dichtes Geflecht derselben. Auf dem Bild in Tabelle 4 des Kunststoffansatzes aus dem Exsikkator mit der Dieselatmosphäre sind kleine runde Zellen zu erkennen.



Abb. 7: Polyethylen Folie aus dem Fermenter 2 (Ostseewasser, Polyethylenfolie und *A. borkumensis*) mit einem Zellhaufen auf der Oberfläche.

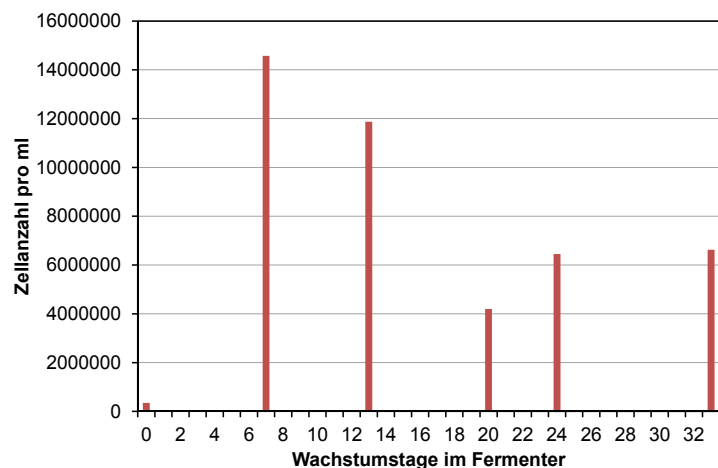


Abb. 8: Zellanzahlentwicklung im 2 Liter Biostat-Labor-Fermenter mit sterilem Ostseewasser, Polyethylenfolie und *A. borkumensis*.

### 3.3 Die Fermentation von *A. borkumensis*

Im Fermenter 2 mit Meerwasser und Plastik war *A. borkumensis* gut gewachsen. Im Fermenter 1 wurde eine Zelldichte von 7 840 000 000 Zellen pro ml mit der Neubauer Zählkammer gezählt. Unter dem Mikroskop waren auf der Kunststoffolie Ansammlungen von Zellen zu sehen (siehe Abb. 7). Als Vergleich dazu wurde der Fermenter 3 mit Meerwasser und Diesel angesetzt, in diesem überlebten jedoch keine Mikroorganismen.

### 3.4 Zellzahlentwicklung von *A. borkumensis* im 2 Liter Fermenter

Im Biostat<sup>®</sup>-Labor Fermenter zeigte die *A. borkumensis*-Kultur zunächst ein rapides Wachstum, dann einen starken Abfall und im Rahmen der letzten Untersuchung ein konstantes Wachstumsverhalten (siehe Abb. 8). Auf den Marine Broth Agar, worauf die Proben aus dem Fermenter ausplattiert wurden, wuchs *A. borkumensis* als dichter Rasen.

### 3.5 Die REM-Aufnahmen

REM Aufnahmen der Proben aus den Fermentern sind in Abb. 9 dargestellt. Die Plastikfolie besitzt eine glatte Oberfläche (a). Dies ändert sich auch nach der Inkubation im Ostseewasser nicht (b). *A. Borkumensis* siedelte sich in dem Fermenter auf der Oberfläche des Plastiks als Biofilm (d), aber auch einzeln (c) an. Dabei ist zu beobachten, dass die Zellen Fäden bilden, die sich zuweilen klar erkennbar entlang von Rissen in der Plastikfolie entlangschlängeln. Es ist weiterhin zu beobachten, dass die Bakterien diese Fäden nur ausbilden, wenn sie mit Plastik in Kontakt stehen. Dies spiegeln die Bilder (e) und (f) wieder. Die Zelle in (e) bildet sehr viele Fäden aus, während in (f), wo die Zellen einen anderen Untergrund als Plastik hatten, keine besaßen. Des Weiteren gibt es Bereiche, in denen die Oberfläche des Plastiks, die in der Bakterienkultur lagen, angegriffen aussahen. (g) zeigt dazu eine angeraute Oberfläche. Außerdem gibt es Risse, die in (h) zu sehen sind. Jedoch gibt es durchaus auch Bereiche auf der Oberfläche, wie sie in (i) und (j) dargestellt sind, auf denen Bakterien auf einer glatten rissarmen Fläche sind.

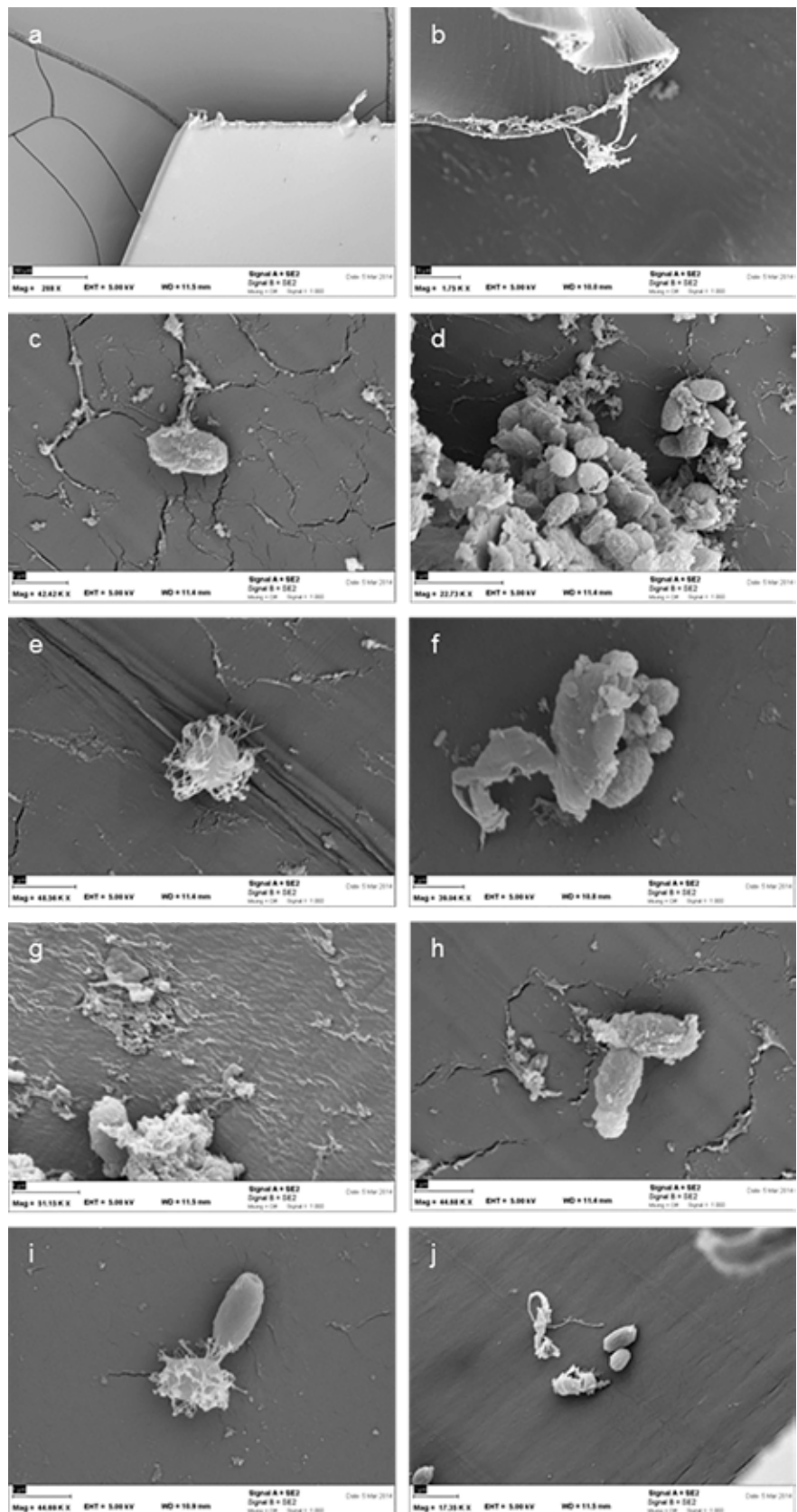


Abb. 9: REM Aufnahmen zur Untersuchung des Abbauverhaltens Polyethylens durch *A. borkumensis*. Die Bilder zeigen Aufnahmen der Kunststoffolie unbehandelt (a) und nach der Fermentation in Fermenter 4 mit Ostseewasser (b) sowie *A. borkumensis* nach der Inkubation in Fermenter 2 mit Ostseewasser auf Polyethylenfolie (c-e,g-j) und auf unbekanntem Strukturen (f). (vgl. Tabelle 3, Seite 54).

## 4 Diskussion

### 4.1 Wachstumsversuche in einer Benzin/Diesel Atmosphäre

#### 4.1.1 Die Benzinatmosphäre

Da auf den Agarplatten im Exsikkator mit der Benzinatmosphäre nichts ge-

wachsen war, vermuten wir, dass die Mikroorganismen in der mit Benzin angereicherten Atmosphäre nicht über-

leben konnten. In den Minimalmedien überlebten ebenfalls keine Mikroorganismen. Das heißt, die Mikroorganismen konnten Benzin nicht als Kohlenstoffquelle nutzen.

#### 4.1.2 Die Dieselatmosphäre

Die Dieselatmosphäre hatte keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum der Mikroorganismen, was aus den dicht bewachsenen Platten geschlossen werden kann. Die Mikroorganismen wuchsen in den Minimalmedien ebenfalls. Daraus schließen wir, dass die Mikroorganismen Diesel als Kohlenstoffquelle nutzen können. Dies könnte daran liegen, dass Diesel bis zu 7 % aus Biodiesel besteht, welches sich chemisch vom normalen Diesel unterscheidet. In [4] wurde schon nachgewiesen, dass Biodiesel von Mikroorganismen verstoffwechselt werden kann.

#### 4.2 Wachstumsverhalten der Mikroorganismen mit PE als Kohlenstoffquelle

Es wird vermutet, dass die molekularen Bindungen des Polyethylens zu stark sind, als dass sie unter diesen Bedingungen für Mikroorganismen als alleinige Nährstoffquelle erreichbar sind. Wie schon in [6] berichtet, ist Polyethylen sehr inert gegenüber mikrobieller Attacke.

Des Weiteren zeigte sich, dass *C. maltosa* ihren Stoffwechsel an die schwierigen Umstände anpassen konnte. Die Ergebnisse können so gedeutet werden, dass die Hefe sich an den Abbau von Kohlenwasserstoffen gewöhnen konnte. Bei *R. ruber* schienen nur einige Zellen, die durch die Dieselatmosphäre an die Stoffwechselbedingungen gewöhnt waren, zu überleben. *A. borkumensis* war unter diesen Bedingungen nicht in der Lage zu überleben. Das gleiche gilt für *P. mikrospora*. In den zuvor mit Benzin behandelten Proben waren, wie zu erwarten, keine Mikroorganismen zu sehen, da diese bereits im Exsikkator mit der Benzinatmosphäre nicht überleben konnten.

#### 4.3 Zellzahlentwicklung von *A. borkumensis* im 2 Liter Fermenter

Der zunächst starke Anstieg der Zellzahl geht vermutlich auf die noch vorhandenen Nährstoffe aus dem steril filtrierten Ostseewasser zurück. Nach mehr als

zwei Wochen waren diese möglicherweise aufgebraucht. Es ist noch zu beobachten, wie sich die Zellzahl in der Folgezeit entwickelt. Es gilt weiterhin noch festzustellen, wie die Zellzahl mit einem Kunststoffabbau zusammenhängt. Eine denkbare Hypothese ist, dass die niedrige konstante Zellzahl sich aufgrund eines Kunststoffabbaus einstellt. Der dichte Bewuchs des Marine Broth Agars beweist, dass die Zellen lebendig sind.

#### 4.4 Die REM-Aufnahmen

Die Risse in der Folie könnten u.U. durch das mechanische Rühren im Fermenter entstanden sein. Aufgrund der Tatsache, dass die ausgebildeten Fäden nur erscheinen, wenn die Mikroorganismen alleinigen Kontakt zur Oberfläche des Polyethylens haben, wird vermutet, dass diese Fäden dazu dienen könnten, Enzyme zu transportieren, um die langen Kohlenwasserstoffketten des Polyethylens anzugreifen. Auffällig ist auch, dass die Fäden meist durch die Risse im Plastik verlaufen. Dies könnte daran liegen, dass den bakteriellen Ausstülpungen dort eine größere Oberfläche zur Verfügung steht. Diese Fäden, auch *extracellular polymeric substances* genannt, dienen auch anderen Bakterien zum Halt und Stofftransport [3]. Im Gegensatz dazu stehen die Mikroorganismen, die Kontakt zu anderen unbekanntem Strukturen haben. Diese bilden keine Fäden aus und lassen vermuten, dass die unbekanntem Strukturen leicht erreichbare Kohlenstoffquellen sind. Möglicherweise könnten die Bakterien die Nährstoffe durch die Membran aufnehmen und interzellulär verstoffwechseln. Zudem kann daraus geschlossen werden, dass die Fäden nicht ausschließlich zur Verankerung dienen. Die Oberflächenstruktur ist teilweise deutlich verändert. Daraus wird geschlossen, dass *A. borkumensis* in der Lage ist, dem Plastik zu schaden.

#### 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Versuche zeigen, dass es für die Mikroorganismen *P. mikrospora*, *A. borkumensis*, *C. maltosa* und *R. ruber* möglich ist, Diesel zu verstoffwechseln. Im Rahmen der Kunststoffabbauversuche wurde klar, dass der mikrobielle Kunststoffabbau ein langwieriger und komplexer, wenn auch kein unmöglicher Prozess ist. Durch unsere Versuche haben wir

Indizien für den mikrobiellen Abbau von Kunststoff erhalten. Diese müssen in weiteren Versuchen gefestigt werden. Zwei dieser geplanten Versuche werden nachfolgend beschrieben.

#### 5.1 Kohlenstoffisotope als Nachweis von Plastikabbau

Im Verlaufe der Experimente kam immer öfter die Fragestellung auf, wie ein eindeutiger Nachweis des Kunststoffabbaus erbracht werden kann. Ein Ansatz ist, Polyethylen zu verwenden, welches aus den Kohlenstoffisotopen  $^{13}\text{C}$  oder  $^{14}\text{C}$  anstatt des üblichen  $^{12}\text{C}$  besteht. Wenn dann Abbauprodukte aus dem Gas oder der Flüssigkeit mithilfe eines Massenspektrometers nachzuweisen sind, die auch diese C-Isotope aufweisen, wäre dies ein eindeutiger Nachweis für einen Plastikabbau. Parallel würden Ansätze mit normalem Polyethylen laufen, die als Kontrolle dienen.

#### 5.2 Plastikbelastete Meerprobe

In einem weiteren Versuch soll die marine Mikroorganismenflora auf Flächen mit hoher Plastikkonzentration untersucht werden. Dafür wird Ostseewasser aus belasteten Regionen genommen. In den Tests sollen vier Fermenter laufen. Im ersten Schritt werden drei Fermenter mit diesem Meerwasser und Plastik inkubiert. Aus einem dieser drei Fermenter werden zu verschiedenen Zeitpunkten Plastikstücke entnommen und auf Agarplatten, versehen mit „Meerwasseragar“ gebracht. Das Ziel ist, die Mikroorganismenflora über einen längeren Zeitraum zu überwachen und im direkten Kontakt zu Plastik zu beobachten. Mikroorganismen, die gut auf diese Lebensumstände ansprechen, werden sequenziert. Weiterhin werden anschließend Fermenter mit sterilem Meerwasser, *A. borkumensis* und Plastik angesetzt. Am Ende ist eine Rasterelektronenmikroskopie geplant, um alle Proben zu vergleichen.

#### Danksagung

An dieser Stelle möchten wir uns bei allen Personen bedanken, die uns bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Rolf Schmaljohann vom Geomar in Kiel. Unter seiner Leitung haben wir die Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie hergestellt. Auch bei Marlies Schwitzke von der Technischen

Fakultät der Universität Kiel möchten wir uns bedanken. Sie hat für uns das Rasterelektronenmikroskop bedient, wodurch wir an die fabelhaften Auf-

nahmen gelangen konnten. Zuletzt möchten wir uns bei unseren Betreuern Dr. Rüdiger Stöhr und Ulrike Duge bedanken, die ihre Freizeit zur Verfügung

gestellt haben, um uns nach der Schule im Labor arbeiten zu lassen und immer bereit waren, auch spontan länger für uns zu bleiben.

### Quellenverzeichnis

- [1] VerbraucherService Bayern im Katholischen Deutschen Frauenbund e.V. 2013. (23. Januar 2014). Verbraucher Service Bayern. Abgerufen am 2. April 2014 von Verbraucher Service Bayern: <http://www.verbraucherservice-bayern.de/information/energie-und-umwelt/meldung/article/Kunststoff-in-Huelle-und-Fuelle-Abfallvermeidung-beim-Einkauf/>
- [2] Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (2013). Abgerufen am 3. November 2013 von Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: <http://www.dsmz.de/home.html>
- [3] Bhaskar, P., & Bhosle, N. (2005). Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. Goa: CURRENT SCIENCE.
- [4] C. L. Peterson, G. M. (2005). Biodiesel Fuels: Biodegradability, Biological and Chemical Oxygen Demand, and Toxicity. In G. M. C. L. Peterson, The Biodiesel Handbook (S. 143-158). AOCS Press.
- [5] Mortimer, C. E., & Müller, U. (2010). Chemie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- [6] Priyanka, N., & Archana, T. (2011). BIODEGRADATION OF POLYTHENE AND PLASTIC BY THE HELP OF MICROBIAL TOOLS: A RECENT APPROACH. Nagpur: International Journal of Biomedical and Advance Research.
- [7] Russell, J. R., Huang, J., & al., e. (September 2011). Biodegradation of Polyester Polyurethane by Endophytic Fungi. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, S. 6076–6084.
- [8] Schauer, F., & Sietmann, R. (2010). Erdölabbauende Mikroorganismen. BIOSpektrum, 502-507.