



Mykoremediation I - Zucht und Screening heimischer Baumpilze

Jugend Forscht, Nordrhein-Westfalen, Regional Wettbewerb 2019



St. Michael Gymnasium, 53902 Bad Münstereifel

Projektbetreuer: Dennis Nebe

Projektteilnehmer: Johanna Bungart (24.01.2002), Luis Dorweiler (10.07.2002),
Hannah Wagner-Gillen (21.12.2002)

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	2
Aufteilung in zwei separate Projekte (Ausblick)	2
Entscheidung für die Schmetterlingstramete	3
Das Klonieren des Myzels	4
Versuche zu optimalen Wachstumsbedingungen	5
Vermehrung auf Reis	8
Beimpfung und Toleranztest auf verschiedenen Konzentrationen von Öl und Benzin	10
Entwicklung eines Ökologietests zur späteren Beurteilung des Reinigungspotentials des noch zu bauenden Pilzfilters	12
Anhang	15
Quellen	18
Unterstützer	18

Einleitung

Die Verunreinigung der Meere durch raffinierte Öle, wie Diesel, Benzin oder Rohöl selbst sind ein gravierendes Problem unserer heutigen Zeit, und haben tiefreichende Folgen für das gesamte Ökosystem. Obwohl es vielfältige Möglichkeiten gibt, Öllachen zu bekämpfen haben sich bis jetzt keine davon bewährt, oftmals sind die Bekämpfungsmethoden selbst eine Belastung für die Umwelt.

Das Ziel dieses Projektes ist es, die Mykoremediation zu nutzen, um raffiniertes Öl effektiv und ohne negative Einflüsse auf die Umwelt abzubauen.

Mykoremediation ist eine Form der Bioremediation, bei der das natürliche Potential von Pilzen als Destruenten zur effektiven Dekontamination der Umwelt verwendet wird. Hierbei steht zu vermuten, dass insbesondere Baumpilze geeignet sein könnten, das chemisch komplexe raffinierte Öl zu zersetzen, da sie in ihrer natürlichen Umgebung ein vergleichbares Problem lösen mussten: Über Jahrmillionen haben sie sich zu Spezialisten im enzymatischen Aufschluss von sonst nur schwer biologisch abbaubaren Substanzen entwickelt.

Nach unserer Hypothese könnte so das Öl eine Nahrungsquelle für den Baumpilz sein, der die komplexen Kohlenstoffstrukturen einfach zersetzen und somit unschädlich machen kann.

Es gibt sehr viele internationale Studien über das Potential von Pilzen, Schadstoffe abzubauen. Jedoch ist ihr Potential Öl abzubauen verglichen gering untersucht worden. Aus diesem Grund eröffnet das Projekt viele interessante Möglichkeiten, neue Einsichten in dieses Forschungsgebiet zu erlangen.

Aufteilung in zwei separate Projekte (Ausblick)

Zur Herangehensweise unseres Projektes mussten wir zunächst herauszufinden, wie man heimische Baumpilze außerhalb ihrer natürlichen Umgebung effektiv vermehren kann. Sollte dieses gelingen, soll in der zweiten Projektphase untersucht werden, welche heimischen Arten ggf. über das Potential verfügen die Substanzen Öl, Benzin und Diesel effektiv abzubauen. Sollten wir eine heimische Art finden, die über das genannte Potential verfügt, war unser Ziel, ihre Abbaufähigkeiten in einer aquatischen Umgebung zu testen.

Konkret wollten wir dazu einen Pilzfilter bauen, der aus dem Myzel des Baumpilzes bestehen würde. Durch diesen Filter könnte man dann das mit Rohöl und Benzin verunreinigte Wasser leiten, und dann auf Restbestände untersuchen. Um eventuelle Rückbestände mit Sicherheit nachweisen zu können, entwickelten wir einen Ökotest.

Das Ziel dieses Tests war es, das Wachstum von Pflanzen, die mit kontaminiertem Wasser gewässert worden sind, mit dem Wachstum von Pflanzen zu vergleichen, deren Wasser von dem Pilzfilter gereinigt wurden. Durch diese Versuchsreihe ließen sich Rückschlüsse auf die Reinigungskraft des Pilzfilters ziehen. Im Anschluss darauf könnten wir daran arbeiten, eine Filteranlage zu bauen, die robust genug wäre um den Umweltbedingungen im Meer (Salzwasser, Strömungen, etc.) standzuhalten. So wäre dieser ultimative Pilzfilter dann in der Lage, das Meerwasser zu „filtrieren“ und dadurch Öllachen auf dem Meer zu abzubauen.

Da all unsere Versuche sehr zeitintensiv waren, und aufgrund der Wachstumsphasen der Pilze bzw. Pflanzen eine gewisse Anlaufzeit hatten, teilen wir unsere Arbeit in zwei einzelne Projekte auf. Das erste Projekt beinhaltet dabei die in diesem Artikel besprochenen Voruntersuchen zum Kultivieren heimischer Baumpilzarten und die Untersuchung auf ihr Potential Rohöl und Benzin abzubauen. Zudem entwickelten wir in diesem Projekt auch den Ökotest.

Im kommenden, zweiten Teil, planen wir den Pilzfilter zu bauen, und mit ihm das Reinigungspotenzial der Pilze zu testen. Im Folgenden soll dann der Pilzfilter optimiert und schließlich angewendet werden.

Entscheidung für die Schmetterlingstramete

Bei dem Nachdenken über die Grundidee stellte sich direkt eine Frage – welche Pilzart von einer Vielzahl an Pilzarten ist für unser Projekt verwendbar?

Da wir die Pilzart selber im Wald suchen wollten konnten wir uns nur für in Deutschland heimische Pilzarten entscheiden. Er sollte ja auch verträglich mit dem deutschen Klima sein, deswegen suchten wir nach heimischen Pilzarten.

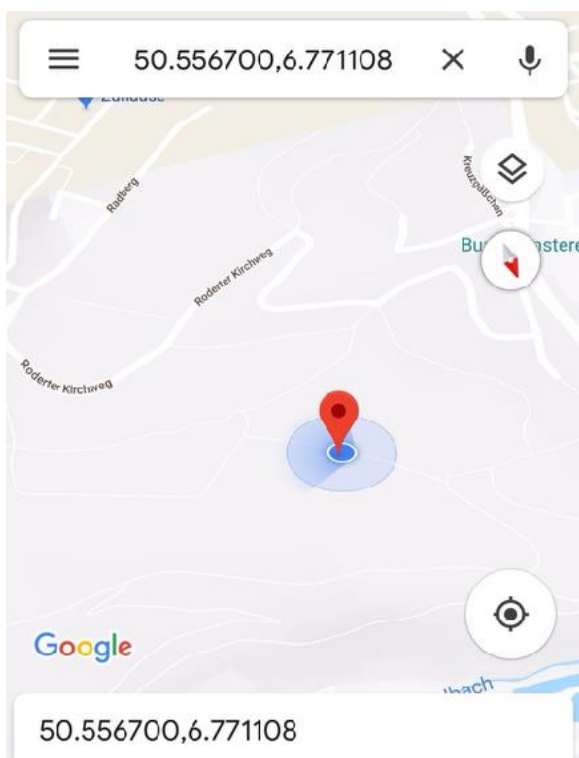
Mithilfe des Buches „Organic Mushroom Farming and Mycoremediation“ von Tradd Cotter, welches von der Züchtung und Kultivierung von Pilzen und dessen Myzelium handelt, stießen wir durch folgenden Vermerk in dem Kapitel zu den Trameten auf eben diese Art:

„Trametes mushrooms show great promise of mycoremediation of biological and chemical pollutants in water and soil“¹.

Wir haben daraufhin unser Augenmerk auf diesen Pilz gelegt, da die Schmetterlingstramete auch in Deutschland vorkommt, zudem schien das Potential in der angeführten Textstelle ebenfalls vielversprechend.

Weiterfolgend haben wir noch ein YT-Video, ein TEDx Vortrag von Paul Stamets und andere Artikel als Inspiration genommen, in denen „Turkey Tail“ oder zu Deutsch „Schmetterlingstramete“ häufig erwähnt wurde.²

Nachdem wir diese Pilzart auch bei einer Suche in einem Wald in der Nähe unserer Schule gefunden hatten, entschlossen wir uns diesen für unser Projekt zu wählen, da er in Deutschland häufig zu finden ist.



(Fundort heimischer Schmetterlingstrameten im Wald von Bad Münstereifel)

Durch die erfolgreiche Entnahmeexkursion konnten wir nun mit dem Klonieren des Myzels der Schmetterlingstramete beginnen.

¹ „Organic Mushroom Farming and Mycoremediation“ (S.351), Tradd Cotter

² YT-Video: Quelle: <https://youtu.be/wxkQO9TZUWs>,

Paul Stamets TEDx Vortrag: Quelle: https://www.ted.com/talks/paul_stamets_on_6_ways_mushrooms_can_save_the_world?language=en#t-831778

Artikel: Quellen: <https://www.sciencedaily.com/releases/2011/11/111130125412.htm>, https://motherboard.vice.com/en_us/article/jp5k9x/the-plan-to-mop-up-the-worlds-largest-oil-spill-with-fungus, <http://earthrepair.ca/resources/bioremediation-types/mycoremediation/>

Das Klonieren des Myzels

Bei dem Klonieren des Myzels wird zuerst dekontaminiertes Gewebe aus dem Inneren des Fruchtkörpers mit einer sterilen Pinzette entnommen. Dies dient dem Zweck, dass beim späteren Züchten des Myzels dieses frei von Verunreinigungen, wie zum Beispiel anderen Pilzsporen und Bakterien sein muss.

Würde man verunreinigtes Gewebe benutzen, dann würden beim Klonieren auf dem Agar wahrscheinlich Bakterien die Hyphen (einzelne Gewebefäden) behindern, neu zu wachsen, wodurch die weitere Benutzung des Myzels nicht möglich ist.

Zudem könnten bei der Versuchsreihe zur Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen durch die Verunreinigung Messungenauigkeiten entstehen. Auf jeden Fall würde der geklonte Pilz Schaden davon tragen, deswegen muss man einen nicht verunreinigten Teil aus dem Inneren des Pilzes entnehmen.

Allerdings ist das Entnehmen nicht einfach, da die Schmetterlingstramete nicht besonders leicht zu öffnen ist. Durch ihre ledrige Oberfläche und ihr sehr faseriges, feines Innengewebe, ist das Entnehmen eines Teils dieses Innengewebes nicht leicht.

Gleichzeitig muss man vermeiden, dass eine Kontamination durch das Berühren der kontaminierten Oberfläche des Pilzkörpers entsteht, deshalb muss man sehr vorsichtig den dekontaminierten Teil des Pilzkörpers aus dem geöffneten Fruchtkörper entnehmen.

Man sollte auch vermeiden Gewebe zu entnehmen, welches Löcher in der Struktur besitzt und möglichst ein dünnes Fragment des leicht trockenen und weichen Gewebes zum Kultivieren zu wählen.

Nachdem wir nun die Kulturlinie aus dem wilden Pilz entnommen hatten und so vor allem präventiv Schimmelbildung im nächsten Schritt entgegengewirkt hatten, konnten wir nun neues Myzelium aus Proben des reinen Gewebes klonen. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass das neue Gewebe genetisch identisch ist mit dem des Fruchtkörpers, aus dem es entnommen wurde.

Bei dem Klonieren werden die Proben auf Petrischalen aufgeteilt und das Myzel wird in den Agar leicht eingedrückt, damit es sich richtig in dem Agar befindet.

Der Agar dient der Versorgung des Myzeliums mit Nährstoffen und Mineralien.

Hierbei mussten wir erstmal einen Blindversuch starten und dafür sorgen, dass wir erstmal Myzel aus dem Fruchtkörper isolieren, damit man dann folglich mit dem aus diesem „Blindversuch“ gezüchteten Myzel ausprobieren kann, wie die optimalen Wachstumsbedingungen sind.

Nach dem Blindversuch konnten wir neu gewachsene Hyphen, die von dem Stammmyzel aus wuchsen entnehmen.

Hierbei wird ein Teil des neu geklonten Gewebes, welches nun sehr rein von sämtlicher Verschmutzung ist, mit einer Pinzette von der Petrischale entfernt.

Diese Hyphen werden zur Weiterzüchtung und Vermehrung dann später in sterilem Reis kultiviert.

Doch wir mussten erst herausfinden, welche Zuchtbedingungen optimal für die Schmetterlingstramete sind.

Die erste Phase des Klonierens, als auch die nächste Phase der darauffolgenden Züchtung von Myzelgewebe, sind beide sehr stark von der Temperatur abhängig.

Deshalb haben wir zuerst eine Versuchsreihe zur Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen während der Petrischal-Phase gemacht.

Man sollte zudem erwähnen, dass wir obwohl es sozusagen ein Blindversuch war, wir Kartoffelagar als Nährboden für die Pilze verwendet hatten, da wir durch das oben bereits genannte Buch bereits ein paar Informationen gesammelt hatten, unter anderem die Aussage, dass der Kartoffelagar bereits bei anderen Pilzen sehr gute Ergebnisse in der Geschwindigkeit des Klonierens gezeigt hat.



In dem Blindversuch gelang es 3 von 5 isolierten Proben aus dem Ausgangsgewebe zu kultivieren. Die Proben, die in den Agar eingebettet wurden, wuchsen danach einige Zeit.



Hier sieht man den Fortschritt nach ein paar Tagen, von dem Myzel aus sind ca. ein halber Zentimeter Hyphen gewachsen.

Versuche zu optimalen Wachstumsbedingungen

Bei der Versuchsreihe der optimalen Wachstumsbedingungen gilt es nicht nur die optimale Temperatur herauszufinden, sondern auch den optimalen Nährboden.

Der Kartoffelagar, den wir während der Phase des Klonierens verwendet haben, ist nicht der einzige Agar, daher musste getestet werden, ob er tatsächlich, wie es in dem Buch hieß, der optimale Agar für unseren Pilz ist. Deshalb wollten wir allerdings auch andere Agarformen, die wir in weiterer Recherche ebenfalls herausgefunden hatten ebenfalls austesten.

Zuerst werde ich auf die Ergebnisse der Temperaturversuchsreihe eingehen, die Temperaturen für die Versuchsreihe hatten wir in verschiedenen Kühlschränken und Brutschränken erreicht.

Die Versuchsreihe hat gezeigt, wie sich oben in der Tabelle und in dem Säulen-Diagramm ablesen lässt, dass der Pilz am besten wächst, wenn er bei 25°C gezüchtet wird.

Die 25°C Kolonie zeigt ein erstaunliches Durchschnittswachstum von fast 15 mm pro Tag auf.

Man kann schließen, dass 25°C die beste Temperatur für das Wachstum ist, da wie das Säulendiagramm und die Durchschnittswerte für das Wachstum zeigen, die Geschwindigkeit am schnellsten bei 25°C ist.

Die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten steigen stetig von der 5°C Kolonie bis zur 25°C Kolonie, während ab 30°C die Wachstumsdurchschnittsgeschwindigkeit kleiner ist als bei 25°C, weshalb die Geschwindigkeit bei höheren Temperaturen als 30°C vermutlich ebenfalls kleiner sein werden als bei der 25°C Kolonie.

Zu der zweiten Versuchsreihe, bei der wir die den effektivsten Agar für die Schmetterlingstramete gesucht hatten lässt sich zuerst einmal sagen, dass der von uns in dem Blindversuch gewählte Kartoffelagar der beste Agar in der Versuchsreihe war und damit anscheinend die optimalen Nährstoffe in der optimalsten Menge enthielt.

Die, von uns verwendeten, unterschiedlichen Agararten waren zum einen eine gewöhnliche Agar-Wasser-Mischung, der bereits erwähnte Kartoffelagar, ein Brühwürfelagar und ein Malzextraktagar.

Zur Herstellung der Agar-Wasser-Mischungen kann man sagen, dass in dieser Mischung nur zwei Löffel Koble 1 Agar-Agar-Pulver enthalten sind, zusätzlich.

Bei dem Kartoffelagar wird eine zerriebene Kartoffel in einem Liter Wasser eine halbe bis 3/4 Stunde gekocht, in das Wasser, in dem jetzt die ausgekochten Nährstoffe aus der Kartoffel enthalten sind, werden danach 2 Teelöffel Agar-Agar-Pulver hineingegeben.

Zweitens ist bei dem Malzextrakt-Agar in einer Malzextrakt-Wasser-Mischung 2 Teelöffel Agar-Agar-Pulver gemischt. Die Mischungen besitzen bereits die richtige Konzentration und können dann auf Petrischalen aufgeteilt werden.

Die Brühwürfelagar-Mischung wird folgendermaßen hergestellt:

ein halber Brühwürfel wird in einem Liter Wasser aufgelöst und dazu 2 Teelöffel Agar-Agar-Pulver hinzugegeben.

Aus unserem Experiment zeigte sich, dass, wie schon oben erwähnt, der Kartoffelagar bei 25°C, da wir bei der ersten Versuchsreihe 25°C als Idealtemperatur herausgefunden haben, mit 14,64 mm pro Tag als Durchschnittsgeschwindigkeit den besten Nährboden darstellte.

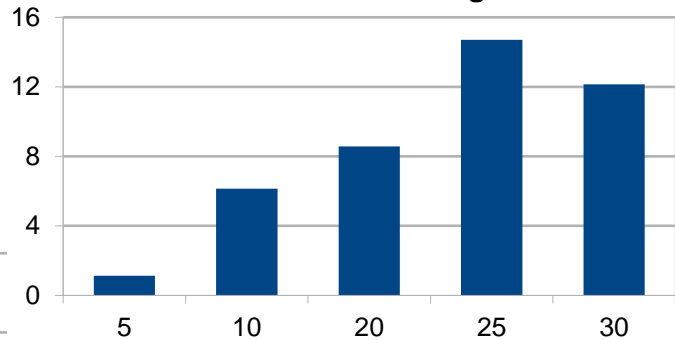
Der zweitbeste Nährboden war Malzextraktagar mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit 9,86 mm pro Tag während der drittbeste Nährboden Brühwürfelagar mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 8,64 mm pro Tag nicht viel weniger effizient war als Malzextraktagar. Die reine Agar-Wasser-Mischung ist der an Nährstoffen ärmste Agar und deswegen besitzt die Probe die geringste Wachstumsgeschwindigkeit von 3,71 mm pro Tag.



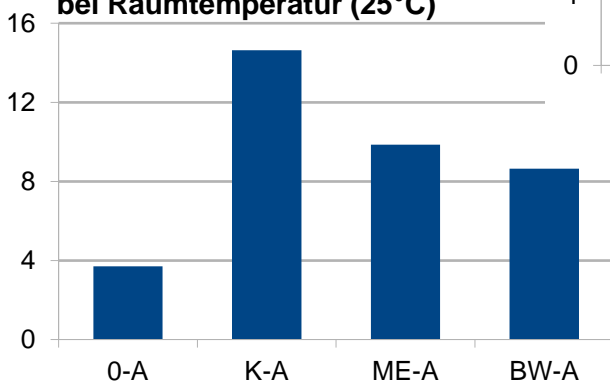
Aus diesen Gründen haben wir danach mit dem Kartoffelagar bei einer Temperatur von 25°C die Züchtung der Schmetterlingstramete betrieben.

Mycelwachstum in mm / Tag vs Temperatur									
5°C		10°C		20°C		25°C		30°C	
Tag	mm	Tag	mm	Tag	mm	Tag	mm	Tag	mm
1	0	1	4	1	6	1	12	1	10
2	1	2	7	2	7	2	16	2	14
3	1	3	5	3	8	3	18	3	12
4	2	4	7	4	9	4	11	4	12
5	2	5	8	5	10	5	14	5	14
6	1	6	6	6	11	6	17	6	13
7	2	7	7	7	10	7	15	7	11
Durchschnitt	1	6	9	15	12				

Mycelwachstum vs Temperatur
 Petrischalenkultur auf Kartoffelagar



Mycelwachstum vs Kulturmedium
 bei Raumtemperatur (25°C)



Mycelwachstum in mm / Tag vs Kulturmedium							
K-A		ME-A		BW-A		O-A	
Tag	mm	Tag	mm	Tag	mm	Tag	mm
1	12	1	10	1	8	1	6
2	14	2	8	2	7	2	3
3	16	3	11	3	10	3	4
4	13	4	9	4	9	4	4
5	17	5	9	5	10	5	2
6	15	6	12	6	8	6	3
7	16	7	10	7	9	7	4
Durchschnitt	15	10	9	4			

Vermehrung auf Reis

Nun mussten wir eine Technik finden, mit der wir das Myzelium wieder weiter vermehren konnten, denn ohne genug Myzelium, wäre es schwierig, Versuche damit anzustellen, wieviel Öl durch den Pilz aus einem Mutterboden gefiltert werden kann.

Wie oben bereits angemerkt entschieden wir uns für Reis als Nährboden für die Hyphen, welche sich durch diesen gut weiter entwickeln konnten, da der Reis durch Autoklavieren sterilisiert wurde.

Dieses Verfahren bedeutet, dass man den Reis in einem Autoklav bei ca. 120°C also einer hohen Temperatur, besonders einer zu hohen für jegliche Bakterien und 2 Bar Druck sterilisiert wird.



Danach werden Pilzproben in mehrere Einmachgläser mittels einem Skalpell und einer Pinzette gesetzt. Diesen Vorgang nennt man Beimpfen.

Diese Einmachgläser sind so aufgebaut, dass wir einen Baumwollstoff-Filter in ein Loch im Deckel des Glases gestopft haben (Bild rechts, 25°C Probe nach 10 Tagen). In dem Einmachglas befindet sich lediglich der Pilz mit dem sterilisierten Reis.

Auf dem Bild sieht man, dass die Hyphen um den Filter herum gewachsen sind, weshalb hier diese Kuhle entstanden ist.

Zudem haben wir auch hier zur Überprüfung unserer Versuche zu den optimalen Wachstumsbedingungen noch einmal mehrere Proben gewählt und in Einmachgläser mit dem autoklavierten Reis gesetzt und diese bei anderen Temperaturen über 3 Wochen beobachtet.

Hierbei ließ sich feststellen, dass auch bei der Züchtung die Hyphen, die bei 25°C gezüchtet wurden, die schnellste Vermehrung zeigten. Dies bestätigte unsere Testergebnisse aus der Versuchsreihe.





Hier sieht man den **Fortschritt nach 3 Tagen** den die beiden Proben die bei **5°C** und bei **25°C** gezüchtet wurden (5°C mit der **geringsten** Vermehrungsgeschwindigkeit, 25°C, mit der **höchsten** Vermehrungsgeschwindigkeit).



Fortschritt nach **10 Tagen**...

Die unterschiedlich schnelle Wachstumsgeschwindigkeit lässt sich also auch hier erkennen. 25°C sind für die Schmetterlingstramete also die beste Temperatur, um zu wachsen.

Allerdings sieht man bei der Züchtung mit Reis schnell ein Problem an der rasanten Zuchtgeschwindigkeit. Der Pilz, dessen Wachstum auf die Zersetzung des Reis durch Exo-Enzyme, das Verdauungssystem des Pilzes, zurückzuführen ist, bezieht so die Nährstoffe aus dem Reis, dieser Zersetzungsprozess lässt sich daran erkennen, dass der Reis aufquillt und sich gelb-orange färbt. (Bild rechts).



Hier sieht man den Reis nach 3 Wochen, der Pilz ist, nachdem der Reis nur noch wenige Nährstoffe enthielt, wieder eingefallen. Das rechte Einmachglas ist die 25°C Probe.

Hier sieht man auch, dass die schnellere Wachstumsgeschwindigkeit, auch zum schnelleren Verdauen des Reises führen.

Die Verdauung durch die Exo-Enzyme zersetzt also nach und nach den Reis, daher haben wir den Pilz zur weiteren Züchtung auf sein natürliches Substrat gesetzt.

Im Falle der Schmetterlingstramete haben wir Buchensägemehl verwendet welches wir mit dem beimpften Reis versetzt haben.



Das Buchensägemehl haben wir mit dem beimpften Reis mit einer Konzentration von 90% Sägemehl und 10% beimpften Reis in eine Plastiktüte getan.

Dies geschah mit der 25°C Kolonie etwa eine Woche nachdem der Reis beimpft wurde.

Die Tüte haben wir ebenfalls mit einem Baumwollfilter zusammenverbunden (Bild oben), dieser wurde zwischen zwei Knoten platziert.

Das Bild zeigt die umgesiedelten Kolonien nach etwa 2 bis 3 Wochen nach der Umsiedlung.

Nach 3 bis 4 Wochen werden wir dann in den Beutel Schlitz an der Oberseite schneiden, in dem sich dann schon eine große Gewebestruktur entwickelt hat.

Wenn sich nach ein paar Tagen Fruchtkörper bilden, kann man dies als Beweis ansehen, dass die Pilzkolonien sich sehr wohlfühlen, bzw. sehr gute Wachstumsbedingungen haben, als auch eine Überversorgung an Nährstoffen, denn zur Bildung eines Fruchtkörpers kommt es nur, wenn der Pilz mehr Nährstoffe erhält, als er tatsächlich benötigt.

Nun, da wir die am besten geeignetste Art zur Züchtung einer Pilzkolonie gefunden hatten, konnten wir beginnen Tests durchzuführen, wie das Potential des Pilzes ist, Öl und Benzin in für den Pilz verwendbare Stoffe umzubauen.



Beimpfung und Toleranztest auf verschiedenen Konzentrationen von Öl und Benzin

Nach der erfolgreichen Vermehrung des Mycels musste der erste Versuch hinsichtlich der Toleranz des Pilzes gegenüber Benzin beziehungsweise Öl angestellt werden.

Hierzu wurde Mycel einer Mutterkolonie auf Kartoffelagarplatten ausgebracht, die jeweils mit Öl- oder Benzin kontaminiert waren (vgl. Bild). Ziel des Testes war heraus zu finden ob der Pilz Potential hat dies abzubauen. Die Öl/Benzin Konzentrationen waren dabei je gestaffelt in 10%, 1%, 0,1%, 0,01% und 0,001%. Pro Konzentration wurde nur eine Petrischale angelegt, daher sind die einzelnen Wachstumsraten statistisch nicht abgesichert.

Die Ergebnisse des Toleranztestes zeigen dennoch deutlich auf dass der Pilz eine höhere Toleranz Öl gegenüber hat, dabei gilt hier Wachstum als Indikator für Toleranz. Bis 1% wächst der Pilz gleich gut auf Öl oder Benzin, bei 10% zeigt der Pilz auf Öl erstmalige Wachstumseinbußen, auf Benzin bereits ab 0,1%.

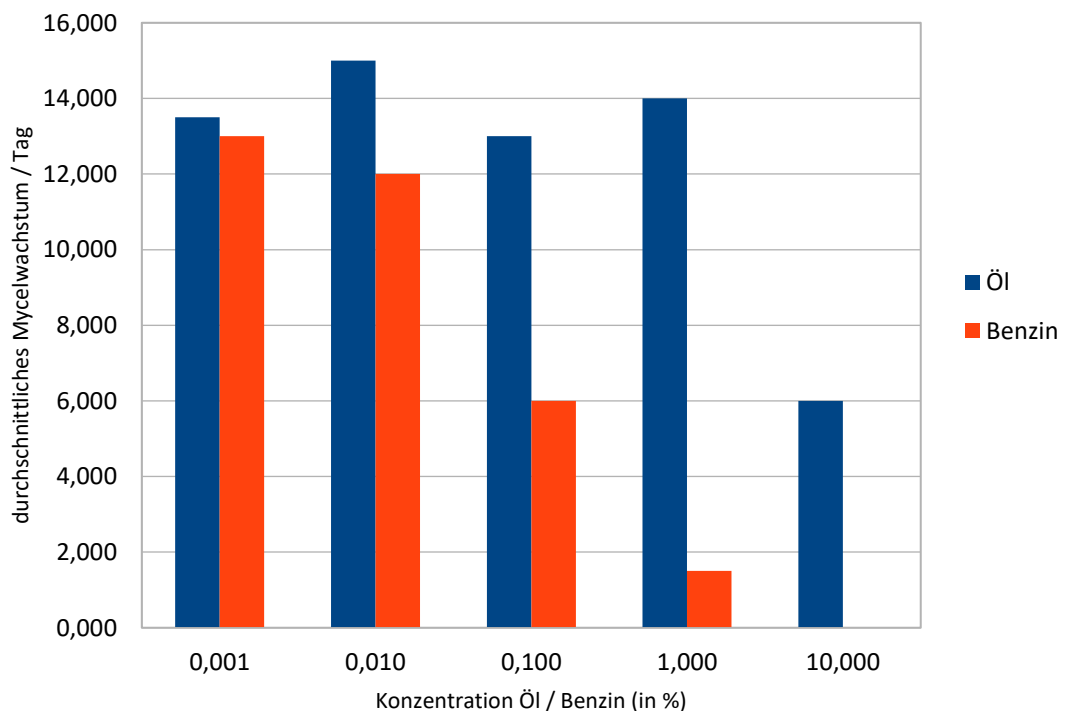


Toleranz + Wachstumstest

Ölkonzentration (in %)	0,001	0,010	0,100	1,000	10,000	
Durchschnittliches Mycelwachstum / Tag (in mm)	13,50	0	15,000	13,000	14,000	6,000

Benzinkonzentration (in %)	0,001	0,010	0,100	1,000	10,000	
Durchschnittliches Mycelwachstum / Tag (in mm)	13,00	0	12,000	6,000	1,500	0,000

Toleranz- und Wachstumstest



In der obigen Grafik wird das durchschnittliche Mycelwachstum pro Tag hinsichtlich der Konzentration von Öl/Benzin in Prozent veranschaulicht. Wobei der Pilz auf Öl (mit blau gekennzeichnet) erste Wachstumseinbußen erst bei 10% zeigt, da sinkt das durchschnittliche Mycelwachstum pro Tag von ca. 14.000 auf 6.000. Der Pilz auf Benzin zeigt jedoch schon deutlich frühere Wachstumseinbußen. Hier sinkt das durchschnittliche Mycelwachstum schon bei einer Benzinkonzentration von 0,1% von 12.000 auf 6.000. Während der Pilz sogar auf einer Ölkonzentration von 10% wächst findet bei einer Benzinkonzentration von 10% keinerlei Mycelwachstum mehr statt. Dies zeigt eine deutlich höhere Toleranz des Pilzes Öl gegenüber.

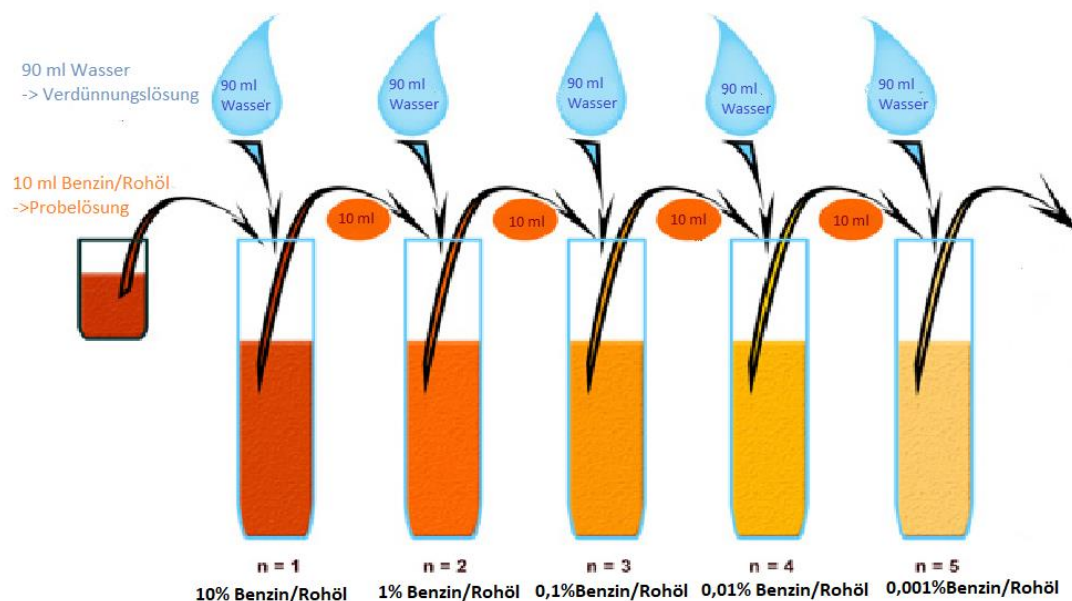
Entwicklung eines Ökologietests zur späteren Beurteilung des Reinigungspotentials des noch zu bauenden Pilzfilters

Nachdem wir die Pilze auf ihre Toleranz gegenüber Öl und Benzin getestet hatten, war unser nächstes Ziel, ihr Reinigungspotential für verunreinigtes Wasser zu testen.

Damit eine präzisere Beurteilung des Reinigungspotentials stattfinden konnte, entwickelten wir einen Ökologischen Test basierend auf den Literaturvorgaben des Buches „Organic Mushroom Farming and Mycoremediation“ von Tradd Cotter entwickelt. Dieser Ökotest erlaubt eine effektive Einschätzung der Auswirkungen von chemischen Kontamination auf Pflanzen. Die Grundidee bestand darin, Pflanzensamen mit verschiedenen Verdünnungsstufen von Benzin und Rohöl (mit Wasser) zu wässern, und ihr Wachstum tabellarisch festzuhalten. Dabei stellte sich heraus, dass Pflanzen, die mit hohen Konzentrationen von Benzin und Rohöl gewässert wurden, Mangelerscheinungen hatten, und trotz gleicher Umweltbedingungen schlechter wuchsen, als die niedrigen Konzentrationen oder die Kontrollgruppe.

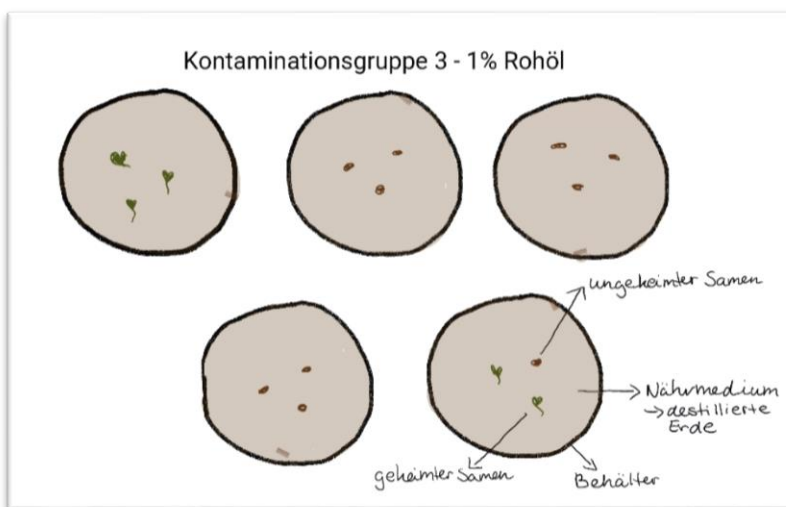
Im weiteren Verlauf des Versuches wird nun ein Pilzfilter gebaut, durch den das verunreinigte Wasser geleitet werden kann. Eine zweite Versuchsgruppe würde angepflanzt und mit dem gefilterten Wasser gewässert werden. Ein Vergleich zwischen dem Wachstum der beiden Versuchsgruppen würde nun Auskunft über das Reinigungspotential des Pilzfilters geben, und es ließen sich Rückschlüsse auf die Anwendung als Reinigungsmittel für Öllachen auf dem Meer treffen.

Um mit der Anpflanzung der ersten Versuchsgruppe zu beginnen, mussten wir uns für eine Samenart entscheiden. Hier wählten wir Radieschen, da sie eine Keimzeit von nur einer Woche haben, und nahmen in einer weiteren Versuchsreihe auch noch Kresse hinzu. Wir begannen den Anbau damit, eine Verdünnungsreihe



von 100%- 0,001% Verunreinigung von jeweils Benzin und Rohöl herzustellen. Dazu füllten wir in je fünf Reagenzgläser 90 ml destilliertes Wasser, und beschrifteten sie mit den Verdünnungsstufen von 10%- 0,001%. Danach pipettierten wir 10 ml reines Rohöl bzw. Benzin in das 10% Reagenzglas, um eine 10-prozentige Verdünnungsstufe zu erreichen. Im Folgenden pipettierten wir 10 ml der 10%-Lösung in das 1% Reagenzglas, etc.

Dadurch wurden jeweils fünf verschiedene Verdünnungen (10%- 0,001%) von Benzin/ Rohöl mit Wasser hergestellt. Zusätzlich füllten wir in drei weitere Reagenzgläser je 100 ml destilliertes Wasser, 100 ml Rohöl und 100 ml Benzin. In jedes Reagenzglas wurden nun 15 Radieschen-Samen gefüllt, die 24 Stunden in verschlossenen Reagenzgläser einweichen konnten. Dies sorgte dafür, dass die die Pflanzensamen sich schon vor dem eigentlichen einpflanzen mit der Flüssigkeit vollsaugen, und so die Kontamination stärker wirkt, was deutlichere Ergebnisse zu Folge hatten. Nach den 24 Stunden kann man die Samen aus der Flüssigkeit entfernen, und einpflanzen. Da es immer Radieschen-Samen geben kann, die aufgrund von verschiedenen Umständen nicht keimen, haben wir pro Kontaminationsstufe je fünf Behälter mit je drei Samen in destillierter Erde bepflanzt.



Pro Stoff (Benzin/ Rohöl) hatten wir nun sechs Kontaminationsgruppen (100%- 0,001% Verunreinigung), plus eine Kontrollgruppe, die nur mit Wasser gewässert wurde

Alle Kontaminationsgruppen und die Kontrollgruppe wurden unter gleichen Bedingungen bei Raumtemperatur gehalten, und regelmäßig mit 3ml- 15ml des verunreinigten Wassers in ihrer jeweiligen Kontaminationsstufe gewässert (z.B.: wurde die dargestellte Kontaminationsgruppe 3 mit 1% verdünntem Rohöl gewässert). Ihre Wachstumsergebnisse wurden tabellarisch festgehalten (siehe Anhang).

So wuchsen die Radieschen, die mit reinem Rohöl gewässert worden waren gar nicht, doch schon ab einer 10%-Verdünnungsstufe, keimten Samen aus drei Behältern; sie wurden aber nach ca. 3 Wochen nur 2-5 cm groß. Im Vergleich dazu wuchsen die Radieschen der 0,001%-Verdünnungsstufe um 10 cm hoch. Ähnliche Unterschiede waren bei den Radieschen sichtbar, die mit Benzin- Verdünnungen gewässert wurden.

Generell war das Wachstum bei den Pflanzen, die mit Benzin- Konzentrationen gewässert wurden stärker eingeschränkt als bei denen, die mit Rohöl- Konzentrationen gewässert worden sind. Dies liegt vermutlich daran, dass Benzin stärker als Rohöl verarbeitet wird, und somit zusätzliche Schadstoffe in der Produktion entstehen, die das Wachstum ebenfalls hemmen.

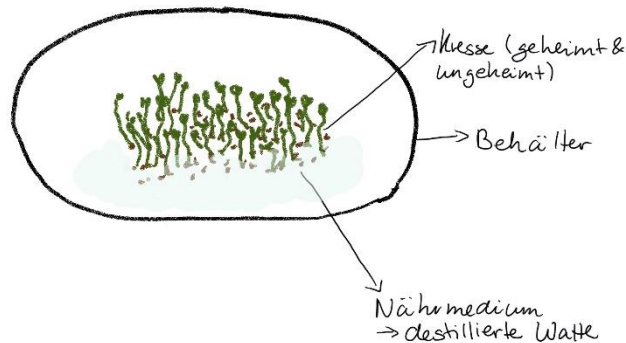
Zusammenfassend sind Radieschen anfällig auf die Verunreinigung, und reagieren selbst auf minimale Verdünnungsunterschiede mit einem unterschiedlichen Wachstumsverhalten. Damit sind sie als Vergleichsmittel für die Pilzfilter-Versuchsgruppe geeignet.

Wir wiederholten denselben Versuch mit Kresse, weil wir die unterschiedliche Reaktion auf die Verunreinigung vergleichen wollten, und somit auf die geeignetste Pflanzenart für die folgenden Versuche mit dem Pilzfilter schließen wollten. Denn je anfälliger eine Pflanzenart auf Kontamination reagiert, desto eher eignet sie sich für

den Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen. Durch die starke Anfälligkeit können selbst kleine Verunreinigungen auf den Wachstumsvorgang der Pflanze Auswirkungen haben, was die Beurteilung der Reinigungskraft des Filters sicherer macht.

Wir wiederholten demnach den oben beschriebenen Vorgang erneut, nur mit Kresse-Samen. Auch das Nährmedium ersetzten wir durch sterile Watte, die in der Flüssigkeit der jeweiligen Konzentration getränkt war.

Kontaminationsgruppe 5 - 0,01% Rohöl



Pro Stoff (Benzin/ Rohöl) hatten wir nun sechs Kontaminationsgruppen (100%-0,001% Verunreinigung), plus eine Kontrollgruppe, die nur mit Wasser gewässert wurde

Die Kresse-Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen bei Raumtemperatur gehalten, und es wurde darauf geachtet, dass die Watte immer in ihrer jeweiligen Kontaminationsstufe getränkt und somit feucht war (z.B.: wurde die dargestellte Kontaminationsgruppe 5 mit 0,01% verdünntem Rohöl getränkt). Ihre Wachstumsergebnisse wurden ebenfalls tabellarisch festgehalten (siehe Anhang).

Jedoch gab es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Wachstumsvorgang der Radieschen und der Kresse:

Während die einzelnen Konzentrationsunterschiede bei den Radieschen auch gravierende Wachstumsunterschiede zur Folge hatten, war dies bei der Kresse nicht der Fall. Nur die Kresse, die mit reinem Rohöl bzw. Benzin gewässert wurde, ist gar nicht gekeimt. Der Rest der Kresse keimte, und wuchs mit relativ geringer Veränderung zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen heran. Dies zeigt, dass Kresse ein sehr robustes Kraut ist, das wenig anfällig auf Verunreinigung durch Benzin und Rohöl reagiert.

Somit ist Kresse keine geeignete Vergleichs-Pflanze, für unsere zweite Versuchsgruppe, da auch mit schlecht gefiltertem Wasser ähnliche Wachstumsfortschritte machen würde wie mit gutem.

Anhang

1) Versuchsgruppe_1 mit Kresse

Kresse Benzin	Wachstum					
	Kresse 100%	Kresse 10%	Kresse 1%	Kresse 0,1%	Kresse 0,01%	Kresse 0,001%
30.12.2018						
31.12.2018						
01.01.2019	kein Wachstum	Keimbeginn	Keimbeginn	Keimbeginn	Keimbeginn	Keimbeginn
02.01.2019						
03.01.2019						
04.01.2019						
05.01.2019						
06.01.2019	kein Wachstum	kein wirkliches Wachstum, schwache Keimung	gutes Wachstum, 4-6 cm	starke Keimung, 2-7 cm	gutes Wachstum, aber sehr schwache Stängel	Sehr starkes Wachstum, 3-6 cm
07.01.2019						
08.01.2019						
09.01.2019						
10.01.2019						
11.01.2019		schwache Keimung, ca. 0,1 cm groß	starke Keimung, schwache Stängel 7-9 cm groß	starke Keimung, schwache Stängel, 5-8 cm	starke Keimung, schwache Stängel, sehr groß	sehr starke Keimung, ca. 5-9 cm groß
12.01.2019						
13.01.2019	Fazit: Kein Wachstum, alle sind abgestorben					

Kresse Control	Wachstum
30.12.2018	
31.12.2018	
01.01.2019	Keimbeginn
02.01.2019	
03.01.2019	
04.01.2019	
05.01.2019	
06.01.2019	gute Keimung, ca. 4 cm
07.01.2019	
08.01.2019	
09.01.2019	
10.01.2019	
11.01.2019	sehr gesund, starke Stängel, 8 cm
12.01.2019	
13.01.2019	

Kresse Rohöl	Wachstum					
	Kresse 100%	Kresse 10%	Kresse 1%	Kresse 0,1%	Kresse 0,01%	Kresse 0,001%
30.12.2018						
31.12.2018						
01.01.2019	kein Wachstum	Keimbeginn	Keimbeginn	Keimbeginn	Keimbeginn	Keimbeginn
02.01.2019						
03.01.2019						
04.01.2019						
05.01.2019						
06.01.2019		1 cm, kaum gekeimt	2 cm mittlere Keimung	2 cm, gute Keimung	3 cm, wenig ist gekeimt	gutes Wachstum, 3 cm
07.01.2019						
08.01.2019						
09.01.2019						
10.01.2019						
11.01.2019		3 cm, geht immer mehr ein	5 cm, gutes Wachstum	5 cm, sehr starke und gesunde Stängel	4 cm, schwache Keimung, starke Stängel	6 cm, starkes Wachstum
12.01.2019						
13.01.2019	Fazit: Kein Wachstum, alle sind abgestorben					

2) Versuchsgrupp_1 mit Radieschen

Wachstum der Radieschen							
Verseuchung mit Rohöl	Radieschen 1- 100%			Radieschen 2- 10%			
Datum	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	
24.12.2018			3 ml			3 ml	
25.12.2018			3 ml			3 ml	
26.12.2018			3 ml			3 ml	
27.12.2018							
28.12.2018			3 ml			3 ml	
29.12.2018			3 ml			3 ml	
30.12.2018							
31.12.2018			3 ml	Keimbeginn	1 cm	3 ml	
01.01.2019			3 ml	3 Behälter sind gesprießt	2 cm	3 ml	
02.01.2019							
03.01.2019							
04.01.2019							
05.01.2019			15ml		3 cm	15ml	
06.01.2019							
07.01.2019			3 ml		4cm	3 ml	
08.01.2019							
09.01.2019			15 ml	4 Behälter sind gesprießt, sehr schwach, gehen ein	5 cm	15 ml	
10.01.2019							
11.01.2019			15 ml		5,5 cm	15 ml	
12.01.2019							
13.01.2019	kein Wachstum, alle sind tot						

Wachstum der Radieschen							
Verseuchung mit Rohöl	Radieschen 3- 1%			Radieschen 4- 0,1%			
Datum	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	
24.12.2018			3 ml			3 ml	
25.12.2018			3 ml			3 ml	
26.12.2018			3 ml			3 ml	
27.12.2018							
28.12.2018			3 ml			3 ml	
29.12.2018			3 ml			3 ml	
30.12.2018				Keimbeginn, 1 Behälter	0,5 cm		
31.12.2018	Keimbeginn, 2 Behälter	1 cm	3 ml			3 ml	
01.01.2019	3 Behälter sind gesprießt, schwach	2 cm	3 ml	2 Behälter sind gesprießt	1cm	3 ml	
02.01.2019							
03.01.2019							
04.01.2019							
05.01.2019		2,5 cm	15ml		4cm	15ml	
06.01.2019							
07.01.2019		4cm	3 ml		7cm	3 ml	
08.01.2019							
09.01.2019	3 Behälter sind gesprießt	6 cm	15 ml	4 Behälter sind gesprießt	8 cm	15 ml	
10.01.2019							
11.01.2019		7 cm	15 ml		9 cm	15 ml	
12.01.2019							
13.01.2019							

Wachstum der Radieschen							
Verseuchung mit Rohöl	Radieschen 5- 0,01%			Radieschen 6- 0,001%			
Datum	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	
24.12.2018			3 ml			3 ml	
25.12.2018			3 ml			3 ml	
26.12.2018			3 ml			3 ml	
27.12.2018							
28.12.2018			3 ml			3 ml	
29.12.2018							
30.12.2018	Keimbeginn	1 cm	3 ml	Keimbeginn	1 cm	3 ml	
31.12.2018			3 ml			3 ml	
01.01.2019	5 Behälter sind gesprießt, sehr gesund	3 cm		5 Behälter sind gesprießt, sehr gesund, stark	3 cm		
02.01.2019							
03.01.2019							
04.01.2019		5 cm	15ml		5cm	15ml	
05.01.2019							
06.01.2019		6 cm	3 ml		7cm	3 ml	
07.01.2019							
08.01.2019		8,5 cm	15 ml		9 cm	15 ml	
09.01.2019							
10.01.2019		9cm	15 ml		10 cm	15 ml	
11.01.2019							
12.01.2019							
13.01.2019							

Wachstum der Radieschen							
Verseuchung mit Benzin	Radieschen 1- 100%			Radieschen 2- 10%			
Datum	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	
24.12.2018			3 ml			3 ml	
25.12.2018			3 ml			3 ml	
26.12.2018			3 ml			3 ml	
27.12.2018							
28.12.2018			3 ml			3 ml	
29.12.2018			3 ml			3 ml	
30.12.2018							
31.12.2018		1 cm	3 ml	Keimbeginn	0,5 cm		
01.01.2019			3 ml	2 Keimlinge wachsen	1 cm	3 ml	
02.01.2019							
03.01.2019							
04.01.2019							
05.01.2019		1-3cm	15ml	3 Keimlinge wachsen	1-3cm	15ml	
06.01.2019							
07.01.2019			3 ml			3 ml	
08.01.2019							
09.01.2019		2-4 cm	15 ml	3 Keimlinge wachsen, sehr schwach	2-4 cm	15 ml	
10.01.2019							
11.01.2019	Fazit: Kein Wachstum bemerkbar		15 ml		3-4,5 cm	15 ml	
12.01.2019							
13.01.2019							

Wachstum der Radieschen							
Verseuchung mit Benzin	Radieschen 3- 1%			Radieschen 4- 0,1%			
Datum	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	
24.12.2018	Samen keimen bereits vor dem Bepflanzen		3 ml	Samen keimen bereits vor dem Bepflanzen		3 ml	
25.12.2018			3 ml			3 ml	
26.12.2018			3 ml			3 ml	
27.12.2018							
28.12.2018			3 ml			3 ml	
29.12.2018			3 ml			3 ml	
30.12.2018							
31.12.2018	Keimbeginn, 2 Behälter sind gekeimt	1 cm	3 ml	Keimbeginn, 3 Behälter sind gekeimt	1 cm	3 ml	
01.01.2019			3 ml			3 ml	
02.01.2019		2 cm					
03.01.2019							
04.01.2019							
05.01.2019		3cm	15ml		3cm	15ml	
06.01.2019							
07.01.2019		5cm	3 ml		5cm	3 ml	
08.01.2019							
09.01.2019	4 Behälter sind gekeimt, schwache Stängel	6 cm	15 ml	5 Behälter sind gekeimt, schwache Stängel	7 cm	15 ml	
10.01.2019							
11.01.2019		6,5 cm	15 ml		7-8 cm	15 ml	
12.01.2019							
13.01.2019							

Wachstum der Radieschen							
Verseuchung mit Benzin	Radieschen 5- 0,01%			Radieschen 6- 0,001%			
Datum	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme	
24.12.2018	Samen keimen bereits vor dem Bepflanzen		3 ml	Samen keimen bereits vor dem Bepflanzen		3 ml	
25.12.2018			3 ml			3 ml	
26.12.2018			3 ml			3 ml	
27.12.2018							
28.12.2018			3 ml			3 ml	
29.12.2018			3 ml	Keimbeginn, 2 Behälter sind gekeimt	1 cm	3 ml	
30.12.2018	Keimbeginn, 3 Behälter sind gekeimt	1 cm					
31.12.2018			3 ml			3 ml	
01.01.2019			3 ml		4cm	3 ml	
02.01.2019							
03.01.2019							
04.01.2019							
05.01.2019		6cm	15ml		6cm	15ml	
06.01.2019							
07.01.2019		8 cm	3 ml		8cm	3 ml	
08.01.2019							
09.01.2019	5 Behälter sind gekeimt, schwache Stängel	8,5 cm	15 ml	5 Behälter sind gekeimt, schwache Stängel, brechen leicht	9cm	15 ml	
10.01.2019							
11.01.2019			15 ml			15 ml	
12.01.2019							
13.01.2019							

Wachstum der Radieschen			
Kontrollgruppe			
Datum	Bemerkungen	Wachstum	Wasseraufnahme
24.12.2018			3 ml
25.12.2018			3 ml
26.12.2018			3 ml
27.12.2018			
28.12.2018			3 ml
29.12.2018	Keimbeginn, 3 Behälter	1 cm	3 ml
30.12.2018			
31.12.2018		2cm	3 ml
01.01.2019			3 ml
02.01.2019			
03.01.2019		5cm	
04.01.2019			
05.01.2019		7 cm	15ml
06.01.2019			
07.01.2019		9,5 cm	3 ml
08.01.2019			
09.01.2019	5 Behälter sind gekeimt	11 cm	15 ml
10.01.2019			
11.01.2019		12 cm	15 ml
12.01.2019			
13.01.2019			

Quellen

- https://motherboard.vice.com/en_us/article/jp5k9x/the-plan-to-mop-up-the-worlds-largest-oil-spill-with-fungus
- <http://udsspace.uds.edu.gh/handle/123456789/461>
- http://www.lifesciencesite.com/lcj/life120515/013_28011life120515_109_121.pdf
- https://de.wikipedia.org/wiki/Erd%C3%B6l#Migration_%E2%80%93_Bildung_konventioneller_Lagerst%C3%A4tten
- Fachliteratur: „Organic Mushroom Farming and Mycoremediation“ von Tradd Cotter

Unterstützer

- Dennis Nebe, Biologielehrer und Projektbetreuer
- KfZ- Technik Dorweiler (stellte uns Rohöl und Benzin für unsere Versuche zur Verfügung)