

SCHWEISFURTH: Ohne weitere Literaturkenntnisse möchte ich doch meinen, daß es mit Hilfe von kontinuierlichen Kulturverfahren möglich sein sollte, konstante Mischkulturen zu erhalten. Wie schon gesagt, wir haben in Homburg Untersuchungen in dieser Richtung begonnen.

### Vermehrung von Mikroorganismen in Öltröpfen

SCHWEISFURTH: Ich möchte über erste Versuche zur Frage der Vermehrung von Mikroorganismen in Öltröpfen berichten. Bei Versuchen über den mikrobiellen Abbau von Kohlenwasserstoffen (KWS) in von unten belüfteten Kolben fiel als erstes auf, daß nach 2 bis 3 Tagen der Kultur eine Emulgierung stattfindet, bei der anfangs größere Tropfen des jeweils zugefügten Substrates vorlagen, die in der Folge mechanisch, durch vermutlich gebildete oberflächenaktive Stoffe und durch Verzehr weiter verkleinert wurden. Mit zunehmendem Alter der Mischkulturen und der Erschöpfung der N- und PO<sub>4</sub>-Quellen war der KWS soweit verändert, daß nach Abstellen der Belüftung Rest-Kohlenwasserstoffe teilweise absanken und am Boden liegenblieben.

Da beim Durchströmen der beimpften Flüssigkeitskulturen mit Stickstoff die Bildung von KWS-Tropfen nicht stattfand, eine rein mechanische Zerstörung der auf die Oberfläche der Mineralsalzlösung gegebenen Kohlenwasserstoffe also ausblieb, muß eine Beteiligung von Stoffwechselprodukten der Mikroorganismen vorliegen. Beobachtungen hierzu sind bereits verschiedentlich publiziert worden (LA RIVIÈRE 1955a, b).

Die Tropfenbildung veranlaßte uns zu mikroskopischen Untersuchungen, da es auch von grundsätzlichem Interesse war, festzustellen, ob Mikroben in Öltröpfen eindringen können oder ob ein Angriff nur von außen erfolgen kann.

Beim Abbau von C<sub>16</sub>-Paraffin fiel nach etwa zweitägiger Kulturdauer auf, daß auf den KWS-Tropfen kleine Tröpfchen lagen. In der gleichen Kultur fanden sich nach 3 bis 4 Tagen massenhaft Öltröpfen, deren Oberfläche dicht mit Bakterien besetzt waren. Später traten dann die kugelrunden Öltröpfen zurück, es zeigten sich schlierenförmige Gebilde, die nach weiterer Bebrütung zu „Detritus“ zerfielen. In gealterten Flüssigkeitskulturen lagen die Mikroorganismen frei in der Lösung und am Boden vor.

Im Gegensatz hierzu schien nach den ersten Versuchen mit Rohöl ein Eindringen der Bakterien in das Öl relativ schnell zu erfolgen. Ein Beweis für das Eindringen konnte bislang höchstens indirekt geführt werden, da bei der mikroskopischen Untersuchung besiedelten Öls ohne besondere Kunstgriffe nicht schlüssig beurteilt werden konnte, ob die Mikroben nicht doch noch auf der Oberfläche von Ölschlieren oder -tropfen lagen.

Bei Kulturen mit Rohöl fiel auf, daß fast alle Bakterien in (oder auf?) den Ölschlieren lagen und daß sie auch bei gealterten Kulturen im Bodensatz nur selten frei in der Lösung zu finden waren. Dies könnte für eine Vermehrung der Mikroben im Öl selbst sprechen. Ferner beobachteten wir bei Objektträgerkulturen, daß Öltröpfen mit Bakterien innerhalb weniger Sekunden „in“ steriles Öl eindringen und sich die Bakterien in der Folge darin vermehren können.

WALLHÄUSSER: Was sollen die Bakterien ausrichten können, die in den Öltröpfen eingedrungen sind?

GUNKEL: HEYER (1966) berichtete über das Wachstum von Bakterien in den wäßrigen Medien. Er ist der Ansicht, daß der Übertritt in das Öl ein rein physikalischer Vorgang ist, der nicht an die lebende Zelle gebunden ist. Verantwortlich soll ein Überwiegen hydrophober Gruppen auf der Zelloberfläche sein. Eine Vermehrung soll auch hier fast ausschließlich an der Grenzfläche Öl-Wasser stattfinden, wobei hier die Bakterien die Ölseite der Grenzfläche besiedeln.

### Isolation von Reinkulturen ölabbauender Bakterien

THON: Ich möchte über eine Methode berichten, die auf relativ einfache Weise gestattet, Reinkulturen ölabbauender Mikroorganismen zu isolieren. Hiermit kann man Ölabbauer auch aus Untersuchungsmaterial gewinnen, in welchem sie in sehr geringer Anzahl vorkommen, ohne

daß eine Zwischenschaltung einer Anreicherungskultur notwendig ist. Wir haben Seewasser durch Membranfilter filtriert, dann das Filter auf einen Filterkarton gelegt, der mit gealtertem Seewasser – supplementiert mit anorganischen Stickstoff- und Phosphorsalzen – getränkt war. Die Petrischale mit dem Filter wurde in einen Exsikkator gebracht, in dessen Fuß Petroleum eingefüllt worden war. Die Menge Petroleum war in den einzelnen Versuchen verschieden groß. Der Exsikkator wurde teilweise evakuiert. Nach wenigen Tagen Bebrütung zeigten sich Bakterienkolonien auf dem Filter. Im Nachttest ergab sich, daß es sich in allen Fällen um äußerst aktive Petroleumabbauer handelte. Überimpfung von den Kolonien in Abbaufaschen zeigte bereits nach ca. 12 Stunden makroskopisch deutliche Petroleumabnahme und Bakterienvermehrung.

WALLHÄUSER: Zur Isolation insbesondere von Mycobakterien kann man Mineralagar beimpfen und in einen Exsikkator mit Benzoldämpfen einbringen. Es ist jedoch ganz erstaunlich, daß Sie in solch kurzer Zeit einen Abbau hatten. Haben Sie auch andere Öle verwandt?

THON: Ja, zum Beispiel mit Heizöl M. Hier habe ich allerdings einen Öltropfen jeweils an die Seite des Filterkartons gegeben.

WALLHÄUSER: Ist es nicht möglich, daß aus dem Filterkarton etwas herausgelöst wurde, was als Kohlenstoffquelle dienen könnte? Können Sie mit Sicherheit einen Zelluloseabbau ausschließen?

THON: Das ist mit Sicherheit auszuschließen, denn wir haben stets Nachkulturen durchgeführt. Ohne Zufügung von Ölen erhielten wir kein Wachstum, dagegen mit Ölen eine äußerst rasche Vermehrung der Bakterien auf Kosten des Öls. Allerdings muß man diese Kontrollen sehr sorgfältig durchführen. In einigen Fällen genügte bereits die in der Institutsluft vorhandenen Petroleumspuren, um einen schwachen Wuchs zu gestatten. Dies konnten wir jedoch leicht ausschalten, indem wir die Kontrollpetrischalen in Exsikkatoren einbrachten, die wir zunächst evakuierten und dann wieder belüfteten, wobei die zuströmende Luft durch Aktivkohle geleitet wurde.

WALLHÄUSER: In den Kartons können auch Hemmstoffe enthalten sein.

THON: Die Kartonscheiben wurden, bevor wir sie verwandten, von uns in Aqua destillata ausgiebig gewässert, um auch diese Möglichkeit auszuschließen.

BLOKKER: Ist etwas bekannt darüber, ob die Geschwindigkeit des Ölabbaues in Süß- oder Salzwasser schneller ist?

WALLHÄUSER: Ich habe keine Erfahrungen darüber.

KÜHL: Vorausgesetzt, daß das Nährstoffangebot gleich ist, geht es im Seewasser schneller.

SCHÖBERL: Sie sprachen vorhin von Enzym-Präparaten, die man zusetzt.

WALLHÄUSER: Wir haben Trockenkulturen von *Desulfovibrio* und auch *Hormodendron* zu öligem Erdboden zugesetzt, und wir haben den Eindruck, daß es etwas schneller geht. Die Gesamtkultur wurde gefriergetrocknet. Es wäre denkbar, daß man mit Trockenmycel noch etwas ausrichten könnte, das mit Erde vermischt wird. Der Ölabbau geht unter diesen Voraussetzungen etwas schneller, aber nicht schnell genug.

SCHÖBERL: Hierbei handelt es sich um Ganzzellen. Interessant wäre, ob Enzympräparate dieselbe oder eine schnellere Wirkung haben, denn es würden Permeabilitätsschwierigkeiten wegfallen.

WALLHÄUSER: Diese Frage wurde von uns bisher noch nicht untersucht.

### Gewinnung von Eiweiß aus Erdöl und Erdgas durch Mikroorganismen

GUNKEL: In Frankreich, in Schottland und der UdSSR werden seit einer Reihe von Jahren Untersuchungen durchgeführt, um Protein für die tierische und menschliche Ernährung im großtechnischen Maßstab aus Erdöl und Erdgas herzustellen (z. B. CHAMPAGNAT et al. 1963).