Anwendung von Mikroorganismen in Biorieselbettreaktoren zur Reinigung industrieller Abluftströme am Beispiel von Geflügelställen

Von der Fakultät für Ingenieurwissenschaften

der Universität Bayreuth

zur Erlangung der Würde

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von

Julian Eckert, M. Sc.

aus

Gunzenhausen

Gutachterinnen: Prof. Dr. rer. nat. Ruth Freitag
Prof. Dr.-Ing. Sabine Grüner-Lempart

Diese Dissertation ist im Rahmen einer kooperativen Promotion mit der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf entstanden.

Tag der mündlichen Prüfung: 31.07.2025

Lehrstuhl für Bioprozesstechnik

Universität Bayreuth

2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Entwicklung und Folgen des weltweiten Fleischkonsums 1
1.2 Zielstellung 2
2. Theoretische Grundlagen 3
2.1 Mikrobiologische Grundlagen 3
2.1.1 Stickstoff im Metabolismus von Mikroorganismen 3
2.1.2 Wachstum von Mikroorganismen 10
2.1.3 Aufbau, Entwicklung und Stoffübergangsverhalten von Biofilmen 12
2.1.4 Konservierung von Mikroorganismen 17
2.2 Verfahren zur Reinigung ammoniakhaltiger Abluftströme 21
2.2.1 Chemowäscher 21
2.2.2 Biowäscher 23
2.2.3 Biofilter 24
2.2.4 Biorieselbettreaktor 26
3. Experimentalteil 28
3.1 Utensilien 28
3.1.1 Geräte 28
3.1.2 Materialien 29
3.1.3 Chemikalien 31
3.2 Methoden 33
3.2.1 Auswahl von Mikroorganismen 33
3.2.2 Suspensionskultur 34
3.2.3 Aufbau und Betrieb des Modellreaktorsystems 36
3.2.4 Aufbau und Betrieb des Pilotreaktorsystems 40
3.2.5 Verwertung von Reststoffen 45
3.2.6 Sprühtrocknung 47
3.2.7 Datenauswertung 51
4. Ergebnisse und Diskussion 52
4.1 Test der Mikroorganismen in Suspensionskultur 52
4.1.1 Einfluss der Mikroorganismen in Reinkultur 52
4.1.2 Einfluss der Mikroorganismen in Mischkultur 65
4.2 Test der Mikroorganismen im Modellreaktorsystem 71
4.3 Test der Mikroorganismen im Pilotreaktorsystem 81

4.4 Verwertung von Reststoffen 90
4.4.1 Biofilm 90
4.4.2 Zirkulationsflüssigkeit 94
4.4.3 Hühnertrockenkot 97
4.5 Alternative Strategien zur Minderung von Ammoniakemissionen 105
4.6 Konservierung von Bakterien durch Sprühtrocknung 107
4.6.1 Wachstumskurve 107
4.6.2 Einfluss der Kultivierungsdauer 108
4.6.3 Einfluss der Eintrittstemperatur 111
4.6.4 Einfluss der Schutzsubstanzen 112
5. Schlussfolgerungen und Ausblick 120
6. Zusammenfassung 122
7. Abstract 123
8. Literaturverzeichnis 124
9. Abbildungsverzeichnis 145
10. Tabellenverzeichnis 148
11. Abkürzungsverzeichnis 149
12. Liste der Veröffentlichungen 153
13. Danksagung 154

1. Einleitung

1.1 Entwicklung und Folgen des weltweiten Fleischkonsums

Geflügel zählt neben Schwein und Rind zu den beliebtesten Fleischsorten in Deutschland.[1] Der Konsum von Fleisch weist global gesehen eine steigende Tendenz auf, die in Verbindung mit der wachsenden Weltbevölkerung und der zunehmenden Nachfrage nach tierischen Lebensmitteln in Schwellen- und Entwicklungsländern steht.[1–4] Abb. 1 veranschaulicht die Entwicklung der weltweiten Produktionsmenge verschiedener Fleischarten im Zeitraum von 2014 bis 2024 gemäß statistischer Erhebungen der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO).[4] Basierend auf den absoluten Erzeugungswerten besitzt Geflügel vor Schwein und Rind die größte globale Bedeutung. Prognosen legen nahe, dass die weltweit am meisten produzierte Fleischart auch in Zukunft Geflügel darstellt und der Verzehr weiterhin zunimmt.[4–6] Beispielsweise liegt die aktuell prognostizierte Produktionsmenge für Geflügelfleisch für das Jahr 2024 bei rund 146,2 Mio. Tonnen, was einer Wachstumsrate von 32 % innerhalb von 10 Jahren entspricht.[4]

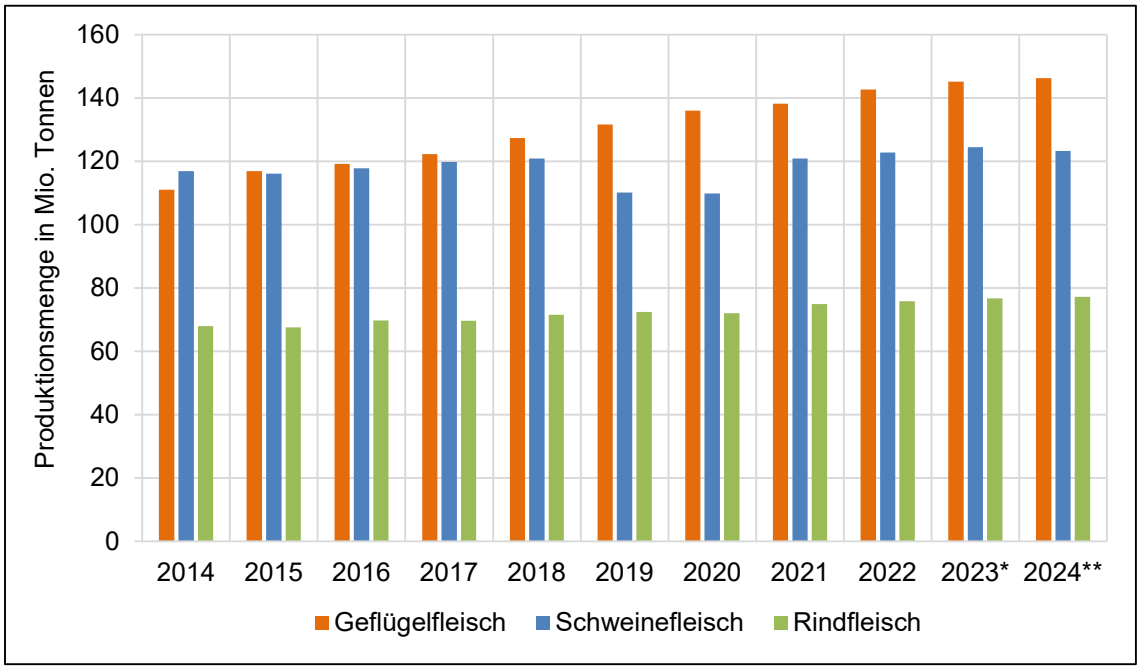

Abb. 1: Entwicklung der globalen Produktionsmenge diverser Fleischarten. *Vorläufig. **Prognose. Erstellt basierend auf der Literatur.[4]

Der zunehmende Bedarf an Geflügelfleisch erfordert eine Steigerung der Produktionskapazitäten, wobei immer größere Massentierhaltungseinrichtungen resultieren.[1] In Deutschland befanden sich im Jahr 2020 rund 80 % aller Masthühner in Betrieben, die mehr als 50.000 Tierplätze aufweisen.[7] Betriebe mit weniger als 10.000 Tierplätzen repräsentieren dagegen lediglich einen Anteil von 0,8 % am deutschen Masthuhnbestand.[7] Die hohe Besatzdichte, welche in der EU bis zu 39 kg/m^2 (23 Hühner pro m^2) betragen darf, beeinflusst sowohl die Gesundheit der Tiere als auch die klimatischen Verhältnisse im Geflügelstall negativ.[8–10] Aus den Ausscheidungsprodukten der Masthühner wird unter anderem Ammoniak freigesetzt, das eine reizende und ätzende Wirkung besitzt.[11–13] Außerdem trägt das stechend riechende Gas zu unerwünschter Eutrophierung bei und beeinträchtigt

zahlreiche Stoffkreisläufe von Ökosystemen.[11–14] Nach der Freisetzung im Geflügelstall bildet Ammoniak durch Reaktion mit weiteren Luftschadstoffen Feinstaubpartikel, die nach dem Einatmen schwerwiegende gesundheitliche Folgen wie chronische Entzündungen verursachen können.[15] Ammoniak ist dabei nicht nur bei Geflügelställen ein Problem, sondern grundsätzlich in der Landwirtschaft, auf die 81 % der weltweiten und 95 % der deutschen Emissionen von Ammoniak zurückzuführen sind.[16, 17] 70 % der Ammoniakemissionen in Deutschland stammen dabei aus der Tierhaltung.[17] Im Rahmen der EU-Richtlinie über nationale Emissionshöchstmengen für bestimmte Luftschadstoffe, die auch als *National Emission Ceilings Directive* (NEC-Richtlinie) bezeichnet wird, hat sich Deutschland ab dem Jahr 2030 zu einer Reduzierung der Ammoniakemissionen um 29 % gegenüber dem Jahr 2005 verpflichtet.[18]

Vor diesem Hintergrund ist eine Reinigung der ammoniakhaltigen Abluft von Geflügelställen unabdingbar, um gesetzliche Grenzwerte zu erfüllen sowie gleichzeitig negative Folgen für Mensch und Umwelt so weit wie möglich zu reduzieren.[18] Konventionelle chemisch-physikalische Technologien zur Luftreinhaltung wie Chemowäscher basieren auf dem Einsatz von aggressiven Substanzen, die ein beträchtliches Gefahrenpotenzial besitzen.[19, 20] Dagegen stellen biologische Verfahren – beispielsweise Biorieselbettreaktoren – eine nachhaltige und kostengünstige Alternative dar, die zur Reinigung ammoniakhaltiger Abluftströme eingesetzt werden kann.[19, 21, 22]

1.2 Zielstellung

Im Rahmen des Promotionsprojektes sollten zunächst neun verschiedene Mikroorganismen zum biologischen Abbau von Ammonium getestet werden, um vier passende Arten für ein Konsortium aus Bakterien und Pilzen zu selektieren. Die Spezies wurden dabei in einem flüssigen Nährmedium als Suspensionskultur und in adhärenter Form in Petrischalen inkubiert. Als Kriterium zum Vergleich der verschiedenen Arten dient die Ammoniumabbaurate, welche eine quantitative Evaluation des Schadstoffabbaus ermöglicht. Neben Suspensionskultur und Petrischalen galt es, eine Kultivierung in Biorieselbettreaktoren vorzunehmen, wobei ein Konsortium aus jeweils zwei Bakterien- und Pilzspezies als Inokulum diente, die basierend auf der Ammoniumabbaurate selektiert wurden. Das mikrobielle Konsortium wurde zunächst in einem Modellreaktor im 1-Liter-Maßstab untersucht, um die Biofilmbildung auf Lavasteinen als porösen Trägermaterialien und den Ammoniumabbau im Vergleich zur Suspensionskultur zu bewerten. Außerdem galt es, den Einfluss einer variierenden Ammoniumkonzentration auf die Metabolisierung durch die Mikroorganismen im Modellreaktor zu analysieren. Im nächsten Schritt erfolgte ein Upscaling des Verfahrens mithilfe eines Pilotreaktors im 100-Liter-Maßstab.

Anschließend wurden Reststoffströme, die aus dem Biorieselbettreaktor und dem Geflügelstall stammen, im Hinblick auf eine potenzielle Verwertung untersucht. Dabei erfolgte eine Analyse von überschüssigem Biofilm, Zirkulationsflüssigkeit und Hühnertrockenkot. Zur Erleichterung der Inbetriebnahme neuer Biorieselbettreaktoren wurde außerdem eine Formulierung für ein pulverförmiges Produkt entwickelt, das ammoniumabbauende Mikroorganismen mit möglichst hoher Langzeitstabilität enthält. Als Konservierungsmethode diente die Sprühtrocknung unter Einsatz verschiedener Schutzsubstanzen, um die Überlebensrate zu optimieren.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Mikrobiologische Grundlagen

2.1.1 Stickstoff im Metabolismus von Mikroorganismen

Als grundlegender Bestandteil von Aminosäuren, Proteinen und Nucleinsäuren ist Stickstoff ein essentielles Element für alle Lebewesen. Im Rahmen des Stickstoffkreislaufes, der einen zentralen biogeochemischen Prozess darstellt, existieren verschiedene chemische Formen von Stickstoff innerhalb der Umwelt bzw. in Lebewesen. Trotz des hohen Anteils von elementarem Stickstoff (N_2) in der Atmosphäre (78 %), ist dieser für die meisten Organismen nicht direkt verfügbar und muss zuerst in reaktivere Formen umgewandelt werden. Abb. 2 zeigt eine Zusammenfassung des Stickstoffkreislaufs mit den einzelnen Reaktionen, die von den jeweiligen Stickstoffspezies eingegangen werden können. Dabei liegen unterschiedliche Oxidationszustände vor, konkret variiert die Oxidationszahl des N-Atoms von −III bis +V. Im Folgenden wird auf die verschiedenen Reaktionswege eingegangen, die in Abb. 2 visualisiert sind.[23–29]

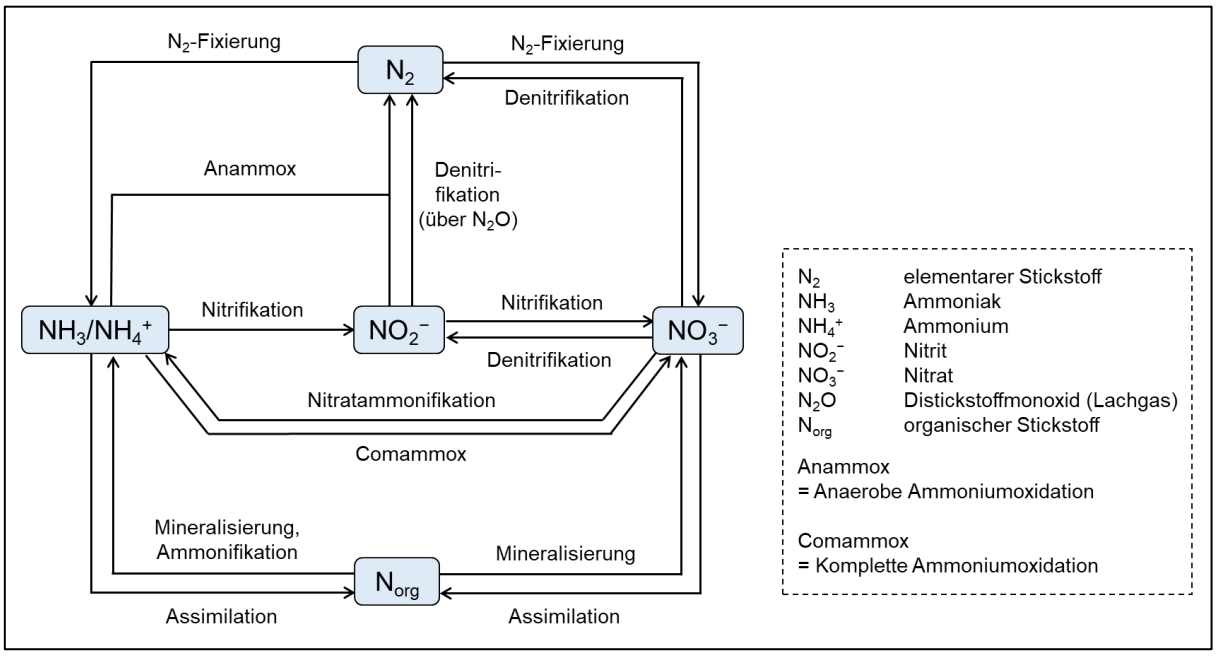

Abb. 2: Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufes. Erstellt in Anlehnung an die Literatur.[23–29]

Die biologische Verfügbarkeit von N_2 wird – mit Ausnahme von anthropogenen Methoden wie dem Haber-Bosch-Verfahren, Blitzentladungen und UV-Strahlung – ausschließlich durch den Prozess der Stickstofffixierung erreicht. Aus chemischer Sicht handelt es sich dabei um eine Reduktion von Stickstoff zu Ammoniak (NH_3) mithilfe des Enzyms Nitrogenase, die eine beträchtliche Energiemenge erfordert und nur unter sauerstofffreien Bedingungen gemäß der folgenden Reaktionsgleichung ablaufen kann.[23–28]

$$N_2 + 8\,H^+ + 16\,ATP \xrightarrow{\text{Nitrogenase}} 2\,NH_3 + H_2 + 16\,ADP + 16\,P_i \qquad \text{(Gl. 1)}$$

Das Produkt Ammoniak steht dabei mit der korrespondierenden Säure Ammonium in wässrigen Medien in einem chemischen Gleichgewicht, das durch die folgende Reaktionsgleichung beschrieben wird.[30–32]

$$NH_3 + H_2O \rightleftharpoons NH_4^+ + OH^- \qquad \text{(Gl. 2)}$$

Infolge der Aufnahme eines Protons entstehen neben Ammoniumionen Hydroxidionen, sodass bei einem wässrigen Medium mit einem zu Beginn neutralen pH-Wert ein alkalisches Milieu resultiert. Die Lage des chemischen Gleichgewichtes wird dabei maßgeblich durch den pH-Wert des wässrigen Mediums und durch dessen Temperatur beeinflusst. Basierend auf der Henderson-Hasselbalch-Gleichung kann mithilfe des jeweiligen temperaturabhängigen pK_S-Wertes der Anteil an Ammoniak berechnet werden.[30–32]

Abb. 3 veranschaulicht am Beispiel von vier konkreten Temperaturen im biologisch relevanten Bereich zwischen 10 °C und 40 °C den Einfluss der pH-Wertes auf den Ammoniakanteil, der in prozentualer Form angegeben ist und sich auf die Summe der Stoffmengenkonzentration von Ammoniak und Ammonium bezieht.[30] Die Subtraktion des aufgetragenen Wertes von dem Gesamtwert 100 % entspricht dabei dem Anteil von Ammonium.[30] Gemäß Abb. 3 wird mit zunehmendem pH-Wert und steigender Temperatur das chemische Gleichgewicht in Richtung von Ammoniak verschoben.[30] Beispielsweise liegt bei einer Temperatur von 20 °C und einem pH-Wert von 7 lediglich 0,4 % in Form von Ammoniak vor, während dieser Anteil bei 40 °C und einem pH-Wert von 9 bereits 60 % beträgt.[30] Der jeweilige Wendepunkt der vier Kurven stellt den entsprechenden pK_S-Wert dar, bei dem beide Stickstoffspezies zu jeweils 50 % vertreten sind.[30] Neben der Temperatur und dem pH-Wert beeinflussen auch der Druck sowie die Ionenstärke bzw. Salinität der wässrigen Lösung die Lage des chemischen Gleichgewichts.[13, 33]

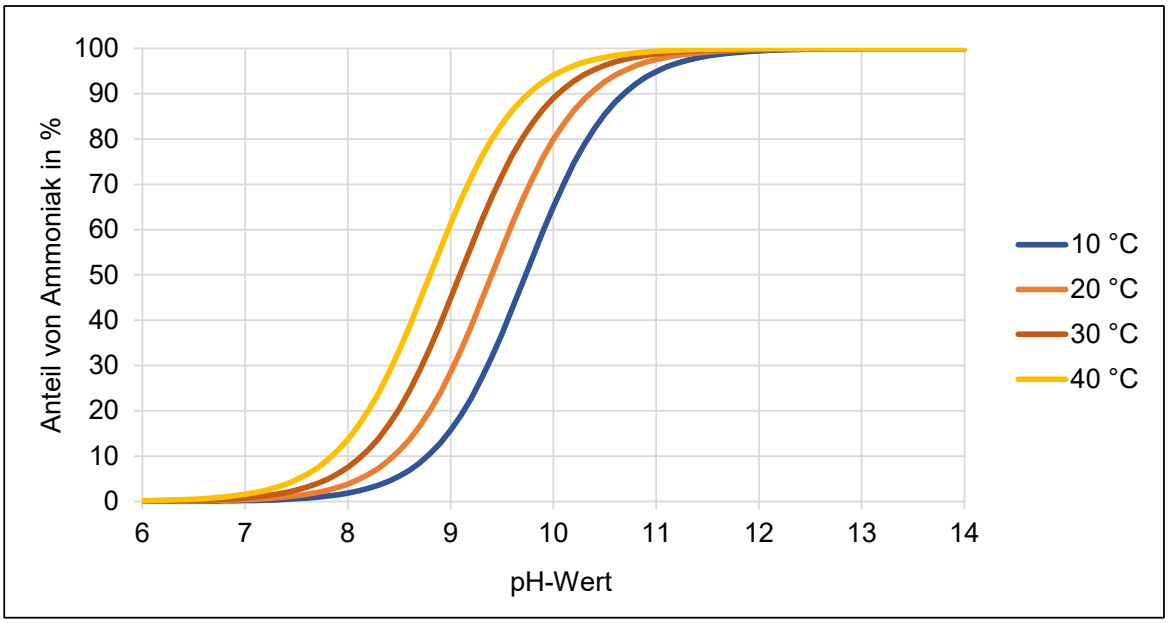

Abb. 3: Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur auf den Anteil von Ammoniak in wässriger Lösung. Der Anteil von Ammoniak bezieht sich auf die Summe der Stoffmengenkonzentration von Ammoniak und Ammonium in wässriger Lösung bei 1013 hPa unter Einsatz eines äquimolaren Puffers aus Ammoniak (50 mM) und Ammoniumchlorid (50 mM). Erstellt basierend auf der Literatur.[30]

Die Biosynthese von Ammoniak bzw. Ammonium im Rahmen der Stickstofffixierung erfolgt primär durch diazotrophe Bakterien, die entweder symbiotisch leben (z. B. *Rhizobium* spp.) oder nicht auf die Wechselwirkung mit anderen Mikroorganismen angewiesen sind (z. B. *Azotobacter* spp.).[34] Einen Sonderfall der Stickstofffixierung stellt die Endosymbiose der marinen Algenart *Braarudosphaera bigelowii* mit dem Cyanobakterium *Candidatus* Atelocyanobacterium thalassa dar, die erstmalig im Jahr 2024 beschrieben wurde.[35] Durch Integration des Cyanobakteriums in die eukaryotische Zelle entstand ein spezialisiertes Organell, das als Nitroplast bezeichnet wird und der Algenart die Nutzung von gelöstem N_2 als Substrat zur Produktion von Ammonium erlaubt.[35]

Höhere Pflanzen sind durch Symbiose mit *Rhizobium* spp. in der Lage, den fixierten Stickstoff in Form von Ammonium über ihr Wurzelsystem aufzunehmen. Im Rahmen der Assimilation erfolgt zunächst die chemische Umwandlung von Ammonium in eine organische Stickstoffverbindung (N_{org}). Beispielsweise katalysiert das Enzym Glutaminsynthetase die Reaktion von Ammonium und Glutaminsäure unter Hydrolyse von ATP zu Glutamin. Auf diesem Wege wird eine Aminogruppe in der Seitenkette der Aminosäure eingeführt. Eine weitere zentrale Rolle bei der Assimilation von Ammonium spielt die Glutamat-Dehydrogenase, die α-Ketoglutarat in Glutamat umwandelt. Zusätzliche Enzyme wie Transaminasen (Aminotransferasen) ermöglichen außerdem eine Übertragung der Aminogruppe auf eine α-Ketosäure, sodass im Anabolismus bei Bedarf neue Aminosäuren synthetisiert werden können. Als Donor-Aminosäure fungiert dabei häufig Glutamat. Die beschriebene Umwandlung von Ammonium in organische Stickstoffverbindungen ist charakteristisch für heterotrophe Mikroorganismen.[23–28]

Auch autotrophe Mikroorganismen können Ammonium verwerten, nutzen das Substrat jedoch als Elektronendonor, um im Rahmen des Energiestoffwechsels ATP zu generieren. Die Oxidation von Ammonium bzw. Ammoniak zu Nitrat (NO_3^-) wird als Nitrifikation bezeichnet und in mehrere Teilreaktionen untergliedert, die von nitrifizierenden Bakterien unter aeroben Bedingungen übernommen werden. Die Bruttogleichung der ablaufenden Gesamtreaktion kann folgendermaßen formuliert werden.[27]

$$NH_3 + 2\ O_2 \longrightarrow NO_3^- + H_2O + H^+ \qquad \text{(Gl. 3)}$$

Im ersten Teil der Nitrifikation erzeugen ammoniakoxidierende Bakterien (AOB), die unter anderem zur Gattung *Nitrosomonas* gehören können, mithilfe des Enzyms Ammonium-Monooxygenase die Produkte Hydroxylamin (NH_2OH) und Wasser.[27]

$$NH_3 + 2\ e^- + 2\ H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{Ammonium-Monooxygenase}} NH_2OH + H_2O \qquad \text{(Gl. 4)}$$

Anschließend wird das Zwischenprodukt Hydroxylamin durch die Hydroxylamin-Dehydrogenase in Nitrit (NO_2^-) umgewandelt, das nach Protonierung in Form von Salpetriger Säure (HNO_2) vorliegt.[27]

$$NH_2OH + H_2O \xrightarrow{\text{Hydroxylamin-Dehydrogenase}} HNO_2 + 4\,H^+ + 4\,e^- \qquad \text{(Gl. 5)}$$

Im zweiten Teil der Nitrifikation produzieren nitritoxidierende Bakterien (NOB), beispielsweise Vertreter der Gattung *Nitrobacter*, Nitrat aus Nitrit mithilfe der Nitrit-/Nitrat-Oxidoreduktase.[27]

$$2\,NO_2^- + O_2 \xrightarrow{\text{Nitrit-/Nitrat-Oxidoreduktase}} 2\,NO_3^- \qquad \text{(Gl. 6)}$$

Die Wachstumsrate der Bakterien, die an der Nitrifikation beteiligt sind, ist relativ gering, da im Vergleich zum heterotrophen Stoffwechsel bei der autotrophen Variante mit Ammoniak bzw. Nitrit anstatt von Glucose als Energiequelle deutlich weniger Energie in Form von ATP produziert wird. Außerdem werden mehr als 80 % der Energie, welche aus der Oxidation von Nitrit zu Nitrat resultiert, für die Fixierung von Kohlenstoffdioxid genutzt.[36] Bei der Kultivierung mit nitrifizierenden Mikroorganismen muss deshalb mit langen Inkubationszeiten gerechnet werden. Beispielsweise weist *Nitrobacter vulgaris* eine Generationszeit von 10 h auf, während die Art *Nitrospira marina* zur Verdopplung der Zellzahl bis zu 90 h benötigt.[37, 38]

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Nitrifikation lediglich durch eine Symbiose von mindestens zwei Bakteriengruppen (AOB und NOB) im Rahmen eines mehrstufigen Prozesses bewerkstelligt werden kann.[27] Im Jahr 2015 wurde mit *Nitrospira inopinata* erstmalig eine Spezies beschrieben, die zur Umwandlung von Ammonium in Nitrat nicht auf andere Mikroorganismen angewiesen ist. Da diese Art somit die komplette Ammoniumoxidation ohne Arbeitsteilung mit weiteren Spezies bewältigt, wurde hierfür der Begriff Comammox (komplette Ammoniumoxidation) eingeführt. Ermöglicht wird die Nitrifikation bei bestimmten Vertretern der Gattung *Nitrospira* durch ein besonderes Genom, das die Expression sämtlicher Enzyme zur Oxidation von Ammonium über Nitrit zu Nitrat erlaubt.[27, 39, 40]

Im Gegensatz zur Nitrifikation bzw. zu Comammox, die nur unter aeroben Bedingungen ablaufen, kann Ammonium von Planctomyceten-ähnlichen Bakterien auch in Abwesenheit von Sauerstoff oxidiert werden. Dieser Prozess wird analog zu Comammox als Anammox (anaerobe Ammoniumoxidation) bezeichnet und ist beispielsweise für Kläranlagen mit einer hohen Kohlenstofffracht oder marine Sedimente von Bedeutung. Als Oxidationsmittel dient dabei Nitrit, das gemäß der folgenden Reaktionsgleichung mit Ammonium zu elementarem Stickstoff und Wasser umgesetzt wird.[27]

$$NH_4^+ + NO_2^- \xrightarrow{\text{Anammoxosom}} N_2 + 2\,H_2O \qquad \text{(Gl. 7)}$$

Untersuchungen mithilfe des Modellorganismus *Kuenenia stuttgartiensis* deuten darauf hin, dass die oben formulierte Reaktion in drei separate Schritte untergliedert ist, bei denen die reaktiven Zwischenprodukte Hydrazin (N_2H_4) und Stickstoffmonoxid (NO) entstehen. Die enzymatisch katalysierten Redoxreaktionen laufen dabei nicht frei im Cytoplasma ab, sondern finden in einem speziellen Zellorganell statt, dem Anammoxosom. Durch diese Kompartimentierung wird die Effizienz der Stoffumwandlungen unter Ausschluss von Sauerstoff erhöht und die restliche Zelle vor toxischen Metaboliten wie Hydrazin geschützt.[27, 41]

Ebenfalls meist unter anaeroben Bedingungen läuft die Denitrifikation ab, welche sich an die aerobe Nitrifikation anschließt und deshalb von Nitrat als Edukt ausgeht. Dieser biologische Prozess ist dabei von grundlegender Bedeutung für den globalen Stickstoffkreislauf, da denitrifizierende Mikroorganismen die Hauptquelle für gasförmigen N_2 darstellen. Die Denitrifikation lässt sich in vier einzelne Reaktionen untergliedern, die durch Reduktasen katalysiert werden und im Folgenden aufgeführt sind.[27]

$$NO_3^- + 2\,e^- + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Nitrat-Reduktase}} NO_2^- + H_2O \qquad \text{(Gl. 8)}$$

$$NO_2^- + e^- + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Nitrit-Reduktase}} NO + H_2O \qquad \text{(Gl. 9)}$$

$$2\,NO + 2\,e^- + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Stickstoffoxid-Reduktase}} N_2O + H_2O \qquad \text{(Gl. 10)}$$

$$N_2O + 2\,e^- + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Distickstoffoxid-Reduktase}} N_2 + H_2O \qquad \text{(Gl. 11)}$$

Bestimmte Mikroorganismen sind in der Lage, die Denitrifikation auch in Anwesenheit von Sauerstoff durchzuführen und mit einer besonderen Variante der Nitrifikation zu kombinieren. Dabei handelt es sich um eine heterotrophe Nitrifikation, an die sich eine aerobe Denitrifikation anschließt. Diese beiden Stoffwechselwege werden häufig unter der Abkürzung HN-AD zusammengefasst. HN-AD wurde erstmals in den frühen 1980er Jahren bei der Bakterienart *Thiosphaera pantotropha* beschrieben. Seitdem wurden zahlreiche HN-AD-Spezies aus verschiedenen Umgebungen identifiziert, darunter Boden, Oberflächenwasser, Belebtschlamm und Abwasser. Der konkrete Ablauf der HN-AD ist abhängig vom jeweiligen Mikroorganismus, demnach variieren sowohl die Enzyme als auch die einzelnen Stoffwechselprodukte.[42–44]

HN-AD-Spezies eignen sich möglicherweise zur Behandlung von stickstoffhaltigem Abwasser in Kläranlagen, da sie einige Vorteile im Vergleich zu autotrophen Arten aufweisen. Zum einen können Nitrifikation und Denitrifikation gleichzeitig in einem einzigen Reaktor stattfinden, was den Gesamtprozess vereinfacht, nachdem keine Separierung durch zwei getrennte Behälter erforderlich ist. Außerdem zeichnen sich die heterotrophen Mikroorganismen durch eine hohe Wachstumsrate im Vergleich zu autotrophen Nitrifikanten aus, was zu einer kürzeren Prozessdauer und einem effizienteren Abbau des Ammonium-Stickstoffs führt.[42–44]

Im Vergleich zu konventionellen Methoden erzeugen HN-AD-Bakterien weniger Schlamm, was die Kosten und den Aufwand für entsprechende Maßnahmen zur Entsorgung verringert.[42–44] Des Weiteren erweisen sich HN-AD-Spezies als toleranter gegenüber hohen Salzkonzentrationen von bis zu 30 g/L NaCl.[45]

Organisch gebundener Stickstoff aus abgestorbener Biomasse oder Exkrementen wird im Rahmen der Ammonifikation zu Ammoniak bzw. Ammonium abgebaut.[27] Neben Proteinen und Nucleinsäuren enthalten vor allem Harnstoff und Harnsäure einen großen Anteil an organischem Stickstoff.[46] Nachdem es sich bei Geflügel um uricotelische Tiere handelt, wird hauptsächlich Harnsäure als Endprodukt des Purinkatabolismus exkretiert.[46–49] Experimentelle Untersuchungen ergaben, dass bei Geflügel ca. 60 – 80 % des Stickstoffs in Form von Harnsäure ausgeschieden werden, während der restliche Anteil vor allem auf unverdaute Proteine, Harnstoff und Ammoniak zurückzuführen ist.[47–50]

Die stickstoffhaltigen Endprodukte stellen gleichzeitig potenzielle Substrate für Mikroorganismen dar, die im Geflügelstall bzw. innerhalb der Exkremente vorkommen und beispielsweise aus dem Darm der Hühner stammen. Aus dem Edukt Harnsäure kann dabei durch mehrere enzymatisch katalysierte Reaktionen, die in Abb. 4 zusammengefasst sind und unter aeroben Bedingungen ablaufen, das Produkt Ammoniak entstehen. Im ersten Schritt erfolgt die Umwandlung von Harnsäure in Allantoin durch das Enzym Uricase. Anschließend wird die ringförmige Struktur von Allantoin mithilfe der Allantoinase hydrolytisch aufgespalten, sodass die Carbonsäure Allantoinsäure resultiert. Diese wird unter Katalyse der Allantoicase hydrolysiert und nach Abspaltung von Glyoxylsäure in Harnstoff umgewandelt. Im letzten Schritt findet eine weitere Hydrolyse statt, die von dem Enzym Urease katalysiert wird. Dabei entstehen aus der organischen Verbindung Harnstoff die anorganischen Produkte Kohlenstoffdioxid und Ammoniak.[47–50]

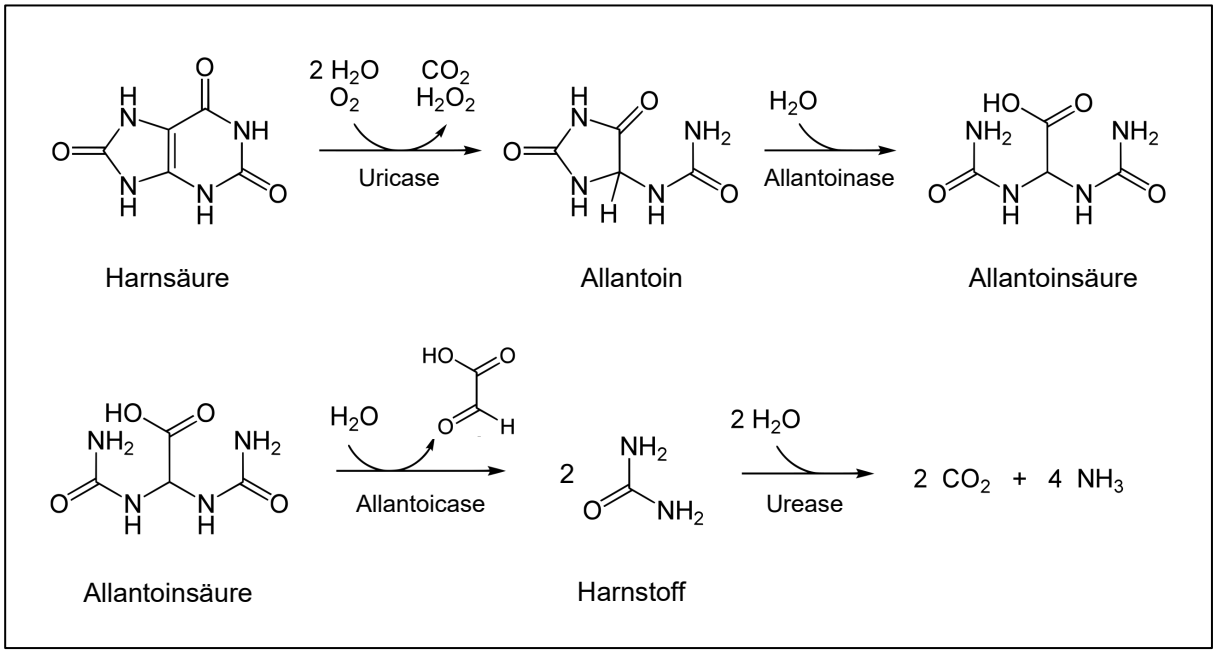

Abb. 4: Abbau von Harnsäure durch Mikroorganismen mithilfe verschiedener Enzyme unter aeroben Bedingungen. Erstellt in Anlehnung an die Literatur.[47–50]

Die beschriebenen Reaktionen werden *in situ* von verschiedenen Bakterienarten übernommen, die sich metabolisch ergänzen.[51, 52] Beispielsweise wurden Vertreter der Gattungen *Corynebacterium, Cytophaga, Micrococcus, Nocardia, Streptomyces, Pseudomonas, Alcaligenes* und *Achromobacter* in 13 Proben aus Geflügelställen nachgewiesen. Organismen, die Harnsäure enzymatisch abbauen können, stellten dabei einen Anteil von 25 % an der gesamten Bakterienpopulation dar.[53]

Neben Bakterien können auch Pilze wie *Aspergillus* spp. an der Mineralisierung von Harnsäure und deren Abbauprodukten beteiligt sein.[52, 54, 55] Einige Mikroorganismenarten sind ohne die Interaktion mit anderen Spezies in der Lage, Harnsäure in Kohlenstoffdioxid und Ammoniak umzuwandeln, da alle erforderlichen Enzyme exprimiert werden. Bei einer Limitierung der enzymatischen Ausstattung kann der in Abb. 4 veranschaulichte Abbauprozess jedoch auch partiell ablaufen, sodass nur ein bestimmter Teil der Reaktionen von einem Mikroorganismus bewerkstelligt wird. So wandeln uricolytische Spezies Harnsäure über die in Abb. 4 aufgeführten Zwischenprodukte in Harnstoff um, der im Anschluss von ureolytischen Bakterien als Substrat verwendet werden kann.[51, 52] Aerobe uricolytische Bakterien erweisen sich beim Abbau von Harnsäure im Vergleich zu anaeroben Spezies als effektiver.[53, 56]

Organischer Stickstoff, der in den Exkrementen von Geflügel enthalten ist, kann neben Harnsäure und Harnstoff auch in Form von Proteinen vorliegen, die trotz der Passage des Gastrointestinaltraktes nicht verstoffwechselt wurden. Eine mögliche Begründung bezieht sich auf die Fütterung der Tiere. Durch den Einsatz von erheblichen Mengen an proteinreichem Futter werden dem Organismus mehr Proteine zugeführt, als dieser verdauen kann. Infolgedessen wird der Überschuss an Nährstoffen in unverdauter Form exkretiert.[47, 57, 58] Proteine enthalten organisch gebundenen Stickstoff, der gemäß Abb. 2 durch Ammonifikation in anorganische Verbindungen umgewandelt werden kann.[27] Dieser Stoffwechselweg ist insbesondere für die Freisetzung von Ammoniak aus Exkrementen in Geflügelställen verantwortlich, da diese – wie bereits erläutert – unverdaute Proteine enthalten.[47, 57, 58] Durch enzymatische Hydrolyse werden die Proteine zunächst in die entsprechenden Aminosäuren gespalten. Die freigesetzten Aminosäuren werden durch oxidative, hydrolytische oder desaturative Desaminierung weiter abgebaut. Dabei wird die Aminogruppe in Form von Ammonium abgespalten. Abb. 5 zeigt die oxidative Desaminierung am Beispiel von L-Glutaminsäure, die zu α-Ketoglutarsäure umgewandelt wird. Eine hydrolytische Desaminierung tritt häufig bei den Aminosäuren Serin und Threonin auf. Diese Variante beruht auf einer Wasserabspaltung und -anlagerung, wodurch im Falle von Serin Aminoacrylat und Enolpyruvat als Zwischenprodukte vorliegen, bevor das Endprodukt Pyruvat entsteht. Bei der desaturativen Desaminierung resultiert die Abspaltung von Ammonium in einer Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen.[59–61]

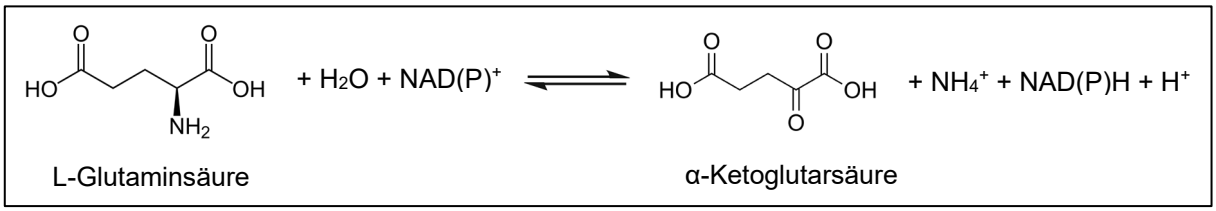

Abb. 5: Oxidative Desaminierung von L-Glutaminsäure. Erstellt in Anlehnung an die Literatur.[59–61]

2.1.2 Wachstum von Mikroorganismen

Mikrobielles Wachstum bezieht sich meist auf die Zunahme der Zellzahl durch Zellteilung. Bei Prokaryoten erfolgt dabei in der Regel eine binäre Teilung, sodass zwei Zellen aus einer ursprünglichen Zelle entstehen. Der Vorgang ist in Abb. 6 schematisch dargestellt.[23, 62, 63]

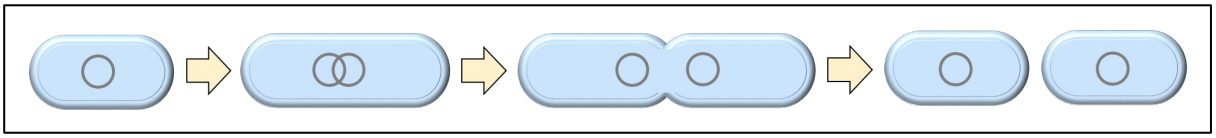

Abb. 6: Binäre Teilung einer prokaryotischen Zelle. Grau: chromosomale DNA. Blau: Zelle. Erstellt basierend auf der Literatur.[23, 62, 63]

Zunächst findet die Replikation der chromosomalen DNA statt, um das bakterielle Genom zu duplizieren. Parallel dazu vergrößert sich die Zelle durch Längenwachstum, damit ein ausreichendes Volumen für die neu synthetisierten Zellbestandteile wie Proteine und Lipide zur Verfügung steht. Nach Abschluss der Replikation bildet sich ein Trennbereich, der als Septum bezeichnet wird. Dadurch wird die Segmentierung in zwei Tochterzellen vorbereitet. Nach der vollständigen Entwicklung des Septums infolge der Einstülpung der Cyoplasmamembran und der Zellwand erfolgt an der Grenzfläche die Abschnürung der beiden Tochterzellen. Somit ist die Cytokinese abgeschlossen. Die Zeitspanne, die für die binäre Teilung erforderlich ist und letztendlich zur Verdopplung der Zellzahl führt, wird als Generationszeit bezeichnet.[23, 62, 63]

Während der Kultivierung von Mikroorganismen ist es wichtig, die Inkubationsbedingungen an die entsprechenden Optima anzupassen, damit der Prozess der Zellteilung ideal abläuft. Dabei kommt der Temperatur, dem pH-Wert, der Sauerstoffverfügbarkeit und der Zusammensetzung des Nährmediums eine zentrale Bedeutung zu. Eukaryotische Organismen wie Hefen weisen tendenziell eine längere Generationszeit als Prokaryoten auf.[23] Bei Hefen findet eine besondere Form der Zellteilung statt, die als Knospung bezeichnet wird und sich von der binären Teilung bei Bakterien unterscheidet.[23] Abb. 7 visualisiert den Ablauf der Knospung einer eukaryotischen Zelle. Dabei wird zunächst der Zellkern verdoppelt, bevor es zur Bildung einer Ausstülpung in Form einer Knospe kommt. Durch Einschnürung der Zellwand entsteht letztendlich eine neue Zelle, die mit der ursprünglichen Zelle genetisch identisch ist. Zusätzlich zur Vermehrung kann es bei Pilzen auch zu einer Vergrößerung der Zellzahl durch Mycelwachstum kommen. In diesem Fall vergrößert sich das Zellvolumen, während die Zellzahl konstant bleibt.[64]

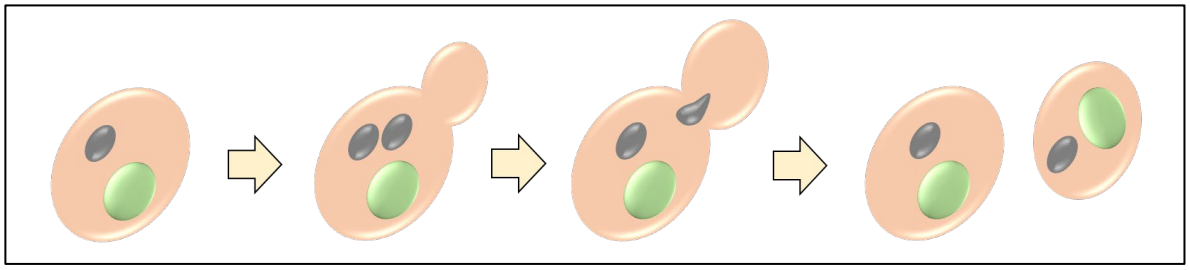

Abb. 7: Knospung einer eukaryotischen Zelle. Grau: Nucleus. Grün: Vakuole. Beige: Zelle. Erstellt basierend auf der Literatur.[64]

Wird der Logarithmus der Lebendkeimzahl in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer aufgetragen, ergibt sich für eine diskontinuierliche Kultur von Mikroorganismen eine Wachstumskurve, die in Abb. 8 dargestellt ist. Diese Wachstumskurve ist spezifisch für eine Population einer Mikroorganismenart und kann idealisiert in vier Hauptphasen unterteilt werden, wobei teilweise auch Übergangsphasen in der Literatur erwähnt werden.[23, 24, 63, 65, 66]

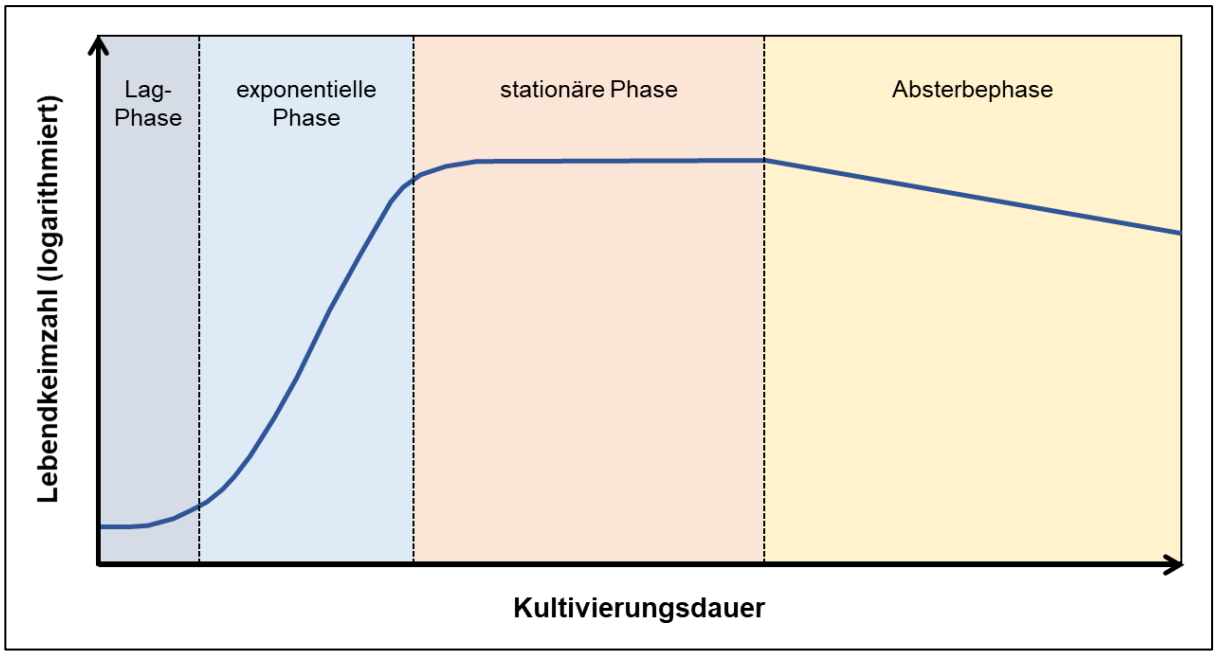

Abb. 8: Wachstumskurve von Mikroorganismen in einer diskontinuierlichen Kultur. Erstellt basierend auf der Literatur.[23, 24, 63, 65, 66]

Die Lag-Phase bezieht sich auf den Zustand unmittelbar nach der Inokulation eines Nährmediums mit einer Mikroorganismenkultur. In dieser Phase müssen die Zellen ihren Stoffwechsel an die neuen Umweltbedingungen anpassen. Dies erfordert die Expression bestimmter Gene, die beispielsweise für Enzyme kodieren, welche für die Metabolisierung der im Nährmedium vorhandenen Substrate erforderlich sind. Eine wesentliche Rolle spielen dabei Unterschiede bzgl. der Nährstoffzusammensetzung und der Kultivierungsbedingungen, wenn die ursprüngliche Kultur mit der neu inokulierten Subkultur verglichen wird. Bei identischen Nährstoffen und physikalischen Parametern kann die Lag-Phase vollständig entfallen, da bereits eine Adaption der Zellen erfolgt ist.[23, 24, 63, 65, 66]

Anschließend gelangt die Population in die exponentielle Phase, die auch als Log-Phase bezeichnet wird. Nachdem sich die Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen angepasst haben, vermehren sich diese mit der maximal möglichen Wachstumsrate, was zu einer exponentiellen Zunahme der Lebendkeimzahl führt. Die Zellen weisen dabei eine hohe Viabilität auf und eignen sich deshalb sehr gut für experimentelle Untersuchungen, beispielsweise zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Die Dauer der exponentiellen Phase wird unter anderem durch das Nährstoffangebot begrenzt, das ohne Zudosierung von Substraten nach einer bestimmten Zeit aufgebraucht ist.[23, 24, 63, 65, 66]

Aufgrund des Mangels an lebenswichtigen Nährstoffen oder der Akkumulation toxischer Stoffwechselprodukte geht die Population in die stationäre Phase über. Dabei findet im Gegensatz zur exponentiellen Phase keine Zunahme der Lebendkeimzahl statt. Der Energiemetabolismus und biosynthetische Prozesse können trotz ungünstiger Bedingungen während der Kultivierung aufrechterhalten werden, allerdings bei erheblich reduzierter Geschwindigkeit. Schließlich tritt die Population in die Absterbephase ein, wenn die Nährstoffe vollständig aufgebraucht sind und toxische Metabolite zum Zelltod führen. Die Lebendkeimzahl nimmt dabei langsamer ab, als sie während der exponentiellen Phase zugenommen hat. Dies ist in Abb. 8 durch eine geringere Steigung der Funktion nach dem Beginn der Absterbephase erkennbar.[23, 24, 63, 65, 66]

2.1.3 Aufbau, Entwicklung und Stoffübergangsverhalten von Biofilmen

Mikroorganismen werden in der Literatur zwar oft als freischwimmende Zellen im sogenannten planktonischen Zustand dargestellt, neigen jedoch in den meisten Fällen dazu, sich an Grenzflächen anzulagern. In wässrigen Systemen erfolgt die Adhäsion beispielsweise an der Oberfläche von Festkörpern wie Gesteinen oder zwischen der Flüssigkeit und der Gasphase. Auch zwischen unterschiedlichen flüssigen Phasen kann eine Anlagerung der Zellen stattfinden, beispielsweise bei einer Öl-in-Wasser-Emulsion.[27] An der Grenzfläche bilden die Mikroorganismen komplexe dreidimensionale Strukturen aus, die als Biofilm bezeichnet werden. Abb. 9 veranschaulicht den schematischen Aufbau eines Biofilms auf einer Festkörperoberfläche. Neben den Zellen, die in immobilisierter, sessiler Form vorliegen, stellen extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) einen wichtigen Bestandteil der Struktur dar. Diese umfassen verschiedene Biopolymere, die von den sessilen Mikroorganismen produziert werden und mehr als 90 % der Trockenmasse von Biofilmen ausmachen. Ein Großteil der EPS besteht aus Polysacchariden, die eine entscheidende Rolle bei der strukturellen Integrität des Biofilms spielen und die Adhäsion der Zellen auf der Oberfläche erleichtern. Zudem erfüllen sie eine schützende Funktion, die mit dem chemischen Aufbau in Verbindung steht.[67–70]

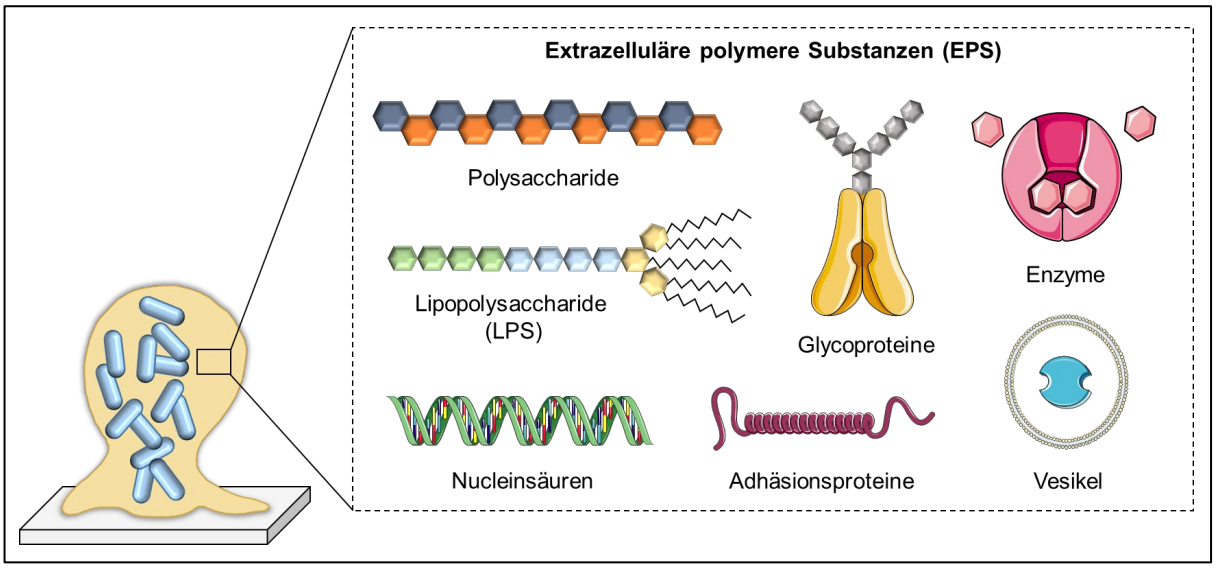

Abb. 9: Biofilm mit extrazellulären polymeren Substanzen. Erstellt basierend auf der Literatur.[67–70] Die Grafik enthält Elemente von Servier Medical Art, die unter CC BY 4.0 lizenziert sind und geringfügig modifiziert wurden. Weitere Informationen unter: https://smart.servier.com/.

Durch die zahlreichen hydrophilen funktionellen Gruppen kann ein großes Volumen an Wasser gespeichert werden, was den hohen Wassergehalt von Biofilmen (bis zu 98 %) erklärt. Extrazelluläre Polysaccharide sorgen im hydratisierten Zustand zudem für die Speicherung von Nährstoffen und schaffen gleichzeitig eine Diffusionsbarriere, die das Eindringen von antimikrobiellen Substanzen erschwert. Sind Gram-negative Bakterien am Aufbau des Biofilms beteiligt, sind Lipopolysaccharide (LPS) enthalten, die meist nicht – wie in Abb. 9 angedeutet – in freier Form vorkommen, sondern in der Zellwand der immobilisierten Mikroorganismen verankert sind. LPS spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation der zellulären Aggregation und können auch die Adhäsion sowie Immunreaktionen bei eukaryotischen Lebewesen beeinflussen.[67–69]

Neben Polysacchariden und LPS sind auch Nucleinsäuren in der Matrix enthalten, beispielsweise extrazelluläre DNA (eDNA). Diese fördert die Adhäsion an Oberflächen und ist zudem für die viskoelastischen Eigenschaften von Biofilmen verantwortlich. Aufgrund der negativen Ladung kann eDNA auch kationische, toxische Substanzen binden und damit einen protektiven Effekt ausüben. Nucleinsäuren in Form von Plasmiden ermöglichen zusätzlich den horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Mikroorganismenarten innerhalb des Biofilms, was zur genetischen Diversität und Anpassungsfähigkeit der mikrobiellen Gemeinschaft beiträgt.[23, 67]

Glycoproteine, die über kovalent gebundene Oligosaccharide verfügen, fördern die Adhäsion an Oberflächen und stabilisieren zudem die interzelluläre Netzwerkstruktur. Zusätzlich sind Glycoproteine an der Zell-Zell-Kommunikation beteiligt, indem sie als Signalrezeptoren oder Liganden wirken, wodurch die Differenzierung des Biofilms gesteuert werden kann. Adhäsionsproteine verbessern die Anheftung der Mikroorganismen an Oberflächen und begünstigen gleichzeitig die Aufrechterhaltung von Kontakten zwischen den Zellen, beispielsweise über F-Pili, die den horizontalen Gentransfer ermöglichen. Des Weiteren werden Enzyme als EPS klassifiziert, die in der Lage sind, Biopolymere innerhalb der Matrix abzubauen bzw. chemisch zu modifizieren. Dies erlaubt die dynamische Anpassung des Biofilms an die jeweiligen Umweltbedingungen. So können Polysaccharide im Falle eines Mangels an Substraten in der umgebenden Flüssigkeit als Nährstoffquelle dienen, wenn durch extrazelluläre Enzyme eine Hydrolyse der glycosidischen Bindungen erfolgt.[67]

Einen weiteren Bestandteil von EPS bilden Vesikel, die aus einer Phospholipiddoppelschicht zusammengesetzt sind. Im Innenraum der Struktur können unter anderem toxische Metabolite enthalten sein, die durch Exocytose aus der Zelle transportiert und in der extrazellulären Matrix abgelagert werden, sodass die Mikroorganismen vor den negativen Auswirkungen im Vergleich zu einer direkten Exposition geschützt sind. Auch Enzyme werden innerhalb der Vesikel von Bakterien sekretiert und ermöglichen eine gezielte Restrukturierung der Matrixarchitektur nach der Freisetzung in den Extrazellularraum. Während des Transports durch die Vesikel profitieren die eingeschlossenen Enzyme von einem protektiven Effekt, der für die Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität sorgt. Darüber hinaus dienen Vesikel bei Bakterien als Vehikel für Nährstoffe sowie Adhäsionsfaktoren und beeinflussen auf diese Weise sowohl die Bildung von neuen Zellen als auch die Differenzierung des Biofilms.[67, 71]

Zur Zusammenfassung der vielfältigen Funktionen der aus EPS zusammengesetzten Matrix von Biofilmen wurde der Begriff Matrixom eingeführt, der ursprünglich aus dem Bereich eukaryotischer Zellen stammt.[68]

Im Folgenden werden die einzelnen Entwicklungsstadien eines Biofilms beschrieben, die in Abb. 10 veranschaulicht sind.[72–75] Dabei werden die einzelnen Vorgänge modellhaft am Beispiel einer einzigen Mikroorganismenspezies betrachtet. In der Realität bestehen Biofilme jedoch selten aus nur einer Art von Mikroorganismen, sondern enthalten häufig mehrere unterschiedliche Spezies, sodass vielfältige Lebensgemeinschaften innerhalb des mikrobiellen Ökosystems resultieren.[27]

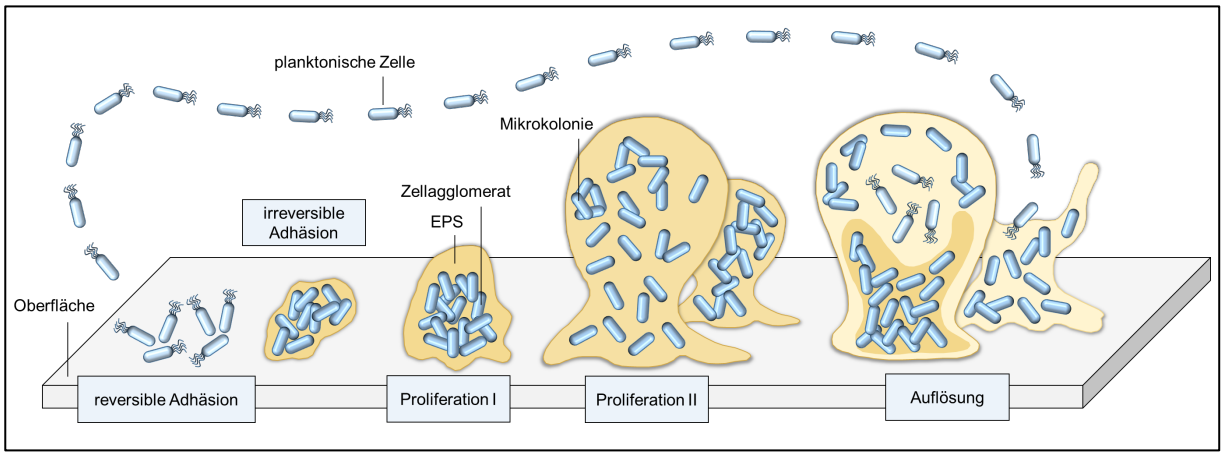

Abb. 10: Entwicklungsstadien eines Biofilms. Erstellt basierend auf der Literatur.[72–75]

Am Anfang existieren in der flüssigen Phase ausschließlich planktonische Zellen, die in Abb. 10 mit polarer Begeißelung dargestellt sind und sich aktiv in Richtung der Oberfläche bewegen. Ursache für den Wechsel der Umgebung kann beispielsweise ein chemischer Gradient in Form einer erhöhten Nährstoffkonzentration in Oberflächennähe oder die Akkumulation toxischer Substanzen in der flüssigen Phase sein. Bei Mikroorganismen, die nicht über Flagellen verfügen, ist zudem ein passiver Transport durch Sedimentation, Diffusion oder Strömungsprozesse innerhalb der Flüssigkeit möglich, sodass auch nicht-motile Zellen einen Kontakt zur Oberfläche aufbauen können.[72–76]

Zunächst erfolgt eine reversible Adhäsion, die durch verschiedene physikochemische Kräfte wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Interaktionen und hydrophobe Effekte beeinflusst wird. Die Art der Wechselwirkungen hängt unter anderem von dem chemischen Aufbau der beteiligten Oberflächenstrukturen (Mikroorganismus, Trägermaterial, Flüssigkeit) ab. Dabei wirken sich proteinhaltige Zellfortsätze wie Pili, Fimbrien und Flagellen positiv auf die Adhäsion aus. Allerdings sorgen die wirkenden Kräfte im ersten Stadium der Biofilmbildung nur für eine relativ schwache, temporäre Anlagerung der Zellen, die beispielsweise bei einer kurzzeitigen Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit im flüssigen Medium destabilisiert werden kann, sodass es wieder zur Ablösung der anhaftenden Mikroorganismen kommt.[72–76]

Werden die initialen Wechselwirkungen zwischen den Zellen und der Oberfläche nicht überwunden, folgt eine Phase der irreversiblen Adhäsion. Diese wird durch Adhäsine gefördert, welche als stabile Verbindungselemente fungieren. Dabei können neben Kontaktstellen zur Oberfläche auch Vernetzungen zwischen den Zellen einer oder mehrerer Spezies gebildet werden, wenn interzelluläre Adhäsine zum Einsatz kommen.[74, 77] Über die Strukturelemente bilden sich Agglomerate aus einzelnen Zellen, die zudem durch Quorum sensing kommunizieren. Dabei ermöglicht die Sekretion von Signalmolekülen in Verbindung mit der anschließenden Detektion durch benachbarte Individuen die Messung der Zelldichte.[23, 24, 72, 78] Auf diesem Wege ist die Zellpopulation in der Lage, die Expression bestimmter Gene zu regulieren, die beispielsweise für die Rückbildung der Flagellen verantwortlich sind. Abb. 10 veranschaulicht die entsprechende Änderung des Phänotyps, da die Zellen nach irreversibler Adhäsion ohne Flagellum gezeichnet sind – im Gegensatz zu den planktonischen Zellen, die sich im begeißelten Zustand durch die flüssige Phase bewegen.[67, 79, 80]

Ein weiterer zellulärer Vorgang, der von grundlegender Bedeutung für die Biofilmbildung ist und durch Quorum sensing initiiert wird, ist die Biosynthese bzw. Sekretion von EPS (gelb in Abb. 10). In Abhängigkeit vom jeweiligen Mikroorganismus erfolgt dabei eine Regulation durch bestimmte Operons, die für extrazelluläre Polysaccharide codieren. Beispielsweise wird die Biosynthese von Alginat bei *Pseudomonas aeruginosa* über das *alg*-Operon reguliert, während zur Produktion von Xanthan bei *Xanthomonas campestris* das *gum*-Operon verantwortlich ist.[79–82]

Im Anschluss an die EPS-Produktion kommt es zu mehreren Phasen der Proliferation, die mit der Bildung von Mikrokolonien einhergehen. Diese wachsen im Laufe der Zeit bei ausreichender Verfügbarkeit von Nährstoffen zu einer ausgedehnten Biofilmstruktur heran, die durch komplexe räumliche Anordnungen und Kanalsysteme gekennzeichnet ist. Diese Strukturen ermöglichen den Austausch von Nährstoffen und tragen zur langfristigen Stabilität des Biofilms bei.[72–75]

Im Falle eines Nährstoffmangels, einer Akkumulation von toxischen Metaboliten oder weiterer ungünstiger Veränderungen der Umgebungsbedingungen wie der Temperatur kann es zur Auflösung des ausgebildeten Biofilms kommen. Wie in Abb. 10 veranschaulicht, findet in dieser Phase eine erneute Veränderung des Phänotyps statt, sodass die Zellen innerhalb der destabilisierten Biofilmstruktur polar begeißelt sind. In diesem Zustand können die Mikroorganismen wieder vollständig in den planktonischen Zustand übergehen, bevor sie den fragmentierten Biofilm verlassen. Ergänzend zu der in Abb. 10 dargestellten Variante der Desintegration, bei der sich einzelne Zellen aktiv aus dem Biofilm herausbewegen, können auch Teilstrukturen des Biofilms durch hydrodynamische Kräfte so weit destabilisiert werden, dass sich diese in Form von Agglomeraten ablösen, die anschließend in der Flüssigkeit suspendiert sind. Sowohl planktonische Zellen als auch Agglomerate sind in der Lage, eine neue Oberfläche zu besiedeln, wodurch der Zyklus der Biofilmbildung gemäß Abb. 10 von vorne beginnt.[72–75]

Im Gegensatz zu planktonischen Zellen, die sich frei durch ein flüssiges Medium bewegen, geht der sessile Zustand innerhalb eines Biofilms mit einer grundsätzlichen Änderung der Substratverfügbarkeit einher und beeinflusst zudem die Verteilung von Stoffwechselprodukten. Zur Betrachtung der jeweiligen Konzentrationsgradienten existieren verschiedene Modelle, die den Verlauf der Substrat- und Produktkonzentration im Biofilm, dem angrenzenden Wasserfilm und der Flüssigkeit in vereinfachter Form beschreiben. Anhand von Abb. 11 sollen im Folgenden die Konzentrationsgradienten exemplarisch betrachtet werden.[83–86]

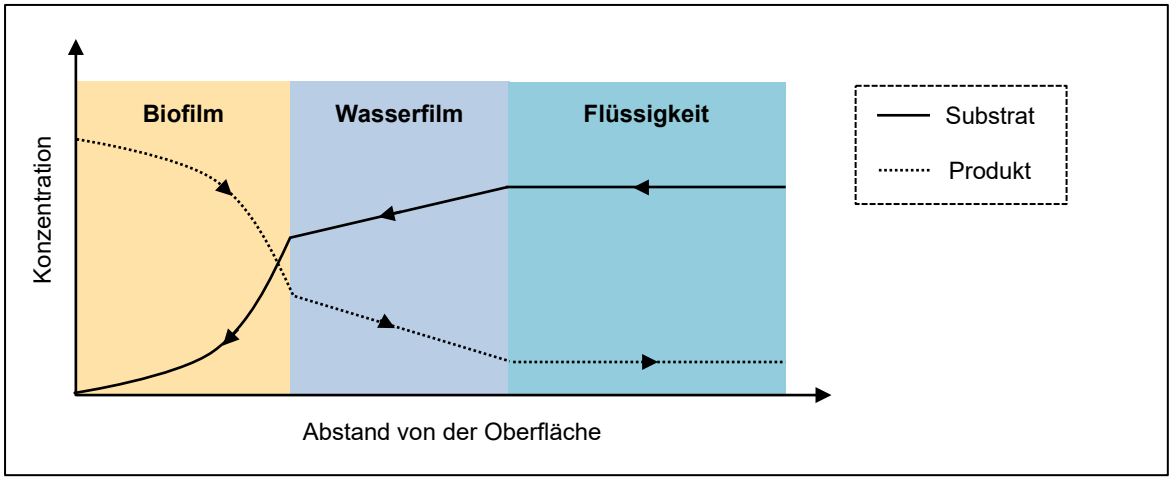

Abb. 11: Konzentrationsgradient eines Substrates und eines Produktes im Biofilm und den angrenzenden flüssigen Phasen. Erstellt basierend auf der Literatur.[83–86]

In der Flüssigkeit weist die Substratkonzentration einen hohen und konstanten Wert auf, da an dieser Stelle das Substrat nicht in den Biofilm übergeht und keine signifikante mikrobielle Aktivität stattfindet, die zu einem biologischen Abbau des Substrates führen würde. In der angrenzenden Phase, dem Wasserfilm, ist die Substratkonzentration leicht reduziert, nachdem ein Teil des Substrates bereits in den Biofilm diffundiert ist. An der Oberfläche des Biofilms, die mit dem Wasserfilm in Kontakt steht, ist die Substratkonzentration relativ hoch, da das Substrat aus der Umgebung durch Diffusion in den Biofilm eintritt. Die Diffusion ist der Hauptmechanismus, durch den Substrate in den Biofilm gelangen. Aufgrund der Verbrauchsrate der Mikroorganismen im Biofilm nimmt die Substratkonzentration mit zunehmender Tiefe exponentiell ab.[83–86] Innerhalb des Biofilms können sich in Abhängigkeit der Sauerstoffverfügbarkeit sowohl aerobe als auch anaerobe Zonen bilden, wodurch die mikrobielle Aktivität und der biologische Schadstoffabbau wesentlich beeinflusst werden. Bereiche mit unterschiedlicher Sauerstoffexposition treten bereits in einem Abstand von wenigen Hundert Mikrometern auf, was die gleichzeitige Existenz von aeroben und anaeroben Mikroorganismen ermöglicht. Neben der Diffusion spielen innerhalb des Biofilms auch konvektive Transportprozesse eine Rolle, die jedoch lediglich in Hohlräumen und Kanälen stattfinden, falls diese von der umgebenden Flüssigkeit durchströmt werden.[27]

Im Gegensatz zum Substrat liegt das Produkt innerhalb des Biofilms, insbesondere in den tieferen Schichten, in höherer Konzentration vor, da es dort durch die mikrobiellen Stoffwechselprozesse entsteht. Nach der Freisetzung in den Extrazellularraum diffundiert das

Produkt in Richtung der äußeren Schichten des Biofilms, was zu einem Konzentrationsgradienten führt, der in Richtung der Biofilmoberfläche abnimmt.[86]

Innerhalb des Wasserfilms nimmt die Produktkonzentration weiterhin ab, bis bei Eintritt in die umgebende Flüssigkeit ein konstanter Wert erreicht wird, der gleichzeitig das Minimum darstellt. Voraussetzung für den in Abb. 11 gezeigten Verlauf ist, dass keine temporäre oder kontinuierliche Abtrennung des Produktes im Rahmen eines mechanischen oder chemischen Aufarbeitungsverfahrens stattfindet.[86]

2.1.4 Konservierung von Mikroorganismen

Biotechnologische Prozesse wie Fermentationen, bei denen Mikroorganismen zum Einsatz kommen, erfordern meist die Bereitstellung eines geeigneten Inokulums, das ausreichend vitale Zellen mit hoher Stoffwechselaktivität enthält.[87–89] Die Herstellung von lagerstabilen Pulvern mit lebenden Zellen gelingt beispielsweise mithilfe der Sprühtrocknung.[87, 90] Dabei erfolgt eine Zerstäubung der Flüssigkeit mit den Mikroorganismen, die im Anschluss in einem heißen Luftstrom getrocknet werden. Abb. 12 zeigt den schematischen Aufbau eines Sprühtrockners im Gleichstrombetrieb. Bei dieser Variante wird das Gas in die gleiche Richtung transportiert wie die zerstäubte Flüssigkeit. Durch eine Zweistoffdüse erfolgt zunächst die Vermischung von Druckluft mit der zu trocknenden Flüssigkeit.[91–93]

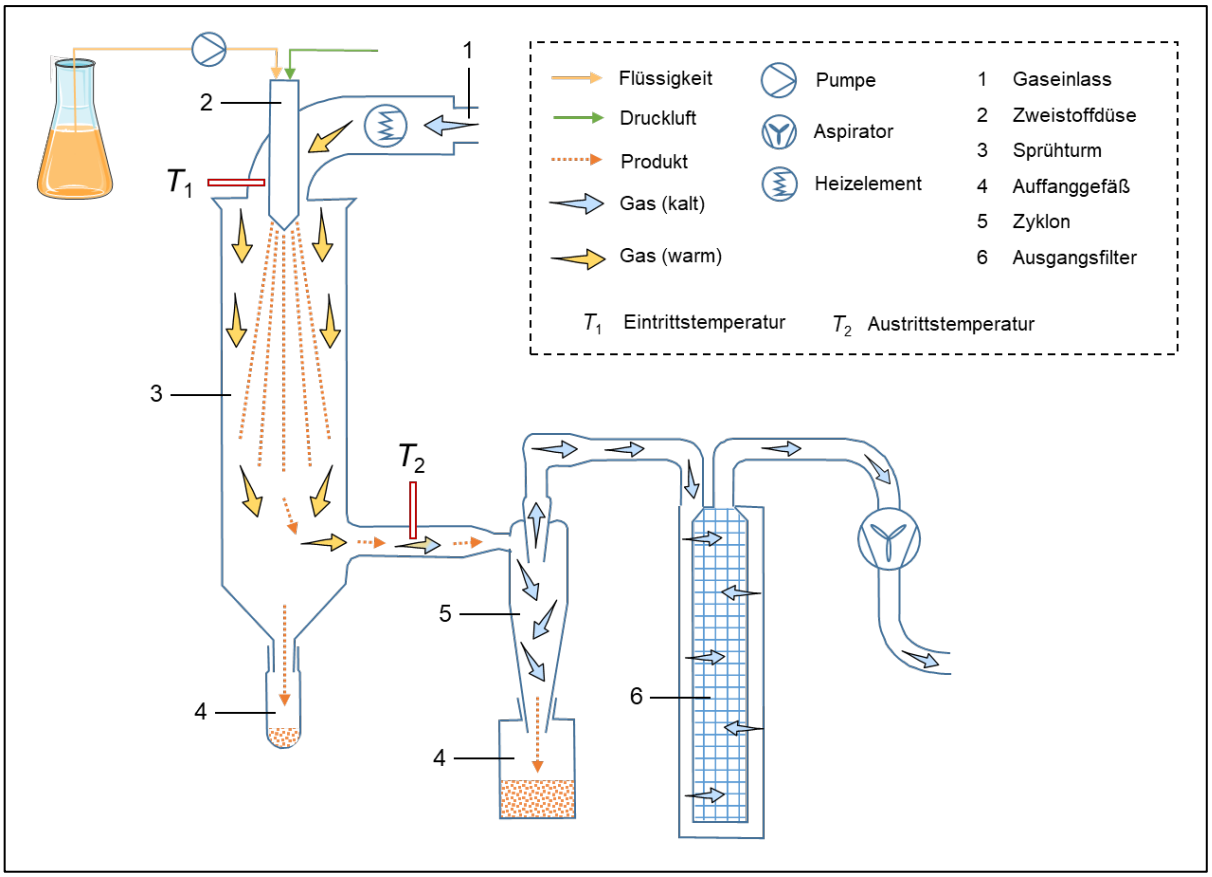

Abb. 12: Aufbau eines Sprühtrockners im Gleichstrombetrieb. Erstellt basierend auf der Literatur.[91–93] Die Grafik enthält Elemente von Servier Medical Art, die unter CC BY 4.0 lizenziert sind und geringfügig modifiziert wurden. Weitere Informationen unter: https://smart.servier.com/.

Anstelle von Druckluft kann bei oxidationsempfindlichen Substanzen auch Inertgas – beispielsweise N_2 – eingesetzt werden. Nach Passage der Zweistoffdüse liegt die Flüssigkeit in Form von fein dispergierten Tropfen vor, die sich im Sprühturm verteilen.[91–93] Als Trocknungsmedium dient ein warmes Gas, in der Regel Luft, das durch ein Heizelement temperiert und anschließend in der gleichen Richtung transportiert wird wie die dispergierte Flüssigkeit.[91–93] Die Eintrittstemperatur der erwärmten Luft liegt typischerweise zwischen 150 °C und 220 °C.[94] Dabei erfolgt die Trocknung im Gegensatz zu anderen Verfahren sehr schnell, meist in Bruchteilen von Sekunden, da durch die Zerstäubung das Verhältnis von Oberfläche zum Volumen der Partikel enorm vergrößert wird. Aufgrund des effizienten Wärmeaustausches mit dem umgebenden Gasstrom resultiert meist unmittelbar die Verdampfung der Flüssigkeit, wodurch der Trocknungsvorgang ebenfalls beschleunigt wird. Die getrockneten Partikel werden im beispielhaften Aufbau (siehe Abb. 12) in zwei Auffanggefäßen gesammelt, wobei der Großteil über einen Zyklon aus dem Luftstrom abgeschieden wird. Über den Ausgangsfilter erfolgt die Separierung von Feinstpartikeln, um eine Gefährdung von Mensch und Umwelt zu vermeiden. Für die Aufrechterhaltung des Luftstroms sorgt der Aspirator, welcher nach dem Ausgangsfilter eingebaut ist.[91–93]

Der Verlauf der Trocknung kann am Beispiel eines singulären Flüssigkeitstropfens mit gelöstem Feststoff modellhaft betrachtet werden. Dabei lassen sich vier verschiedene Phasen beobachten, die in Abb. 13 visualisiert sind.[95–98]

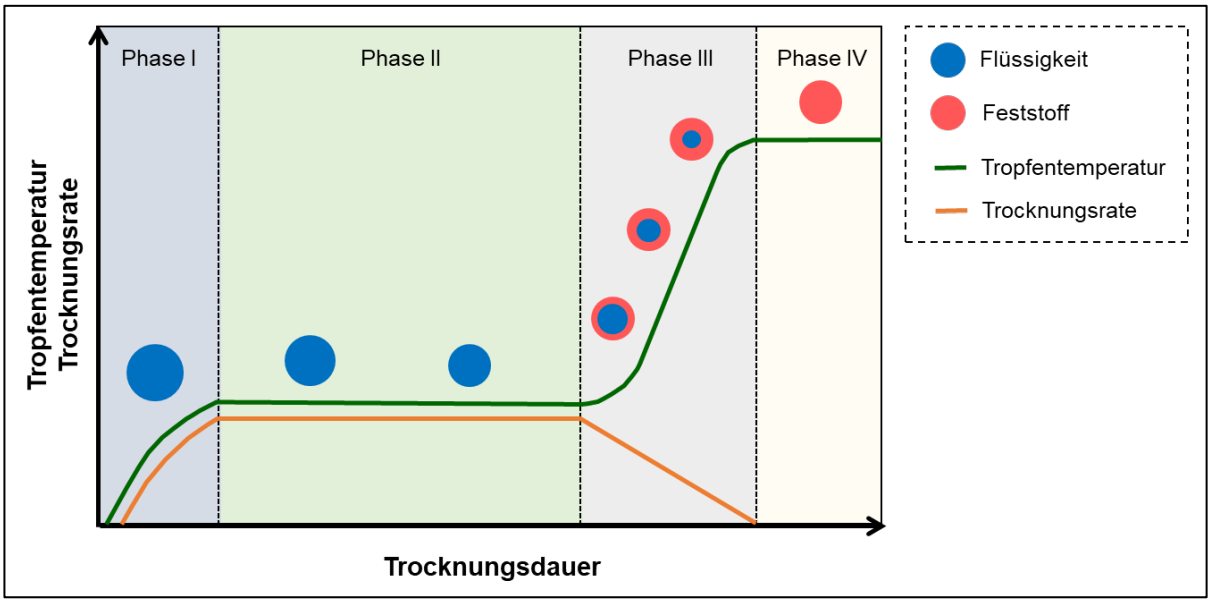

Abb. 13: Trocknungsverlauf am Beispiel eines singulären Tropfens bei der Sprühtrocknung. Erstellt basierend auf der Literatur.[95–98]

Bevor der Trocknungsprozess beginnt, wird der Tropfen durch das umgebende Trocknungsmedium erwärmt, bis ein thermisches Gleichgewicht erreicht ist, das durch den Wärmeverlust infolge der Flüssigkeitsverdunstung bzw. -verdampfung und den Wärmeeintrag beeinflusst wird. In den ersten beiden Phasen erfolgt die Trocknung ungehindert, ähnlich wie bei einem reinen Flüssigkeitstropfen. Die Triebkraft für die Verdunstung der Flüssigkeit ist die Differenz zwischen deren Dampfdruck und dem Partialdruck in der Umgebung. Die Rate der

Verdunstung wird jedoch durch die benötigte Energie und somit durch den Wärmetransfer zur Tropfenoberfläche begrenzt.[95–98]

Während die Trocknung fortschreitet, diffundieren die Flüssigkeitsmoleküle aus dem Inneren der feuchten Partikel zur Oberfläche. Die Trocknungsrate, definiert als Oberflächenreduktion pro Zeiteinheit, bleibt in der zweiten Phase konstant, während das Volumen des Tropfens reduziert wird. An der Oberfläche findet die Verdunstung der Flüssigkeit statt, wodurch die Konzentration der gelösten Stoffe dort zunimmt. Ab einem bestimmten Punkt führt diese Anreicherung zu Kristallisation und Krustenbildung. Mit der Bildung der Kruste beginnt die dritte Phase, in der die Verdunstung der Flüssigkeit verlangsamt wird. Die Trocknungsrate wird nun durch den Transport der Flüssigkeit aus dem feuchten Kern durch die Poren der Kruste zur Oberfläche bestimmt. Der Feuchtegehalt wird weiterhin reduziert, und die Kruste wächst zur Tropfenmitte hin, was die Verdunstungsrate verlangsamt. Daher wird weniger Energie benötigt, und die Tropfentemperatur passt sich der Temperatur des Trocknungsmediums an. Der Trocknungsprozess ist abgeschlossen, sobald die restliche Flüssigkeit innerhalb des Partikels im Gleichgewicht mit der Umgebung steht und die Verdunstungsrate 0 beträgt. Die getrockneten Partikel können verschiedene Morphologien annehmen, wobei infolge der Mikroverkapselung häufig eine sphärische Struktur auftritt.[95–98]

In der Lebensmittelindustrie wird die Sprühtrocknung unter anderem zur Mikroverkapselung von bioaktiven Inhaltsstoffen wie Ölen oder Aromen eingesetzt. Durch diese Form der Nachbehandlung ergeben sich zahlreiche Vorteile, beispielsweise wird die Löslichkeit verbessert, die Stabilität sensitiver Substanzen erhöht, die Freisetzung verzögert oder ein unangenehmer Geschmack maskiert.[99] Auch zur Herstellung lagerfähiger probiotischer Bakterien[90, 100–102] und Hefen[103–106] eignet sich die Sprühtrocknung. Im Vergleich zur Gefriertrocknung lassen sich dabei die Fix- und Herstellungskosten senken.[90] Es muss jedoch beachtet werden, dass die Anzahl an vitalen Zellen aufgrund der hohen Temperaturen und des Wasserentzugs infolge der Sprühtrocknung reduziert wird. Trotz des Kühlungseffektes durch die Verdunstung bzw. Verdampfung sind die Temperaturen hoch genug, um zur Denaturierung von Proteinen und zur Beeinträchtigung der Zellmembranstruktur zu führen. Ein weiterer Grund für die Verringerung der Viabilität während des Sprühtrocknungsprozesses ist die Dehydration. Biomoleküle wie Proteine, Nucleinsäuren und Lipide sind auf die Anwesenheit von molekular gebundenem Wasser angewiesen, um ihre zelluläre Funktion zu erfüllen. Ein zu geringer Wassergehalt als Folge der Trocknung führt zu Veränderungen der Zellmembran, die den primären Ort der Inaktivierung durch Dehydration darstellt.[107, 108]

Um die negativen Auswirkungen der thermischen Belastung und Dehydration zu reduzieren, können während der Kultivierung der Zellen oder unmittelbar vor der Sprühtrocknung Schutzsubstanzen in Form von Oligosacchariden, Aminosäuren oder Proteinen hinzugefügt werden.[109] Eine wichtige Voraussetzung zur Verbesserung der Überlebensrate auf molekularer Ebene ist der Ersatz des an hydrophile Zellstrukturen gebundenen Wassers durch Schutzsubstanzen. Infolgedessen bleibt die native Konformation der Proteine auch im dehydratisierten Zustand erhalten, was zu einer verbesserten Viabilität der Mikroorganismen nach der Trocknung führt. Außerdem wird die Phospholipiddoppelschicht durch zusätzliche

Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert, die zwischen den hydrophilen Kopfgruppen und den Schutzsubstanzen ausgebildet werden.[110, 111]

Abb. 14 zeigt eine modellhafte Darstellung der beschriebenen Substitution in den hydrophilen Bereichen der Cytoplasmamembran. Die Integration der Schutzsubstanzen führt zu einer Verringerung der Phasenübergangstemperatur der Membranlipide vom kristallinen in den gelartigen Zustand. Dadurch bleibt die Cytoplasmamembran auch bei niedrigeren Temperaturen stabil, was sich positiv auf die Überlebensrate der Mikroorganismen bei gekühlter Lagerung auswirkt. Wenn die Komponenten der Membran nach Übergang in den Glaszustand in amorpher, nicht-kristalliner Form vorliegen, werden außerdem chemische Reaktionen – beispielsweise oxidative oder hydrolytische Prozesse – verlangsamt, die zu einer Beeinträchtigung der Struktur und Funktion führen. Die in Abb. 14 veranschaulichte Interaktion der Schutzsubstanzen mit dem hydrophilen Kopfbereich der Phospholipide gelingt dabei nur, wenn relativ kleine Oligosaccharide vorliegen, z. B. das Disaccharid Trehalose. Kohlenhydrate mit einer hohen molaren Masse, wie das Polysaccharid Dextran, können sich aus sterischen Gründen nicht zwischen den Kopfgruppen positionieren. Folglich wird der erwünschte Effekt einer reduzierten Phasenübergangstemperatur der Membranlipide bei Polysacchariden nicht beobachtet.[112]

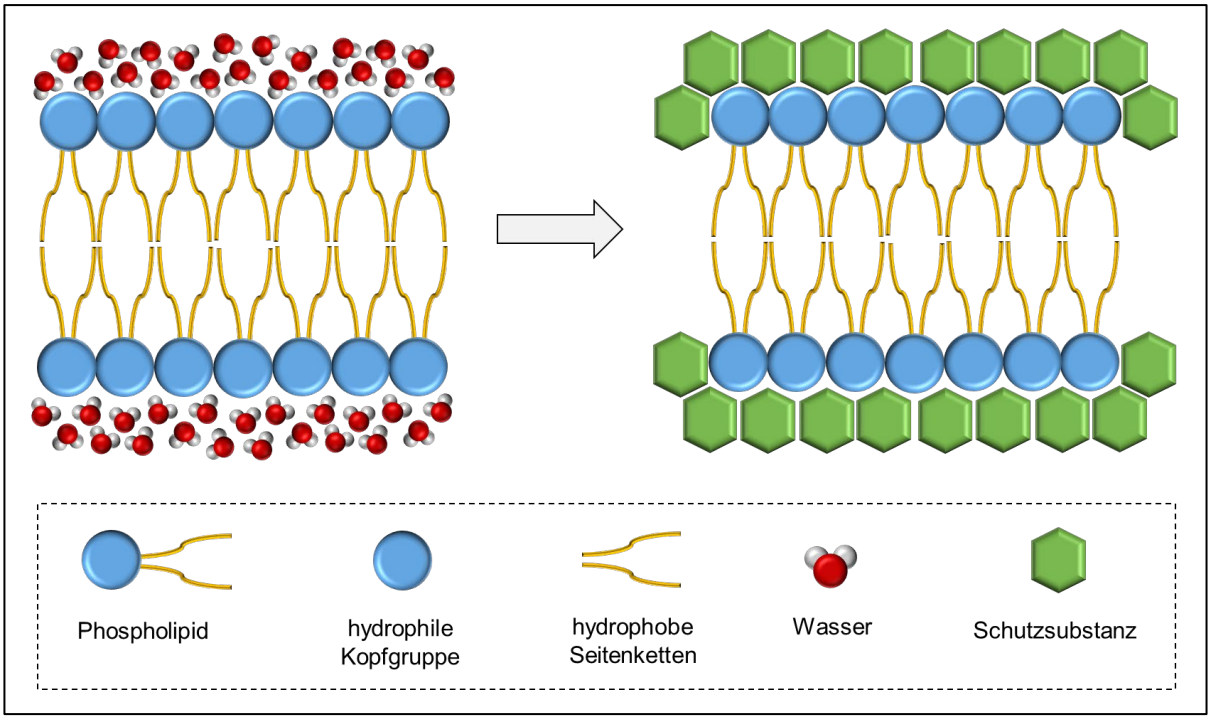

Abb. 14: Substitution von Wassermolekülen im hydrophilen Bereich der Cytoplasmamembran durch Schutzsubstanzen. Erstellt basierend auf der Literatur.[112]

Des Weiteren wird angenommen, dass bestimmte Schutzsubstanzen wie Kohlenhydrate eine Reduzierung des oxidativen Stresses bewirken, indem sie als Reaktionspartner für freie Radikale fungieren. Allerdings sind die genauen Mechanismen der antioxidativen Wirkung noch nicht vollständig aufgeklärt.[112]

Neben dem Abfangen freier Radikale wird eine Komplexierung von Wasserstoffperoxid sowie eine Limitierung der Sauerstoffdiffusion infolge der Viskositätserhöhung durch den Zusatz von Sacchariden diskutiert.[113–115]

Die Anreicherung von Schutzsubstanzen vor der Trocknung fördert den Übergang in die Anhydrobiose, einen Zustand, der durch eine extrem niedrige Stoffwechselaktivität gekennzeichnet ist. Bestimmte Arten von Mikroorganismen bleiben in diesem Zustand jahrelang vital und können sich nach der Rehydratisierung erneut vermehren.[111] Neben der Zugabe von Schutzsubstanzen wird die Überlebensrate primär durch die Betriebsparameter während der Sprühtrocknung beeinflusst. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die Eintrittstemperatur des Trocknungsmediums, die Förderrate der Flüssigkeit vor der Zerstäubung, die Düsengeometrie, die Aufenthaltsdauer im Sprühtrockner und die Zusammensetzung der Flüssigkeit hinsichtlich Feststoff- und Wassergehalt.[90]

2.2 Verfahren zur Reinigung ammoniakhaltiger Abluftströme

2.2.1 Chemowäscher

Eine effektive Methode zur Reinigung ammoniakhaltiger Abluftströme stellen Chemowäscher dar. Mithilfe einer Waschflüssigkeit erfolgt die Absorption und die chemische Umwandlung des Ammoniaks. Der Aufbau eines Chemowäschers ist in Abb. 15 veranschaulicht.[116, 117]

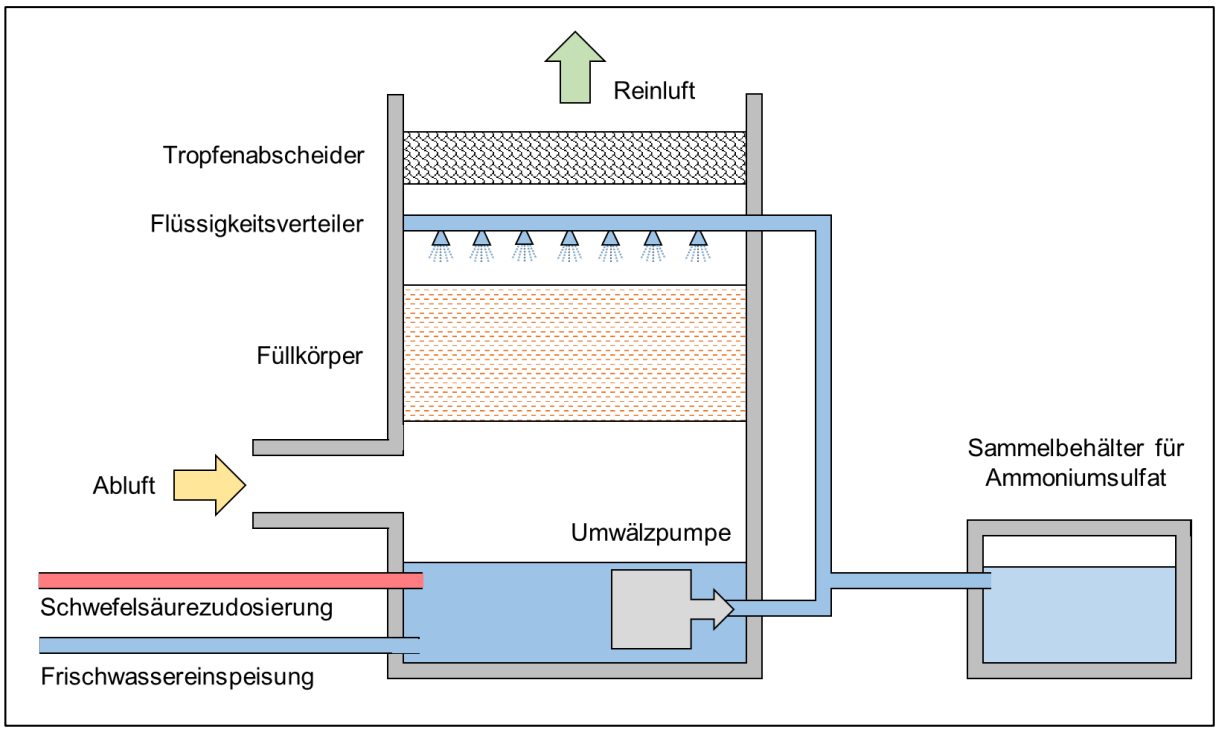

Abb. 15: Beispiel für den Aufbau eines Chemowäschers. Erstellt basierend auf der Literatur.[116, 117]

Das Funktionsprinzip des Chemowäschers beruht auf einer Schüttung, die aus vertikal oder horizontal angeordneten Füllkörpern besteht und über Flüssigkeitsverteiler kontinuierlich mit Waschflüssigkeit in Kontakt kommt. Die Zirkulation erfolgt durch eine Umwälzpumpe. Die Abluft wird über die feuchte Schüttung geleitet, wodurch das gasförmige Ammoniak in Kontakt mit der wässrigen Phase kommt und in gelöster Form gebunden wird.[118–120]

Der pH-Wert der Waschflüssigkeit wird durch Zugabe einer anorganischen Säure – meist Schwefelsäure (H_2SO_4) – gezielt gesenkt, um ein saures Milieu (pH-Wert unter 5) zu gewährleisten. Auf diese Weise wird das pH-Wert-abhängige Gleichgewicht zwischen Ammoniak und Ammonium (siehe Abb. 3) in Richtung von Ammonium verschoben, wodurch Verluste durch Ausgasung von Ammoniak minimiert werden und Stickstoff in aufkonzentrierter Form im Waschwasser vorliegt. Im Anschluss bildet sich gemäß der folgenden Reaktionsgleichung das Salz Ammoniumsulfat, das bis zur Löslichkeitsgrenze von 772 g/L in vollständig gelöster Form in der Waschflüssigkeit vorliegt.[118–120]

$$2\ NH_4^+ + SO_4^{2-} \longrightarrow (NH_4)_2SO_4 \qquad \text{(Gl. 12)}$$

Die Ammoniumsulfatkonzentration wird üblicherweise auf 150 g/L begrenzt, was ca. 40 % der maximalen Löslichkeit von Ammoniumsulfat entspricht. Bei Überschreitung der Löslichkeitsgrenze kann eine Verblockung des Systems durch Feststoffpartikel resultieren. Die Konzentration der Lösung kann durch die Messung der elektrischen Leitfähigkeit überwacht werden, wobei 15 mS/cm etwa 14 g/L entsprechen. Ein Tropfenabscheider verhindert den Austrag von Aerosolen aus dem Chemowäscher. Die konzentrierte Ammoniumsulfatlösung kann nach Erreichen des Sollwertes in einen Sammelbehälter gepumpt werden, um anschließend eine Verwertung als Düngemittel zu ermöglichen.[121]

Bei Geflügelställen dienen Chemowäscher neben der Bindung von Ammoniak auch zur Abtrennung von Staub. Eine Vorbefeuchtung der Abluft erlaubt zunächst eine Grobstaubabscheidung. Über die Füllkörper und die Zirkulation können im Anschluss Feinstaubpartikel aus dem Gasstrom entfernt werden. In der Praxis müssen Chemowäscher auf eine variierende Ammoniakkonzentration, Luftfeuchtigkeit und Temperatur ausgelegt sein. Die Dimensionierung des Chemowäschers und die Durchflussrate der Waschflüssigkeit werden abhängig von der Stallgröße und der Luftwechselrate festgelegt. Korrosionsbeständige Materialien wie Edelstahl oder Kunststoff sind aufgrund der aggressiven Chemikalien empfehlenswert. Von der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft (DLG) wurden mehrere Chemowäscher hinsichtlich der Emissionsminderung von Ammoniak und Staub bei Masthähnchenställen geprüft und als Abluftreinigungsverfahren im Rahmen von Prüfberichten anerkannt.[122–124]

Ein Nachteil von Chemowäschern ist die mangelnde Neutralisation von Geruchsstoffen, die in der Abluft enthalten sind.[118, 120] In Ausnahmefällen wurde jedoch eine signifikante Reduzierung der Konzentration von geruchsintensiven Verbindungen wie Schwefelwasserstoff (H_2S) beobachtet, die auf die Anwesenheit von chemolithotrophen Bakterien, beispielsweise *Thiobacillus thiooxidans* zurückzuführen ist. Diese sind in der Lage, bei einem pH-Wert unterhalb von 4 zu wachsen und H_2S als Substrat zu verstoffwechseln, wodurch bei der Olfaktometrie eine Verringerung der Geruchsbelastung resultiert.[120]

2.2.2 Biowäscher

Während die Reinigung von Abluftströmen durch Chemowäscher ausschließlich auf einer chemischen Reaktion beruht, basieren Biowäscher auf dem Einsatz von Mikroorganismen, die einen biologischen Abbau der Schadstoffe ermöglichen. Abb. 16 veranschaulicht den prinzipiellen Aufbau eines Biowäschers.[125, 126]

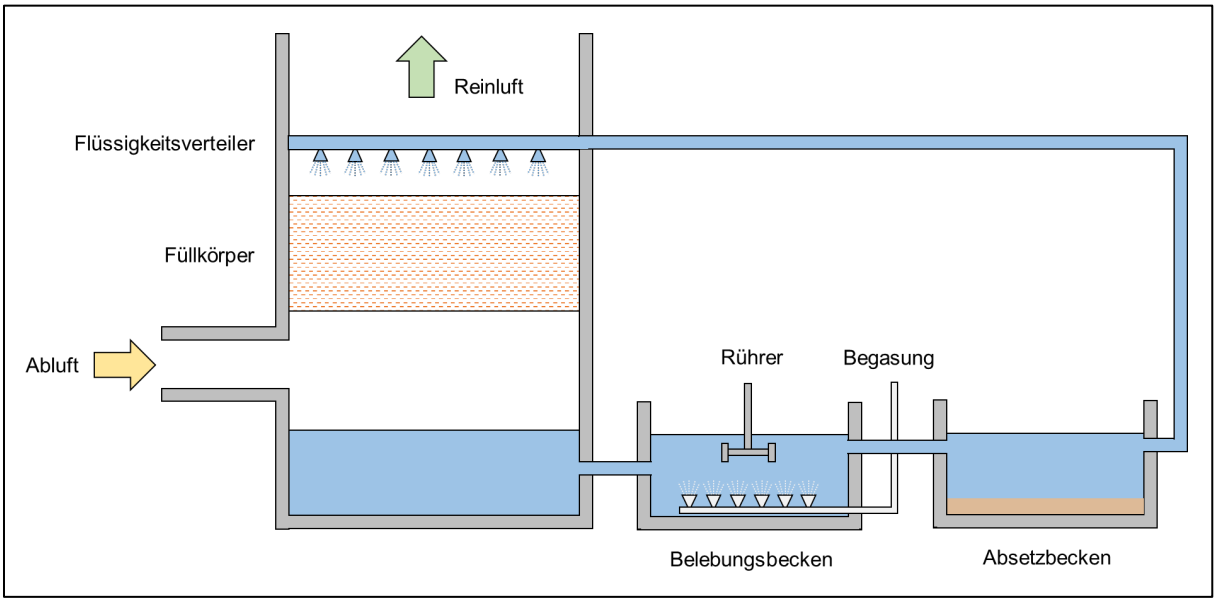

Abb. 16: Aufbau eines Biowäschers. Erstellt basierend auf der Literatur.[125, 126]

Analog zum Chemowäscher passiert die schadstoffhaltige Abluft zunächst eine Schüttung aus Füllkörpern, wobei über einen Flüssigkeitsverteiler kontinuierliche Befeuchtung erfolgt. Um eine möglichst große Phasengrenzfläche zu erzeugen, dienen in der Praxis meist Venturi-, Sprüh- oder Strahlwäscher zum Stoffaustausch. Durch den Kontakt mit der flüssigen Phase erfolgt eine physikalische Absorption der gasförmigen Substanzen aus dem Abluftstrom. Im Anschluss findet der biologische Abbau in einem separaten Belebungsbecken statt, das suspendierte Mikroorganismen enthält und auch in Kläranlagen zur Abwasserreinigung eingesetzt wird. Zur Förderung der aeroben Stoffwechselvorgänge erfolgt eine Begasung mithilfe von Luft aus der Umgebung der Anlage. Ein Rührer garantiert eine ausreichende mechanische Durchmischung und verbessert die Sauerstoffverteilung in der gesamten Flüssigkeit. Um einen optimalen Schadstoffabbau zu gewährleisten, müssen die Prozessparameter im Belebungsbecken (pH-Wert, Nährstoffkonzentration, Sauerstoffgehalt) kontinuierlich überwacht werden. Das in Abb. 16 dargestellte, nachgeschaltete Belebungsbecken kann auch in die Absorbereinheit integriert sein. Bei ausreichender Sauerstoffzufuhr über die Einleitung der Abluft ist keine zusätzliche Begasung mit Umgebungsluft erforderlich. Durch das mikrobielle Wachstum anfallende, überschüssige Biomasse wird regelmäßig aus der Suspension entfernt und in einem Absetzbecken gelagert, um innerhalb der Flüssigkeit die Separation der Biomasse durch Sedimentation zu ermöglichen. Außerdem erfolgt eine Zirkulation der Flüssigkeit, die suspendierte Mikroorganismen beinhaltet, sodass diese erneut zur Berieselung der Füllkörper und damit zur Absorption weiterer gasförmiger Schadstoffe aus dem eingeleiteten Abluftstrom verwendet werden kann.[27, 125, 126]

2.2.3 Biofilter

Im Gegensatz zu Biowäschern weisen Biofilter meist eine kompaktere Bauweise auf, die für eine einstufige Ausführung in Abb. 17 illustriert ist. Die Anlage wurde von der DLG geprüft und wird zur Geruchs- bzw. Gesamtstaubabscheidung bei der einstreulosen Tierhaltung eingesetzt.[27]

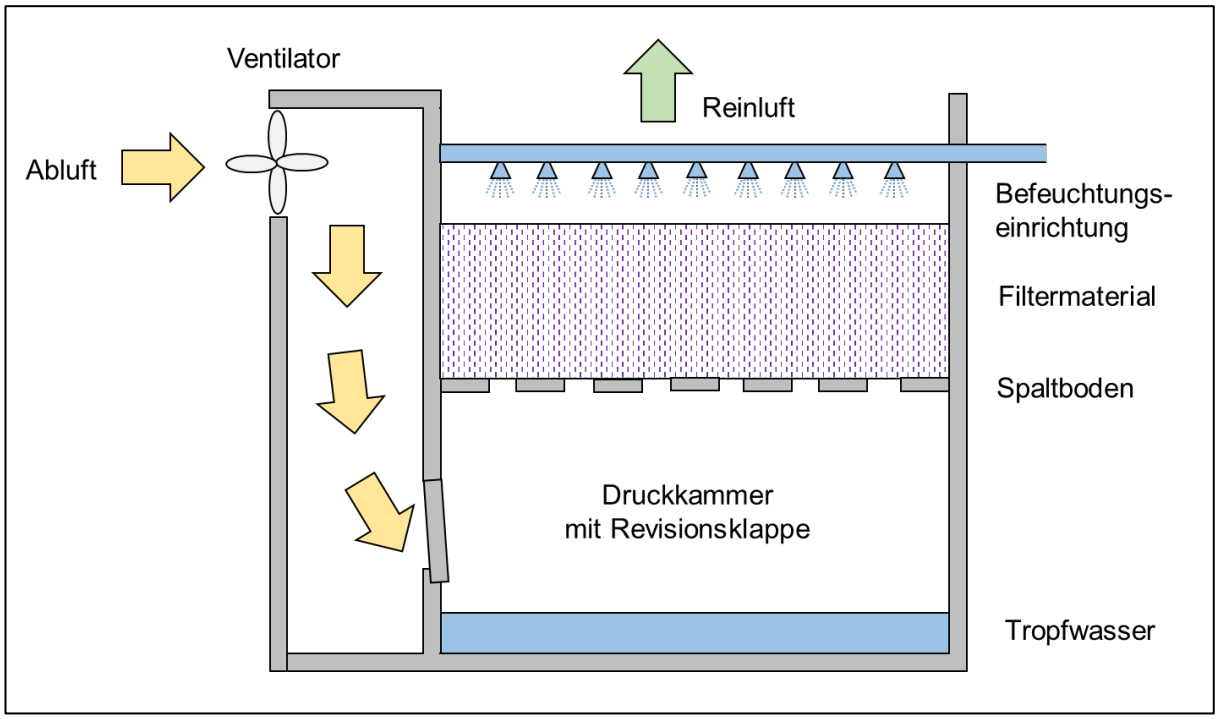

Abb. 17: Aufbau eines einstufigen Biofilters. Erstellt basierend auf der Literatur.[27]

Die Abluft wird im ersten Schritt über einen Ventilator in den Innenraum der Anlage transportiert und gelangt zunächst in eine Druckkammer, um eine gleichmäßige Verteilung des Gasstroms über die gesamte Fläche des Filtermaterials zu ermöglichen. Dadurch soll vermieden werden, dass sich innerhalb der Schüttung bevorzugte Strömungswege bilden und bestimmte Bereiche nur unzureichend mit der Abluft in Kontakt kommen. Das Filtermaterial wird durch eine Befeuchtungseinrichtung mit Flüssigkeit versorgt, um das Wachstum von Mikroorganismen zu ermöglichen, die einen schadstoffabbauenden Biofilm bilden. Eine ausreichende Feuchtigkeit ist ein kritischer Faktor für die Aufrechterhaltung der Abbauleistung, da die biologische Aktivität stark von der Wasseraktivität (a_w-Wert) abhängt. Die durch die biologische Reaktion erzeugte Wärme und die Feuchtigkeit der einströmenden Luft beeinflussen den Wasserverlust und -bedarf.[127] Kritisch wirkt sich ein Abluftstrom mit geringer Luftfeuchtigkeit aus, weshalb in diesem Fall eine Vorbefeuchtung empfohlen wird. Durch intermittierende Berieselung mit Wasser werden potenzielle Flüssigkeitsverluste infolge der Durchströmung und des biologischen Abbaus regelmäßig kompensiert.[27, 125, 126]

Als Trägermaterialien können entweder natürliche biologisch aktive oder inerte Materialien zum Einsatz kommen. Zu den natürlichen bioaktiven Trägermaterialien gehören unter anderem Torf, Kompost und Rinde, die Wasser speichern können und in der Regel ausreichend Mineralstoffe enthalten, um eine initiale Besiedelung durch die Mikroorganismen

zu ermöglichen.[128] Außerdem verfügen die natürlichen Substanzen über eine große Anzahl und Vielfalt an Mikroorganismen, was für den Aufbau eines stabilen Biofilms von Vorteil ist.[27] Die genannten Trägermaterialien sind relativ kostengünstig und leicht zu beschaffen. Um die strukturellen Eigenschaften zu verbessern, wird in der Regel eine Mischung von Trägermaterialien verwendet, einschließlich einer gröberen Fraktion, um einen hohen Druckabfall innerhalb der Schüttung zu verhindern. Zusatzstoffe wie Säuren oder Basen und langsam freisetzende Nährstoffe können verwendet werden, um den Aufbau von Biomasse zu beschleunigen. Die natürlichen Trägermaterialien können mit der Zeit abgebaut werden. Dadurch ändern sich die Strukturierung der Schüttung und die Wasseraufnahmekapazität, was zu einer negativen Beeinflussung des Schadstoffabbaus führt.[129] Die Abscheideleistung kann auch negative Werte annehmen, was einer Produktion von Schadstoffen entspricht. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn keine ausreichende Befeuchtung des Trägermaterials gewährleistet wird. Infolgedessen kommt es zur Akkumulation von Ammonium und Nitrit.[130, 131] In einigen Fällen kann die biologische Aktivität durch Mischen des Trägermaterials mit neuem Material in Verbindung mit Nährstoffen wiederhergestellt werden.[132] Ein vollständiger Austausch ist jedoch auch bei ordnungsgemäßer Wartung nach mehreren Jahren unvermeidbar.[126]

Inerte natürliche oder synthetische Trägermaterialien kommen ebenfalls in Biofiltern zum Einsatz. Poröse Materialien, wie Aktivkohle, Keramik, gesintertes Glas, Lavagestein, Polyurethanschaum, Vermiculit und Perlit, enthalten häufig nicht ausreichend Nährstoffe, um die mikrobielle Aktivität aufrechtzuerhalten, weshalb eine separate Zugabe geeigneter Substrate erfolgen muss. Vorteilhaft im Vergleich zu bioaktiven Trägermaterialien ist jedoch die hohe Beständigkeit gegenüber Abbauprozessen. Außerdem kann bei synthetischen Füllkörpern eine gezielte Anpassung der Eigenschaften wie der Porosität oder der Adsorptionskapazität vorgenommen werden. Dies ist Gegenstand der aktiven Forschung.[133] Die große Oberfläche und der geringe Wassergehalt von Biofiltern erlauben die Anwendung zur Reinigung von Abluftströmen mit hydrophoben Schadstoffen. Das Füllvolumen des Trägermaterials wird an die Höhe der Schüttung angepasst, die typischerweise ca. 0,8 – 1,2 m beträgt. Biofilter erfordern meist eine große Grundfläche, was bei der nachträglichen Installation bei dicht bebautem Areal berücksichtigt werden muss.[125]

In erster Linie kommen Biofilter zur Geruchsbeseitigung in Stallanlagen ohne Einstreumaterial zum Einsatz. Sie können auch zur Abscheidung von Staubpartikeln genutzt werden, wenn auf der Zuluftseite grob strukturiertes Filtermaterial verwendet wird, das nicht leicht verblockt. Als alleinige Prozessstufe eignen sich Biofilter auch zur Reduktion von Ammoniakemissionen, wobei ihre Abscheideleistung im Vergleich zu Wäschern geringer ausfällt.[120]

2.2.4 Biorieselbettreaktor

Ein weiteres biologisches Abluftreinigungsverfahren stellt der Biorieselbettreaktor dar, der Ähnlichkeiten zu den bereits beschriebenen Technologien Biowäscher und Biofilter aufweist. Abb. 18 zeigt den grundsätzlichen Aufbau eines Biorieselbettreaktors, für den auch der Begriff Tropfkörperwäscher in Anlehnung an die Abwasserreinigung verwendet wird.[27, 126]

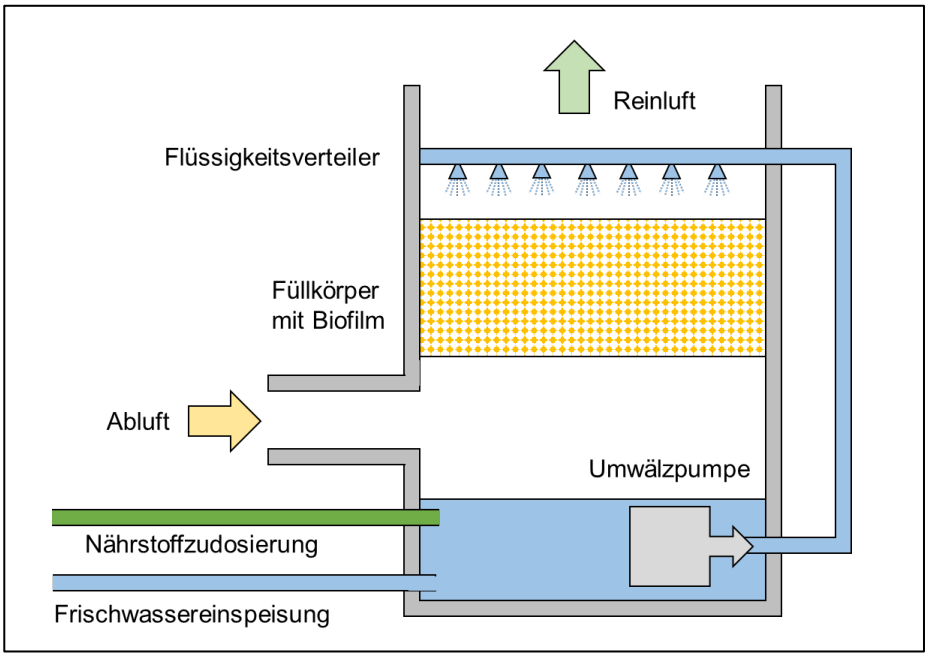

Abb. 18: Aufbau eines Biorieselbettreaktors. Erstellt basierend auf der Literatur.[27, 126]

Bei Vergleich mit Abb. 16 wird deutlich, dass ein Biorieselbettreaktor ähnlich wie die Absorbereinheit eines Biowäschers aufgebaut ist. Es handelt sich um einen zylindrischen Behälter, der zur Aufbewahrung eines inerten Trägermaterials (z. B. Lavagestein) dient, aus dem die Schüttung des Reaktors zusammengesetzt ist. Über die Berieselung mit einem nährstoffhaltigen Medium, das auch als Zirkulationsflüssigkeit bezeichnet wird und Mikroorganismen in suspendierter Form enthält, erfolgt die initiale Besiedelung der Schüttung. Wie bereits anhand von Abb. 10 beschrieben, bildet sich nach der Adhäsion der Zellen bei ausreichender Nährstoffversorgung ein Biofilm auf dem Trägermaterial, der den Hauptort des biologischen Schadstoffabbaus darstellt.[27, 126]

Aufgrund der Berieselung können sich im laufenden Betrieb nach dem Anwachsen des Biofilms auch Agglomerate von Mikroorganismen ablösen und in der Zirkulationsflüssigkeit wieder in suspendierter Form vorliegen. Der Großteil der Zellen im Biorieselbettreaktor befindet sich jedoch im Biofilm und wird über EPS am Trägermaterial immobilisiert. Der Abluftstrom gelangt von unten in den Reaktor und passiert im Anschluss die Schüttung, sodass der Übergang der gasförmigen wasserlöslichen Schadstoffe in den Biofilm erfolgen kann. Auf diesem Wege gelangt auch Sauerstoff aus der Abluft in die flüssige Phase und steht den aeroben Mikroorganismen im Biofilm zur Verfügung.[27, 126]

Über die Berieselung wird der Biofilm nicht nur mit Nährstoffen versorgt, sondern bei Anpassung des Druckes bzw. der Strömungsgeschwindigkeit auch in seiner Schichtdicke begrenzt. Eine Reduzierung der Schichtdicke kann von Vorteil sein, um eine ausreichende Sauerstoffverfügbarkeit innerhalb des Biofilms zu garantieren. Wie bereits bei Betrachtung der Konzentrationsgradienten in Abb. 11 diskutiert, können aufgrund der limitierten Diffusion im viskosen Biofilm anaerobe Verhältnisse entstehen, die zu einer Beeinträchtigung der aeroben Schadstoffabbauprozesse führen. Außerdem kann ein ausgedehntes Biofilmwachstum zur Verblockung von Zwischenräumen innerhalb der Schüttung führen. Dieses Phänomen wird auch als *Clogging* bezeichnet und wirkt sich negativ auf die Abbaukapazität aus, da der Stoffaustausch erheblich beeinträchtigt wird. Messtechnisch kann die Verringerung des freien Strömungsquerschnittes durch eine Zunahme des Druckverlustes erfasst werden. Als präventive Maßnahme empfiehlt sich beispielsweise eine lokale, temporäre Wasserdruckerhöhung über den Flüssigkeitsverteiler oder Lanzen innerhalb der Schüttung, um die Schichtdicke des Biofilms zu reduzieren.[27, 126]

Im Vergleich zum Biofilter muss beim Biorieselbettreaktor kein Austausch der Trägermaterialien erfolgen, da ausschließlich inerte Substanzen verwendet werden, deren chemische Struktur durch die Mikroorganismen nicht abgebaut wird. Allerdings ist in bestimmten Intervallen eine Erneuerung der Zirkulationsflüssigkeit empfehlenswert, um die Akkumulation von Substanzen zu vermeiden, die sich negativ auf den Biofilm und den biologischen Abbau auswirken. In der Praxis dient als Kriterium für den Wechsel der Zirkulationsflüssigkeit oft die elektrische Leitfähigkeit, die in der Regel 10 mS/cm nicht überschreiten sollte. Allerdings muss beachtet werden, dass in Abhängigkeit der eingesetzten Mikroorganismenarten und der abzubauenden Schadstoffe auch höhere Werte der elektrischen Leitfähigkeit ohne negative Auswirkungen auftreten können. Ein entsprechender Grenzwert sollte also immer an den jeweiligen Prozess angepasst werden.[27]

Im Vergleich zum Biowäscher besitzt ein Biorieselbettreaktor einen kompakteren Aufbau, sodass eine geringere Fläche für die Installation der Anlage benötigt wird. Von Vorteil ist zudem, dass kein separates Belebungsbecken erforderlich ist, nachdem die Absorption und der Abbau der Schadstoffe in einem Behälter stattfinden.[126]

Aufgrund der Immobilisierung der Mikroorganismen im Biofilm des Biorieselbettreaktors erweisen sich diese tendenziell robuster als suspendierte Zellen, die beim Biowäscher verwendet werden.[67–69] Deshalb ist damit zu rechnen, dass Fluktuationen der Prozessbedingungen – beispielsweise infolge der schwankenden Ammoniakkonzentration in der Abluft von Geflügelställen – bei Biorieselbettreaktoren besser kompensiert werden als bei Biowäschern.[27]

3. Experimentalteil

Im Folgenden werden alle Utensilien aufgelistet, die bei den experimentellen Arbeiten zum Einsatz kamen. Anschließend erfolgt die Dokumentation des methodischen Vorgehens.

3.1 Utensilien

3.1.1 Geräte

Tab. 1 veranschaulicht alle im Rahmen der Dissertation benutzten Geräte mit jeweiligem Hersteller und entsprechender Bezeichnung.

Tab. 1: Geräte mit Herstellerangaben.

Gerätetyp	Hersteller	Bezeichnung
Akku-Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	pipetus®
Analysenwaage	Sartorius AG	APX-200
Aquariumpumpe	Heissner GmbH	Indoor-Unterwasserpumpe P300-i
Autoklav	ibs | tecnomara GmbH	FVA3/A1
Brutschrank (Inkubator)	Memmert GmbH + Co. KG,	IPP 110 plus
Cedex Bioanalyzer	Roche Diagnostics GmbH	Serien-Nr.: 30052
Datenlogger	Testo SE & Co. KGaA	175H1
Digitales Präzisionsthermometer	GREISINGER Electronic GmbH	GTH 175 / MO
Digitalmikroskop	Keyence Corporation	VHX-6000
Industriewaage	KERN & SOHN GmbH	DS 100K0.5
Kolbenhubpipette (0,5 – 10 µL)	Sartorius AG	Proline® Plus (Art.-Nr: 728020)
Kolbenhubpipette (100 – 1000 µL)	Sartorius AG	Proline® Plus (Art.-Nr: 728070)
Kolbenhubpipette (20 – 200 µL)	Brand GmbH & Co. KG	Transferpette® S 20 – 200 µL, gelb
Kühlschrank (4 °C)	GastroHero GmbH	KS-PROFI1400
Laborsprühtrockner	Büchi Labortechnik AG	B-290
Laborzentrifuge	Joan LAB Equipment Co., Ltd. (Gemini BV)	GR4-22
Laserscanning-Mikroskop	Keyence Corporation	VK-X3000
Lichtmikroskop	Leica Microsystems GmbH	DM750
Lötstation	Weller Tools GmbH	WTCP-S 50 W
Luftpumpe inkl. Ausströmersteine	Zhongshan Haiyi Electric Appliance Co., Ltd.	HQ-602
Luftstrahlsiebmaschine	Retsch GmbH	AS 200 Jet
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	MR 3000
Magnetrührerplatte	Thermo Fisher Scientific, Inc.	CimarecTM i Poly 15

Gerätetyp	Hersteller	Bezeichnung
Mechan. Handzähler	Carl Roth GmbH & Co. KG	EE53.1
pH-Elektrode	Hanna Instruments Deutschland GmbH	HI 1230 (pH 0 bis 12; − 5 bis 70 °C)
pH-Elektrode	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG	SenTix® 980
pH-Meter	Hanna Instruments Deutschland GmbH	HI 2211 Basic pH / Redox / °C Meter
Photometer	Pharmacia Biotech AG	Ultrospec 3000
Schüttelinkubator	Sartorius AG	CERTOMAT® BS-1
Sicherheitswerkbank	Clean Air Techniek B.V.	CA/RE4 (Art.-Nr.: 9675501)
Silikonkochlöffel	WMF GmbH	Gourmet-Kochlöffel (1892579990)
Spektralphotometer	Hach Lange GmbH	DR 3900
Spektrometer (FTIR)	Bruker Corporation	ALPHA
Steckdosenleiste	Hugo Brennenstuhl GmbH & Co. KG	Secure-Tec (Art.-Nr.: 1159490936)
Tiefkühlschrank (− 20 °C)	GastroHero GmbH	GH-TKS-PROFI1400N
Tischzentrifuge	Heraeus Holding GmbH	Biofuge pico
Trockenwaage	Denver Instrument GmbH	IR-35
Ultratiefkühlschrank (− 80 °C)	Binder GmbH	ULTRA.GUARD^{TM} UF V 500
Vibrationssiebmaschine	Retsch GmbH	AS 200 Control
Vortexer	Scientific Industries, Inc.	Vortex-Genie 2

3.1.2 Materialien

In Tab. 2 sind alle Materialien zusammengefasst, die für die Experimente verwendet wurden.

Tab. 2: Materialien mit Herstellerangaben.

Materialtyp	Hersteller	Bezeichnung
1,5-mL-Reaktionsgefäß	Carl Roth GmbH & Co. KG	Reaktionsgefäße ROTILABO®, farblos (Art.-Nr.: 4182.1)
1,5-mL-Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One International GmbH	Reaction Tubes, 1.5 mL, PP, graduated, attached cap, natural (Art.-Nr.: 616201)
100-mL-Erlenmeyer-kolben (ohne Schikanen)	DWK Life Sciences GmbH	DURAN® Erlenmeyerkolben weithalsig/enghalsig
15-mL-Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One International GmbH	CELLSTAR® RÖHRCHEN (Art.-Nr.: 188271)
15-mL-Reaktionsgefäß	Sarstedt AG & Co. KG	Röhre, 15 mL, 120 x 17 mL, PP (Art.-Nr.: 62.554.502)
500-mL-Erlenmeyer-kolben (mit Schikanen)	DWK Life Sciences GmbH	DURAN®, Erlenmeyerkolben mit Schikanen, 500 mL
50-mL-Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One International GmbH	Röhrchen, 50 mL, PP, 30/115 mm, konischer Boden (Art.-Nr.: 227261)
600-mL-Becherglas	VWR International, LLC	Borosilicatglas 3.3, mit Ausguss, 213-1126

Materialtyp	Hersteller	Bezeichnung
Deckglas	Rogo Sampaic S.A.	X100 COVERSLIP BORO (15 x 15 mm)
Einmalküvetten	Carl Roth GmbH + Co. KG	ROTILABO®; PS, Halbmikro, 1,6 mL (Art.-Nr.: XK20.1)
Einmalspritze (10 mL)	B. Braun Melsungen AG	Injekt® 10 mL, Luer-Ansatz (Art.-Nr.: 4606108V)
Gesamtstickstoff-Küvettentest 5 – 40 mg/L Gesamt-N	Hach Lange GmbH	LCK 238 LATON
Glucose Bio (Glucose-Testkit)	Roche Diagnostics GmbH	06343732-001
Immersionsöl	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Immersol 518 N, 20 mL
Impföse	Carl Roth GmbH + Co. KG	Einmal-Impfösen 10 µl, steril (Art.-Nr.: CPX5.1)
Kunststoffbox 1,8 L	LocknLock Co., Ltd.	Classic Food Container (Art-Nr.: HPL933D)
Lavasteine	VulkaTec Riebensahm GmbH	Lavadrän 16 – 32 mm
NH3 Bio (Ammonium-Testkit)	Roche Diagnostics GmbH	068343775-001
Nitrat-Küvettentest 0,23 – 13,5 mg/L NO_3^--N	Hach Lange GmbH	LCK 339
Nitrilhandschuhe	VWR International, LLC	100 Gloves Nitrile light Size L (Art.-Nr.: 112-2756)
Nitrit-Küvettentest 0,015 – 0,6 mg/L NO_2^--N	Hach Lange GmbH	LCK 341
Nylonfaden	Zebco Europe GmbH	Zebco Trophy Surf Line
Objektträger	VWR International, LLC	Microscope Slides ECN 631-1550 (50/pk)
Passiertuch aus Nylon	Corpower Limited GmbH	B0BHW4KV24
Petrischale	Greiner Bio-One International GmbH	Petrischalen, PS, Standard, mit Nocken, steril (Art.-Nr.: 633181)
Petrischalenspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG	Petrischalenspatel DeltaTM ABS, steril (Art.-Nr.: PC59.1)
Pipettenspitzen (0,1 – 10 µL)	VWR International, LLC	Pipette Tips (Art.-Nr.: 613-0334)
Pipettenspitzen (2 – 200 µL)	Greiner Bio-One International GmbH	Pipette Tips for Pipetman and other 10 µL Pipettors (Art.-Nr.: 685290)
Pipettenspitzen (50 – 1000 µL)	Greiner Bio-One International GmbH	Pipette Tips 1000, blue (Art.-Nr.: 740290)
magnetisches Rührstäbchen	Carl Roth GmbH + Co. KG	Magnetstäbchen ROTILABO®, Ø: 8 mm, L: 25 mm (Art.-Nr.: XA18.1)
Schlauch für Modellreaktor	Carl Roth GmbH & Co. KG	Schlauch ROTILABO® Silikon Standardausführung, Innendurchmesser: 6,0 mm, Außendurchmesser: 10,0 mm (Art.-Nr.: 9573.1)
Schlauchklemme	Carl Roth GmbH & Co. KG	Schlauchklemme ROTILABO® Metall, passend für: Schlauch mit Außendurchmesser bis 10 mm, 1L7K.1
Siebe	Retsch GmbH	Gewebesiebe, ø 200 mm/203 mm, Maschenweiten (20 µm – 125 µm)

3.1.3 Chemikalien

Tab. 3 zeigt alle eingesetzten Chemikalien.

Tab. 3: Chemikalien mit Herstellerangaben.

Chemikalie	Hersteller	Bezeichnung
α-D-(+)-Glucose-Monohydrat (≥ 99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG	6780.2
Agar-Agar, Kobe I (Pulver)	Carl Roth GmbH & Co. KG	5210.3
Ammoniaklösung (184,6 g/L)	Carl Roth GmbH & Co. KG	6753.2
Ammoniaklösung (68,1 g/L)	Carl Roth GmbH & Co. KG	9897.2
Ammoniumnitrat (p. a.)	Merck KGaA	1183
Ammoniumsulfat (≥ 99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG	3746.1
Calciumchlorid-Dihydrat (≥ 99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG	HN04.1
Dikaliumhydrogenphosphat (p. a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG	6875.1
Dinatriumhydrogenphosphat (≥ 98 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG	T876.1
Hefe-Extrakt (für Mikrobiologie)	Ohly GmbH	20901010
Hühnertrockenkot (pelletiert, org. Dünger)	hubey GmbH	555441
Isopropanol (70 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG	CN09.3
Kaliumdihydrogenphosphat (p. a.)	Carl Roth GmbH & Co. KG	P018.2
Magermilchpulver (Blotting Grade)	Carl Roth GmbH & Co. KG	T145.3
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (≥ 99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG	P027.1
Mononatriumglutamat (p. a.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	49621-2506
Natriumchlorid (> 99,8 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG	9265.3
Pepton aus Casein (tryptisch verdaut)	Carl Roth GmbH & Co. KG	8986.4
Pufferlösung pH 4,00 ± 0,02 (20 °C)	Carl Roth GmbH & Co. KG	A517.1
Pufferlösung pH 7,00 ± 0,02 (20 °C)	Carl Roth GmbH & Co. KG	P713.1
Trehalose (90,2 %)	GM GesundheitsManufaktur GmbH	GM10615.3

Die Bestandteile der Medien und Lösungen sind in Tab. 4 aufgeführt. Als Lösungsmittel kam vollentsalztes Wasser zum Einsatz. Die Sterilisation erfolgte in der Regel mithilfe eines Autoklavs bei 121 °C und 1 bar Überdruck. Um bei den autoklavierten definierten Medien eine Maillard-Reaktion zu vermeiden, wurde der reduzierende Zucker Glucose jeweils in einem separaten Gefäß angesetzt und getrennt von den restlichen Komponenten hitzesterilisiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Überführung aller autoklavierten Nährstofflösungen unter der Sterilwerkbank in ein gemeinsames Gefäß. Medien mit Magermilchpulver wurden nicht autoklaviert, um eine thermische Denaturierung von Proteinen sowie eine Maillard-Reaktion zu vermeiden. Stattdessen erfolgte eine Teilentkeimung durch Pasteurisieren bei einer Temperatur von 70 °C für 30 min im Trockenschrank.

Tab. 4: Zusammensetzung der Medien und Lösungen.

Bezeichnung	Inhaltsstoff	Massenkonzentration in g/L
LB-Medium	Hefe-Extrakt Pepton aus Casein Natriumchlorid	5 10 10
YPD-Medium	Hefe-Extrakt Pepton aus Casein Glucose-Monohydrat	10 20 22
YPD-Agar	Hefe-Extrakt Pepton aus Casein Glucose-Monohydrat Agar-Agar	10 20 22 15
Ammoniummedium (C:N = 10)	Glucose-Monohydrat Ammoniumsulfat Magnesiumsulfat-Heptahydrat Kaliumdihydrogenphosphat Dinatriumhydrogenphosphat Calciumchlorid-Dihydrat	4,28 0,73 0,41 7 7 0,03
Ammoniummedium (C:N = 20)	Glucose-Monohydrat Ammoniumsulfat Magnesiumsulfat-Heptahydrat Kaliumdihydrogenphosphat Dinatriumhydrogenphosphat Calciumchlorid-Dihydrat	4,28 0,37 0,41 7* 7* 0,03
Ammoniummedium mit Agar (C:N = 20)	Glucose-Monohydrat Ammoniumsulfat Magnesiumsulfat-Heptahydrat Kaliumdihydrogenphosphat Dinatriumhydrogenphosphat Calciumchlorid-Dihydrat Agar-Agar	4,28 0,37 0,41 7 7 0,03 20
isotonische Kochsalzlösung	Natriumchlorid	9
Phosphatpuffer (pH-Wert = 6,8)	Kaliumdihydrogenphosphat Dikaliumhydrogenphosphat	7 7
Adaptionsmedium mit Trehalose	Hefe-Extrakt Pepton aus Casein Glucose-Monohydrat Trehalose	10 20 22 12,5
Adaptionsmedium mit Magermilchpulver	Hefe-Extrakt Pepton aus Casein Glucose-Monohydrat Magermilchpulver	10 20 22 12,5
Schutzmedium mit Trehalose	Trehalose Mononatriumglutamat	200 12,5
Schutzmedium mit Magermilchpulver	Magermilchpulver Mononatriumglutamat	200 12,5

* Teilweise erfolgte eine Reduzierung der Konzentration auf 0,7 g/L. In diesem Fall ist die konkrete Konzentration in der Beschreibung des jeweiligen Experiments angegeben.

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl von Mikroorganismen

Im Rahmen einer Literaturrecherche erfolgte zunächst die Selektion mesophiler, aerober Bakterien und Pilze, die zum Abbau von Ammoniak bzw. Ammonium und zur Bildung von Biofilm in der Lage sind.[134–150] Bei der finalen Auswahl der Stämme für die Experimente im Labor wurde berücksichtigt, dass alle Spezies der Risikogruppe 1 gemäß der Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) angehören, um negative Folgen für die Gesundheit der damit arbeitenden Personen und kostenintensive Sicherheitsmaßnahmen während des Betriebs des Biorieselbettreaktors zu vermeiden. Für das Screening im Labormaßstab wurden insgesamt neun Mikroorganismenarten festgelegt, wobei drei Gram-positive Bakterien, drei Gram-negative Bakterien und drei Pilze selektiert wurden. Bei den Bakterien wurden teilweise Spezies ausgewählt, die laut Literatur zur heterotrophen Nitrifikation und aeroben Denitrifikation fähig sind, da dieser Stoffwechselweg zu einem schnelleren Wachstum und höheren Ammoniumabbauraten führt als autotrophe Varianten.[42–44] Die genauen Artnamen der Mikroorganismen für das Konsortium können Tab. 5 entnommen werden.[134–150]

Tab. 5: Auswahl von Mikroorganismen für die Zusammenstellung des mikrobiellen Konsortiums.

Gram-positive Bakterien	Gram-negative Bakterien	Pilze
Bacillus subtilis [134, 135] DSM 10	*Escherichia coli* [139, 140] DSM 498	*Rhodotorula mucilaginosa* [145, 146] DSM 13621
Kocuria rhizophila [136] DSM 348	*Pseudomonas fluorescens* [141, 142] DSM 50090	*Saccharomyces cerevisiae* [147, 148] HANSEN CBS 5926
Rhodococcus sp. [137, 138] DSM 43001	*Pseudomonas alloputida* [132, 133] DSM 6125	*Yarrowia lipolytica* [149, 150] DSM 8218

Pseudomonas alloputida war bis zum Jahr 2019 unter dem Namen *Pseudomonas putida* mt-2 KT2440 bekannt, allerdings erfolgte eine phylogenetische Reklassifizierung, die zu einer Umbenennung führte.[151, 152] Mit Ausnahme von *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN CBS 5926, die auch als *Saccharomyces boulardii* bezeichnet wird, stammen alle Spezies von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH. *S. cerevisiae* HANSEN CBS 5926 wurde von dem Hersteller Arzneimittel Pütter GmbH & Co. KG bezogen und in Form des Präparates Perenterol® Junior 250 mg eingesetzt. Es handelt sich um Trockenhefe (lyophilisiertes Pulver), die zur Behandlung und Prävention von Durchfallerkrankungen verwendet wird. Die Auswahl dieses Hefestammes erfolgte aufgrund der verbesserten Adhäsion an Oberflächen im Vergleich zu anderen Vertretern der Gattung *Saccharomyces*, welche sich positiv auf die Bildung eines Biofilms auswirken könnte.[153]

3.2.2 Suspensionskultur

Die vorselektierten Mikroorganismen (siehe Tab. 5) wurden zunächst in suspendierter Form als Reinkultur in einem definierten Nährmedium hinsichtlich des Ammoniumabbaus untersucht. Dazu diente ein standardisierter Versuchsaufbau, der in Abb. 19 veranschaulicht ist.

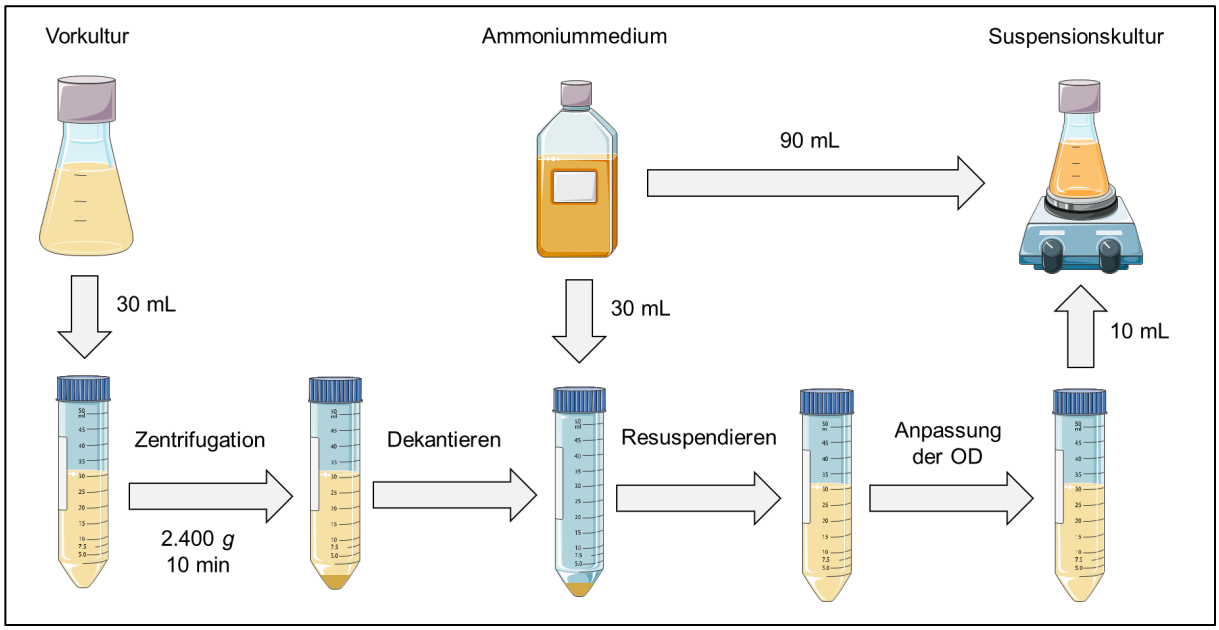

Abb. 19: Ablauf des Experiments zur Evaluation des Ammoniumabbaus in Suspensionskultur. Die Grafik enthält Elemente von Servier Medical Art, die unter CC BY 4.0 lizenziert sind und geringfügig modifiziert wurden. Weitere Informationen unter: https://smart.servier.com/.

Im ersten Schritt erfolgte die Inokulation einer Vorkultur mithilfe einer Kolonie von einer Agarplatte unter Verwendung einer Impföse. Dabei wurde für alle Spezies außer *Rhodococcus* sp. YPD-Medium verwendet. Für *Rhodococcus* sp. kam LB-Medium zum Einsatz. Die Vorkultur (150 mL beimpftes Medium in einem 500-mL-Glaskolben mit Schikanen) wurde 24 h bei 28 °C und 150 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch 10 min lange Zentrifugation bei 2.400 *g* abgetrennt und anschließend mit Ammoniummedium resuspendiert. Um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verbessern, erfolgte anschließend die Herstellung einer Zellsuspension mit einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 3,0, wobei dieser Wert unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung berechnet wurde. Ab einer gemessenen OD_{600} von 0,7 erfolgte eine Verdünnung der Probe. Die Zellsuspension wurde schließlich zur Inokulation des Ammoniummediums in einem 100-mL-Glaskolben ohne Schikanen benutzt. Anschließend erfolgte eine 48 h lange Inkubation auf einer Magnetrührerplatte mit einem magnetischen Rührstäbchen unter Einsatz einer Drehzahl von 500 rpm bei Raumtemperatur (22,6 °C ± 0,9 °C), um eine ausreichende Durchmischung und Verfügbarkeit von Sauerstoff für das zelluläre Wachstum zu ermöglichen. Dabei erfolgte eine Probenahme im Abstand von 24 h, um die Ammoniumkonzentration, die Glucosekonzentration, die OD_{600} und den pH-Wert in einem Volumen von 5 mL zu erfassen.

Um den pH-Wert in der Suspensionskultur ohne externe Zugabe von Säuren bzw. Laugen möglichst lange stabil zu halten und dadurch optimale Bedingungen für die Mikroorganismen zu garantieren, wurde eine erhöhte Konzentration der beiden Puffersubstanzen Kaliumdihy-

drogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat von jeweils 7 g/L eingesetzt. Für alle Reinkulturen wurde das Ammoniummedium mit C:N = 20 verwendet.

Die Messung der Ammonium- und Glucosekonzentration erfolgte enzymatisch-photometrisch mithilfe des Cedex Bio Analyzers.[154] Alle Pipettiervorgänge laufen dabei automatisiert innerhalb des Gerätes ab, sodass eine Verfälschung von Messergebnissen durch manuelle Pipettierfehler ausgeschlossen werden kann.[154] Um eine Beeinträchtigung der photometrischen Quantifizierung durch suspendierte Partikel zu vermeiden, wurde die flüssige Probe vor der Messung 2 min lang bei 13.000 *g* zentrifugiert. Hierzu diente ein Probenvolumen von 1000 µL innerhalb eines 1,5-mL-Reaktionsgefäßes, das nach der Abtrennung von suspendierten Partikeln mithilfe des Cedex Bio Analyzers analysiert wurde. Die Quantifizierung von Ammonium erfolgte über eine enzymatische Umsetzung durch die Glutamat-Dehydrogenase zu L-Glutamat, wobei NADPH verbraucht wird.[155] Die Abnahme der NADPH-Konzentration wurde über die Absorption bei 340 nm gemessen und ermöglicht eine exakte Bestimmung der Ammoniumkonzentration.[155] Zum Vergleich der verschiedenen Ansätze in der Suspensionskultur wurde die absolute bzw. relative Ammoniumabbaurate verwendet, die sich aus den Massenkonzentrationen von Ammonium zu den jeweiligen Messzeitpunkten berechnen lässt. Dabei erfolgte unter Verwendung von Gl. 13 die Bestimmung der absoluten Ammoniumabbaurate ($\delta(\mathrm{NH_4^+})$, in mg/(L·h)) aus der Diffferenz von zwei Ammoniumkonzentrationen ($\beta_1(\mathrm{NH_4^+})$, in mg/L und $\beta_2(\mathrm{NH_4^+})$, in mg/L) bezogen auf das Intervall, das durch die beiden Zeitpunkte (t_1 in h und t_2 in h) begrenzt ist.

$$\delta(\mathrm{NH_4^+}) = \frac{\beta_1(\mathrm{NH_4^+}) - \beta_2(\mathrm{NH_4^+})}{t_2 - t_1} \qquad \text{(Gl. 13)}$$

Zusätzlich wurde die relative Ammoniumabbaurate ($D(\mathrm{NH_4^+})$, in %) mithilfe von Gl. 14 ermittelt, die ebenfalls auf zwei Werten der Ammoniumkonzentration zu zwei aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten basiert.

$$D(\mathrm{NH_4^+}) = \left(1 - \frac{\beta_2(\mathrm{NH_4^+})}{\beta_1(\mathrm{NH_4^+})}\right) \cdot 100\ \% \qquad \text{(Gl. 14)}$$

Auch die Glucosekonzentration wurde mithilfe einer NADPH-gekoppelten Reaktion erfasst, wobei hier die beiden Enzyme Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zum Einsatz kamen.[156] In Ergänzung zu den genannten Messgrößen wurde bei den Reinkulturen die Lebendkeimzahl durch das Oberflächenplattierungsverfahren bestimmt und auf OD_{600} = 1 normiert, um einen Vergleich der verschiedenen Mikroorganismen zu ermöglichen.

Zur Untersuchung der Ammoniumabbaurate der Mischkulturen wurde das gleiche Vorgehen angewandt wie bei den Reinkulturen, das in Abb. 19 veranschaulicht ist. Für die Versuche wurde sich dabei auf jeweils zwei Bakterienarten und zwei Pilzspezies beschränkt, die sich durch eine besonders hohe Ammoniumabbaurate auszeichnen. Für die unterschiedlichen Kombinationen der vier Mikroorganismen erfolgte vor der Inokulation eine Mischung der

jeweiligen Zellsuspensionen mit einer OD_{600} von 3,0. Es wurde darauf geachtet, die Reinkulturen in einem passenden Volumenverhältnis zu vereinigen, um sechs Zweier-Mischkulturen (1:1), vier Dreier-Mischkulturen (1:1:1) und eine Vierer-Mischkultur (1:1:1:1) für die Selektionsversuche zur Verfügung zu stellen. Zur Inokulation diente erneut ein Volumen von 10 mL, das unter Einsatz des jeweiligen Volumenverhältnisses angesetzt wurde, z. B. 5 mL + 5 mL im Falle der Zweier-Mischkulturen. Um den Einfluss des C:N-Verhältnisses zu erforschen, wurden am Beispiel der sechs Zweier-Mischkulturen zwei Varianten des Ammoniummediums (C:N = 10 und C:N = 20) getestet.

Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen den Spezies während des Wachstums erfolgte eine Kultivierung in der Petrischale mithilfe von geliertem Ammoniummedium (C:N = 20), das Agar-Agar enthielt. Als Inokulum dienten 50 µL jeder Zweier-Mischkultur, die aus dem Kolben unmittelbar nach dem Beimpfen entnommen und mit einem sterilen Einwegspatel kreisförmig auf der Oberfläche des Mediums verteilt wurden. Die Kultivierung der beimpften Petrischalen erfolgte 48 h lang bei einer Temperatur von 28 °C in einem Inkubator. Im Anschluss wurde das Wachstumsverhalten der gebildeten Kolonien mithilfe des Digitalmikroskops analysiert. Um die Bildqualität zu verbessern, erfolgte eine Entfernung des Deckels der Petrischalen. Auf diese Weise konnte der Abstand zwischen den Kolonien und dem Objektiv verringert werden, ohne störende Reflektionen zu verursachen.

3.2.3 Aufbau und Betrieb des Modellreaktorsystems

Um neben dem Wachstum in suspendierter Form auch die Biofilmbildung der Mikroorganismen untersuchen zu können, wurde ein Modellreaktorsystem konzipiert, dessen Aufbau in Abb. 20 veranschaulicht wird. Die Grundstruktur bilden zwei zylinderförmige Kunststoffboxen aus Polypropylen (PP), wobei die untere als Fermenter und Aufbewahrungsort für zwei Aquariumpumpen zur Umwälzung der Zirkulationsflüssigkeit dient.

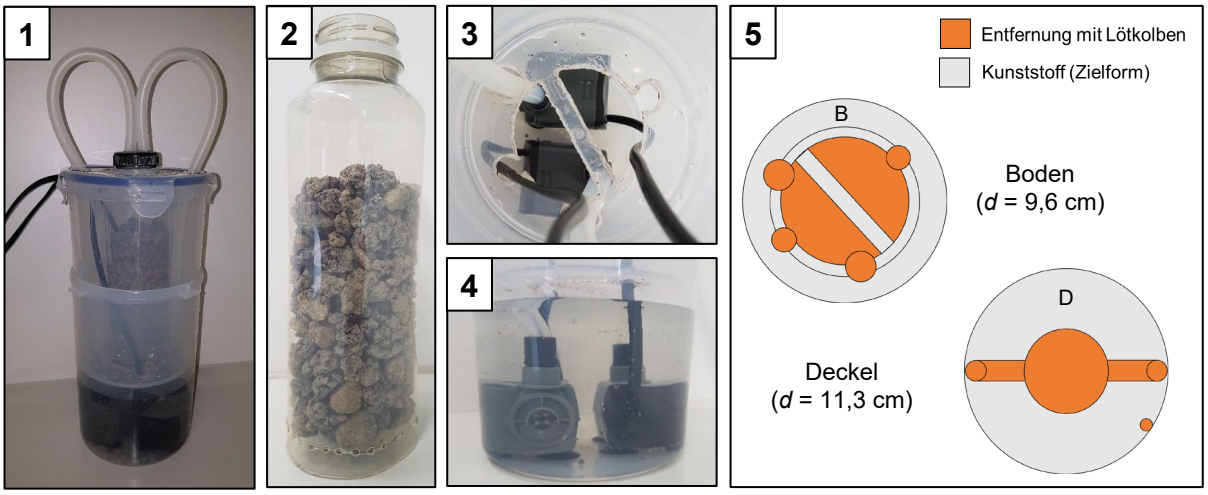

Abb. 20: Aufbau des Modellreaktorsystems. 1 Frontalansicht des Modellreaktors im zusammengebauten Zustand. **2** Füllkörperflasche mit Lavasteinen. **3** Boden der oberen Kunststoffbox mit Aussparungen für Kabel und Schläuche. **4** Pumpen in der unteren Kunststoffbox. **5** Schablonen zur Modifikation des Bodens und des Deckels der oberen Kunststoffbox.

Die obere Kunststoffbox wurde zur Unterbringung einer Flasche (0,5 L) aus Polyethylenterephthalat (PET) verwendet, die für die Aufbewahrung der Füllkörper, in diesem Fall 450 g trockene Lavasteine der Korngröße 16 – 32 mm, zum Einsatz kam. In den Deckel der Füllkörperflasche wurden zwei Löcher mit einem Lötkolben eingefügt, sodass die beiden Schläuche (Innendurchmesser: 6 mm, Außendurchmesser: 10 mm) hindurchgeführt und damit fixiert werden konnten. Die Berieselung erfolgte durch die Öffnung des Schlauches ca. 3 cm über der obersten Schicht der Schüttung. Der Boden der Füllkörperflasche wurde entfernt, um im Abstand von ca. 2 cm von der resultierenden Schnittkante Löcher zu implementieren, die zur Fixierung eines Netzes aus einem Nylonfaden benötigt wurden. Die Distanz von Loch zu Loch in der horizontalen Ebene entlang der zylinderförmigen Wand betrug ca. 5 mm, der Durchmesser eines Lochs ca. 2 mm. Der Boden der oberen Kunststoffbox wurde gemäß der Schablone (siehe **5** in Abb. 20) mit einem Lötkolben modifiziert, um die Passage der Zirkulationsflüssigkeit zu ermöglichen und zusätzlich Öffnungen für Kabel und Schläuche einzufügen. Die untere Kunststoffbox, welche zur Aufbewahrung der Zirkulationsflüssigkeit diente, wurde nicht verändert. Die auf dem Boden durch Saugnäpfe fixierten Aquariumpumpen wurden über ca. 60 cm lange Schläuche mit der Füllkörperflasche verbunden. Durch den beschriebenen Aufbau kann eine definierte Konfiguration des Modellreaktorsystems gewährleistet werden, um die Reproduzierbarkeit der experimentellen Arbeiten zu verbessern. Zur Inbetriebnahme des Modellreaktors diente ein Flüssigkeitsvolumen von 600 mL, das aus 540 mL Ammoniummedium und 60 mL Inokulum bestand. Die Herstellung des Inokulums erfolgte wie in Kap. 3.2.2 beschrieben, wobei ausschließlich mikrobielle Konsortien aus den selektierten Reinkulturen zum Einsatz kamen. Mithilfe des Modellreaktors wurden in zwei separaten Experimenten das Wachstum von Biofilm und der Abbau von Ammonium untersucht. Tab. 6 enthält eine Übersicht zu den Parametern der Experimente.

Tab. 6: Vergleich der Parameter des Modellreaktorbetriebs während der Experimente.

Kriterium	Experiment 1	Experiment 2
Ziel	Vergleich von Modellreaktor und Suspensionskultur, Variation der Ammoniumkonzentration	Vergleich von Modellreaktor und Pilotreaktor
Trägermaterialien	Lavasteine (16 – 32 mm)	Lavasteine (16 – 32 mm)
Masse der Trägermaterialien	500 g	450 g
Nährmedium	Ammoniummedium (C:N = 20) mit 7 g/L KH_2PO_4 und 7 g/L Na_2HPO_4	Ammoniummedium (C:N = 20) mit 0,07 g/L KH_2PO_4 und 0,07 g/L Na_2HPO_4
Nährstoffzugabe	Glucoselösung, Ammoniumsulfatlösung	Glucoselösung, Ammoniaklösung
Inokulum	*K. rhizophila*, *Y. lipolytica*, *P. alloputida*, *R. mucilaginosa*	*K. rhizophila*, *Y. lipolytica*, *P. alloputida*, *R. mucilaginosa*
Volumenstrom der Berieselung	120 L/h	3,5 L/h
Volumenstrom der Begasung	0 L/h	150 L/h
Temperatur	23,1 °C ± 1,8 °C	24,5 °C ± 2,5 °C
Kultivierungsdauer	10 Tage	30 Tage

Um die Flüssigkeitsaufnahme bzw. Biofilmbildung zu quantifizieren, wurde die Masse der Füllkörperflasche inkl. Lavasteine im trockenen und feuchten Zustand bestimmt. Es wurde eine Abtropfphase von 2 min nach Unterbrechung der Umwälzung durch Ausschalten der Pumpe implementiert, um Reste der Zirkulationsflüssigkeit aus der Schüttung zu entfernen. Dieses Vorgehen diente zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse, da mit fortschreitender Biofilmbildung die gebundene Menge an Flüssigkeit zunimmt und nach 2 min kein weiteres Abtropfen beobachtet werden konnte. Die Probenahme der Zirkulationsflüssigkeit wurde über den Schlauch des Modellreaktors mithilfe der Pumpe realisiert. Die relative Massenzunahme (Δm, in %) wurde mithilfe der Masse der Füllkörperflasche mit feuchten bzw. von Biofilm besiedelten Lavasteinen (m_F, in g) und der Masse der Füllkörperflasche mit trockenen Lavasteinen (m_T, in g) – jeweils abzüglich der Leermasse der Füllkörperflasche (m_0, in g) – via Gl. 15 bestimmt.

$$\Delta m = \frac{m_F - m_0}{m_T - m_0} \qquad \text{(Gl. 15)}$$

Um den Einfluss der Massenzunahme auf die Durchströmung der Schüttung zu erforschen, erfolgte zusätzlich die Messung des Volumenstroms der Zirkulationsflüssigkeit. Dazu wurde die Füllkörperflasche inkl. Schlauch aus der oberen Kunststoffbox entnommen und über einem Trichter positioniert, der als Verbindungselement zu einem 500-mL-Messzylinder fungierte. Es wurde darauf geachtet, dass die gleiche Förderhöhe der Aquariumpumpe vorlag wie innerhalb des Modellreaktors. Nach dem Einschalten der Pumpe wurde die Zeit gemessen, die nötig war, um 300 mL der Zirkulationsflüssigkeit in den Messzylinder zu befördern. Mithilfe von Gl. 16 konnte der Volumenstrom ($\dot{V}$, in mL/s) aus dem Fördervolumen (V, in mL) und der benötigten Zeit (t, in s) berechnet werden.

$$\dot{V} = \frac{V}{t} \qquad \text{(Gl. 16)}$$

Um den biologischen Abbau unter variierender Ammoniumkonzentration zu untersuchen, erfolgte eine Zudosierung von Glucose- und Ammoniumsulfatlösungen unter Berücksichtigung von im Vorfeld definierten Zielwerten, die in Tab. 7 aufgeführt sind. Dabei wurden im Laufe der Kultivierungsdauer vier verschiedene Ammoniumkonzentrationen (100 – 600 mg/L) getestet, wobei jeweils das gleiche C:N-Verhältnis als Grundlage für die hinzudosierte Glucosemenge diente. Jeder Konzentrationswert wurde zweimal nacheinander getestet. Die Ermittlung des Zugabevolumens (V_1, in mL) erfolgte basierend auf den Messwerten der Glucose- bzw. Ammoniumkonzentration in der Zirkulationsflüssigkeit vor dem jeweiligen Zugabezeitpunkt (β_2, in mg/L), der Ausgangskonzentration der Nährstofflösung (β_1, in mg/L) und dem Volumen der Zirkulationsflüssigkeit (V_2, in mL) gemäß Gl. 17. Nach einer Kultivierungsdauer von 6 Tagen erfolgte bei Experiment 1 vor der Zudosierung der Nährstofflösung ein Austausch der Zirkulationsflüssigkeit durch neues Ammoniummedium (C:N = 20).

$$V_1 = \frac{\beta_2}{\beta_1} \cdot V_2 \qquad \text{(Gl. 17)}$$

Tab. 7: Nährstoffzugabe während des Betriebs des Modellreaktors bei Experiment 1.

Kulti-vierungs-dauer in Tagen	Zielwert der Ammonium-konzentration in mg/L	Zielwert des C:N-Verhältnisses	Glucoselösung (233,4 g/L)	Ammoniumsulfat-lösung (44 g/L)
0,00	100	20	+	+
1,00	100	20	+	+
2,02	200	20	+	+
3,04	200	20	+	+
6,00	400	20	+	+
7,02	400	20	+	+
8,04	600	20	+	+
9,06	600	20	+	+

\+ Zugabe der jeweiligen Nährstofflösung. Berechnung des Volumens basierend auf Gl. 17.

Beim Experiment zum Vergleich von Modell- und Pilotreaktor erfolgte eine Drosselung des Volumenstroms der Zirkulationsflüssigkeit mithilfe einer Klemme an der Austrittsöffnung eines Schlauches. Im laufenden Betrieb wurde nur eine der zwei Aquariumpumpen verwendet, das zweite Exemplar diente als Reserve. Zusätzlich wurde Umgebungsluft durch eine Pumpe und einen Ausströmerstein in die Zirkulationsflüssigkeit. Die Betriebsparameter des Modellreaktors (siehe Tab. 6, Experiment 2), wurden so gewählt, dass sie in einem Maßstab von 1:50 bis 1:100 mit dem Pilotreaktor vergleichbar sind, die in Kap. 3.2.4 beschrieben werden. Die Nährstoffzugabe ist für den Modellreaktor in Tab. 8 veranschaulicht. Die Angaben wurden dabei mit den Dosierintervallen des Pilotreaktors abgestimmt, die in Form von Tab. 9 Teil des folgenden Kapitels sind.

Tab. 8: Nährstoffzugabe während des Betriebs des Modellreaktors bei Experiment 2.

Kulti-vierungs-dauer in Tagen	Glucoselösung		Glucose	Ammoniaklösung		Ammoniak
	Konzentration in g/L	Volumen in mL	Masse in g	Konzentration in g/L	Volumen in µL	Masse in mg
1,00	233,4	8,28	1,9	68,1	519	35,3
1,91	233,4	11	2,6	68,1	840	57,2
5,89	233,4	11	2,6	68,1	840	57,2
6,83	233,4	11	2,6	68,1	450	30,6
7,92	233,4	11	2,6	68,1	840	57,2
8,87	233,4	11	2,6	68,1	840	57,2
11,94	233,4	11	2,6	68,1	840	57,2
13,01	233,4	11	2,6	184,6	630	116,3
13,95	233,4	11	2,6	184,6	100	18,5
14,85	233,4	11	2,6	−	−	−
18,97	−	−	−	−	−	−
19,81	233,4	11	2,6	184,6	100	18,5
20,88	233,4	11	2,6	184,6	110	20,3
25,85	233,4	11	2,6	184,6	310	57,2
26,95	233,4	11	2,6	−	−	−
27,85	233,4	11	2,6	−	−	−

− keine Zugabe der jeweiligen Nährstofflösung. Berechnung des Volumens basierend auf Gl. 17.

3.2.4 Aufbau und Betrieb des Pilotreaktorsystems

Um die Skalierbarkeit der Ergebnisse zu bewerten, die mithilfe des Modellreaktors in der Größenordnung von 1 L erzielt wurden, erfolgte die Inbetriebnahme eines Pilotreaktorsystems, das in Kooperation mit der IDS Miesbach GmbH entwickelt wurde. Abb. 21 zeigt die Pilotanlage von der Vorder- und Rückseite. Alle Komponenten sind auf einem fahrbaren Wagen positioniert, um eine flexible Änderung des Standorts zu ermöglichen. Der obere Teil des Wagens dient zur Aufbewahrung des Schaltschranks (**A**) und des Reaktors (**B**) inkl. Wägezellen. Dabei ist der Reaktor in drei variabel einsetzbare, zylindrische Abschnitte untergliedert, die zur Aufnahme unterschiedlicher Volumina von inertem Trägermaterial dienen können. Außerdem sind in jeden Abschnitt acht Sichtfenster zur Überwachung der Biofilmbildung integriert. Die Sichtfenster lassen sich bei Bedarf durch Rotation der Fassung entfernen, sodass eine Probe aus der Schüttung entnommen werden kann.

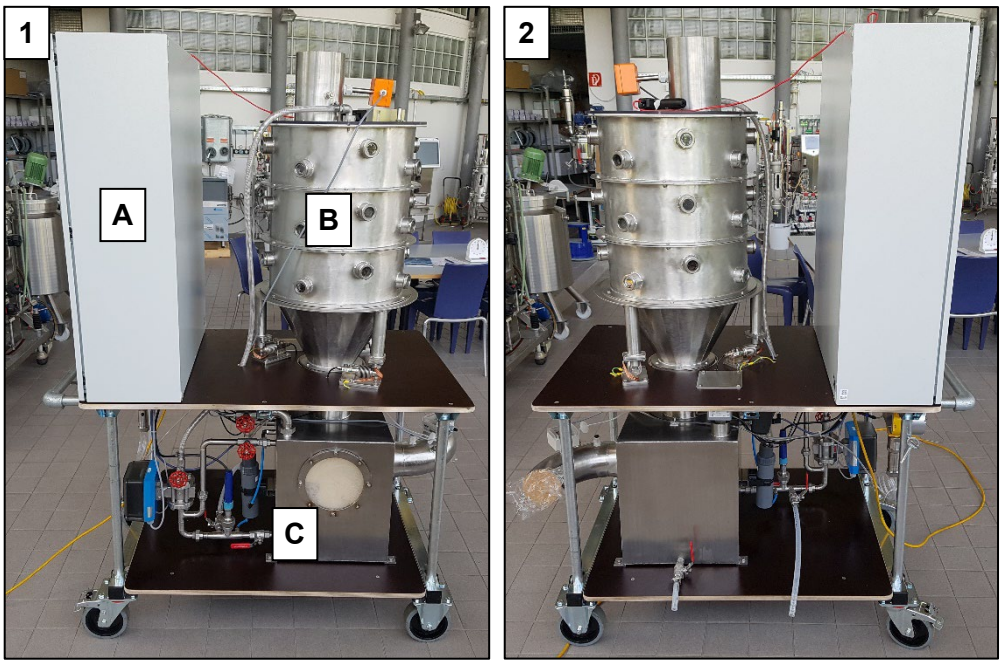

Abb. 21: Aufbau des Pilotreaktorsystems. 1 Vorderseite. **2** Rückseite. **A** Schaltschrank. **B** Behälter des Biorieselbettreaktors zur Lagerung der Schüttung aus Lavasteinen. **C** Behälter des Biorieselbettreaktors zur Aufbewahrung der Zirkulationsflüssigkeit (Fermenter) mit Rohrleitungen für Zuluft, Probenahme und Sensoren.

Unter der zylinderförmigen Einheit ist eine kegelförmige Übergangsverbindung positioniert, die einen Diffusor zur Verbesserung der Durchströmung im Falle einer Einleitung eines Gasstroms enthält. Im unteren Bereich befindet sich der Fermenter (**C**) zur Lagerung der Zirkulationsflüssigkeit, der über Rohrleitungen für Zuluft, Probenahme und Sensoren verfügt. Im Fermenter ist ein kreisförmiges Sichtfenster enthalten, das eine optische Kontrolle der Zirkulationsflüssigkeit erlaubt. Um die Anlage möglichst resistent zu gestalten, kam rostfreier Edelstahl 1.4301 zum Einsatz.

Abb. 22 zeigt in Ergänzung zu den Fotos, die in Abb. 21 zusammengefasst sind, ein vereinfachtes Fließbild des Pilotreaktorsystems, das in Anlehnung an einen industriellen Biorieselbettreaktor zur Reinigung von lösemittelhaltiger Prozessabluft erstellt wurde.[157] Im Rahmen der Dissertation wurden nicht alle abgebildeten Sensoren verwendet, es erfolgte eine Beschränkung auf die Erfassung der Masse und des pH-Wertes. Außerdem wurde keine Prozessabluft (siehe roter Pfeil) verwendet, sondern der Schadstoff wurde in gelöster Form zur Zirkulationsflüssigkeit hinzugegeben, um die Vergleichbarkeit zum Modellreaktorsystem zu gewährleisten. Die Öffnung der aus dem Fermenter herausführenden Rohrleitung für die Prozessabluft wurde, wie in Abb. 21 zu sehen, verschlossen. Das Füllvolumen des Reaktors und die Korngröße der Lavasteine weichen ebenfalls von der schematischen Darstellung in Abb. 21 ab.

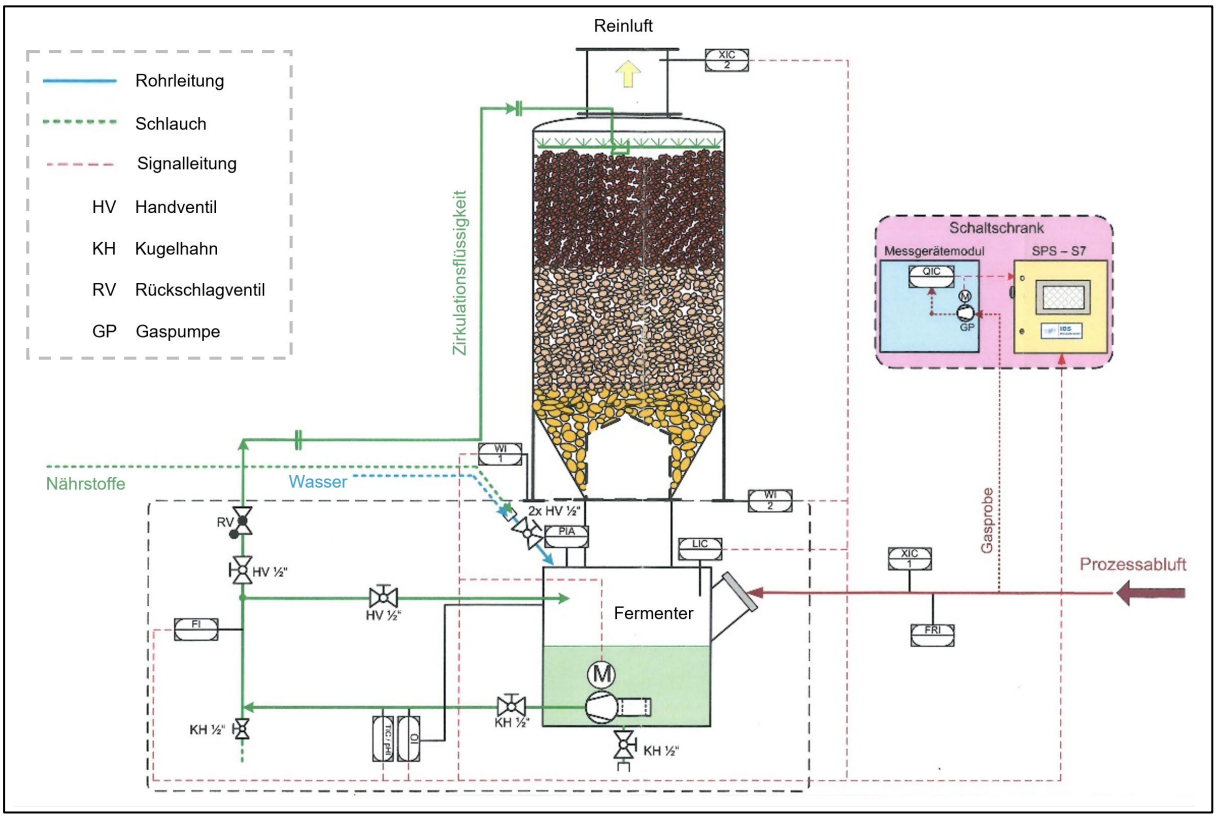

Abb. 22: Fließbild des Pilotreaktorsystems. Erstellt in Anlehnung an einen industriellen Biorieselbettreaktor zur Reinigung von lösemittelhaltiger Prozessabluft aus der Literatur.[157]

Die Bedienung der Anlage erfolgt hauptsächlich über das Touchdisplay (Siemens Simatic HMI) des Schaltschranks. Mithilfe eines USB-Sticks erfolgt zudem eine Aufzeichnung der Messdaten in Form von *.txt-Dateien, die anschließend in Verbindung mit Microsoft Excel ausgewertet werden können.

Neben der Bedienung über das Touchdisplay lassen sich ausgewählte Komponenten des Pilotreaktors auch durch Handventile steuern, die an den Rohrleitungen positioniert sind, welche sich an den Fermenter anschließen. An der Vorderseite (siehe **1** in Abb. 21) lässt sich der Durchfluss der Zirkulationsflüssigkeit über eine Bypass-Rohrleitung regulieren. Zusätzlich ermöglicht das oberste Ventil im Kopfraum des Fermenters die Zugabe von Wasser oder Flüssigkeit mit Nährstoffen. Die Rückseite (siehe **2** in Abb. 21) beherbergt am Boden des Fermenters ein Handventil zur Entfernung der Zirkulationsflüssigkeit bzw. des Schlamms und ein weiteres Ventil, das ausgehend von der Bypass-Rohrleitung eine repräsentative Probenahme ermöglicht.

Am Tisch sind außerdem drei Wägezellen (siehe Abb. 23) angebracht, die eine kontinuierliche Überwachung der Masse von Lavasteinen und Biofilm innerhalb des Reaktors erlauben. Die spezielle Bauweise ermöglicht eine exakte Erfassung der Biofilmausdehnung in Verbindung mit einer Aufzeichnung der Daten über den Schaltschrank.

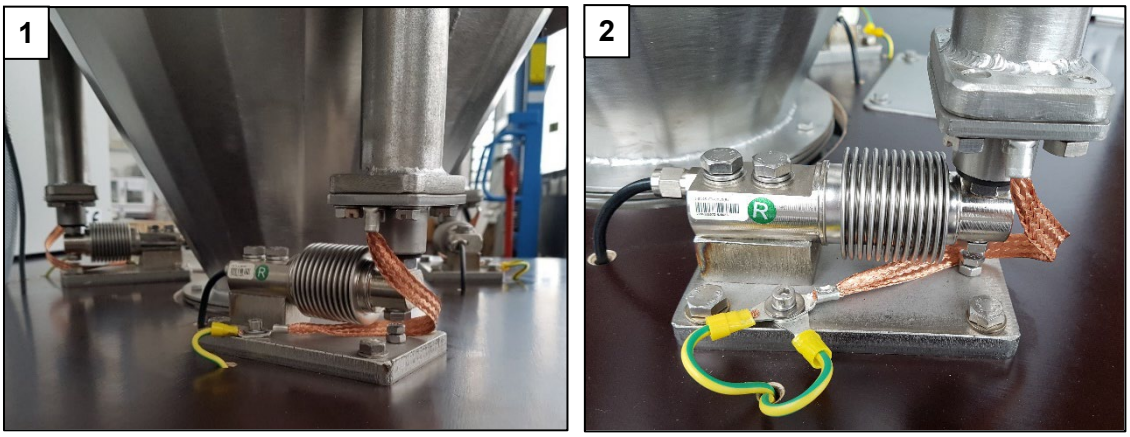

Abb. 23: Wägezellen des Pilotreaktors. 1 Positionen auf dem Tisch. **2** Nahaufnahme.

Die Berieselung des Pilotreaktors erfolgt mit einer speziellen Düse, deren Aufbau und Sprühmuster in Abb. 24 veranschaulicht sind. Durch die Düse wird ein gleichmäßiges Sprühmuster erzeugt, sodass ein Großteil der Lavasteinschüttung kontinuierlich mit der Zirkulationsflüssigkeit versorgt wird. Die Düse wurde dabei zentral im Deckel des Pilotreaktors positioniert, und ist über einen Schlauch mit dem Fermenter verbunden.

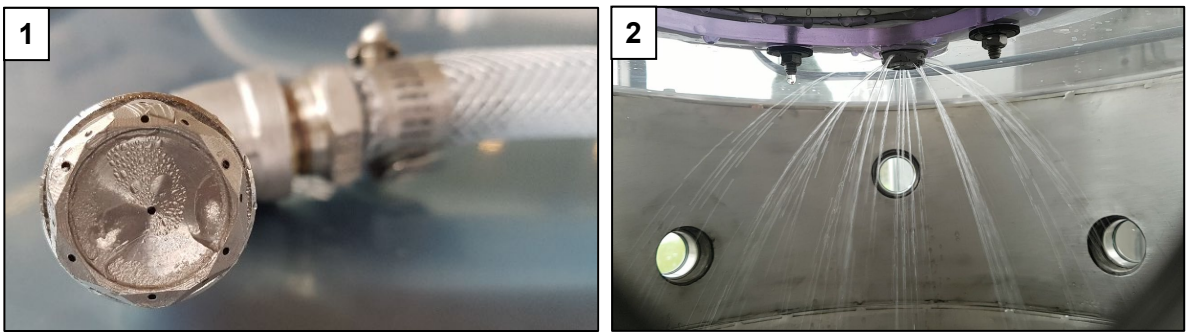

Abb. 24: Berieselung des Pilotreaktors. 1 Düse im ausgebauten Zustand. **2** Sprühmuster der eingebauten Düse im laufenden Betrieb.

Vor dem Einfüllen der Lavasteine der Korngröße 16 – 32 mm, die bereits beim Modellreaktor zum Einsatz kam, wurde die Leermasse des Reaktors über die Bedieneinheit der Wägezellen erfasst und über die Tarier-Taste als Nullwert definiert. Danach wurden die Lavasteine in den Reaktor überführt, wobei eine Masse von 46,1 kg gemäß der Wägeeinheit eingesetzt wurde, die einem Volumen von 25 L entspricht. Abb. 25 zeigt den Reaktorinnenraum vor und nach dem Befüllen mit den porösen Trägermaterialien. Die Lavasteine stammen aus der Vulkaneifel (Rheinland-Pfalz). Erfahrungsgemäß werden die Lavasteine nicht im vollständig trockenen Zustand angeliefert, sondern sind bereits geringfügig mit Flüssigkeit beladen.

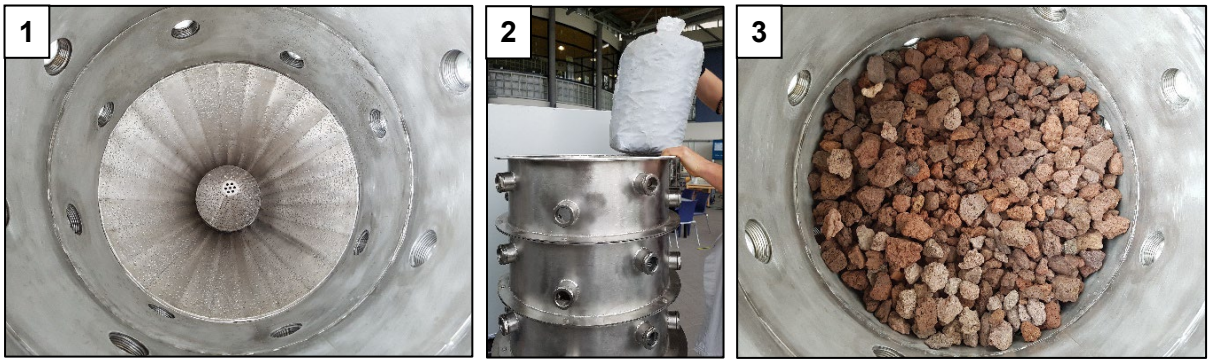

Abb. 25: Überführung von Lavasteinen in den Pilotreaktor. 1 Reaktor vor dem Befüllen. **2** Reaktor mit verpackten Lavasteinen (Sack mit 25 L). **3** Reaktor nach dem Befüllen mit Lavasteinen der Korngröße 16 – 32 mm.

Nach Überführung der Lavasteine erfolgte mithilfe von 30 L entsalztem Wasser, die im Fermenter vorgelegt wurden, die Berieselung der Schüttung, um die Füllkörper während eines Zeitraums von 24 h vorzubefeuchten. Das entsalzte Wasser wurde im Anschluss verworfen und durch 29 L Ammoniummedium (C:N = 20) ersetzt. Zur Inokulation des Pilotreaktors diente ein mikrobielles Konsortium aus *K. rhizophila*, *P. alloputida*, *R. mucilaginosa* und *Y. lipolytica*. Von jeder Spezies wurde eine Vorkultur mithilfe von 250 mL YPD-Medium in einem 500-mL-Erlenmeyerkolben mit Schikanen angesetzt, der nach der Beimpfung mit einer Kolonie von einer Agarplatte unter Einsatz einer Impföse 24 h lang bei 30 °C und 120 rpm inkubiert wurde. Somit war insgesamt ein Volumen von 1000 mL der Vorkultur vorhanden. Nach Zugabe des Inokulums befand sich ein Startvolumen von 30 L im Fermenter. Zur Vollendung der Inbetriebnahme wurde die Berieselung mit einem Volumenstrom von 37 L/h über den Schaltschrank gestartet, sodass mit der Datenaufzeichnung begonnen werden konnte. Der Volumenstrom der Begasung betrug 800 L/h, wobei Umgebungsluft als gasförmiges Medium diente. Der Betrieb des Pilotreaktors erfolgte für einen Zeitraum von 30 Tagen bei einer Temperatur von 24,5 °C ± 2,5 °C im gleichen Labor wie der parallel gestartete Modellreaktor, um die Vergleichbarkeit der zwei Kultivierungsmaßstäbe zu ermöglichen.

Um ein ausreichendes Wachstum von Biofilm zu gewährleisten und den Ammoniumabbau zu untersuchen, erfolgte eine Zugabe von Nährstoffen. Dazu wurde ein Teilvolumen von 1 – 2 L der Zirkulationsflüssigkeit entnommen und mit dem passenden Volumen der jeweiligen Nährstofflösung vermischt. Die resultierende verdünnte Nährstofflösung wurde über das Reinluftrohr (siehe Abb. 21 und Abb. 22, oberer Bereich) in den Pilotreaktor überführt, sodass vor der Zirkulationsflüssigkeit im Fermenter zunächst die Schüttung mit dem hinzudosierten Volumen in Kontakt kam.

Die genauen Angaben zu den Zugabezeitpunkten und eingesetzten Konzentrationen können Tab. 9 entnommen werden. Die Nährstoffzugabe wurde in Anlehnung an die Konzentrationen des Ammoniummediums festgelegt. Erfolgte eine Messung der Glucose- bzw. Ammoniumkonzentration, konnte das erforderliche Volumen über die Konzentration der Lösungen mithilfe von Gl. 17 – wie bereits in Kap. 3.2.3 beschrieben – ermittelt werden. Vor Wochenenden und Feiertagen wurde teilweise eine erhöhte Konzentration der Nährstoffe hinzudosiert.

Tab. 9: Nährstoffzugabe während des Betriebs des Pilotreaktors.

Kultivierungsdauer in Tagen	Glucoselösung		Glucose	Ammoniaklösung		Ammoniak
	Konzentration in g/L	Volumen in mL	Masse in g	Konzentration in g/L	Volumen in mL	Masse in g
1,00	233,4	201	46,9	68,1	19,2	1,31
1,91	233,4	550	128,4	68,1	42,0	2,86
5,89	233,4	550	128,4	68,1	42,0	2,86
6,83	233,4	442	103,2	68,1	25,3	1,72
7,92	233,4	550	128,4	68,1	42	2,86
8,87	233,4	550	128,4	68,1	42	1,72
11,94	233,4	550	128,4	68,1	42	2,86
13,01	233,4	550	128,4	184,6	31,2	5,76
13,95	233,4	550	128,4	184,6	31,2	5,76
14,85	233,4	550	128,4	−	−	−
18,97	−	−	−	−	−	−
19,81	233,4	250	58,4	−	−	−
20,88	233,4	550	128,4	−	−	−
25,85	233,4	550	128,4	−	−	−
26,95	233,4	550	128,4	−	−	−
27,85	233,4	550	128,4	−	−	−

− keine Zugabe der jeweiligen Nährstofflösung. Berechnung des Volumens basierend auf Gl. 17.

3.2.5 Verwertung von Reststoffen

Um im Sinne der Kreislaufwirtschaft die Entsorgung von Endprodukten zu vermeiden, ist es von Vorteil, auch Reststoffströme biotechnologischer Verfahren zu verwerten.[158, 159] Zwei potenzielle Reststoffe, die im Rahmen des Abluftreinigungsprozesses anfallen, stellen überschüssiger Biofilm und Zirkulationsflüssigkeit aus dem Biorieselbettreaktor dar. In Kooperation mit dem Raiffeisen Laborservice (Raiffeisen Rhein-Ahr-Eifel Handelsgesellschaft mbH) erfolgte eine quantitative Analyse der Nährstoffe und Spurenelemente. Die untersuchten Parameter sind mit der entsprechenden Methode in Tab. 10 angegeben. Als Probe diente jeweils ein Volumen von 500 mL des Biofilms bzw. der Zirkulationsflüssigkeit. Die Gewinnung des Biofilms erfolgte mithilfe von Modellreaktoren, wozu der in Abb. 20 dargestellte Aufbau in modifizierter Form diente. Dabei wurden die Lavasteine nicht in der Füllkörperflasche, sondern in der oberen Kunststoffbox aufbewahrt. Zur Abtrennung des Biofilms von der Gesteinsoberfläche wurden die bewachsenen Trägermaterialien in einen 3000-ml-Messbecher überführt, der bis zu einem Füllstand von 50 Vol.-% mit Wasser gefüllt war. Anschließend wurde der Inhalt des Messbechers mithilfe eines Silikonkochlöffels 30 s lang gerührt, sodass sich der Biofilm von den Lavasteinen löste und in der Flüssigkeit in suspendierter Form vorlag. Die Suspension wurde danach durch ein Passiertuch filtriert, wodurch die Biofilmpartikel über das Retentat abgetrennt werden konnten.

Tab. 10: Parameter und Methoden der Nährstoffanalyse.

Parameter	Methode	Klassifikation
organische Substanz	DIN 38414-3 (S 3)	Makroelement
Gesamt-Stickstoff (N)	DIN ISO 13878	Makroelement
organischer N-Anteil	Berechnung aus Gesamt-Stickstoff und löslichem N-Anteil	Makroelement
löslicher N-Anteil (NH_4-N)	DIN EN ISO 11732 nach $CaCl_2$-Extraktion	Makroelement
Phosphat (P_2O_5)	DIN EN ISO 11885	Makroelement
Kalium (K_2O)	DIN EN ISO 11885	Makroelement
Magnesium (MgO)	DIN EN ISO 11885	Makroelement
Calcium (CaO)	DIN EN ISO 11885	Makroelement
Natrium (Na_2O)	DIN EN ISO 11885	Makroelement
Schwefel (S)	DIN ISO 13878	Makroelement
Bor (B)	DIN EN ISO 11885	Spurenelement
Cobalt (Co)	DIN EN ISO 11885	Spurenelement
Eisen (Fe)	DIN EN ISO 11885	Spurenelement
Kupfer (Cu)	DIN EN ISO 11885	Spurenelement
Mangan (Mn)	DIN EN ISO 11885	Spurenelement
Molybdän (Mo)	DIN EN ISO 11885	Spurenelement
Zink (Zn)	DIN EN ISO 11885	Spurenelement

Der durch die Filtration gewonnene Biofilm wurde in 50-mL-Reaktionsgefäße überführt. Um unerwünschte Stoffwechselaktivitäten bzw. Abbauprozesse biologischer oder chemischer Natur zu minimieren, erfolgte eine Lagerung der Probe bei − 80 °C. Die Zirkulationsflüssigkeit wurde aus dem Pilotreaktor nach einer Kultivierungsdauer von 28 Tagen entnommen.

Zusätzlich wurde die Konzentration von Nitrit und Nitrat in der jeweiligen Probe mithilfe von Küvettentests photometrisch bestimmt. Der Nachweis von Nitrit durch den Küvettentest LCK 341 erfolgte in saurer Lösung durch Reaktion mit primären aromatischen Aminen, wobei Diazoniumsalze entstehen, die mit aromatischen Verbindungen, welche über eine Amino- oder Hydroxygruppe verfügen, Azofarbstoffe bilden.[160] Die Absorption der Azofarbstoffe wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.[160] Nitrat wurde mithilfe des Küvettentests LCK 338 in schwefel- und phosphorsaurer Lösung mit 2,6-Dimethylphenol unter Bildung von 4-Nitro-2,6-dimethylphenol nachgewiesen, das bei 324 nm absorbiert.[161] Als Probe für die Küvettentests diente der Überstand nach 2 min langer Zentrifugation von 1 mL Biofilm bzw. Zirkulationsflüssigkeit in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß bei 13.000 *g*.

Neben Biofilm und Zirkulationsflüssigkeit wurde Hühnertrockenkot als Reststoff der Geflügelhaltung untersucht. Die Zusammensetzung von frischen Geflügelexkrementen unterliegt je nach Tieralter und Haltungsbedingungen erheblichen Fluktuationen.[162–165] Deshalb wurde als Modellsubstanz ein getrocknetes, pelletiertes Produkt verwendet, das in Abb. 26 gezeigt ist.

Abb. 26: Hühnertrockenkot. 1 Produktverpackung. **2** Pellets. **3** Pulver nach Zerkleinerung der Pellets.

Konkret handelt es sich bei dem Produkt um Hühnertrockenkot, der als biologischer Naturdünger vermarktet wird.[166] Der Hühnerkot wird aus Norddeutschland und den Niederlanden bezogen.[166] Da sich das Präparat in der pelletierten Form nur unzureichend mit Flüssigkeiten mischen lässt, wurde eine Zerkleinerung mithilfe einer Schwingmühle bei einer Frequenz von 25 Hz für eine Dauer von 10 s durchgeführt. Auf diese Weise kann ein feines Pulver erzeugt werden (siehe Abb. 26), das sich zudem für eine anschließende Siebanalyse eignet. Zunächst wurde eine 2 min lange Luftstrahlsiebung des zerkleinerten Pulvers bei einer Drehzahl von 30 rpm mit einem Sieb der Maschenweite 20 µm vorgenommen, um Feinstpartikel (≤ 20 µm) abzutrennen. Die Aufgabemasse pro Siebung betrug 100 g. Um den Einfluss der Partikelgröße auf das Freisetzungsverhalten von Ammonium zu testen, wurden vier verschiedene Fraktionen des Hühnertrockenkotpulvers (32 – 45 µm, 45 – 90 µm, 90 – 125 µm, 125 – 200 µm) nach der Zerkleinerung untersucht, die durch 10 min lange Vibrationssiebung bei einer Amplitude von 40 mm/g gewonnen wurden. Als Ausgangsprobe diente die durch Luftstrahlsiebung

abgetrennte Fraktion (> 20 µm). Das Versuchsdesign kann Kap. 3.2.2 entnommen werden, wobei Hühnertrockenkot in einer Konzentration von 1 g/L vor dem Autoklavieren hinzugesetzt wurde. Das Ammoniummedium enthielt keine Glucose. Um den Einfluss der Mikroorganismen zu erforschen, wurde jeweils ein Ansatz ohne Inokulum als Negativkontrolle mitgeführt. Die Durchmischung der Ansätze erfolgte mit einem Magnetrührer bei 500 rpm und Raumtemperatur (23,2 °C ± 0,8 °C). Für die Inokulation wurde ein mikrobielles Konsortium aus *Kocuria rhizophila*, *Pseudomonas alloputida*, *Rhodotorula mucilaginosa* und *Yarrowia lipolytica* verwendet. Bei den verschiedenen Ansätzen wurde nach einer Inkubationsdauer von 1 Tag, 3 Tagen und 7 Tagen jeweils eine Probe zur Messung des pH-Wertes und der Ammoniumkonzentration genommen. Nach 2 min langer Zentrifugation bei 13.000 *g* wurde jeweils die Ammoniumkonzentration ($\beta_m(\mathrm{NH_4^+})$, in mg/L) bestimmt, um die freigesetzte Ammoniumkonzentration ($\beta_f(\mathrm{NH_4^+})$, in mg/L) durch Subtraktion der *a priori* im Nährmedium enthaltenen Ammoniumkonzentration ($\beta_0(\mathrm{NH_4^+})$, in mg/L) gemäß der folgenden Gleichung zu berechnen.

$$\beta_f(\mathrm{NH_4^+}) = \beta_m(\mathrm{NH_4^+}) - \beta_0(\mathrm{NH_4^+}) \qquad \text{(Gl. 18)}$$

Zur Ermittlung der maximal freisetzbaren Ammoniumkonzentration erfolgte zusätzlich eine Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs der Hühnertrockenkotsuspension (1 g/L, 32 – 45 µm) per Küvettentest LCK 238. Die Analytik beinhaltet einen Aufschluss mit Peroxodisulfat, wobei anorganisch und organisch gebundener Stickstoff zu Nitrat oxidiert wird.[167] Im Anschluss findet eine Reaktion des gebildeten Nitrats in schwefel- und phosphorsaurer Lösung mit 2,6-Dimethylphenol statt, bei der ein Nitrophenol entsteht, das durch Absorption bei 324 nm nachweisbar ist.[161, 167]

3.2.6 Sprühtrocknung

Die folgenden Beschreibungen basieren auf der Publikation „Preservation of *Kocuria rhizophila* DSM 348 by spray drying using different protective agents for improvement of bacterial viability“, die in der Zeitschrift Drying Technology am 13.04.2024 online veröffentlicht wurde.[168] Die Implementierung in die Dissertation erfolgt mit ausdrücklicher Genehmigung des Urheberrechtsinhabers (Informa UK Limited, Taylor & Francis Group).

Im Vorfeld der Sprühtrocknungsexperimente wurde zunächst das Wachstumsverhalten des Modellorganismus *K. rhizophila* analysiert, um den optimalen Zeitpunkt für die Abtrennung der Biomasse mit einer möglichst großen Ausbeute zu ermitteln. Die Kultivierung erfolgte in flüssigem YPD-Medium, das in Schüttelkolben mit Schikanen vorlag, während eines Zeitraums von 72 h. Jeder Schüttelkolben hatte ein Gesamtvolumen von 500 mL, war jedoch nur mit 150 mL Medium gefüllt, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten und eine hohe Konzentration an gelöstem Sauerstoff für ein optimales Wachstum der aeroben Bakterien zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich wurde der Einfluss von Adaptationsmedien (siehe Tab. 4) auf das mikrobielle Wachstum untersucht, indem die Kulturflüssigkeit nach 24 h ausgetauscht wurde. Dazu wurden die Zellen durch 10 min lange Zentrifugation bei 2.400 *g* separiert und nach Abtrennung des Überstands mit dem entsprechenden Adaptationsmedium resuspendiert.

Während der Inkubation bei 150 rpm und 28 °C wurden Proben in einem Intervall von 24 h entnommen, um die Zellkonzentration mittels des Oberflächenplattierungsverfahrens zu analysieren.

Basierend auf dem Wachstumsverhalten wurden zwei verschiedene Kultivierungszeiten (24 h, 48 h) gewählt, die auf eine hohe Biomasseausbeute schließen lassen. Dabei sollte untersucht werden, ob sich die Wachstumsphase zum Zeitpunkt der Separierung der Biomasse auf die Überlebensrate auswirkt. Außerdem wurde der Einfluss der Kultivierungszeit auf den Wassergehalt der Pulver und auf die Austrittstemperatur während der Sprühtrocknung getestet. Nach der entsprechenden Kultivierungsdauer wurde die Zellsuspension 10 min lang bei 2.400 *g* zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet nach Entfernen des Überstands mit Phosphatpuffer resuspendiert. Die Sprühtrocknung erfolgte bei einer Eintrittstemperatur von 140 °C. Außerdem wurden zwei weitere Eintrittstemperaturen gewählt, um den Einfluss auf die Überlebensrate der Bakterien, den Wassergehalt des Pulvers und die Austrittstemperatur bei der Sprühtrocknung zu untersuchen. In Anlehnung an die Literatur wurden als zusätzliche Eintrittstemperaturen 120 °C und 160 °C festgelegt.[90, 100, 101, 111]

Nach Festlegung einer geeigneten Kultivierungszeit und Eintrittstemperatur wurden diverse Formulierungen von Schutzsubstanzen eingesetzt, um die Überlebensrate der Bakterien unmittelbar nach der Sprühtrocknung und während der Lagerung bei 4 °C zu erhöhen. Um eine Adaption der Zellen an die Schutzsubstanzen zu ermöglichen, wurde die Kulturflüssigkeit nach einer Inkubationszeit von 24 h ausgetauscht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen durch 10 min lange Zentrifugation bei 2.400 *g* separiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurden die Bakterien in einem Adaptionsmedium resuspendiert, das die Schutzsubstanzen in der in Tab. 4 angegebenen Konzentration enthielt. Nach 48 h Inkubation im Schüttelinkubator wurde die Kulturflüssigkeit mit *K. rhizophila* bei 2.400 *g* 10 min lang zentrifugiert, um die Zellen von den restlichen Komponenten zu separieren. Der Überstand wurde durch das gleiche Volumen an Schutzmedium (siehe Tab. 4) ersetzt.

In Ergänzung zu den Schutzsubstanzen diente ein Ansatz mit Phosphatpuffer als Negativkontrolle, der eine Feststoffkonzentration von 14 g/L (7 g/L KH_2PO_4 + 7 g/L K_2HPO_4) aufwies und zum Resuspendieren der Zellen verwendet wurde. Im Gegensatz zu den Schutzsubstanzen erfolgte bei der Negativkontrolle nach einer Inkubationszeit von 24 h kein Austausch der Kulturflüssigkeit durch ein Adaptationsmedium. Anschließend erfolgte die Messung des pH-Werts und der Lebendkeimzahl der resuspendierten Proben, bevor die Sprühtrocknung unter Verwendung der Schutzmedien bzw. des Phosphatpuffers bei einer Eintrittstemperatur von 140 °C stattfand. Um die Langzeitstabilität der Mikroorganismen zu untersuchen, erfolgten Lagerungsexperimente mit drei Pulvern, die aus drei separaten Sprühtrocknungsversuchen stammten. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 52 Wochen aufbewahrt. Die Lagerung der sprühgetrockneten Proben erfolgte im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 °C. Dabei erfolgte eine marginale Lichtexposition aufgrund der Entnahme der Gefäße für die Beprobung. Während der Aufbewahrung im Kühlschrank waren die Pulver dagegen vor Licht geschützt.

Für alle Experimente kam ein Laborsprühtrockner zum Einsatz, der in Abb. 27 veranschaulicht ist und im Gleichstromverfahren betrieben wurde, um die versprühte Flüssigkeit in der gleichen Richtung zu transportieren wie den Luftstrom. Der prinzipielle Aufbau entspricht Abb. 12 und wurde bereits in Kap. 2.1.4 erläutert. Im Folgenden werden die konkreten Betriebsparameter beschrieben. Eine Zweistoffdüse mit einem Durchmesser von 0,7 mm bezogen auf die Spitze wurde verwendet, um Druckluft als Sprühgas mit dem flüssigen Medium zu mischen, das durch eine im Laborsprühtrockner integrierte Peristaltikpumpe mit einer konstanten Durchflussrate von 11 mL/min gefördert wurde.

Abb. 27: Aufbau des Laborsprühtrockners.

Der Zerstäubungsdruck betrug 0,7 MPa. Die Luftmenge wurde über den Aspirator auf 100 % eingestellt, was einem Volumenstrom von 35 m^3/h entspricht. Zusätzlich wurde die Sprühgasmenge mit einem Schwebekörperdurchflussmesser quantifiziert, der auf eine Höhe von 45 mm in Bezug auf die schwebende Kugel eingestellt war. Dieser Wert entspricht einem Volumenstrom von 0,536 m^3/h. Nach der Anpassung der spezifischen Parameter für jedes Experiment wurde das flüssige Medium mittels Peristaltikpumpe zur Düse im Kopfraum des Sprühturms transportiert. Dabei kam ein Magnetrührer mit einer Drehzahl von 150 rpm zum Einsatz, um eine Sedimentation der Mikroorganismen im flüssigen Medium zu verhindern. Die Eintrittstemperatur wurde an das jeweilige Experiment angepasst und bezieht sich auf die eingeleitete Luft nach der Passage eines Heizelements vor der Einleitung in die Düse (siehe T_1 in Abb. 12). Die Austrittstemperatur wird erheblich von der Eintrittstemperatur beeinflusst und im Übergangsbereich zwischen dem Sprühturm und dem Zyklon gemessen (siehe T_2 in Abb. 12). Der Höchstwert der Austrittstemperatur wurde aufgezeichnet und zur Bewertung des hitzeinduzierten zellulären Stresses verwendet.

Das sprühgetrocknete Pulver wurde in einem Auffangbehälter unterhalb des Zyklons gesammelt und in sterile, transparente 50-mL-Reaktionsgefäße überführt. Der Leerraum über dem Pulver innerhalb der 50-mL-Reaktionsgefäße war nicht mit Inertgas gefüllt. Die Experimente wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt, was zu drei verschiedenen Proben für jeden Ansatz führte, um die Reproduzierbarkeit des gesamten Prozesses zu bewerten. Die Lagerung erfolgte, wie bereits beschrieben, im Kühlschrank.

Der Wassergehalt wurde thermogravimetrisch mit einer Infrarot-Trockenwaage bei einer Temperatur von 150 °C und einer initialen Probenmasse von 0,5 g analysiert. Basierend auf der Massendifferenz während des Trocknens wurde der Wassergehalt automatisch als Prozentwert angezeigt. Die Bestimmung des Wassergehalts der Pulver erfolgte 5 min nach Abschluss der Sprühtrocknung. Der Feststoffgehalt (S, in %) wurde basierend auf dem experimentell bestimmten Wassergehalt (W, in %) nach folgender Gleichung berechnet.

$$S = 100\ \% - W \qquad \text{(Gl. 19)}$$

Die Überlebensrate der Bakterien vor und nach der Sprühtrocknung wurde mit dem Oberflächenplattierungsverfahren bestimmt. Dabei erfolgte zunächst die Erstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe unter Verwendung von 900 µL Phosphatpuffer und 100 µL der Probe. Anschließend wurde ein Volumen von 50 µL der verdünnten Proben auf YPD-Agar in doppelter Ausführung ausplattiert und im Brutschrank bei 28 °C inkubiert. Nach 48 h wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) für jede Agarplatte ermittelt.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, die für die Bestimmung der Überlebensrate erforderlich sind, zu gewährleisten, wurde die Lebendzellzahl auf den Feststoffgehalt der Probe vor und nach der Sprühtrocknung bezogen. Dadurch sollte der Einfluss der Additive (Schutzsubstanzen bzw. Phosphate) berücksichtigt werden, die den Feststoffgehalt signifikant erhöhen. Ein Volumen von 25 mL Phosphatpuffer wurde hinzugefügt, um das sprühgetrocknete Pulver (abhängig vom Feststoffgehalt) in einem 50-mL-Reaktionsgefäß unter Verwendung eines Vortexers zu resuspendieren. Im Anschluss wurde ein Teilvolumen von 100 µL verwendet, um die Überlebensrate zu bestimmen.

Die Überlebensrate relativ zum flüssigen Medium vor der Sprühtrocknung (R_1, in %) wurde gemäß Gl. 20 über das Verhältnis der Lebendkeimzahlen bestimmt, die sich auf die flüssige Probe vor der Sprühtrocknung (N_0, in KbE/mL) bzw. die unmittelbar danach resuspendierte, sprühgetrocknete Pulverprobe (N_1, in KbE/mL) beziehen.

$$R_1 = \frac{N_1}{N_0} \cdot 100\ \% \qquad \text{(Gl. 20)}$$

Für die Lagerungsexperimente wurde die zeitabhängige Überlebensrate ($R(t)$, in %) aus den Lebendzellzahlen unmittelbar nach der Sprühtrocknung (N_1, in KbE/mL) und nach der Lagerung ($N(t)$, in KbE/mL) mithilfe von Gl. 21 bestimmt.

$$R(t) = \frac{N(t)}{N_1} \cdot 100\ \% \qquad \text{(Gl. 21)}$$

Die Morphologie des sprühgetrockneten Pulvers wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) und einem Digitalmikroskop analysiert. Die Probe wurde auf einen Objektträger übertragen und auf den Probenteller gelegt. Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie ist für ein CLSM und ein Digitalmikroskop weder eine Beschichtung noch ein Vakuum erforderlich.[169]

3.2.7 Datenauswertung

Für die statistische Analyse von Experimenten mit einer Anzahl n an Messwerten x_i wurde zuerst der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$ gemäß Gl. 22 berechnet und daraus im Anschluss die absolute Standardabweichung σ_A mithilfe von Gl. 23 ermittelt. Unter Einsatz von Gl. 24 wurde bei Bedarf die relative Standardabweichung σ_R zur Charakterisierung der Streuung berechnet, die in prozentualer Form angegeben wird und damit den Vergleich von Messgrößen mit verschiedenen physikalischen Einheiten erlaubt. Die Datenanalyse erfolgte mithilfe von Microsoft Excel 2016. Die Ergebnisse wurden mittels Zweistichproben-*t*-Test statistisch verglichen, wobei für einen signifikanten Unterschied ein *p*-Wert von 0,05 zugrunde gelegt wurde.[170]

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i \qquad \text{(Gl. 22)}$$

$$\sigma_A = \frac{1}{\sqrt{n-1}} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2} \qquad \text{(Gl. 23)}$$

$$\sigma_R = \frac{\sigma_A}{\bar{x}} \qquad \text{(Gl. 24)}$$

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Test der Mikroorganismen in Suspensionskultur

4.1.1 Einfluss der Mikroorganismen in Reinkultur

Um geeignete Arten für das mikrobielle Konsortium zu selektieren, erfolgte zunächst die Untersuchung des Ammoniumabbauverhaltens ausgewählter Bakterien und Pilze in axenischer Suspensionskultur. Abb. 28 zeigt den Verlauf der Ammoniumkonzentration bei den Reinkulturen der sechs getesteten Bakterienstämme. Bei allen Spezies ist zu erkennen, dass im Laufe der Kultivierungsdauer die Ammoniumkonzentration abnimmt, wobei jedoch große Unterschiede zwischen den Stämmen vorliegen, die auch bei der Auswertung der Daten in Form der Ammoniumabbaurate (siehe Tab. 11) erkennbar sind. Nur *Kocuria rhizophila* und *Pseudomonas alloputida* sind in der Lage, die gesamte Menge an Ammonium innerhalb von 48 h vollständig abzubauen. Die beiden Spezies weisen außerdem gemäß Tab. 11 nach 24 h eine Ammoniumabbaurate auf, die deutlich höher liegt als bei den restlichen vier Stämmen. Innerhalb der Gram-positiven bzw. Gram-negativen Bakterien gibt es somit jeweils einen Vertreter, der sich als besonders effizient bei der Verwertung von Ammonium unter den vorliegenden Versuchsbedingungen erweist.

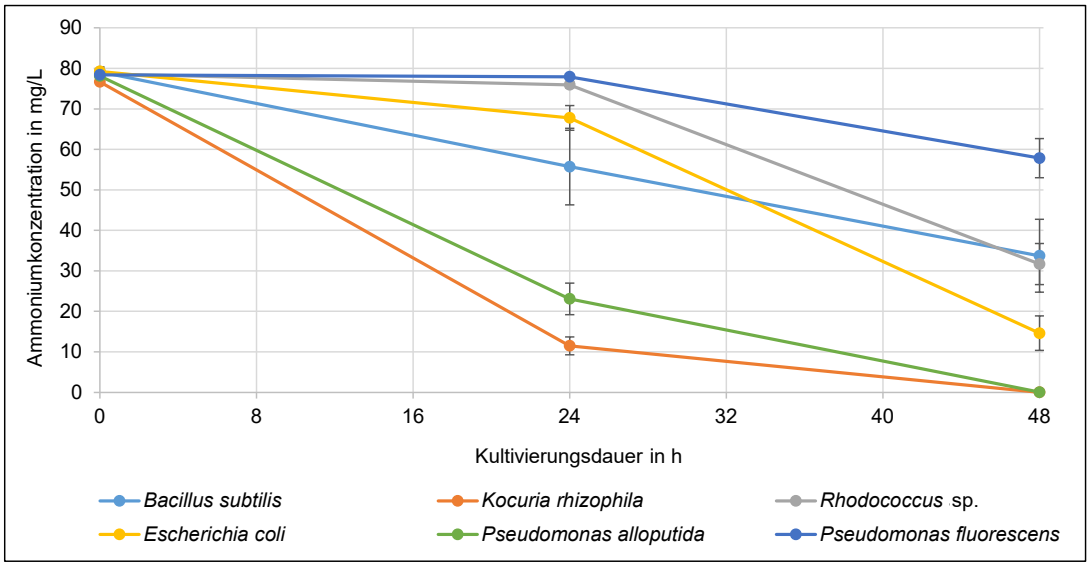

Abb. 28: Verlauf der Ammoniumkonzentration bei den Reinkulturen der Bakterien. *n* = 3.

Tab. 11: Ammoniumabbaurate bei den Reinkulturen der Bakterien. *n* = 3.

Mikroorganismus	**Ammoniumabbaurate in mg/(L ·h)** Zeitraum: 0 h bis 24 h	**Ammoniumabbaurate in %** Zeitraum: 0 h bis 48 h
Bacillus subtilis	0,97 ± 0,44	57,4 ± 11,4
Kocuria rhizophila	2,72 ± 0,09	100,0 ± 0,0
Rhodococcus sp.	0,11 ± 0,02	59,7 ± 6,4
Escherichia coli	0,48 ± 0,11	81,6 ± 5,4
Pseudomonas alloputida	2,29 ± 0,17	99,9 ± 0,1
Pseudomonas fluorescens	0,02 ± 0,00	26,2 ± 6,1

Bei den Negativkontrollen war die Ammoniumkonzentration während der gesamten Versuchsdauer konstant, sodass biologische Kontaminationen oder abiotische Ursachen für die beobachtete Abnahme der Ammoniumkonzentration ausgeschlossen werden können. Die Einordnung der in Tab. 11 aufgeführten Werte der Ammoniumabbaurate erfolgt mithilfe von Publikationen, die anhand von charakteristischen Parametern in Tab. 12 zusammengefasst sind.[171–198] Im Rahmen der Literaturrecherche wurden nicht nur für die getesteten Spezies Referenzwerte ermittelt, sondern auch für weitere heterotrophe Bakterienstämme, die entweder zur gleichen oder zu einer anderen Gattung gehören. Tab. 12 zeigt eine Übersicht der recherchierten Angaben aus der Literatur.[171–198]

Tab. 12: Referenzwerte für die Ammoniumabbaurate von Reinkulturen von heterotrophen Bakterien.

Mikroorganismus	NH_4^+-Abbaurate in mg/(L·h)	NH_4^+-Abbaurate in %	initiale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	finale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	Zeitbedarf	C:N	Quelle
Acinetobacter junii YB	8,28	99,4	200,0	1,3	24 h	10	[171]
Acinetobacter sp. JQ1004	5,36	100,0	128,6	0,0	24 h	5,39	[172]
Acinetobacter sp. SYF26	0,12	95,0	22,1	1,1	7 d	4,31	[173]
Acinetobacter sp. Y1	4,78	95,7	600,0	26,0	5 d	14	[174]
Agrobacterium sp. LAD9	3,33	88,9	90	10	24 h	8,28	[175]
Agrobacterium sp. WS-4	7,37	94,3	187,7	10,7	24 h	3,5	[176]
Arthrobacter nicotianae D51	1,09	98,7	53,2	0,7	48 h	15	[177]
Bacillus licheniformis Lr124/6	7,68	92,2	600,0	46,9	72 h	10	[178]
Bacillus litoralis N31	1,82	86,2	101,2	14,0	48 h	5 – 20	[179]
Bacillus methylotrophicus L7	0,64	73,5	188,6	50,0	9 d	20	[180]
Bacillus sp. K5	4,70	100,0	112,9	0,0	24 h	15	[181]
Bacillus sp. LY	0,08	84,5	57,9	9,0	24 d	k. A.	[182]
Bacillus sp. SM5	0,17	50,0	8,0	4,0	24 h	1	[183]
Chryseobacterium sp. R31	1,11	95,9	55,7	2,3	48 h	10	[184]
Delftia tsuruhatensis NF4	0,23	99,4	16,6	0,1	72 h	7,89	[185]
Escherichia coli ATCC 25922	0,04	68,0	1,47	0,47	24 h	k. A.	[186]
Escherichia coli NCM 3722	6,00	58,8	30,6	12,6	3 h	11	[187]
Klebsiella sp. KSND	5,77	86,5	160,0	21,6	24 h	8	[188]
Kocuria palustris TH126	0,58	70,2	139,6	41,6	7 d	k. A.	[189]
Paracoccus denitrificans ISTOD1	1,04	80,0	62,6	12,5	48 h	10	[190]
Paracoccus denitrificans ISTOD1	2,41	86,0	134,7	18,9	48 h	10	[190]
Paracoccus denitrificans ISTOD1	7,16	76,0	452,1	108,5	48 h	10	[190]
Pseudomonas aeruginosa YL	8,27	99,2	200,0	1,6	24 h	10	[171]
Pseudomonas aeruginosa YL	10,98	52,7	500,0	236,5	24 h	10	[171]
Pseudomonas fluorescens 2P24	8,27	95,6	103,8	4,6	12 h	19	[142]
Pseudomonas putida Y-12	2,75	98,8	267,6	3,1	4 d	8,5	[191]
Pseudomonas putida ZN1	5,34	96,8	128,6	4,1	24 h	12	[192]
Pseudomonas sp. MK621209	1,66	80,3	149,4	29,5	72 h	7,88	[193]
Pseudomonas sp. WS-1	7,62	97,4	187,6	4,9	24 h	3,5	[176]

Mikroorganismus	NH_4^+-Abbaurate in mg/(L·h)	NH_4^+-Abbaurate in %	initiale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	finale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	Zeitbedarf	C:N	Quelle
Pseudomonas sp. WS-6	7,50	95,8	187,8	7,8	24 h	3,5	[176]
Pseudomonas sp. WS-7	7,62	97,4	187,6	4,8	24 h	3,5	[176]
Pseudomonas tolaasii Y-11	2,04	93,6	209,6	13,4	4 d	13,8	[194]
Rhodococcus erythropolis Y10	3,22	100,0	77,3	0,0	24 h	15	[195]
Rhodococcus sp. S2	2,68	100,0	128,8	0,0	48 h	12	[196]
Tritonibacter mobilis HN1	2,62	97,6	128,8	3,1	48 h	15	[197]
Zobellella taiwanensis DN-7	6,51	95,3	273,2	12,8	40 h	12	[198]

Bei Betrachtung der absoluten Ammoniumabbaurate in Tab. 12 fällt auf, dass diese erheblich variiert, wobei Werte zwischen 0,04 mg/(L·h) und 10,98 mg/(L·h) erreicht werden.[171–198] Auch bei Spezies, die zu einer gemeinsamen Gattung gehören, sind relativ große Unterschiede zu beobachten. Beispielsweise besitzt *Bacillus licheniformis* Lr124/6 mit 7,68 mg/(L·h) eine rund 100-mal höhere Ammoniumabbaurate als *Bacillus* sp. LY, der nur 0,08 mg/(L·h) erzielt.[178, 182] *Bacillus subtilis*, der im Rahmen der Dissertation getestet wurde, liegt innerhalb dieses Wertebereiches, wenn die absolute Ammoniumabbaurate aus Tab. 11 betrachtet wird.[178, 182] Die deutlichen Schwankungen lassen sich unter anderem durch eine Variation der experimentellen Bedingungen erklären, die schematisch in Abb. 29 visualisiert sind.[170–201]

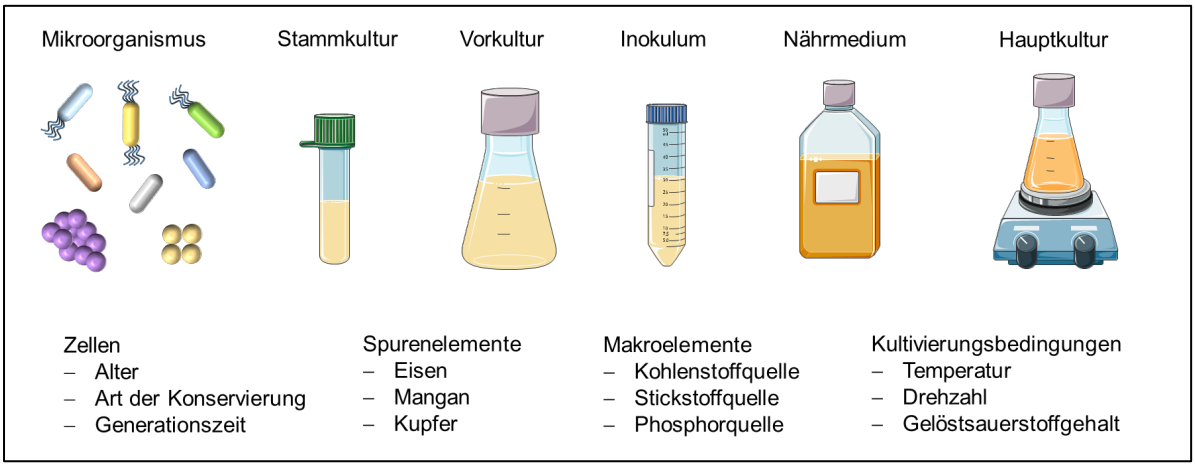

Abb. 29: Auswahl an Einflussfaktoren auf den Ammoniumabbau. Erstellt basierend auf der Literatur.[170–201] Die Grafik enthält Elemente von Servier Medical Art, die unter CC BY 4.0 lizenziert sind und geringfügig modifiziert wurden. Weitere Informationen unter: https://smart.servier.com/.

Dies betrifft unter anderem Inkubationsparameter wie die Temperatur oder die Drehzahl bei rührender bzw. schüttelnder Kultivierung, welche sich auf den Gelöstsauerstoffgehalt und damit auf die aeroben Stoffwechselprozesse bei der Metabolisierung von Ammonium auswirkt.[199–201] Eine wichtige Rolle spielt außerdem die Zusammensetzung des Nährmediums, das zur Kultivierung der Mikroorganismen verwendet wird.[199–201] So kann sich ein Mangel von essentiellen Spurenelementen negativ auf das Wachstum auswirken, was bei dem Test der Reinkulturen der Bakterien möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der Ammoniumabbaurate geführt hat.[199–201] Beispielsweise wurde bei der Untersuchung von *Bacillus*

licheniformis Lr124/6 ein Nährmedium mit Salzen der Elemente Zink, Mangan, Molybdän, Kupfer und Cobalt eingesetzt, die im Ammoniummedium nicht enthalten sind.[178] Für die eigenen Experimente zur Selektion der Mikroorganismen wurde lediglich ein Minimalmedium verwendet, um diejenigen Spezies auszuwählen, die auch bei einer starken Limitierung von Nährstoffen und Spurenelementen überleben können. Im Hinblick auf den Einsatz von Lavasteinen als poröses Trägermaterial für die Mikroorganismen im Biorieselbettreaktor ist mit einer Kompensation des reduzierten Gehaltes an Spurenelementen zu rechnen. Durch den kontinuierlichen Kontakt mit Flüssigkeit werden abiotisch oder mikrobiell induzierte Veränderungsprozesse der Lavasteinoberfläche gefördert, die zur Solubilisierung von Mineralien wie Eisen oder Mangan führen können.[202–204] Neben Spurenelementen beeinflusst bei der Festlegung des Nährmediums vor allem die Kohlenstoffquelle (C-Quelle) den Abbau von Ammonium, wobei zum einen die chemische Struktur und zum anderen die Konzentration berücksichtigt werden muss.[199–201] Die Optima sind wiederum abhängig von der Art des Mikroorganismus. Beispielsweise weist *Bacillus licheniformis* Lr124/6 eine höhere Ammoniumabbaurate auf, wenn Trinatriumcitrat anstatt Glucose als C-Quelle zum Einsatz kommt.[178]

Auch die Inokulation der Vor- bzw. Hauptkultur beeinflusst das Wachstumsverhalten von Mikroorganismen und damit die Verstoffwechselung von Ammonium.[87] Die Stammkultur, die zur Beimpfung der Vorkultur verwendet wird, kann beispielsweise in cryokonservierter Form, als Lyophilisat oder als Kolonien in einer Petrischale vorliegen.[87, 205] Im Idealfall sollte das Inokulum aus der exponentiellen Phase stammen, da eine Entnahme in der stationären Phase bereits zu einer geringeren Anpassungs- und Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen führen kann.[87] In einem sehr guten Impfgut sollte die Gesamtpopulation zu mindestens 99 % aus teilungsfähigen Zellen bestehen.[87] Als Inokulationsvolumen werden 1 – 10 % des Gesamtvolumens empfohlen, wobei in Einzelfällen auch eine geringere Menge ausreichend sein kann.[87] Teilweise erweist sich auch ein Animpfvolumen von 1 ‰ für biotechnologische Produktionsprozesse als geeignet, wenn eine adäquate Steriltechnik vorhanden ist.[87]

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Suspensionskulturen ein Inokulationsvolumen von 10 % verwendet. Bei den in Tab. 12 dargestellten Studien treten erhebliche Variationen auf, was den Animpfvorgang betrifft, wobei auch hier häufig ein flüssiges Inokulum mit einem Anteil von 1 – 10 % am Gesamtvolumen eingesetzt wird.[171–198] Allerdings existieren darüber hinaus auch Arbeiten, bei denen die Untersuchung des Einflusses verschiedener Inokulationsvolumina auf das Wachstumsverhalten und den Ammoniumabbau im Fokus steht.[206, 207] Beispielsweise testeten Liu et al. zur Beimpfung Volumina zwischen 1 %, 3 %, 5 %, 7 % und 9 %, um die Auswirkungen auf die optische Dichte und die Ammoniumkonzentration einer kontinuierlichen Kultur von *Pseudomonas* sp. N31942 zu analysieren.[206] Der Ansatz mit einem Inokulationsvolumen von 1 % erzielte dabei die höchste relative Ammoniumabbaurate am Ende des Versuchszeitraums nach 14 h.[206] Allerdings muss beachtet werden, dass mit zunehmendem Anteil des Inokulums am Nährmedium die Dauer der exponentiellen Phase reduziert wird.[207, 208] Dies lässt sich durch die Steigerung der Zellzahl erklären, die zu einer Erhöhung des Nährstoffverbrauchs führt.[207, 208] So konnten Gao et al. zeigen, dass bei *Pseudomonas stutzeri* GEP-01 durch eine Steigerung des Inokulationsvolumens von 1 % auf 5 % die absolute Ammoniumabbaurate von 2,15 mg/(L·h) auf 4,31 mg/(L·h) erhöht wird,

sodass bereits nach 12 h anstatt nach 24 h die Stickstoffquelle (N-Quelle) zu 100 % verbraucht war.[207] Dagegen wirkte sich eine weitere Erhöhung des Inokulationsvolumens bis zu einem Wert von 10 % negativ aus, da selbst nach 30 h nur 80 % der initialen Ammoniumkonzentration abgebaut wurden.[207] Es wird angenommen, dass ab einer bestimmten kritischen Zellzahl, die durch den erhöhten Anteil des Inokulums erreicht wird, eine Autolyse der Mikroorganismen infolge des rapiden Nährstoffverbrauchs eintritt, wodurch das Wachstum beeinträchtigt wird.[207, 208]

Nach der Überführung in ein neues Nährmedium findet zunächst eine Adaption der Zellen an die geänderten Umgebungsbedingungen statt, welche in der Lag-Phase zu einer Verzögerung des mikrobiellen Wachstums führt (siehe Kap. 2.1.2).[23, 24, 63, 65, 66] Um die initiale Vermehrung der Mikroorganismen zu beschleunigen, sollten Unterschiede in der Nährstoffzusammensetzung der Medien minimiert werden, da auf diese Weise die Lag-Phase verkürzt werden kann.[23, 24, 63, 65, 66] Bei den eigenen Untersuchungen wurde ein komplexes Nährmedium für die Vorkultur verwendet, während bei der Hauptkultur ein definiertes Minimalmedium zum Einsatz kam. Dabei variierte auch die N-Quelle, da von einer organischen Verbindung (Hefe-Extrakt bzw. Pepton) auf ein anorganisches Salz (Ammoniumsulfat) umgestellt wurde, das eine andere Form der Aufnahme in den Intrazellularraum und der enzymatischen Metabolisierung im Rahmen der Assimilation erfordert.[209] Insofern erscheint eine Reduzierung des Ammoniumabbaus durch den Wechsel des Mediums plausibel. Auch in der Literatur wird häufig ein komplexes Medium für die Vorkultur eingesetzt.[180, 183, 190, 191] Jedoch kommen teilweise auch definierte Medien zum Einsatz.[144, 185] Bei der Inokulation des jeweiligen Mediums spielt die Lebendzellzahl der Vorkultur eine wichtige Rolle. Nur bei einer ausreichenden Zelldichte sind die Mikroorganismen in der Lage, optimal im neuen Medium anzuwachsen.[87]

Beim Vergleich der absoluten Ammoniumabbaurate muss berücksichtigt werden, dass der Zeitbedarf bei den Literaturwerten, die in Tab. 12 aufgeführt sind, erheblich variiert.[171–198] Bei längeren Zeiträumen liegt tendenziell auch eine geringere Ammoniumabbaurate vor. So erreicht *Bacillus methylotrophicus* L7 nach 9 Tagen einen Wert von 0,64 mg/(L·h), während *Bacillus* sp. LY nach 24 Tagen nur 0,08 mg/(L·h) erzielt.[180, 182] Indem die absolute Menge an verstoffwechseltem Ammonium auf einen längeren Zeitraum bezogen wird, vergrößert sich der Divisor in der Formel zur Berechnung der absoluten Ammoniumabbaurate (siehe Gl. 13). Dadurch verringert sich der Wert des resultierenden Quotienten. Die in der Literatur für längere Zeiträume von mehr als 3 Tagen angegebenen Abbauraten erscheinen unter Berücksichtigung eines regulären Wachstumsverhaltens für heterotrophe Mikroorganismen nur bedingt sinnvoll.[173, 174, 180, 182, 189, 191] Eine differenzierte Bewertung ist nur möglich, wenn neben der Ammoniumkonzentration auch das mikrobielle Wachstum – beispielsweise durch Ermittlung der Lebendkeimzahl oder der optischen Dichte – untersucht wurde.

Im Folgenden wird anhand der Veröffentlichung von Zhang et al. zum heterotrophen Bakterium *Bacillus methylotrophicus* L7 eine exemplarische Bewertung vorgenommen.[180] Basierend auf dem Verlauf der optischen Dichte unter optimalen Kultivierungsbedingungen erreicht die Bakterienkultur bereits nach 4 Tagen die stationäre Phase, nachdem die Lag-Phase und die exponentielle Phase jeweils rund 2 Tage in Anspruch genommen haben.[180] Eine Absterbe-

phase ist gemäß der Entwicklung der optischen Dichte nicht zu beobachten, da bis zum Ende des Versuchszeitraumes nach 9 Tagen keine wesentlichen Änderungen auftreten.[180] Insgesamt entfallen somit allein 5 Tage auf die stationäre Phase, in der die Ammoniumkonzentration nur noch geringfügig abnimmt.[180] Wird als Bezugszeitraum für die Berechnung der Ammoniumabbaurate nur die Dauer der exponentiellen Phase gewählt, in der die größte Abnahme der Ammoniumkonzentration zu beobachten ist, ergibt sich ein Wert von 2,22 mg/(L·h) – anstatt 0,64 mg/(L·h) bei Verwendung der gesamten Inkubationsdauer.[180] Neben den absoluten Werten ist auch die relative Ammoniumabbaurate abhängig von der Wachstumsphase, dem jeweiligen Referenzzeitraum und der initialen Ammoniumkonzentration.[170–201]

Eine weitere potenzielle Fehlerquelle bei der Diskussion von Literaturwerten stellt die Angabe der Ammoniumkonzentration dar. Häufig wird diese in Publikationen in Form von NH_4^+-N dargestellt, was dem Ammonium-Stickstoff entspricht. In diesem Fall muss eine Umrechnung erfolgen, damit ein Vergleich mit der Massenkonzentration von Ammonium möglich ist. Dazu wurde die folgende Formel verwendet, die das Verhältnis der molaren Massen von Ammonium und Stickstoff berücksichtigt.[210]

$$\beta(\mathrm{NH_4^+}) = \frac{M(\mathrm{NH_4^+})}{M(\mathrm{N})} \cdot \beta(\mathrm{NH_4^+\text{-}N}) = \frac{18\ \mathrm{g \cdot mol^{-1}}}{14\ \mathrm{g \cdot mol^{-1}}} \cdot \beta(\mathrm{NH_4^+\text{-}N}) \cong 1{,}29 \cdot \beta(\mathrm{NH_4^+\text{-}N}) \quad \text{(Gl. 25)}$$

Abb. 30 veranschaulicht analog zu Abb. 28 den Verlauf der Konzentration der C-Quelle Glucose. Dabei fällt auf, dass eine Verringerung der Glucosekonzentration mit zunehmender Kultivierungsdauer eintritt, welche durch die aerobe Verstoffwechselung im Rahmen der Zellatmung zu erklären ist.[23] Ähnlich wie bei der Ammoniumkonzentration variiert die Metabolisierung durch den biologischen Abbau in Abhängigkeit der Bakterienspezies. Charakteristisch ist erneut, dass *Kocuria rhizophila* und *Pseudomonas alloputida* bereits nach 24 h eine deutlich geringere Glucosekonzentration erreichen als die restlichen Arten. Zudem wurde die C-Quelle bei den beiden Spezies nach 48 h nahezu vollständig metabolisiert, während bei den vier weiteren Bakterienarten noch über 1.000 mg/L Glucose vorliegen.

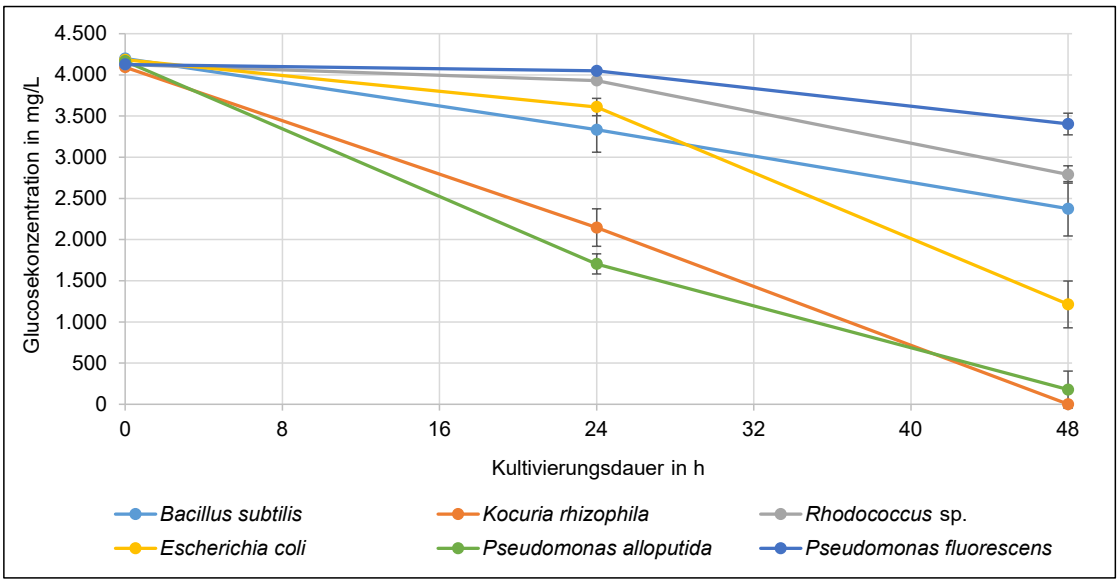

Abb. 30: Verlauf der Glucosekonzentration bei den Reinkulturen der Bakterien. *n* = 3.

Ergänzend zu den Substratkonzentrationen ist in Abb. 31 die Entwicklung der optischen Dichte dargestellt, wobei im Laufe der Kultivierung eine Zunahme zu beobachten ist. Die Ergebnisse bestätigen dabei die Tendenz, die bereits bei der Glucose- und Ammoniumkonzentration sichtbar war. Auch bei Betrachtung der optischen Dichte weisen *Kocuria rhizophila* und *Pseudomonas alloputida* ein besseres mikrobielles Wachstum auf als die restlichen Spezies.

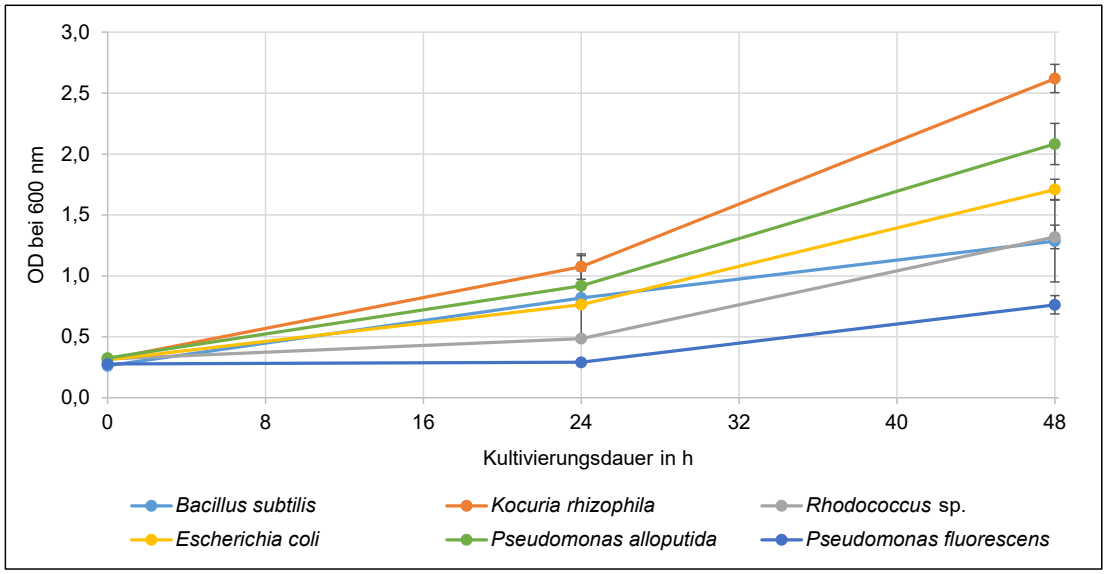

Abb. 31: Verlauf der optischen Dichte bei den Reinkulturen der Bakterien. *n* = 3.

Bei der Interpretation der optischen Dichte muss beachtet werden, dass diese je nach Mikroorganismus einer unterschiedlichen Lebendzellzahl entspricht. Trotz eines einheitlichen Startwertes (OD_{600} = 0,3) resultieren somit verschiedenen Zellkonzentrationen in der Suspensionskultur. Um eine Abschätzung der damit verbundenen Auswirkungen zu ermöglichen, wurde eine Bestimmung der Lebendzellzahl durchgeführt und diese auf einen Wert von OD_{600} = 1,0 normiert, wodurch ein Vergleich der verschiedenen Bakterienspezies erleichtert wird. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zusammengefasst. Bei Betrachtung der Lebendzellzahl fällt auf, dass diese um drei Zehnerpotenzen variiert, den geringsten Wert weist *Rhodococcus* sp. auf, den größten Wert besitzt *Pseudomonas fluorescens*. Die auftretenden Unterschiede hängen unter anderem mit der Morphologie der Bakterienzellen zusammen. So bildet *Rhodococcus* sp. im Gegensatz zu den anderen Arten verzweigte Filamente aus, die zur Bildung von komplexen Zellagglomeraten führen.[211]

Tab. 13: Vergleich der Lebendzellzahl und der optischen Dichte der Bakterien. *n* = 1.

Mikroorganismus	Lebendzellzahl in KbE/mL	Optische Dichte (OD_{600})
Bacillus subtilis	$1{,}54 \cdot 10^7$	1,0
Kocuria rhizophila	$6{,}00 \cdot 10^7$	1,0
Rhodococcus sp.	$1{,}55 \cdot 10^6$	1,0
Escherichia coli	$2{,}81 \cdot 10^8$	1,0
Pseudomonas alloputida	$4{,}62 \cdot 10^9$	1,0
Pseudomonas fluorescens	$1{,}02 \cdot 10^9$	1,0

Bei der Kultivierung in Form der Suspensionskultur kann das filamentöse Wachstum zu einer Erhöhung der Trübung führen, was zu einer Steigerung der optischen Dichte führt. Allerdings wird die Zelldichte vermutlich aufgrund der verzweigten stäbchenförmigen Strukturen verringert, da sich im Vergleich zu sphärischen oder stäbchenförmigen nicht-filamentösen Organismen ähnlicher Größe weniger Zellen im gleichen Volumen des Nährmediums befinden. Dies könnte die Ursache dafür sein, dass bei *Rhodococcus* sp. eine geringere Lebendzellzahl vorliegt als bei den restlichen Arten. Differenzen von mehreren Zehnerpotenzen zwischen der Lebendzellzahl von Bakterien bei der gleichen optischen Dichte wurden beispielsweise auch von Zhang et al. beobachtet, die ebenfalls drei Gram-negative und drei Gram-positive Arten untersuchten.[212] Dabei wurden ausschließlich Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet.[212] Die Spezies *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* wiesen bei OD_{600} = 1,0 eine Lebendzellzahl von 10^9 – 10^{12} KbE/mL auf.[212] Neben den bereits beschriebenen Unterschieden in der Morphologie der Zellen besitzen auch die Zusammensetzung des Nährmediums, die Wachstumsphase, die Temperatur und die Durchführung der Spektrophotometrie einen wesentlichen Einfluss auf die optische Dichte bzw. die Lebendzellzahl. Da die genannten Parameter in der Literatur und der Dissertation variieren, erscheinen die vorliegenden Unterschiede plausibel.

Abb. 32 zeigt abschließend zur Charakterisierung der Kultivierung den Verlauf des pH-Wertes des Mediums nach der Inokulation mit den Bakterien.

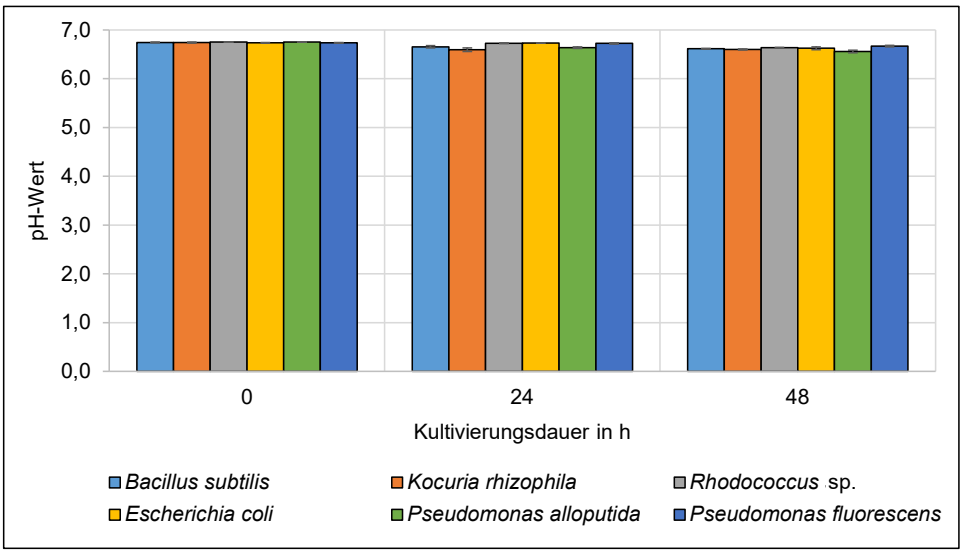

Abb. 32: Verlauf des pH-Wertes bei den Reinkulturen der Bakterien. *n* = 3.

Aus den Daten geht hervor, dass nur geringfügige Änderungen auftreten, was sich durch die erhöhte Konzentration der Puffersalze erklären lässt. Es wurde eine Pufferkonzentration von 7 g/L festgelegt, um die Bildung von Säuren in der Anwachsphase der Suspensionskultur zu kompensieren und dadurch optimale Bedingungen für die Zellvermehrung zu gewährleisten. Das Wachstum der Mikroorganismen wurde durch die relative hohe Konzentration der Phosphatsalze nicht negativ beeinflusst. Es tritt keine signifikante Ansäuerung des Mediums im Laufe der Kultivierung auf, wodurch optimale Bedingungen für das mikrobielle Wachstum – bei

Betrachtung des pH-Wertes – gegeben sind. Bei den beobachteten pH-Werten von 6,6 bis 6,8 und der Temperatur von ca. 20 °C liegen dabei 99,75 % bis 99,84 % bezogen auf die Stoffmenge von Ammoniak und Ammonium in Form von Ammonium vor, sodass der Übergang von Ammoniak aus der Flüssigkeit in die Gasphase als potenzielle Ursache für die Abnahme der Ammoniumkonzentration vernachlässigt werden kann.[30]

Auch bei den Pilzen zeigt sich eine deutliche Abnahme der Ammoniumkonzentration mit zunehmender Kultivierungsdauer, die in Abb. 33 dargestellt ist. Wird die Ammoniumabbaurate nach 24 h in Tab. 14 betrachtet, fällt auf, dass diese bei zwei von drei Pilzstämmen signifikant größer ist als bei den beiden effizientesten Bakterienarten. Gemäß Tab. 14 erreichen alle drei Spezies innerhalb von 48 h eine Ammoniumabbaurate von mehr als 90 %. Basierend auf den experimentellen Ergebnissen eignen sich dabei besonders die Arten *Rhodotorula mucilaginosa* und *Yarrowia lipolytica* als Pilze für das ammoniumabbauende Konsortium.

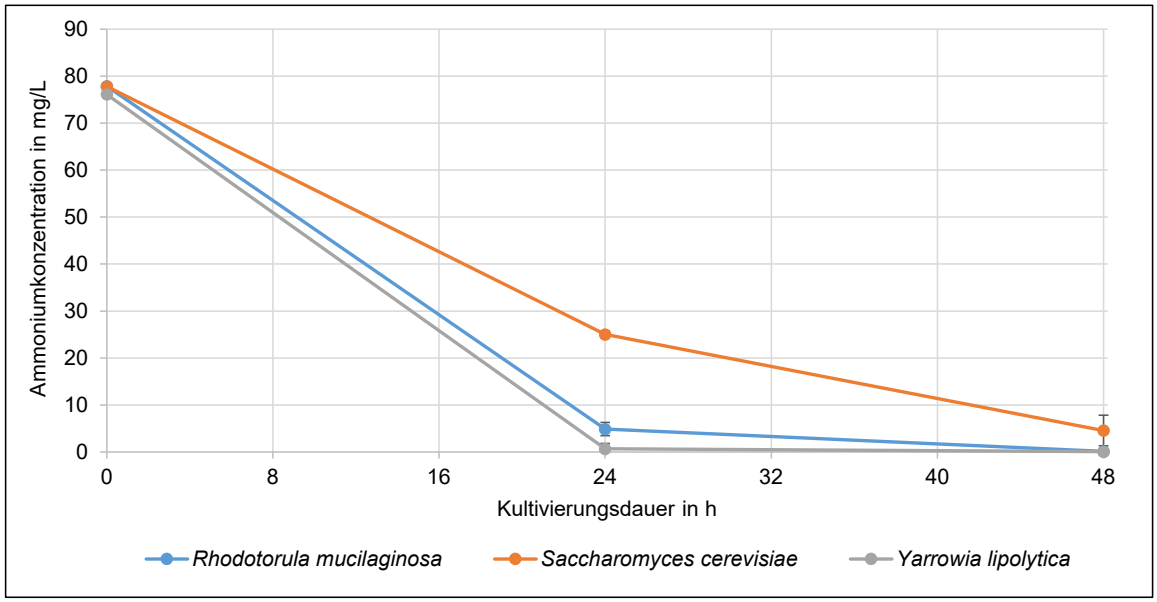

Abb. 33: Verlauf der Ammoniumkonzentration bei den Reinkulturen der Pilze. *n* = 3.

Tab. 14: Ammoniumabbaurate bei den Reinkulturen der Pilze.

Mikroorganismus	**Ammoniumabbaurate in mg/(L·h)** Zeitraum: 0 h bis 24 h	**Ammoniumabbaurate in %** Zeitraum: 0 h bis 48 h
Rhodotorula mucilaginosa	3,04 ± 0,08	99,9 ± 0,0
Saccharomyces cerevisiae	2,20 ± 0,03	94,1 ± 4,2
Yarrowia lipolytica	3,14 ± 0,07	99,9 ± 0,1

Um eine wissenschaftlich fundierte Bewertung der Ammoniumabbauraten der Pilze zu ermöglichen, wurden wie bei den Bakterien Referenzwerte mithilfe von Publikationen recherchiert. Die entsprechenden Werte sind mit ergänzenden Angaben zu den Kultivierungsbedingungen der jeweiligen Mikroorganismen in Tab. 15 zusammengefasst.[148, 149, 213–222] Der Vergleich zeigt, dass die experimentell ermittelten Werte für die drei Pilzarten in der gleichen Größenordnung wie die Literaturwerte liegen. Wie bereits bei den Bakterien diskutiert, muss jedoch beachtet werden, dass die Ammoniumabbaurate von zahlreichen Faktoren (siehe

Abb. 29) abhängt. Da sich die Kultivierungsbedingungen je nach Publikation beträchtlich unterscheiden, ist selbst bei Verwendung der gleichen Spezies – beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae* – keine vollständige Vergleichbarkeit gegeben. Insofern erscheinen Abweichungen von den Literaturwerten plausibel.[148, 149, 213–222]

Auch wenn der Name der Spezies übereinstimmt, wird von anderen Autoren meist nicht exakt der gleiche Stamm verwendet. So untersuchten Mendes-Ferreira et al. *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 4072, die als Weinhefe industrielle Anwendung findet, während im Rahmen der Dissertation der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN CBS 5926 eingesetzt wurde, welcher als Arzneimittel vermarktet wird.[148] Da es sich bei Stämmen um genetisch differenzierbare Untergruppen innerhalb einer Spezies handelt, ist mit Unterschieden im Metabolismus zu rechnen, die sich vermutlich auch auf die Assimilation von Ammonium auswirken.[23] Im Vergleich zu den Bakterien fällt bei den Pilzen in Tab. 15 ein in vielen Fällen höheres C:N-Verhältnis auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die entsprechenden Pilzstämme bevorzugt in einer kohlenstoffreichen Umgebung vorkommen und deshalb eine hohe Konzentration einer organischen C-Quelle für den Abbau von Ammonium bzw. den Aufbau von Biomasse benötigen.[217]

Tab. 15: Referenzwerte für die Ammoniumabbaurate von Reinkulturen von Pilzen.

Mikroorganismus	NH_4^+-Abbaurate in mg/(L·h)	NH_4^+-Abbaurate in %	initiale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	finale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	Zeitbedarf	C:N	Quelle
Aspergillus niger NBG5	1,33	89,8	70,8	7,2	48 h	6,31	[213]
Barnettozyma californica K1	3,76	100,0	180,3	0,0	48 h	15	[214]
Candida tropicalis CICC1351	0,03	88,0	5,0	0,6	6 d	3	[215]
Fusarium keratoplasticum FSP1	3,22	88,2	109,5	12,9	30 h	30	[216]
Mucor circinelloides SNDM1	2,14	75,0	103,0	25,8	36 h	30	[217]
Paecilomyces variotii HL	5,90	100,0	141,7	0,0	24 h	5	[218]
Penicillium tropicum IS0293	3,85	97,9	125,7	2,6	32 h	5	[219]
Pichia guilliermondii LB	0,60	25,0	57,1	42,8	24 h	0,86	[149]
Rhodosporidium sphaerocarpum YLY01	4,56	81,0	270,5	51,5	48 h	10	[220]
Rhodosporidium sphaerocarpum YLY02	1,88	33,3	270,5	180,3	48 h	10	[220]
Rhodosporidium sphaerocarpum YLY03	3,09	54,8	270,5	122,4	48 h	10	[220]
Rhodosporidium sphaerocarpum YLY04	2,36	41,9	270,5	157,1	48 h	10	[220]
Rhodosporidium sphaerocarpum YLY05	0,94	16,7	270,5	225,4	48 h	10	[220]
Rhodotorula glutinis var. *glutinis*	4,17	16,7	1.200	1.000	48 h	10	[221]
Saccharomyces cerevisiae PYCC 4072	3,54	100,0	84,9	0	24 h	1.212	[148]
Saccharomyces cerevisiae PYCC 4072	7,15	100,0	343,3	0	48 h	300	[148]
Saccharomyces cerevisiae PYCC 4072	9,38	87,5	514,3	64,3	48 h	200	[148]
Sporidiobolus pararoseus Y1	1,43	93,0	18,5	1,3	12 h	8	[222]
Sporidiobolus pararoseus Y1	2,41	93,1	93,1	6,4	36 h	8	[222]
Sporidiobolus pararoseus Y1	6,53	85,9	182,4	25,8	24 h	8	[222]
Yarrowia lipolytica LR	0,95	39,9	57,1	34,3	24 h	0,86	[149]

Abb. 34 veranschaulicht den Verlauf der Glucosekonzentration bei der Kultivierung der Pilze. Ähnlich wie bei der Ammoniumkonzentration ist auch bei der C-Quelle eine Abnahme zu beobachten, die sich durch die Verstoffwechselung im Rahmen der aeroben Atmung erklären lässt. Es fällt auf, dass die Art *Saccharomyces cerevisiae* im Gegensatz zu den beiden anderen Spezies bereits nach 24 h das Substrat Glucose vollständig verbraucht hat. Ein Vergleich mit der optischen Dichte der Kulturen, die in Abb. 35 dargestellt ist, lässt darauf schließen, dass trotz des Kohlenstoffmangels im Nährmedium weiter mikrobielles Wachstum stattfindet, da zwischen 24 h und 48 h ein Anstieg der optischen Dichte vorliegt. Diese Schlussfolgerung wird durch die Messwerte der Ammoniumkonzentration bestätigt, da auch hier gemäß Abb. 33 von 24 h bis 48 h eine Fortsetzung der Abnahme zu beobachten ist. Die Pilzarten *R. mucilaginosa* und *Y. lipolytica* weisen im Vergleich zu *S. cerevisiae* eine deutlich geringere optische Dichte im Verlauf der Kultivierung auf.

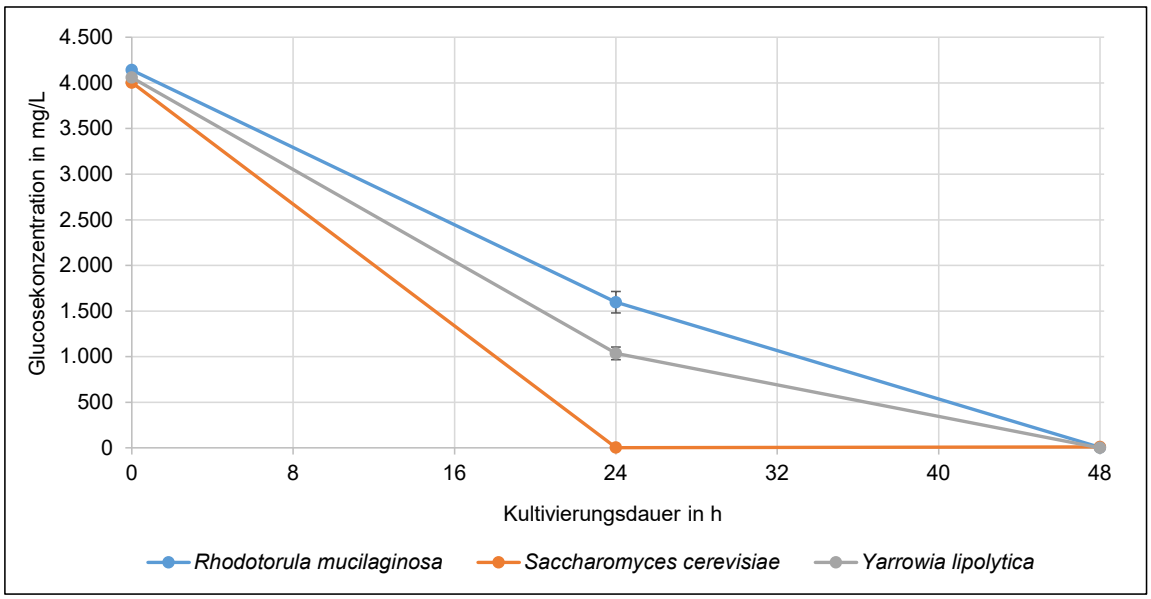

Abb. 34: Verlauf der Glucosekonzentration bei den Reinkulturen der Pilze. *n* = 3.

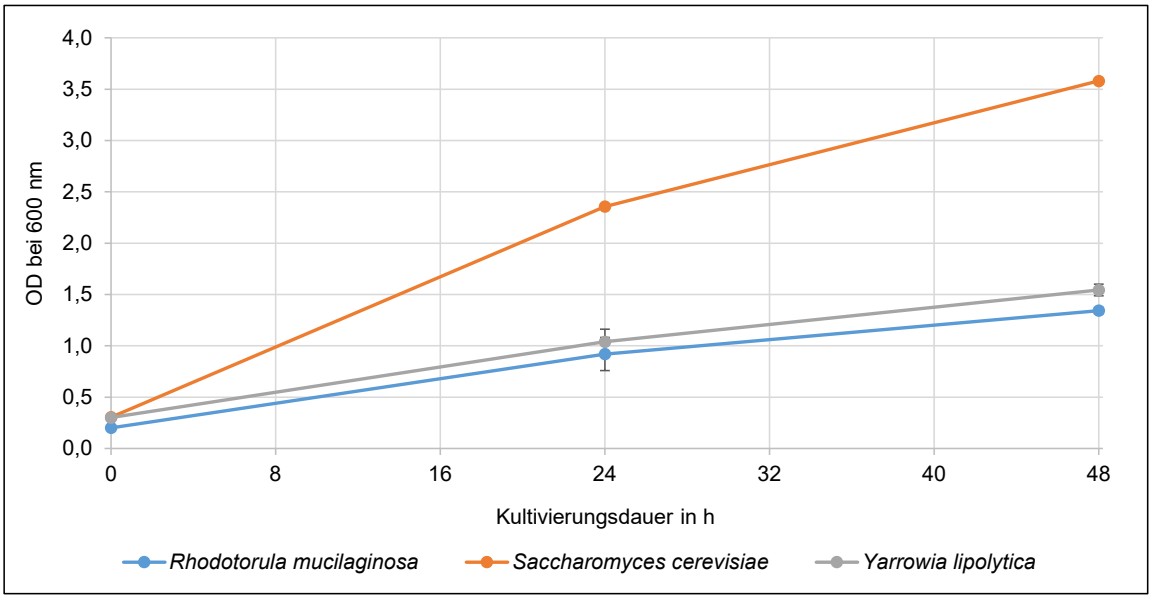

Abb. 35: Verlauf der optischen Dichte bei den Reinkulturen der Pilze. *n* = 3.

Dagegen ist die Glucosekonzentration bei *R. mucilaginosa* und *Y. lipolytica* nach 24 h größer als bei *S. cerevisiae*, was für einen geringeren Verbrauch der C-Quelle spricht. Nach 48 h haben jedoch alle drei Pilze beide Substrate nahezu vollständig verstoffwechselt. Da zu Beginn des Experiments eine relativ hohe Glucosekonzentration von rund 4.000 mg/L vorliegt und die Kultivierung unter aeroben Bedingungen stattfindet, kann im Falle von *S. cerevisiae* der Crabtree-Effekt auftreten, der in der Regel bereits relevant ist, wenn Glucose in einer Konzentration von 150 mg/L im Medium vorhanden ist.[223] Unter diesen Voraussetzungen sind die Hefezellen in der Lage, auch in Anwesenheit von Sauerstoff die C-Quelle im Rahmen der alkoholischen Gärung in Kohlenstoffdioxid und Ethanol umzuwandeln. Im Vergleich zur Zellatmung werden dabei jedoch deutlich weniger Moleküle ATP gebildet, was sich negativ auf die Wachstumsrate und die Biomasseausbeute auswirkt. Außerdem besitzt das Stoffwechselprodukt Ethanol mit zunehmender Konzentration einen cytotoxischen Effekt, wodurch die Viabilität der Hefezellen beeinträchtigt wird. Um eine quantitative Einordnung vornehmen zu können, werden Referenzwerte von Sweechin et al. herangezogen, die sich ebenfalls auf eine diskontinuierliche Kultur der probiotischen Hefe *S. boulardii* in Glaskolben beziehen.[224] Im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen wurde eine relativ hohe Glucosekonzentration von 100 g/L eingesetzt, wobei eine maximale Ethanolkonzentration von 0,03 Vol.-% auftrat. Unter Berücksichtigung der Ethanoltoleranz von *S. boulardii*, die bei rund 20 Vol.-% liegt, ist somit nicht von einer wachstumshemmenden Wirkung auszugehen.[224, 225] Auch bei Betrachtung von Abb. 35 ist kein negativer Einfluss von potenziell gebildetem Ethanol erkennbar, da die optische Dichte im Laufe der Kultivierung kontinuierlich zunimmt. Die Bedeutung des Crabtree-Effektes erscheint somit im Rahmen der Dissertation vernachlässigbar. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass keine explizite Messung der Ethanolkonzentration erfolgte und deshalb das Auftreten der alkoholischen Gärung als Indikator für den Crabtree-Effekt nicht experimentell bestätigt wurde.

Wie bei den Bakterien wurde auch für die Pilze die Lebendzellzahl bei OD_{600} = 1,0 verglichen, die entsprechenden Werte sind in Tab. 16 aufgeführt. Es fällt auf, dass tendenziell eine geringere Lebendkeimzahl vorliegt als bei den Bakterienspezies. Dieser Unterschied lässt sich durch die Zellgröße erklären. Pilze weisen als Eukaryoten im vegetativen Zustand – mit Ausnahme von Sporen – ein höheres Zellvolumen auf als die zu den Prokaryoten zählenden Bakterien.[23] Folglich ist die maximale Anzahl an Hefezellen, die sich in einem definierten Flüssigkeitsvolumen befinden kann, geringer als bei den deutlich kleineren Bakterien. Auffällig ist, dass *S. cerevisiae* eine höhere Zelldichte als die restlichen Pilze erreicht. Dies könnte damit erklärt werden, dass diese Hefeart ausschließlich als einzellige monomorphe Variante vorkommt.[23]

Tab. 16: Vergleich der Lebendzellzahl und der optischen Dichte der Pilze. *n* = 1.

Mikroorganismus	Lebendzellzahl in KbE/mL	Optische Dichte (OD_{600})
Rhodotorula mucilaginosa	$7{,}46 \cdot 10^5$	1,0
Saccharomyces cerevisiae	$1{,}05 \cdot 10^7$	1,0
Yarrowia lipolytica	$9{,}49 \cdot 10^5$	1,0

Dagegen handelt es sich bei *Y. lipolytica* um eine dimorphe Hefe, die neben der einzelligen Form auch filamentös wachsen kann.[226] Durch die Verzweigungen der Hyphen wird die maximale Zelldichte – wie bereits bei der Bakterienart *Rhodococcus* sp. erläutert – reduziert. *R. mucilaginosa* weist keinen Dimorphismus auf.[227] Die im Vergleich zu *S. cerevisiae* geringere Lebendzellzahl könnte durch Unterschiede in der Zellgröße hervorgerufen worden sein.

Abb. 36 visualisiert den Verlauf des pH-Wertes bei den Reinkulturen der Pilze. Dabei sind analog zu den Bakterien keine erheblichen Änderungen aufgrund der Pufferung erkennbar, sodass während der gesamten Versuchsdauer ein leicht saures Milieu vorliegt. Alle drei Hefen sind gemäß der Literatur in der Lage, unter den vorliegenden Kultivierungsbedingungen zu wachsen, wobei der optimale pH-Wert zwischen 6 und 7 liegt.[228–230]

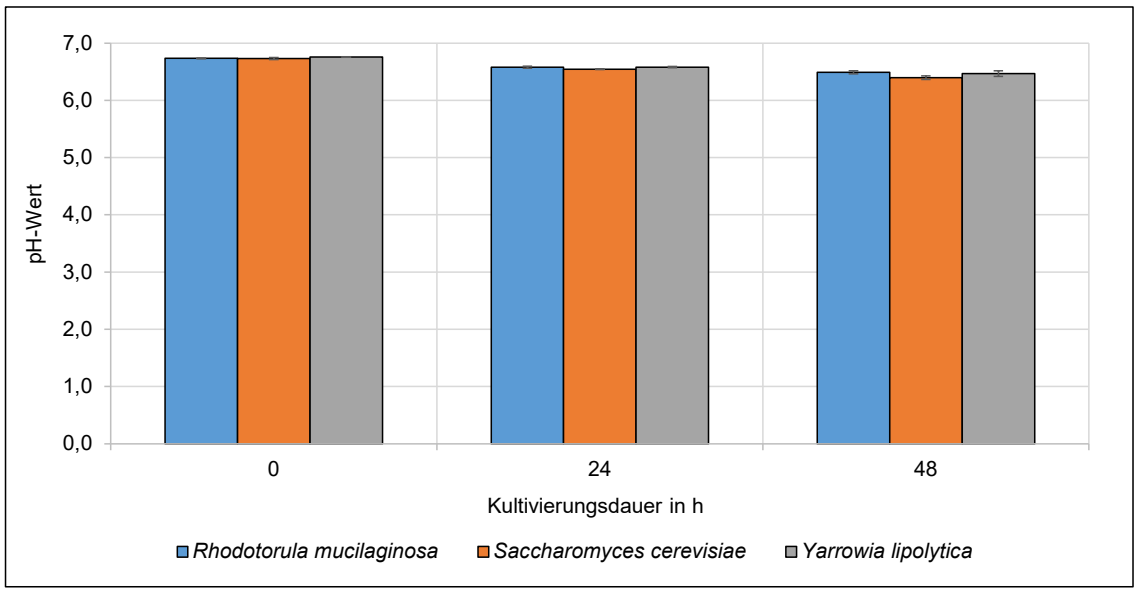

Abb. 36: Verlauf des pH-Wertes bei den Reinkulturen der Pilze. *n* = 3.

4.1.2 Einfluss der Mikroorganismen in Mischkultur

Durch die experimentelle Untersuchung der Mikroorganismen in axenischer Kultur wurden zwei Bakterienspezies (*K. rhizophila, P. alloputida*) und zwei Pilzarten (*R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica*) selektiert, die sich im Vergleich zu den restlichen Stämmen durch eine besonders hohe absolute Ammoniumabbaurate auszeichnen. Im Anschluss wurden die ausgewählten vier Spezies in Form von mikrobiellen Konsortien aus zwei, drei und vier einzelnen Arten kultiviert, um den Einfluss der Co-Kultur auf den Abbau von Ammonium zu erforschen. Im Folgenden wird sich deshalb auf die Ammoniumabbaurate beschränkt. Tab. 17 zeigt die Ergebnisse der Zweier-Mischkulturen innerhalb der ersten 24 h nach Inokulation. Es wird deutlich, dass sich die Spezies nicht negativ bezüglich der Verstoffwechselung von Ammonium beeinflussen, da jeweils Werte erzielt werden, die nicht geringer sind als die der Reinkulturen (siehe Tab. 11 und Tab. 14). Die Zweier-Mischkultur *Y. lipolytica* + *K. rhizophila* erzielt dabei insgesamt die höchste Ammoniumabbaurate, die zudem unter Berücksichtigung der Standardabweichung größer ist als die der korrespondierenden Reinkulturen. Bei einer Betrachtung des jeweiligen Mittelwerts fällt auf, dass die Ammoniumabbaurate der Kombination *Y. lipolytica* + *K. rhizophila* im Vergleich zu *Y. lipolytica* um 16 % gesteigert werden konnte, verglichen mit der Reinkultur von *K. rhizophila* wird sogar eine Erhöhung um 34 % erreicht.

Tab. 17: Ammoniumabbaurate bei den Zweier-Mischkulturen. *n* = 3.

Mikroorganismen	**Ammoniumabbaurate in mg/(L·h)** Zeitraum: 0 h bis 24 h
R. mucilaginosa + *P. alloputida*	2,13 ± 0,07
R. mucilaginosa + *K. rhizophila*	2,83 ± 0,10
Y. lipolytica + *P. alloputida*	3,15 ± 0,66
Y. lipolytica + *K. rhizophila*	3,64 ± 0,14
P. alloputida + *K. rhizophila*	3,20 ± 0,11
R. mucilaginosa + *Y. lipolytica*	3,31 ± 0,10

Tab. 18 veranschaulicht die Ammoniumabbaurate für die vier Dreier-Mischkulturen und die Vierer-Mischkultur. Im Vergleich zu den Zweier-Mischkulturen wird dabei keine weitere Steigerung erzielt. Den höchsten Wert erreicht die Kombination *Y. lipolytica* + *R. mucilaginosa* + *K. rhizophila*.

Tab. 18: Ammoniumabbaurate bei den Dreier-Mischkulturen und der Vierer-Mischkultur. *n* = 3.

Mikroorganismen	**Ammoniumabbaurate in mg/(L·h)** Zeitraum: 0 h bis 24 h
Y. lipolytica + *P. alloputida* + *K. rhizophila*	2,42 ± 0,13
R. mucilaginosa + *P. alloputida* + *K. rhizophila*	2,66 ± 0,17
Y. lipolytica + *R. mucilaginosa* + *K. rhizophila*	3,21 ± 0,15
Y. lipolytica + *R. mucilaginosa* + *P. alloputida*	2,66 ± 0,17
Y. lipolytica + *R. mucilaginosa* + *P. alloputida* + *K. rhizophila*	2,57 ± 0,06

Trotz der geringfügig niedrigeren Ammoniumabbaurate verglichen mit den Zweier-Mischkulturen könnte es von Vorteil sein, ein Konsortium aus drei oder vier verschiedenen Mikroorganismen zur Inokulation des Biorieselbettreaktors einzusetzen, da so im Falle einer Verdrängung einer Art (beispielsweise durch eine Kontamination) noch weitere Spezies vorhanden sind, die einen ausreichenden Schadstoffabbau gewährleisten.

Um den Einfluss des C:N-Verhältnisses auf den Abbau von Ammonium zu erforschen, wurden zwei unterschiedliche Werte mithilfe des etablierten Versuchsaufbaus (siehe Abb. 19) am Beispiel der Zweier-Mischkulturen analysiert. Der Effekt des C:N-Verhältnisses auf die relative Ammoniumabbaurate ist in Abb. 37 dargestellt. Bei allen getesteten Kombinationen kann durch die Erhöhung des C:N-Verhältnisses von 10 auf 20 eine deutliche Steigerung der innerhalb von 48 h abgebauten Menge an Ammonium erzielt werden. Dabei wird in jedem Fall der Maximalwert von 100 % erreicht. Den größten Einfluss scheint die Erhöhung des C:N-Verhältnisses auf *R. mucilaginosa* + *P. alloputida* zu haben, da hier die relative Ammoniumabbaurate nahezu verdoppelt wurde.

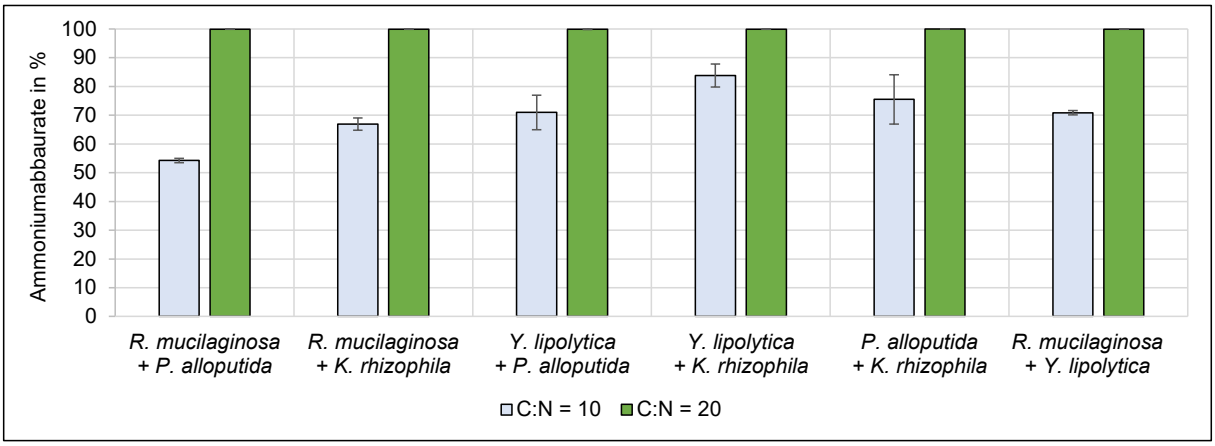

Abb. 37: Ammoniumabbaurate der Zweier-Mischkulturen 48 h nach der Inokulation in Abhängigkeit des initialen C:N-Verhältnisses. *n* = 3.

Eine Steigerung des Ammoniumabbaus durch eine Erhöhung des C:N-Verhältnisses wurde auch von anderen Autoren beobachtet.[135, 196, 199] Beispielsweise konnten Zhang et al. nachweisen, dass bei C:N = 20 der Ammoniumabbau von *Bacillus subtilis* F4 bzw. *Alcaligenes faecalis* P4 um 38 % bzw. 30 % im Vergleich zu C:N = 10 zunimmt, sodass beide Stämme 90 % der zu Beginn im Medium enthaltenen N-Quelle innerhalb von 24 h metabolisierten.[135] *Rhodococcus* sp. S2 zeigte bei C:N = 16 eine relative Ammoniumabbaurate von 94 %, während bei C:N = 8 nur ein Wert von 68 % nach der gleichen Kultivierungsdauer (48 h) erreicht wurde.[196] Aus der Literatur ist bekannt, dass sich höhere C:N-Verhältnisse bei HN-AD-Mikroorganismen positiv auf den Abbau von Ammonium und weiterer Stickstoffspezies auswirken.[199] Dies lässt sich durch den heterotrophen Stoffwechsel erklären, für den ein Überschuss der C-Quelle bis zu einer bestimmten Grenze von Vorteil ist.[195] Optimale Werte variieren zwischen C:N = 8 und C:N = 20.[199] Eine Ausnahme stellt das oligotrophe Bakterium *Acinetobacter* sp. Y16, das Ammonium optimal bei C:N = 2 und einer sehr geringen Temperatur von 2 °C abbaut.[231]

Tab. 19 zeigt eine Übersicht von Referenzwerten für die Ammoniumabbaurate verschiedener Mikroorganismen, wobei zunächst die Reinkulturen und darunter die daraus resultierenden Mischkulturen aufgeführt sind.[232–235] Aus diesem Grund wurde im Gegensatz zu den vorherigen tabellarischen Literaturübersichten auf eine alphabetische Sortierung verzichtet. Bei den absoluten Ammoniumabbauraten von Huang et al., Shu et al. und Luo et al. fällt auf, dass diese deutlich geringer sind als die im Rahmen der Dissertation ermittelten absoluten Werte.[232–234] Dieser Unterschied lässt sich zum einen durch die reduzierte Ammoniumkonzentration (4,20 – 6,70 mg/L) begründen.[232–234] Hintergrund für die Wahl des geringen Konzentrationsbereiches ist die Orientierung an Abwasserströmen aus der Aquakultur, die im Vergleich zu anderen Industriezweigen einen reduzierten Gehalt an anorganischem Stickstoff aufweisen.[232–234] Bei Huang et al. liegt zudem ein längeres Zeitintervall (72 h) als bei der Dissertation vor.[232] Dabei wurde nur ein unvollständiger Abbau der initialen Substratkonzentration erreicht, da die relative Ammoniumabbaurate maximal 61,0 % beträgt.[232] Die Referenzwerte in Tab. 19 beweisen, dass die Kombination mehrerer Mikroorganismen im Vergleich zu den jeweiligen Reinkulturen zu einer Steigerung der Ammoniumabbaurate führen kann.[232–235] Beispielsweise erreicht *Paracoccus* sp. T8 in Co-Kultur mit *Acinetobacter* sp. A12 mit 11,16 mg/(L·h) einen Wert, der um den Faktor 7,6 höher liegt als bei der axenischen Kultur von *Paracoccus* sp. T8.[235] Eine ähnliche Zunahme, wenn auch nicht um den gleichen Faktor, wurde – wie bereits erläutert – auch bei den Zweier-Mischkulturen der Dissertation erreicht, wobei sich die Kombination *Y. lipolytica* + *K. rhizophila* als am effektivsten erwies.

Tab. 19: Referenzwerte für die Ammoniumabbaurate von Rein- und Mischkulturen von Mikroorganismen.

Mikroorganismus	NH_4^+-Abbaurate in mg/(L·h)	NH_4^+-Abbaurate in %	initiale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	finale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	Zeitbedarf	C:N	Quelle
Marinomonas communis (*M. communis*)	0,046	50,0	6,65	3,32	72 h	5	[232]
Marinomonas aquimarina (*M. aquimarina*)	0,045	48,2	6,66	3,45	72 h	5	[232]
Marinomonas vaga (*M. vaga*)	0,027	30,2	6,40	4,47	72 h	5	[232]
Halomonas titanicae (*H. titanicae*)	0,046	50,4	6,57	3,26	72 h	5	[232]
Cobetia marina (*C. marina*)	0,039	42,9	6,52	3,72	72 h	5	[232]
Marinobacterium stanieri (*M. stanieri*)	0,023	25,2	6,65	4,97	72 h	5	[232]
M. communis + *H. titanicae*	0,055	58,7	6,74	2,78	72 h	5	[232]
M. communis + *C. marina*	0,054	60,0	6,47	2,59	72 h	5	[232]
M. communis + *M. stanieri*	0,045	49,6	6,49	3,27	72 h	5	[232]
M. aquimarina + *H. titanicae*	0,054	61,0	6,40	2,50	72 h	5	[232]
M. aquimarina + *C. marina*	0,055	59,2	6,66	2,72	72 h	5	[232]
M. aquimarina + *M. stanieri*	0,043	47,3	6,56	3,45	72 h	5	[232]
M. vaga + *H. titanicae*	0,048	53,3	6,43	3,00	72 h	5	[232]
M. vaga + *C. marina*	0,040	43,5	6,57	3,71	72 h	5	[232]
M. vaga + *M. stanieri*	0,030	32,7	6,58	4,43	72 h	5	[232]
Pseudomonas mendocina S16	0,123	44,2	6,70	3,74	24 h	10	[233]
Enterobacter cloacae DS'5	0,054	19,2	6,70	5,41	24 h	10	[233]
P. mendocina S16 + *E. cloacae* DS'5	0,215	76,9	6,70	1,55	24 h	10	[233]

Mikroorganismus	NH_4^+-Abbaurate in mg/(L·h)	NH_4^+-Abbaurate in %	initiale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	finale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	Zeitbedarf	C:N	Quelle
Rhodosporidium sphaerocarpum	0,040	22,6	4,20	3,25	48 h	k. A.	[234]
Chlorella vulgaris GY-H4	0,040	22,6	4,20	3,25	48 h	k. A.	[234]
R. sphaerocarpum + *C. vulgaris* GY-H4	0,060	34,5	4,20	2,75	48 h	k. A.	[234]
Acinetobacter sp. A12	6,36	23,3	655,0	502,3	24 h	10	[235]
Paracoccus sp. T8	1,46	5,4	653,2	618,2	24 h	10	[235]
Acinetobacter sp. A12 + *Paracoccus* sp. T8	11,16	40,9	654,3	386,4	24 h	10	[235]

Da sich in der Literatur häufig Untersuchungen finden, die nur mit Mischkulturen arbeiten, ohne die zugrundeliegenden Reinkulturen zu analysieren, wurden in Tab. 20 weitere Referenzwerte für den Ammoniumabbau zusammengefasst.[236–244] Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Daten keine Aussagen zur Effektivität der Symbiose im Vergleich zu den einzelnen Mikroorganismenarten erlauben, da diese aufgrund der komplexen mikrobiellen Zusammensetzung nicht separat, sondern nur in Form von Konsortien erforscht wurden.[236–244] Ein Vergleich der Referenzwerte aus Tab. 20 mit den eigenen Ergebnissen beweist, dass die Ammoniumabbaurate in einer ähnlichen Größenordnung liegt. Da zudem höhere initiale Ammoniumkonzentrationen verwendet wurden als bei den Studien aus Tab. 19, die auf Aquakulturen spezialisiert waren, scheint tendenziell eine bessere Vergleichbarkeit gegeben. Allerdings muss bei der Interpretation der Literaturwerte trotzdem beachtet werden, dass sich der Zeitbedarf teilweise erheblich von den Experimenten der Dissertation unterscheidet. Dabei fällt auf, dass beim geringsten Referenzzeitraum von 4 h die höchste absolute Ammoniumabbaurate erreicht wird. Dies bestätigt erneut die große Bedeutung des experimentellen Kontextes und der rechnerischen Auswertung für die Bewertung der Ergebnisse aus der Literatur.

Tab. 20: Referenzwerte für die Ammoniumabbaurate von Mischkulturen von Mikroorganismen.

Inokulum	NH_4^+-Abbaurate in mg/(L·h)	NH_4^+-Abbaurate in %	initiale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	finale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	Zeitbedarf	C:N	Quelle
Ammoniumoxidierende Bakterien aus Deponiesickerwasser	1,49	42,5	336,2	193,2	4 d	1	[238]
Ammoniumoxidierende Bakterien aus Deponiesickerwasser	2,41	36,0	322,0	206,1	48 h	1	[239]
Anammox-Konsortium (20 % *Candidatus* Brocadia fulgida)	1,95	81,6	114,6	21,1	48 h	k. A.	[243]
Autotrophes Anammox-Konsortium aus Abwasser	3,31	18,0	128,8	105,6	7 h	k. A.	[244]
Chlorella vulgaris und Mikroorganismen aus Klärschlamm	2,42	90,1	64,4	6,4	24 h	k. A.	[240]
Chlorella sorokiniana und nitrifizierende Bakterien aus Klärschlamm	14,15	91,6	61,8	5,2	4 h	1	[241]
Mikroalgen-Konsortium (*Chlorococcum* sp., *Spirulina* sp., *Pseudoanabaena* sp.)	0,38	21,8	41,2	32,2	24 h	k. A.	[242]
Pseudomonas sp., *Sphingobacterium* sp. *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp.	2,65	99,0	128,3	1,28	48 h	10	[236]
Nitrifizierende und denitrifizierende Bakterien aus Klärschlamm	7,35	64,6	273,1	96,6	24 h	2	[237]

Eine Co-Kultur von Bakterien und Pilzen zum Abbau von Ammonium ist bisher nicht beschrieben, kommt jedoch bei anderen Stickstoffspezies bzw. Schadstoffgruppen zum Einsatz. Beispielsweise wurden von Chen et al. *Citrobacter freundii* WXP-9 und *Penicillium citrinum* WXP-2 verwendet, um Nitrat durch Denitrifikation abzubauen.[245] Im Vergleich zu den beiden Reinkulturen konnte der Abbau sowohl relativ zur Ausgangskonzentration als auch absolut bezogen auf die Inkubationszeit deutlich gesteigert werden.[245] Die Förderung der Denitrifikation durch die Co-Kultur wird auf eine Erhöhung der Elektronentransmissionssystemaktivität und der Nitrat-Reduktaseaktivität zurückgeführt.[245] Dabei wurde mithilfe eines Rasterelektronenmikroskops eine Interaktion der Bakterienzellen mit den Hyphen des Pilzes festgestellt.[245] *Citrobacter freundii* WXP-9 zeigte eine Adhäsion am filamentösen Mycel von *Penicillium citrinum* WXP-2, sodass die Oberfläche der Hyphen von den stäbchenförmigen Bakterien besiedelt wurde.[245]

Im Rahmen der Dissertation erfolgte ebenfalls eine mikroskopische Untersuchung der Co-Kulturen, wobei geliertes Ammoniummedium in der Petrischale als Substrat diente. Dabei wurde für jede der sechs Zweier-Mischkulturen eine repräsentative Aufnahme der Kolonien auf der Oberfläche des Nährmediums erstellt, die in Abb. 38 enthalten ist. Bei Betrachtung der vier Ansätze mit jeweils einem Bakterium und einem Pilz wird deutlich, dass die Kolonien der beiden Mikroorganismen nicht getrennt voneinander wachsen, sondern sich in direkter räumlicher Nähe befinden. Die Morphologien legen dabei nahe, dass die Bakterien und Pilze auf dem Nährmedium eine Symbiose eingehen, da sich die Kolonien jeweils an mehreren Stellen überlappen. Ein Teil des Mycels der Pilze befindet sich gemäß Abb. 38 bevorzugt innerhalb des bakteriellen Zellverbundes, wodurch vermutlich der Austausch von Stoffwechselprodukten während des Ammoniumabbaus gefördert wird.

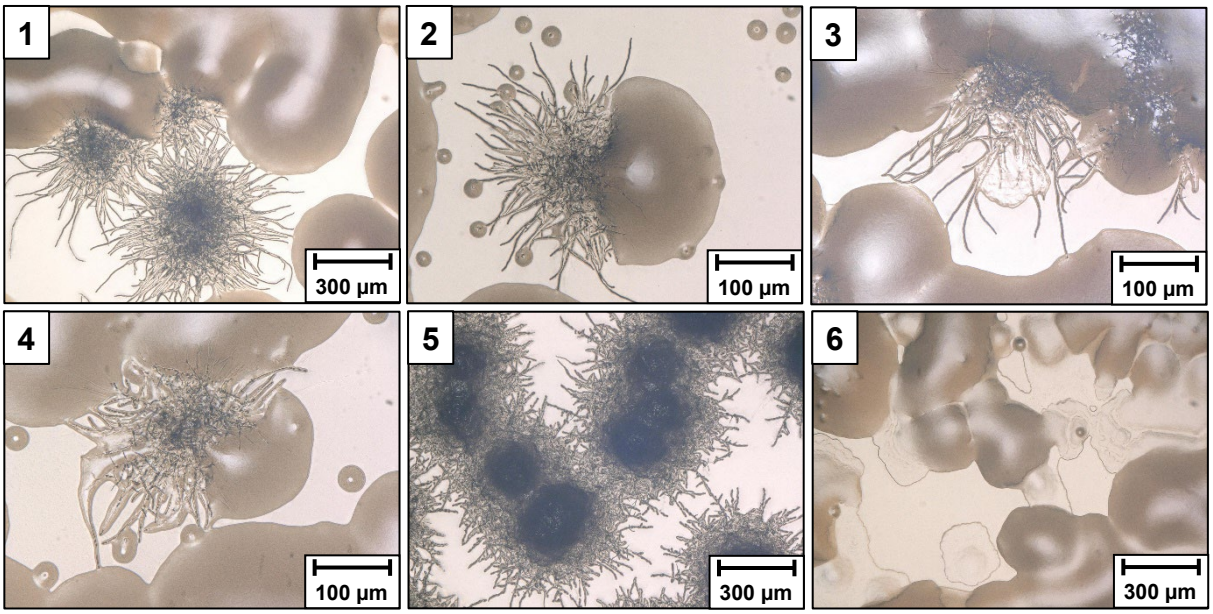

Abb. 38: Wachstum der Zweier-Mischkulturen von Bakterien und Pilzen auf geliertem Ammoniummedium. **1** *R. mucilaginosa* + *P. alloputida*. **2** *R. mucilaginosa* + *K. rhizophila*. **3** *Y. lipolytica* + *P. alloputida*. **4** *Y. lipolytica* + *K. rhizophila*. **5** *Y. lipolytica* + *R. mucilaginosa*. **6** *P. alloputida* + *K. rhizophila.* Die Aufnahmen wurden nach 48 h langer Inkubation bei 28 °C in der Petrischale erstellt.

In der Literatur sind verschiedene Formen der Interaktion von Bakterien und Pilzen dokumentiert, wobei neben einer Symbiose auch eine Inhibition auftreten kann.[246–248] Das bekannteste Beispiel für eine inhibierende Wirkung von Pilzen steht mit der Entdeckung des Antibiotikums Penicillin durch Alexander Fleming in Verbindung. Der schottische Wissenschaftler beobachtete bei der Kultivierung von *Penicillium chrysogenum* eine Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus*, die auf den antibakteriellen Effekt des Penicillins zurückgeführt werden konnte.[23, 248] Da bei der morphologischen Charakterisierung in Abb. 38 keine Hemmhöfe zwischen den Kolonien der Mikroorganismen zu erkennen sind, liegt keine Inhibition des Wachstums vor.

Im Falle einer Symbiose fungiert bei filamentösen Pilzen häufig die sogenannte Hyphosphäre als Habitat für die bakterielle Besiedelung und ermöglicht Wechselwirkungen des Primär- und Sekundärstoffwechsels.[246, 247] Digitalmikroskopische Aufnahmen (siehe Abb. 39) deuten darauf hin, dass auch der Pilz *R. mucilaginosa* eine Hyphosphäre ausbildet, die eine Interaktion mit den Bakterien fördert. In Ergänzung zu Abb. 38 ist dabei erkennbar, dass sich die Hyphen innerhalb der Kolonien der Bakterien fortsetzen, da unterhalb der Oberfläche eine charakteristische verzweigte Struktur auftaucht (siehe schwarzer Pfeil in Abb. 39), die zum Mycel des Pilzes gehört. Zudem wachsen auch einzelne Hyphen in Richtung der bakteriellen Kolonien und reduzieren sukzessive die räumliche Distanz auf der Oberfläche des gelartigen Nährmediums, um letztendlich eine direkte Verbindung mit den Bakterien einzugehen. Diese wurde in Abb. 39 durch blaue Pfeile markiert. Bei 1000-facher Vergrößerung zeigt sich innerhalb der Bakterienkolonie oberhalb des blauen Pfeils eindeutig die filamentöse Struktur des Pilzes, welche bei isoliertem Wachstum des Bakteriums (siehe grüner Pfeil) nicht vorhanden ist. Jedoch ist davon auszugehen, dass mit zunehmender Kultivierungszeit auch im Falle der isolierten Kolonie eine Verbindung zum Pilzmycel entsteht, da in der näheren Umgebung im Abstand von rund 50 µm bereits mehrere Hyphen vorhanden sind.

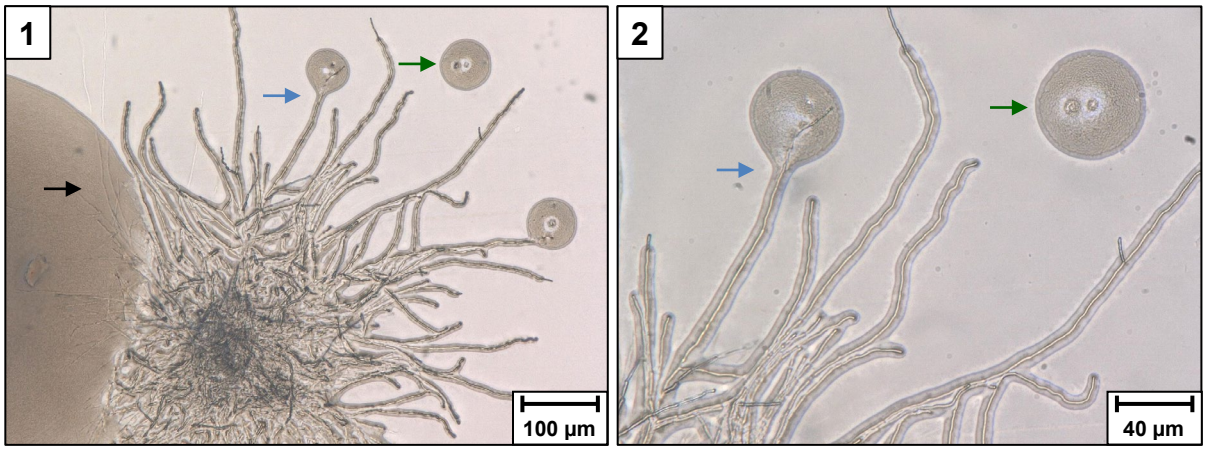

Abb. 39: Entwicklung einer Hyphosphäre beim Wachstum von Bakterien und Pilzen auf geliertem Ammoniummedium. 1 600-fache Vergrößerung. **2** 1000-fache Vergrößerung. Die Aufnahmen zeigen die Zweier-Mischkultur *R. mucilaginosa* + *K. rhizophila*. Schwarzer Pfeil: Fortsetzung des Mycels innerhalb der Bakterienkolonie. Blauer Pfeil: Vereinigung einer Hyphe mit einer Bakterienkolonie. Grüner Pfeil: Isolierte Kolonie des Bakteriums ohne direkte Verbindung zum Mycel des Pilzes.

4.2 Test der Mikroorganismen im Modellreaktorsystem

Um nach der Evaluation der selektierten Spezies in der Suspensionskultur und in der Petrischale zusätzlich die Eignung für Bioriesel bettreaktoren zu testen, erfolgte eine Kultivierung im Modellreaktorsystem. Zunächst wird auf die Masse eingegangen, die in Abb. 40 visualisiert ist. Dabei muss beachtet werden, dass sich die Masse des Modellreaktors auf die Füllkörperflasche inkl. Lavasteine bezieht. Innerhalb des ersten Tages ist eine deutliche Massenzunahme zu beobachten, die sich mit der Aufnahme von Wasser durch die porösen Lavasteine erklären lässt. Die beobachtete Steigerung der Masse um 9,3 % innerhalb des ersten Tages stimmt gut mit den Angaben des Herstellers überein.[249] Aufgrund des hohen Porenvolumens von bis zu 67 % kann die Zirkulationsflüssigkeit während der Berieselung über die luftgefüllten Hohlräume aufgenommen und gespeichert werden.[249] Zusätzlich ergibt sich auch im Leerraum zwischen den Lavasteinen innerhalb der Schüttung ein potenzielles Flüssigkeitsreservoir.

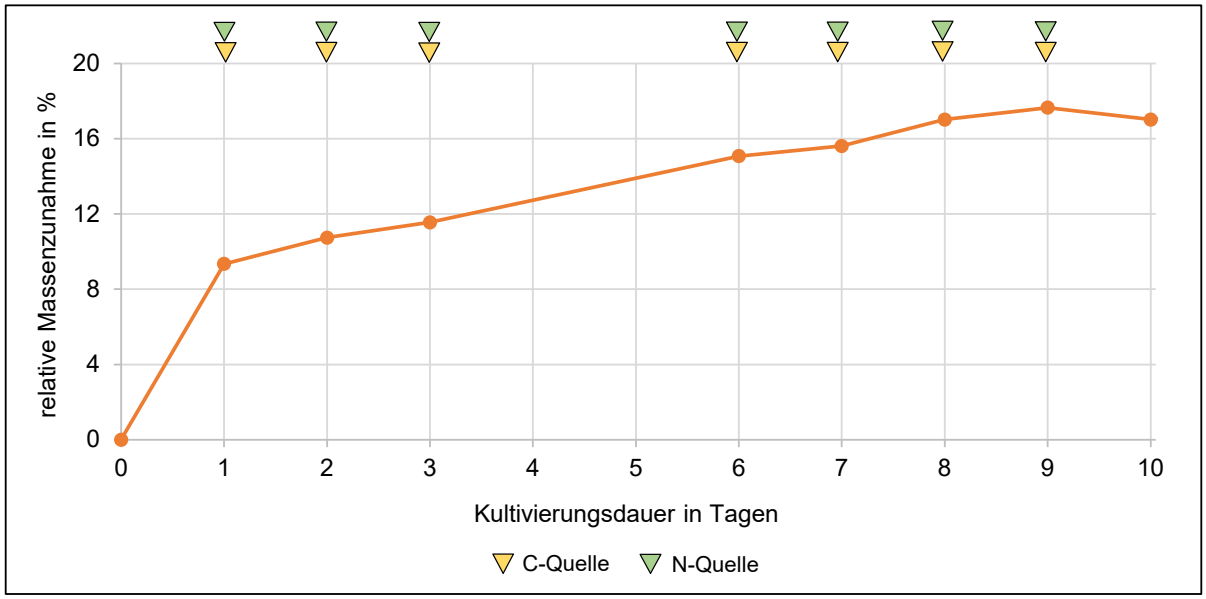

Abb. 40: Verlauf der relativen Massenzunahme im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium. *n* = 3. Die Standardabweichung ist zu gering, um in der Darstellung erkennbar zu sein.

Die Massenzunahme im weiteren Verlauf nach der initialen Aufnahme der Zirkulationsflüssigkeit ist durch die Bildung von Biofilm zu erklären. Der prinzipielle Ablauf der Biofilmentwicklung wurde in Kap. 2.1.3 beschrieben. Nach der Adhäsion der Zellen kann im Beispiel eine Fortsetzung des Wachstums auf der Oberfläche der Lavasteine erfolgen. Aufgrund der regelmäßigen Nährstoffzugabe können sich die Mikroorganismen in der Schüttung vermehren, was zu einer zunehmenden Ausdehnung des Biofilms im Laufe der Kultivierungsdauer führt. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass mit der angewandten Methodik nicht die reine Biomasse identifiziert wurde, sondern lediglich eine unspezifische Massenzunahme. Nachdem Biofilm aufgrund des Aufbaus aus hydrophilen EPS einen hohen Wassergehalt von bis zu 98 % besitzt, lässt sich der Anstieg der Masse zu einem großen Anteil durch das zusätzlich gebundene Wasser aus der Zirkulationsflüssigkeit erklären.[67–69] In der Literatur dient zur Charakterisierung des Biofilms oft die Biotrockenmasse oder die Lebendzellzahl, welche auf die Probenmenge und die besiedelte Oberfläche des Trägermaterials bezogen wird.[250–253]

Ein ähnlicher Trend der Massenzunahme bzw. der akkumulierten Biomasse wurde auch von anderen Autoren beobachtet, die sich mit der Kultivierung von Mikroorganismen auf Trägermaterialien beschäftigten.[250–252] Abweichungen von der Literatur lassen sich durch Variationen der Kultivierungsbedingungen bzw. der Versuchsdurchführung erklären.[250–252] Anhand von Abb. 41 ist ersichtlich, dass auf der Oberfläche des porösen Trägermaterials 3 Tage nach der Inokulation bereits ein ausgeprägtes Biofilmwachstum stattgefunden hat. Die Aufnahmen zeigen die Unterseite der Füllkörperflasche. Dabei dominiert im Biofilm die Farbe Gelb, die charakteristisch für *K. rhizophila* ist.[254] Zusätzlich zeigen sich weiß-graue Strukturen, die von *Y. lipolytica* stammen könnten.[255] Im weiteren Verlauf der Kultivierung wird die Lavasteinoberfläche immer großflächiger von Biofilm bedeckt, der 8 Tage nach der Inokulation nach unten ragende Fortsätze ausbildet, die Stalaktiten ähneln.[256] Mithilfe der Digitalmikroskopie kann die Biofilmverteilung auf der Lavasteinoberfläche zudem hochaufgelöst dokumentiert werden (siehe Abb. 42).

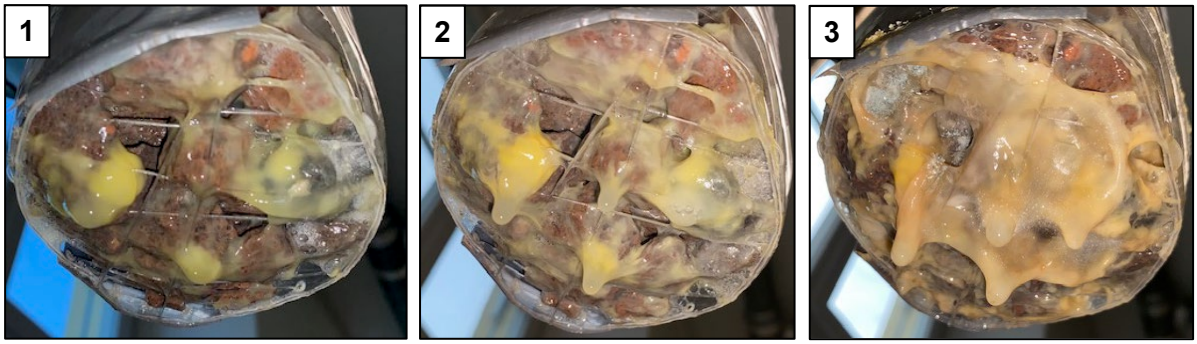

Abb. 41: Ausbildung eines Biofilms auf der Lavasteinoberfläche im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium. 1 3 Tage nach Inokulation**. 2** 6 Tage nach Inokulation**. 3** 8 Tage nach Inokulation**.**

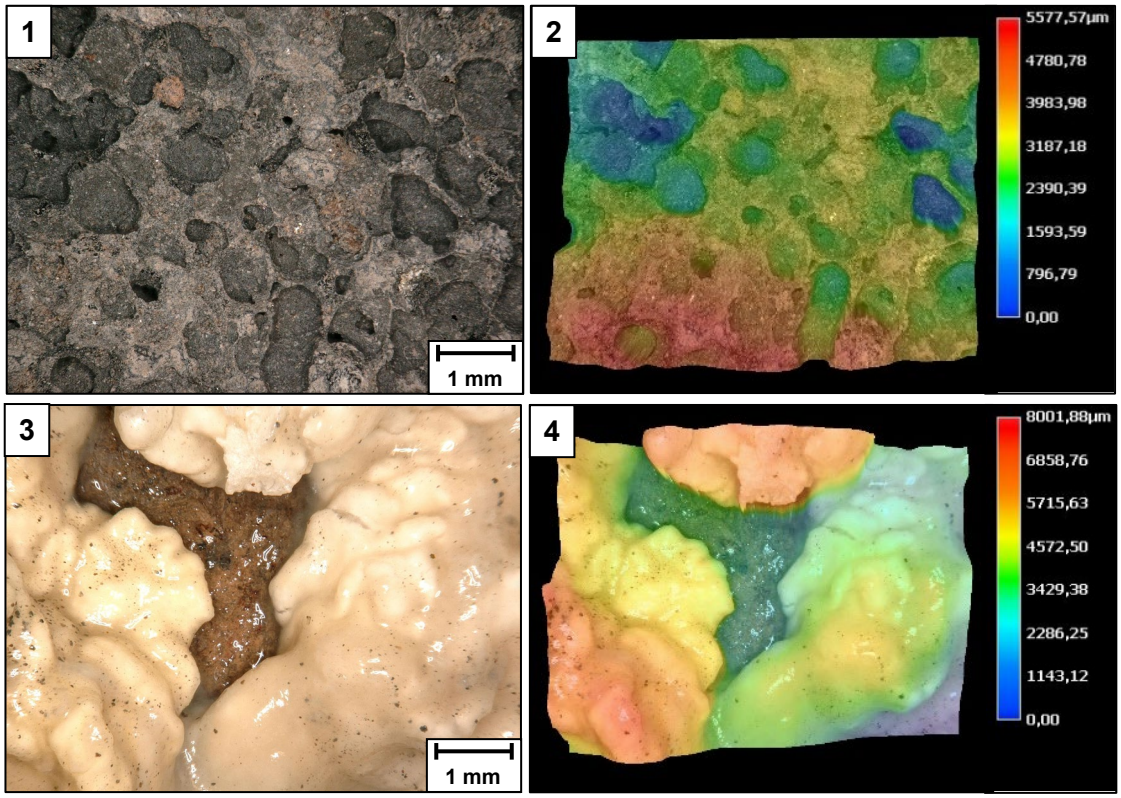

Abb. 42: Lavasteinoberfläche ohne und mit Biofilm. 1 2D-Ansicht ohne Biofilm im trockenen Zustand**. 2** 3D-Ansicht ohne Biofilm im trockenen Zustand. **3** 2D-Ansicht mit Biofilm im feuchten Zustand 8 Tage nach der Inokulation**. 4** 3D-Ansicht mit Biofilm im feuchten Zustand 8 Tage nach der Inokulation**.**

Anhand von Abb. 42 ist klar ersichtlich, dass im natürlichen Zustand vor der Kolonisation zahlreiche Poren innerhalb des Lavagesteins vorhanden sind, die vermutlich die Adhäsion der Mikroorganismen und die nachfolgende Biofilmbildung erleichtern. Im Beispiel weist der Biofilm bereits eine Schichtdicke von mehreren Millimetern auf. Hohe Schichtdicken in Verbindung mit ausgeprägtem Wachstum des Biofilms auf der Lavasteinoberfläche beeinflussen signifikant das Durchströmungsverhalten, was mithilfe des Modellreaktors quantitativ untersucht wurde. Abb. 43 schildert den Zusammenhang zwischen der relativen Massenzunahme des Reaktors und dem relativen Volumenstrom der Zirkulationsflüssigkeit, der die Schüttung aus Lavasteinen und Biofilm passiert. Es handelt sich um ein zusätzliches Experiment, was die Abweichung der Messintervalle bzw. Massenzunahme im Vergleich zu Abb. 40 erklärt.

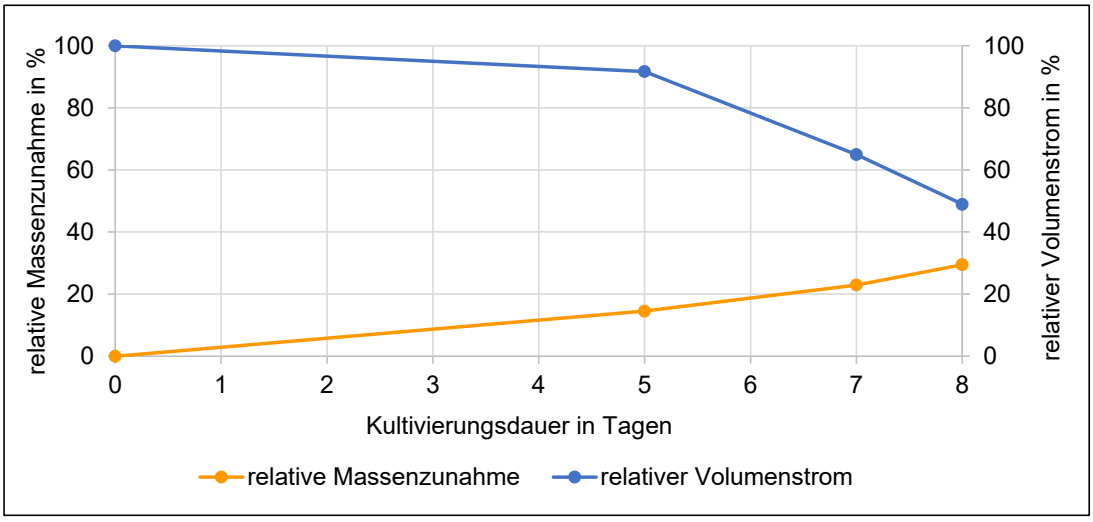

Abb. 43: Verlauf der relativen Massenzunahme des Modellreaktors und des relativen Volumenstroms in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. *n* = 1.

Bei Betrachtung von Abb. 43 wird deutlich, dass die steigende Biofilmmasse zu einer wesentlichen Reduktion des Volumenstroms führt, wobei dieser nach 8 Tagen nur noch rund 50 % des ursprünglichen Werts erreicht. Bei der Durchführung des Experiments trat außerdem ein Flüssigkeitsstau innerhalb der Schüttung auf, da die von oben eingeleitete Flüssigkeitsmenge größer war als das nach unten abfließende Volumen. Wie bereits anhand von Abb. 41 erkennbar, werden die zunächst luftgefüllten Zwischenräume im unteren Bereich des Modellreaktors sukzessive von Biofilm besiedelt, was zu einer erheblichen Reduzierung der Durchflussmenge pro Zeitintervall führt.

Zur Festlegung eines geeigneten Reinigungszyklus kann im industriellen Maßstab die Druckdifferenz innerhalb des Reaktors verwendet werden, die von der Reduzierung des freien Strömungsquerschnittes beeinflusst wird.[257] Um eine vollständige Verblockung des Reaktors zu vermeiden, muss eine regelmäßige Entfernung von überschüssigem Biofilm durchgeführt werden.[257–259] In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Lösung von biofilmbasierten Verblockungen beschrieben, die in physikalische, chemische und biologische Ansätze untergliedert werden können.[257–259] Häufig wird eine Rückspülung unter hohem Wasserdruck eingesetzt, um überschüssige Biomasse auf physikalischem Wege zu entfernen.[257–259]

Die Parameter des Rückspülens variieren in Abhängigkeit der Reaktorauslegung.[257–259] Eine chemische Methode stellt die Begasung der Schüttung mit Ozon dar.[260] Eine Konzentration des Ozons von 5 – 10 mg/m^3 war ausreichend, um übermäßiges Wachstum und eine ungleichmäßige Verteilung der Biomasse in einem Biorieselbettreaktor mit einem Festbettvolumen von 3 L zu verhindern.[260] Erreichte die Ozonkonzentration dagegen einen Wert von mehr als 20 mg/m^3, wurde das mikrobielle Wachstum gehemmt, was zu einer Beeinträchtigung des Schadstoffabbaus führte.[260]

Als biologische Alternative zur Prävention von Verblockungen in Biorieselbettreaktoren können Nematoden dienen. Ihre Anwendung basiert auf der Auflockerung des Biofilms mittels Bewegung und Nahrungsaufnahme. Dadurch wird die Akkumulation von Biomasse innerhalb der Schüttung verringert, was das Verblockungssrisiko minimiert.[257]

Auch im Modellreaktor wurden Nematoden sowohl in der Zirkulationsflüssigkeit als auch im Biofilm beobachtet. Aus der Literatur ist bekannt, dass eukaryotische Organismen einen wichtigen Teil der Biozönose eines Biofilms darstellen.[75, 261, 262] Nematoden üben beispielsweise einen wesentlichen Einfluss auf eine Vielzahl von Prozessen in Biofilmen aus.[263, 264] Durch die Fortbewegung der Fadenwürmer innerhalb des Biofilms entstehen Hohlräume, welche das engmaschige Netzwerk aus EPS und immobilisierten Zellen durchdringen. Die morphologische Veränderung konnte durch eine Erfassung der Oberflächenstruktur mit dem Digitalmikrokop nachgewiesen werden, die exemplarisch in Abb. 44 dargestellt ist.

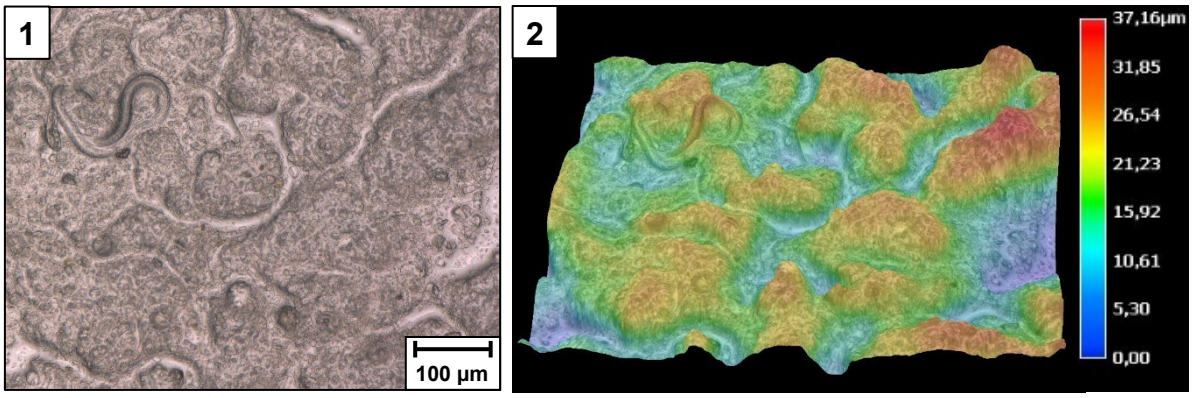

Abb. 44: Oberflächenstruktur von Biofilm mit nematodeninduzierten Vertiefungen unter dem Digitalmikroskop. 1 2D-Aufnahme. **2** 3D-Aufnahme.

Bereits in der 2D-Aufnahme sind die hellen Vertiefungen zu erkennen, die sich von der dunkleren Hintergrundstruktur abheben. Die 3D-Aufnahme erlaubt zusätzlich eine Quantifizierung der Tiefe relativ zum höchsten Punkt des getrockneten Biofilms, der im Beispiel eine Höhe von rund 37 µm besitzt. Bei starkem Bewuchs der Lavasteine können anaerobe Verhältnisse entstehen, da die typische Eindringtiefe der Sauerstoffmoleküle im Biofilm nur 100 – 150 µm beträgt.[265] Dagegen führt die Anwesenheit von Nematoden zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Sauerstoff für Mikroorganismen, die sich in tieferen Schichten befinden, sodass dort eine Förderung aerober Stoffwechselvorgänge stattfindet.[266, 267] Insofern ist die Anwesenheit von Nematoden im Biofilm positiv zu bewerten und trägt vermutlich zu einem ausreichenden Schadstoffabbau bei. Auch bei Biofilmen, die sauerstoffproduzierende Organismen enthalten, wurde ein positiver Effekt nachgewiesen, wenn Nematoden Teil der

Biozönose waren. [268] So wiesen Biofilmproben bei einer Studie mit Diatomeen (Kieselalgen) nach dem Zusatz von Nematoden in einer Konzentration von mehr als 100 Individuen pro cm^2 signifikant höhere Sauerstoffkonzentrationen und -produktionsraten auf.[268]

Der gezielte Einsatz von Nematoden erlaubt auch in Biorieselbettreaktoren einen Abbau des Biofilms. So führte die Anwendung der Nematodenart *Diplogaster nudicapitatus* in einem Reaktor zum Abbau von halogenierten Aromaten zu einer Reduzierung der Biomassenakkumulationsrate um ca. 50 %.[269] Als Gegenmaßnahme konnte der Wirkstoff Ivermectin hinzudosiert werden, wodurch es erneut zu einem Wachstum des Biofilms aufgrund der Hemmung der Nematoden kam.[269] Der Schadstoffabbau wurde durch die Zugabe der Fadenwürmer nicht inhibiert.[269]

Häufig sind Fadenwürmer auch ein natürlicher Bestandteil der Biozönose von Luftreinhaltungssystemen, die auf dem Einsatz von Mikroorganismen basieren.[270] Beispielsweise zeigten Untersuchungen eines Biofilters innerhalb einer kommunalen Kläranlage, dass im Pilotsystem eine mittlere Nematodendichte von 118 Individuen pro mL vorlag.[270] Die Population der Fadenwürmer innerhalb des Biofilms bestand aus den drei Arten *Diploscapter coronatus*, *Diplogasteritus nudicapitatus* und *Paroigolaimella bernensis*.[270]

Nematoden können nicht nur in Anlagen zur biologischen Abluftreinigung eingesetzt werden, sondern auch als Maßnahme gegen Biofouling bei Membranen, das eine mögliche Ursache für die Verblockung von Wasserfiltrationssystemen ist.[269, 271] Dabei kann die Bildung eines unerwünschten Belages auf der Oberfläche reduziert werden, der die Funktion der Membran beeinträchtigt.[271] Klein et al. erforschten den Einfluss der Nematodenart *Plectus aquatilis* auf das Biofouling von hydrophilisierten Polysulfon-Ultrafiltrationsmembranen mit einem Molekulargewichtsgrenzwert (MWCO) von 100 kDa.[271] Nach Zugabe der Fadenwürmer resultierte eine Flusszunahme von 119 – 164 % im Vergleich zum Kontrollsystem.[271] Die Erhöhung des Flusses ist auf eine Änderung der Biofilmstruktur zurückzuführen.[271] Infolge der Nematodenaktivität entsteht aus einer homogenen, kuchenartigen Morphologie eine heterogene, poröse Struktur, außerdem wird die Dicke der Basalschicht signfikant reduziert.[271]

In seltenen Fällen können die Motilität und das Fressverhalten von Fadenwürmern durch Biofilm gehemmt werden.[272] Beispielsweise produziert die pathogene Bakterienspezies *Pseudomonas aeruginosa* ein Exopolysaccharid (Psl), welches das Wanderungsverhalten der Nematodenspezies *Caenorhabditis elegans* reduziert.[272] Die Beeinträchtigung der Bewegung aufgrund der exopolysaccharidhaltigen Matrix des Biofilms führt außerdem zu einer eingeschränkten Nahrungsaufnahme, sodass die Viabilität von *C. elegans* negativ beeinflusst wird.[272]

Zur Charakterisierung des Schadstoffabbaus der Mikroorganismen in Abhängigkeit von unterschiedlich hohen Ammoniumkonzentrationen wurden Messungen in drei Modellreaktoren durchgeführt. Die Ergebnisse sind zusammen mit den Angaben zur Nährstoffzugabe in Abb. 45 veranschaulicht. Die initiale und finale Ammoniumkonzentration sowie die daraus berechnete, absolute bzw. relative Ammoniumabbaurate (Mittelwert ± Standardabweichung) wurden zusätzlich in Tab. 21 aufgeführt. Um für einen optimalen Abbau zu sorgen, wurde bei der Zudosierung der Nährstoffe darauf geachtet, mithilfe der konzentrierten Glucoselösung ein C:N-Verhältnis von mind. 20 zu erreichen. Bei der Betrachtung des C:N-Verhältnisses muss berücksichtigt werden, dass dieses in vereinfachter Form über die Ammonium- und Glucosekonzentration berechnet wurde. Jedoch können in einem Biorieselbettreaktor beispielsweise auch die chemischen Bestandteile des Biofilms (EPS) als C- bzw. N-Quelle dienen.[67, 69] In der Regel erfolgt dies allerdings nur bei akutem Mangel an im Medium gelösten Nährstoffen.[67, 69]

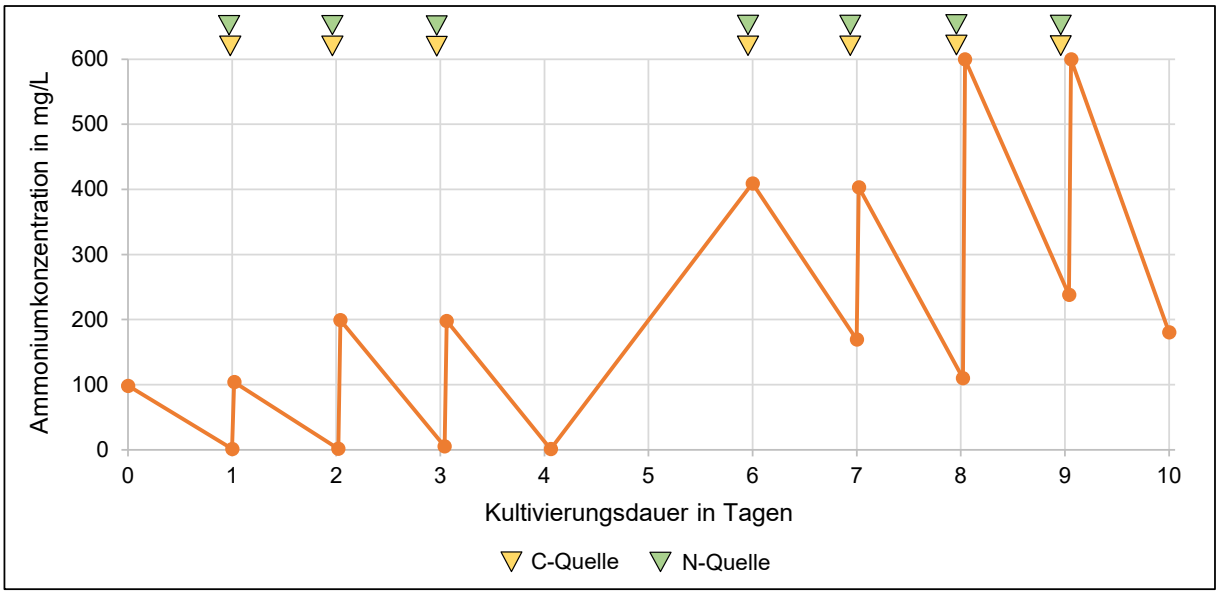

Abb. 45: Verlauf der Ammoniumkonzentration im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium. *n* = 3. Die Standardabweichung ist zu gering, um in der Darstellung erkennbar zu sein. Die konkreten Werte können Tab. 21 entnommen werden.

Tab. 21: Ammoniumabbaurate im Modellreaktor unter Variation der initialen Ammoniumkonzentration im Laufe der Kultivierungsdauer.

Kultivierungsdauer in Tagen	initiale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	finale $\beta(NH_4^+)$ in mg/L	NH_4^+-Abbaurate in mg/(L·h)	NH_4^+-Abbaurate in %
0,00 – 1,00	98,20 ± 1,94	1,37 ± 0,72	4,03 ± 0,08	98,6 ± 0,7
1,02 – 2,02	104,02 ± 2,70	1,49 ± 0,84	4,27 ± 0,09	98,6 ± 0,8
2,04 – 3,04	199,12 ± 1,67	5,18 ± 0,66	8,08 ± 0,06	97,4 ± 0,3
3,06 – 4,06	197,86 ± 2,07	0,94 ± 0,28	8,20 ± 0,09	99,5 ± 0,1
6,00 – 7,00	409,10 ± 6,78	169,24 ± 7,61	9,99 ± 0,04	58,7 ± 1,2
7,02 – 8,02	403,35 ± 5,29	109,83 ± 3,23	12,23 ± 0,16	72,8 ± 0,6
8,04 – 9,04	599,57 ± 3,56	237,94 ± 2,31	15,07 ± 0,05	60,3 ± 0,2
9,06 – 10,06	599,62 ± 3,65	180,49 ± 3,94	17,46 ± 0,05	69,9 ± 0,5

Mithilfe der Werte aus Abb. 45 bzw. Tab. 21 wurde die absolute Ammoniumabbaurate außerdem als Säulendiagramm in Abhängigkeit der initialen Schadstoffkonzentration visualisiert (siehe Abb. 46). Dabei zeigt sich eine Erhöhung der Abbaurate mit zunehmender Ammoniumkonzentration. Dabei muss beachtet werden, dass es sich um ein dynamisches System handelt, da mit sich im Laufe der Betriebsdauer von Biorieselbettreaktoren auch die Ausdehnung des Biofilms in der Schüttung verändert. Diese wurde anhand der relativen Massenzunahme in Abb. 40 messtechnisch erfasst. Mit zunehmender Kultivierungsdauer steigt auch die Masse innerhalb des Reaktors infolge des Biofilmwachstums. Dadurch könnte die gesteigerte absolute Abbaurate erklärt werden, da die höheren initialen Ammoniumkonzentrationen erst im späteren Verlauf der Reaktorbetriebs getestet wurden, als bereits eine größere Menge an Biofilm vorhanden war. Infolge der Erhöhung der Zellzahl aufgrund des mikrobiellen Wachstums erscheint es plausibel, dass auch die Verstoffwechselung von Ammonium als N-Quelle gesteigert wird, solange weitere Voraussetzungen für die Vermehrung der Zellen – beispielsweise eine ausreichende Temperatur und eine bioverfügbare C-Quelle – erfüllt sind.[23]

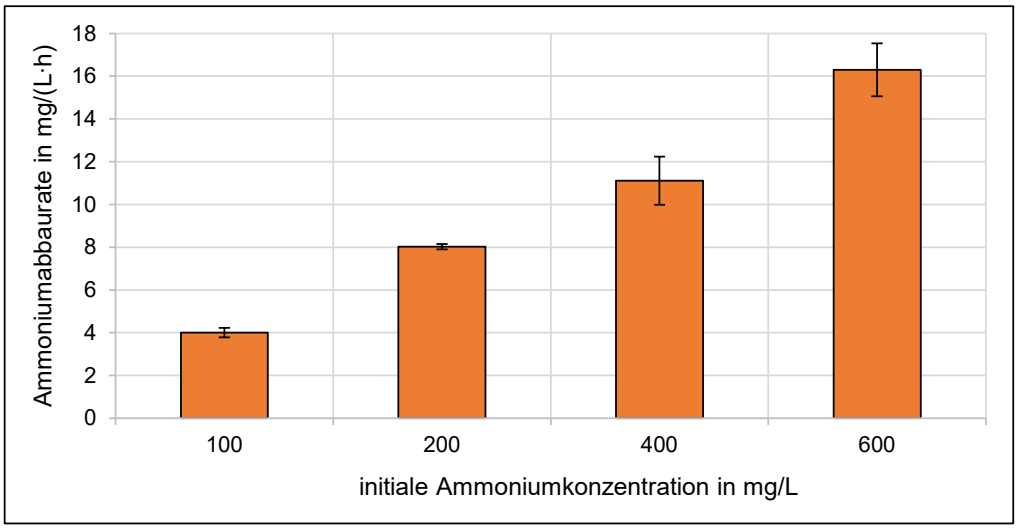

Abb. 46: Verlauf der Ammoniumabbaurate unter Variation der initialen Ammoniumkonzentration im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium. *n* = 3. Das Messintervall, auf das sich die Ammoniumabbaurate bezieht, ist in Tab. 21 angegeben.

Die Zunahme der absoluten Ammoniumabbaurate mit steigender Ammoniumkonzentration wurde auch von anderen Autoren beobachtet.[180, 218, 273, 274] So konnten Zhang et al. nachweisen, dass *Bacillus methylotrophicus* L7 bei $\beta(NH_4^+)$ = 550 mg/L mit 7,69 mg/(L·h) eine deutlich höhere Abbaurate als bei $\beta(NH_4^+)$ = 101 mg/L besitzt, die lediglich 0,59 mg/(L·h) betrug.[180] Yang et al. testeten das heterotrophe Bakterium *Pseudomonas putida*, das eng verwandt mit einem der vier Vertreter des im Modellreaktor eingesetzten Konsortiums ist, bei variierender Ammoniumkonzentration.[274] Die Kultivierung der Spezies bei $\beta(NH_4^+)$ = 257 mg/L führte im Vergleich zum Ausgangswert von $\beta(NH_4^+)$ = 64 mg/L zu einer Steigerung der Ammoniumabbaurate um den Faktor 2,2.[274] Wie bei den Untersuchungen im Rahmen der Dissertation wird auch in der Literatur keine eindeutige lineare Korrelation zwischen der initialen Ammoniumkonzentration und der absoluten Ammoniumabbaurate beschrieben.[274]

Die absolute Ammoniumabbaurate bei Einsatz der Modellreaktoren erreicht im Durchschnitt Werte, die deutlich höher liegen als in der Suspensionskultur. Beispielsweise weist die Vierer-Mischkultur im Modellreaktor bei der geringsten initialen Konzentration bereits eine Abbaurate von 4,03 mg/(L·h) auf, die somit 57 % höher ist als bei der Suspensionskultur, welche bei 2,57 mg/(L·h) unter ähnlichen Bedingungen liegt. Da innerhalb der ersten 24 h der Kultivierung nur marginale Biofilmansätze vorlagen, könnte die gesteigerte Metabolisierung auf den erhöhten Stoffaustausch durch das kontinuierliche Umpumpen der flüssigen Phase zurückgeführt werden. Möglicherweise wird dadurch eine bessere Sauerstoffverfügbarkeit erreicht, die eine aerobe Verstoffwechselung von Ammonium beschleunigt. Mit zunehmender Kultivierungsdauer lässt sich der gesteigerte Abbau durch die tendenziell größere Anzahl an Zellen erklären, die neben der Zirkulationsflüssigkeit vor allem im Biofilm eines Biorieselbettreaktors vorliegen.

Teilweise erfolgt in der Literatur die Untersuchung des Ammoniumabbaus erst nach einer ausreichend langen Anwachsphase des Biofilms.[275] So wird in einer Studie von Jiang et al. ein 20 Tage umfassender Inokulationsbetrieb für einen Biorieselbettreaktor beschrieben, um die Biofilmbildung mit einer Anreicherungskultur aus AOB zu fördern.[275] Nachdem es sich bei AOB um autotrophe Mikroorganismen mit relativ langer Generationszeit handelt, erscheint das verzögerte Biofilmwachstum im Vergleich zu den heterotrophen Spezies aus dem Promotionsprojekt plausibel.[23, 37, 38]

Es ist anzunehmen, dass innerhalb des Modellreaktors nicht nur die zur Inokulation eingesetzten Arten Ammonium verstoffwechseln, sondern auch pro- oder eukaryotische Organismen, die sich als invasive Spezies im System ansiedeln. Bei den Experimenten mit Modellreaktoren gilt es wie bei industriellen Biorieselbettreaktoren zu beachten, dass der Betrieb nicht unter sterilen Bedingungen (monoseptisch) erfolgt.[276–278] Aus diesem Grund können sich Mikroorganismen aus der Umgebung oder den Trägermaterialien ansiedeln, die zu einer Veränderung der Biozönose führen.[276, 277] Die Populationsdynamik des Systems wurde im Rahmen der Dissertation nicht näher analysiert, könnte aber künftig wie bei anderen Studien mithilfe einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder einer 16S/18S-rDNA-Analyse erforscht werden.[23, 276, 279, 280]

Auch im Vergleich zu den bereits aufgeführten Literaturwerten (siehe Tab. 12, Tab. 15 und Tab. 19 – 20) erscheint die absolute Ammoniumabbaurate, die mithilfe der Modellreaktoren ermittelt wurde, relativ hoch. Durch Recherche weiterer Publikationen, die sich vor allem der Untersuchung hoher initialer Ammoniumkonzentrationen widmen, kann geschlussfolgert werden, dass andere Autoren teilweise eine noch höhere Ammoniumabbaurate als bei den Modellreaktorexperimenten feststellten.[274, 281] So konnten Yang et al. nachweisen, dass *Pseudomonas putida* eine absolute Ammoniumabbaurate von 25,88 – 55,86 mg/(L·h) besitzt, wenn zu Beginn der Kultivierung eine Ammoniumkonzentration von 257 – 1.286 mg/L vorlag.[274] Joo et al. ermittelten bei Experimenten mit *Alcaligenes faecalis* eine maximale Ammoniumabbaurate von 37,29 mg/(L·h) bei $\beta(NH_4^+)$ = 1.543 mg/L.[281]

Auch eine Verringerung der relativen Ammoniumabbaurate bei Erhöhung der initialen Schadstoffkonzentration ist in der Literatur beschrieben.[218, 274] Beispielsweise zeigte *Pseudomonas putida* bei $\beta(NH_4^+)$ = 257 mg/L eine relative Ammoniumabbaurate von 99,83 %, während eine Steigerung der initialen Konzentration auf $\beta(NH_4^+)$ = 643 mg/L zu einer reduzierten Abbaukapazität von 66,95 % führte.[274] Auch der Pilz *Paecilomyces variotii* weist diese Tendenz auf, so betrug bei $\beta(NH_4^+)$ = 141 mg/L die relative Ammoniumabbaurate 100 %, bei $\beta(NH_4^+)$ = 571 mg/L dagegen 68 %.[218] Eine ähnliche Größenordnung der Abbaulimitierung wurde auch bei den eigenen Untersuchungen in einem vergleichbaren Referenzzeitraum festgestellt.[218, 274] Bei der Interpretation der Literaturwerte, die sich auf *Pseudomonas putida* und *Paecilomyces variotii* beziehen, muss berücksichtigt werden, dass die Mikroorganismen nicht in Form von Biofilm in einem Biorieselbettreaktor kultiviert wurden, sondern als Suspensionskultur in Erlenmeyerkolben.[274]

Bei Betrachtung von Tab. 21 und Abb. 46 wird deutlich, dass das mikrobielle Konsortium im Biorieselbettreaktor unterschiedlich hohe Ammoniumkonzentrationen toleriert und abbaut. Vor allem Fluktuationen der Ammoniumkonzentration sind infolge variierender Ammoniakmengen in der Abluft von Geflügelställen bei der industriellen Anwendung zu erwarten und beeinflussen den Schadstoffabbau.[21, 120] Die Toleranz gegenüber erhöhten Ammoniumkonzentrationen (400 – 600 mg/L) ist positiv zu bewerten, da diese grundsätzlich nicht bei allen Mikroorganismen vertreten ist. Beispielsweise toleriert das Bakterium *Providencia rettgeri* YL, das zum Abbau von Ammonium über den HN-AD-Weg in der Lage ist, maximal einen Wert von $\beta(NH_4^+)$ = 386 mg/L.[282] Jedoch existieren auch Bakterienarten, die in Anwesenheit einer noch höheren Ammoniumkonzentration wachsen können, als im Rahmen der Dissertation getestet wurde.[198, 281] Beispielsweise isolierten Lei et al. aus ammoniumkontaminiertem Deponiesickerwasser den Stamm *Zobellella taiwanensis* DN-7, der bis zu $\beta(NH_4^+)$ = 2.571 mg/L toleriert und zudem biologisch abbaut.[198] Dabei wurde eine maximale Ammoniumabbaurate von 22,2 mg/(L·h) erzielt, während der Zeitraum für die vollständige Verstoffwechselung der höchsten Schadstoffkonzentration 9 Tage betrug.[198]

Abb. 47 zeigt die Entwicklung des pH-Wertes der Zirkulationsflüssigkeit im Modellreaktor.

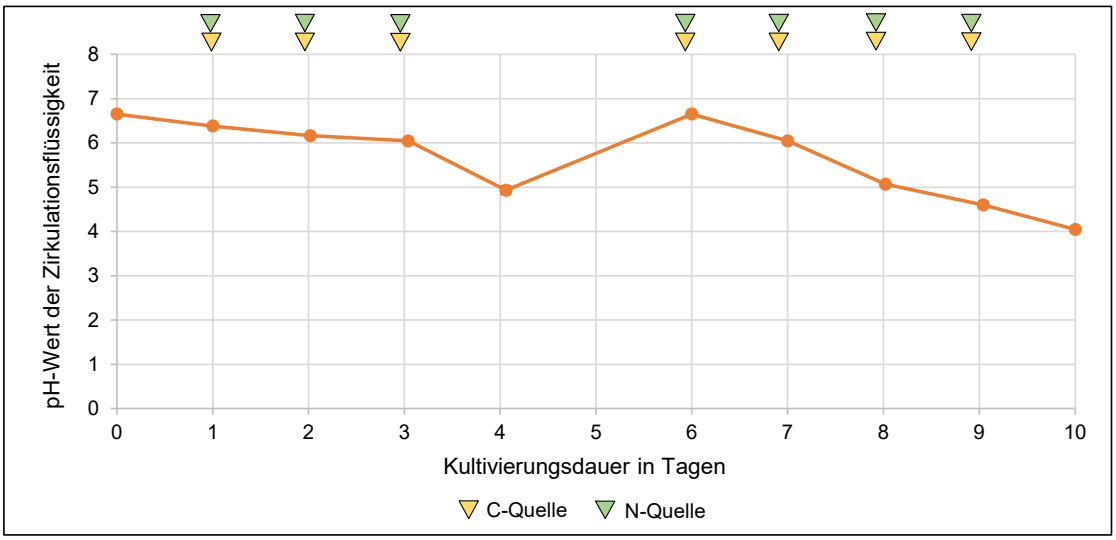

Abb. 47: Verlauf des pH-Wertes der Zirkulationsflüssigkeit im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium. *n* = 3. Die Standardabweichung ist zu gering, um in der Darstellung erkennbar zu sein.

In den ersten 48 h nach der Inokulation ist eine Abnahme des pH-Wertes zu beobachten, die durch die aerobe Verstoffwechselung von Glucose erklärt werden kann.[25] Bei vollständiger Metabolisierung entsteht dabei CO_2, das im flüssigen Medium in gelöster Form vorliegt und mit Kohlensäure (H_2CO_3) in einem chemischen Gleichgewicht steht.[25] Durch Deprotonierung kann im Anschluss Hydrogencarbonat (HCO_3^-) gebildet werden, sodass eine Reduzierung des pH-Wertes die Folge ist.[25]

Auch die Produktion organischer Säuren durch das mikrobielle Konsortium im Bioriesel-bettreaktor kann zu einer Abnahme des pH-Wertes führen. Beispielsweise ist *Yarrowia lipolytica* in der Lage, Glucose zu Citronensäure zu verstoffwechseln.[283] Allerdings ist fraglich, ob dieser Stoffwechselweg unter den experimentellen Bedingungen ablaufen konnte, da die Produktion von Citronensäure nur bei einer Limitierung von anorganischen Nährstoffen wie Stickstoff, Phosphor, Schwefel oder Magnesium und gleichzeitigem Überschuss der C-Quelle stattfindet.[283]

Der Anstieg des pH-Wertes ist durch die Zugabe von neuem Nährmedium zu erklären. Im Anschluss nimmt der pH-Wert erneut ab, wobei geringere Werte erreicht werden als in den ersten 4 Tagen des Experimentes. Dies könnte durch die höhere Menge an hinzudosierter Glucose erklärt werden, die aufgrund der gesteigerten Ammoniumkonzentration für die Beibehaltung von C:N = 20 erforderlich war. Prinzipiell ist bei einer Zunahme der Glucose-konzentration auch mit einem Anstieg von sauren Stoffwechselprodukten zu rechnen, solange die Zellen metabolisch aktiv sind.[23, 25] Der alkalische Einfluss der Lavasteine scheint unter den experimentellen Bedingungen nicht zu dominieren, da vermutlich die Säureproduktion der Mikroorganismen mehr Protonen freisetzt als von basischen Solubilisierungsprodukten der mineralischen Trägermaterialien aufgenommen werden können.

4.3 Test der Mikroorganismen im Pilotreaktorsystem

Im Folgenden wird die Inbetriebnahme des Pilotreaktors erläutert, wobei ein Vergleich mit dem Modellreaktor erfolgt, um schwerpunktmäßig das Upscaling zu beurteilen. Beide Biorieselbettreaktoren wurden im gleichen Labor unter ähnlichen Bedingungen betrieben, wodurch eine ausreichende Vergleichbarkeit der zwei Kultivierungsmaßstäbe gegeben ist. Abb. 48 zeigt den Verlauf der Masse der beiden Reaktorformate. Die primäre und sekundäre y-Achse wurden an die Startmasse der Lavasteine innerhalb des jeweiligen Reaktors angepasst, sodass näherungsweise ein Verhältnis von 1:100 vorliegt, das gleichzeitig der Größenordnung des Upscalings entspricht. Insgesamt besitzen beide Massen einen relativ ähnlichen zeitlichen Verlauf. Zunächst ist ein Anstieg der Masse zu beobachten, der im Falle des Pilotreaktors bis Tag 10 andauert und sich beim Modellreaktor bis Tag 12 geringfügig länger fortsetzt.

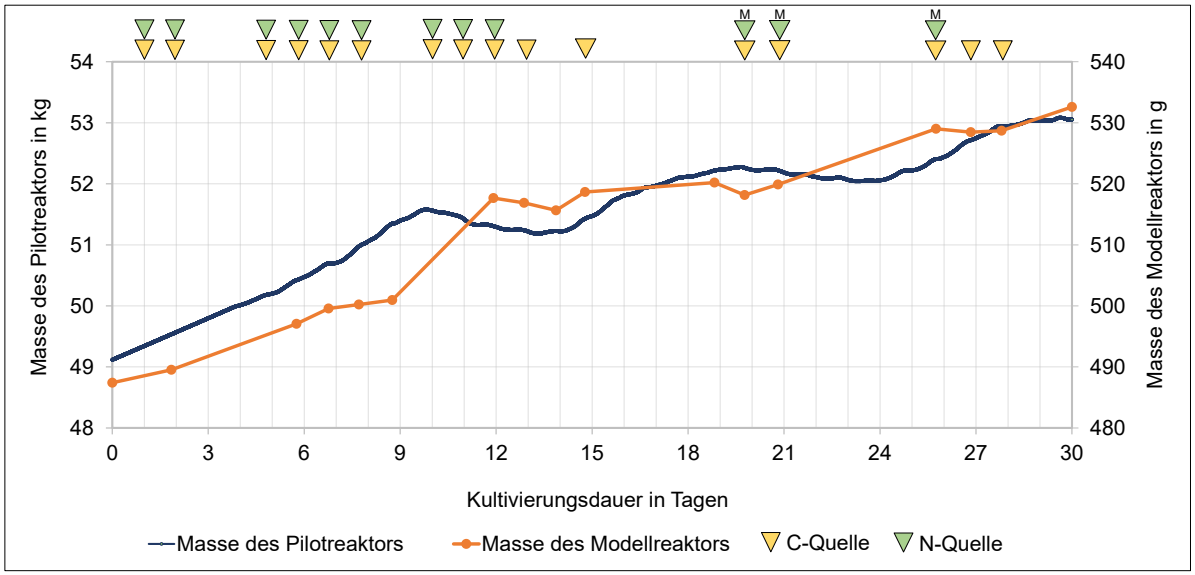

Abb. 48: Verlauf der Masse des Pilotreaktors und des Modellreaktors unter ähnlichen Betriebsbedingungen. Eine abweichende Zugabe der N-Quelle für den Modellreaktor ist durch ein M über dem grünen Dreieck gekennzeichnet. Die y-Achsen wurden an die jeweilige Startmasse im feuchten Zustand angepasst. *n* = 1.

Die Massenzunahme lässt sich durch die Bildung von Biofilm auf der Oberfläche der porösen Trägermaterialien erklären, die exemparisch in Abb. 49 anhand von drei Lavasteinen aus dem Pilotreaktor dokumentiert ist. Der Biofilm zeichnet sich durch eine gelbe bis orange Farbe aus und ist heterogen auf der Oberfläche der Füllkörper verteilt, sodass Bereiche mit geringer und hoher Schichtdicke vorliegen.

Abb. 49: Lavasteine mit Biofilm aus dem Pilotreaktor. 1 Beispiel 1. **2** Beispiel 2. **3** Beispiel 3. Die Entnahme erfolgte nach einer Kultivierungsdauer von 30 Tagen.

Eine ausgeprägte Biofilmbildung trat im Pilotreaktor primär im Innenraum der Schüttung unterhalb der obersten Schicht der Lavasteine auf, der über die zentrale Berieselung kontinuierlich mit der Zirkulationsflüssigkeit versorgt wurde. Die beschriebene Verteilung lässt sich durch eine reduzierte Strömungsgeschwindigkeit mit zunehmender Entfernung von der Austrittsöffnung des Flüssigkeitsstrahl erklären, die gemäß der Literatur zu einer verbesserten Adhäsion von Mikroorganismen führt und somit das Biofilmwachstum fördert.[284–286] Dies deckt sich mit Beobachtungen aus dem Modellreaktor. Auch hier wächst der Biofilm bevorzugt in den tieferen Regionen der Schüttung. Dies lässt sich anhand von Aufnahmen der Füllkörperflasche eines Modellreaktors bestätigen, die in Abb. 50 zusammengefasst sind. Vor allem in der Seitenansicht ist gut erkennbar, dass erst rund 3 cm unter der obersten Lavasteinschicht ein bräunlicher Biofilm auftritt, der optische Ähnlichkeit zum Biofilm aus dem Modellreaktor besitzt. Auch auf der Unterseite der Schüttung ist eine Akkumulation von Biomasse zu beobachten. An dieser Stelle ist ebenfalls eine geringe Strömungsgeschwindigkeit vorhanden, da die Zirkulationsflüssigkeit nach der Passage der restlichen Schüttung langsam an den untersten Lavasteinen vorbei fließt. Im laufenden Betrieb ist dies durch Tropfen zu erkennen, die sich von der Unterseite der Schüttung lösen und in den Flüssigkeitsbehälter gelangen.

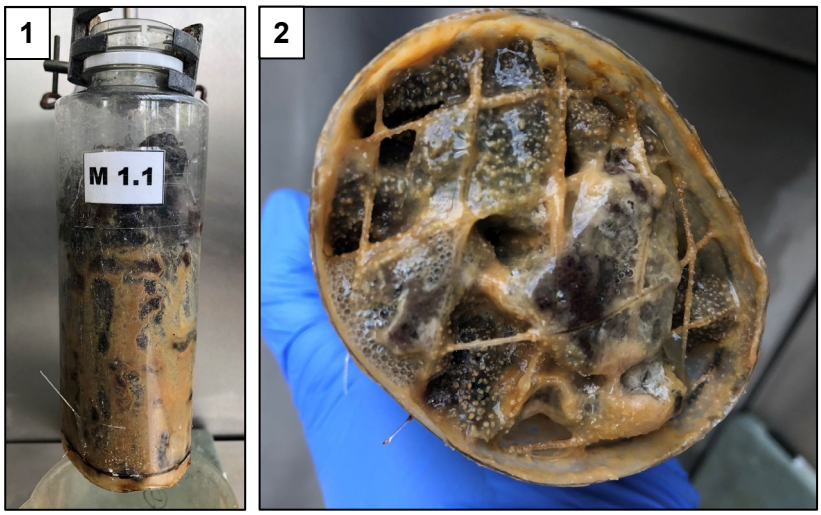

Abb. 50: Wachstum von Biofilm im Modellreaktor. 1 Seitenansicht der Füllkörperflasche mit der Schüttung. **2** Unterseite der Füllkörperflasche mit der Schüttung.

Bei Betrachtung des weiteren Verlaufs der Reaktormassen anhand von Abb. 48 fällt auf, dass von Tag 12 bis Tag 20 nur geringfügige Fluktuationen auftreten. Da ab Tag 14 aufgrund der ausbleibenden Nährstoffzugabe eine Hungerphase simuliert wurde, ist grundsätzlich mit einer Massenabnahme infolge des Biofilmabbaus zu rechnen. Die Messergebnisse zeigen jedoch, dass sich der Biofilm innerhalb beider Biorieselbettreaktoren relativ stabil verhält, da keine deutliche Verringerung der Masse resultiert. Ab Tag 20 tritt aufgrund der Fortsetzung der Nährstoffzugabe erneut eine geringfügige Steigerung der Masse auf. Eine Verblockung der Schüttung durch den gebildeten Biofilm wurde während des 30-tägigen Betriebs der Reaktoren nicht beobachtet. Wie bereits in Kap. 4.2 erwähnt, quantifizierten auch andere Autoren eine Massenzunahme bei der Kultivierung von Mikroorganismen auf Trägermaterialien, wobei je nach Versuchsbedingungen Abweichungen auftreten.[250–252]

Neben der Masse, die wesentlich durch die Biofilmbildung beeinflusst wird, wurde auch der pH-Wert der Zirkulationsflüssigkeit kontinuierlich beim Pilotreaktor und diskontinuierlich beim Modellreaktor messtechnisch erfasst. Die Ergebnisse sind in Abb. 51 veranschaulicht. Bei Betrachtung des Pilotreaktors ist klar ersichtlich, dass die Zugabe der N-Quelle (Ammoniaklösung) zu einem rapiden Anstieg des pH-Werts führt. Dies lässt sich durch den stark basischen pH-Wert der Ammoniaklösung erklären. Dabei werden kurzzeitig Werte erreicht, bei denen aufgrund des chemischen Gleichgewichts der beiden Stickstoffspezies ein relativ hoher Ammoniakanteil vorliegt. Beispielsweise existieren bei einem pH-Wert von 8,7, der im Pilotreaktor nach der zweiten Nährstoffzugabe kurz vor Tag 2 zu beobachten ist, 16,63 % der Stoffmenge von Ammonium und Ammoniak in Form von Ammoniak unter Annahme einer Temperatur von 20 °C.[30] Dadurch wird das Risiko erhöht, dass ein gewisser Teil der hinzudosierten N-Quelle in die Gasphase übergeht und aus dem System entweicht. Durch die Umwälzung der Zirkulationsflüssigkeit verteilt sich die hinzudosierte Ammoniaklösung im gesamten Biorieselbettreaktor, sodass ein Verdünnungseffekt resultiert, der nach der rapiden Zunahme wieder zu einer Reduzierung des pH-Wertes führt. Das physikalische Einlösen des Ammoniaks ermöglicht den biologischen Abbau durch die Mikroorganismen, wobei der pH-Wert aufgrund der gleichzeitigen Metabolisierung von Glucose weiter abnimmt. Auffällig ist, dass in den ersten Tagen nach der Inokulation (Tag 0) die Verringerung des pH-Werts schneller erfolgt und niedrigere Werte erreicht als im späteren Verlauf. Beispielsweise reduziert sich der pH-Wert an Tag 1/2 von 7,2 auf 3,6 innerhalb von 12 h, während ab Tag 9 der pH-Wert für die Verringerung von 8,5 auf 3,7 insgesamt 40 h (bis Tag 11/12) benötigt. Beim Modellreaktor muss beachtet werden, dass die Auflösung der Kurve aufgrund der manuellen diskontinuierlichen Messung verringert ist. Dadurch wird die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des Pilotreaktors eingeschränkt, zumal der pH-Wert im Gegensatz zur Masse eine Messgröße ist, die sich unter den Betriebsbedingungen der Biorieselbettreaktoren bereits in kurzen Zeitintervallen von Minuten bis Stunden deutlich ändern kann.

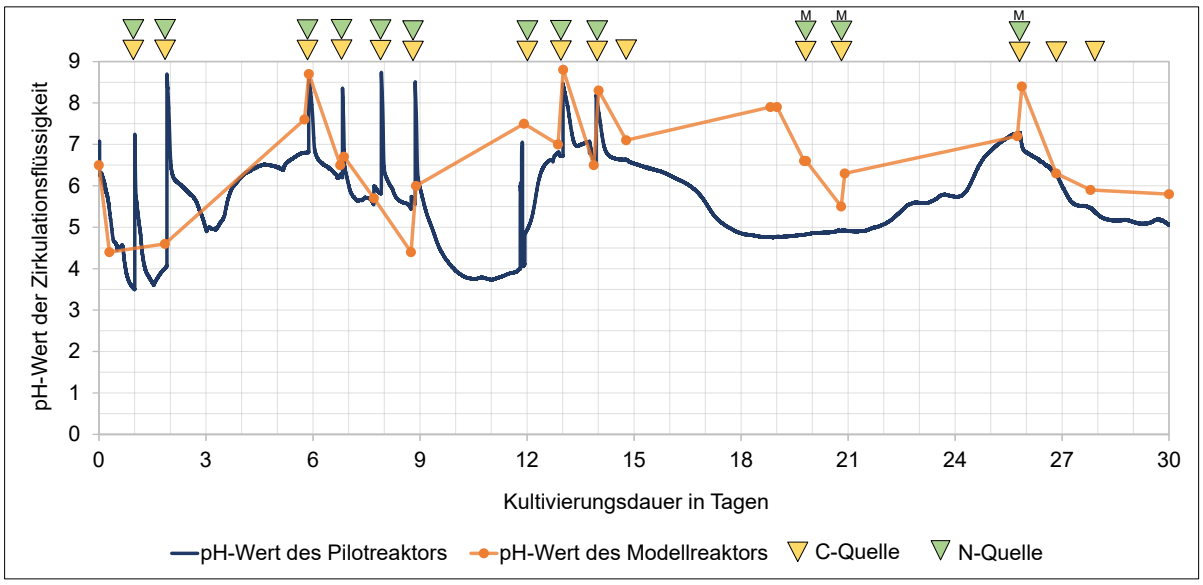

Abb. 51: Verlauf des pH-Werts der Zirkulationsflüssigkeit des Pilotreaktors und des Modellreaktors unter ähnlichen Betriebsbedingungen. Eine abweichende Zugabe der N-Quelle für den Modellreaktor ist durch ein M über dem grünen Dreieck gekennzeichnet. *n* = 1.

Der Ammoniumabbau wurde exemplarisch während der ersten 9 Tage der Kultivierung untersucht, um den Pilotreaktor mit dem Modellreaktor zu vergleichen. Abb. 52 zeigt den Verlauf der Ammoniumkonzentration in der Zirkulationsflüssigkeit der beiden Systeme. Aus den Diagrammen geht hervor, dass der Pilotreaktor einen sehr ähnlichen Trend aufweist wie der Modellreaktor. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass Biorieselbettreaktoren erheblichen Variationen unterliegen, beispielsweise hinsichtlich der Biozönose, wie bereits beim ersten Experiment mit den Modellreaktoren diskutiert wurde. Solange der Ammoniumabbau dadurch nicht beeinträchtigt wird, ist dies nicht als negativ zu bewerten. Grundsätzlich empfiehlt sich eine möglichst umfassende Überwachung des Reaktorsystems unter Einsatz adäquater Mess- und Regelungstechnik, um einer Beeinträchtigung des Schadstoffabbaus rechtzeitig entgegenzuwirken. Dies betrifft beispielsweise den pH-Wert, der nicht im alkalischen Bereich liegen sollte, um Stickstoffverluste durch das Ausgasen von Ammoniak zu vermeiden. Da der pH-Wert in den ersten 9 Tagen der Kultivierung beider Reaktorsysteme teilweise im Basischen liegt, sind die in Tab. 22 aufgeführten Ammoniumabbauraten möglicherweise fehlerbehaftet.

Zudem wurde die Glucosekonzentration nicht explizit gemessen, deshalb können keine Aussagen zum C:N-Verhältnis getroffen werden. Auch wenn die Daten gemäß Abb. 52 für eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem 1-L-Maßstab in den 100-L-Maßstab sprechen, muss beachtet werden, dass es sich nur um eine relativ geringe Anzahl an Messpunkten in einem begrenzten Zeitintervall handelt. Es sind noch weitere Experimente erforderlich, um die Langzeitstabilität des Biorieselbettreaktors hinsichtlich des Ammoniumabbaus zu erforschen.

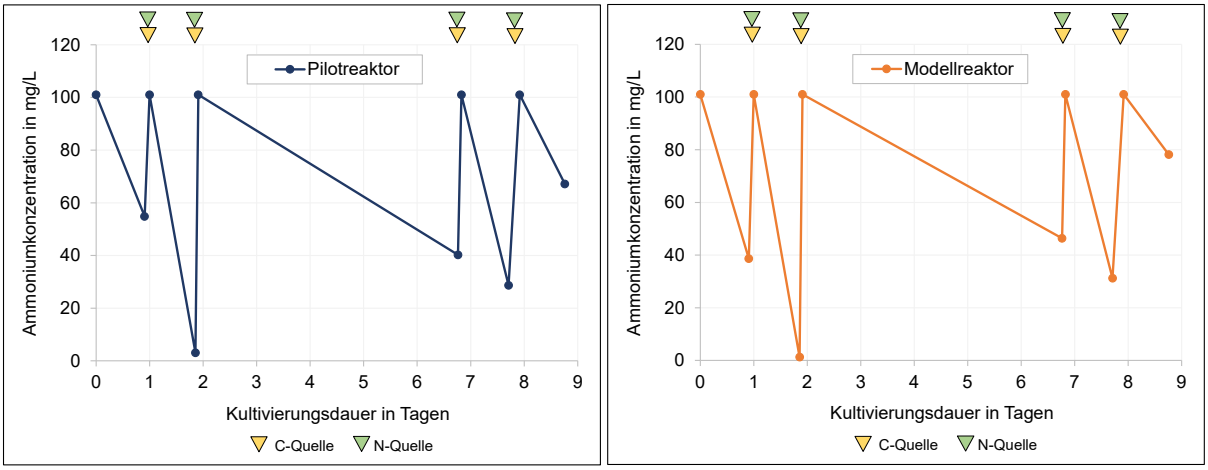

Abb. 52: Verlauf der Ammoniumkonzentration in der Zirkulationsflüssigkeit des Pilotreaktors und des Modellreaktors unter ähnlichen Betriebsbedingungen. *n* = 1.

Tab. 22: Vergleich der Ammoniumabbaurate von Pilotreaktor und Modellreaktor. *n* = 1.

Zeitintervall (Kultivierungsdauer) in Tagen	Pilotreaktor		Modellreaktor	
	NH_4^+-Abbaurate in mg/(L·h)	NH_4^+-Abbaurate in %	NH_4^+-Abbaurate in mg/(L·h)	NH_4^+-Abbaurate in %
0,00 – 0,91	2,12	45,7	2,87	61,8
1,00 – 1,86	4,76	97,0	4,85	98,8
1,91 – 6,76	0,52	60,2	0,47	54,1
6,83 – 7,71	3,42	71,6	3.30	69,1
7,92 – 8,76	1,67	33,6	1,13	22,7

Neben den bereits anhand von Abb. 29 bei der Suspensionskultur diskutierten Parametern kann der Ammoniumabbau auch noch durch weitere Faktoren beeinflusst werden. Beispielsweise konnten Chen et al. zeigen, dass sich ein statisches Magnetfeld positiv auf den Abbau von Ammonium in einem Rührkesselreaktor mit einem effektiven Volumen von 4 L unter Einsatz eines mikrobiellen Konsortiums aus Belebtschlamm auswirkt.[287] Bei einer magnetischen Flussdichte von 50 mT wurde die Entfernung des gesamten anorganischen Stickstoffs um den Faktor 1,47 im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Magnetfeld erhöht.[287] Dieser Befund wird auf eine Veränderung der Mikroorganismenpopulation zurückgeführt, wobei in Anwesenheit des Magnetfeldes HN-AD-Bakterien (*Paracoccus* spp.) und denitrifizierende Pilze (*Candida* spp.) dominierten, die eine synergistische Interaktion eingehen.[287] Die Wechselwirkung beruht auf der Bereitstellung von organischem Kohlenstoff durch die Bakterien in Form von Exopolysacchariden, die von den Pilzen als Substrat genutzt werden.[287] Gleichzeitig dient sowohl für *Paracoccus* spp. als auch *Candida* spp. Ammonium als N-Quelle.[287] Andere Autoren beobachteten ebenfalls eine Steigerung des mikrobiellen Wachstums und aerober Abbauprozesse bei einer magnetischen Flussdichte von 10 – 500 mT.[288–295] Gemäß der Literatur können auch bei Biorieselbettreaktoren Magnetfelder eingesetzt werden, wobei sich der Nachweis eines optimierten Schadstoffabbaus bisher auf das Lösemittel Trichlorethen beschränkt.[293–295] Als Ursache für den positiven Effekt wird erneut eine Veränderung der Mikroorganismenpopulation genannt.[293–295] Insbesondere das Wachstum der Pilze wird maßgeblich durch das Magnetfeld beeinflusst.[294, 295] Auch Lavasteine wurden erfolgreich als Trägermaterial für den schadstoffabbauenden Biofilm innerhalb eines Biorieselbettreaktors bei einer magnetischen Flussdichte von 30 – 130 mT getestet.[293]

In Zukunft könnte auch beim Konsortium aus Bakterien und Pilzen, das im Rahmen der Dissertation ausgewählt wurde, der Einfluss eines statischen Magnetfeldes getestet werden, um eine weitere Steigerung des Ammoniumabbaus zu ermöglichen. Da die Implementierung von Permanentmagneten lediglich die Investitionskosten erhöht, jedoch nicht die Betriebskosten, handelt es sich grundsätzlich um eine interessante Optimierungsmöglichkeit für biologische Abluftreinigungsanlagen. Allerdings muss die wirtschaftliche Rentabilität und Kompatibilität mit den Komponenten der Anlage kritisch geprüft werden, um beispielsweise technische Risiken aufgrund der lokalen Wirkung des Magnetfeldes auf Elektromotoren von Pumpen oder stromführende Leitungen zu minimieren.[296, 297] Außerdem muss eine Gefährdung des Personals durch die eingesetzten Permanentmagnete ausgeschlossen werden.[298]

Zur Einordnung der Ammoniumabbauraten des Modell- und Pilotreaktorsystems wurden Referenzwerte recherchiert, die sich auf Biorieselbettreaktoren beziehen und in Tab. 23 zusammengefasst sind.[21, 300–325] Beim Vergleich mit den Ergebnissen der Dissertation muss beachtet werden, dass die zitierten Arbeiten den Abbau basierend auf der Ammoniakkonzentration bewerten, die in der eingeleiteten Abluft ($c_\alpha(\mathrm{NH_3})$, in ppm) und der aus dem Reaktor austretenden Reinluft ($c_\omega(\mathrm{NH_3})$, in ppm) gemessen wurde. Aus den beiden Messgrößen lässt sich via Gl. 26 der Abscheidegrad (Removal Efficiency, RE, in %) ermitteln.[299]

$$RE = \frac{c_\alpha(\mathrm{NH_3}) - c_\omega(\mathrm{NH_3})}{c_\alpha(\mathrm{NH_3})} \cdot 100\ \% \qquad \text{(Gl. 26)}$$

Unter der Berücksichtigung des Gasvolumenstroms ($\dot{V}$, in m³/h), des Leerbettvolumens (V_L, in m³) und der Ammoniakkonzentrationsdifferenz kann mithilfe von Gl. 27 zudem die Eliminationskapazität (Elimination Capacity, EC, in g/(m³·h)) berechnet werden.[299]

$$EC = \frac{\dot{V}}{V_L} \cdot (c_\alpha(\mathrm{NH_3}) - c_\omega(\mathrm{NH_3})) \qquad \text{(Gl. 27)}$$

Beim Modell- und Pilotreaktorsystem erfolgte die Bestimmung der Ammoniumkonzentration ausschließlich in der Zirkulationsflüssigkeit, Messungen in der Gasphase wurden nicht durchgeführt. Zudem wurde Ammoniak bzw. Ammonium in gelöster Form hinzugegeben, es erfolgte keine Einleitung des Schadstoffs über einen Gasstrom. Auch wenn die Vergleichbarkeit mit der Literatur durch die beschriebenen Unterschiede in der Methodik eingeschränkt wird, kann mithilfe von Tab. 23 eine grundsätzliche Gegenüberstellung mit Biorieselbettreaktoren zum Abbau von Ammoniak erfolgen, die zur besseren Übersicht aufsteigend nach dem Festbettvolumen geordnet wurden.[21, 300–325]

Tab. 23: Referenzwerte zur Charakterisierung von Biorieselbettreaktoren zum Abbau von Ammoniak.

Inokulum	Trägermaterial	Festbettvolumen in L	NH_3-Konz. der Abluft in ppm	NH_3-Eliminationskapazität in g/(m³·h)	NH_3-Abscheidegrad in %	Betriebsdauer in Tagen	Quelle
Kultur aus Bioreaktor für Abbau von Phenol und Formaldehyd	Polyurethanschaumwürfel (Volumen: 1 cm³)	0,6	100 – 600	4 – 15	60 – 100	162	[300]
Anreicherungskultur aus Belebtschlamm	Kohlenschlacke (Korngröße: 2 – 5 mm)	0,67	250 – 450	78 – 115	80 – 100	283	[301]
Nitrosomonas europaea ATCC 19718	Polyurethanschaumwürfel (Volumen: 1 cm³)	1	98 – 322	k. A.	max. 100	50	[302]
Belebtschlamm	Raschig-Ringe aus Keramik	1,6	3 – 50	3,7 – 27,4	19 – 100	500	[303]
Anreicherungskultur aus Belebtschlamm	Pappel- und Kiefernholzspäne	2,9	39,1 – 57,9	k. A.	max. 100	100	[304]
Nitrifizierender Schlamm	Polyurethanschaumwürfel (Volumen: 8 cm³)	3,2	100 – 1400	10 – 124	78 – 100	232	[305]
Belebtschlamm	Rinderknochen-Verbundkeramikkugeln (Durchmesser: 4 mm)	4,7	270 – 700	51 – 120	90 – 100	46	[306]
Acinetobacter, Citrobacter, Brevundimonas, Pseudomonas	Kunststoffhohlkugeln (Durchmesser: 42 mm)	6	10 – 84	1,0 – 6,2	65 – 100	121	[307]
Nitrifizierendes Konsortium	Aktivkohle mit erschöpfter Adsorptionskapazität	6,4	20 – 400	67 – 131	98 – 100	30	[308]
Belebtschlamm	Raschig-Ringe aus Keramik, Gießereisand	6,8	11 – 70	0,1 – 4	40 – 100	60	[309]
Belebtschlamm	Polyethylenfüllkörper	7,8	83 – 115	3 – 4	68 – 95	31	[310]
Anreicherungskultur aus Rindermist	resistente Fasern (Korngröße: 30 – 40 mm)	8	4 – 1222	8 – 78	70 – 100	47	[311]

Inokulum	Trägermaterial	Festbett-volumen in L	NH_3-Konz. der Abluft in ppm	NH_3-Elimina-tionskapazität in g/(m^3·h)	NH_3-Abscheide-grad in %	Betriebs-dauer in Tagen	Quelle
autochthone Mikro-flora (keine gezielte Inokulation)	Kiefernrinde, Kompositfüllkörper	8,12	120 – 900	10 – 40	70 – 100	46	[312]
Arthrobacter oxydans CH8, *Pseudomonas putida* CH11	Aktivkohlegranulat (Durchmesser: 4,5 mm)	9,05	80 – 120	0,2 – 9,7	50 – 100	140	[313]
Anreicherungskultur aus Belebtschlamm	Kohleschlacke (Korngröße: 7 – 15 mm)	10	120 – 800	2,5 – 9,5	90 – 100	61	[314]
Paracoccus denitrificans HY-1	Bambusholzkohle (Korngröße: 10 – 30 mm)	13,5	207 – 813	8 – 80	88 – 100	108	[315]
Belebtschlamm	Polyurethan-schaumwürfel (Volumen: 64 cm^3)	13,6	162 – 404	3 – 50	48 – 100	392	[316]
Anreicherungskultur aus Belebtschlamm	polyedrische Kugelfüllkörper	21,2	0 – 500	1 – 38	20 – 100	76	[317]
Hühnerexkremente	Steinwolle	22	200 – 750	8,6 – 27	17 – 100	79	[318]
Belebtschlamm	Polypropylenfüll-körper	84	15	k. A.	8 – 90	48	[21]
Bacillus subtilis N1, *Bacillus cereus* S5, *Schizophyllum commune* NO.7	Polyurethan-schaum	254	12 – 129	k. A.	92 – 100	15	[319]
autochthone Mikro-flora (keine gezielte Inokulation)	Muschelschalen (*Mytilus edulis*, max. 30 mm)	430	25 – 60	k. A.	40 – 100	60	[320]
Belebtschlamm	Polypropylenringe (Durchmesser: 35 mm)	500	56 – 112	2,1 – 12,9	68 – 97	60	[321]
Kosakonia oryzae FB2-3, *Acinetobacter baumannii* L5-4	Bambusholzkohle (Korngröße: 30 – 50 mm)	750	9,8 – 328,6	0,5 – 136	83 – 100	84	[322]
Belebtschlamm	Vulkangestein (Korngröße: 10 – 22 mm)	1.125	359 – 2010	k. A.	15 – 100	102	[323]
Acinetobacter, Citrobacter, Brevundimonas, Pseudomonas	Kunststoffhohl-kugeln (Durch-messer: 42 mm)	1.600	5 – 38	0,5 – 3,6	80 – 100	121	[307]
autochthone Mikro-flora (keine gezielte Inokulation)	Polyethylenfüll-körper (Durchmesser: 70 mm)	3.800	5 – 23	k. A.	42 – 100	211	[324]
Anreicherungskultur aus Belebtschlamm	Kunststofffaser-kugeln (Durch-messer: 60 mm)	9.000	9,6 – 56,3	0,1 – 22,6	68,4 – 100	240	[325]

Dabei decken die recherchierten Studien ein breites Spektrum an Reaktorgrößen ab, wie anhand des Festbettvolumens nachvollzogen werden kann. Der Großteil bezieht sich auf einen Maßstab von 0,6 – 84 L, der in der gleichen Größenordnung wie das getestete Modell- und Pilotreaktorsystem liegt. Jedoch finden sich auch Reaktoren mit einem Festbettvolumen von 430 – 9.000 L, die sich im Übergangsbereich zum industriellen Maßstab bewegen. Publikationen, die sich mit dem Upscaling eines bestehenden Verfahrens zur biologischen Abluftreinigung beschäftigen und damit das gleiche Ziel verfolgen wie die Dissertation, sind relativ selten. Eine Ausnahme stellt die Studie von Zápotocký und Šváb dar, welche in zwei Zeilen von Tab. 23 aufgeführt ist, da sie zwei Biorieselbettreaktoren mit einem Festbett-

volumen von 6 L bzw. 1.600 L unter ähnlichen Betriebsbedingungen vergleicht.[307] Ähnlich wie bei der Dissertation kam dabei als Inokulum ein Konsortium aus vier verschiedenen Mikroorganismen (Spezies nicht dokumentiert) zum Einsatz, jedoch handelte es sich ausschließlich um Bakterien, Pilze wurden nicht verwendet.[307] In beiden Maßstäben wurde ein hoher Abscheidegrad von Ammoniak erzielt, der mit der relativen Ammoniumabbaurate des Modell- und Pilotreaktorsystems vergleichbar ist.[307] Dabei muss beachtet werden, dass die Abscheidung von Ammoniak nicht mit einem Abbau gleichzusetzen ist, da es sich gemäß Gl. 26 nur um die Konzentrationsdifferenz des Gasstroms handelt, welche primär durch Einlösen der Ammoniakmoleküle in die Zirkulationsflüssigkeit zustande kommt.[299] Um eine Aufkonzentrierung des Schadstoffs auszuschließen, bestimmten Zápotocký und Šváb in der Zirkulationsflüssigkeit stichprobenartig die Konzentration des Ammonium-Stickstoffs.[307] Über das Flüssigkeitsvolumen innerhalb des Biorieselbettreaktors und die Konzentrationsdifferenz von Ammoniak in der Gasphase wurde die theoretische Konzentration des Ammonium-Stickstoffs berechnet, die sich maximal im jeweiligen Zeitintervall einlösen konnte.[307] Über das Verhältnis der gemessenen Konzentration des Ammonium-Stickstoffs zum theoretischen maximalen Konzentrationswert wurde anschließend die relative Ammoniumabbaurate ermittelt, welche im Bereich von 79,8 – 96,6 % lag.[307] Somit konnte bewiesen werden, dass ein biologischer Abbau und keine reine Absorption stattgefunden hatte.[307] Die Art und die Konzentration der Abbauprodukte wurden in der Studie nicht untersucht.[307] Um einen Vergleich mit den absoluten Werten der Dissertation zu ermöglichen, wurde unter Annahme eines Zeitraums von 24 h die absolute Ammoniumabbaurate aus den publizierten Konzentrationswerten berechnet.[307] Für die beiden Biorieselbettreaktoren ergibt sich dadurch eine absolute Ammoniumabbaurate von 5,57 – 69,11 mg/(L·h), die in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie die Werte des Modell- und Pilotreaktorsystems.[307] Dabei erreicht der Reaktor mit einem Festbettvolumen von 1.600 L zwar eine höhere absolute Ammoniumabbaurate als der Reaktor im Labormaßstab von 6 L, besitzt jedoch eine rund 50 % geringere Eliminationskapazität von Ammoniak.[307] Letztendlich kommt es auf die Wahl des jeweiligen Vergleichskriteriums und die Berechnungsart an, welche die Bewertung der Leistungsfähigkeit der biologischen Abluftreinigungsanlage wesentlich beeinflusst. Als Vorteil während des Betriebs der Reaktoren von Zápotocký und Šváb erwies sich die Vorinstallation eines Rührers im Zentrum der Schüttung, der im Labormaßstab zweimal pro Tag für eine Dauer von 5 min zum Einsatz kam und eine Drehzahl von 9 rpm besaß.[307] Auf diese Weise konnte eine Verblockung durch die mechanische Entfernung überschüssiger Biomasse von den Trägermaterialien verhindert werden.[307] Eine Voraussetzung für die Funktionstüchtigkeit der Rühreinheit ist die Kompatibilität mit dem Medium bzw. in diesem Fall mit der Schüttung.[307, 326, 327] In der Literatur wurden Kunststoffhohlkugeln verwendet, die eine relativ geringe Dichte im Vergleich zu Lavasteinen besitzen und deshalb einen niedrigeren Leistungseintrag bzw. ein reduziertes Drehmoment des Rührers zur ausreichenden Durchmischung erfordern.[307, 326, 327]

Daten zum Ammoniumabbau in der flüssigen Phase von Biorieselbettreaktoren sind in der Literatur teilweise nicht dokumentiert, da für die Beurteilung der Abluftreinigungseffizienz in erster Linie die Schadstoffkonzentration im Gasstrom herangezogen wird.[22, 328–331] Um eine Aufkonzentrierung von Ammoniak bzw. Ammonium auszuschließen und die biologische Abbaukinetik zu charakterisieren, ist es von Vorteil, auch die flüssige Phase zu analysieren.

Dies erfolgte beispielsweise in einer Studie von Xue et al., die während eines Zeitraums von 16 Tagen die Konzentrationen von Ammoniak, Nitrit und Nitrat in der Zirkulationsflüssigkeit eines Biorieselbettreaktors untersuchte.[311] Im Gegensatz zur Publikation von Zápotocký und Šváb wurden von Xue et al. somit auch die Produkte des biologischen Abbaus analysiert.[311] Dabei resultierte ein Anstieg der Nitrifikationseffizienz mit zunehmender Betriebsdauer, die nach 8 Tagen ein Maximum von 100 % erreichte.[311] Es konnte nachgewiesen werden, dass Ammoniak durch die eingesetzten Mikroorganismen in Nitrat umgewandelt wird.[311] Die Darstellung der Ergebnisse zu den Abbauprodukten bei der Dissertation erfolgt in Kap. 4.4.2.

Eine weitere Publikation zum Abbau von Ammoniak mit einem Biorieselbettreaktor, die neben dem Gasstrom auch die Zirkulationsflüssigkeit berücksichtigt, stammt von Copelli et al.[320] Dabei erfolgte eine regelmäßige Messung der Ammoniak-, Nitrit- und Nitratkonzentration.[320] Basierend auf der linearen Abnahme der Ammoniakkonzentration innerhalb der ersten 10 Tage nach dem Abschluss der Inokulationsphase kann eine absolute Ammoniumabbaurate berechnet werden, die in diesem Fall bei durchschnittlich 0,71 mg/(L·h) lag.[320] Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass die Zusammensetzung der Zirkulationsflüssigkeit nicht konstant war, da ein Teil davon kontinuierlich aus dem Reaktor entfernt wurde und zum Ausgleich des Volumenverlustes eine Zugabe von Leitungswasser erfolgte.[320] Außerdem beeinflusste die Einleitung des ammoniakhaltigen Abluftstroms in den Reaktor maßgeblich die Konzentration von Ammoniak in der Zirkulationsflüssigkeit.[320] Aus diesem Grund ist die Vergleichbarkeit der oben berechneten absoluten Ammoniumabbaurate mit den Werten der Dissertation nur bedingt gegeben.[320] Zur Vereinfachung der komplexen Vorgänge wurde von Copelli et al. ein Modell entwickelt, das auf mehreren partiellen Differentialgleichungen basiert und eine Prognose verschiedener Prozessparameter – wie des Abscheidegrads von Ammoniak oder der gelösten Ammoniakkonzentration – erlaubt.[320]

Deng et al. untersuchten während der gesamten Betriebsdauer von 102 Tagen die Zirkulationsflüssigkeit eines Biorieselbettreaktors hinsichtlich der Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentration.[323] Anhand der publizierten Messwerte lässt sich eine absolute Ammoniumabbaurate berechnen, die im Bereich von 1,34 – 42,86 mg/(L·h) liegt.[323] Die Ammoniumkonzentration erreichte dabei relativ hohe Werte von bis zu 3.214 mg/L, was einen Vergleich mit den Ergebnissen der Dissertation erschwert.[323] Zudem muss berücksichtigt werden, dass andere Betriebsbedingungen vorlagen und das Entweichen von gasförmigem Ammoniak nicht ausgeschlossen werden kann, da sich der pH-Wert zwischen 6,5 und 9,0 bewegte.[323] Im Gegensatz zur Studie von Copelli et al. erfolgte weder eine Entfernung eines Teilvolumens der Zirkulationsflüssigkeit noch eine Zugabe von Leitungswasser, sodass ein konstantes Volumen angenommen wird.[323] Deng et al. führten zusätzlich Experimente im Schüttelkolben durch, um die Abbaukinetik der Mikroorganismen mit synthetischem Abwasser unter definierten Bedingungen *ex situ* im Labor zu überprüfen.[323] Als Inokulum dienten dabei Biofilmproben aus dem Biorieselbettreaktor und Belebtschlamm als Kontrolle.[323] Es wurde eine absolute Ammoniumabbaurate von 1,61 – 5,36 mg/(L·h) mit den Biofilmproben erzielt, während mit Belebtschlamm Werte von 4,02 – 8,04 mg/(L·h) vorlagen.[323] Bei der Interpretation der Werte gilt es zu beachten, dass es sich lediglich um eine einzige Probenahme handelt, die bei einer Betriebsdauer von 102 Tagen nicht repräsentativ ist.[323]

4.4 Verwertung von Reststoffen

4.4.1 Biofilm

Einen potenziellen Reststoff, der im Rahmen der Abluftreinigung durch Biorieselbettreaktoren anfällt, stellt überschüssiger Biofilm dar.[257] Dieser befindet sich zunächst auf den Lavasteinen innerhalb der Schüttung, kann jedoch durch die Berieselung mit der Zirkulationsflüssigkeit im Laufe der Zeit abgelöst werden und gelangt letztendlich in den Fermenter. Um die Eignung als Tierfutter oder Düngemittel zu erforschen, wurde die Nährstoffzusammensetzung einer feuchten Biofilmprobe aus einem Biorieselbettreaktor analysiert, die eine Trockenmasse von 5,03 % aufwies. Tab. 24 und Tab. 25 veranschaulichen die Ergebnisse der Analyse, wobei der jeweilige Gehalt an Makro- bzw. Spurenelementen auf die Trockenmasse der Probe bezogen wurde. Zur Erleichterung der Interpretation wurden neben den Messwerten zusätzlich Minimal- und Maximalwerte aus der Literatur aufgeführt, die sich auf Klärschlammproben unterschiedlicher Herkunft beziehen.[332–335] Klärschlamm wurde für den Vergleich ausgewählt, da dieser ebenfalls einen Reststoff bei einem biologischen Prozess (Abwasserreinigung) darstellt und als organisches Düngemittel eingesetzt werden kann.[336] Bei den Makroelementen, die im Biofilm enthalten sind, liegt der Gehalt bis auf den organischen N-Anteil innerhalb des Intervalls, das bei den Referenzwerten angegeben ist.[332–334] Sowohl bei Betrachtung der Feuchtmasse als auch der Trockenmasse fällt auf, dass der größte Anteil der Biofilmprobe auf die organische Substanz und den Gesamt-Stickstoff entfällt, die in Summe 83,6 % der Trockenmasse repräsentieren. Calcium, Phosphat, Natrium, Kalium, Magnesium und Schwefel kommen nur in geringen Mengen vor und erreichen insgesamt einen Anteil von 3,7 % der Trockenmasse. Auch im Falle der Spurenelemente wird bei Betrachtung von Tab. 25 in den meisten Fällen ein Gehalt erreicht, der im Bereich der Referenzwerte liegt.[333–335] Lediglich Cobalt und Molybdän sind im Biofilm in einer Menge vorhanden, die geringfügig unterhalb des Minimalwertes von Klärschlamm angesiedelt ist.[333] Die Metalle Zink, Eisen, Mangan und Kupfer kommen in der Probe in größerer Menge vor als die restlichen Spurenelemente.

Tab. 24: Makroelemente der Biofilmprobe mit Referenzwerten.

Makroelement	Gehalt in der Biofilmprobe in kg/t Feuchtmasse	Gehalt in der Biofilmprobe in g/kg Trockenmasse	Referenzwerte für Klärschlamm in g/kg Trockenmasse
organische Substanz	40,1	798,0	323 – 941 [332]
Gesamt-Stickstoff (N)	1,9	38,0	7,11 – 56,15 [333]
organischer N-Anteil	1,3	25,8	5,94 – 23,96 [333]
löslicher N-Anteil (NH_4-N)	0,61	12,1	0,00 – 21,56 [333]
Phosphat (P_2O_5)	0,38	7,6	1,94 – 78,88 [333]
Kalium (K_2O)	0,28	5,5	0,52 – 10,13 [333]
Magnesium (MgO)	0,18	3,6	1,21 – 30,00 [333]
Calcium (CaO)	0,59	11,7	2,67 – 332,43 [333]
Natrium (Na_2O)	7,1	7,1	0,3 – 82,8 [334]
Schwefel (S)	1,3	1,3	0,6 – 1,5 [334]

Tab. 25: Spurenelemente der Biofilmprobe mit Referenzwerten.

Spurenelement	Gehalt in der Biofilmprobe in g/t Feuchtmasse	Gehalt in der Biofilmprobe in mg/kg Trockenmasse	Referenzwerte für Klärschlamm in mg/kg Trockenmasse
Bor (B)	0,56	11,2	74 – 680 [335]
Cobalt (Co)	0,10	2,0	2,6 – 35,67 [333]
Eisen (Fe)	4,5	90,0	100 – 15.300 [334]
Kupfer (Cu)	3,6	70,6	51,50 – 622,90 [333]
Mangan (Mn)	4,5	88,6	0,04 – 7.100,00 [333]
Molybdän (Mo)	0,04	0,8	1,13 – 10,00 [333]
Zink (Zn)	21,9	435,4	86,67 – 1.984,00 [333]

Dass der überwiegende Anteil der Biofilmprobe aus organischer Substanz, Stickstoff und weiteren Makroelementen besteht, erscheint plausibel, da diese in Form von mikrobiellen Zellen und EPS im Biofilm vorliegen.[69] Ein Großteil der chemischen Elemente wurde über das Nährmedium und die Zugabe von Nährstoffen hinzugeführt. Das Auftreten von Spurenelementen, die nicht im eingesetzten Nährmedium enthalten sind, lässt sich durch die Lavasteine erklären, welche infolge der Berieselung mineralische Komponenten an die Zirkulationsflüssigkeit abgeben. Quantitative Angaben dazu werden in Kap. 4.4.2 aufgeführt und diskutiert. Die solubilisierten Spurenelemente sind gemäß Tab. 25 auch im Biofilm vorhanden, der vermutlich eine Art Depotfunktion für die essentiellen Substanzen besitzt. Kröpfl et al. beobachteten ebenfalls die Aufnahme von Spurenelementen durch Biofilm, der in einem fließenden Gewässer auf mineralischen Trägermaterialien wie Granit und Andesit kultiviert wurde.[337] Aufgrund ihrer positiven Ladung können Schwermetallionen, zu denen mit Ausnahme von Bor alle in Tab. 25 aufgeführten Spurenelemente gehören, durch elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Gruppen gebunden werden.[338] Dieser Vorgang wird in der Literatur häufig als eine Variante der Biosorption beschrieben, die auf dem Einsatz von lebender oder toter Biomasse zur Abtrennung gelöster Substanzen basiert.[338–340] Im Falle von Biofilm lässt sich die Biosorption von Schwermetallionen primär auf negative Ladungen funktioneller Gruppen zurückführen, die Bestandteil der EPS sind.[338] Dies betrifft beispielsweise Phosphatreste bei eDNA und Carboxylatgruppen von Proteinen.[69, 338]

Basierend auf den Ergebnissen der Nährstoffzusammensetzung kann geschlussfolgert werden, dass der Biofilm aus dem Biorieselbettreaktor eine wertvolle Nährstoffquelle darstellt und sich somit für die Anwendung in Form eines Düngemittels eignen könnte. Jedoch müssen im Falle eines Inverkehrbringens in Deutschland die rechtlichen Vorgaben in Form der Düngemittelverordnung (DüMV) beachtet werden.[341] Aufgrund der Unterschreitung der Mindestnährstoffgehalte darf die Biofilmprobe aus dem Dissertationsprojekt nicht unmittelbar als flüssiger organischer Dünger in Verkehr gebracht werden.[341] Allerdings wäre es denkbar, die Biofilmprobe mit weiteren Nährstoffen aus Reststoffströmen zu supplementieren, um den Mindestnährstoffgehalt zu erreichen. Vor dem Inverkehrbringen müssen gemäß DüMV

zusätzlich das Einhalten von Schadstoffgrenzwerte, beispielsweise für Arsen, und der hygienisch einwandfreie Zustand gewährleistet werden.[341] Bereits in der Literatur beschrieben ist die Anwendung von Biofilm im nicht-getrockneten, vitalen Zustand als biologisches Düngemittel durch Inokulation mit biofilmbildenden Mikroorganismen.[342–345] Allerdings ist diese Technologie bisher auf wenige Einsatzbereiche limitiert, da sich die artifiziell hinzugesetzten Mikroorganismen in der Rhizosphäre der Pflanzen oft nicht durchsetzen können.[342] Vorteilhaft erweist sich die Integration indigener Spezies, um die Ansiedelung im natürlichen Lebensraum der Pflanzen zu fördern.[342] Denkbar wäre vor diesem Hintergrund die Nutzung eines Bioriesel-bettreaktors zur Kultivierung geeigneter ammoniumabbauender Spezies mit phytoprotektiven Eigenschaften, um das Inokulum in Form von vitalem Biofilm für die Pflanzen in der Umgebung bereitzustellen.

Neben der quantitativen Bestimmung der Nährstoffzusammensetzung in Form der Makro- und Spurenelemente wurde nach Trocknung der Biofilmprobe ein FTIR-Spektrum aufgenommen, das in Abb. 53 visualisiert ist. Dabei sind die Wellenzahlen charakteristischer Absorptionsmaxima durch eine vertikale Linie angegeben und zusätzlich in Tab. 25 mit dem Schwingungstyp sowie der chemischen Klassifikation gemäß der Literatur aufgeführt.[346–354]

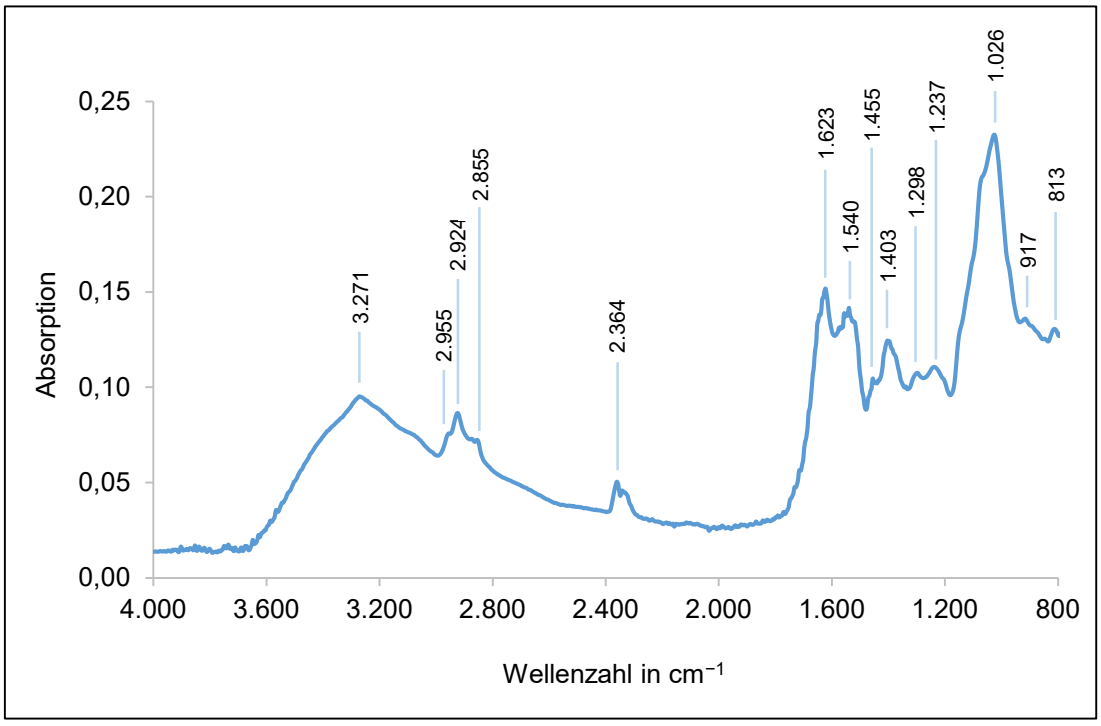

Abb. 53: FTIR-Spektrum des getrockneten Biofilms. Charakteristische Absorptionsmaxima sind mit der entsprechenden Wellenzahl durch eine vertikale, hellblaue Linie hervorgehoben.

Tab. 26: Interpretation des FTIR-Spektrums des getrockneten Biofilms.

Wellenzahl in cm^{-1}	Schwingungstyp	chemische Zuordnung	Quelle
3.271	O-H- oder N-H-Streckschwingungen	Polysaccharide, Proteine	[346, 348]
2.955	asymmetrische CH_3-Streckschwingungen	Lipide	[350, 351]
2.924	asymmetrische CH_2-Streckschwingung	Lipide	[350, 351]

Wellenzahl in cm^{-1}	Schwingungstyp	chemische Zuordnung	Quelle
2.855	symmetrische CH_2-Streckschwingung	Lipide	[350, 351]
2.364	asymmetrische CO_2-Streckschwingung	CO_2	[349, 352]
1.623	C=O-Streckschwingungen, Amidbande I	Proteine	[348, 351]
1.540	N-H-Deformationsschwingungen, C-N-Streckschwingungen, Amidbande II	Proteine	[346, 351]
1.455	CH_2-Deformationsschwingung	Lipide	[346, 347, 351]
1.403	symmetrische C=O-Streckschwingung	Proteine, Lipide	[346, 351]
1.298, 1.237	asymmetrische P=O-Streckschwingung	Nucleinsäuren, Phospholipide	[346, 347]
1.026	C-O-Streckschwingungen	Polysaccharide	[347, 349]
917, 813	C-O-C-Deformationsschwingungen	Polysaccharide	[353, 354]

Das FTIR-Spektrum des getrockneten Biofilms (siehe Abb. 53) zeigt mehrere charakteristische Absorptionsbanden, die verschiedenen Komponenten der EPS zugeordnet werden können. Die ausgeprägte Bande bei 3.271 cm^{-1} ist ein Indiz für O-H- bzw. N-H-Streckschwingungen, welche häufig in Hydroxylgruppen von Polysacchariden bzw. innerhalb der Peptidbindung von Proteinen auftreten.[346, 348] Die Absorptionsmaxima bei 2.955 cm^{-1}, 2.924 cm^{-1} und 2.855 cm^{-1} entsprechen verschiedenen Arten von C-H-Streckschwingungen, die typisch für aliphatische Gruppen von Lipiden sind.[350, 351]

Eine Anomalie im FTIR-Spektrum ist bei einer Wellenzahl von 2.364 cm^{-1} zu beobachten, da diese nicht charakteristisch für Bestandteile von Biofilmen ist. Es handelt sich hier vermutlich um gasförmiges Kohlenstoffdioxid (CO_2), das in der Raumluft des Spektroskopielabors enthalten war und über die Messmethode erfasst wird.[349, 352] Die deutliche Absorptionsbande bei 1.623 cm^{-1} ist charakteristisch für die C=O-Streckschwingungen und wird typischerweise als Amidbande I in Proteinen interpretiert.[348, 351] Darauf folgt die Amidbande II bei 1.540 cm^{-1}, die durch N-H-Deformationsschwingungen und C-N-Streckschwingungen in Proteinen verursacht wird.[346, 351] Ein Indiz für Lipide stellt das Absorptionsmaximum bei 1.455 cm^{-1} dar, welches sich auf C-H-Deformationsschwingungen der aliphatischen Struktur zurückführen lässt.[346, 347, 351] Bei 1.403 cm^{-1} ist eine symmetrische C=O-Streckschwingung zu erkennen, die sowohl Proteinen als auch Lipiden zugeordnet wird.[346, 351]

Die Banden im Bereich von 1.298 cm^{-1} und 1.237 cm^{-1} können mit einer asymmetrischen P=O-Streckschwingung in Verbindung gebracht werden, die in Nucleinsäuren und Phospholipiden vorkommt.[346, 347] Dabei kann es sich sowohl um extrazelluläre DNA als auch um intrazelluläre Bestandteile wie Membranlipide handeln, die bei der Probenvorbereitung des Biofilms durch Trocknung intakt bleiben.[23, 69] Eine deutliche Bande bei 1.026 cm^{-1} ist charakteristisch für die C-O-Streckschwingungen, die in Polysacchariden vorkommen.[347, 349] Die schwächeren Banden bei 917 cm^{-1} und 813 cm^{-1} sind ein Indikator für C-O-C-Deformationsschwingungen, die auf glycosidische Bindungen zurückgeführt werden können und somit ebenfalls auf die Anwesenheit von Polysacchariden in der Probe hindeuten.[353, 354]

Insgesamt bestätigt die Analyse des FTIR-Spektrums die für Biofilme typische Zusammensetzung aus Proteinen, Polysacchariden, Lipiden und Nucleinsäuren.[67, 346–354] Auch von anderen Autoren wurde die FTIR-Spektroskopie erfolgreich zur Charakterisierung von Biofilmproben diverser Mikroorganismen eingesetzt.[355–361] Teilweise kann dabei auch eine Identifizierung konkreter Spezies erfolgen, wenn das FTIR-Spektrum mit einer Referenzdatenbank verglichen wird.[348, 362]

Alternativ zur Verwendung von Biofilm als Düngemittel könnte auch der Einsatz als Futtermittel für Tiere erfolgen, da die gemäß des FTIR-Spektrums vorliegenden Polysaccharide, Proteine und Lipide ernährungsphysiologisch wertvolle Nährstoffe darstellen.[363] Aufgrund des hohen Anteils der organischen Substanz an der Masse des Biofilms ist damit zu rechnen, dass die drei genannten Makronährstoffe in relativ großen Mengen vorhanden sind. Vor der Verwertung als Tierfutter müssen jedoch – wie bereits bei den Düngemitteln erläutert – die rechtlichen Vorgaben berücksichtigt werden, die in Deutschland durch das Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) festgelegt werden.[363, 364]

4.4.2 Zirkulationsflüssigkeit

Neben dem Biofilm wurde auch die Zirkulationsflüssigkeit aus einem Biorieselbettreaktor als potenzieller Reststoff im Falle eines Austausches bzw. der Entsorgung untersucht. Aufgrund des höheren Wassergehaltes im Vergleich zum Biofilm wies die Probe eine geringere Trockenmasse von 0,24 % auf. Tab. 27 zeigt die in der Zirkulationsflüssigkeit enthaltenen Makroelemente, während Tab. 28 einen Überblick zu den Spurenelementen gibt. Zur Einordnung des Gehaltes wurden jeweils Referenzwerte recherchiert, die sich auf Gärrest als Endprodukt von Biogasanlagen beziehen.[365–370] Die Zirkulationsflüssigkeit besteht neben Wasser – ähnlich wie der Biofilm – größtenteils aus organischer Substanz und Gesamt-Stickstoff, die 92,9 % der Trockenmasse darstellen.

Tab. 27: Makroelemente der Zirkulationsflüssigkeitsprobe mit Referenzwerten.

Makroelement	Gehalt in der Zirkulationsflüssigkeit in kg/t Feuchtmasse	Gehalt in der Zirkulationsflüssigkeit in g/kg Trockenmasse	Referenzwerte für Gärrest in g/kg Trockenmasse
organische Substanz	1,9	806,4	156 – 980 [365]
Gesamt-Stickstoff (N)	0,29	122,2	2 – 205 [365]
organischer N-Anteil	0,09	39,7	24 – 100 [366]
löslicher N-Anteil (NH_4-N)	0,20	82,6	2,1 – 17,9 [365]
Phosphat (P_2O_5)	0,02	6,9	0,46 – 247,32 [365]
Kalium (K_2O)	0,04	17,3	2,17 – 266,86 [365]
Magnesium (MgO)	0,05	19,3	0,17 – 23,38 [365]
Calcium (CaO)	0,05	22,2	0,84 – 137,9 [365]
Natrium (Na_2O)	0,07	29,0	1,83 – 66,31 [366]
Schwefel (S)	0,05	19,8	2,9 – 14,7 [366]

Tab. 28: Spurenelemente der Zirkulationsflüssigkeitsprobe mit Referenzwerten.

Spurenelement	Gehalt in der Zirkulationsflüssigkeit in g/t Feuchtmasse	Gehalt in der Zirkulationsflüssigkeit in mg/kg Trockenmasse	Referenzwerte für Gärrest in mg/kg Trockenmasse
Bor (B)	0,07	28,0	28,1 – 46,5 [368]
Cobalt (Co)	0,00	0,9	0,0068 – 1,4 [367, 369]
Eisen (Fe)	6,3	2616	371 – 29.837 [365]
Kupfer (Cu)	0,06	26,0	1,4 – 681,0 [365]
Mangan (Mn)	0,69	288,4	31,5 – 96,5 [365]
Molybdän (Mo)	0,00	1,7	1,7 – 8,0 [368, 370]
Zink (Zn)	0,00	1,0	0,81 – 4.019 [365]

Auffällig bei den Spurenelementen ist der hohe Gehalt an Eisen, der im Vergleich zum Biofilm bei Betrachtung der Trockenmasse um den Faktor 29 höher liegt. Es muss berücksichtigt werden, dass die Zirkulationsflüssigkeit aufgrund der kontinuierlichen Berieselung wasserlösliche Eisenionen aus dem Lavagestein in hydratisierter Form aufnimmt. Infolge des höheren Wassergehaltes von 99,76 % – im Vergleich zu 94,76 % im Falle des Biofilms – ist die Wahrscheinlichkeit bei der Zirkulationsflüssigkeit größer, dass Eisenionen in Lösung bleiben und sich in der wässrigen Phase verteilen. Im Biofilm könnte dagegen eine Komplexierung von Eisenionen durch Siderophore der immobilisierten Zellen stattfinden oder die Bildung von schwer löslichen Salzen wie beispielsweise Eisen(III)-phosphat ($FePO_4$) eintreten.[23, 371] Dadurch würde ein verminderter Gehalt an Eisen im Biofilm resultieren. Allerdings muss beachtet werden, dass die Zirkulationsflüssigkeit bei Betrachtung der Feuchtmasse lediglich eine um den Faktor 1,4 höhere Eisenkonzentration aufweist als der Biofilm. Infolgedessen liegt im Falle der feuchten Reststoffe nur ein marginaler Unterschied im Eisengehalt vor.

Insgesamt weist der Gehalt an Makro- und Spurenelementen der Zirkulationsflüssigkeit eine gute Übereinstimmung mit den Referenzwerten auf, die sich auf unterschiedliche Arten von Gärrest beziehen.[365–370] Lediglich der Gehalt an Ammonium-Stickstoff (löslicher N-Anteil) erscheint im Vergleich zur Literatur erhöht.[365] Dieser Befund könnte auf die Zudosierung von N-Quellen (Ammoniumsulfat bzw. Ammoniak) beim Betrieb des Biorieselbettreaktors zurückzuführen sein, während für Biogasanlagen in der Regel keine chemisch definierten N-haltigen Substrate zum Einsatz kommen.[372, 373] Stattdessen wird Ammonium, das im Gärrest von Biogasanlagen enthalten ist, hauptsächlich durch anaeroben Abbau von organischen N-Quellen gebildet.[372, 373] Im Falle von Exkrementen als Substrat ist außerdem bereits Ammonium vorhanden, das durch die mikrobielle Verstoffwechselung von Harnsäure bzw. Harnstoff entsteht.[47–50] Mit fortschreitendem anaeroben Abbau kommt es zu einer Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich, sodass durch Ausgasung von Ammoniak der Gehalt an Ammonium im Gärrest reduziert wird.[365] Insofern erscheint es plausibel, dass die Referenzwerte für die Konzentration von Ammonium-Stickstoff im Gärrest geringer sind als das entsprechende Messergebnis, das sich auf die Zirkulationsflüssigkeit bezieht.[365–370]

In der Literatur ist bereits eine Verwertung der Zirkulationsflüssigkeit aus Biorieselbettreaktoren beschrieben, die zur Reinigung ammoniakhaltiger Abluftströme von einer Kompostierungsanlage eingesetzt werden.[374–376] Dabei wurde der Reststoffstrom der biologischen Abluftreinigung zur Regulierung der Feuchtigkeit bei der Kompostierung verwendet.[374–376] Nach Zusatz der Zirkulationsflüssigkeit resultierte im Vergleich zur Negativkontrolle (Leitungswasser) eine beschleunigte Zersetzung der organischen Ausgangsstoffe.[374] Dieser Befund wird durch den hohen Gehalt an Ammonium-Stickstoff (1.576,6 mg/L) in der Zirkulationsflüssigkeit erklärt, der das Wachstum heterotropher Bakterien fördert.[374] Auch der Reifeprozess des Komposts ließ sich durch den Zusatz der Zirkulationsflüssigkeit optimieren. Es wurde eine höhere Wärmeentwicklung und ein gesteigertes C:N-Verhältnis verglichen mit dem Ansatz erzielt, der Leitungswasser als Medium zur Feuchtekonditionierung enthielt.[374] Darüber hinaus kann die Zirkulationsflüssigkeit als Düngemittel verwertet werden.[377]

Um eine Gegenüberstellung der Zusammensetzung des Gesamt-Stickstoffs der Zirkulationsflüssigkeit und des Biofilms aus der vorliegenden Arbeit zu erleichtern, wurden mithilfe der absoluten Werte des Ammonium-Stickstoffs und organischen Stickstoffs (siehe Tab. 24 und Tab. 27) zwei Kreisdiagramme erstellt, die in Abb. 54 dargestellt sind.

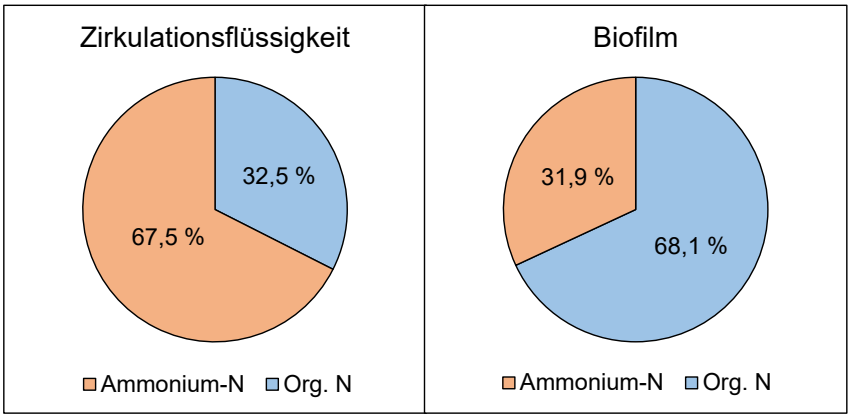

Abb. 54: Zusammensetzung des Gesamt-Stickstoffs von Zirkulationsflüssigkeit und Biofilm. Die prozentualen Anteile wurden anhand der Nährstoffgehalte bezogen auf die Trockenmasse ermittelt.

Dabei fällt auf, dass im Biofilm ein deutlich geringerer Anteil an Ammonium-Stickstoff und ein höherer Prozentsatz organischen Stickstoffs als in der Zirkulationsflüssigkeit vorliegt. Dies lässt sich durch die höhere Zelldichte in Verbindung mit den EPS erklären, welche die Grundstruktur des Biofilms bilden und organischen Stickstoff in Form von Proteinen enthalten.[67, 69] Dass die Abnahme des Ammonium-Stickstoffs mit einer Steigerung des organischen Stickstoffs einhergeht, entspricht ebenfalls den Erwartungen, da Ammonium von den Mikroorganismen im Biofilm als N-Quelle verwendet wird. Im Rahmen der Assimilation entstehen im heterotrophen Stoffwechsel beispielsweise Aminosäuren wie Glutamin und Glutamat, die wiederum zur Biosynthese von Proteinen verwendet werden können.[23] Auf diese Weise wird der Anteil an organischem Stickstoff bei gleichzeitigem Verbrauch der anorganischen N-Quelle Ammonium erhöht. Auffällig bei den beiden Kreisdiagrammen ist, dass sich das Verhältnis von Ammonium-Stickstoff zu organischem Stickstoff von ca. 2:1 (Zirkulationsflüssigkeit) zu ca. 1:2 (Biofilm) verändert und sich somit nahezu invertiert.

Basierend auf der Bilanzierung kann ausgeschlossen werden, dass Ammonium in nennenswertem Anteil in anorganische Stoffwechselprodukte wie Nitrit oder Nitrat umgewandelt wurde. Um diesen Befund experimentell zu untermauern, wurde zusätzlich die Konzentration von Nitrit und Nitrat photometrisch bestimmt, die bei beiden Proben unterhalb der Nachweisgrenze von 0,015 mg/L (NO_2^--N) bzw. 0,23 mg/L (NO_3^--N) lag. Die Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass aus dem Substrat Ammonium bevorzugt organische Stickstoffverbindungen entstehen, was charakteristisch für heterotrophe Mikroorganismen ist. Gemäß der Bilanzierung in Abb. 54 ist außerdem nicht mit der Bildung von molekularem Stickstoff durch das mikrobielle Konsortium zu rechnen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Mikroorganismen im Biorieselbettreaktor nicht den HN-AD-Stoffwechselweg bevorzugen, der bei Untersuchungen anderer Autoren zur Entstehung von weiteren Stickstoffspezies wie Hydroxylamin, Nitrit und Nitrat führt.[175, 199, 201]

4.4.3 Hühnertrockenkot

In Ergänzung zu den Reststoffen, die aus dem Biorieselbettreaktor stammen, wurde mit Hühnertrockenkot eine Testsubstanz ausgewählt, welche bei der industriellen Haltung von Geflügel in großen Mengen anfällt und ebenfalls Potenzial für eine Verwertung bietet.[8, 165] Im Fokus stand dabei der Einsatz als N-Quelle für die Mikroorganismen im Falle eines Nährstoffmangels, der beispielsweise durch geringe Konzentrationen an Ammoniak im Abluftstrom aus dem Geflügelstall hervorgerufen werden könnte. Es ist denkbar, Hühnertrockenkot in zerkleinerter Form der Zirkulationsflüssigkeit hinzuzusetzen, um den Stoffübergang und damit die Bioverfügbarkeit der N-Quelle zu beschleunigen.

Abb. 55 veranschaulicht den Verlauf der freigesetzten Ammoniumkonzentration für die vier verschiedenen Partikelfraktionen, wobei eine Inokulation mit Mikroorganismen erfolgte.

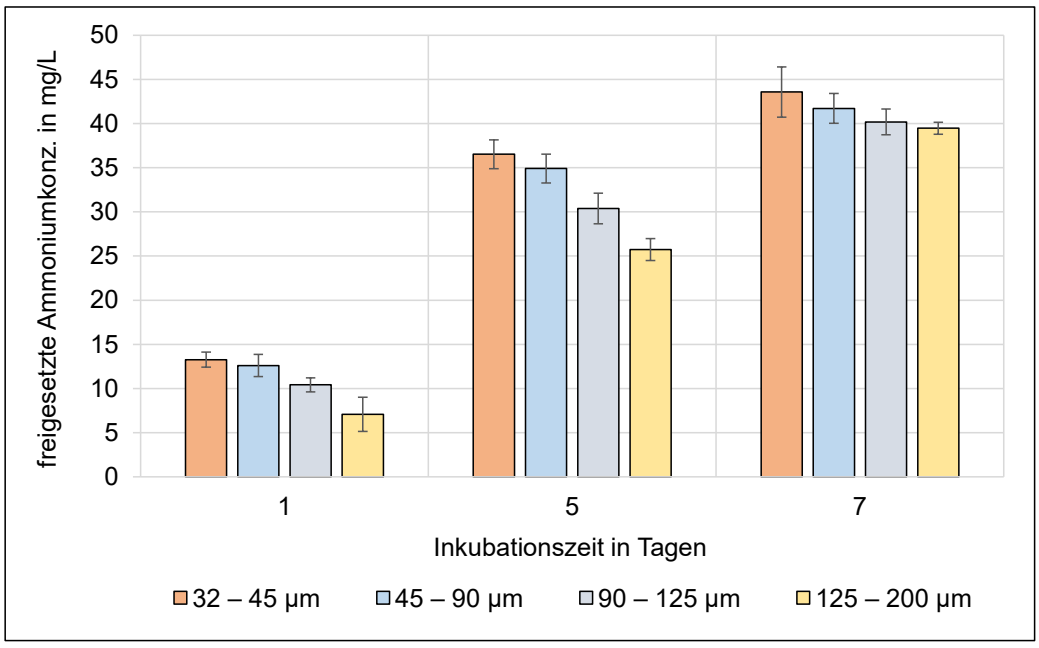

Abb. 55: Einfluss der Partikelgröße des Hühnertrockenkots auf die freigesetzte Ammoniumkonzentration im Ammoniummedium mit Inokulation. Konzentration des Hühnertrockenkots: 1 g/L. *n* = 3.

Verluste infolge einer Ausgasung von Ammoniak können vernachlässigt werden, da sich der pH-Wert der Ansätze während des Versuchszeitraums im leicht sauren Bereich (6,7 – 6,8) bewegte, wodurch das chemische Gleichgewicht auf der Seite von Ammonium liegt.[30] Konkret resultiert bei einem pH-Wert von 6,8 ein Ammoniakanteil von 0,26 %, während die restlichen 99,74 % in Form von Ammonium vorliegen, wobei sich die Prozentwerte auf die Summe der Stoffmengenkonzentration von Ammoniak und Ammonium bei einer Temperatur von 20 °C beziehen.[30] Im Laufe der Inkubationszeit ist anhand von Abb. 55 eine Zunahme der freigesetzten Ammoniumkonzentration zu beobachten, vor allem im Zeitraum zwischen 1 Tag und 5 Tagen kommt es zu einer deutlichen Steigerung. Dies lässt sich durch die Freisetzung von Ammonium aus den suspendierten Hühnertrockenkotpartikeln erklären.

Tab. 29 zeigt eine Übersicht zum Anteil verschiedener Stickstoffspezies am Gesamt-Stickstoff von Hühnerexkrementen aus der Literatur.[378–381] Bei der Interpretation der Prozentwerte muss berücksichtigt werden, welche Art des Hühnerexkrements untersucht wurde. Bei Hühnern erfolgt die Ausscheidung von Urin und Kot natürlicherweise über eine gemeinsame anatomische Struktur, die Kloake, die als Endabschnitt des Verdauungs-, Harn- und Fortpflanzungssystems dient.[382] Über einen sekundären Harnleiter gelangt der Harn von der Niere in den finalen Teil des Darmtraktes und vermischt sich mit dem Kot zu einer weißlichen pastösen Substanz.[382] Die weiße Farbe stammt dabei von Harnsäure.[382] Bei gesunden Hühnern ist es aus anatomischen Gründen nicht möglich, Urin und Kot zu separieren. Bei den Untersuchungen, die sich auf Urin beziehen, erfolgte entweder ein operativer Eingriff oder der Einsatz eines Katheters, um eine Vermischung mit dem Kot aus dem Darm zu vermeiden.[379]

Tab. 29: Referenzwerte für den Anteil verschiedener Stickstoffspezies am Gesamt-Stickstoff von Hühnerexkrementen.

Art des Hühnerexkrements	Anteil der Stickstoffspezies am Gesamt-Stickstoff des Hühnerexkrements in %							Quelle
	Harnsäure-N	Ammonium-N	Harnstoff-N	Purin-N	Allantoin-N	Creatin-N + Creatinin-N	Aminosäure-N	
Urin + Kot	38,6	8,4	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	[383]
Urin + Kot	34,3	9,0	1,7	k. A.	k. A.	1,2	2,2	[381]
Urin + Kot	52,2	2,9	1,6	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	[384]
Urin	80,7	10,5	4,5	k. A.	k. A.	0,9	2,2	[378]
Urin	62,9	17,3	10,4	k. A.	k. A.	8,0	k. A.	[380]
Urin	65,8	7,58	6,45	9,57	3,83	4,56	k. A.	[379]

Da gemäß Tab. 29 der Großteil des exkretierten Stickstoffs bei Geflügel in Form von Harnsäure vorliegt, ist nach Zusatz der Mikroorganismen mit einer enzymatischen Umwandlung zu rechnen.[46–50] Wie bereits in Kap. 2.1.1 anhand von Abb. 4 erläutert, entsteht aus Harnsäure über mehrere Zwischenprodukte – unter Katalyse der Uricase, Allantoinase und Allantoicase – Harnstoff, der wiederum durch das Enzym Urease in Ammonium

umgewandelt werden kann.[47–50] Ein Vergleich mit der Literatur lässt darauf schließen, dass die Vertreter des eingesetzten mikrobiellen Konsortiums teilweise Enzyme besitzen, die bei der Metabolisierung von Harnsäure eine wichtige Rolle spielen.[385–388] Beispielsweise exprimiert der Bakterienstamm *Pseudomonas putida* CN3, der eng verwandt mit *Pseudomonas alloputida* ist, Uricase und sekretiert das Protein in den Extrazellularraum.[385] Auch bei der Pilzspezies *Rhodotorula mucilaginosa* wurde eine extrazelluläre Uricase nachgewiesen.[386] Innerhalb der Zelle fungiert Harnsäure als Induktor, sodass in Anwesenheit dieser organischen Stickstoffverbindung die Transkription der DNA gefördert wird, die für Uricase codiert.[385] In einer Studie von Hà et al. wurde eine maximale Uricaseaktivität unter Einsatz von *Pseudomonas putida* CN3 nach einer Kultivierungsdauer von 30 h festgestellt.[385]

Bei der Untersuchung der uricolytischen Pilze *Aspergillus flavus* und *Aspergillus terreus* wurde das Maximum der Uricaseaktivität 4 Tage nach Beginn der Kultivierung erreicht, im Falle von *Trichoderma* sp. nach 6 Tagen.[389] Vor diesem Hintergrund erscheint es plausibel, dass nach 1 Tag zunächst nur eine relativ geringe freigesetzte Ammoniumkonzentration vorliegt, die jedoch nach 5 Tagen deutlich gesteigert wird. Neben der Biosynthese von Uricase zum Abbau von Harnsäure kann auch die Produktion von Urease erfolgen, sofern der Organismus die genetische Ausstattung dafür besitzt und Harnstoff als Substrat bzw. Induktor im Medium vorhanden ist.[390] Mit *Rhodotorula mucilaginosa* und *Yarrowia lipolytica* weisen zwei von vier Spezies des mikrobiellen Konsortiums das Enzym Urease auf.[387, 388] Harnstoff, der im Hühnertrockenkot enthalten ist oder aus der Verstoffwechselung von Harnsäure resultiert, kann unter Katalyse der Urease hydrolysiert werden, wodurch sich der Anstieg der freien Ammoniumkonzentration in Abb. 55 erklären lässt.[47–50]

Nachdem Hühnerexkremente gemäß Tab. 29 neben Harnsäure und Harnstoff auch freien Ammonium-Stickstoff enthalten, ist während der Inkubation auch eine rein physikalische Einlösung von Ammonium aus den suspendierten Partikeln in das flüssige Medium möglich. Der in der Literatur angegebene Anteil des Ammonium-Stickstoffs bezogen auf den Gesamt-Stickstoff von Hühnerexkrementen liegt bei 2,9 – 17,3 %.[378–381, 391] Allerdings muss beachtet werden, dass Stickstoff in den Ausscheidungsprodukten von Geflügel auch noch in weiteren Formen vorkommt. Beispielsweise wurden Harnstoff, Allantoin, Creatin, Creatinin, Purine und Aminosäuren im Urin bzw. Kot von Hühnern nachgewiesen, wie der Übersicht in Tab. 29 entnommen werden kann.[378–381] Es handelt sich jedoch um relativ geringe Mengen im Vergleich zum Hauptbestandteil Harnsäure.[378–381] Außerdem erfolgt in den meisten Fällen keine explizite Analyse unterrepräsentierter Stickstoffverbindungen, sodass nur wenige Studien mit Referenzwerten vorliegen.[378–381]

Einen größeren Stellwert können laut anderer Autoren unverdaute Proteine einnehmen, die zum im Hühnerkot enthaltenen Gesamt-Stickstoff beitragen.[392, 393] Diese sind jedoch in den Studien aus Tab. 29 nicht direkt quantitativ bestimmt worden. In zwei Fällen erfolgte lediglich eine indirekte Messung des Aminosäure-Stickstoffs, der sich jedoch im Gegensatz zu Proteinen auch auf freie Aminosäuren beziehen kann.[378, 381] Brink et al. konnten nachweisen, dass Rohproteine einen Anteil von 24,8 – 31,7 % bezogen auf die Trockensubstanz der untersuchten Hühnerexkremente repräsentierten, während Harnsäure in geringerer Menge

(4,76 – 8,05 %) vorkam.[393] Da sich die prozentualen Werte auf die Trockensubstanz und nicht auf den Gesamt-Stickstoff beziehen, lassen sich diese nicht direkt mit den Angaben aus Tab. 29 vergleichen.[393]

Bei Betrachtung von Abb. 55 fällt auf, dass teilweise nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Fraktionen auftreten, was die freigesetzte Ammoniumkonzentration betrifft. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die in der Flüssigkeit suspendierten Partikel infolge des Mischungsprozesses auf der Magnetrührerplatte morphologisch verändert wurden. Aufgrund von Kollisionen mit dem magnetischen Rührelement oder bedingt durch turbulente Strömungsverhältnisse erfolgte möglicherweise eine Reduzierung der Partikelgröße.

Außerdem muss beachtet werden, dass eine Interaktion der Partikel mit den Mikroorganismen stattfindet, die ebenfalls zu einer Änderung der Morphologie führen kann, wie anhand des folgenden Beispiels ersichtlich ist. Abb. 56 zeigt eine digitalmikroskopische Aufnahme der Fraktion 90 – 125 µm.

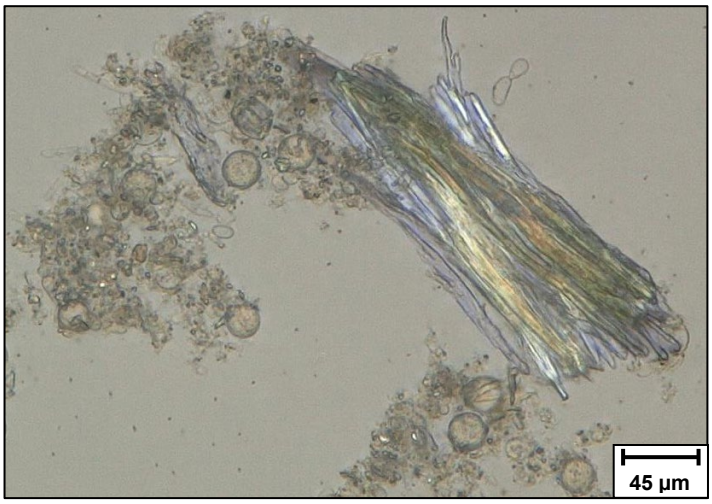

Abb. 56: Mikroorganismen und Hühnertrockenkotpartikel unter dem Digitalmikroskop. Fraktion 90 – 125 µm.

Es ist eine faserartige Struktur zu erkennen, die am unteren und oberen Ende Agglomerate beherbergt, welche vermutlich aus Bakterien und Pilzen bestehen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass eine Adhäsion der Zellen an die suspendierten Partikel erfolgt. Ausgehend von der Oberfläche können die anhaftenden Mikroorganismen auch tieferliegende Regionen der Partikelstrukturen im Rahmen der Biofilmbildung besiedeln. Potenzielle stickstoffhaltige Substrate – wie Harnsäure oder Harnstoff – in diesen Bereichen werden damit bioverfügbar, sodass nach Expression der entsprechenden Enzyme Ammonium entstehen kann.[47–50]

Die beschriebenen Prozesse infolge der mikrobiellen Besiedelung von Hühnexkrementen werden bei der Kompostierung gezielt angewandt, um organischen nährstoffreichen Dünger zu produzieren.[394, 395] Neben der Nutzung der natürlichen Mikroflora kann dabei analog zu den Untersuchungen des Dissertationsprojektes auch ein Konsortium mit definierter Zusammensetzung eingesetzt werden.[395] Beispielsweise selektierten Selvamani et al. drei Arten der Gattung *Bacillus*, um einen effizienten einstufigen Kompostierungsprozess zur

Verwertung von Geflügelmist mit einer relativ kurzen Zeitspanne von 30 Tagen zu entwickeln.[395] Im Gegensatz zur Dissertation ist eine Freisetzung von Ammonium bzw. gasförmigem Ammoniak bei der Kompostierung aufgrund potenzieller Stickstoffverluste unerwünscht.[395] Deshalb wurde bei der Auswahl des Konsortiums darauf geachtet, dass die Spezies Ammonium bzw. dessen Folgeprodukt Nitrit oxidieren können und damit zu den AOB bzw. NOB gehören.[395] Dadurch kann das Entweichen von Ammoniakgas verhindert werden, indem eine Umwandlung in Nitrat erfolgt, das bei ausreichendem Wassergehalt in gelöster Form im Kompost konserviert ist.[395]

Um den Einfluss der Mikroorganismen auf die Freisetzung von Ammonium zu erforschen, wurde mit einer Fraktion (32 – 45 µm) ein zusätzliches Experiment durchgeführt, das einen einen Ansatz ohne Inokulation umfasste. Abb. 57 veranschaulicht die freigesetzte Ammoniumkonzentration im Laufe der Inkubation. Bei Betrachtung der Daten ist erkennbar, dass eine Inokulation mit Mikroorganismen für die Freisetzung von Ammonium in hohem Maße verantwortlich ist. Dabei kann die Ammoniumkonzentration durch den Zusatz des mikrobiellen Konsortiums um den Faktor 3 – 4 erhöht werden, wobei mit zunehmender Inkubationszeit die freigesetzte Menge ansteigt.

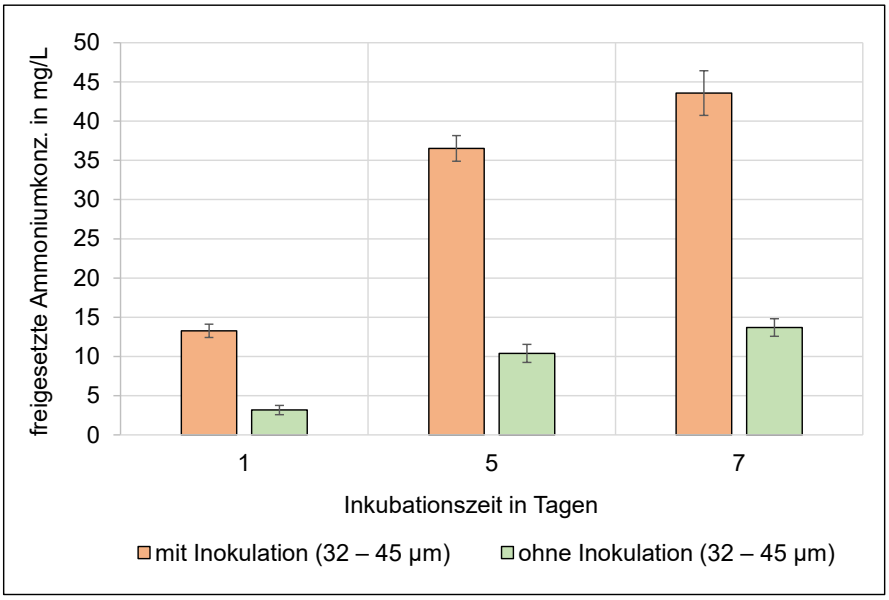

Abb. 57: Einfluss der Inokulation auf die Ammoniumkonzentration im Ammoniummedium. Konzentration des Hühnertrockenkots: 1 g/L. *n* = 3.

Im Rahmen der Kompostierung von Hühnermist wurde ebenfalls eine Erhöhung der Ammoniumkonzentration bei Zugabe eines Inokulums festgestellt.[396] Als Substrat dient organischer Stickstoff, der von den Mikroorganismen mineralisiert wird.[396] Durch die Inokulation werden Abbauprozesse während der Kompostierung gefördert, sodass die Bioverfügbarkeit von Stickstoff verbessert wird.[397] Allerdings liegt in der Literatur eine geringere Erhöhung der Ammoniumkonzentration vor als anhand von Abb. 57 ersichtlich.[396] Beispielsweise ermittelten Zhao et al. unter Einsatz eines mikrobiellen Konsortiums mit vier Vertretern der Gattung *Bacillus* eine Steigerung des Ammonium-Stickstoffs um den Faktor 1,5 nach 10 Tagen.[396] Darüber hinaus wird jedoch bei der Kompostierung von Hühnerexkrementen

häufig auch eine Reduzierung der Ammoniumkonzentration durch Zusatz von Mikroorganismen als Ziel verfolgt.[398–401] So konnten Zhou et al. zeigen, dass ein Konsortium aus zwei *Bacillus*-Spezies und der Hefe *Candida utilis* die Emissionen von Ammoniak bei der Kompostierung von Reststoffen aus der Legehennenhaltung effektiv verringert.[398] Die positive Wirkung wird auf die Senkung des pH-Wertes und die Förderung des Wachstums von AOB zurückgeführt, die – in Kooperation mit NOB – Ammonium in Nitrat umwandeln.[398] Im Vergleich zum Kontrollansatz tritt dabei während des Kompostierungsprozesses eine Zunahme der Nitratkonzentration auf.[398–401]

Bei einer Trockenvergärung von Hühnermist unter anaeroben Bedingungen wurde von Abouelenien et al. eine Erhöhung der Ammoniakkonzentration um den Faktor 2,6 – 3,5 nach 37 Tagen bzw. 56 Tagen beobachtet.[402] Die absolute Ammoniumkonzentration am Ende von Trockenvergärungen mit Hühnermist als Substrat variiert in der Literatur im Bereich von 0,14 – 16 g/L bei unterschiedlichem Trockensubstanzgehalt (16 – 25 %) und verschiedenen Fermentationstemperaturen (35 – 65 °C).[164] Beim Vergleich mit der Literatur muss beachtet werden, dass sich Kompostierungs- bzw. Trockenvergärungsprozesse grundsätzlich von der aeroben Suspensionskultur unterscheiden, auf die sich die Ergebnisse der Dissertation beziehen.[164, 396–402] Dies betrifft neben der Sauerstoffverfügbarkeit beispielsweise den Wassergehalt, die Substratkonzentration, die Art der Durchmischung und die Zusammensetzung des mikrobiellen Konsortiums.[164, 396–402] Insofern erscheinen die diskutierten Abweichungen plausibel. Neben Kompostierung und Trockenvergärung stellt die Produktion von Einzellerprotein (SCP, Single Cell Protein) eine weitere Verwertungsmöglichkeit von Geflügelexkrementen dar.[403–405] Beispielsweise nutzten El-Deek et al. getrockneten Hühnermist in einer Konzentration von 20 g/L in einem komplexen Nährmedium zur Kultivierung von uricolytischen Hefen.[403] Mithilfe der Spezies *Candida utilis* wurde dabei eine maximale Proteinausbeute von 18,6 % erzielt.[403]

Um die freigesetzte Ammoniumkonzentration in Abb. 55 und Abb. 57 zu bewerten, wird im Folgenden eine rechnerische Abschätzung durchgeführt. Laut Hersteller weist Hühnertrockenkot einen durchschnittlichen Gesamt-Stickstoffgehalt von 4 % auf.[166] Dieser Wert konnte durch eigene Messungen bestätigt werden. Bei einer Konzentration der Partikel von 1 g/L resultiert somit eine Stickstoffkonzentration von 40 mg/L. Unter der Annahme, dass eine vollständige Umwandlung des Gesamt-Stickstoffs in Ammonium stattfindet, kann also maximal eine Ammoniumkonzentration von 51,4 mg/L vorliegen.

Ohne Inokulation werden somit nach 7 Tagen rund 26 % der maximal möglichen Ammoniumkonzentration aus den Hühnertrockenkotpartikeln freigesetzt. Mit Inokulation ergibt sich nach 7 Tagen dagegen eine absolute Ammoniumkonzentration, die rund 85 % des Maximalwertes repräsentiert. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass ca. 15 % des Gesamt-Stickstoffs nicht in Ammonium umgewandelt wurden. Möglicherweise handelt es sich dabei um Verbindungen, die für das eingesetzte mikrobielle Konsortium nicht verwertbar sind, da geeignete Enzyme für die Metabolisierung fehlen. Außerdem könnte eine mangelnde Bioverfügbarkeit die Ursache für den unvollständigen Abbau sein. Es ist denkbar, dass stickstoffhaltige Moleküle innerhalb der Hühnertrockenkotpartikel an eine organische Matrix

gebunden sind oder darin eingeschlossen werden, sodass trotz der mechanischen Durchmischung keine unmittelbare Aufnahme durch die Mikroorganismen erfolgen kann. Beispielsweise stellen Proteine, die in der Zellwand von Pflanzen eingebettet sind, eine mögliche N-Quelle dar, die jedoch vermutlich nicht vollständig für die Zellen zugänglich ist.[406–408] Die Faser, welche in Abb. 56 zu sehen ist, könnte solche nicht-bioverfügbaren Proteine enthalten. Eine Option wäre die Zugabe von hydrolytischen Enzymen wie β-Glucanasen, um die Matrixstruktur mit dem Verbund aus Polysacchariden und Proteinen aufzulösen.[409]

Zudem muss beachtet werden, dass die Herstellerangabe genau wie Literaturwerte in der Regel auf einem chemischen Aufschluss zur Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs basiert.[410] Durch den Einsatz hoher Temperaturen und konzentrierter Chemikalien – beispielsweise erfolgt der Kjeldahl-Aufschluss bei 350 °C mit Schwefelsäure (96 %) – ist zu erwarten, dass eine größere Ausbeute im Sinne einer höheren freigesetzten Stickstoffkonzentration als bei einer Inkubation mit Mikroorganismen resultiert.[410]

Eine alternative Möglichkeit zur Bewertung der freigesetzten Ammoniumkonzentration stellt der Vergleich mit der bereits diskutierten Studie von El-Deek et al. zur biotechologischen Produktion von SCP aus getrocknetem Hühnermist dar.[403] Neben der Proteinausbeute wurde dabei auch die Harnsäureabbaurate bestimmt, indem die Harnsäurekonzentration im Überstand der zentrifugierten Kulturflüssigkeit auf den Ausgangswert des Nährmediums bezogen wurde.[403] Die Hefe *Candida utilis* erreichte eine maximale Harnsäureabbaurate von 95,4 % nach einer Kultivierungsdauer von 6 Tagen.[403] Dieses Ergebnis zeigt, dass Harnsäure aus getrockneten Hühnerexkrementen zu einem hohen Anteil mikrobiell verwertbar ist.[403]

Vermutlich diente auch für das Konsortium aus den vier Mikroorganismen des Dissertationsprojektes Harnsäure als primäre N-Quelle und führte nach der enzymatischen Verstoffwechselung zum Anstieg der freigesetzten Ammoniumkonzentration. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass sich die Publikation von El-Deek et al. nur den Harnsäureabbau konzentriert und weder die Ammoniumfreisetzung noch die Verwertung weiterer Stickstoffverbindungen aus dem komplexen Substrat quantifiziert.[403] Basierend auf der chemischen Zusammensetzung der eingesetzten Hühnerexkremente enthalten diese neben Harnsäure (7,2 %) auch Rohprotein (19,1 %), wobei sich die Prozentangaben auf die Trockenmasse und nicht auf den Gesamt-Stickstoffgehalt beziehen.[403] Wie bereits erwähnt, stellten auch Brink et al. einen hohen Rohproteingehalt fest, der Werte von 24,8 – 31,7 % bezogen auf die Trockensubstanz annahm.[393] Demnach ist damit zu rechnen, dass neben Harnsäure auch noch weitere stickstoffhaltige Substrate aus den Ausscheidungsprodukten verstoffwechselt werden können, solange diese in bioverfügbarer Form vorliegen. Möglicherweise würde sich bei dem Bezug des Abbaus auf die enthaltene Harnsäure bei den Experimenten der Dissertation ebenfalls eine noch höhere Abbaurate als 85 % ergeben, da bei dieser Betrachtung potenziell geringer bioverfügbare und damit schwerer abbaubare Stickstoffverbindungen wie zellwandassoziierte Proteine nicht berücksichtigt werden.[406–408]

Grundsätzlich kann eine Freisetzung von Ammonium nicht nur im Rahmen der Metabolisierung von stickstoffhaltigen Verbindungen, sondern auch durch die Lyse von Zellen erfolgen, indem die Bestandteile aus dem Cytoplasma in den Extrazellularraum gelangen.[411] Dieser

Einflussfaktor wurde jedoch bei der Berechnung der freigesetzten Ammoniumkonzentration berücksichtigt. Basierend auf dem Versuchsdesign kann darauf geschlossen werden, dass das mikrobielle Konsortium Hühnertrockenkot im Ammoniummedium als C- und N-Quelle verwerten kann. Somit bestehen Parallelen zu der Studie von El-Deek et al., die mehrere Hefen identifizierten, welche Harnsäure aus Hühnerexkrementen als C- und N-Quelle nutzen können.[403]

Bei der Zudosierung von Hühnertrockenkot muss beachtet werden, dass möglicherweise neue Mikroorganismenspezies in den Biorieselbettreaktor gelangen, die eine Veränderung der Ammoniumabbaurate hervorrufen könnten. In der Literatur ist beschrieben, dass insbesondere humanpathogene Arten der Gattungen *Campylobacter*, *Clostridium*, *Listeria*, *Salmonella* sowie *Staphylococcus* in Hühnermist und darauf basierenden organischen Düngern enthalten sind.[412] Die metabolische Aktivität der Pathogene wird von weiteren Spezies des jeweiligen Mikrobioms beeinflusst, wobei eine Gesamtkeimzahl von bis zu 10^{10} KbE/g vorliegen kann.[412] Den Großteil der Mikroorganismen stellen mit rund 90 % Gram-positive Bakterien dar.[412] Allerdings wird durch eine thermische Vorbehandlung des Hühnerkots die Anzahl an vegetativen Zellen deutlich reduziert, solange eine ausreichende hohe Trocknungstemperatur und -dauer gewährleistet werden.[412–415] Es ist somit bei Verwendung von getrocknetem Hühnerkot nur mit marginalen Auswirkungen auf die Mikroorganismenzusammensetzung im Biorieselbettreaktor zu rechnen.

4.5 Alternative Strategien zur Minderung von Ammoniakemissionen

Während sich das vorherige Kapitel mit der Freisetzung von Ammonium aus Hühnertrockenkot als N-Quelle für die Mikroorganismen im Biorieselbettreaktor beschäftigte, lassen sich zur Emissionsminderung auch alternative Strategien anwenden.[416] Bei ganzheitlicher Betrachtung der Problematik von Ammoniakemissionen bei Geflügelställen kann unter anderem die Fütterungsstrategie der Masttiere als Ausgangspunkt gewählt werden, um die Schadstoffbelastung *ab initio* zu reduzieren.[416] Beispielsweise kann durch eine Senkung des Rohproteingehaltes des Tierfutters die Konzentration an gasförmigem Ammoniak in Geflügelställen signifikant reduziert werden.[416] So führte in einer Studie von van Emous et al. die Verringerung des Rohproteingehaltes um 15 g/kg des Futters bei Masthühnern zu einer Abnahme der Ammoniakemissionen um 9 %.[417] Die Proben aus Einstreu und Exkrementen der Tiere wiesen zudem einen geringeren Gesamt- und Ammonium-Stickstoffgehalt auf, wodurch sich die Emissionsminderung erklären lässt.[417] Summers konnte durch Senkung des Proteingehaltes bei Futtermitteln für Legehennen von 19 % auf 5 % die Stickstoffexkretion um bis zu 50 % verringern.[418] Allerdings muss beachtet werden, dass sich ein reduzierter Rohproteingehalt negativ auf das Wachstum von Masthähnchen auswirken kann.[419]

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verabreichung von exogenen Enzymen, die im Falle von Proteasen eine Hydrolyse von Proteinen im Gastrointestinaltrakt bewirken und dadurch die Resorption von Aminosäuren oder Oligopeptiden im Dünndarm fördern.[420–422] Auf diese Weise lässt sich die Exkretion von unverdauten Proteinen im Vergleich zu Tieren mit ausschließlich endogenen Enzymen deutlich reduzieren.[420] Dies führt letztendlich zu einem verminderten Gehalt an stickstoffhaltigen Ausscheidungsprodukten, sodass eine geringere Menge an Ammoniak bei der mikrobiellen Verstoffwechselung resultiert.[47, 420] Die Aufnahme exogener Proteasen mit der Nahrung kann bei Masthühnern zudem die Aktivität endogener Peptidasen erhöhen, die sowohl Proteine aus dem Futter als auch Trypsin-Inhibitoren hydrolysieren und damit ebenfalls zu einer reduzierten Exkretion von Stickstoffverbindungen beitragen.[423] Neben Proteasen werden auch Glycosidasen, beispielsweise Xylanasen und β-Glucanasen, als Futtermittelzusätze eingesetzt, da sie aufgrund der Hydrolyse von Polysacchariden die Viskosität des Chymus verrringern und so den Stoffaustausch im Gastrointestinaltrakt beschleunigen.[409] Auf diese Weise lässt sich zudem die Bioverfügbarkeit von Proteinen steigern, die mit zellwandbildenden Polysacchariden wie Cellulose assoziiert sind und durch β-Glucanasen freigesetzt werden.[409] Auch die Zusammensetzung des Mikrobioms im Verdauungstrakt von Masthühnern wird infolge der chemisch-physikalischen Effekte nach Zugabe exogener Enzyme indirekt verändert, was die Resorption von Nährstoffen positiv beeinflussen kann.[424, 425]

Alternativ stellt der Einsatz von Probiotika eine gezielte Intervention dar, um das Mikrobiom von Geflügel zur Minderung der Ammoniakemissionen zu modulieren.[11] Eine Studie von Mi et al. zeigt, dass ein mikrobielles Konsortium aus einer Pilzart (*Pichia guilliermondii*) und zwei Bakterienspezies (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*) die Freisetzung von Ammoniak um 43 % im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzieren kann.[426] Allerdings gilt es zu beachten, dass die Daten lediglich auf einer *in-vitro*-Fermentation der Ausscheidungsprodukte von

Legehennen beruhen.[426] Dagegen konnten Liu et al. die ammoniakreduzierende Wirkung von probiotischen Mikroorganismen auch *in vivo* an Masthühern belegen.[427] Dabei führte die Verabreichung von *Lactobacillus plantarum* als Probiotikum zu einer Senkung der Ammoniakemissionen im Geflügelstall um 30 % relativ zur Kontrollgruppe.[427] Diese Wirkung kann durch eine signifikante Reduzierung der Harnstoff- und Ammoniakkonzentration im Serum sowie des Ureasegehaltes im Faeces erklärt werden, die nach der Besiedelung des Gastrointestinaltraktes mit den probiotischen Bakterien resultiert.[427] Zudem wurde eine Inhibition ureaseproduzierender Mikroorganismen im Dünndarm infolge der Sekretion antimikrobieller Substanzen wie Mersacidin durch Probiotika festgestellt.[427, 428] Auch auf diese Weise lässt sich die Freisetzung von Ammoniak unterbinden, da die Hydrolyse von Harnstoff gehemmt wird.[47] Eine weitere wichtige Rolle spielt die Senkung des pH-Wertes im Dünndarm und Faeces durch *Lactobacillus plantarum*, welche sich auf die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, Short-Chain Fatty Acids) oder die homofermentative Milchsäuregärung zurückführen lässt.[429, 430] Neben der Inhibition von Pathogenen wird dadurch auch das Entweichen von gasförmigem Ammoniak reduziert, nachdem eine Verringerung des pH-Wertes das chemische Gleichgewicht in Richtung von Ammonium verschiebt.[30, 430]

Zusätzlich zu Probiotika sind auch Kombinationspräparate von Mikroorganismen und mineralischen Trägermaterialien Gegenstand der Forschung zur Minderung von Ammoniakemissionen in Geflügelställen.[431–434] Beispielsweise konnten Borowski et al. nachweisen, dass die Zugabe von sechs sprühgetrockneten Bakterienarten und einer Perlit-Bentonit-Mischung zu frischem Geflügelmist die Konzentration von Ammoniak im Modellstall um 94 % reduziert.[431] Gleichzeitig wurde die Freisetzung von Schwefelwasserstoff um 60 % verringert, sodass eine erhebliche Verbesserung der Geruchsbelastung nach Zusatz des Kombinationspräparates resultierte.[431] Die Emissionsminderung beruht neben den bereits beschriebenen Wirkmechanismen von Mikroorganismen auf der Adsorption von Ammoniak und Schwefelwasserstoff durch die mineralischen Trägermaterialien.[431, 435] Abgesehen von Perlit und Bentonit besitzt vor allem Zeolith eine hohe Adsorptionskapazität für Ammoniak und besonders Ammonium, da dieses über eine poröse dreidimensionale Netzwerkstruktur mit negativen Ladungen ver-fügt.[435] Chemisch handelt es sich bei Zeolith um Alumosilicat, das natürlicherweise gebundene Kationen wie Natrium enthält, die jedoch durch Ammonium ersetzt werden können.[435] Dabei besitzt natürliches Zeolith eine Adsorptionskapazität von 2,7 – 30,6 mg Ammonium bezogen auf 1 g des mineralischen Trägermaterials.[436] Nachdem der Maximalwert an adsorbiertem Ammonium erreicht wurde, muss eine Regeneration erfolgen, die sich beispielsweise durch eine Suspension mit nitrifizierenden Bakterien realisieren lässt.[437]

Die Sprühtrocknung, welche bei der Herstellung des Kombinationspräparates von Borowski et al. zum Einsatz kam,[431] wurde auch im Rahmen der Dissertation zur Konservierung von Mikroorganismen eingesetzt. Die Ergebnisse und deren Diskussion können dem nachfolgenden Kapitel entnommen werden.

4.6 Konservierung von Bakterien durch Sprühtrocknung

Um die Inokulation und Inbetriebnahme von Biorieselbettreaktoren zum Abbau von Ammonium zu erleichtern, wurde die Sprühtrocknung als Verfahren zur Herstellung einer Starterkultur am Beispiel der Bakterienart *Kocuria rhizophila* angewandt. Wie bereits in Kap. 4.1.1 beschrieben, weist diese Spezies eine hohe Ammoniumabbaurate auf und wurde deshalb als Vertreter der Gram-positiven Bakterien für das mikrobielle Konsortium ausgewählt. Vor der Sprühtrocknung erfolgte zunächst eine Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Zellen unter Berücksichtigung verschiedener Schutzsubstanzen. Im Anschluss wurde die Überlebensrate der Bakterien unmittelbar nach der Sprühtrocknung sowie im Laufe einer 52 Wochen umfassenden Lagerung bei 4 °C unter Einsatz der Schutzsubstanzen und einer Negativkontrolle untersucht. Die nachfolgenden Inhalte basieren auf der Publikation „Preservation of *Kocuria rhizophila* DSM 348 by spray drying using different protective agents for improvement of bacterial viability“, die in der Zeitschrift Drying Technology am 13.04.2024 online veröffentlicht wurde.[168] Die Implementierung in die Dissertation erfolgt mit ausdrücklicher Genehmigung des Urheberrechtsinhabers (Informa UK Limited, Taylor & Francis Group).

4.6.1 Wachstumskurve

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten von *K. rhizophila* in flüssigem YPD-Medium und Adaptionsmedien analysiert, um die optimale Kultivierungsdauer im Hinblick auf eine hohe Biomasseausbeute für die Sprühtrocknungsexperimente zu ermitteln. Abb. 58 veranschaulicht die Entwicklung der Lebendzellzahl in den verschiedenen Ansätzen im Laufe der Zeit.

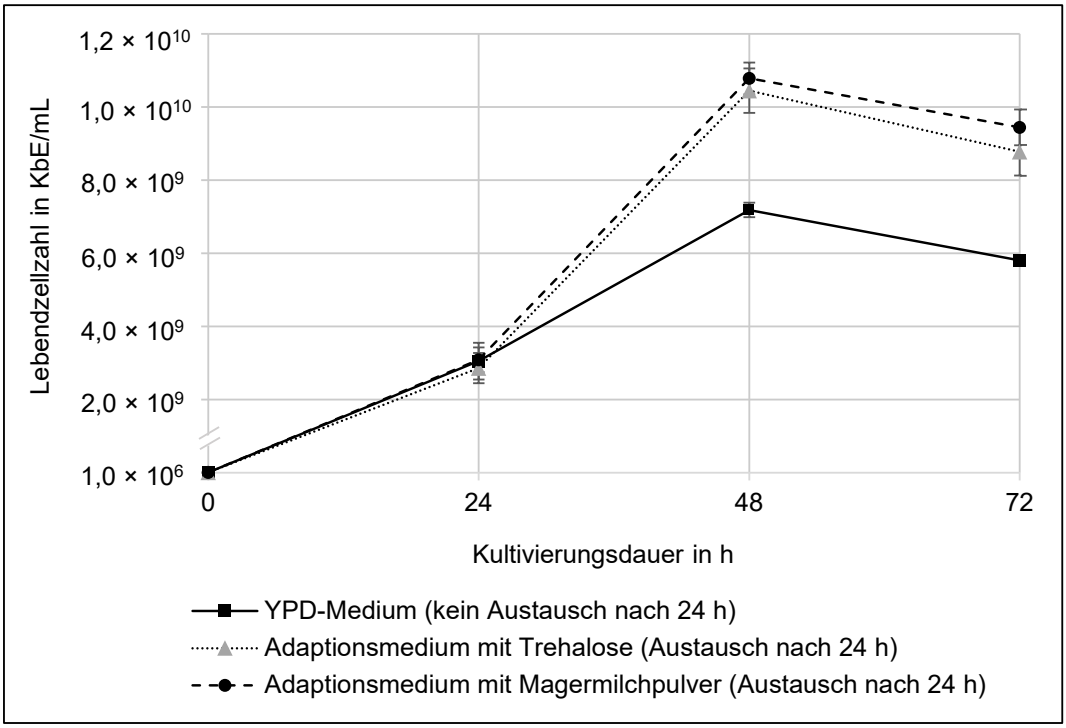

Abb. 58: Wachstumskurve von *Kocuria rhizophila* in YPD-Medium und Adaptionsmedien. Bei den Adaptionsmedien wurde im Zeitraum von 0 bis 24 h ebenfalls YPD-Medium für die Kultivierung eingesetzt. Nach 24 h erfolgte ein Austausch durch das jeweilige Adaptionsmedium. Die Inkubation erfolgte bei 150 rpm und 28 °C. n = 3.

In den ersten 24 h nach Beginn der Kultivierung ist kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Ansätzen erkennbar. Dies kann damit begründet werden, dass am Anfang die gleichen Nährstoffkonzentrationen vorliegen, da die Adaptionsmedien im Zeitraum von 0 bis 24 h die identische Zusammensetzung wie YPD-Medium besitzen. Somit waren zu Beginn gleiche Bedingungen für das mikrobielle Wachstum vorhanden. Bei den Adaptionsmedien erfolgte ein Austausch der flüssigen Phase nach einer Inkubationsdauer von 24 h, um eine Akkumulation der Schutzsubstanzen in den Zellen zu ermöglichen, da dies gemäß der Literatur die Überlebensrate nach der Sprühtrocknung positiv beeinflusst.[438–441]

Die maximale Zellkonzentration wurde 48 h nach der Inokulation erreicht. Vermutlich tritt die Population zu diesem Zeitpunkt in die stationäre Phase ein oder befindet sich in der späten exponentiellen Phase. Nach 72 h nimmt die Zellzahl im Vergleich zum vorherigen Wert ab, was auf einen Übergang in die Absterbephase hindeutet. Basierend auf der Wachstumskurve liefert eine Separation der Biomasse nach 48 h die maximale Ausbeute an vitalen Bakterien. Beide Adaptionsmedien zeichnen sich durch eine ähnliche Zellkonzentration aus, die nach 48 h und 72 h deutlich höher ist als im YPD-Medium. Der positive Effekt auf das mikrobielle Wachstum lässt sich mit dem Austausch der flüssigen Phase nach 24 h erklären, wodurch den Bakterien zusätzliche Nährstoffe zur Verfügung gestellt werden. Abb. 58 zeigt, dass das Wachstum in den Adaptionsmedien nicht von der jeweiligen Schutzsubstanz abhängt, da kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Trehalose und Magermilchpulver hinsichtlich der Zellkonzentrationen nach 24 h und 72 h festgestellt wurde.

Gemäß der Literatur ist *K. rhizophila* nicht in der Lage, die Disaccharide Trehalose und Lactose als Substrate für die Säureproduktion zu nutzen.[254] Nachdem Magermilchpulver zu 51 – 57 % aus Lactose besteht, ist dieser Anteil für die Bakterien nicht bioverfügbar.[442] Dies ist im Falle der Konservierung von Vorteil, um eine Verstoffwechselung der Schutzsubstanzen zu vermeiden. Vor diesen Hintergrund kann geschlussfolgert werden, dass die Erhöhung der Zellkonzentration in den Adaptionsmedien aus den Nährstoffen Hefe-Extrakt, Pepton und Glucose resultiert, die im YPD-Medium enthalten waren und als Substrate für *K. rhizophila* geeignet sind. Timkina et al.[443] beobachteten bei zwei Arten der Gattung *Kocuria*, die aus Radon-Quellwasser gewonnen wurden, ebenfalls ein maximales Wachstum nach einer Kultivierungsdauer von 48 h, wobei die Inkubation in einem Rotationsschüttler bei 150 rpm und 30 °C in LB-Medium erfolgte.

4.6.2 Einfluss der Kultivierungsdauer

Nach der Bewertung des mikrobiellen Wachstums wurden Sprühtrocknungsexperimente durchgeführt, wobei der Fokus auf der Kultivierungszeit der Mikroorganismen lag. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, erreichte die Zellkonzentration nach 48 h Inkubation ein Maximum, was auf eine hohe Ausbeute an Biomasse hinweist. Darüber hinaus wurde ein weiterer Zeitpunkt während der Kultivierung ausgewählt, um die Zellen zu separieren. Aus Abb. 58 geht hervor, dass die Bakterien nach 72 h Kultivierung die Absterbephase erreichen. Daher könnte die Verwendung der entsprechenden Kultur negative Auswirkungen auf die Überlebensrate der Zellen während der Sprühtrocknung haben. Mikroorganismen, die bereits Zellschäden aufgrund von Nährstoffmangel oder der Akkumulation von toxischen Metaboliten

besitzen, reagieren grundsätzlich empfindlicher gegenüber durch Hitze und Austrocknung verursachtem Stress, was zu verringerten Überlebensraten führt.[90] Um eine möglichst hohe Viabilität zu gewährleisten, wurden die Kulturen nach einer Inkubationsdauer von 72 h nicht für die Sprühtrocknungsexperimente verwendet. Stattdessen wurden Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase nach 24 h eingesetzt, auch wenn in diesem Fall eine geringere Ausbeute an Biomasse vorlag – wie bereits in Abb. 58 anhand der Zellkonzentration beschrieben wurde.

Abb. 59 veranschaulicht die Überlebensrate, den Wassergehalt und die Austrittstemperatur, um die beiden ausgewählten Kultivierungsdauern zu vergleichen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung basierend auf einer Dreifachbestimmung gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensrate der Bakterien, die 11,1 % ± 1,6 % nach 24 h und 9,8 % ± 2,9 % nach 48 h beträgt. Bei der Interpretation der genannten Prozentwerte muss berücksichtigt werden, dass die absolute Anzahl der vor der Sprühtrocknung in Phosphatpuffer resuspendierten Bakterien nach einer Kultivierungsdauer von 48 h höher war als nach 24 h, wie anhand der Wachstumskurve in Abb. 58 ersichtlich ist.

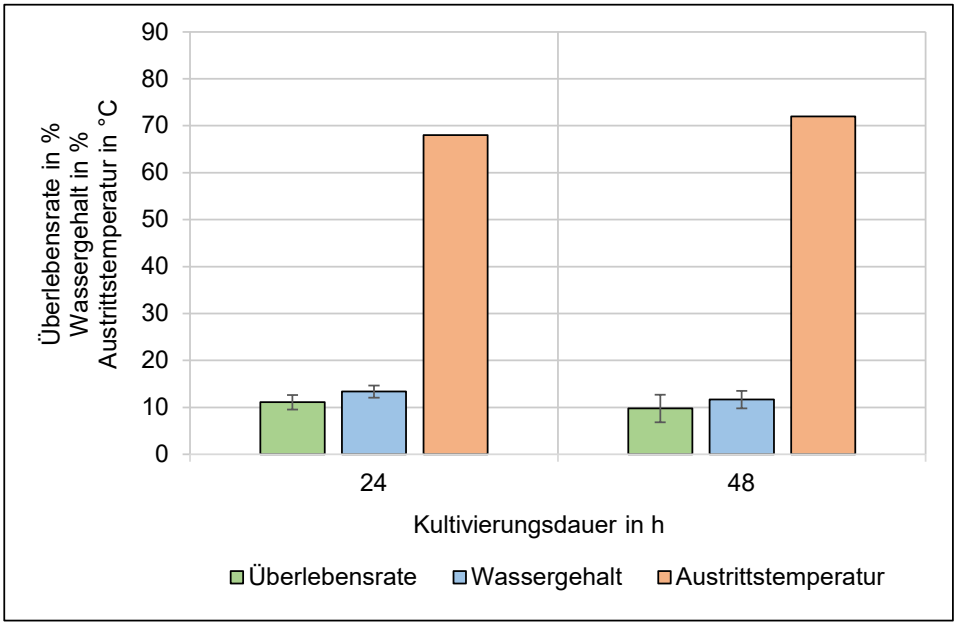

Abb. 59: Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Überlebensrate von *Kocuria rhizophila*, den Wassergehalt und die Austrittstemperatur. Die Sprühtrocknung erfolgte bei einer Eintrittstemperatur von 140 °C. Als Medium diente Phosphatpuffer. *n* = 3.

Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass die Konzentration der Mikroorganismen, die im flüssigen Medium für die Sprühtrocknung enthalten sind, die Überlebensrate nach der Sprühtrocknung beeinflusst. Die Erhöhung der Zellzahl von *Lactobacillus rhamnosus* GG von 10^9 KbE/mL auf 10^{10} KbE/mL in phosphatgepufferter Kochsalzlösung führte zu einer signifikant niedrigeren Überlebensrate.[101] Der Effekt der Zellkonzentration auf die Überlebensfähigkeit nach der Sprühtrocknung hängt jedoch von verschiedenen Parametern ab, z. B. der Mikroorganismenspezies oder der Zusammensetzung der Trocknungs- und Rehydratisierungsmedien.[101] Experimente mit *Pediococcus acidilactici* CFR2193 zeigten, dass eine Erhöhung der Zellkonzentration von 1 % (w/v) auf 5 % (w/v) zu einer Abnahme der

Überlebensrate führte, solange Maltodextrin als Trägermaterial verwendet wurde.[444] Fettfreie Magermilch führte im Gegensatz zu Maltodextrin nicht zu einer geringeren Viabilität der Bakterien, wenn die Zellkonzentration erhöht wurde.[444] Die Verwendung einer Kultur aus der stationären Phase hat gemäß der Literatur einen positiven Einfluss auf die Überlebensrate von Milchsäurebakterien nach der Sprühtrocknung.[90] Es wird davon ausgegangen, dass Mikroorganismen im Hungerzustand widerstandsfähiger gegenüber osmotischem und thermischem Stress werden.[90] In der vorliegenden Arbeit beeinflussten die Anzahl der Bakterien im Sprühtrocknungsmedium sowie die Wachstumsphase zum Zeitpunkt der Zellseparation die Überlebensrate nicht signifikant bei Verwendung von Phosphatpuffer als Resuspensionsmedium. Da die experimentellen Bedingungen, wie Mikroorganismenspezies, Zellkonzentration, Volumenstrom des Sprühtrockungsmediums und Eintrittstemperatur von der Literatur abweichen, erscheinen die beobachteten Unterschiede plausibel.[90, 101, 444]

Der Wassergehalt der sprühgetrockneten Pulver mit *K. rhizophila* zeigt keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, da Werte von 13,4 % ± 1,3 % nach 24 h und 11,7 % ± 1,9 % nach 48 h vorlagen. Nachdem die Bakterien in flüssigem YPD-Medium kultiviert und in Phosphatpuffer resuspendiert wurden, betrug der Wassergehalt vor der Sprühtrocknung mindestens 95 %. Durch die Sprühtrocknung erfolgte somit eine deutliche Reduzierung des Wassergehaltes, die zur Inaktivierung von Mikroorganismen führte, was anhand der Überlebensrate von rund 10 % ersichtlich ist. Folglich wurden ca. 90 % der Zellen durch Dehydratisierung oder thermische Denaturierung inaktiviert, welche die Hauptursachen für die Inaktivierung bei der Sprühtrocknung darstellen.[107, 108] Broeckx et al. beobachteten einen geringeren Wassergehalt (3,95 – 6,75 %) bei Pulvern mit *L. rhamnosus* GG, jedoch muss beachtet werden, dass Abweichungen hinsichtlich des Volumenstroms des flüssigen Mediums, der Eintrittstemperatur und des Volumenstroms der Trocknungsluft im Vergleich zur vorliegenden Arbeit existieren.[101] Shokri et al. erzielten ähnliche Ergebnisse für den Wassergehalt (3,30 – 7,19 %) nach der Sprühtrocknung von *Bifidobacterium bifidum*.[445] Experimente von Slavutsky et al. mit *L. acidophilus* führten zu sprühgetrockneten Pulvern mit einem Wassergehalt von 5,41 – 10,35 %.[446] Grundsätzlich wird der Wassergehalt als ein wichtiger Parameter für die Stabilität von getrockneten Mikroorganismenkulturen betrachtet, wobei optimale Werte von der Lageratmosphäre und der Bakterienart abhängen.[90] Für die Konservierung von mikrobiellen Zellen in getrockneten Milchprodukten wird ein Wassergehalt von 4 % empfohlen.[90] Im Vergleich zu Literaturwerten[90, 101, 105, 445] weisen die im Rahmen der Dissertation sprühgetrockneten Pulver mit 10 % einen relativ hohen Wassergehalt auf. Nachdem dies vor allem für die Lagerungsversuche relevant ist, erfolgt die Diskussion in Kap. 4.6.4.

Für beide Zellsuspensionen wurde dieselbe Eintrittstemperatur von 140 °C verwendet, was zu leicht unterschiedlichen Austrittstemperaturen mit Werten von 68 °C nach 24 h und 72 °C nach 48 h führt. Die Standardabweichung lag in beiden Fällen bei 0. Die resultierenden Austrittstemperaturen liegen im Bereich von 60 – 80 °C, was bei Betrachtung von Milchsäurebakterien zu einer guten Überlebensfähigkeit führt.[90] Da nach der Zentrifugation für jede Probe dasselbe Resuspensionsmedium verwendet wurde, ist die um 4 °C höhere Austrittstemperatur vermutlich auf einen erhöhten Feststoffgehalt infolge der gesteigerten Zellzahl nach 48 h zurückzuführen.

Diese Hypothese wird durch die Masse des aus dem Zyklon entnommenen Pulvers unterstützt, die 0,8874 g ± 0,0745 g nach 24 h und 2,1158 g ± 0,1785 g nach 48 h betrug. Basierend auf den Mittelwerten der Masse kann geschlussfolgert werden, dass nach einer Kultivierungsdauer von 48 h die Ausbeute um den Faktor 2,4 im Vergleich zu 24 h gesteigert wird. Broeckx et al. beobachteten ebenfalls eine Zunahme der Ausbeute bei der Sprühtrocknung von Medien mit höheren Zellkonzentrationen.[101] Eine Steigerung der Zellkonzentration um den Faktor 8 führte zu einer 2,6-mal höheren Ausbeute an getrockneten Feststoffen.[101]

4.6.3 Einfluss der Eintrittstemperatur

Nach der Untersuchung der Kultivierungsdauer wurde der Einfluss der Eintrittstemperatur auf die Prozessparameter getestet. Die Sprühtrocknung erfolgte mit Bakterienkulturen, die 48 h lang inkubiert wurden, um im Vergleich zu 24 h eine höhere Ausbeute zu erzielen. Die Ergebnisse für die drei getesteten Eintrittstemperaturen sind in Abb. 60 veranschaulicht.

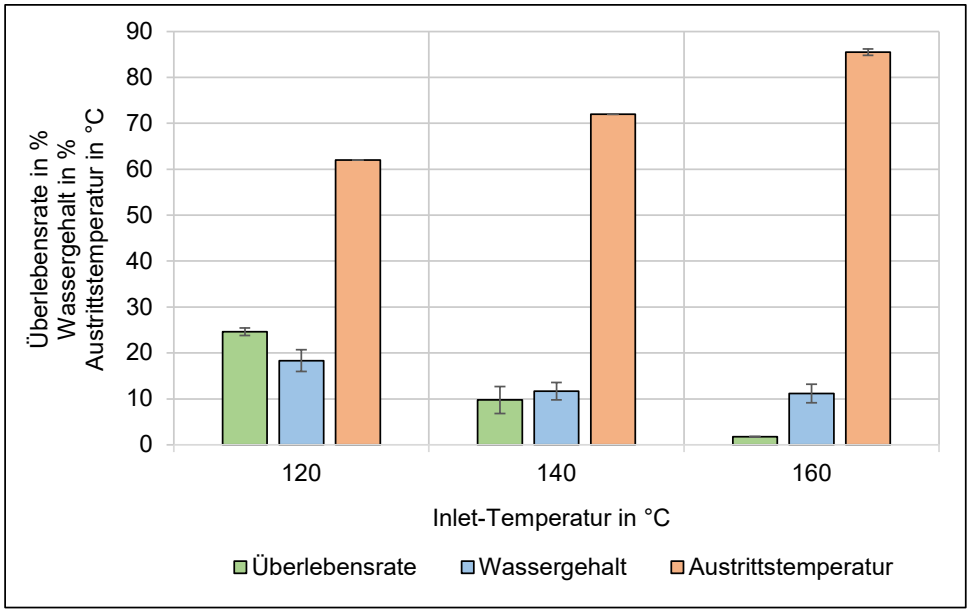

Abb. 60: Einfluss der Eintrittstemperatur auf die Überlebensrate von *Kocuria rhizophila*, den Wassergehalt und die Austrittstemperatur. Die Sprühtrocknung erfolgte nach einer Kultivierungsdauer von 48 h. Als Medium diente Phosphatpuffer. *n* = 3.

Den Daten zufolge nimmt die Überlebensrate mit steigender Eintrittstemperatur signifikant ab. Die höchste Überlebensrate liegt mit 24,6 % ± 0,8 % bei 120 °C vor. Eine Erhöhung der Eintrittstemperatur um 20 °C führt zu einer Reduzierung des Anteils lebender Zellen auf 9,8 % ± 2,9 %. Die geringste Überlebensrate (1,8 % ± 0,1 %) wurde bei der höchsten Eintrittstemperatur (160 °C) beobachtet. Eine Abnahme des Anteils vitaler Mikroorganismen mit steigender Eintrittstemperatur wurde bereits von anderen Autoren beschrieben.[90, 101] Der Anstieg der Austrittstemperatur mit zunehmender Eintrittstemperatur ist ebenfalls plausibel und entspricht der Literatur.[90] Die Lufttemperatur, die nach der Verdunstung von Wasser im Sprühtrockner resultiert, gilt als entscheidender Einflussfaktor auf die Überlebensrate von Bakterien. Gemäß der Literatur führt eine Reduzierung der Eintrittstemperatur zu einer Zunahme des Wassergehalts, was sich negativ auf die Überlebensrate bei der Lagerung von

sprühgetrockneten Pulvern auswirkt. Eine Abnahme des Feuchtigkeitsgehaltes reduziert dagegen die Geschwindigkeit der mikrobiellen Inaktivierung, wobei für getrocknete Milchprodukte ein Wassergehalt von 4 % optimal ist.[90] Eine geringe Wasseraktivität, die messtechnisch durch den a_w-Wert erfasst werden kann, verlangsamt die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen, die zum Zelltod führen, z. B. die Oxidation von Lipiden.[446] Deshalb wird die Überlebensrate sprühgetrockneter Bakterien in diesem Fall positiv beeinflusst.[446]

Unter Berücksichtigung der Entwicklung des Wassergehaltes (siehe Abb. 60) liegt kein signifikanter Unterschied zwischen einer Eintrittstemperatur von 140 °C und 160 °C vor. Aufgrund der deutlich höheren Überlebensrate wurde entschieden, die Sprühtrocknung für die folgenden Lagerungsexperimente bei 140 °C durchzuführen. Obwohl eine Eintrittstemperatur von 120 °C laut den in Abb. 60 gezeigten Daten zu einer noch höheren Überlebensrate führt, muss berücksichtigt werden, dass sich unter diesen Bedingungen der Wassergehalt auf 18,3 % ± 2,4 % erhöht. Da dieser Wert als zu hoch betrachtet wird, um gemäß der Literatur eine ausreichende Lagerstabilität der Bakterien in Pulverform zu gewährleisten, wurde eine Eintrittstemperatur von 120 °C nicht für weitere Sprühtrocknungsexperimente eingesetzt.[90, 101, 105, 445] Um den Wassergehalt des sprühgetrockneten Pulvers zu reduzieren, könnte alternativ eine Nachbehandlung erfolgen. Beispielsweise kann ein Sprühtrockner mit einem Wirbelschichttrockner kombiniert werden, um ein agglomeriertes Pulver mit einem geringen Wassergehalt und vorteilhaften Eigenschaften hinsichtlich der Rehydratisierung zu produzieren.[90]

4.6.4 Einfluss der Schutzsubstanzen

Um die Überlebensrate von *K. rhizophila* zu erhöhen, wurden während der Kultivierung bzw. zum Resuspendieren der Zellen vor der Sprühtrocknung die Schutzsubstanzen Trehalose + MSG und Magermilchpulver + MSG eingesetzt, Phosphate dienten als Negativkontrolle. Abb. 61 vergleicht die verschiedenen Ansätze anhand von drei Messgrößen.

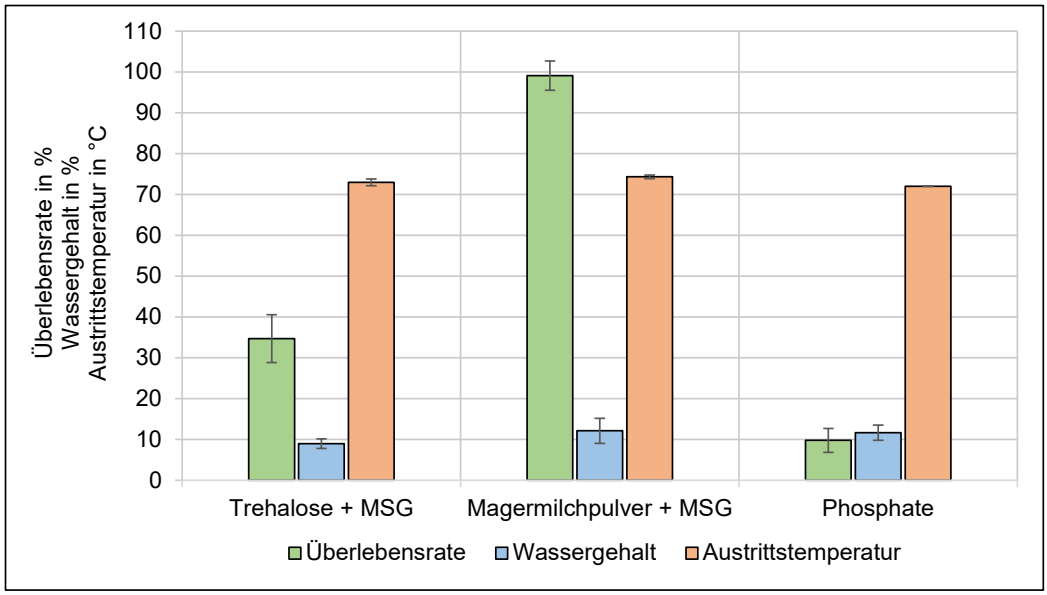

Abb. 61: Einfluss der Schutzsubstanzen auf die Überlebensrate von *Kocuria rhizophila*, den Wassergehalt und die Austrittstemperatur. Die Sprühtrocknung erfolgte nach einer Kultivierungsdauer von 48 h bei einer Eintrittstemperatur von 140 °C. Phosphate wurden als Negativkontrolle eingesetzt. *n* = 3.

Im Vergleich zum Ansatz mit Phosphaten wird die Überlebensrate durch die Schutzsubstanzen signifikant erhöht. Magermilchpulver + MSG erzielt mit 99,1 % ± 3,6 % eine bessere Überlebensrate als Trehalose + MSG (34,7 % ± 5,9 %). Die Zugabe von Phosphaten führt dagegen zu einem geringeren Anteil vitaler Zellen, der 9,8 % ± 2,9 % beträgt. Die Zellmorphologie wurde durch die Zusatzstoffe (Trehalose, MSG, Magermilchpulver, Phosphate) in den drei Ansätzen nicht beeinflusst. Die Bakterien waren als nicht-motile Kokken mit einem Durchmesser von etwa 1 µm sichtbar, sodass eine Übereinstimmung mit der morphologischen Beschreibung der Spezies vorliegt.[254] Da *K. rhizophila* kein sporenbildendes Bakterium ist, kann eine Verfälschung der Überlebensrate durch Sporen ausgeschlossen werden.[254, 447–449] Der pH-Wert der Zellsuspensionen 48 h nach Beginn der Kultivierung wurde durch den Austausch der flüssigen Phase deutlich beeinflusst. Dabei führte der Austausch durch Medium mit Trehalose + MSG, Magermilchpulver + MSG bzw. Phosphaten zu pH-Werten von 5,9, 6,4 bzw. 6,8. Nachdem das Kulturmedium vor dem Austausch einen pH-Wert von 4,5 aufwies, könnte sich die Substitution der flüssigen Phase positiv auf die Bakterienzellen ausgewirkt haben, da ein pH-Wert-Bereich von 5,7 bis 7,5 ideal für das Wachstum von *K. rhizophila* ist.[254]

Magermilchpulver gilt als eine der wirksamsten Schutzsubstanzen, um die Überlebensrate von Bakterien während und nach der Sprühtrocknung zu erhöhen, da es größtenteils aus Proteinen (33 – 37 %) und Lactose (51 – 57 %) besteht.[442] Auf molekularer Ebene interagieren die Proteine und Disaccharide mit den Komponenten der Zellmembran, wodurch eine stabilisierende Wirkung resultiert.[450, 451] Die erfolgreiche Anwendung von Magermilchpulver zur Sprühtrocknung von Milchsäurebakterien ist in der Literatur mehrfach beschrieben.[452–457] Die Überlebensrate von *L. acidophilus* NCIMB 701748 konnte durch Magermilchpulver von 0,44 % ± 0,03 % (mit 100 % Maltodextrin) auf 19,2 % ± 3,7 % mit einer Mischung aus 70 % Maltodextrin und 30 % Magermilchpulver gesteigert werden.[452] Experimente mit *L. acidophilus* FTDC 3081 lieferten eine Überlebensrate von 70 % unter Einsatz von Magermilchpulver (200 g/L) im Vergleich zu 25 % ohne Zugabe von Schutzsubstanzen.[453]

Die Überlebensrate von *K. rhizophila* mit Magermilchpulver ist in der vorliegenden Arbeit höher als die von Milchsäurebakterien in der Literatur.[452, 453] Es ist jedoch zu beachten, dass Magermilchpulver bereits während der Kultivierung hinzugefügt und mit einer anderen Schutzsubstanz (MSG) kombiniert wurde. Wahrscheinlich resultierte aus dieser Behandlung eine synergistische positive Wirkung, welche die Überlebensrate erhöhte. Die Zugabe von MSG führte auch bei den Milchsäurebakterien *L. rhamnosus* GG und *L. rhamnosus* E-97800 zu einer verbesserten Viabilität.[439] Experimente mit *L. casei* LK-1 zeigten eine verbesserte Schutzwirkung durch Magermilch im Vergleich zu Trehalose, was mit den Ergebnissen der Dissertation übereinstimmt.[458] Neben Magermilchpulver finden auch Molkenproteine Verwendung als milchbasierte Schutzsubstanzen zur Sprühtrocknung verschiedener Mikroorganismen.[456, 459–461]

Trehalose wurde ebenfalls von mehreren Autoren als Schutzsubstanz für die Sprühtrocknung von Bakterien verwendet.[438, 462] Die Überlebensrate von *L. plantarum* TISTR 2075 wurde durch Zugabe von Trehalose (50 g/L) zu den resuspendierten Mikroorganismen von 0,1 % auf 25 % gesteigert.[462] Auch die Viabilität von *L. rhamnosus* GG nach der Sprühtrocknung konnte positiv durch Trehalose beeinflusst werden, bei einer Konzentration von 20 % (w/w) resultierte eine Überlebensrate von 69 %.[438] Die Zugabe von 12,5 g/L MSG in Kombination mit 20 % (w/w) Trehalose führte zu einer weiteren Erhöhung der Überlebensrate auf 81 %.[438]

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (0,23 g/L NaH_2PO_4 + 1,23 g/L Na_2HPO_4 + 8,2 g/L NaCl), die von Broeckx et al. als Sprühtrocknungsmedium eingesetzt wurde, hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf die Überlebensrate von *L. rhamnosus* GG im Vergleich zu isotonischer Kochsalzlösung (9 g/L NaCl).[100] Die phosphatgepufferte Kochsalzlösung führte zu einer Reduzierung der Viabilität um 0,54 log-Stufen nach der Sprühtrocknung, während die isotonische Kochsalzlösung die Lebendkeimzahl um 1,89 log-Stufen verringerte.[100] Aus diesem Grund wird vermutet, dass anorganische Phosphate eine stabilisierende Wirkung bei der Sprühtrocknung von Bakterien besitzen. Auf zellulärer Ebene könnte der positive Einfluss auf die Viabilität mit der Anreicherung von Polyphosphaten durch Bakterien sowie mit der Pufferkapazität von Phosphaten zur Stabilisierung des pH-Wertes und des osmotischen Gleichgewichtes zusammenhängen.[100] Auch eine Substitution von Wassermolekülen im hydrophilen Bereich der Cytoplasmamembran, die in Abb. 14 veranschaulicht wurde, ist denkbar, da gelöste Phosphate mit Phospholipiden interagieren.[112] In Abhängigkeit der Protonierung der beteiligten funktionellen Gruppen können dabei verschiedene Arten von intermolekularen Wechselwirkungen auftreten.[26] Beispielsweise könnten Dihydrogenphosphationen durch die positiv polarisierten H-Atome Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Phospholipid eingehen, die über ein freies Elektronenpaar von O-Atomen der Phosphatgruppe zustande kommen.[26] Auch elektrostatische Wechselwirkungen von teilweise deprotonierten, negativ geladenen Phosphationen ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}, PO_4^{3-}) sind im Falle von positiv geladenen Phospholipiden möglich.[26] Ein Beispiel hierfür stellt Phosphatidylcholin dar, das als quartäre Ammoniumverbindung eine permanente positive Ladung am N-Atom trägt und auch in der Cytoplasmamembran von Bakterien vorkommen kann.[26, 463] Im Falle von *K. rhizophila* wurde bisher nur Phosphatidylglycerol als Membranlipid nachgewiesen, das über freie OH-Gruppen Wasserstoffbrückenbindungen zu Phosphat ausbilden kann.[26, 254]

Im Gegensatz zu Milchpulver und Trehalose kann sich der Zusatz von Phosphatsalzen in Verbindung mit geeigneten Mikroorganismen positiv auf das Wachstum von Pflanzen auswirken.[464] Beispielsweise setzten Azaroual et al. ein phosphathaltiges natürliches Mineral (Phosphorit) in einer Konzentration von 5 % bei der Sprühtrocknung von *Bacillus* spp. ein, wobei zusätzlich Maltodextrin (2 – 10 %) und Natriumalginat (2 %) als Schutzsubstanzen dienten.[465] Unter optimalen Bedingungen, die unter anderem eine höhere Eintrittstemperatur als bei den Experimenten mit *K. rhizophila* (155 °C anstatt 140 °C) umfassen, wurde eine Überlebensrate von 64,18 % unmittelbar nach der Sprühtrocknung ermittelt.[465] Dabei muss jedoch beachtet werden, dass das enthaltene Phosphorit nicht als Schutzsubstanz eingesetzt wurde.[465] Stattdessen dient dieses als Edukt zur Solubilisierung von Phosphat durch die Bakterien, die mithilfe organischer Säuren die Bioverfügbarkeit für Pflanzen erhöhen.[464, 465]

Neben Bakterien wurden auch eukaryotische Mikroorganismen von mehreren Autoren sprühgetrocknet, z. B. Hefen als biologische Pflanzenschutzmittel zur Bekämpfung von Phytopathogenen.[105, 106, 466] Im Folgenden werden drei Beispiele von Hefen beschrieben, um die Ergebnisse mit der prokaryotischen Art *K. rhizophila* zu vergleichen. Die Sprühtrocknung von *Rhodotorula mucilaginosa* mit 18 % (w/v) Maltodextrin und einer Eintrittstemperatur von 140 °C führte zu einer Überlebensrate von 31,8 % ± 4,5 %.[105] Die Hefe *Candida sake* CPA-1 wies nach der Sprühtrocknung mit 10 % (w/v) Magermilch und einer Eintrittstemperatur von 150 °C eine Überlebensrate von 17,0 % auf.[106] Romano et al. untersuchten 11 Stämme der Weinhefe *Saccharomyces cerevisiae* und beobachteten im Rahmen der Sprühtrocknung große Schwankungen der Überlebensrate von 0,02 % ± 0,00 % bis 62,39 % ± 5,05 % bei Verwendung von 3 Vol.-% Magermilch und einer Eintrittstemperatur von 120 °C.[466]

Abb. 62 veranschaulicht die Ergebnisse der Lagerexperimente. Die Ausgangswerte von 100 % entsprechen der Lebendzellzahl direkt nach der Sprühtrocknung (10^{10} – 10^{11} KbE/g).

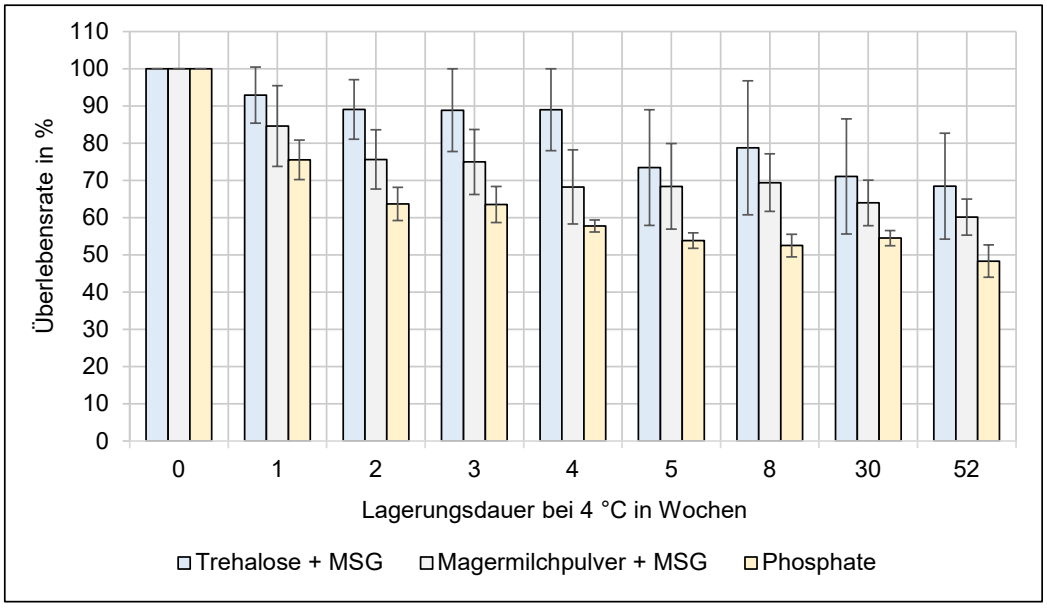

Abb. 62: Einfluss der Schutzsubstanzen auf die Überlebensrate von *Kocuria rhizophila* während der Lagerung bei 4 °C. Die Sprühtrocknung erfolgte nach einer Kultivierungsdauer von 48 h bei einer Eintrittstemperatur von 140 °C. Phosphate wurden als Negativkontrolle eingesetzt. *n* = 3.

Über den gesamten Lagerzeitraum zeigen beide Schutzsubstanzen leicht höhere durchschnittliche Überlebensraten im Vergleich zu den Phosphaten als Negativkontrolle. Es existiert jedoch in den meisten Fällen kein signifikanter Unterschied, wenn die Standardabweichungen berücksichtigt werden. Wie zuvor diskutiert, könnten Phosphate eine positive Wirkung auf die Überlebensrate der Bakterien durch verschiedene zelluläre Mechanismen haben, die zu einer verlängerten Haltbarkeit von sprühgetrockneten Mikroorganismen führen. Broeckx et al. berichten ebenfalls von einem positiven Effekt von PBS auf die Viabilität von *L. rhamnosus* GG, wobei eine Überlebensrate von 15 % nach einer Lagerungsdauer von 28 Wochen bei 4 °C erzielt wurde.[100] Die Verwendung von entsalztem Wasser als Sprühtrocknungsmedium führte unter den gleichen Lagerbedingungen zu einer Reduzierung der Lebendzellzahl um mehr als 5 log-Stufen.[100]

In wissenschaftlichen Veröffentlichungen wurde ebenfalls eine Steigerung der Überlebensrate von Bakterien durch protein- und kohlenhydratbasierte Schutzsubstanzen beschrieben.[462, 467] *L. murinus* PS85 zeigte bei Sprühtrocknung mit 20 % fettfreier Magermilch eine Überlebensrate von 100 % ± 20 % nach 60 Tagen Lagerung bei 5 °C. Experimente mit *Enterococcus raffinosus* PS7 unter denselben Bedingungen führten zu einer Überlebensrate von 95 % ± 5 %.[467] Die Anzahl der vitalen Zellen scheint jedoch signifikant zu sinken, wenn sprühgetrocknete Pulver mehrere Monate lang aufbewahrt werden. Bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C zeigte *L. plantarum* TISTR 2075 eine Überlebensrate von 63 % nach 120 Tagen bzw. von 32 % nach 360 Tagen bei Verwendung der Schutzsubstanzen Trehalose (50 g/L) bzw. Maltodextrin DE 10 (200 g/L). Die Sprühtrocknung von *Streptococcus thermophilus* unter Einsatz eines Molkenproteinkonzentrats (40 g/L) führte zu einer Überlebensrate von 46 % nach 6 Monaten und 14 % nach 12 Monaten bei Lagerung bei 6 °C.[459] Bäckerhefe (*S. cerevisiae*), sprühgetrocknet mit 10 % (w/v) Maltodextrin, erreichte nach einer Lagerdauer von 180 Tagen bei 27 °C ± 2 °C eine Überlebensrate von 78 % ± 2 %.[103] Eine weitere Pilzart, *Beauveria bassiana*, die durch Sprühtrocknung bei relativ geringen Temperaturen mithilfe von 10 % Dextrin, 10 % Magermilch und 5 % Polyvinylpyrrolidon (PVP) konserviert wurde, wies nach 6 Monaten bei 4 °C eine Überlebensrate von 80 % auf.[468] Im Vergleich zu den oben genannten Referenzwerten liegen die Überlebensraten von *K. rhizophila* in Abb. 62 in derselben Größenordnung und stimmen daher mit bisherigen Arbeiten zur Sprühtrocknung von Gram-positiven Bakterien[100, 459, 462, 468] und Pilzen[103, 468] überein.

Auch mehrere andere Autoren beobachteten relativ hohe Standardabweichungen der Überlebensrate von Bakterien in sprühgetrockneten Pulvern.[439, 469, 470] In der vorliegenden Arbeit basiert die Standardabweichung auf drei unabhängigen Sprühtrocknungsexperimenten, was Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit ermöglicht. Angesichts der Variabilität der einzelnen Schritte während der Experimente, z. B. des mikrobiellen Wachstums während der Kultivierung oder des Betriebs des Sprühtrockners, scheint die beobachtete Streuung der Ergebnisse plausibel.

Bei der Interpretation der prozentualen Überlebensraten, die auf den koloniebildenden Einheiten basieren, muss berücksichtigt werden, dass die absoluten Werte mindestens 10^{10} KbE/g des Pulvers entsprechen. Dies bedeutet, dass selbst Überlebensraten, die auf den ersten Blick niedrig erscheinen, absolute Werte mit einem vergleichsweise hohen Niveau repräsentieren. Wie in Abb. 61 dargestellt, betrug der Wassergehalt von Pulvern mit Schutzsubstanzen und Phosphaten rund 10 %. Trotz des relativ hohen Feuchtigkeitsgehalts im Vergleich zur Literatur lag eine hohe Überlebensrate während der Lagerung der sprühgetrockneten Bakterien vor.[90, 101, 105, 445] Daher wurde beschlossen, den Wassergehalt im Bereich von 10 % zu halten, ohne eine nachfolgende Trocknung durchzuführen. Da sich *K. rhizophila* in Bezug auf Phylogenese, Morphologie und Stoffwechsel von Milchsäurebakterien für die Joghurtproduktion unterscheidet,[254, 450] scheint es plausibel, dass auch der Toleranzbereich bezüglich des Wassergehaltes variiert. Darüber hinaus kommen Arten der Gattung *Kocuria* in Umgebungen vor, die durch hohe Strahlendosen, toxische Schwermetalle und kritische Salzkonzentrationen gekennzeichnet sind.[254, 443, 471] Aus diesem Grund sind spezi-

fische zelluläre Anpassungen erforderlich, die möglicherweise an der Aufrechterhaltung der Viabilität während und nach der Sprühtrocknung beteiligt sind.

Hinsichtlich der beabsichtigten Anwendung des sprühgetrockneten Pulvers als Inokulum lassen die in Abb. 62 zusammengefassten Ergebnisse auf eine ausreichende Konservierung der Mikroorganismen bei gekühlter Lagerung schließen. Eine signifikante Abnahme der Überlebensrate wurde während der 52 Wochen umfassenden Aufbewahrung nicht beobachtet, was eine hohe Langzeitstabilität von *K. rhizophila* bestätigt. Unter Berücksichtigung der Überlebensrate relativ zum flüssigen Medium vor der Sprühtrocknung und relativ zum sprühgetrockneten Pulver während der Lagerung erweist sich Magermilchpulver + MSG als effektivste Kombination der Schutzsubstanzen. Um die Oberflächenstruktur der Mikrokapseln zu visualisieren, sind in Abb. 63 Aufnahmen des Pulvers mit *K. rhizophila* und Magermilchpulver + MSG als Schutzsubstanzen dargestellt, die mit einem CLSM angefertigt wurden.

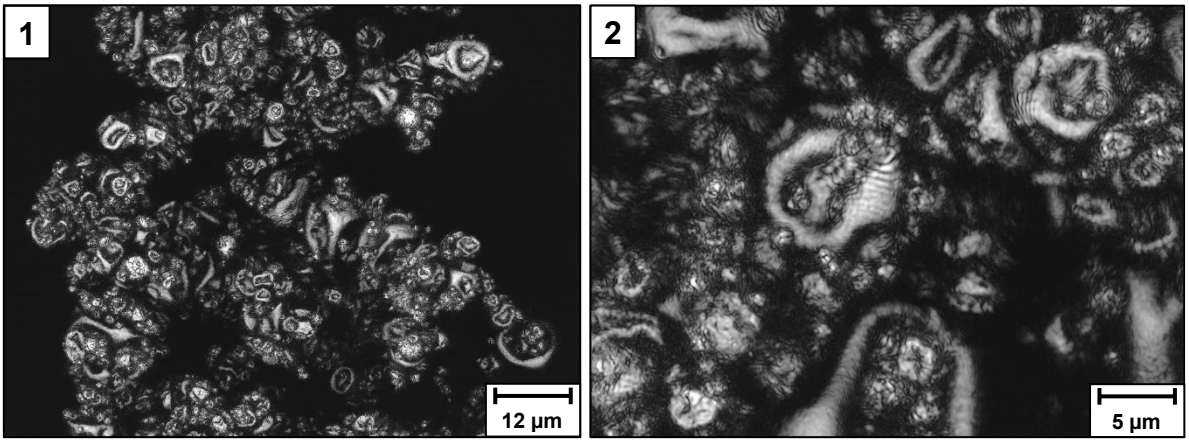

Abb. 63: Sprühgetrocknetes Pulver mit *Kocuria rhizophila* unter dem CLSM. 1 Agglomerat aus Mikrokapseln. **2** Vergrößerter Ausschnitt des Agglomerates aus Mikrokapseln. Ansatz mit Magermilchpulver + MSG.

Die kugelförmige Struktur der Partikel ist durch Oberflächenkonkavitäten gekennzeichnet, die von mehreren Autoren bei Aufnahmen von sprühgetrockneten Pulvern beschrieben wurden, welche von einem Rasterelektronenmikroskop (REM) stammen.[452, 472, 473] Die teilweise kollabierte, texturierte Morphologie wird durch hohe Temperaturen bei der Sprühtrocknung verursacht und ist charakteristisch für Mikrokapseln, die Milchproteine enthalten.[452, 473]

Eine Destabilisierung der Mikrokapseln in Form von Rissen an der Oberfläche ist in Abb. 63 nicht erkennbar. Die vorliegende, intakte Struktur trägt zum Schutz der Bakterien vor äußeren Einflüssen während und nach der Sprühtrocknung bei. Dieses optisch-qualitative Ergebnis spiegelt sich quantitativ in relativ hohen Überlebensraten wider, wie anhand von Abb. 61 und Abb. 62 nachvollzogen werden kann.

Neben der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie wurde auch die Digitalmikroskopie zur Analyse der Morphologie der Pulver eingesetzt. Abb. 64 zeigt für jeden Ansatz der Sprühtrocknung zwei repräsentative Aufnahmen in unterschiedlichen digitalmikroskopischen Vergrößerungsstufen. Anhand der Maßstabsbalken ist ersichtlich, dass jeweils eine geringere Vergrößerung vorliegt als bei Abb. 63.

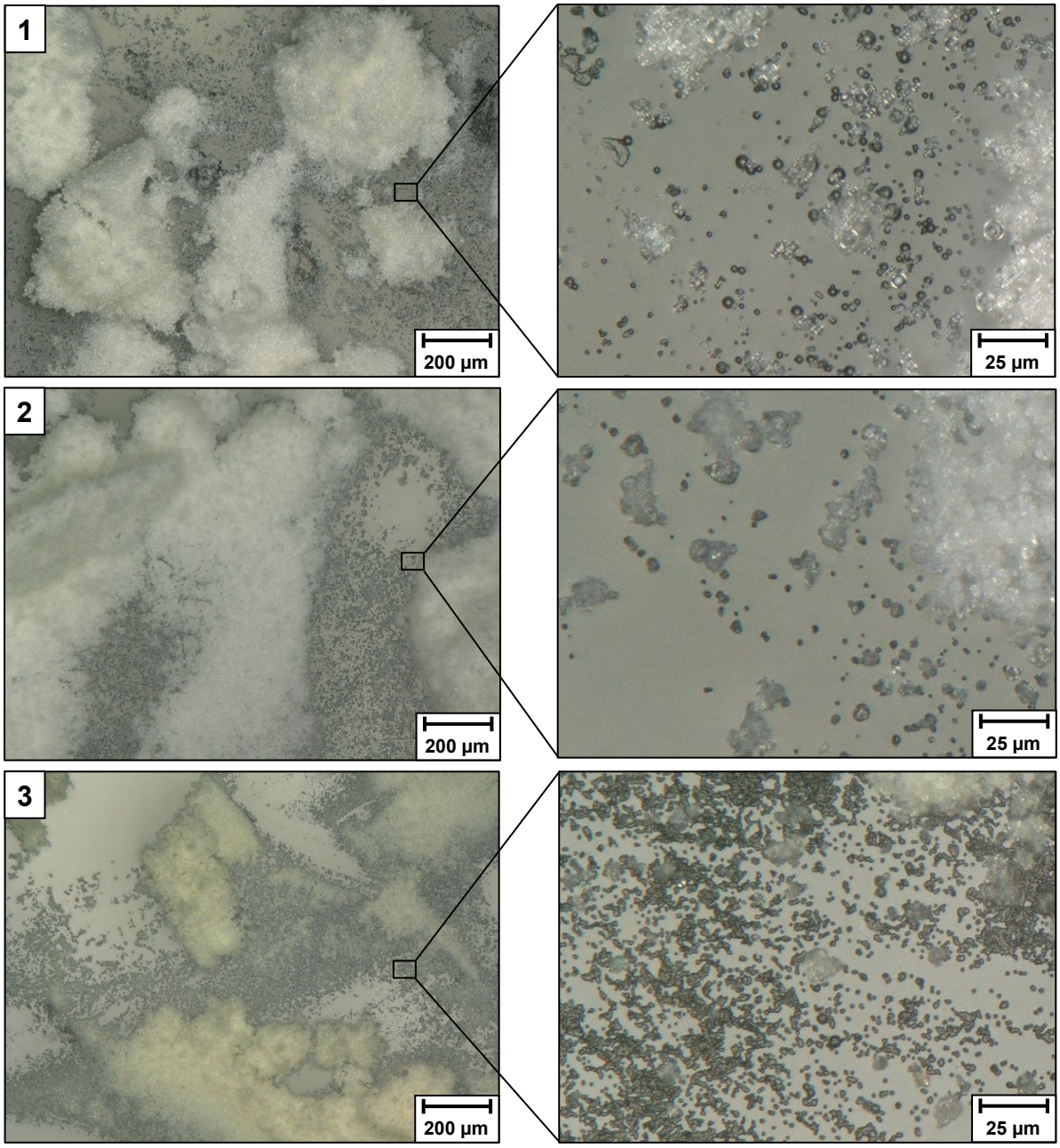

Abb. 64: Sprühgetrocknete Pulver mit *Kocuria rhizophila* unter dem Digitalmikroskop. 1 Trehalose + MSG. **2** Magermilchpulver + MSG. **3** Phosphate.

Die Aufnahmen lassen darauf schließen, dass die Pulver aus verschiedenen Partikelgrößen bestehen, wobei mehrfach Agglomerate auftreten, die charakteristisch für sprühgetrocknete Produkte sind.[90] Der vergrößerte Bildausschnitt zeigt jeweils einen deutlichen Anteil an Partikeln mit einem Durchmesser von etwa 1 µm und einer dunklen Farbe. Das Pulver mit Phosphaten (**3**) scheint eine höhere Konzentration dieses Anteils im Vergleich zu Proben

aufzuweisen, die mit Trehalose + MSG (**1**) und Magermilchpulver + MSG (**2**) konserviert wurden. Das Resuspendieren in Phosphatpuffer führte zu einem höheren Anteil an Zellen im sprühgetrockneten Pulver, da in diesem Ansatz eine Feststoffkonzentration von 14 g/L (7 g/L KH_2PO_4 + 7 g/L K_2HPO_4) vorlag, während das Medium mit den Schutzsubstanzen eine Feststoffkonzentration von 212,5 g/L (200 g/L Trehalose bzw. Magermilchpulver + 12,5 g/L MSG) enthielt. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die Partikel mit einem Durchmesser von etwa 1 µm Zellen von *K. rhizophila* darstellen. Diese Hypothese wird durch die gelbe Farbe des Pulvers mit Phosphaten gestützt, die von Carotinoiden der Gattung *Kocuria* stammt.[474] Bei den Ansätzen mit Trehalose + MSG bzw. Magermilchpulver + MSG wurde dagegen keine Gelbfärbung beobachtet, die Pulver wiesen gemäß Abb. 64 unter dem Mikroskop eine weiße Farbe auf. Dies ist ebenfalls auf den erhöhten Feststoffanteil bei den Schutzsubstanzen zurückzuführen, die als Reinsubstanzen weiß erscheinen.[475–477] Zudem liegen die Bakterienzellen infolge der Sprühtrocknung in mikroverkapselter Form vor, sodass Zellagglomerate von einer weißen Hülle aus Schutzsubstanzen umgeben sind, welche die native gelbe Farbe von *K. rhizophila* maskiert.

Neben pulverförmigen Starterkulturen, die durch Sprüh- oder Gefriertrocknung hergestellt werden, stellen flüssige Mikroorganismensuspensionen nach Zusatz geeigneter Stabilisatoren eine vielversprechende Alternative dar.[322, 478–481] Zur Konservierung der Zellen werden beispielsweise Trehalose, Polyethylenglycol (PEG), PVP, Natriumalginat oder Glycerol eingesetzt.[478–481] Teilweise wird dabei auch ohne gekühlte Lagerung eine hohe Überlebensrate erreicht.[478, 480, 481] So konnten Praveen Biradar und Santosh zeigen, dass *Pseudomonas fluorescens* in einem flüssigen, komplexen Nährmedium (King's B) unter Einsatz von 2 % PVP nach 180 Tage langer Lagerung bei 28 °C eine Überlebensrate von 72 % besitzt.[478] Eine weitere Studie von Santosh unter ähnlichen Bedingungen kommt zu dem Ergebnis, dass durch die Kombination von 0,5 % PVP mit 0,5 % Glycerin die Überlebensrate der Bakterienarten *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus megaterium* und *Rhizobium* sp. im Vergleich zum Medium ohne Stabilisatoren deutlich gesteigert werden kann.[480] Im Falle von PVP lässt sich der positive Einfluss auf die Viabilität der Mikroorganismen durch die Bindung von toxischen Metaboliten erklären, die während der stationären Wachstumsphase in den Extrazellularraum sekretiert werden.[480] Ein biologischer Abbau des synthetischen Polymers PVP wurde bisher nicht nachgewiesen, weitere Hypothesen zur stabilisierenden Wirkung beruhen auf der Änderung der Viskosität des Mediums, da es sich um ein Hydrokolloid handelt.[482] Neben Bakterien konnte auch die Hefe *Candida sake* in flüssiger Form in einem Phosphatpuffermedium nach Zusatz von 1 % Trehalose konserviert werden, sodass nach viermonatiger Lagerung bei 4 °C eine Überlebensrate von 72 % vorlag.[479]

Im Vergleich zu etablierten energieintensiven Trocknungsverfahren können durch eine flüssige Konservierung der Zellen die Betriebskosten reduziert werden, zudem entfällt der Schritt des Resuspendierens.[90, 481, 483] Allerdings resultieren aufgrund des größeren Volumens von flüssigen Formulierungen höhere Lager- und Transportkosten als bei getrockneten Starterkulturen. [90, 481, 483] Letztendlich muss basierend auf dem jeweiligen Mikroorganismus und den zur Verfügung stehenden Konservierungsmethoden entschieden werden, welches Verfahren für die Produktion eines langzeitstabilen Inokulums am besten geeignet ist.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen der Dissertation wurden zunächst ammoniumabbauende Mikroorganismen in der Suspensionskultur mithilfe eines definierten Nährmediums getestet. Dabei wurden Bakterien und Pilze basierend auf der Ammoniumabbaurate selektiert, sodass ein mikrobielles Konsortium konzipiert werden konnte. Als vorteilhaft erwies sich ein C:N-Verhältnis von 20, bei dem nach 48 h langer Kultivierung ein vollständiger Abbau der initialen Ammoniumkonzentration unter Einsatz von Zweier-Mischkulturen erreicht wurde. Somit konnte eine Optimierung im Vergleich zu einem geringeren C:N-Verhältnis von 10 erzielt werden. Zudem erlaubte eine digitalmikroskopische Analyse, eine gegenseitige Hemmung der Vertreter des mikrobiellen Konsortiums auszuschließen und gleichzeitig Indizien für ein symbiotisches Wachstum zu detektieren. Dabei wurde insbesondere eine räumliche Annäherung von Bakterien und Pilzen in Form einer Hyphosphäre optisch dokumentiert. Weiterführende Arbeiten könnten sich mit der Analyse der Symbiose auf molekularer Ebene beschäftigen, indem beispielsweise der Austausch von Stoffwechselprodukten während des Abbaus von Ammonium durch die Mikroorganismen erforscht wird. Die Bildung eines schadstoffabbauenden Biofilms wurde sowohl im Modellreaktor als auch im Pilotreaktor nach der Inokulation mit einem mikrobiellen Konsortium erfolgreich nachgewiesen. Nachdem jedoch unklar ist, ob sich die zur Beimpfung eingesetzten Spezies auch auf lange Sicht im Biorieselbettreaktor ansiedeln, sollte künftig eine Untersuchung der Zusammensetzung der Biozönose erfolgen, die Aussagen zur Populationsdynamik bei verschiedenen Betriebszuständen ermöglicht. Auch den Abbau höherer initialer Ammoniumkonzentrationen als 600 mg/L gilt es zu erforschen.

Als C-Quelle diente bei allen Experimenten Glucose. Um die laufenden Kosten für die Umsetzung des Verfahrens im industriellen Maßstab zu reduzieren, sollten in Zukunft alternative Substrate (bevorzugt Reststoffe) getestet werden, beispielsweise Melasse. Eine weitere Option stellt Citronensäure dar, über deren Zudosierung außerdem der pH-Wert gezielt veringert werden kann. Dies ist im Hinblick auf die Einleitung von gasförmigem Ammoniak aus der Abluft von Geflügelställen von Vorteil, da somit die basische Wirkung kompensiert werden kann. Wie bei den Experimenten mit Ammoniaklösung als N-Quelle festgestellt wurde, erweisen sich die nach der Zudosierung resultierenden pH-Wert-Erhöhungen bis in den basischen Bereich als problematisch, da unter diesen Bedingungen gasförmiges Ammoniak entweichen kann. Aus diesem Grund sollte im industriellen System eine pH-Wert-Regelung implementiert werden, sodass kein alkalisches Milieu vorliegt, sondern ein optimaler pH-Wert für den biologischen Abbau.

Ebenfalls eingehender untersucht werden sollte der Sauerstoffbedarf der Mikroorganismen im Biorieselbettreaktor. Nachdem das mikrobielle Konsortium ausschließlich aus aeroben Spezies besteht, ist Sauerstoff von grundlegender Bedeutung für das Wachstum und damit auch für den Abbau von Ammonium. Bei konventionellen Kultivierungsformaten wie der Suspensionskultur ist mit keiner sauerstoffbedingten Limitierung zu rechnen, da durch eine hohe Rührerdrehzahl ein ausreichendes aerobes Milieu garantiert werden kann. Auch wenn in Biorieselbettreaktoren in der Regel kein Rührer eingebaut ist, kann über den eingeleiteten Abluftstrom meist eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung erfolgen. Vor allem innerhalb der

Schüttung können jedoch trotzdem leicht anaerobe Verhältnisse – beispielsweise bei einer zu großen Schichtdicke des Biofilms – resultieren, die den Schadstoffabbau beeinträchtigen. Zur Reduzierung des Verblockungsrisikos und der Schichtdicke des Biofilms gilt es zudem, passende Verfahren zum Austrag von überschüssiger Biomasse einzusetzen, die sich für den Betrieb der Anlage im Umfeld eines Geflügelstalls eignen.

Um die tatsächliche Abbauleistung der Pilotanlage zu testen, empfiehlt sich der Anschluss an einen realen Geflügelstall im Rahmen eines Feldversuches, bei dem ein ammoniakhaltiger Abluftstrom in das System eingeleitet wird. Eine entsprechende Rohrleitung ist am Fermenter des Pilotreaktors bereits vorhanden. Mithilfe geeigneter Sensoren sollte dabei eine Messung der Ammoniakkonzentration am Eingang und Ausgang des Pilotreaktors erfolgen, sodass Rückschlüsse auf die Abscheideleistung der Anlage im laufenden Betrieb möglich sind. Im Rahmen der Dissertation wurde sich lediglich auf die Zirkulationsflüssigkeit konzentriert, was die Quantifizierung des Schadstoffabbaus betrifft. Im Hinblick auf eine Prüfung der Anlage sollte auch ein Test der Geruchsabscheidung mit realer Geflügelstallabluft vorgenommen werden.

Eine potenzielle Verwertung von Reststoffen aus dem Biorieselbettreaktor wie Biofilm und Zirkulationsflüssigkeit wurde ebenfalls erforscht. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Substanzen das Potenzial zum Einsatz als Rohstoff für die Herstellung organischer Düngemittel besitzen. Allerdings müssen dazu die geltenden rechtlichen Rahmenbedingungen beachtet werden. Zudem sollte die Analyse weiterer Proben aus unterschiedlichen Betriebszuständen erfolgen, um möglicherweise mit zunehmender Verweilzeit bzw. Umwälzung der Zirkulationsflüssigkeit eine höhere Konzentration an Makro- und Spurenelementen zu erreichen. Hühnertrockenkot eignet sich gemäß der experimentellen Untersuchungen als zusätzliche N-Quelle für das mikrobielle Konsortium und kann im Falle einer geringen Ammoniakkonzentration des Abluftstroms hinzudosiert werden. Aufgrund der Fähigkeit zur sukzessiven Freisetzung von Ammonium könnten die Mikroorganismen möglicherweise als biologischer Zusatzstoff bei Kompostierungsprozessen eingesetzt werden.

Durch Sprühtrocknung konnte ein lagerstabiles Pulver mit dem Modellorganismus *Kocuria rhizophila* produziert werden. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sich eine Kombination von Magermilchpulver und MSG am besten von allen getesteten Schutzsubstanzen für die Gewährleistung einer möglichst hohen Überlebensrate eignet. Da die Langzeitstabilität bisher nur unter gekühlten Bedingungen bei 4 °C erforscht wurde, könnten alternativ Lagerungsversuche bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Außerdem ist es erforderlich, neben dem getetesteten Modellorganismus noch weitere Spezies mithilfe des entwickelten Sprühtrocknungsverfahrens zu konservieren, um die Übertragbarkeit der protektiven Wirkung auf die Überlebensrate zu bewerten. Da bisher nur eine Reinkultur sprühgetrocknet wurde, obwohl für den Abbau von Ammonium ein Konsortium verschiedener Mikroorganismen zum Einsatz kommt, könnte künftig auch mit einer Mischkultur aus allen erforderlichen Arten gearbeitet werden, um die Anzahl an Sprühtrockungsversuchen zu reduzieren. Dadurch könnte eine Formulierung des passenden mikrobiellen Konsortiums entwickelt werden, die zur Inokulation neuer Biorieselbettreaktor dienen kann.

6. Zusammenfassung

Geflügel gehört zu den weltweit am meisten konsumierten Fleischarten – mit steigender Tendenz aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung. Ein Großteil der Nutztiere wird dabei in Mastgeflügelställen gehalten, die infolge des mikrobiellen Abbaus von Stickstoffverbindungen aus den Exkrementen der Tiere hohe Konzentrationen an Ammoniak aufweisen. Um gesetzliche Grenzwerte einzuhalten und gleichzeitig das Gefahrenpotenzial, das von Ammoniak ausgeht, zu reduzieren, ist eine Reinigung der Abluft von Geflügelställen erforderlich. Als nachhaltige Alternative zu chemischen Reinigungsverfahren wie dem Chemowäscher wurde ein biologisches Verfahren entwickelt, das auf der Anwendung ammoniumabbauender Mikroorganismen in einem Biorieselbettreaktor beruht. Dabei erfolgte zunächst eine Vorselektion von heterotrophen, mesophilen Bakterien und Pilzen, die Ammonium unter aeroben Bedingungen abbauen und Biofilm bilden. Im Anschluss wurden durch die Anzucht der Spezies in Suspensionskultur jeweils zwei Bakterien- und Pilzarten ausgewählt, wobei eine möglichst hohe absolute Ammoniumabbaurate als Kriterium diente. Das mikrobielle Konsortium aus den Bakterien (*Kocuria rhizophila*, *Pseudomonas alloputida*) und Pilzen (*Rhodotorula mucilaginosa, Yarrowia lipolytica*) wurde in Biorieselbettreaktoren unter Verwendung von Lavasteinen als porösem Trägermaterial kultiviert. Dabei wurde im Modellreaktor im 1-Liter-Maßstab im Vergleich zur Suspensionskultur eine erhöhte absolute Ammoniumabbaurate festgestellt, die zudem mit steigender initialer Ammoniumkonzentration zunahm. Durch einen Pilotreaktor im 100-Liter-Maßstab erfolgte anschließend ein Upscaling des Verfahrens. Die Experimente zeigen, dass der Schadstoffabbau im Pilotreaktor im Vergleich zum Modellreaktor sehr ähnlich verläuft und somit eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Labormaßstab gegeben ist.

Um im Sinne einer nachhaltigen Kreislaufwirtschaft die Verwertung von Reststoffen des biologischen Abluftreinigungsverfahrens zu erforschen, wurden der Biofilm und die Zirkulationsflüssigkeit aus einem Biorieselbettreaktor untersucht. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Ammonium aus der Zirkulationsflüssigkeit größtenteils in organischen Stickstoff umgewandelt wird, der sich im Biofilm anreichert. Außerdem enthalten die Reststoffe Spurenelemente, die durch die Berieselung aus den Lavasteinen freigesetzt werden. Somit eröffnet sich das Potenzial, die anfallenden Produkte aus dem Biorieselbettreaktor als Bestandteil für organische Düngemittel zu verwenden. Das mikrobielle Konsortium eignet sich außerdem zur Freisetzung von Ammonium aus Hühnerexkrementen, die somit als N-Quelle für die Mikroorganismen im Falle einer reduzierten Ammoniakkonzentration in der Abluft des Geflügelstalls eingesetzt werden könnten. Um die Inbetriebnahme neuer Biorieselbettreaktoren zu erleichtern, wurde abschließend ein Starter-Kit in Pulverform entwickelt, das sprühgetrocknete Mikroorganismen enthält. Zur Optimierung der Überlebensrate der Modellspezies *Kocuria rhizophila* wurden verschiedene Schutzsubstanzen getestet. Am effektivsten erwies sich Magermilchpulver in Kombination mit Mononatriumglutamat, jedoch führten auch Phosphatsalze zu einer relativ hohen Überlebensrate der Bakterien.

7. Abstract

Poultry is one of the most consumed types of meat worldwide, with a rising trend due to the increasing global population. A significant portion of livestock is kept in broiler houses, which exhibit high concentrations of ammonia due to the microbial degradation of nitrogen compounds from animal excrement. To comply with legal limits and simultaneously reduce the hazards associated with ammonia, it is necessary to purify the exhaust air from poultry houses. As a sustainable alternative to chemical purification methods such as chemical scrubbers, a biological process has been developed that relies on the use of ammonium-degrading microorganisms in a biotrickling filter. Initially, a preselection of heterotrophic, mesophilic bacteria and fungi capable of degrading ammonium under aerobic conditions and forming biofilms was conducted. Subsequently, two bacterial and two fungal species were selected based on their absolute ammonium degradation rates in suspension culture. The microbial consortium, consisting of bacteria (*Kocuria rhizophila*, *Pseudomonas alloputida*) and fungi (*Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*), was then cultivated in biotrickling filters using lava rocks as a porous carrier material. In the model reactor at a 1-liter scale, a significantly increased absolute ammonium degradation rate compared to suspension culture was observed, higher initial ammonium concentrations resulted in a further improvement of the absolute degration rate. The process was then upscaled using a pilot reactor at a 100-liter scale. The experiments demonstrate that pollutant degradation in the pilot reactor closely mirrored that in the model reactor, indicating a good transferability of the results from the lab scale.

To explore the utilization of residual materials from the biological exhaust air purification process in terms of a sustainable circular economy, biofilm and circulation fluid from a biotrickling filter were investigated. The results suggest that ammonium from the circulation fluid is mainly converted into organic nitrogen, which accumulates in the biofilm. Additionally, the residual materials contain trace elements released from the lava rocks due to irrigation. This opens up the potential to use the byproducts from the biotrickling filter as components for organic fertilizers. The microbial consortium is also suitable for the release of ammonium from chicken manure, which could serve as a nitrogen source for microorganisms in case of reduced ammonia concentrations in the exhaust air of the poultry house. To facilitate the startup of new biotrickling filters, a starter kit in powder form was developed, containing spray-dried microorganisms. Various protective substances were tested to optimize the survival rate of the model species *Kocuria rhizophila*. The most effective combination was skim milk powder with monosodium glutamate. However, phosphate salts also resulted in a relatively high survival rate of the bacteria.

8. Literaturverzeichnis

[1] Wirsam, J.; Leitzmann, C. *Die Vermessung der Ernährung: Unsere Ernährung in kommentierten Zahlen und Daten*; UTB, 2022.

[2] Godfray, H. C. J.; Aveyard, P.; Garnett, T.; Hall, J. W.; Key, T. J.; Lorimer, J.; Pierrehumbert, R. T.; Scarborough, P.; Springmann, M.; Jebb, S. A. Meat Consumption, Health, and the Environment. *Science*, **2018**, *361* (6399), eaam5324. https://doi.org/10.1126/science.aam5324.

[3] Benning, R. *Fleischatlas: Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel*, 1. Auflage.; Chemnitz, C., Ed.; Heinrich-Böll-Stiftung: Berlin, 2021.

[4] FAO. *Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets*; FAO ;, 2024.

[5] Mottet, A.; Tempio, G. Global Poultry Production: Current State and Future Outlook and Challenges. *World's Poultry Science Journal*, **2017**, *73* (2), 245–256. https://doi.org/10.1017/S0043933917000071.

[6] Franzo, G.; Legnardi, M.; Faustini, G.; Tucciarone, C. M.; Cecchinato, M. When Everything Becomes Bigger: Big Data for Big Poultry Production. *Animals*, **2023**, *13* (11), 1804. https://doi.org/10.3390/ani13111804.

[7] Statistisches Bundesamt. Viehhaltung der Betriebe - Fachserie 3 Reihe 2.1.3 - 2020 (Letzte Ausgabe - berichtsweise eingestellt) https://www.destatis.de/DE/Themen/Branchen-Unternehmen/Landwirtschaft-Forstwirtschaft-Fischerei/Tiere-Tierische-Erzeugung/Publikationen/Downloads-Tiere-und-tierische-Erzeugung/viehhaltung-2030213209004.html (zuletzt aufgerufen am 08.01.2025).

[8] Gržinić, G.; Piotrowicz-Cieślak, A.; Klimkowicz-Pawlas, A.; Górny, R. L.; Ławniczek-Wałczyk, A.; Piechowicz, L.; Olkowska, E.; Potrykus, M.; Tankiewicz, M.; Krupka, M.; et al. Intensive Poultry Farming: A Review of the Impact on the Environment and Human Health. *Science of The Total Environment*, **2023**, *858*, 160014. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160014.

[9] Knierim, U. Auswirkungen der Besatzdichte in der Schwermast auf das Verhalten sowie die Fuß- und Beingesundheit von Masthühnern. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **2013**, *126*.

[10] *Richtlinie 2007/43/EG des Rates vom 28. Juni 2007 mit Mindestvorschriften zum Schutz von Masthühnern (Text von Bedeutung für den EWR)*; 2007; Vol. 182.

[11] Naseem, S.; King, A. J. Ammonia Production in Poultry Houses Can Affect Health of Humans, Birds, and the Environment—Techniques for Its Reduction during Poultry Production. *Environmental Science and Pollution Research*, **2018**, *25* (16), 15269–15293. https://doi.org/10.1007/s11356-018-2018-y.

[12] Bist, R. B.; Subedi, S.; Chai, L.; Yang, X. Ammonia Emissions, Impacts, and Mitigation Strategies for Poultry Production: A Critical Review. *Journal of Environmental Management*, **2023**, *328*, 116919. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116919.

[13] Ip, Y. K.; Chew, S. F.; Randall, D. J. Ammonia Toxicity, Tolerance, and Excretion. In *Fish Physiology*; Nitrogen Excretion; Academic Press, 2001; Vol. 20, 109–148. https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)20005-3.

[14] Mitroi, R.; Stoian, O.; Covaliu, C. I.; Manea, D. Pollutants Resulting from Intensive Poultry Farming Activities and Their Impact on the Environment. *E3S Web Conf.*, **2021**, *286*, 03018. https://doi.org/10.1051/e3sconf/202128603018.

[15] Danuser, B. Respiratorische Gesundheitsrisiken bei Arbeiten mit Hühnern. *Pneumologie*, **2000**, *54* (01), 37–42. https://doi.org/10.1055/s-2000-9060.

[16] Damme, M. V.; Clarisse, L.; Franco, B.; Sutton, M. A.; Erisman, J. W.; Kruit, R. W.; Zanten, M. van; Whitburn, S.; Hadji-Lazaro, J.; Hurtmans, D.; et al. Global, Regional and National Trends of Atmospheric Ammonia Derived from a Decadal (2008–2018) Satellite Record. *Environmental Research Letters*, **2021**, *16* (5), 055017. https://doi.org/10.1088/1748-9326/abd5e0.

[17] Stallmann, M. *Review of internationally proposed critical levels for ammonia*; Umweltbundesamt, 2023.

[18] *Richtlinie (EU) 2016/2284 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 14. Dezember 2016 über die Reduktion der nationalen Emissionen bestimmter Luftschadstoffe, zur Änderung der Richtlinie 2003/35/EG und zur Aufhebung der Richtlinie 2001/81/EG*; 2016; Vol. 344.

[19] Grahn, D.; Puritz, T.; Rebbe, F.; Köhler, A. *Innovative Abluftreinigung in der Tierhaltung*; Heft 2/2017; Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, 2017.

[20] Alinezhad, E.; Haghighi, M.; Rahmani, F.; Keshizadeh, H.; Abdi, M.; Naddafi, K. Technical and Economic Investigation of Chemical Scrubber and Bio-Filtration in Removal of H_2S and NH_3 from Wastewater Treatment Plant. *Journal of Environmental Management*, **2019**, *241*, 32–43. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.003.

[21] Dumont, E.; Poser, M.; Peu, P.; Couvert, A. Biotrickling Filters for the Removal of Gaseous Ammonia Emissions from Livestock Facilities. Theoretical Prediction of Removal Efficiency and Experimental Validation. *Chemical Engineering Journal*, **2020**, *402*, 126188. https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126188.

[22] Morral, E.; Gabriel, D.; Dorado, A. D.; Gamisans, X. A Review of Biotechnologies for the Abatement of Ammonia Emissions. *Chemosphere*, **2021**, *273*, 128606. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128606.

[23] Madigan, M. T.; Bender, K. S.; Buckley, D. H.; Sattley, W. M.; Stahl, D. A.; Brock, T. D. *Brock Mikrobiologie*, 15., aktualisierte Auflage.; Bio Biologie; Pearson: München, 2020.

[24] Bramkamp, M.; Dersch, P.; Eitinger, T.; Heider, J.; Kothe, E. *Allgemeine Mikrobiologie*, 11., vollständig überarbeitete Auflage.; Fuchs, G., Schlegel, H. G., Eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2022. https://doi.org/10.1055/b000000100.

[25] Cypionka, H. *Grundlagen Der Mikrobiologie*; Springer-Lehrbuch; Springer: Berlin, Heidelberg, 2010. https://doi.org/10.1007/978-3-642-05096-1.

[26] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Gatto, G. J.; Stryer, L. *Stryer Biochemie*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54620-8.
[27] Reineke, W.; Schlömann, M. *Umweltmikrobiologie*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-662-59655-5.
[28] *Boenigk, Biologie: Der Begleiter in und durch das Studium*; Boenigk, J., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61270-5.
[29] Ottow, J. C. G. *Mikrobiologie von Böden*; Springer-Lehrbuch; Springer: Berlin, Heidelberg, 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00824-5.
[30] Bates, R. G.; Pinching, G. D. Acidic Dissociation Constant of Ammonium Ion at 0 to 50 °C, and the Base Strength of Ammonia. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology.*, **1949**, *42* (5), 419. https://doi.org/10.6028/jres.042.037.
[31] Martinelle, K.; Häggström, L. On the Dissociation Constant of Ammonium: Effects of Using an Incorrect pK a in Calculations of the Ammonia Concentration in Animal Cell Cultures. *Biotechnology Techniques*, **1997**, *11* (8), 549–551. https://doi.org/10.1023/A:1018482520832.
[32] Ritgen, U. *Analytische Chemie I*; Springer-Verlag, 2020.
[33] Khoo, K. H.; Culberson, C. H.; Bates, R. G. Thermodynamics of the Dissociation of Ammonium Ion in Seawater from 5 to 40°C. *Journal of Solution Chemistry*, **1977**, *6* (4), 281–290. https://doi.org/10.1007/BF00645459.
[34] *Microbes: The Foundation Stone of the Biosphere*; Hurst, C. J., Ed.; Advances in Environmental Microbiology; Springer International Publishing: Cham, 2021; Vol. 8. https://doi.org/10.1007/978-3-030-63512-1.
[35] Coale, T. H.; Loconte, V.; Turk-Kubo, K. A.; Vanslembrouck, B.; Mak, W. K. E.; Cheung, S.; Ekman, A.; Chen, J.-H.; Hagino, K.; Takano, Y.; et al. Nitrogen-Fixing Organelle in a Marine Alga. *Science*, **2024**, *384* (6692), 217–222. https://doi.org/10.1126/science.adk1075.
[36] Bömeke, H. Über das Verhältnis des oxydierten Stickstoffs zum reduzierten Kohlenstoff beim Nitratbildner. *Archiv für Mikrobiologie*, **1954**, *20* (2), 176–182. https://doi.org/10.1007/BF00691666.
[37] Bock, E.; Koops, H.-P.; Möller, U. C.; Rudert, M. A New Facultatively Nitrite Oxidizing Bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. *Archives of Microbiology*, **1990**, *153* (2), 105–110. https://doi.org/10.1007/BF00247805.
[38] Watson, S. W.; Bock, E.; Valois, F. W.; Waterbury, J. B.; Schlosser, U. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: A Chemolithotrophic Nitrite-Oxidizing Bacterium. *Archives of Microbiology.*, **1986**, *144* (1), 1–7. https://doi.org/10.1007/BF00454947.
[39] Daims, H.; Lebedeva, E. V.; Pjevac, P.; Han, P.; Herbold, C.; Albertsen, M.; Jehmlich, N.; Palatinszky, M.; Vierheilig, J.; Bulaev, A.; et al. Complete Nitrification by *Nitrospira* Bacteria. *Nature*, **2015**, *528* (7583), 504–509. https://doi.org/10.1038/nature16461.
[40] van Kessel, M. A. H. J.; Speth, D. R.; Albertsen, M.; Nielsen, P. H.; Op den Camp, H. J. M.; Kartal, B.; Jetten, M. S. M.; Lücker, S. Complete Nitrification by a Single Microorganism. *Nature*, **2015**, *528* (7583), 555–559. https://doi.org/10.1038/nature16459.
[41] Kartal, B.; Maalcke, W. J.; de Almeida, N. M.; Cirpus, I.; Gloerich, J.; Geerts, W.; Op den Camp, H. J. M.; Harhangi, H. R.; Janssen-Megens, E. M.; Francoijs, K.-J.; et al. Molecular Mechanism of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Nature*, **2011**, *479* (7371), 127–130. https://doi.org/10.1038/nature10453.
[42] *Biological and Hybrid Wastewater Treatment Technology: Recent Developments in India*; Ghangrekar, M. M., Yadav, S., Yadava, R. N., Eds.; Earth and Environmental Sciences Library; Springer Nature Switzerland: Cham, 2024. https://doi.org/10.1007/978-3-031-63046-0.
[43] *Innovations in Environmental Biotechnology*; Arora, S., Kumar, A., Ogita, S., Yau, Y.-Y., Eds.; Springer Nature: Singapore, 2022. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4445-0.
[44] *Ammonia Oxidizing Bacteria: Applications in Industrial Wastewater Treatment*; Shah, M. P., Ed.; Royal Society of Chemistry, 2023. https://doi.org/10.1039/9781837671960.
[45] Pan, Z.; Zhou, J.; Lin, Z.; Wang, Y.; Zhao, P.; Zhou, J.; Liu, S.; He, X. Effects of COD/TN Ratio on Nitrogen Removal Efficiency, Microbial Community for High Saline Wastewater Treatment Based on Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Process. *Bioresource Technology*, **2020**, *301*, 122726. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122726.
[46] Hildebrandt, J.-P.; Bleckmann, H.; Homberg, U. *Penzlin - Lehrbuch der Tierphysiologie*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61595-9.
[47] Vilela, M. de O.; Gates, R. S.; Souza, C. F.; Teles Junior, C. G. S.; Sousa, F. C.; Vilela, M. de O.; Gates, R. S.; Souza, C. F.; Teles Junior, C. G. S.; Sousa, F. C. Nitrogen Transformation Stages into Ammonia in Broiler Production: Sources, Deposition, Transformation, and Emission into the Environment. *DYNA*, **2020**, *87* (214), 221–228. https://doi.org/10.15446/dyna.v87n214.83318.
[48] *Textbook of Veterinary Physiology*; Das, P. K., Sejian, V., Mukherjee, J., Banerjee, D., Eds.; Springer Nature: Singapur, 2023. https://doi.org/10.1007/978-981-19-9410-4.
[49] Goldstein, D. L.; Skadhauge, E. CHAPTER 11 - Renal and Extrarenal Regulation of Body Fluid Composition. In *Sturkie's Avian Physiology (Fifth Edition)*; Whittow, G. C., Ed.; Academic Press: San Diego, 2000; 265–297. https://doi.org/10.1016/B978-012747605-6/50012-2.
[50] Mowrer, J.; Cabrera, M.; Rasmussen, T.; Cassity-Duffey, K. Nitrogen in Stored Poultry Litter: Uric Acid and Xanthine. *Journal of Environmental Quality*, **2014**, *43* (6), 2137–2145. https://doi.org/10.2134/jeq2014.05.0240.
[51] Swelum, A. A.; El-Saadony, M. T.; Abd El-Hack, M. E.; Abo Ghanima, M. M.; Shukry, M.; Alhotan, R. A.; Hussein, E. O. S.; Suliman, G. M.; Ba-Awadh, H.; Ammari, A. A.; et al. Ammonia Emissions in Poultry Houses and Microbial Nitrification as a Promising Reduction Strategy. *Science of The Total Environment*, **2021**, *781*, 146978. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146978.

[52] Rothrock, M. J.; Cook, K. L.; Lovanh, N.; Warren, J. G.; Sistani, K. Development of a Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay to Target a Novel Group of Ammonia-Producing Bacteria Found in Poultry Litter. *Poultry Science*, **2008**, *87* (6), 1058–1067. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00350.
[53] Schefferle, H. E. The Decomposition of Uric Acid in Built Up Poultry Litter. *Journal of Applied Bacteriology*, **1965**, *28* (3), 412–420. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1965.tb02171.x.
[54] Cook, K. L.; Rothrock Jr., M. J.; Warren, J. G.; Sistani, K. R.; Moore Jr., P. A. Effect of Alum Treatment on the Concentration of Total and Ureolytic Microorganisms in Poultry Litter. *Journal of Environmental Quality*, **2008**, *37* (6), 2360–2367. https://doi.org/10.2134/jeq2008.0024.
[55] Skóra, J.; Matusiak, K.; Wojewódzki, P.; Nowak, A.; Sulyok, M.; Ligocka, A.; Okrasa, M.; Hermann, J.; Gutarowska, B. Evaluation of Microbiological and Chemical Contaminants in Poultry Farms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **2016**, *13* (2), 192. https://doi.org/10.3390/ijerph13020192.
[56] Salim, H. M.; Patterson, P. H.; Ricke, S. C.; Kim, W. K. Enhancement of Microbial Nitrification to Reduce Ammonia Emission from Poultry Manure: A Review. *World's Poultry Science Journal*, **2014**, *70* (4), 839–856. https://doi.org/10.1017/S0043933914000890.
[57] Heo, Y.-J.; Park, J.; Kim, Y.-B.; Kwon, B.-Y.; Kim, D.-H.; Song, J.-Y.; Lee, K.-W. Effects of Dietary Protein Levels on Performance, Nitrogen Excretion, and Odor Emission of Growing Pullets and Laying Hens. *Poultry Science*, **2023**, *102* (8), 102798. https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102798.
[58] Kriseldi, R.; Tillman, P. B.; Jiang, Z.; Dozier, W. A. Effects of Feeding Reduced Crude Protein Diets on Growth Performance, Nitrogen Excretion, and Plasma Uric Acid Concentration of Broiler Chicks during the Starter Period. *Poultry Science*, **2018**, *97* (5), 1614–1626. https://doi.org/10.3382/ps/pex395.
[59] *Energie aus Biomasse: Bio-chemische und physikalisch-chemische Konversion*; Kaltschmitt, M., Scherzinger, M., Gescher, J., Eds.; Energie aus Biomasse; Springer Fachmedien: Wiesbaden, 2024. https://doi.org/10.1007/978-3-658-41386-6.
[60] *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*; Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L., Koch, H.-G., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-662-60266-9.
[61] Gupta, R.; Gupta, N. *Fundamentals of Bacterial Physiology and Metabolism*; Springer: Singapur, 2021. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0723-3.
[62] Sadava, D. E.; Purves, W. K.; Hillis, D. M.; Heller, H. C.; Hacker, S. D.; Markl, J. *Purves Biologie*, 10. Auflage.; Held, A., Jarosch, B., Seidler, L., Niehaus, M., Sixt, E., Delbrück, M., Translators; Springer Spektrum: Berlin [Heidelberg], 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-662-58172-8.
[63] Fritsche, O. *Mikrobiologie*; Kompaktwissen Biologie; Springer Spektrum: Berlin Heidelberg, 2016.
[64] Mayr, A.; Büttner, M.; Gedek, B.; Kaaden, O.-R.; Krüger, M.; Seidler, T.; Selbitz, H.-J. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 8., überarbeitete Auflage.; Thieme Verlag, 2007. https://doi.org/10.1055/b-002-11347.
[65] Liu, S. *Bioprocess Engineering: Kinetics, Sustainability, and Reactor Design*, Second edition.; Amsterdam Elsevier: Boston, 2017.
[66] *Environmental Microbiology*, Third edition.; Pepper, I. L., Gerba, C. P., Gentry, T. J., Eds.; Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier: Amsterdam, 2015.
[67] Flemming, H.-C. EPS—Then and Now. *Microorganisms*, **2016**, *4* (4), 41. https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041.
[68] Seviour, T.; Derlon, N.; Dueholm, M. S.; Flemming, H.-C.; Girbal-Neuhauser, E.; Horn, H.; Kjelleberg, S.; van Loosdrecht, M. C. M.; Lotti, T.; Malpei, M. F.; et al. Extracellular Polymeric Substances of Biofilms: Suffering from an Identity Crisis. *Water Research*, **2019**, *151*, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.020.
[69] Flemming, H.-C.; Neu, T. R.; Wozniak, D. J. The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells." *Journal of Bacteriology*, **2007**, *189* (22), 7945–7947. https://doi.org/10.1128/jb.00858-07.
[70] Limoli, D. H.; Jones, C. J.; Wozniak, D. J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum*, **2015**, *3* (3), 10.1128/microbiolspec.mb-0011–2014. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0011-2014.
[71] Chen, N.; Li, Y.; Liang, X.; Qin, K.; Zhang, Y.; Wang, J.; Wu, Q.; Gupta, T. B.; Ding, Y. Bacterial Extracellular Vesicle: A Non-Negligible Component in Biofilm Life Cycle and Challenges in Biofilm Treatments. *Biofilm*, **2024**, *8*, 100216. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100216.
[72] Sauer, K.; Stoodley, P.; Goeres, D. M.; Hall-Stoodley, L.; Burmølle, M.; Stewart, P. S.; Bjarnsholt, T. The Biofilm Life Cycle: Expanding the Conceptual Model of Biofilm Formation. *Nature Reviews Microbiology*, **2022**, *20* (10), 608–620. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0.
[73] Mahto, K. U.; Vandana; Priyadarshanee, M.; Samantaray, D. P.; Das, S. Bacterial Biofilm and Extracellular Polymeric Substances in the Treatment of Environmental Pollutants: Beyond the Protective Role in Survivability. *Journal of Cleaner Production*, **2022**, *379*, 134759. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134759.
[74] Dunne, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*, **2002**, *15* (2), 155–166. https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002.
[75] Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, **2002**, *56*, 187–209. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
[76] Hoffman, M. D.; Zucker, L. I.; Brown, P. J. B.; Kysela, D. T.; Brun, Y. V.; Jacobson, S. C. Timescales and Frequencies of Reversible and Irreversible Adhesion Events of Single Bacterial Cells. *Analytical Chemistry*, **2015**, *87* (24), 12032–12039. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02087.

[77] Arciola, C. R.; Campoccia, D.; Ravaioli, S.; Montanaro, L. Polysaccharide Intercellular Adhesin in Biofilm: Structural and Regulatory Aspects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **2015**, *5*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00007.
[78] Schmidt, O. G. *Genetik und Molekularbiologie*; Kompaktwissen Biologie; Springer: Berlin, Heidelberg, 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-662-66947-1.
[79] Vandana; Das, S. Genetic Regulation, Biosynthesis and Applications of Extracellular Polysaccharides of the Biofilm Matrix of Bacteria. *Carbohydrate Polymers*, **2022**, *291*, 119536. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119536.
[80] Schmid, J.; Sieber, V.; Rehm, B. Bacterial Exopolysaccharides: Biosynthesis Pathways and Engineering Strategies. *Frontiers in Microbiology*, **2015**, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496.
[81] Vojnov, A. A.; Slater, H.; Daniels, M. J.; Dow, J. M. Expression of the Gum Operon Directing Xanthan Biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and Its Regulation In Planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **2001**, *14* (6), 768–774. https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.768.
[82] Davies, D. G.; Geesey, G. G. Regulation of the Alginate Biosynthesis Gene algC in *Pseudomonas Aeruginosa* during Biofilm Development in Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, **1995**, *61* (3), 860–867. https://doi.org/10.1128/aem.61.3.860-867.1995.
[83] Liu, Z.; Zhou, C.; Ontiveros-Valencia, A.; Luo, Y.-H.; Long, M.; Xu, H.; Rittmann, B. E. Accurate O_2 Delivery Enabled Benzene Biodegradation through Aerobic Activation Followed by Denitrification-Coupled Mineralization. *Biotechnology and Bioengineering*, **2018**, *115* (8), 1988–1999. https://doi.org/10.1002/bit.26712.
[84] Lin, Y.-H.; Hsien, T.-Y. Kinetics of Biodegradation of Phenolic Wastewater in a Biofilm Reactor. *Water Science and Technology*, **2009**, *59* (9), 1703–1711. https://doi.org/10.2166/wst.2009.203.
[85] Butler, C. S.; Boltz, J. P. 3.6 - Biofilm Processes and Control in Water and Wastewater Treatment. In *Comprehensive Water Quality and Purification*; Ahuja, S., Ed.; Elsevier: Waltham, 2014; 90–107. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00083-9.
[86] Andersson, S. Characterization of Bacterial Biofilms for Wastewater Treatment, Royal Institute of Technology (KTH),: Stockholm, 2009.
[87] *Bioprozesstechnik*; Chmiel, H., Takors, R., Weuster-Botz, D., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54042-8.
[88] *Industrielle Mikrobiologie*; Sahm, H., Antranikian, G., Stahmann, K.-P., Takors, R., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013. https://doi.org/10.1007/978-3-8274-3040-3.
[89] Krull, R.; Hempel, D.; Wucherpfennig, T. Bioverfahrenstechnik. In *Dubbel Taschenbuch für den Maschinenbau 3: Maschinen und Systeme*; Bender, B., Göhlich, D., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2020; 565–600. https://doi.org/10.1007/978-3-662-59715-6_28.
[90] Peighambardoust, S. H.; Golshan Tafti, A.; Hesari, J. Application of Spray Drying for Preservation of Lactic Acid Starter Cultures: A Review. *Trends in Food Science & Technology*, **2011**, *22* (5), 215–224. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.009.
[91] Rähse, W.; Dicoi, O. Produktdesign disperser Stoffe: Industrielle Sprühtrocknung. *Chemie Ingenieur Technik*, **2009**, *81* (6), 699–716. https://doi.org/10.1002/cite.200800191.
[92] Miller, D. A.; Ellenberger, D.; Porfirio, T.; Gil, M. Spray-Drying Technology. In *Formulating Poorly Water Soluble Drugs*; Williams III, R. O., Davis Jr., D. A., Miller, D. A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2022; 377–452. https://doi.org/10.1007/978-3-030-88719-3_10.
[93] Kumoro, A. C.; Wardhani, D. H.; Kusworo, T. D.; Djaeni, M.; Ping, T. C.; Alhanif, M. A Brief Overview of Spray Drying Technology and Its Potential in Food Applications. *Journal of Human, Earth, and Future*, **2024**, *5* (2), 279–305.
[94] Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. Applications of Spray-Drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview. *Food Research International*, **2007**, *40* (9), 1107–1121. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004.
[95] Boel, E.; Koekoekx, R.; Dedroog, S.; Babkin, I.; Vetrano, M. R.; Clasen, C.; Van den Mooter, G. Unraveling Particle Formation: From Single Droplet Drying to Spray Drying and Electrospraying. *Pharmaceutics*, **2020**, *12* (7), 625. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070625.
[96] Mezhericher, M.; Levy, A.; Borde, I. Modelling of Particle Breakage during Drying. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **2008**, *47* (8), 1404–1411. https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.06.018.
[97] Mezhericher, M.; Levy, A.; Borde, I. Spray Drying Modelling Based on Advanced Droplet Drying Kinetics. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **2010**, *49* (11), 1205–1213. https://doi.org/10.1016/j.cep.2010.09.002.
[98] Mezhericher, M.; Levy, A.; Borde, I. Theoretical Models of Single Droplet Drying Kinetics: A Review. *Drying Technology*, **2010**, *28* (2), 278–293. https://doi.org/10.1080/07373930903530337.
[99] Furuta, T.; Neoh, T. L. Microencapsulation of Food Bioactive Components by Spray Drying: A Review. *Drying Technology*, **2021**, *39* (12), 1800–1831. https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1862181.
[100] Broeckx, G.; Vandenheuvel, D.; Henkens, T.; Kiekens, S.; van den Broek, M. F. L.; Lebeer, S.; Kiekens, F. Enhancing the Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after Spray Drying and during Storage. *Int J Pharm*, **2017**, *534* (1–2), 35–41. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.075.
[101] Broeckx, G.; Kiekens, S.; Jokicevic, K.; Byl, E.; Henkens, T.; Vandenheuvel, D.; Lebeer, S.; Kiekens, F. Effects of Initial Cell Concentration, Growth Phase, and Process Parameters on the Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after Spray Drying. *Drying Technology*, **2020**, *38* (11), 1474–1492. https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1648290.

[102] Pupa, P.; Apiwatsiri, P.; Sirichokchatchawan, W.; Pirarat, N.; Muangsin, N.; Shah, A. A.; Prapasarakul, N. The Efficacy of Three Double-Microencapsulation Methods for Preservation of Probiotic Bacteria. *Scientific Reports*, **2021**, *11* (1), 13753. https://doi.org/10.1038/s41598-021-93263-z.
[103] Chandralekha, A.; Tavanandi, A. H.; Amrutha, N.; Hebbar, H. U.; Raghavarao, K. S. M. S.; Gadre, R. Encapsulation of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by Spray Drying for Extension of Shelf Life. *Drying Technology*, **2016**, *34* (11), 1307–1318. https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1112808.
[104] Chandralekha, A.; Rani, A.; Tavanandi, H. A.; Amrutha, N.; Hebbar, U.; Raghavarao, K. S. M. S. Role of Carrier Material in Encapsulation of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by Spray Drying. *Drying Technology*, **2017**, *35* (8), 1029–1042. https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1230626.
[105] González-Esparza, A.; Gentina, J. C.; Ah-Hen, K. S.; Alvarado, R.; Stevenson, J.; Briceño, E.; Montenegro, O. Survival of Spray-Dried *Rhodotorula mucilaginosa* Isolated from Natural Microbiota of Murta Berries and Antagonistic Effect on *Botrytis cinerea*. *Food Technology and Biotechnology*, **2019**, *57* (2), 222–229. https://doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.6139.
[106] Cañamás, T. P.; Viñas, I.; Usall, J.; Magan, N.; Solsona, C.; Teixidó, N. Impact of Mild Heat Treatments on Induction of Thermotolerance in the Biocontrol Yeast *Candida sake* CPA-1 and Viability after Spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*, **2008**, *104* (3), 767–775. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03590.x.
[107] Santivarangkna, C.; Wenning, M.; Foerst, P.; Kulozik, U. Damage of Cell Envelope of *Lactobacillus helveticus* during Vacuum Drying. *Journal of Applied Microbiology*, **2007**, *102* (3), 748–756. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03123.x.
[108] Santivarangkna, C.; Kulozik, U.; Foerst, P. Inactivation Mechanisms of Lactic Acid Starter Cultures Preserved by Drying Processes. *Journal of Applied Microbiology*, **2008**, *105* (1), 1–13. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x.
[109] Meng, X. C.; Stanton, C.; Fitzgerald, G. F.; Daly, C.; Ross, R. P. Anhydrobiotics: The Challenges of Drying Probiotic Cultures. *Food Chemistry*, **2008**, *106* (4), 1406–1416. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.076.
[110] García, A. H. Anhydrobiosis in Bacteria: From Physiology to Applications. *Journal of Biosciences*, **2011**, *36* (5), 939–950. https://doi.org/10.1007/s12038-011-9107-0.
[111] Morgan, C. A.; Herman, N.; White, P. A.; Vesey, G. Preservation of Micro-Organisms by Drying; a Review. *Journal of Microbiological Methods*, **2006**, *66* (2), 183–193. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017.
[112] Santivarangkna, C.; Higl, B.; Foerst, P. Protection Mechanisms of Sugars during Different Stages of Preparation Process of Dried Lactic Acid Starter Cultures. *Food Microbiology*, **2008**, *25* (3), 429–441. https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.12.004.
[113] Gillbe, C. E.; Sage, F. J.; Gutteridge, J. M. C. Commentarv Mannitol: Molecule Magnifique or a Case of Radical Misinterpretation? *Free Radical Research*, **1996**, *24* (1), 1–7. https://doi.org/10.3109/10715769609087994.
[114] Joslyn, M. A.; Supplee, H. Solubility of Oxygen in Solutions of Various Sugars. *Food Research*, **1949**, *14* (3), 209–215. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1949.tb16225.x.
[115] Imagi, J.; Yamanouchi, T.; Okada, K.; Tanimoto, M.; Matsuno, R. Properties of Agents That Effectively Entrap Liquid Lipids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **1992**, *56* (3), 477–480. https://doi.org/10.1271/bbb.56.477.
[116] Melse, R. W.; Ogink, N. W. M. Air Scrubbing Techniques for Ammonia and Odor Reduction at Livestock Operations: Review of On-Farm Research in the Netherlands. *Transactions of the ASAE*, **2005**, *48* (6), 2303–2313. http://dx.doi.org/10.13031/2013.20094.
[117] Margesin, R.; Schneider, M.; Schinner, F. *Praxis der biotechnologischen Abluftreinigung*; Springer Berlin Heidelberg, 1995.
[118] Jungbluth, T.; Büscher, W.; Krause, M. *Technik Tierhaltung*; UTB, 2017.
[119] Häußermann, U.; Bach, M.; Breuer, L.; Döhler, H. *Potenziale zur Minderung der Ammoniakemissionen in der deutschen Landwirtschaft*; UBA-Texte 221/2020; Forschungskennzahl 3718 51 242 0; Umweltbundesamt: Dessau-Roßlau, 2020.
[120] Van der Heyden, C.; Demeyer, P.; Volcke, E. I. P. Mitigating Emissions from Pig and Poultry Housing Facilities through Air Scrubbers and Biofilters: State-of-the-Art and Perspectives. *Biosystems Engineering*, **2015**, *134*, 74–93. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2015.04.002.
[121] Zhao, L. Production of Ammonium Sulfate Fertilizer Using Acid Spray Wet Scrubbers. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, **2015**.
[122] Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft. *1-stufige Abluftreinigungsanlage mit Tropfenabscheider*; DLG-Prüfbericht 6271; 2024.
[123] Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft. *1-stufiger Chemowäscher mit Tropfenabscheider Inno+ Pollo-M*; DLG-Prüfbericht 6260; 2015.
[124] Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft. *1-stufiger Chemowäscher mit Tropfenabscheider ASA-S1*; DLG-Prüfbericht 7451; 2024.
[125] *Biotechnology for Odor and Air Pollution Control*; Shareefdeen, Z., Singh, A., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2005. https://doi.org/10.1007/b138434.
[126] Förtsch, G.; Meinholz, H. *Handbuch Betrieblicher Immissionsschutz*; Springer Fachmedien: Wiesbaden, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-658-29147-1.
[127] Morales, M.; Hernández, S.; Cornabé, T.; Revah, S.; Auria, R. Effect of Drying on Biofilter Performance: Modeling and Experimental Approach. *Environmental Science & Technology*, **2003**, *37* (5), 985–992. https://doi.org/10.1021/es025970w.

[128] Cárdenas-González, B.; Ergas, S. J.; Switzenbaum, M. S.; Phillibert, N. Evaluation of Full-Scale Biofilter Media Performance. *Environmental Progress*, **1999**, *18* (3), 205–211. https://doi.org/10.1002/ep.670180317.
[129] Morgan-Sagastume, J. M.; Noyola, A.; Revah, S.; Ergas, S. J. Changes in Physical Properties of a Compost Biofilter Treating Hydrogen Sulfide. *Journal of the Air & Waste Management Association*, **2003**, *53* (8), 1011–1021. https://doi.org/10.1080/10473289.2003.10466249.
[130] Melse, R. W.; Hol, J. M. G. *Measures to reduce fine dust emission from poultry houses: biofiltration of exhaust air of a manure drying system at a barn for laying hens*; 498; Wageningen UR Livestock Research: Lelystad, 2012; p .
[131] Van der Heyden, C.; Vanthillo, B.; Pieters, J. G.; Demeyer, P.; Volcke, E. I. P. Mechanistic Modeling of Pollutant Removal, Temperature, and Evaporation in Chemical Air Scrubbers. *Chemical Engineering & Technology*, **2016**, *39* (10), 1785–1796. https://doi.org/10.1002/ceat.201500664.
[132] Auria, R.; Frere, G.; Morales, M.; Acuña, M. E.; Revah, S. Influence of Mixing and Water Addition on the Removal Rate of Toluene Vapors in a Biofilter. *Biotechnology & Bioengineering*, **2000**, *68* (4), 448–455. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(20000520)68:4<448::aid-bit10>3.0.co;2-2.
[133] Kennes, C.; Veiga, M. C. *Bioreactors for Waste Gas Treatment*; Springer Science & Business Media, 2013.
[134] Detsch, C.; Stülke, J. Ammonium Utilization in *Bacillus subtilis*: Transport and Regulatory Functions of NrgA and NrgB. *Microbiology*, **2003**, *149* (11), 3289–3297. https://doi.org/10.1099/mic.0.26512-0.
[135] Zhang, X.; Xu, P.; Lou, Y.; Liu, Y.; Shan, Q.; Xiong, Y.; Wei, H.; Song, J. Characteristics of Novel Heterotrophic Nitrification–Aerobic Denitrification Bacteria *Bacillus subtilis* F4 and *Alcaligenes faecalis* P4 Isolated from Landfill Leachate Biochemical Treatment System. *Water*, **2024**, *16* (14), 1993. https://doi.org/10.3390/w16141993.
[136] Patel, B. P.; Kumar, A. Optimization Study for Maximizing 2,4-Dichlorophenol Degradation by *Kocuria rhizophila* Strain Using Response Surface Methodology and Kinetic Study. *Desalination and Water Treatment*, **2016**, *57* (39), 18314–18325. https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1091988.
[137] Chen, P.; Li, J.; Li, Q. X.; Wang, Y.; Li, S.; Ren, T.; Wang, L. Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification by Bacterium *Rhodococcus* sp. CPZ24. *Bioresource Technology*, **2012**, *116*, 266–270. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.050.
[138] Li, W. Study on Characteristics in the Removal Process of Ammonia Nitrogen and Nitrate Nitrogen by an Isolated Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Strain *Rhodococcus* sp. *Journal of Environmental Protection*, **2013**, *04* (01), 74. https://doi.org/10.4236/jep.2013.41B014.
[139] Kim, M.; Zhang, Z.; Okano, H.; Yan, D.; Groisman, A.; Hwa, T. Need-based Activation of Ammonium Uptake in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, **2012**, *8* (1), 616. https://doi.org/10.1038/msb.2012.46.
[140] Reitzer, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, **2003**, *57* (Volume 57, 2003), 155–176. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090820.
[141] Brown, C. M.; Macdonald-Brown, D. S.; Stanley, S. O. The Mechanisms of Nitrogen Assimilation in Pseudomonads. *Antonie van Leeuwenhoek*, **1973**, *39* (1), 89–98. https://doi.org/10.1007/BF02578844.
[142] Luo, Y.; Luo, L.; Huang, X.; Jiang, D.; Wu, X.; Li, Z. Characterization and Metabolic Pathway of *Pseudomonas fluorescens* 2P24 for Highly Efficient Ammonium and Nitrate Removal. *Bioresource Technology*, **2023**, *382*, 129189. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129189.
[143] Annuar, M. S. M.; Tan, I. K. P.; Ibrahim, S.; Ramachandran, K. B. Ammonium Uptake and Growth Kinetics of *Pseudomonas putida* PGA1. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, **2006**, *14* (1), 1–10.
[144] Yang, L.; Wang, X.-H.; Cui, S.; Ren, Y.-X.; Yu, J.; Chen, N.; Xiao, Q.; Guo, L.-K.; Wang, R.-H. Simultaneous Removal of Nitrogen and Phosphorous by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification of a Metal Resistant Bacterium *Pseudomonas putida* Strain NP5. *Bioresource Technology*, **2019**, *285*, 121360. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121360.
[145] Aksu, Z.; Eren, A. T. Carotenoids Production by the Yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of Agricultural Wastes as a Carbon Source. *Process Biochemistry*, **2005**, *40* (9), 2985–2991. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.011.
[146] Prabhu, A. A.; Gadela, R.; Bharali, B.; Deshavath, N. N.; Dasu, V. V. Development of High Biomass and Lipid Yielding Medium for Newly Isolated *Rhodotorula mucilaginosa*. *Fuel*, **2019**, *239*, 874–885. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.11.088.
[147] Magasanik, B. Ammonia Assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, **2003**, *2* (5), 827–829. https://doi.org/10.1128/ec.2.5.827-829.2003.
[148] Mendes-Ferreira, A.; Mendes-Faia, A.; Leão, C. Growth and Fermentation Patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under Different Ammonium Concentrations and Its Implications in Winemaking Industry. *Journal of Applied Microbiology*, **2004**, *97* (3), 540–545. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x.
[149] Nsoe, M. N.; Kofa, G. P.; Ndi, K. S.; Mohammadou, B.; Heran, M.; Kayem, G. J. Biodegradation of Ammonium Ions and Formate During Ammonium Formate Metabolism by *Yarrowia lipolytica* and *Pichia guilliermondii* in a Batch Reactor. *Water, Air, & Soil Pollution*, **2018**, *229* (5), 162. https://doi.org/10.1007/s11270-018-3795-0.
[150] Konzock, O.; Zaghen, S.; Fu, J.; Kerkhoven, E. J. Urea Is a Drop-in Nitrogen Source Alternative to Ammonium Sulphate in *Yarrowia lipolytica*. *iScience*, **2022**, *25* (12). https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105703.

[151] Keshavarz-Tohid, V.; Vacheron, J.; Dubost, A.; Prigent-Combaret, C.; Taheri, P.; Tarighi, S.; Taghavi, S. M.; Moënne-Loccoz, Y.; Muller, D. Genomic, Phylogenetic and Catabolic Re-Assessment of the *Pseudomonas putida* Clade Supports the Delineation of *Pseudomonas alloputida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **2019**, *42* (4), 468–480. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.04.004.
[152] Passarelli-Araujo, H.; Jacobs, S. H.; Franco, G. R.; Venancio, T. M. Phylogenetic Analysis and Population Structure of *Pseudomonas alloputida*. *Genomics*, **2021**, *113* (6), 3762–3773. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.09.008.
[153] Pais, P.; Almeida, V.; Yılmaz, M.; Teixeira, M. C. *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *Journal of Fungi*, **2020**, *6* (2), 78. https://doi.org/10.3390/jof6020078.
[154] Roche Diagnostics GmbH. Betriebsanleitung Cedex Bio Analyzer, 2021.
[155] Roche Diagnostics GmbH. Spezifikation für Testkit NH_3 Bio zur Messung der Ammoniumkonzentration, 2014.
[156] Roche Diagnostics GmbH. Spezifikation für Testkit Glucose Bio zur Messung der Glucosekonzentration, 2015.
[157] Grüner-Lempart, S.; Eckert, J.; Gredmaier, L. Reinigung von lösemittelhaltiger Prozessabluft in Biorieselbettreaktoren. *Chemie Ingenieur Technik*, **2021**, *93* (10), 1555–1564. https://doi.org/10.1002/cite.202100058.
[158] Marzi, T.; Renner, M. *Das Weltbild der Circular Economy und Bioökonomie: Vorbild Natur?*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2024. https://doi.org/10.1007/978-3-662-68230-2.
[159] *Das System Bioökonomie*; Thrän, D., Moesenfechtel, U., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-662-60730-5.
[160] Hach Lange GmbH. Spezifikation für Nitritnachweis LCK 341, 2019. https://de.hach.com/nitrit-kuvetten-test-0-015-0-6-mg-l-no-n-25-bestimmungen/product?id=26370284692 (zuletzt aufgerufen am 08.01.2025).
[161] Hach Lange GmbH. Spezifikation für Nitratnachweis LCK 339, 2019. https://de.hach.com/nitrat-kuvetten-test-0-23-13-5-mg-l-no-n-25-bestimmungen/product?id=26370284690 (zuletzt aufgerufen am 08.01.2025).
[162] Sloan, D. R.; Harms, R. H.; Barnard, D.; Nordstedt, R. Effect of Diet on Feces Composition and the Implications on Environmental Quality1. *Journal of Applied Poultry Research*, **1995**, *4* (4), 379–383. https://doi.org/10.1093/japr/4.4.379.
[163] Kiba, D. I.; Zongo, N. A.; Traoré, O. Y. A.; Louré, M.; Barry, H.; Bassirou, S. S.; Zacharia, G.; Noufou, O.; Lompo, F.; Sedogo, M. P. Poultry Farming Practices Affect the Chemical Composition of Poultry Manure and Its C and N Mineralization in a Ferric Acrisol. *Journal of Agricultural Science*, **2020**, *12* (3), p95. https://doi.org/10.5539/jas.v12n3p95.
[164] Shapovalov, Y.; Zhadan, S.; Bochmann, G.; Salyuk, A.; Nykyforov, V. Dry Anaerobic Digestion of Chicken Manure: A Review. *Applied Sciences*, **2020**, *10* (21), 7825. https://doi.org/10.3390/app10217825.
[165] Ashworth, A. J.; Chastain, J. P.; Moore Jr., P. A. Nutrient Characteristics of Poultry Manure and Litter. In *Animal Manure*; John Wiley & Sons, Ltd, 2020; 63–87. https://doi.org/10.2134/asaspecpub67.c5.
[166] hubey GmbH. Spezifikation Zu Pelletiertem Geflügeldung, 2025. https://hubey.com/product/gefluegeldung-biologischer-naturduenger-universalduenger-und-bodenverbesserer/ (zuletzt aufgerufen am 08.01.2025).
[167] Hach Lange GmbH. Spezifikation Für Gesamt-Stickstoffnachweis LCK 238, 2024. https://de.hach.com/laton-gesamt-stickstoff-kuvetten-test-5-40-mg-l-tnb-25-bestimmungen/product-downloads?id=26370260963 (zuletzt aufgerufen am 08.01.2025).
[168] Eckert, J.; Gruse, P.; Freitag, R.; Grüner-Lempart, S. Preservation of *Kocuria Rhizophila* DSM 348 by Spray Drying Using Different Protective Agents for Improvement of Bacterial Viability. *Drying Technology*, **2024**, *42* (6), 1051–1064. https://doi.org/10.1080/07373937.2024.2340050.
[169] *Romeis - Mikroskopische Technik*; Mulisch, M., Welsch, U., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55190-1.
[170] Mittag, H.-J.; Schüller, K. *Statistik: Eine interdisziplinäre Einführung mit interaktiven Elementen*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-662-68224-1.
[171] Yang, L.; Ren, Y.-X.; Zhao, S.-Q.; Liang, X.; Wang, J. Isolation and Characterization of Three Heterotrophic Nitrifying-Aerobic Denitrifying Bacteria from a Sequencing Batch Reactor. *Annals of Microbiology*, **2016**, *66* (2), 737–747. https://doi.org/10.1007/s13213-015-1161-7.
[172] Wang, X.; Wang, W.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Li, J.; Wang, S.; Chen, G. Isolation and Characterization of *Acinetobacter* Sp. JQ1004 and Evaluation of Its Inhibitory Kinetics by Free Ammonia. *Desalination and Water Treatment*, **2019**, *147*, 316–325. https://doi.org/10.5004/dwt.2019.23757.
[173] Su, J.; Zhang, K.; Huang, T.; Wen, G.; Guo, L.; Yang, S. Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification at Low Nutrient Conditions by a Newly Isolated Bacterium, *Acinetobacter* sp. SYF26. *Microbiology*, **2015**, *161* (4), 829–837. https://doi.org/10.1099/mic.0.000047.
[174] Lv, Y.; Yang, J.; Liu, Y. Biodegradation of Ammonium by Suspended and Immobilized Cells of *Acinetobacter* sp. Y1. *Asian Journal of Chemistry*, **2013**, *25* (13), 7243–7246. https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.14525.
[175] Chen, Q.; Ni, J. Ammonium Removal by *Agrobacterium* sp. LAD9 Capable of Heterotrophic Nitrification–Aerobic Denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2012**, *113* (5), 619–623. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.012.
[176] Li, X.; Wu, S.; Shen, Y.; Ning, Y.; Zhang, X.; Sun, X.; Zhang, B.; Chen, J. Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification by Four Novel Isolated Bacteria. *Polish Journal of Environmental Studies*, **2015**, *24* (4), 1677–1682. https://doi.org/10.15244/pjoes/35392.

[177] Cai, X.; Li, K.; He, T.; Wang, Y.; Zhang, X.; Xie, E.; Ding, N.; Li, Z. Characteristics of Heterotrophic Nitrifying and Aerobic Denitrifying *Arthrobacter nicotianae* D51 Strain in the Presence of Copper. *Water*, **2019**, *11* (3), 434. https://doi.org/10.3390/w11030434.
[178] Wang, T.; Liu, Z. X.; Wu, M. J.; Kang, F. H.; Chen, Q.; Song, Y. J.; Zhang, L. H. Screening and Characterization of a Bacterium Capable of Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification at High Concentrations of Ammonia-Nitrogen. *Applied Mechanics and Materials*, **2014**, *665*, 487–490. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.665.487.
[179] Huang, F.; Pan, L.; Lv, N.; Tang, X. Characterization of Novel *Bacillus* Strain N31 from Mariculture Water Capable of Halophilic Heterotrophic Nitrification–Aerobic Denitrification. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2017**, *124* (5), 564–571. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.06.008.
[180] Zhang, Q.-L.; Liu, Y.; Ai, G.-M.; Miao, L.-L.; Zheng, H.-Y.; Liu, Z.-P. The Characteristics of a Novel Heterotrophic Nitrification–Aerobic Denitrification Bacterium, *Bacillus methylotrophicus* Strain L7. *Bioresource Technology*, **2012**, *108*, 35–44. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.139.
[181] Yang, Y.; Lin, E.; Huang, S. Heterotrophic Nitrogen Removal in *Bacillus* sp. K5: Involvement of a Novel Hydroxylamine Oxidase. *Water Science and Technology*, **2017**, *76* (12), 3461–3467. https://doi.org/10.2166/wst.2017.510.
[182] Yan, L.; He, Y.; Kong, H.; Tanaka, S.; Lin, Y. Isolation of a New Heterotrophic Nitrifying *Bacillus* sp. Strain. *Journal of Environmental Biology*, **2006**, *27* (2 Suppl), 323–326.
[183] Mendoza, L.; Mujica, J.; Maribel, J.; Lucana, G.; Angulo, J.; Cruz, V.; Escobar, V.; Mialhe, E. Assessment of Heterotrophic Nitrification Capacity in *Bacillus* spp. and Its Potential Application in the Removal of Nitrogen from Aquaculture Water. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **2019**, *13*, 1893–1908. https://doi.org/10.22207/JPAM.13.4.02.
[184] Kundu, P.; Pramanik, A.; Dasgupta, A.; Mukherjee, S.; Mukherjee, J. Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification by *Chryseobacterium* sp. R31 Isolated from Abattoir Wastewater. *BioMed Research International*, **2014**, *2014*, 436056. https://doi.org/10.1155/2014/436056.
[185] Yang, R.; Li, J.; Wei-Xie, L.; Shao, L. Oligotrophic Nitrification and Denitrification Bacterial Communities in a Constructed Sewage Treatment Ecosystem and Nitrogen Removal of *Delftia tsuruhatensis* NF4. *Polish Journal of Microbiology*, **2020**, *69*, 99–108. https://doi.org/10.33073/pjm-2020-013.
[186] Taabodi, M.; Hashem, F. M.; Oscar, T. P.; Parveen, S.; May, E. B. The Possible Roles of *Escherichia coli* in the Nitrogen Cycle. *International Journal of Environmental Research*, **2019**, *13* (3), 597–602. https://doi.org/10.1007/s41742-019-00191-y.
[187] Yuan, J.; Doucette, C. D.; Fowler, W. U.; Feng, X.; Piazza, M.; Rabitz, H. A.; Wingreen, N. S.; Rabinowitz, J. D. Metabolomics-driven Quantitative Analysis of Ammonia Assimilation in *E. coli*. *Molecular Systems Biology*, **2009**, *5* (1), 302. https://doi.org/10.1038/msb.2009.60.
[188] Jin, P.; Chen, Y.; Zheng, Z.; Du, Q. Evaluation of a Novel Low-Carbon to Nitrogen- and Temperature-Tolerant Simultaneously Nitrifying–Denitrifying Bacterium and Its Use in the Treatment of River Water. *RSC Advances*, **2018**, *8* (48), 27417–27422. https://doi.org/10.1039/C8RA04697B.
[189] Madkour, A.; Hamed, M.; Dar, M. Removal of Ammonia and Orthophosphate from Domestic Wastewater Using Marine Actinomycetes. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, **2019**, *23*, 455–465. https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.48322.
[190] Medhi, K.; Gupta, A.; Thakur, I. Biological Nitrogen Removal from Wastewater by *Paracoccus denitrificans* ISTOD1: Optimization of Process Parameters Using Response Surface Methodology. *Journal of Energy and Environmental Sustainability*, **2019**, *5*, 41–48. https://doi.org/10.47469/JEES.2018.v05.100055.
[191] Ye, Q.; Li, K.; Li, Z.; Xu, Y.; He, T.; Tang, W.; Xiang, S. Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Performance of Strain Y-12 under Low Temperature and High Concentration of Inorganic Nitrogen Conditions. *Water*, **2017**, *9* (11), 835. https://doi.org/10.3390/w9110835.
[192] Zhang, N.; Chen, H.; Lyu, Y.; Wang, Y. Nitrogen Removal by a Metal-Resistant Bacterium, *Pseudomonas Putida* ZN1, Capable of Heterotrophic Nitrification–Aerobic Denitrification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **2019**, *94* (4), 1165–1175. https://doi.org/10.1002/jctb.5863.
[193] Wang, C.; Ren, J.; Qiao, X.; Habib, M. Ammonium Removal Efficiency of Biochar-Based Heterotrophic Nitrifying Bacteria Immobilization Body in Water Solution. *Environmental Engineering Research*, **2020**, *26*. https://doi.org/10.4491/eer.2019.451.
[194] He, T.; Li, Z.; Sun, Q.; Xu, Y.; Ye, Q. Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without Nitrite Accumulation during Nitrogen Conversion. *Bioresource Technology*, **2016**, *200*, 493–499. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.064.
[195] Ma, S.; Huang, S.; Tian, Y.; Lu, X. Heterotrophic Ammonium Assimilation: An Important Driving Force for Aerobic Denitrification of *Rhodococcus erythropolis* Strain Y10. *Chemosphere*, **2022**, *291*, 132910. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132910.
[196] Chen, X.; Li, S.; Zhang, W.; Li, S.; Gu, Y.; Ouyang, L. A Newly Isolated *Rhodococcus* sp. S2 from Landfill Leachate Capable of Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification. *Water*, **2024**, *16* (3), 431. https://doi.org/10.3390/w16030431.
[197] Qi, R.; Zhang, Y.; Qu, W.; Wei, J.; Xu, H.; Liu, Y.; Xia, J.; Wang, J. Characteristics and Mechanism of Heterotrophic Nitrification/Aerobic Denitrification in the Marine *Tritonibacter Mobilis* HN1. *Journal of Marine Science and Engineering*, **2023**, *11* (12), 2267. https://doi.org/10.3390/jmse11122267.
[198] Lei, Y.; Wang, Y.; Liu, H.; Xi, C.; Song, L. A Novel Heterotrophic Nitrifying and Aerobic Denitrifying Bacterium, *Zobellella taiwanensis* DN-7, Can Remove High-Strength Ammonium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2016**, *100* (9), 4219–4229. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7290-5.

[199] Fu, W.; Song, G.; Wang, Y.; Wang, Q.; Duan, P.; Liu, C.; Zhang, X.; Rao, Z. Advances in Research Into and Applications of Heterotrophic Nitrifying and Aerobic Denitrifying Microorganisms. *Frontiers in Environmental Science*, **2022**, *10*. https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.887093.
[200] Hu, B.; Lu, J.; Qin, Y.; Zhou, M.; Tan, Y.; Wu, P.; Zhao, J. A Critical Review of Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification Process: Influencing Factors and Mechanisms. *Journal of Water Process Engineering*, **2023**, *54*, 103995. https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103995.
[201] Yan, Y.; Lu, H.; Zhang, J.; Zhu, S.; Wang, Y.; Lei, Y.; Zhang, R.; Song, L. Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification (SND) for Nitrogen Removal: A Review and Future Perspectives. *Environmental Advances*, **2022**, *9*, 100254. https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100254.
[202] Kulkarni, H. V.; Ford, J.; Blank, J. G.; Park, M.; Datta, S. Geochemical Interactions among Water, Minerals, Microbes, and Organic Matter in Formation of Speleothems in Volcanic (Lava Tube) Caves. *Chemical Geology*, **2022**, *594*, 120759. https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2022.120759.
[203] Hadland, N.; Hamilton, C. W.; Duhamel, S. Young Volcanic Terrains Are Windows into Early Microbial Colonization. *Communications Earth & Environment*, **2024**, *5* (1), 1–19. https://doi.org/10.1038/s43247-024-01280-3.
[204] Dong, H.; Huang, L.; Zhao, L.; Zeng, Q.; Liu, X.; Sheng, Y.; Shi, L.; Wu, G.; Jiang, H.; Li, F.; et al. A Critical Review of Mineral–Microbe Interaction and Co-Evolution: Mechanisms and Applications. *National Science Review*, **2022**, *9* (10), nwac128. https://doi.org/10.1093/nsr/nwac128.
[205] Dahouk, S. A.; Autenrieth, I. B.; Bartz, H.; Becker, K.; Beyer, W.; Braun, R. W.; Brem, S.; Bugert, J. J.; Caspari, G.; Clarici, A.; et al. *Mikrobiologische Diagnostik*, 2., vollständig überarbeitete Aufage.; Neumeister, B., Geiss, H. K., Braun, R. W., Kimmig, P., Eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2009.
[206] Liu, S.; Liu, Q.; Wu, H.; Jiang, W.; Kahaer, A.; Tang, Q.; Hu, Z.; Hong, C.; Liu, D. Integrative Chemical and Omics Analysis of the Ammonia Nitrogen Removal Characteristics and Mechanism of a Novel Oligotrophic Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacterium. *Science of The Total Environment*, **2022**, *852*, 158519. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158519.
[207] Gao, J.; Zhu, T.; Liu, C.; Zhang, J.; Gao, J.; Zhang, J.; Cai, M.; Li, Y. Ammonium Removal Characteristics of Heterotrophic Nitrifying Bacterium *Pseudomonas stutzeri* GEP-01 with Potential for Treatment of Ammonium-Rich Wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **2020**, *43* (6), 959–969. https://doi.org/10.1007/s00449-020-02292-x.
[208] Jolliffe, L. K.; Doyle, R. J.; Streips, U. N. The Energized Membrane and Cellular Autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell*, **1981**, *25* (3), 753–763. https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90183-5.
[209] Geisseler, D.; Horwath, W. R.; Joergensen, R. G.; Ludwig, B. Pathways of Nitrogen Utilization by Soil Microorganisms – A Review. *Soil Biology and Biochemistry*, **2010**, *42* (12), 2058–2067. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.021.
[210] Obernosterer, I.; Biener, E. Abfallwirtschaft. In *Wendehorst Beispiele aus der Baupraxis*; Vismann, U., Ed.; Springer Fachmedien: Wiesbaden, 2022; 833–877. https://doi.org/10.1007/978-3-658-32486-5_18.
[211] *Biology of Rhodococcus*; Alvarez, H. M., Ed.; Microbiology Monographs; Springer International Publishing: Cham, 2019; Vol. 16. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11461-9.
[212] Zhang, X.; Wang, Y.; Guo, J.; YU, Y.; Li, Y.; Liu, C. Comparing Two Functions for Optical Density and Cell Numbers in Bacterial Exponential Growth Phase. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **2015**, *9*, 299–305.
[213] Hwang, S.-C.; Lin, C.-S.; Chen, I.-M.; Chen, J.-M.; Liu, L.-Y.; Dodds, W. K. Removal of Multiple Nitrogenous Wastes by *Aspergillus niger* in a Continuous Fixed-Slab Reactor. *Bioresource Technology*, **2004**, *93* (2), 131–138. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.017.
[214] Fang, J.; Liao, S.; Zhang, S.; Li, L.; Tan, S.; Li, W.; Wang, A.; Ye, J. Characteristics of a Novel Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Yeast, *Barnettozyma californica* K1. *Bioresource Technology*, **2021**, *339*, 125665. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125665.
[215] Liu, X.; Wang, L.; Shi, J. Micro-Polluted Surface Water Treated by Yeast-Chitosan Bio-Microcapsules. *Materials*, **2020**, *13* (16), 3519. https://doi.org/10.3390/ma13163519.
[216] Xu, M.-J.; Cui, Y.-W.; Huang, M.-Q.; Sui, Y. Simultaneous Inorganic Nitrogen and Phosphate Removal by Aerobic-Heterotrophic Fungus *Fusarium keratoplasticum* FSP1: Performance, Pathway and Application. *Bioresource Technology*, **2024**, *393*, 130141. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130141.
[217] Xu, M.-J.; Cui, Y.-W. Simultaneous Aerobic Nitrogen and Phosphorus Removal by Novel Halotolerant Fungus *Mucor circinelloides* SNDM1: Function and Metabolism Pathway. *Bioresource Technology*, **2024**, *410*, 131257. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131257.
[218] Liu, Z.; Liu, G.; Cai, H.; Shi, P.; Chang, W.; Zhang, S.; Zheng, A.; Xie, Q.; Ma, J. *Paecilomyces variotii*: A Fungus Capable of Removing Ammonia Nitrogen and Inhibiting Ammonia Emission from Manure. *PLOS ONE*, **2016**, *11* (6), e0158089. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158089.
[219] Yao, Z.; Yang, L.; Wang, F.; Tian, L.; Song, N.; Jiang, H. Enhanced Nitrate Removal from Surface Water in a Denitrifying Woodchip Bioreactor with a Heterotrophic Nitrifying and Aerobic Denitrifying Fungus. *Bioresource Technology*, **2020**, *303*, 122948. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122948.
[220] Yun, L.; Wang, W.; Li, Y.; Xie, M.; Chen, T.; Hu, C.; Luo, P.; Li, D. Potential Application Values of a Marine Red Yeast, *Rhodosporidium sphaerocarpum* YLY01, in Aquaculture and Tail Water Treatment Assessed by the Removal of Ammonia Nitrogen, the Inhibition to *Vibrio* spp., and Nutrient Composition. *PLOS ONE*, **2021**, *16* (2), e0246841. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246841.
[221] El-Banna, A. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*. *Food and Nutrition Sciences*, **2012**, *03*, 64–71. https://doi.org/10.4236/fns.2012.31011.

[222] Zeng, J.; Liao, S.; Qiu, M.; Chen, M.; Ye, J.; Zeng, J.; Wang, A. Effects of Carbon Sources on the Removal of Ammonium, Nitrite and Nitrate Nitrogen by the Red Yeast *Sporidiobolus pararoseus* Y1. *Bioresource Technology*, **2020**, *312*, 123593. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123593.
[223] Pfeiffer, T.; Morley, A. An Evolutionary Perspective on the Crabtree Effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **2014**, *1*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017.
[224] Sweechin, T.; Othman, N.; Malek, R. A.; Elmarzugi, N.; Leng, O.; Ramli, S.; Musa, N.; Aziz, R.; El Enshasy, H. Bioprocess Optimization for Biomass Production of Probiotics Yeast *Saccharomyces boulardii* in Semi-Industrial Scale. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2015**, *7*, 122–132.
[225] Du, L.; Hao, R.; Xiao, D.; Guo, L.; Gai, W. Research on the Characteristics and Culture Conditions of *Saccharomyces boulardii*. *Advanced Materials Research*, **2011**, *343–344*, 594–598. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.594.
[226] Braga, A.; Mesquita, D. P.; Amaral, A. L.; Ferreira, E. C.; Belo, I. Quantitative Image Analysis as a Tool for *Yarrowia Lipolytica* Dimorphic Growth Evaluation in Different Culture Media. *Journal of Biotechnology*, **2016**, *217*, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.10.023.
[227] Sen, D.; Paul, K.; Saha, C.; Mukherjee, G.; Nag, M.; Ghosh, S.; Das, A.; Seal, A.; Tripathy, S. A Unique Life-Strategy of an Endophytic Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1—a Comparative Genomics Viewpoint. *DNA Research*, **2019**, *26* (2), 131–146. https://doi.org/10.1093/dnares/dsy044.
[228] Urano, N.; Shirao, A.; Naito, Y.; Okai, M.; Ishida, M.; Takashio, M. Molecular Phylogeny and Phenotypic Characterization of Yeasts with a Broad Range of pH Tolerance Isolated from Natural Aquatic Environments. *Advances in Microbiology*, **2019**, *9* (1), 56–73. https://doi.org/10.4236/aim.2019.91005.
[229] Peña, A.; Sánchez, N. S.; Álvarez, H.; Calahorra, M.; Ramírez, J. Effects of High Medium pH on Growth, Metabolism and Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, **2015**, *15* (2), fou005. https://doi.org/10.1093/femsyr/fou005.
[230] Mukhtar, H.; Suliman, S. M.; Shabbir, A.; Mumtaz, M. W.; Rashid, U.; Rahimuddin, S. A. Evaluating the Potential of Oleaginous Yeasts as Feedstock for Biodiesel Production. *Protein & Peptide Letters*, **2018**, *25* (2), 195–201. https://doi.org/10.2174/0929866525666180122112805.
[231] Huang, X.; Li, W.; Zhang, D.; Qin, W. Ammonium Removal by a Novel Oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 Capable of Heterotrophic Nitrification–Aerobic Denitrification at Low Temperature. *Bioresource Technology*, **2013**, *146*, 44–50. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.046.
[232] Huang, F.; Pan, L.; He, Z.; Zhang, M.; Zhang, M. Identification, Interactions, Nitrogen Removal Pathways and Performances of Culturable Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacteria from Mariculture Water by Using Cell Culture and Metagenomics. *Science of The Total Environment*, **2020**, *732*, 139268. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139268.
[233] Shu, H.; Sun, H.; Huang, W.; Zhao, Y.; Ma, Y.; Chen, W.; Sun, Y.; Chen, X.; Zhong, P.; Yang, H.; et al. Nitrogen Removal Characteristics and Potential Application of the Heterotrophic Nitrifying-Aerobic Denitrifying Bacteria *Pseudomonas mendocina* S16 and *Enterobacter cloacae* DS'5 Isolated from Aquaculture Wastewater Ponds. *Bioresource Technology*, **2022**, *345*, 126541. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126541.
[234] Luo, Z.; Huang, W.; Zheng, C.; Li, J.; Yun, L.; Sun, H.; Wang, G.; Chen, X.; Mo, W.; Deng, D.; et al. Identification of a Microalgae-Yeast Coculture System for Nutrient Removal in Shrimp Culture Wastewater. *Journal of Applied Phycology*, **2021**, *33* (2), 879–890. https://doi.org/10.1007/s10811-021-02379-2.
[235] Ke, X.; Liu, C.; Yu, H.; Wu, Z.-D.; Guo, T.-T.; Zhang, Y.-C.; Tang, S.-Q.; Xue, Y.-P.; Zheng, Y.-G. Coculture of the Heterotrophic Nitrification–Aerobic Denitrification Strains *Acinetobacter* sp. A12 and *Paracoccus* sp. T8 Enables Effective Biological Nitrogen Removal from Landfill Leachate. *ACS EST Water*, **2024**, *4* (4), 1786–1797. https://doi.org/10.1021/acsestwater.3c00789.
[236] Zhang, Q.; Yang, P.; Liu, L.; Liu, Z. Formulation and Characterization of a Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Synthetic Microbial Community and Its Application to Livestock Wastewater Treatment. *Water*, **2020**, *12* (1), 218. https://doi.org/10.3390/w12010218.
[237] Du, G.; Geng, J.; Chen, J.; Lun, S. Mixed Culture of Nitrifying Bacteria and Denitrifying Bacteria for Simultaneous Nitrification and Denitrification. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2003**, *19* (4), 433–437. https://doi.org/10.1023/A:1023985229493.
[238] Yang, X.; Liu, L.; Wang, S. A Strategy of High-Efficient Nitrogen Removal by an Ammonia-Oxidizing Bacterium Consortium. *Bioresource Technology*, **2019**, *275*, 216–224. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.057.
[239] Yin, Z.; Yang, X.; Wang, X.; Wang, S. Effects of Operating Conditions on Microbial Consortium of the Heterotrophic Ammonia Oxidation Process. *Bioresource Technology*, **2021**, *328*. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124823.
[240] Li, Q.; Xu, Y.; Liang, C.; Peng, L.; Zhou, Y. Nitrogen Removal by Algal-Bacterial Consortium during Mainstream Wastewater Treatment: Transformation Mechanisms and Potential N_2O Mitigation. *Water Research*, **2023**, *235*, 119890. https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119890.
[241] Sakthivel, A.; Ramasamy, S.; Kheria, S.; Pugazhenthi, G.; Pakshirajan, K. Self-Regenerable Oxygen System Using Microalgae-Bacterial Consortium for Ammonium Removal from Wastewater. *Chemical Engineering Journal*, **2024**, *498*, 155200. https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.155200.
[242] Ruiz-Martinez, A.; Serralta, J.; Pachés, M.; Seco, A.; Ferrer, J. Mixed Microalgae Culture for Ammonium Removal in the Absence of Phosphorus: Effect of Phosphorus Supplementation and Process Modeling. *Process Biochemistry*, **2014**, *49* (12), 2249–2257. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.002.
[243] Zhang, Z.; Liu, S. Insight into the Overconsumption of Ammonium by Anammox Consortia under Anaerobic Conditions. *Journal of Applied Microbiology*, **2014**, *117* (6), 1830–1838. https://doi.org/10.1111/jam.12649.

[244] Toh, S. K.; Webb, R. I.; Ashbolt, N. J. Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-Oxidizing Consortia from Various Wastewaters. *Microbial Ecology*, **2002**, *43* (1), 154–167. https://doi.org/10.1007/s00248-001-0033-9.
[245] Chen, C.; Wang, Z.; Zhao, M.; Yuan, B.; Yao, J.; Chen, J.; Hrynshpan, D.; Savitskaya, T. A Fungus–Bacterium Co-Culture Synergistically Promoted Nitrogen Removal by Enhancing Enzyme Activity and Electron Transfer. *Science of The Total Environment*, **2021**, *754*. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142109.
[246] Deveau, A.; Bonito, G.; Uehling, J.; Paoletti, M.; Becker, M.; Bindschedler, S.; Hacquard, S.; Hervé, V.; Labbé, J.; Lastovetsky, O. A.; et al. Bacterial–Fungal Interactions: Ecology, Mechanisms and Challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, **2018**, *42* (3), 335–352. https://doi.org/10.1093/femsre/fuy008.
[247] Salvioli, A.; Ghignone, S.; Novero, M.; Navazio, L.; Venice, F.; Bagnaresi, P.; Bonfante, P. Symbiosis with an Endobacterium Increases the Fitness of a Mycorrhizal Fungus, Raising Its Bioenergetic Potential. *The ISME Journal*, **2016**, *10* (1), 130–144. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.91.
[248] Scherlach, K.; Graupner, K.; Hertweck, C. Molecular Bacteria-Fungi Interactions: Effects on Environment, Food, and Medicine. *Annual Review of Microbiology*, **2013**, *67* (Volume 67, 2013), 375–397. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155702.
[249] VulkaTec Riebensahm GmbH. Datenblatt für Lavasteine (Vulka ST 16-32), 2022.
[250] Sun, Z.; Xi, J.; Yang, R.; Lu, L.; Qiu, W.; Yang, B. Structures and Compositions of Biofilms in Moving Bed Biofilm Reactors Pretreated by Four Drying Methods. *Chemical Engineering Journal*, **2023**, *477*, 147228. https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.147228.
[251] Won, Y.; Lee, T.; Wu, Y.; Deshusses, M. An Environmentally Friendly Method for Controlling Biomass in Biotrickling Filters for Air Pollution Control. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **2004**, *10*, 60–65.
[252] Ramírez, M.; Gómez, J. M.; Aroca, G.; Cantero, D. Removal of Hydrogen Sulfide by Immobilized *Thiobacillus Thioparus* in a Biotrickling Filter Packed with Polyurethane Foam. *Bioresource Technology*, **2009**, *100* (21), 4989–4995. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.022.
[253] Delatolla, R.; Berk, D.; Tufenkji, N. Rapid and Reliable Quantification of Biofilm Weight and Nitrogen Content of Biofilm Attached to Polystyrene Beads. *Water Research*, **2008**, *42* (12), 3082–3088. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.023.
[254] Kovács, G.; Burghardt, J.; Pradella, S.; Schumann, P.; Stackebrandt, E.; Márialigeti, K. *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., Isolated from the Rhizoplane of the Narrow-Leaved Cattail (*Typha angustifolia*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **1999**, *49* (1), 167–173. https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-167.
[255] Niehus, X.; Casas-Godoy, L.; Vargas-Sánchez, M.; Sandoval, G. A Fast and Simple Qualitative Method for Screening Oleaginous Yeasts on Agar. *Journal of Lipids*, **2018**, *2018* (1), 5325804. https://doi.org/10.1155/2018/5325804.
[256] Jones, B. The Preferential Association of Dolomite with Microbes in Stalactites from Cayman Brac, British West Indies. *Sedimentary Geology*, **2010**, *226* (1), 94–109. https://doi.org/10.1016/j.sedgeo.2010.03.004.
[257] De Vela, R. J. L.; Gostomski, P. A. Minimising Biomass Accumulation in Biotrickling Filters. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **2018**, *17* (3), 417–430. https://doi.org/10.1007/s11157-018-9471-4.
[258] Kennes, C.; Veiga, M. C. Inert Filter Media for the Biofiltration of Waste Gases – Characteristics and Biomass Control. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **2002**, *1* (3), 201–214. https://doi.org/10.1023/A:1021240500817.
[259] Yang, C.; Chen, H.; Zeng, G.; Yu, G.; Luo, S. Biomass Accumulation and Control Strategies in Gas Biofiltration. *Biotechnology Advances*, **2010**, *28* (4), 531–540. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.04.002.
[260] Zhou, Q.; Zhang, L.; Chen, J.; Luo, Y.; Zou, H.; Sun, B. Enhanced Stable Long-Term Operation of Biotrickling Filters Treating VOCs by Low-Dose Ozonation and Its Affecting Mechanism on Biofilm. *Chemosphere*, **2016**, *162*, 139–147. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.072.
[261] Penesyan, A.; Paulsen, I. T.; Kjelleberg, S.; Gillings, M. R. Three Faces of Biofilms: A Microbial Lifestyle, a Nascent Multicellular Organism, and an Incubator for Diversity. *npj Biofilms Microbiomes*, **2021**, *7* (1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41522-021-00251-2.
[262] Fried, J.; Mayr, G.; Berger, H.; Traunspurger, W.; Psenner, R.; Lemmer, H. Monitoring Protozoa and Metazoa Biofilm Communities for Assessing Wastewater Quality Impact and Reactor Up-Scaling Effects. *Water Science and Technology*, **2000**, *41* (4–5), 309–316. https://doi.org/10.2166/wst.2000.0460.
[263] Weitere, M.; Erken, M.; Majdi, N.; Arndt, H.; Norf, H.; Reinshagen, M.; Traunspurger, W.; Walterscheid, A.; Wey, J. K. The Food Web Perspective on Aquatic Biofilms. *Ecological Monographs*, **2018**, *88* (4), 543–559. https://doi.org/10.1002/ecm.1315.
[264] Salvadó, H.; Palomo, A.; Mas, M.; Puigagut, J.; Gracia, M. D. P. Dynamics of Nematodes in a High Organic Loading Rotating Biological Contactors. *Water Research*, **2004**, *38* (10), 2571–2578. https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.007.
[265] Wimpenny, J. W. T.; Kinniment, S. Biochemical Reactions and the Establishment of Gradients within Biofilms. In *Microbial Biofilms*; Lappin-Scott, H. M., Costerton, J. W., Eds.; Biotechnology Research; Cambridge University Press: Cambridge, 1995; 99–117. https://doi.org/10.1017/CBO9780511525353.007.
[266] Traunspurger, W. *Ecology of Freshwater Nematodes*; CABI, 2021.
[267] de Beer, D.; Stoodley, P. Relation between the Structure of an Aerobic Biofilm and Transport Phenomena. *Water Science and Technology*, **1995**, *32* (8), 11–18. https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00002-9.

[268] Mathieu, M.; Leflaive, J.; Ten-Hage, L.; De Wit, R.; Buffan-Dubau, E. Free-Living Nematodes Affect Oxygen Turnover of Artificial Diatom Biofilms. *Aquatic Microbial Ecology*, **2007**, *49*, 281–291. https://doi.org/10.3354/ame01150.
[269] Seignez, C.; Holliger, C. Influence of Nematodes Grazing Bacteria on Biomass Growth in a Biotrickling Filter Treating Chlorobenzenes. In *Proceedings of the International Congress Biotechniques for Air Pollution Control*; 2005; 361–367.
[270] Bergtold, M.; Mayr, G.; Traunspurger, W. Nematodes in Wastewater Biofilms—Appearance and Density of Species in Three Biofilter Reactors. *Water Research*, **2007**, *41* (1), 145–151. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.023.
[271] Klein, T.; Zihlmann, D.; Derlon, N.; Isaacson, C.; Szivak, I.; Weissbrodt, D. G.; Pronk, W. Biological Control of Biofilms on Membranes by Metazoans. *Water Research*, **2016**, *88*, 20–29. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.050.
[272] Chan, S. Y.; Liu, S. Y.; Seng, Z.; Chua, S. L. Biofilm Matrix Disrupts Nematode Motility and Predatory Behavior. *The ISME Journal*, **2021**, *15* (1), 260–269. https://doi.org/10.1038/s41396-020-00779-9.
[273] Jia, H.; Yuan, Q. Ammonium Removal Using Algae–Bacteria Consortia: The Effect of Ammonium Concentration, Algae Biomass, and Light. *Biodegradation*, **2018**, *29* (2), 105–115. https://doi.org/10.1007/s10532-017-9816-7.
[274] Yang, L.; Ren, Y.-X.; Zhao, S.-Q.; Liang, X.; Wang, J. Isolation and Characterization of Three Heterotrophic Nitrifying-Aerobic Denitrifying Bacteria from a Sequencing Batch Reactor. *Annals of Microbiology*, **2015**, *66*. https://doi.org/10.1007/s13213-015-1161-7.
[275] Jiang, X.; Yan, R.; Tay, J. H. Transient-State Biodegradation Behavior of a Horizontal Biotrickling Filter in Co-Treating Gaseous H_2S and NH_3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2009**, *81* (5), 969–975. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1759-9.
[276] Van der Heyden, C.; De Mulder, T.; Volcke, E. I. P.; Demeyer, P.; Heyndrickx, M.; Rasschaert, G. Long-Term Microbial Community Dynamics at Two Full-Scale Biotrickling Filters Treating Pig House Exhaust Air. *Microbial Biotechnology*, **2019**, *12* (4), 775–786. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13417.
[277] Popov, V. O.; Bezborodov, A. M.; Cavanagh, M.; Cross, P. Evaluation of Industrial Biotrickling Filter at the Flexographic Printing Facility. *Environmental Progress*, **2004**, *23* (1), 39–44. https://doi.org/10.1002/ep.10005.
[278] Liu, S.; Gao, P.-F.; Li, S.; Fu, H.; Wang, L.; Dai, Y.; Fu, M. A Review of the Recent Progress in Biotrickling Filters: Packing Materials, Gases, Micro-Organisms, and CFD. *Environmental Science and Pollution Research*, **2023**, *30* (60), 125398–125416. https://doi.org/10.1007/s11356-023-31004-7.
[279] Hekmat, D.; Feuchtinger, A.; Stephan, M.; Vortmeyer, D. Biofilm Population Dynamics in a Trickle-Bed Bioreactor Used for the Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons from Waste Gas under Transient Conditions. *Biodegradation*, **2004**, *15* (2), 133–144. https://doi.org/10.1023/B:BIOD.0000015647.21321.df.
[280] Portune, K. J.; Pérez, M. C.; Álvarez-Hornos, J.; Gabaldón, C. Contribution of Bacterial Biodiversity on the Operational Performance of a Styrene Biotrickling Filter. *Chemosphere*, **2020**, *247*, 125800. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125800.
[281] Joo, H.-S.; Hirai, M.; Shoda, M. Nitrification and Denitrification in High-Strength Ammonium by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters*, **2005**, *27* (11), 773–778. https://doi.org/10.1007/s10529-005-5634-9.
[282] Taylor, S. M.; He, Y.; Zhao, B.; Huang, J. Heterotrophic Ammonium Removal Characteristics of an Aerobic Heterotrophic Nitrifying-Denitrifying Bacterium, *Providencia rettgeri* YL. *Journal of Environmental Sciences*, **2009**, *21* (10), 1336–1341. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62423-7.
[283] Kamzolova, S. V. A Review on Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Yeast: Past and Present Challenges and Developments. *Processes*, **2023**, *11* (12), 3435. https://doi.org/10.3390/pr11123435.
[284] Tsai, Y.-P. Impact of Flow Velocity on the Dynamic Behaviour of Biofilm Bacteria. *Biofouling*, **2005**, *21* (5–6), 267–277. https://doi.org/10.1080/08927010500398633.
[285] Krsmanovic, M.; Biswas, D.; Ali, H.; Kumar, A.; Ghosh, R.; Dickerson, A. K. Hydrodynamics and Surface Properties Influence Biofilm Proliferation. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2021**, *288*, 102336. https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102336.
[286] Wang, C.; Miao, L.; Hou, J.; Wang, P.; Qian, J.; Dai, S. The Effect of Flow Velocity on the Distribution and Composition of Extracellular Polymeric Substances in Biofilms and the Detachment Mechanism of Biofilms. *Water Science and Technology*, **2013**, *69* (4), 825–832. https://doi.org/10.2166/wst.2013.785.
[287] Chen, J.; Cui, Y.-W.; Huang, M.-Q.; Yan, H.-J.; Li, D. Static Magnetic Field Increases Aerobic Nitrogen Removal from Hypersaline Wastewater in Activated Sludge with Coexistence of Fungi and Bacteria. *Bioresource Technology*, **2023**, *382*, 129194. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129194.
[288] Mansouri, A.; Abbes, C.; Landoulsi, A. Combined Intervention of Static Magnetic Field and Growth Rate of *Microbacterium Maritypicum* CB7 for Benzo(*a*)Pyrene Biodegradation. *Microbial Pathogenesis*, **2017**, *113*, 40–44. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.008.
[289] Tang, H.; Wang, P.; Wang, H.; Fang, Z.; Yang, Q.; Ni, W.; Sun, X.; Liu, H.; Wang, L.; Zhao, G.; et al. Effect of Static Magnetic Field on Morphology and Growth Metabolism of *Flavobacterium* sp. M1-14. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **2019**, *42* (12), 1923–1933. https://doi.org/10.1007/s00449-019-02186-7.
[290] Ji, Y.; Wang, Y.; Sun, J.; Yan, T.; Li, J.; Zhao, T.; Yin, X.; Sun, C. Enhancement of Biological Treatment of Wastewater by Magnetic Field. *Bioresource Technology*, **2010**, *101* (22), 8535–8540. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.094.

[291] Cortés-Castillo, M.; Encinas, A.; Aizpuru, A.; Arriaga, S. Effect of Applying a Magnetic Field on the Biofiltration of Hexane over Long-Term Operation Period. *Environmental Science and Pollution Research*, **2024**. https://doi.org/10.1007/s11356-024-34671-2.
[292] Chen, D.; Qiu, J.; Sun, H.; Liu, Y.; Ye, J.; Chen, J.-M.; Lu, L. Enhanced Chlorobenzene Removal by Internal Magnetic Field through Initial Cell Adhesion and Biofilm Formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2024**, *108* (1), 159. https://doi.org/10.1007/s00253-024-13001-z.
[293] Quan, Y.; Wu, H.; Yin, Z.; Fang, Y.; Yin, C. Effect of Static Magnetic Field on Trichloroethylene Removal in a Biotrickling Filter. *Bioresource Technology*, **2017**, *239*, 7–16. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.121.
[294] Quan, Y.; Wu, H.; Guo, C.; Han, Y.; Yin, C. Enhancement of TCE Removal by a Static Magnetic Field in a Fungal Biotrickling Filter. *Bioresource Technology*, **2018**, *259*, 365–372. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.031.
[295] Wang M.; Yang T.; Geng Y.; Yin C.; Quan Y. Removal of Trichloroethylene by a Magnetic Field-Fungal Biotrickling Filter. *Journal of Southwest University Natural Science Edition*, **2021**, *43* (5), 172–181. https://doi.org/10.13718/j.cnki.xdzk.2021.05.021.
[296] Harten, U. *Physik: Eine Einführung für Ingenieure und Naturwissenschaftler*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2024. https://doi.org/10.1007/978-3-662-68484-9.
[297] Hauptmanns, U. *Prozess- und Anlagensicherheit*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-662-59709-5.
[298] Walhalla Fachredaktion. *Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz, Unfallverhütung: Ausgabe 2024; Gesetze, Verordnungen, Technische Regeln (ASR) für die betriebliche und behördliche Praxis*; Walhalla Fachverlag, 2023.
[299] Oyarzun, P.; Alarcón, L.; Calabriano, G.; Bejarano, J.; Nuñez, D.; Ruiz-Tagle, N.; Urrutia, H. Trickling Filter Technology for Biotreatment of Nitrogenous Compounds Emitted in Exhaust Gases from Fishmeal Plants. *Journal of Environmental Management*, **2019**, *232*, 165–170. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.008.
[300] Moussavi, G.; Khavanin, A.; Sharifi, A. Ammonia Removal from a Waste Air Stream Using a Biotrickling Filter Packed with Polyurethane Foam through the SND Process. *Bioresource Technology*, **2011**, *102* (3), 2517–2522. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.047.
[301] Tsang, Y. F.; Wang, L.; Chua, H. Effects of High Ammonia Loads on Nitrogen Mass Balance and Treatment Performance of a Biotrickling Filter. *Process Safety and Environmental Protection*, **2015**, *98*, 253–260. https://doi.org/10.1016/j.psep.2015.08.008.
[302] Ramirez, M.; Gómez, J. M.; Aroca, G.; Cantero, D. Removal of Hydrogen Sulfide and Ammonia from Gas Mixtures by Co-Immobilized Cells Using a New Configuration of Two Biotrickling Filters. *Water Science and Technology*, **2009**, *59* (7), 1353–1359. https://doi.org/10.2166/wst.2009.105.
[303] Du, J.; You, J.; Cai, Z.; Wang, H.; Chen, D.; Zhu, S.; Liu, D. Simultaneous Removal of Ammonia and Sulfur Odorants in Biotrickling Filters and N2O Production. *Bioresource Technology*, **2024**, *403*, 130870. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130870.
[304] Hernández, J.; Dorado, A. D.; Lafuente, J.; Gamisans, X.; Prado, Ó. J.; Gabriel, D. Characterization and Evaluation of Poplar and Pine Wood in Twin Biotrickling Filters Treating a Mixture of NH_3, H_2S, Butyric Acid, and Ethylmercaptan. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, **2017**, *36* (1), 171–179. https://doi.org/10.1002/ep.12491.
[305] Blázquez, E.; Bezerra, T.; Lafuente, J.; Gabriel, D. Performance, Limitations and Microbial Diversity of a Biotrickling Filter for the Treatment of High Loads of Ammonia. *Chemical Engineering Journal*, **2017**, *311*, 91–99. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.072.
[306] Sakuma, T.; Jinsiriwanit, S.; Hattori, T.; Deshusses, M. A. Removal of Ammonia from Contaminated Air in a Biotrickling Filter – Denitrifying Bioreactor Combination System. *Water Research*, **2008**, *42* (17), 4507–4513. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.07.036.
[307] Zápotocký, L.; Šváb, M. Removal of Ammonia Emissions from Waste Air in a Biotrickling Filter: Pilot-Scale Demonstration in Real Conditions. *Open Chemistry*, **2012**, *10* (4), 1049–1058. https://doi.org/10.2478/s11532-012-0010-9.
[308] Jiang, X.; Yan, R.; Tay, J. H. Simultaneous Autotrophic Biodegradation of H_2S and NH_3 in a Biotrickling Filter. *Chemosphere*, **2009**, *75* (10), 1350–1355. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.028.
[309] Ying, S.; Kong, X.; Cai, Z.; Man, Z.; Xin, Y.; Liu, D. Interactions and Microbial Variations in a Biotrickling Filter Treating Low Concentrations of Hydrogen Sulfide and Ammonia. *Chemosphere*, **2020**, *255*, 126931. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126931.
[310] Hien Lam, P. T.; Bui, N. B. T.; Nguyen, T. T.; Nguyen, T. L. L.; Vo, T. T. T.; Nguyen, N. H. Application of Biological Methods in the Treatment of Gaseous Ammonia. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **2019**, *61* (3), 71–76. https://doi.org/10.31276/VJSTE.61(3).71-76.
[311] Xue, N.; Wang, Q.; Wu, C.; Zhang, L.; Xie, W. Enhanced Removal of NH_3 during Composting by a Biotrickling Filter Inoculated with Nitrifying Bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, **2010**, *51* (1), 86–93. https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.05.007.
[312] Wang, Y.; Cui, R.; Jiang, H.; Bai, M.; Lin, K.; Zhang, M.; Ren, L. Removal of Hydrogen Sulfide and Ammonia Using a Biotrickling Filter Packed with Modified Composite Filler. *Processes*, **2022**, *10* (10), 2016. https://doi.org/10.3390/pr10102016.
[313] Chung, Y.-C.; Lin, Y.-Y.; Tseng, C.-P. Removal of High Concentration of NH_3 and Coexistent H_2S by Biological Activated Carbon (BAC) Biotrickling Filter. *Bioresource Technology*, **2005**, *96* (16), 1812–1820. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.003.

[314] Huan, C.; Lyu, Q.; Tong, X.; Li, H.; Zeng, Y.; Liu, Y.; Jiang, X.; Ji, G.; Xu, L.; Yan, Z. Analyses of Deodorization Performance of Mixotrophic Biotrickling Filter Reactor Using Different Industrial and Agricultural Wastes as Packing Material. *Journal of Hazardous Materials*, **2021**, *420*, 126608. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126608.
[315] Huan, C.; Wang, J.; He, Y.; Liu, Y.; Tian, X.; Lyu, Q.; Wang, Z.; Ji, G.; Yan, Z. Efficient Strategy for Employing HN-AD Bacterium Enhanced Biofilter Reactors to Remove NH_3 and Reduce Secondary Pollution. *Journal of Hazardous Materials*, **2024**, *480*, 135802. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135802.
[316] Tang, L.; Deshusses, M. A. Novel Integrated Biotrickling Filter–Anammox Bioreactor System for the Complete Treatment of Ammonia in Air with Nitrification and Denitrification. *Environmental Science & Technology*, **2020**, *54* (19), 12654–12661. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c03332.
[317] Huan, C.; Fang, J.; Tong, X.; Zeng, Y.; Liu, Y.; Jiang, X.; Ji, G.; Xu, L.; Lyu, Q.; Yan, Z. Simultaneous Elimination of H_2S and NH_3 in a Biotrickling Filter Packed with Polyhedral Spheres and Best Efficiency in Compost Deodorization. *Journal of Cleaner Production*, **2021**, *284*, 124708. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124708.
[318] Kawase, Y.; Hirata, A.; Kojima, T.; Ohmori, S.; Akutagawa, H.; Uehara, K.; Iwata, K.; Nakajima, T.; Yamamoto, K. Improvement of Biodegradation in Compact Co-Current Biotrickling Filter by High Recycle Liquid Flow Rate: Performance and Biodegradation Kinetics of Ammonia Removal. *Process Biochemistry*, **2014**, *49* (10), 1733–1740. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.008.
[319] Su, Q.; Dai, D.; Liao, Y.; Han, H.; Wu, J.; Ren, Z. Synthetic Microbial Consortia to Enhance the Biodegradation of Compost Odor by Biotrickling Filter. *Bioresource Technology*, **2023**, *387*, 129698. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129698.
[320] Copelli, S.; Raboni, M.; Derudi, M.; Nano, G.; Torretta, V. Comparison between Absorption and Biological Activity on the Efficiency of the Biotrickling Filtration of Gaseous Streams Containing Ammonia. *Environmental Science and Pollution Research*, **2017**, *24* (29), 23207–23218. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9968-3.
[321] Raboni, M.; Torretta, V. A Modified Biotrickling Filter for Nitrification-Denitrification in the Treatment of an Ammonia-Contaminated Air Stream. *Environmental Science and Pollution Research*, **2016**, *23* (23), 24256–24264. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7694-x.
[322] Zhu, Q.; Wu, P.; Chen, B.; Wu, Q.; Cao, F.; Wang, H.; Mei, Y.; Liang, Y.; Sun, X.; Chen, Z. Improving NH_3 and H_2S Removal Efficiency with Pilot-Scale Biotrickling Filter by Co-Immobilizing *Kosakonia oryzae* FB2-3 and *Acinetobacter baumannii* L5-4. *Environmental Science and Pollution Research*, **2022**, *30* (12), 33181–33194. https://doi.org/10.1007/s11356-022-24426-2.
[323] Deng, L.; Xu, J.; Li, Y.; Wu, S.; Yi, K.; Dai, R.; He, S.; Xu, Y. Deodorization of the Off-Gas from Livestock Manure Aerobic Composting Tank Using Biotrickling Filters and Its Mechanism. *Biochemical Engineering Journal*, **2022**, *181*, 108409. https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108409.
[324] Melse, R. W.; Ploegaert, J. P. M.; Ogink, N. W. M. Biotrickling Filter for the Treatment of Exhaust Air from a Pig Rearing Building: Ammonia Removal Performance and Its Fluctuations. *Biosystems Engineering*, **2012**, *113* (3), 242–252. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.08.010.
[325] Wu, C.; Wang, Q.; Sun, X.; Xue, N.; Liu, S.; Xie, W. Effect of Aeration Modes on the Characteristics of Composting Emissions and the NH_3 Removal Efficiency by Using Biotrickling Filter. *Waste Management*, **2011**, *31* (8), 1702–1710. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.04.003.
[326] *Handbuch Chemische Reaktoren*; Reschetilowski, W., Ed.; Springer Reference Naturwissenschaften; Springer: Berlin, Heidelberg, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56434-9.
[327] Kraume, M. *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik: Grundlagen und apparative Umsetzungen*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-662-60012-2.
[328] Liu, J. W.; Zhao, Y. Z.; Ma, W. L. Removal of Ammonia from Waste Gases by a Biotrickling Filter. *Advanced Materials Research*, **2011**, *233–235*, 759–764. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.233-235.759.
[329] Barbusiński, K.; Parzentna-Gabor, A.; Kasperczyk, D. Removal of Odors (Mainly H_2S and NH_3) Using Biological Treatment Methods. *Clean Technologies*, **2021**, *3* (1), 138–155. https://doi.org/10.3390/cleantechnol3010009.
[330] Iranpour, R.; Cox, H. H. J.; Deshusses, M. A.; Schroeder, E. D. Literature Review of Air Pollution Control Biofilters and Biotrickling Filters for Odor and Volatile Organic Compound Removal. *Environmental Progress*, **2005**, *24* (3), 254–267. https://doi.org/10.1002/ep.10077.
[331] Liu, D.; Løkke, M. M.; Leegaard Riis, A.; Mortensen, K.; Feilberg, A. Evaluation of Clay Aggregate Biotrickling Filters for Treatment of Gaseous Emissions from Intensive Pig Production. *Journal of Environmental Management*, **2014**, *136*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.01.023.
[332] Hattori, H.; Mukai, S. Decomposition of Sewage Sludges in Soil as Affected by Their Organic Matter Composition. *Soil Science and Plant Nutrition*, **1986**, *32* (3), 421–432. https://doi.org/10.1080/00380768.1986.10557522.
[333] Kügler, I.; Öhlinger, A.; Walter, B. *Dezentrale Klärschlammverbrennung*; Umweltbundesamt GmbH, 2004.
[334] Sommers, L. E. Chemical Composition of Sewage Sludges and Analysis of Their Potential Use as Fertilizers. *Journal of Environmental Quality*, **1977**, *6* (2), 225–232. https://doi.org/10.2134/jeq1977.00472425000600020026x.
[335] Bradford, G. R.; Page, A. L.; Lund, L. J.; Olmstead, W. Trace Element Concentrations of Sewage Treatment Plant Effluents and Sludges; Their Interactions with Soils and Uptake by Plants. *Journal of Environmental Quality*, **1975**, *4* (1), 123–127. https://doi.org/10.2134/jeq1975.00472425000400010029x.

[336] *Praxishandbuch der Kreislauf- und Rohstoffwirtschaft*; Kurth, P., Oexle, A., Faulstich, M., Eds.; Springer Fachmedien: Wiesbaden, 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-658-36262-1.
[337] Kröpfl, K.; Vladár, P.; Szabó, K.; Ács, É.; Borsodi, A. K.; Szikora, S.; Caroli, S.; Záray, G. Chemical and Biological Characterisation of Biofilms Formed on Different Substrata in Tisza River (Hungary). *Environmental Pollution*, **2006**, *144* (2), 626–631. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.031.
[338] Anggayasti, W. L.; Salamah, L. N.; Rizkymaris, A.; Yamamoto, T.; Kurniawan, A. The Role of Ion Charge Density and Solubility in the Biosorption of Heavy Metals by Natural Biofilm Matrix of Polluted Freshwater: The Cases of Mg(II), Cr(VI), and Cu(II). *Environmental Pollutants and Bioavailability*, **2023**, *35* (1), 2220571. https://doi.org/10.1080/26395940.2023.2220571.
[339] Fomina, M.; Gadd, G. M. Biosorption: Current Perspectives on Concept, Definition and Application. *Bioresource Technology*, **2014**, *160*, 3–14. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.102.
[340] Torres, E. Biosorption: A Review of the Latest Advances. *Processes*, **2020**, *8* (12), 1584. https://doi.org/10.3390/pr8121584.
[341] *Verordnung über das Inverkehrbringen von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln (DüMV)*; 1991.
[342] Pandit, A.; Adholeya, A.; Cahill, D.; Brau, L.; Kochar, M. Microbial Biofilms in Nature: Unlocking Their Potential for Agricultural Applications. *Journal of Applied Microbiology*, **2020**, *129* (2), 199–211. https://doi.org/10.1111/jam.14609.
[343] Hettiarachchi, R.; Dharmakeerthi, S.; Jayakody, A.; Seneviratne, G.; Silva, E.; Gunathilake, T.; Thewarapperuma, A. Effectiveness of Fungal Bacterial Interactions as Biofilmed Biofertilizers on Enhancement of Root Growth of Hevea Seedlings. *Journal of Environmental Professionals Sri Lanka*, **2014**, *3*. https://doi.org/10.4038/jepsl.v3i2.7844.
[344] Seneviratne, G.; Jayasekara, A. P. D. A.; De Silva, M. S. D. L.; Abeysekera, U. P. Developed Microbial Biofilms Can Restore Deteriorated Conventional Agricultural Soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **2011**, *43* (5), 1059–1062. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.01.026.
[345] Malusà, E.; Sas, L.; Ciesielska, J. Technologies for Beneficial Microorganisms Inocula Used as Biofertilizers. *TheScientificWorldJournal*, **2012**, *2012*, 491206. https://doi.org/10.1100/2012/491206.
[346] Beekes, M.; Lasch, P.; Naumann, D. Analytical Applications of Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spectroscopy in Microbiology and Prion Research. *Veterinary Microbiology*, **2007**, *123* (4), 305–319. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.010.
[347] Liaqat, I. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of Dental Unit Water Line Biofilm Bacteria. *Journal of Spectroscopy*, **2009**, *23* (3–4), 892569. https://doi.org/10.3233/SPE-2009-0374.
[348] Kassem, A.; Abbas, L.; Coutinho, O.; Opara, S.; Najaf, H.; Kasperek, D.; Pokhrel, K.; Li, X.; Tiquia-Arashiro, S. Applications of Fourier Transform-Infrared Spectroscopy in Microbial Cell Biology and Environmental Microbiology: Advances, Challenges, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, **2023**, *14*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1304081.
[349] Kamnev, A. A.; Tugarova, A. V. Specificities of the Fourier Transform Infrared Spectroscopic Methodology and Interpretation of Spectroscopic Data in Microbiological Analyses. *Journal of Analytical Chemistry*, **2023**, *78* (10), 1320–1332. https://doi.org/10.1134/S1061934823100106.
[350] Schmitt, J.; Flemming, H.-C. FTIR-Spectroscopy in Microbial and Material Analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **1998**, *41* (1), 1–11. https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)80002-4.
[351] Ariafar, M. N.; Iğci, N.; Akçelik, M.; Akçelik, N. Investigation of the Effect of Different Environmental Conditions on Biofilm Structure of *Salmonella enterica* Serotype Virchow via FTIR Spectroscopy. *Archives of Microbiology*, **2019**, *201* (9), 1233–1248. https://doi.org/10.1007/s00203-019-01681-5.
[352] Pop, C.; Apostu, S.; Rotar, A. M.; Semeniuc, C. A.; Sindic, M.; Mabon, N. FTIR Spectroscopic Characterization of a New Biofilm Obtained from Kefiran. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **2013**, *19(2)*.
[353] Wang, H.; Ding, S.; Wang, G.; Xu, X.; Zhou, G. In Situ Characterization and Analysis of *Salmonella* Biofilm Formation under Meat Processing Environments Using a Combined Microscopic and Spectroscopic Approach. *International Journal of Food Microbiology*, **2013**, *167* (3), 293–302. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005.
[354] Bosch, A.; Serra, D.; Prieto, C.; Schmitt, J.; Naumann, D.; Yantorno, O. Characterization of *Bordetella pertussis* Growing as Biofilm by Chemical Analysis and FT-IR Spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2006**, *71* (5), 736–747. https://doi.org/10.1007/s00253-005-0202-8.
[355] Tugarova, A. V.; Scheludko, A. V.; Dyatlova, Y. A.; Filip'echeva, Y. A.; Kamnev, A. A. FTIR Spectroscopic Study of Biofilms Formed by the Rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Mutant *Azospirillum brasilense* Sp245.1610. *Journal of Molecular Structure*, **2017**, *1140*, 142–147. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.12.063.
[356] Delille, A.; Quilès, F.; Humbert, F. In Situ Monitoring of the Nascent Pseudomonas Fluorescens Biofilm Response to Variations in the Dissolved Organic Carbon Level in Low-Nutrient Water by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, **2007**, *73* (18), 5782–5788. https://doi.org/10.1128/AEM.00838-07.
[357] Kamnev, A. A.; Dyatlova, Y. A.; Kenzhegulov, O. A.; Fedonenko, Y. P.; Evstigneeva, S. S.; Tugarova, A. V. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Biofilms Formed by the Rhizobacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245: Aspects of Methodology and Matrix Composition. *Molecules*, **2023**, *28* (4), 1949. https://doi.org/10.3390/molecules28041949.

[358] Bajrami, D.; Fischer, S.; Barth, H.; Sarquis, M. A.; Ladero, V. M.; Fernández, M.; Sportelli, M. C.; Cioffi, N.; Kranz, C.; Mizaikoff, B. In Situ Monitoring of *Lentilactobacillus parabuchneri* Biofilm Formation via Real-Time Infrared Spectroscopy. *npj Biofilms Microbiomes*, **2022**, *8* (92). https://doi.org/10.1038/s41522-022-00353-5.

[359] Veiga, F. F.; de Castro-Hoshino, L. V.; Sato, F.; Baesso, M. L.; Silva, S.; Negri, M.; Svidzinski, T. I. E. Characterization of a Biofilm Formed by *Fusarium oxysporum* on the Human Nails. *International Journal of Dermatology*, **2022**, *61* (2), 191–198. https://doi.org/10.1111/ijd.15747.

[360] Gieroba, B.; Krysa, M.; Wojtowicz, K.; Wiater, A.; Pleszczyńska, M.; Tomczyk, M.; Sroka-Bartnicka, A. The FT-IR and Raman Spectroscopies as Tools for Biofilm Characterization Created by Cariogenic Streptococci. *International Journal of Molecular Sciences*, **2020**, *21* (11), 3811. https://doi.org/10.3390/ijms21113811.

[361] Singhalage, D.; Seneviratne, G.; Madawala, S.; Manawasinghe, I. Characterization of Structural Properties of Fungal-Bacterial Biofilms by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Ceylon Journal of Science*, **2018**, *47*, 77. https://doi.org/10.4038/cjs.v47i1.7490.

[362] Filip, Z.; Hermann, S. An Attempt to Differentiate *Pseudomonas* spp. and Other Soil Bacteria by FT-IR Spectroscopy. *European Journal of Soil Biology*, **2001**, *37* (3), 137–143. https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01078-0.

[363] Kirchgeßner, M.; Stangl, G. I.; Schwarz, F. J.; Roth, F. X.; Südekum, K.-H.; Eder, K. *Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis*, 14., aktualisierte Auflage.; DLG-Verlag: Frankfurt am Main, 2014.

[364] *Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch*; 2005.

[365] Kovačić, Đ.; Lončarić, Z.; Jović, J.; Samac, D.; Popović, B.; Tišma, M. Digestate Management and Processing Practices: A Review. *Applied Sciences*, **2022**, *12* (18), 9216. https://doi.org/10.3390/app12189216.

[366] Monlau, F.; Sambusiti, C.; Ficara, E.; Aboulkas, A.; Barakat, A.; Carrère, H. New Opportunities for Agricultural Digestate Valorization: Current Situation and Perspectives. *Energy & Environmental Science*, **2015**, *8* (9), 2600–2621. https://doi.org/10.1039/C5EE01633A.

[367] Yang, S.; Xu, J.; Wang, Z.-M.; Bao, L.-J.; Zeng, E. Y. Cultivation of Oleaginous Microalgae for Removal of Nutrients and Heavy Metals from Biogas Digestates. *Journal of Cleaner Production*, **2017**, *164*, 793–803. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.06.221.

[368] Häfner, F.; Hartung, J.; Möller, K. Digestate Composition Affecting N Fertiliser Value and C Mineralisation. *Waste & Biomass Valorization*, **2022**, *13* (8), 3445–3462. https://doi.org/10.1007/s12649-022-01723-y.

[369] Somers, M. H.; Azman, S.; Bollansée, G.; Goedemé, T.; Leermakers, M.; Alonso-Fariñas, B.; Appels, L. Behavior of Trace Elements and Micronutrients in Manure Digestate during Ozone Treatment. *Chemosphere*, **2020**, *252*, 126477. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126477.

[370] Montusiewicz, A.; Szaja, A.; Musielewicz, I.; Cydzik-Kwiatkowska, A.; Lebiocka, M. Effect of Bioaugmentation on Digestate Metal Concentrations in Anaerobic Digestion of Sewage Sludge. *PLOS ONE*, **2020**, *15* (7), e0235508. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235508.

[371] Ueshima, M.; Fortin, D.; Kalin, M. Development of Iron-Phosphate Biofilms on Pyritic Mine Waste Rock Surfaces Previously Treated with Natural Phosphate Rocks. *Geomicrobiology Journal*, **2004**, *21* (5), 313–323. https://doi.org/10.1080/01490450490453877.

[372] Deng, L.; Liu, Y.; Wang, W. *Biogas Technology*; Springer: Singapore, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4940-3.

[373] *Improving Biogas Production: Technological Challenges, Alternative Sources, Future Developments*; Treichel, H., Fongaro, G., Eds.; Biofuel and Biorefinery Technologies; Springer International Publishing: Cham, 2019; Vol. 9. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10516-7.

[374] Wu, C.; Wang, Q.; Shi, S.; Xue, N.; Zou, D.; Pan, S.; Liu, S. Effective Utilisation of Trickling Liquid Discharged from a Bio-Trickling Filter as a Moisture Conditioning Agent for Composting. *Biosystems Engineering*, **2015**, *129*, 378–387. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.04.002.

[375] Xie, D.; Yang, M.; Xu, M.; Meng, J.; Wu, C.; Wang, Q.; Liu, S. In-Situ Utilization of Nitrogen-Rich Wastewater Discharged from a Biotrickling Filter as a Moisture Conditioning Agent for Composting: Effect of Nitrogen Composition. *Bioresource Technology*, **2022**, *362*, 127828. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127828.

[376] Xie, D.; Yang, M.; Zhang, S.; Xu, M.; Meng, J.; Wu, C.; Wang, Q.; Liu, S. In-Situ Utilization of Nitrogen-Rich Wastewater Discharged from a Biotrickling Filter as a Moisture Conditioning Agent for Composting: Insights into Nitrogen Transformation Behavior and Microbial Mechanism. *Bioresource Technology*, **2023**, *369*, 128362. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128362.

[377] Sarno, M.; Iuliano, M. Potential Utilization as Fertilizer of Waste Liquid from Bio-Trickling Reactor for Greenhouse Gases Treatment. *Chemical Engineering Transactions*, **2020**, *79*, 409–414. https://doi.org/10.3303/CET2079069.

[378] O'dell, B. L.; Woods, W. D.; Laerdal, Osm. A.; Jeffay, A. M.; Savage, J. E. Distribution of the Major Nitrogenous Compounds and Amino Acids in Chicken Urine. *Poultry Science*, **1960**, *39* (2), 426–432. https://doi.org/10.3382/ps.0390426.

[379] Coulson, E. J.; Hughes, J. S. Collection and Analysis of Chicken Urine. *Poultry Science*, **1930**, *10* (1), 53–58. https://doi.org/10.3382/ps.0100058.

[380] Davis, R. E. The Nitrogenous Constituents of Hen Urine. *Journal of Biological Chemistry*, **1927**, *74* (3), 509–513. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)74042-1.

[381] Davidson, J.; Thomas, O. A. A Scheme for the Separation and Estimation of Nitrogenous Components of the Excreta from Poultry. *British Poultry Science*, **1969**, *10* (1), 53–66. https://doi.org/10.1080/00071666908415742.
[382] Clauss, W.; Clauss, C. *Taschenatlas Zoologie*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-662-61593-5.
[383] Such, N.; Mezőlaki, Á.; Rawash, M. A.; Tewelde, K. G.; Pál, L.; Wágner, L.; Schermann, K.; Poór, J.; Dublecz, K. Diet Composition and Using Probiotics or Symbiotics Can Modify the Urinary and Faecal Nitrogen Ratio of Broiler Chicken's Excreta and Also the Dynamics of In Vitro Ammonia Emission. *Animals*, **2023**, *13* (3), 332. https://doi.org/10.3390/ani13030332.
[384] Krogdahl, A.; Dalsgard, B. Estimation of Nitrogen Digestibility in Poultry: Content and Distribution of Major Urinary Nitrogen Compounds in Excreta. *Poultry Science*, **1981**, *60* (11), 2480–2485. https://doi.org/10.3382/ps.0602480.
[385] Hà, P. T.; Man, T. D.; Hoa, T. T. Selection of Optimum Conditions for Culture and Fermentation of Uricase Production by *Pseudomonas putida* CN3. *Vietnam Journal of Science and Technology*, **2013**, *51* (6), 709–718. https://doi.org/10.15625/2525-2518/51/6/11634.
[386] Malassigné, S.; Laÿs, M.; Vallon, L.; Martin, E.; Vigneron, A.; Van, V. T.; Minard, G.; Moro, C. V.; Luis, P. Environmental Yeasts Differentially Impact the Development and Oviposition Behavior of the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. **2025**, *13* (99). https://doi.org/10.1186/s40168-025-02099-6.
[387] Menyes, H.; Fritsche, W. Regulation der Ureasesynthese in *Rhodotorula mucilaginosa*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, **1972**, *12* (3), 219–229. https://doi.org/10.1002/jobm.19720120305.
[388] Casaregola, S.; Neuvéglise, C.; Lépingle, A.; Bon, E.; Feynerol, C.; Artiguenave, F.; Wincker, P.; Gaillardin, C. Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. *FEBS Letters*, **2000**, *487* (1), 95–100. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02288-2.
[389] Abdel-Faftah, G. M.; Abo-Hamed, N. A. Bioconversion of Poultry Wastes I-Factors Influencing the Assay and Productivity of Crude Uricase by Three Uricolytic Filamentous Fungi. *New Microbiologica*, **2002**, *25* (1), 57–64.
[390] Mobley, H. L.; Hausinger, R. P. Microbial Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization. *Microbiological Reviews*, **1989**, *53* (1), 85–108. https://doi.org/10.1128/mr.53.1.85-108.1989.
[391] Chepete, J.; Xin, H.; Li, H. Ammonia Emissions of Laying-Hen Manure as Affected by Accumulation Time. *The Journal of Poultry Science*, **2011**, *48*, 133–138. https://doi.org/10.2141/jpsa.010087.
[392] Groot Koerkamp, P. W. G. Review on Emissions of Ammonia from Housing Systems for Laying Hens in Relation to Sources, Processes, Building Design and Manure Handling. *Journal of Agricultural Engineering Research*, **1994**, *59* (2), 73–87. https://doi.org/10.1006/jaer.1994.1065.
[393] Brink, M.; Janssens, G. P. J.; Demeyer, P.; Bağci, Ö.; Delezie, E. Reduction of Dietary Crude Protein and Feed Form: Impact on Broiler Litter Quality, Ammonia Concentrations, Excreta Composition, Performance, Welfare, and Meat Quality. *Animal Nutrition*, **2022**, *9*, 291–303. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.12.009.
[394] Okada, E.; Young, B. J.; Pérez, D. J.; Pellegrini, M. C.; Carciochi, W. D.; Lavallén, C. M.; Ponce, A. G.; Dopchiz, M. C.; Hernández Guijarro, K.; Franco, M. del R.; et al. Effect of On-Farm Poultry Litter Composting Processes on Physicochemical, Biological, and Toxicological Parameters and Reduction of Antibiotics and Antibiotic-Resistant *Escherichia coli*. *Waste Management*, **2024**, *174*, 310–319. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.12.005.
[395] Selvamani, K.; Annadurai, V.; Soundarapandian, S. Improved Co-Composting of Poultry Manure with Complementary Consortium of Indigenous Bacillus spp. *3 Biotech*, **2019**, *9* (6), 215. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1745-1.
[396] Zhao, H.; Li, S.; Pu, J.; Wang, H.; Dou, X. Effects of *Bacillus*-Based Inoculum on Odor Emissions Co-Regulation, Nutrient Element Transformations and Microbial Community Tropological Structures during Chicken Manure and Sawdust Composting. *Journal of Environmental Management*, **2024**, *354*, 120328. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120328.
[397] Zhang, M.; Li, J. Y.; Chen, D. Y. Effects of Inoculating Microorganism Agents on Aerobic Composting of Chicken Manure. *Advanced Materials Research*, **2012**, *518–523*, 3345–3348. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.518-523.3345.
[398] Zhou, S.; Zhang, X.; Liao, X.; Wu, Y.; Mi, J.; Wang, Y. Effect of Different Proportions of Three Microbial Agents on Ammonia Mitigation during the Composting of Layer Manure. *Molecules*, **2019**, *24* (13), 2513. https://doi.org/10.3390/molecules24132513.
[399] Qiu, Z.; Li, M.; Song, L.; Wang, C.; Yang, S.; Yan, Z.; Wang, Y. Study on Nitrogen-Retaining Microbial Agent to Reduce Nitrogen Loss during Chicken Manure Composting and Nitrogen Transformation Mechanism. *Journal of Cleaner Production*, **2021**, *285*, 124813. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124813.
[400] Cao, R.; Huang, Y.; Li, R.; Li, K.; Ren, Z.; Wu, J. Regulation of Nitrogen Transformation and Microbial Community by Inoculation during Livestock Manure Composting. *Environmental Microbiology Reports*, **2024**, *16* (2), e13256. https://doi.org/10.1111/1758-2229.13256.
[401] Wan, L.; Wang, X.; Cong, C.; Li, J.; Xu, Y.; Li, X.; Hou, F.; Wu, Y.; Wang, L. Effect of Inoculating Microorganisms in Chicken Manure Composting with Maize Straw. *Bioresource Technology*, **2020**, *301*, 122730. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122730.
[402] Abouelenien, F.; Nakashimada, Y.; Nishio, N. Dry Mesophilic Fermentation of Chicken Manure for Production of Methane by Repeated Batch Culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2009**, *107* (3), 293–295. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.009.

[403] El-Deek, A. A.; Ghonem, K. M.; Hamdy, S. M.; Aser, M. A.; Aljasass, F.; Osman, M. M. Producing Single Cell Protein from Poultry Manure and Evaluation for Broiler Chickens Diets. *International Journal of Poultry Science*, **2009**, *8*. https://doi.org/10.3923/ijps.2009.1062.1077.
[404] Jalasutram, V.; Kataram, S.; Gandu, B.; Anupoju, G. R. Single Cell Protein Production from Digested and Undigested Poultry Litter by *Candida utilis*: Optimization of Process Parameters Using Response Surface Methodology. *Clean Technologies and Environmental Policy*, **2013**, *15* (2), 265–273. https://doi.org/10.1007/s10098-012-0504-3.
[405] Patthawaro, S.; Saejung, C. Production of Single Cell Protein from Manure as Animal Feed by Using Photosynthetic Bacteria. *MicrobiologyOpen*, **2019**, *8* (12), e913. https://doi.org/10.1002/mbo3.913.
[406] Showalter, A. M. Structure and Function of Plant Cell Wall Proteins. *The Plant Cell*, **1993**, *5* (1), 9–23. https://doi.org/10.1105/tpc.5.1.9.
[407] Albenne, C.; Canut, H.; Hoffmann, L.; Jamet, E. Plant Cell Wall Proteins: A Large Body of Data, but What about Runaways? *Proteomes*, **2014**, *2* (2), 224–242. https://doi.org/10.3390/proteomes2020224.
[408] Jamet, E.; Dunand, C. Plant Cell Wall Proteins and Development. *International Journal of Molecular Sciences*, **2020**, *21* (8), 2731. https://doi.org/10.3390/ijms21082731.
[409] Wu, D.; Choct, M.; Wu, S. B.; Liu, Y. G.; Swick, R. A. Carbohydrase Enzymes Improve Performance of Broilers Fed Both Nutritionally Adequate and Marginal Wheat-Based Diets. *Journal of Applied Animal Nutrition*, **2017**, *5*, e12. https://doi.org/10.1017/jan.2017.5.
[410] Mahimairaja, S.; Bolan, N. S.; Hedley, M. J.; Macgregor, A. N. Evaluation of Methods of Measurement of Nitrogen in Poultry and Animal Manures. *Fertilizer Research*, **1990**, *24* (3), 141–148. https://doi.org/10.1007/BF01073582.
[411] Ishizawa, H.; Kaji, Y.; Shimizu, Y.; Kuroda, M.; Inoue, D.; Makino, A.; Nakai, R.; Tamaki, H.; Morikawa, M.; Ike, M. Spontaneous Cell Lysis by *Pelomonas saccharophila* MRB3 Provides Plant-Available Macronutrients in Hydroponic Growth Media and Accelerates Biomass Production of Duckweed. *Journal of Water and Environment Technology*, **2023**, *21* (1), 49–58. https://doi.org/10.2965/jwet.22-054.
[412] Chen, Z.; Jiang, X. Microbiological Safety of Chicken Litter or Chicken Litter-Based Organic Fertilizers: A Review. *Agriculture*, **2014**, *4* (1), 1–29. https://doi.org/10.3390/agriculture4010001.
[413] Li, X.; Li, B.; Tong, Q. The Effect of Drying Temperature on Nitrogen Loss and Pathogen Removal in Laying Hen Manure. *Sustainability*, **2020**, *12* (1), 403. https://doi.org/10.3390/su12010403.
[414] Chen, Z.; Diao, J.; Dharmasena, M.; Ionita, C.; Jiang, X.; Rieck, J. Thermal Inactivation of Desiccation-Adapted *Salmonella* spp. in Aged Chicken Litter. *Applied and Environmental Microbiology*, **2013**, *79* (22), 7013–7020. https://doi.org/10.1128/AEM.01969-13.
[415] Khodadadi, M.; Masoumi, A.; Sadeghi, M. Drying, a Practical Technology for Reduction of Poultry Litter (Environmental) Pollution: Methods and Their Effects on Important Parameters. *Poultry Science*, **2024**, *103* (12), 104277. https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104277.
[416] Cao, T.; Zheng, Y.; Dong, H. Control of Odor Emissions from Livestock Farms: A Review. *Environmental Research*, **2023**, *225*, 115545. https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115545.
[417] Van Emous, R. A.; Winkel, A.; Aarnink, A. J. A. Effects of Dietary Crude Protein Levels on Ammonia Emission, Litter and Manure Composition, N Losses, and Water Intake in Broiler Breeders. *Poultry Science*, **2019**, *98* (12), 6618–6625. https://doi.org/10.3382/ps/pez508.
[418] Summers, J. D. Reducing Nitrogen Excretion of the Laying Hen by Feeding Lower Crude Protein Diets. *Poultry Science*, **1993**, *72* (8), 1473–1478. https://doi.org/10.3382/ps.0721473.
[419] Law, F. L.; Zulkifli, I.; Soleimani, A. F.; Liang, J. B.; Awad, E. A. The Effects of Low-Protein Diets and Protease Supplementation on Broiler Chickens in a Hot and Humid Tropical Environment. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **2018**, *31* (8), 1291–1300. https://doi.org/10.5713/ajas.17.0581.
[420] Sugiharto, S.; Agusetyaningsih, I.; Widiastuti, E.; Wahyuni, H. I.; Yudiarti, T.; Sartono, T. A. Dietary Supplementation of Enzymes: An Approach to Mitigate Ammonia Emission during Broiler Production. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, **2023**, *13* (4), 615–625.
[421] Ravindran, V.; Abdollahi, M. R. Nutrition and Digestive Physiology of the Broiler Chick: State of the Art and Outlook. *Animals*, **2021**, *11* (10), 2795. https://doi.org/10.3390/ani11102795.
[422] Macelline, S. P.; Chrystal, P. V.; Liu, S. Y.; Selle, P. H. The Dynamic Conversion of Dietary Protein and Amino Acids into Chicken-Meat Protein. *Animals*, **2021**, *11* (8), 2288. https://doi.org/10.3390/ani11082288.
[423] Rehman, Z. U.; Kamran, J.; El-Hack, M. E. A.; Alagawany, M.; Bhatti, S. A.; Ahmad, G.; Saleem, A.; Ullah, Z.; Yameen, R. M. K.; Ding, C. Influence of Low-Protein and Low-Amino Acid Diets with Different Sources of Protease on Performance, Carcasses and Nitrogen Retention of Broiler Chickens. *Animal Production Science*, **2018**, *58* (9), 1625. https://doi.org/10.1071/AN16687.
[424] Sugiharto, S. Role of Nutraceuticals in Gut Health and Growth Performance of Poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, **2016**, *15* (2), 99–111. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001.
[425] Yaqoob, M. U.; Yousaf, M.; Iftikhar, M.; Hassan, S.; Wang, G.; Imran, S.; Zahid, M. U.; Iqbal, W.; Wang, M. Effect of Multi-Enzymes Supplementation on Growth Performance, Meat Quality, Ileal Digestibility, Digestive Enzyme Activity and Caecal Microbiota in Broilers Fed Low-Metabolizable Energy Diet. *Animal Bioscience*, **2022**, *35* (7), 1059–1068. https://doi.org/10.5713/ab.21.0402.
[426] Mi, J.; Chen, X.; Liao, X. Screening of Single or Combined Administration of 9 Probiotics to Reduce Ammonia Emissions from Laying Hens. *Poultry Science*, **2019**, *98* (9), 3977–3988. https://doi.org/10.3382/ps/pez138.
[427] Liu, X.; Cao, G.; Qiu, K.; Dong, Y.; Hu, C. *Lactobacillus plantarum* Decreased Ammonia Emissions through Modulating Cecal Microbiotain Broilers Challenged with Ammonia. *Animals*, **2023**, *13* (17), 2739. https://doi.org/10.3390/ani13172739.

[428] Herzner, A. M.; Dischinger, J.; Szekat, C.; Josten, M.; Schmitz, S.; Yakéléba, A.; Reinartz, R.; Jansen, A.; Sahl, H.-G.; Piel, J.; et al. Expression of the Lantibiotic Mersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PLOS ONE*, **2011**, *6* (7), e22389. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022389.
[429] Meng, Y.; Wang, J.; Wang, Z.; Zhang, G.; Liu, L.; Huo, G.; Li, C. *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0318 Ameliorates Impaired Intestinal Immunity and Metabolic Disorders in Cyclophosphamide-Treated Mice. *Frontiers in Microbiology*, **2019**, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00731.
[430] Neal-McKinney, J. M.; Lu, X.; Duong, T.; Larson, C. L.; Call, D. R.; Shah, D. H.; Konkel, M. E. Production of Organic Acids by Probiotic Lactobacilli Can Be Used to Reduce Pathogen Load in Poultry. *PLOS ONE*, **2012**, *7* (9), e43928. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043928.
[431] Borowski, S.; Matusiak, K.; Powałowski, S.; Pielech-Przybylska, K.; Makowski, K.; Nowak, A.; Rosowski, M.; Komorowski, P.; Gutarowska, B. A Novel Microbial-Mineral Preparation for the Removal of Offensive Odors from Poultry Manure. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2017**, *119*, 299–308. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.042.
[432] Gałęcki, R.; Dąbrowski, M.; Bakuła, T.; Obremski, K.; Nowak, A.; Gutarowska, B. The Influence of the Mineral-Microbial Preparation on Ammonia Concentration and Productivity in Laying Hens Houses. *Atmosphere*, **2019**, *10* (12), 751. https://doi.org/10.3390/atmos10120751.
[433] Kalus, K.; Opaliński, S.; Maurer, D.; Rice, S.; Koziel, J. A.; Korczyński, M.; Dobrzański, Z.; Kołacz, R.; Gutarowska, B. Odour Reducing Microbial-Mineral Additive for Poultry Manure Treatment. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, **2017**, *11* (3), 7. https://doi.org/10.1007/s11783-017-0928-4.
[434] Gałęcki, R.; Dąbrowski, M.; Bakuła, T.; Obremski, K.; Baranowski, M.; Nowak, A.; Gutarowska, B. The Influence of the Mineral–Microbial Deodorizing Preparation on Ammonia Emission and Growth Performance in Turkey Production. *Atmosphere*, **2020**, *11* (7), 743. https://doi.org/10.3390/atmos11070743.
[435] Han, B.; Butterly, C.; Zhang, W.; He, J.; Chen, D. Adsorbent Materials for Ammonium and Ammonia Removal: A Review. *Journal of Cleaner Production*, **2021**, *283*, 124611. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124611.
[436] Wang, S.; Peng, Y. Natural Zeolites as Effective Adsorbents in Water and Wastewater Treatment. *Chemical Engineering Journal*, **2010**, *156* (1), 11–24. https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.029.
[437] Martins, T. H.; Souza, T. S. O.; Foresti, E. Ammonium Removal from Landfill Leachate by Clinoptilolite Adsorption Followed by Bioregeneration. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **2017**, *5* (1), 63–68. https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.11.024.
[438] Sunny-Roberts, E. O.; Knorr, D. Cellular Injuries on Spray-dried *Lactobacillus rhamnosus GG* and Its Stability during Food Storage. *Nutrition & Food Science*, **2011**, *41* (3), 191–200. https://doi.org/10.1108/00346651111132466.
[439] Sunny-Roberts, E. O.; Knorr, D. The Protective Effect of Monosodium Glutamate on Survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) Strains during Spray-Drying and Storage in Trehalose-Containing Powders. *International Dairy Journal*, **2009**, *19* (4), 209–214. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.10.008.
[440] Tymczyszyn, E. E.; Gómez-Zavaglia, A.; Disalvo, E. A. Effect of Sugars and Growth Media on the Dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*, **2007**, *102* (3), 845–851. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03108.x.
[441] Ferreira, V.; Soares, V.; Santos, C.; Silva, J.; Gibbs, P. A.; Teixeira, P. Survival of *Lactobacillus sakei* during Heating, Drying and Storage in the Dried State When Growth Has Occurred in the Presence of Sucrose or Monosodium Glutamate. *Biotechnology Letters*, **2005**, *27* (4), 249–252. https://doi.org/10.1007/s10529-004-8351-x.
[442] Pugliese, A.; Cabassi, G.; Chiavaro, E.; Paciulli, M.; Carini, E.; Mucchetti, G. Physical Characterization of Whole and Skim Dried Milk Powders. *Journal of Food Science and Technology*, **2017**, *54* (11), 3433–3442. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2795-1.
[443] Timkina, E.; Drábová, L.; Palyzová, A.; Řezanka, T.; Maťátková, O.; Kolouchová, I. *Kocuria* Strains from Unique Radon Spring Water from Jachymov Spa. *Fermentation*, **2022**, *8* (1), 35. https://doi.org/10.3390/fermentation8010035.
[444] Reddy, K. B. P. K.; Madhu, A. N.; Prapulla, S. G. Comparative Survival and Evaluation of Functional Probiotic Properties of Spray-Dried Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, **2009**, *62* (2), 240–248. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00480.x.
[445] Shokri, Z.; Fazeli, M. R.; Ardjmand, M.; Mousavi, S. M.; Gilani, K. Factors Affecting Viability of *Bifidobacterium bifidum* during Spray Drying. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2015**, *23* (1), 7. https://doi.org/10.1186/s40199-014-0088-z.
[446] Slavutsky, A. M.; Chávez, M. C.; Favaro-trindade, C. S.; Bertuzzi, M. A. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in a Pilot-Plant Spray-Dryer. Effect of Process Parameters on Cell Viability. *Journal of Food Process Engineering*, **2017**, *40* (2), e12394. https://doi.org/10.1111/jfpe.12394.
[447] Elhariry, H.; Gado, E.; El-Deeb, B.; Altalhi, A. Antibiofilm Potential of Biogenic Silver Nanoparticles against *Kocuria rosea* And *Kocuria rhizophila*. *Microbiology*, **2018**, *87* (1), 9–20. https://doi.org/10.1134/S0026261718010071.
[448] Guesmi, S.; Pujic, P.; Nouioui, I.; Dubost, A.; Najjari, A.; Ghedira, K.; Igual, J. M.; Miotello, G.; Cherif, A.; Armengaud, J.; et al. Ionizing-Radiation-Resistant *Kocuria rhizophila* PT10 Isolated from the Tunisian Sahara Xerophyte *Panicum turgidum*: Polyphasic Characterization and Proteogenomic Arsenal. *Genomics*, **2021**, *113* (1, Part 1), 317–330. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.11.029.
[449] García-López, M.-L.; Santos, J.-Á.; Otero, A. MICROCOCCUS. In *Encyclopedia of Food Microbiology*; Robinson, R. K., Ed.; Elsevier: Oxford, 1999; 1344–1350. https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1025.

[450] Li, C.; Wang, Y.; Li, Q.; Xu, N. Yogurt Starter Obtained from *Lactobacillus plantarum* by Spray Drying. *Drying Technology*, **2012**, *30* (15), 1698–1706. https://doi.org/10.1080/07373937.2012.714824.
[451] Wang, N.; Fu, N.; Chen, X. D. The Extent and Mechanism of the Effect of Protectant Material in the Production of Active Lactic Acid Bacteria Powder Using Spray Drying: A Review. *Current Opinion in Food Science*, **2022**, *44*, 100807. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.01.003.
[452] Soukoulis, C.; Behboudi-Jobbehdar, S.; Yonekura, L.; Parmenter, C.; Fisk, I. Impact of Milk Protein Type on the Viability and Storage Stability of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 Using Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology*, **2014**, *7* (5), 1255–1268. https://doi.org/10.1007/s11947-013-1120-x.
[453] Tang, H. W.; Abbasiliasi, S.; Murugan, P.; Tam, Y. J.; Ng, H. S.; Tan, J. S. Influence of Freeze-Drying and Spray-Drying Preservation Methods on Survivability Rate of Different Types of Protectants Encapsulated *Lactobacillus acidophilus* FTDC 3081. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **2020**, *84* (9), 1913–1920. https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1770572.
[454] Würth, R.; Foerst, P.; Kulozik, U. Effects of Skim Milk Concentrate Dry Matter and Spray Drying Air Temperature on Formation of Capsules with Varying Particle Size and the Survival Microbial Cultures in a Microcapsule Matrix. *Drying Technology*, **2018**, *36* (1), 93–99. https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1301952.
[455] Jokicevic, K.; Lebeer, S.; Kiekens, F. Atomization Gas Type, Device Configuration and Storage Conditions Strongly Influence Survival of *Lactobacillus casei* after Spray Drying. *Drying Technology*, **2022**, *40* (3), 494–504. https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1809447.
[456] Bustos, P.; Bórquez, R. Influence of Osmotic Stress and Encapsulating Materials on the Stability of Autochthonous *Lactobacillus plantarum* after Spray Drying. *Drying Technology*, **2013**, *31* (1), 57–66. https://doi.org/10.1080/07373937.2012.717325.
[457] Zhu, Z.; Luan, C.; Zhang, H.; Zhang, L.; Hao, Y. Effects of Spray Drying on *Lactobacillus plantarum* BM-1 Viability, Resistance to Simulated Gastrointestinal Digestion, and Storage Stability. *Drying Technology*, **2016**, *34* (2), 177–184. https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1021009.
[458] Liao, L.-K.; Wei, X.-Y.; Gong, X.; Li, J.-H.; Huang, T.; Xiong, T. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by Spray Drying Related to Its Stability and in Vitro Digestion. *LWT - Food Science and Technology*, **2017**, *82*, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.065.
[459] Minorova, A.; Romanchuk, I.; Verbytskyi, S.; Danylenko, S.; Krushelnytska, N.; Potemska, O.; Narizhnyi, S. Effect of Protein and Carbohydrate Components upon Quality Parameters and Viable Probiotic Bacteria Content in Milk Mixtures during Their Drying and Storage. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **2022**, e3778. https://doi.org/10.55251/jmbfs.3778.
[460] Çabuk, B.; Harsa, Ş. Whey Protein-Pullulan (WP/Pullulan) Polymer Blend for Preservation of Viability of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology*, **2015**, *33* (10), 1223–1233. https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1021008.
[461] Eratte, D.; Gengenbach, T. R.; Dowling, K.; Barrow, C. J.; Adhikari, B. Survival, Oxidative Stability, and Surface Characteristics of Spray Dried Co-Microcapsules Containing Omega-3 Fatty Acids and Probiotic Bacteria. *Drying Technology*, **2016**, *34* (16), 1926–1935. https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1141782.
[462] Lapsiri, W.; Bhandari, B.; Wanchaitanawong, P. Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in Different Protectants during Spray Drying and Storage. *Drying Technology*, **2012**, *30* (13), 1407–1412. https://doi.org/10.1080/07373937.2012.684226.
[463] Geiger, O.; López-Lara, I. M.; Sohlenkamp, C. Phosphatidylcholine Biosynthesis and Function in Bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **2013**, *1831* (3), 503–513. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.08.009.
[464] Billah, M.; Khan, M.; Bano, A.; Hassan, T. U.; Munir, A.; Gurmani, A. R. Phosphorus and Phosphate Solubilizing Bacteria: Keys for Sustainable Agriculture. *Geomicrobiology Journal*, **2019**, *36* (10), 904–916. https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1654043.
[465] Azaroual, S. E.; El Mernissi, N.; Zeroual, Y.; Bouizgarne, B.; Meftah Kadmiri, I. Effect of *Bacillus* spp. Strains on Wheat Nutrient Assimilation and Bioformulation by New Spray Drying Approach Using Natural Phosphate Powder. *Drying Technology*, **2022**, *40* (13), 2630–2644. https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1950170.
[466] Romano, P.; Pietrafesa, R.; Romaniello, R.; Zambuto, M.; Calabretti, A.; Capece, A. Impact of Yeast Starter Formulations on the Production of Volatile Compounds during Wine Fermentation. *Yeast*, **2015**, *32* (1), 245–256. https://doi.org/10.1002/yea.3034.
[467] Zamora, L. M.; Carretero, C.; Parés, D. Comparative Survival Rates of Lactic Acid Bacteria Isolated from Blood, Following Spray-Drying and Freeze-Drying. *Food Science and Technology International*, **2006**, *12* (1), 77–84. https://doi.org/10.1177/1082013206062443.
[468] Liu, C.-P.; Liu, S.-D. Low-Temperature Spray Drying for the Microencapsulation of the Fungus *Beauveria bassiana*. *Drying Technology*, **2009**, *27* (6), 747–753. https://doi.org/10.1080/07373930902828005.
[469] Hugo, A. A.; Bruno, F.; Golowczyc, M. A. Whey Permeate Containing Galacto-Oligosaccharides as a Medium for Biomass Production and Spray Drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. *LWT - Food Science and Technology*, **2016**, *69*, 185–190. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.031.
[470] Ananta, E.; Volkert, M.; Knorr, D. Cellular Injuries and Storage Stability of Spray-Dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, **2005**, *15* (4), 399–409. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.004.
[471] Haq, F.; Butt, M.; Ali, H.; Chaudhary, H. J. Biosorption of Cadmium and Chromium from Water by Endophytic *Kocuria rhizophila*: Equilibrium and Kinetic Studies. *Desalination and Water Treatment*, **2016**, *57* (42), 19946–19958. https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1109561.

[472] Behboudi-Jobbehdar, S.; Soukoulis, C.; Yonekura, L.; Fisk, I. Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology*, **2013**, *31* (11), 1274–1283. https://doi.org/10.1080/07373937.2013.788509.
[473] Fang, Y.; Rogers, S.; Selomulya, C.; Chen, X. D. Functionality of Milk Protein Concentrate: Effect of Spray Drying Temperature. *Biochemical Engineering Journal*, **2012**, *62*, 101–105. https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.05.007.
[474] Rezaeeyan, Z.; Safarpour, A.; Amoozegar, M. A.; Babavalian, H.; Tebyanian, H.; Shakeri, F. High Carotenoid Production by a Halotolerant Bacterium, *Kocuria* sp. Strain QWT-12 and Anticancer Activity of Its Carotenoid. *EXCLI Journal*, **2017**, 1611–2156. https://doi.org/10.17179/EXCLI2017-218.
[475] Milovanovic, B.; Djekic, I.; Miocinovic, J.; Djordjevic, V.; Lorenzo, J. M.; Barba, F. J.; Mörlein, D.; Tomasevic, I. What Is the Color of Milk and Dairy Products and How Is It Measured? *Foods*, **2020**, *9* (11), 1629. https://doi.org/10.3390/foods9111629.
[476] Jain, N. K.; Roy, I. Effect of Trehalose on Protein Structure. *Protein Science*, **2009**, *18* (1), 24–36. https://doi.org/10.1002/pro.3.
[477] Henry-Unaeze, H. N. Update on Food Safety of Monosodium L-Glutamate (MSG). *Pathophysiology*, **2017**, *24* (4), 243–249. https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2017.08.001.
[478] Praveen Biradar, B. J.; Santhosh, G. P. Cell Protectants, Adjuvants, Surfactant and Preservative and Their Role in Increasing the Shelf Life of Liquid Inoculant Formulations of *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, **2018**, *6* (4), 116–122. https://doi.org/10.18782/2320-7051.6821.
[479] Torres, R.; Usall, J.; Teixidó, N.; Abadias, M.; Viñas, I. Liquid Formulation of the Biocontrol Agent *Candida sake* by Modifying Water Activity or Adding Protectants. *Journal of Applied Microbiology*, **2003**, *94* (2), 330–339. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01843.x.
[480] Santhosh, G. P. Formulation and Shelf Life of Liquid Biofertilizer Inoculants Using Cell Protectants. *International Journal of Researches in Biosciences, Agriculture and Technology*, **2015**, *2*, 243–247.
[481] Elsakhawy, T.; Ghazi, A.; Abdel-Rahman, M. A. Developing Liquid *Rhizobium* Inoculants with Enhanced Long-Term Survival, Storage Stability, and Plant Growth Promotion Using Ectoine Additive. *Current Microbiology*, **2021**, *78* (1), 282–291. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02265-z.
[482] Dayamani, K. J.; Brahmaprakash, G. P. Influence of Form and Concentration of the Osmolytes in Liquid Inoculants Formulations of Plant Growth Promoting Bacteria. *International Journal of Scientific and Research Publications*, **2014**, *4* (7).
[483] Hewitt, A. J.; Galea, V. J.; O'Donnell, C. Application Technology for Bioherbicides: Challenges and Opportunities with Dry Inoculum and Liquid Spray Formulations. *Pest Management Science*, **2024**, *80* (1), 72–80. https://doi.org/10.1002/ps.7823.

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entwicklung der globalen Produktionsmenge diverser Fleischarten. 1
Abb. 2: Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufes. 3
Abb. 3: Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur auf den Anteil von Ammoniak in wässriger Lösung. 4
Abb. 4: Abbau von Harnsäure durch Mikroorganismen mithilfe verschiedener Enzyme unter aeroben Bedingungen. 8
Abb. 5: Oxidative Desaminierung von L-Glutaminsäure. 9
Abb. 6: Binäre Teilung einer prokaryotischen Zelle. 10
Abb. 7: Knospung einer eukaryotischen Zelle. 10
Abb. 8: Wachstumskurve von Mikroorganismen in einer diskontinuierlichen Kultur. 11
Abb. 9: Biofilm mit extrazellulären polymeren Substanzen. 12
Abb. 10: Entwicklungsstadien eines Biofilms. 14
Abb. 11: Konzentrationsgradient eines Substrates und eines Produktes im Biofilm und den angrenzenden flüssigen Phasen. 16
Abb. 12: Aufbau eines Sprühtrockners im Gleichstrombetrieb. 17
Abb. 13: Trocknungsverlauf am Beispiel eines singulären Tropfens bei der Sprühtrocknung. 18
Abb. 14: Substitution von Wassermolekülen im hydrophilen Bereich der Cytoplasmamembran durch Schutzsubstanzen. 20
Abb. 15: Beispiel für den Aufbau eines Chemowäschers. 21
Abb. 16: Aufbau eines Biowäschers. 23
Abb. 17: Aufbau eines einstufigen Biofilters. 24
Abb. 18: Aufbau eines Biorieselbettreaktors. 26
Abb. 19: Ablauf des Experiments zur Evaluation des Ammoniumabbaus in Suspensionskultur. 34
Abb. 20: Aufbau des Modellreaktorsystems. 36
Abb. 21: Aufbau des Pilotreaktorsystems.. 40
Abb. 22: Fließbild des Pilotreaktorsystems. 41
Abb. 23: Wägezellen des Pilotreaktors.. 42
Abb. 24: Berieselung des Pilotreaktors. 42
Abb. 25: Überführung von Lavasteinen in den Pilotreaktor.. 43
Abb. 26: Hühnertrockenkot. 46
Abb. 27: Aufbau des Laborsprühtrockners. 49
Abb. 28: Verlauf der Ammoniumkonzentration bei den Reinkulturen der Bakterien. 52
Abb. 29: Auswahl an Einflussfaktoren auf den Ammoniumabbau. 54
Abb. 30: Verlauf der Glucosekonzentration bei den Reinkulturen der Bakterien. 57
Abb. 31: Verlauf der optischen Dichte bei den Reinkulturen der Bakterien. 58

Abb. 32: Verlauf des pH-Wertes bei den Reinkulturen der Bakterien. 59
Abb. 33: Verlauf der Ammoniumkonzentration bei den Reinkulturen der Pilze. 60
Abb. 34: Verlauf der optischen Dichte bei den Reinkulturen der Pilze.. 62
Abb. 35: Verlauf der Glucosekonzentration bei den Reinkulturen der Pilze. 62
Abb. 36: Verlauf des pH-Wertes bei den Reinkulturen der Pilze. 64
Abb. 37: Ammoniumabbaurate der Zweier-Mischkulturen 48 h nach der Inokulation in Abhängigkeit des initialen C:N-Verhältnisses. 66
Abb. 38: Wachstum der Zweier-Mischkulturen von Bakterien und Pilzen auf geliertem Ammoniummedium. 69
Abb. 39: Entwicklung einer Hyphosphäre beim Wachstum von Bakterien und Pilzen auf geliertem Ammoniummedium. 70
Abb. 40: Verlauf der relativen Massenzunahme im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium.. 71
Abb. 41: Ausbildung eines Biofilms auf der Lavasteinoberfläche im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium. 72
Abb. 42: Lavasteinoberfläche ohne und mit Biofilm. 72
Abb. 43: Verlauf der relativen Massenzunahme des Modellreaktors und des relativen Volumenstroms in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.. 73
Abb. 44: Oberflächenstruktur von Biofilm mit nematodeninduzierten Vertiefungen unter dem Digitalmikroskop.. 74
Abb. 45: Verlauf der Ammoniumkonzentration im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium.. 76
Abb. 46: Verlauf der Ammoniumabbaurate unter Variation der initialen Ammonium-konzentration im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium.. 77
Abb. 47: Verlauf des pH-Wertes der Zirkulationsflüssigkeit im Modellreaktor mit dem mikrobiellen Konsortium.. 79
Abb. 48: Verlauf der Masse des Pilotreaktors und des Modellreaktors unter ähnlichen Betriebsbedingungen. 81
Abb. 49: Lavasteine mit Biofilm aus dem Pilotreaktor. 81
Abb. 50: Wachstum von Biofilm im Modellreaktor.. 82
Abb. 51: Verlauf des pH-Werts der Zirkulationsflüssigkeit des Pilotreaktors und des Modellreaktors unter ähnlichen Betriebsbedingungen.. 83
Abb. 52: Verlauf der Ammoniumkonzentration in der Zirkulationsflüssigkeit des Pilotreaktors und des Modellreaktors unter ähnlichen Betriebsbedingungen.. 84
Abb. 53: FTIR-Spektrum des getrockneten Biofilms. 92
Abb. 54: Zusammensetzung des Gesamt-Stickstoffs von Zirkulationsflüssigkeit und Biofilm. 96
Abb. 55: Einfluss der Partikelgröße des Hühnertrockenkots auf die freigesetzte Ammoniumkonzentration im Ammoniummedium mit Inokulation. 97
Abb. 56: Mikroorganismen und Hühnertrockenkotpartikel unter dem Digitalmikroskop. 100

Abb. 57: Einfluss der Inokulation auf die Ammoniumkonzentration im Ammoniummedium. 101

Abb. 58: Wachstumskurve von *Kocuria rhizophila* in YPD-Medium und Adaptionsmedien..... 107

Abb. 59: Einfluss der Kultivierungsdauer auf die Überlebensrate von *Kocuria rhizophila*, den Wassergehalt und die Austrittstemperatur..... 109

Abb. 60: Einfluss der Eintrittstemperatur auf die Überlebensrate von *Kocuria rhizophila*, den Wassergehalt und die Austrittstemperatur..... 111

Abb. 61: Einfluss der Schutzsubstanzen auf die Überlebensrate von *Kocuria rhizophila*, den Wassergehalt und die Austrittstemperatur..... 112

Abb. 62: Einfluss der Schutzsubstanzen auf die Überlebensrate von *Kocuria rhizophila* während der Lagerung bei 4 °C..... 115

Abb. 63: Sprühgetrocknetes Pulver mit *Kocuria rhizophila* unter dem CLSM. 117

Abb. 64: Sprühgetrocknete Pulver mit *Kocuria rhizophila* unter dem Digitalmikroskop. 118

10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte mit Herstellerangaben. 28
Tab. 2: Materialien mit Herstellerangaben. 29
Tab. 3: Chemikalien mit Herstellerangaben. 31
Tab. 4: Zusammensetzung der Medien und Lösungen. 32
Tab. 5: Auswahl von Mikroorganismen für die Zusammenstellung des mikrobiellen Konsortiums. 33
Tab. 6: Vergleich der Parameter des Modellreaktorbetriebs während der Experimente. 37
Tab. 7: Nährstoffzugabe während des Betriebs des Modellreaktors bei Experiment 1. 39
Tab. 8: Nährstoffzugabe während des Betriebs des Modellreaktors bei Experiment 2. 39
Tab. 9: Nährstoffzugabe während des Betriebs des Pilotreaktors. 44
Tab. 10: Parameter und Methoden der Nährstoffanalyse. 45
Tab. 11: Ammoniumabbaurate bei den Reinkulturen der Bakterien. 52
Tab. 12: Referenzwerte für die Ammoniumabbaurate von Reinkulturen von heterotrophen Bakterien. 53
Tab. 13: Vergleich der Lebendzellzahl und der optischen Dichte der Bakterien. 58
Tab. 14: Ammoniumabbaurate bei den Reinkulturen der Pilze. 60
Tab. 15: Referenzwerte für die Ammoniumabbaurate von Reinkulturen von Pilzen. 61
Tab. 16: Vergleich der Lebendzellzahl und der optischen Dichte der Pilze. 63
Tab. 17: Ammoniumabbaurate bei den Zweier-Mischkulturen. 65
Tab. 18: Ammoniumabbaurate bei den Dreier-Mischkulturen und der Vierer-Mischkultur. 65
Tab. 19: Referenzwerte für die Ammoniumabbaurate von Rein- und Mischkulturen von Mikroorganismen. 67
Tab. 20: Referenzwerte für die Ammoniumabbaurate von Mischkulturen von Mikroorganismen. 68
Tab. 21: Ammoniumabbaurate im Modellreaktor unter Variation der initialen Ammoniumkonzentration im Laufe der Kultivierungsdauer. 76
Tab. 22: Vergleich der Ammoniumabbaurate von Pilotreaktor und Modellreaktor. 84
Tab. 23: Referenzwerte zur Charakterisierung von Biorieselbettreaktoren zum Abbau von Ammoniak. 86
Tab. 24: Makroelemente der Biofilmprobe mit Referenzwerten. 90
Tab. 25: Spurenelemente der Biofilmprobe mit Referenzwerten. 91
Tab. 26: Interpretation des FTIR-Spektrums des getrockneten Biofilms. 92
Tab. 27: Makroelemente der Zirkulationsflüssigkeitsprobe mit Referenzwerten. 94
Tab. 28: Spurenelemente der Zirkulationsflüssigkeitsprobe mit Referenzwerten. 95
Tab. 29: Referenzwerte für den Anteil verschiedener Stickstoffspezies am Gesamt-Stickstoff von Hühnerexkrementen. 98

11. Abkürzungsverzeichnis

Standardabkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
Anammox	anaerobe Ammoniumoxidation
AOB	ammoniakoxidierende Bakterien
ATP	Adenosintriphosphat
B. V.	Kapitalgesellschaft mit beschränkter Haftung in den Niederlanden
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CC BY	Creative Commons (Attribution)
ca.	circa
CFU	Colony-Forming Unit (Kolonie-bildende Einheit)
CICC	China Center of Industrial Culture Collection
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
Co.	Compagnie (Komplementär, haftender Gesellschafter)
Comammox	komplette Ammoniumoxidation
DIN	Deutsches Institut für Normung
DLG	Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonucleinsäure)
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DüMV	Düngemittelverordnung
EN	Europäische Norm
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
et al.	et alii (und andere)
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization (Welternährungsorganisation)
FISH	Fluoreszenz-*in*-*situ*-Hybridisierung
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot(-Spektroskopie/-Spektrometer)
GC	Gaschromatographie
Gew.-%	Gewichtsprozent
ggf.	gegebenenfalls
Gl.	Gleichung
Glc	Glucose

GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GP	Gaspumpe
HV	Handventil
HMI	Human Machine Interface (Mensch-Maschinen-Schnittstelle)
HN-AD	heterotrophe Nitrifikation und aerobe Denitrifikation
Inc.	Incorporated
inkl.	inklusive
ISO	International Organization for Standardization
k. A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
KbE	Kolonie-bildende Einheit
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KH	Kugelhahn
Konz.	Konzentration
LB	Lysogeny Broth
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LLC	Limited Liability Company
Ltd.	Limited
MWCO	Molecular Weight Cut-Off (Molekulargewichtsgrenzwert)
MSG	Monosodium Glutamate (Mononatriumglutamat)
N	Stickstoff
$NAD(P)^+$	Nicotinamidadenindinucleotid(-phosphat), oxidierte Form
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotid(-phosphat), reduzierte Form
NCIMB	National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria
NEC	National Emission Ceilings (Directive, Richtlinie)
NOB	Nitritoxidierende Bakterien
P	Phosphor
P_i	Phosphat (PO_4^{3-})
p. a.	pro analysi (zur Analyse)
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenterephthalat
PYCC	Portuguese Yeast Culture Collection
PP	Polypropylen
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Rasterelektronenmikroskop
RV	Rückschlagventil
S.A.	Société Anonyme (Rechtsform für Aktiengesellschaften in Frankreich)

SCFA	Short-Chain Fatty Acids (kurzkettige Fettsäuren)
SCP	Single Cell Protein (Einzellerprotein)
SE	Societas Europaea (europäische Gesellschaft)
sp.	species (eine Art einer Gattung)
SNDM	Simultaneous Nitrification Denitrification Microorganism
spp.	species pluralis (mehrere, nicht näher definierte Arten einer Gattung)
SPS	speicherprogrammierbare Steuerung
ssp.	subspecies (Unterart einer Art)
Tab.	Tabelle
TRBA	Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe
UK	United Kingdom
Vol.-%	Volumenprozent
YPD	Yeast Extract, Peptone, Dextrose (Hefe-Extrakt, Pepton, Dextrose)
z. B.	zum Beispiel

Symbole

a_w	Wasseraktivität
β	Massenkonzentration
β	Massenkonzentration
β_0	ursprünglich im Nährmedium enthaltene Massenkonzentration
β_f	freigesetzte Massenkonzentration
β_m	gemessene Massenkonzentration
$c_\alpha(\mathrm{NH_3})$	Konzentration von Ammoniak in der Abluft vor Einleitung in den Reaktor
$c_\omega(\mathrm{NH_3})$	Konzentration von Ammoniak in der Reinluft am Ende des Reaktors
$\delta(\mathrm{NH_4^+})$	absolute Ammoniumabbaurate
d	Tag(e)
d	Durchmesser
$D(\mathrm{NH_4^+})$	relative Ammoniumabbaurate
EC	Eliminationskapazität (Elimination Capacity)
g	Erdbeschleunigung
m	Masse
Δm	relative Massenzunahme
m_0	Masse der leeren Füllkörperflasche
m_F	Masse der Füllkörperflasche mit feuchten bzw. von Biofilm besiedelten Lavasteinen

m_T	Masse der Füllkörperflasche mit trockenen Lavasteinen
M	molare Masse
n	Stichprobenumfang
N	Lebendkeimzahl
R_1	Überlebensrate unmittelbar nach der Sprühtrocknung relativ zum flüssigen Medium vor der Sprühtrocknung
$R(t)$	Überlebensrate in Abhängigkeit des Lagerungszeitraums der sprühgetrockneten Probe
RE	Abscheidegrad (Removal Efficiency)
S	Feststoffgehalt
σ_A	absolute Standardabweichung
σ_R	relative Standardabweichung
t	Zeit
t	Zeit
T	Temperatur
T_1	Eintrittstemperatur bei der Sprühtrocknung
T_2	Austrittstemperatur bei der Sprühtrocknung
V	Volumen
V_L	Leerbettvolumen
$\dot{V}$	Volumenstrom
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
x_i	Messwert
W	Wassergehalt

12. Liste der Veröffentlichungen

Eckert J., Grüner-Lempart S., Gredmaier L. (2020) Hochdruckimprägnierung von Lavasteinen als Trägermaterial für schadstoffabbauende Biofilme. Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppen Hochdruckverfahrenstechnik und Membrantechnik. DECHEMA.

Grüner-Lempart S., **Eckert J.**, Gredmaier L. (2021) Reinigung von lösemittelhaltiger Prozessabluft in Biorieselbettreaktoren. Chemie Ingenieur Technik. *93*(10). 1555 – 1564. https://www.doi.org/10.1002/cite.202100058.

Eckert J., Gredmaier L., Grüner-Lempart S., Schneller N., Bastos Inoue C. H. (2021) Purification of Industrial Waste Air Using a Consortium of Microorganisms in a Sustainable Biotrickling Filter. 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology. Poster und Kurzvortrag.

Eckert J., Gredmaier L., Grüner-Lempart S., Algner L., Schübel M. (2021) Impregnation of Lava Stones as Carrier Material for Biofilms Promoting Sustainable Waste Air Purification Technologies. 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology. Poster.

Eckert J., Grüner-Lempart S., Herdt K., Schäffer J. (2021) Encapsulation of Bacteria with a Sustainable Biopolymer Facilitating Inoculation of Microbiological Processes. 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology. Poster und Kurzvortrag.

Eckert J., Grüner-Lempart S., Schäffer J., Trimpe N., Vitz A. (2021) Encapsulation of Seeds Using Calcium Alginate Hydrogels Enhancing Storing Properties and Germination. 13th European Congress of Chemical Engineering and 6th European Congress of Applied Biotechnology. Poster und Kurzvortrag.

Gredmaier L., Grüner-Lempart S., **Eckert J.**, Joachim R., Funke P. (2021) Gas-to-aqueous Phase Transfer for Three Paint Solvents Injected into an Abiotic, Industrial Biotrickling Filter Measured with a Flame Ionization Detector. Periodica Polytechnica Chemical Engineering. *66*(1). 91 – 100. https://doi.org/10.3311/PPch.18131.

Eckert J., Grüner-Lempart S., Herdt K., Oberpriller O. (2022) Verkapselung von Mikroorganismen mit Biopolymeren zur Inokulation von Biorieselbettreaktoren. 8. Kooperationsforum Biopolymere. Poster.

Eckert J., Grüner-Lempart S., Joachim J., Joachim R., Klein P. (2023) Biologische Reinigung der Abluft von Geflügelställen. Green Future Day. Hochschule Weihenstephan-Triesdorf. Poster.

Eckert J. (2023) Biologische Netzwerke am Beispiel von Biofilm. 5. Netzwerktreffen des BayWISS-Verbundkollegs Life Sciences und Grüne Technologien. Hochschule Weihenstephan-Triesdorf. Poster.

Eckert J., Gruse P., Freitag R., Grüner-Lempart S. (2024) Preservation of *Kocuria rhizophila* DSM 348 by spray drying using different protective agents for improvement of bacterial viability. Drying Technology. *42*(6). 1051 – 1064. doi.org/10.1080/07373937.2024.2340050.

13. Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Fakultät Bioingenieurwissenschaften der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf unter der Betreuung von Prof. Dr.-Ing. Sabine Grüner-Lempart in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bioprozesstechnik der Universität Bayreuth unter der Betreuung von Prof. Dr. Ruth Freitag. Im Laufe des Promotionsvorhabens haben mich zahlreiche Menschen begleitet, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg zum Dr.-Ing. unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Ruth Freitag und Prof. Dr.-Ing. Sabine Grüner-Lempart für die hervorragende Betreuung, den großen Gestaltungsspielraum bei der Bearbeitung der Aufgabenstellung und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Zudem danke ich Prof. Dr.-Ing. Andreas Jess für die Übernahme der Rolle des weiteren Prüfers. Es war für mich ein großes Privileg, die Möglichkeit einer kooperativen Promotion im konstruktiven Umfeld einer Hochschule für angewandte Wissenschaften und einer Universität gleichermaßen zu erhalten.

Außerdem möchte ich mich beim Bundesministerium für Wirtschaft und Energie für die Finanzierung des Forschungsprojektes über das Zentrale Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM) bedanken, das in diesem Fall die Kooperation mit zwei Unternehmen aus Bayern ermöglicht hat. Dadurch war stets ein konkreter Bezug der Forschungsinhalte zur Anwendung in der Praxis gewährleistet, der vor allem an einer Hochschule für angewandte Wissenschaften eine herausragende Rolle spielt. Insbesondere bedanken möchte ich bei der Geschäftsführung und den Mitarbeitenden der zwei Projektpartner (IDS Miesbach GmbH, Klimax Lüftungs- und Klimaanlagen GmbH & Co. KG) für die hervorragende Zusammenarbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt darüber hinaus dem Bayerischen Staatsministerium für Wissenschaft und Kunst (StMWK) für die umfangreiche Unterstützung der Promotion in Form von finanziellen Förderungen, Weiterbildungsangeboten und Netzwerkveranstaltungen des BayWISS-Verbundkollegs Life Sciences und Grüne Technologien. An dieser Stelle möchte ich besonders den Koordinatorinnen des BayWISS-Verbundkollegs, Dr. Michaela Stegmann und Dr. Ute Nazet, für die persönliche Betreuung danken.

Außerdem möchte ich der Fachschaft der Fakultät für Ingenieurwissenschaften an der Universität Bayreuth meinen Dank aussprechen, die mich sehr gut bei der Vorbereitung für die Auflagenprüfungen am Lehrstuhl für Wissenschaftliches Rechnen und am Lehrstuhl für Umweltgerechte Produktionstechnik unterstützt hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Norbert W. Hopf bedanken, der mir die Möglichkeit gab, die Vorlesung für das Modul Allgemeine Mikrobiologie im Rahmen eines Lehrauftrags zu übernehmen und dadurch wertvolle Erfahrungen in der Lehre mit Bezug zum Promotionsprojekt zu sammeln. Es hat mir stets sehr große Freude bereitet, den Studierenden sowohl im Hörsaal als auch in digitaler Form fachliche Inhalte näher zu bringen und sie einen Teil ihres Weges im Bachelorstudiengang Biotechnologie zu begleiten. Auch den Studierenden möchte ich herzlich dafür danken, dass sie an meinen Lehrveranstaltungen mitgewirkt und diese durch ihr Feedback bereichert haben.

Durch Prof. Dr.-Ing. Sabine Grüner-Lempart erhielt ich zusätzlich die Gelegenheit, Praktikumsversuche im Bereich der Verfahrenstechnik als Lehrbeauftragter zu betreuen. In Ergänzung zur mikrobiologisch geprägten Vorlesung konnte ich somit auch umfangreiche Erfahrungen in der praktischen Vermittlung von verfahrenstechnischen Inhalten sammeln. Auch dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Mein großer Dank gilt zudem allen Mitgliedern der Fakultät Bioingenieurwissenschaften an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, die mich während meiner Promotionszeit begleitet haben. Es war für mich eine große Bereicherung, nach dem Masterstudium in Kooperation mit der Hochschule München an der gleichen Fakultät als wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig sein zu dürfen. Als Vertretung der wissenschaftlichen Mitarbeitenden im Fakultätsrat konnte ich zwei Jahre lang an wichtigen Entscheidungen in diesem Gremium mitwirken und die Interessen der Forschung repräsentieren. An dieser Stelle deshalb noch einmal ein herzliches Dankeschön an alle Professorinnen und Professoren, Mitarbeitenden und Studierenden für den angenehmen Austausch während der Fakultätsratsitzungen. Auch die Unterstützung seitens der IT-Abteilung war für mich sehr hilfreich. Vielen Dank an Thomas Metzger und Kajetan Hundhammer für die Bereistellung von Software und Hardware während meiner Zeit als Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter.

Auch meinen Kolleginnen und Kollegen innerhalb der Forschungsgruppe von Prof. Dr.-Ing. Sabine Grüner-Lempart gilt ein besonderer Dank: Antje Deutschmann, Patrizia Fazekas, Nadine Gendreizig, Alexander Gramlich, Dr.-Ing. Ludwig Gredmaier, Philipp Gruse, Michael Krutel, Zoe Meiller, Dr. Klaus Meindl, Karina Nakahara Waibel, Alexander Preißler, Pia Reinisch, Dr. Jörg Schäffer, Anna Lena Schuhmacher, Alexandra Stabl, Nikolas Trimpe und Jodok Waibel Nakahara.

Für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten im Labor möchte ich den folgenden Studierenden danken, die ich im Rahmen eines Praktikums, einer Projektstudie, einer Bachelorarbeit, einer Masterarbeit oder als studentische Hilfskraft betreuen durfte: Leonie Algner, Pooja Balasandran, Handayani Basuki, Erika Camacho Fukui, Benjamin Dahnert, Amelie Erlacher, Philipp Gruse, Kristina Herdt, Carina Harue Bastos Inoue, Dennis Nicolas Kirchner, Rachel Lauren, Janina Löx, Catharina Oberpriller, Marius Ruf, Mykola Savchyn, Samuel Schmucker, Marco Schübel, Renan Hideki Seguchi, Adrian Vitz, Leonard Wagner, Weronika Walczak, Felix Weidhas, Malte Westhaus, Benedikt Weß und Katharina Wittmann.

Nachdem anonym begutachtete Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften im Rahmen der Promotion einen hohen Stellenwert besitzen, gilt mein Dank auch allen Gutachtenden, die mit ihren kritischen Anmerkungen und Ratschlägen eine Optimierung der publizierten Forschungsinhalte ermöglicht haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Partnerin bedanken, die durch ihre umfangreiche Unterstützung wesentlich zum Gelingen meines akademischen Werdegangs beigetragen haben.