

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Die Optimierung des mikrobiellen Abbaus von Limonen
in Biofiltern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Lillian Mitzkat
aus Stralsund

Leipzig, 2001

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Gropp

Betreuer: Prof. Dr. Armin Bergmann

Gutachter: Prof. Dr. Armin Bergmann, Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig
Prof. Dr. Karsten Fehlhaber, Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig
Dr. Roland Müller, Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle GmbH
(UbZ)

Tag der Verteidigung: 16.04.0

Gefördert durch die

UNIVERSITÄT LEIPZIG

**im Rahmen des Hochschulsonderprogramms III
„Förderung von Frauen in der Wissenschaft“**

und die

H. WILHELM SCHAUMANN STIFTUNG

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	3
2.1	Kompostierung von Bioabfall - ein Überblick	3
2.1.1	Geruchsemissionen bei der Kompostierung von Bioabfall	5
2.1.2	Limonen als charakteristische Geruchskomponente bei der Kompostierung	8
2.2	Biologische Abluftreinigung	9
2.2.1	Verfahren der biologischen Abluftreinigung	10
2.2.2	Mikrobiologische Grundlagen der biologischen Abluftreinigung	12
2.3	Vorkommen und Eigenschaften von Limonen als Naturstoff in der Umwelt	14
2.3.1	Bedeutung und Verwendung von Limonen	16
2.3.2	Mikrobieller Abbau von Limonen	17
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	Mikrobiologische Untersuchungen	21
3.1.1	Gewinnung und Anreicherung Limonen-abbauender Mikroorganismen	21
3.1.2	Anreicherung der Batch-Kulturen für die Untersuchungen zum Limonenabbau	22
3.1.3	Aufreinigung des Probenmaterials und Isolierung von Reinkulturen	22
3.1.4	Stammhaltung der Batch-Kulturen und der Isolate	23
3.1.5	Untersuchung des Bakterienwachstums der Batch-Kulturen	23
3.1.5.1	Bestimmung der optischen Dichte	23
3.1.5.2	Bestimmung der Lebendkeimzahl	23
3.1.6	Untersuchung des aeroben Bakterienwachstums in Modellbiofiltern	24
3.1.6.1	Ermittlung der Keimzahl aus dem Filtermaterial eines konventionellen Biofilters	24
3.1.6.2	Ermittlung der Keimzahl aus dem Filtermaterial der Modellbiofilter	24
3.1.7	Untersuchung der aeroben mikrobiellen Zusammensetzung des Biofilter- materials	25

ABKÜRZUNGEN

3.1.8	Anzucht größerer Mengen von Bakteriensuspension für die Inokulation des Modellbiofilters	25
3.1.9	Untersuchungen zur Taxonomie der Limonen-abbauenden Isolate	25
3.1.9.1	Zell- und Koloniemorphologie	25
3.1.9.2	Molekularbiologische Untersuchungen	26
3.1.9.2.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	26
3.1.9.2.2	Polymerase Kettenreaktion	27
3.1.9.3	Chemotaxonomische Untersuchungen: Analyse der Fettsäuren aus Bakterien	28
3.1.9.4	Qualitative physiologisch-biochemische Untersuchungen	29
3.1.9.4.1	API 20 NE-Identifizierungssystem	29
3.1.9.4.2	BBL CRYSTAL-Identifizierungssysteme	30
3.1.9.4.3	MicroLog-Testsystem	30
3.1.9.5	Durchführung weiterer physiologisch-biochemischer Untersuchungen	31
3.1.9.6	Untersuchung der optimalen Wachstumsbedingungen	32
3.1.9.6.1	Bestimmung der Temperaturabhängigkeit des Wachstums	32
3.1.9.6.2	Bestimmung der pH-Wert Abhängigkeit des Wachstums	32
3.1.9.6.3	Bestimmung der osmotischen Empfindlichkeit (NaCl-Toleranz)	32
3.2	Chemisch-analytische Untersuchungen	33
3.2.1	Gaschromatische Analytik von Limonen	33
3.2.1.1	Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von Limonen im konventionellen Biofilter	33
3.2.1.2	Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von Limonen in Modellbiofiltern	34
3.2.2	Bestimmung der Kinetik des Limonenabbaus	35
3.2.3	Bestimmung der Metaboliten des Limonenabbaus	36
3.2.4	Olfaktometrische Untersuchungen	36
3.2.4.1	Olfaktometrische Bestimmung von Limonen in Modellbiofiltern	36
3.2.4.2	Olfaktorische Untersuchung zum Limonenabbau der Reinkulturen	37
3.2.5	Bestimmung des pH-Wertes	38
3.2.6	Bestimmung der Trockensubstanz und der Materialfeuchte des Biofiltermaterials	38
3.2.7	Bestimmung der Temperatur im Modellbiofilter	39

ABKÜRZUNGEN

3.3	Biofilterversuche	39
3.3.1	Versuche mit einem konventionellen Biofilter	39
3.3.1.1	Aufbau und Betrieb	39
3.3.2	Überführungsversuche parallel laufender Modellbiofilter	40
3.3.2.1	Aufbau und Betrieb	40
3.3.2.2	Versuchsparameter	41
3.3.2.3	Probennahme	42
3.3.2.4	Überführung der Anreicherungskulturen in den Modellbiofilter	42
3.3.2.5	Bestimmung des Wirkungsgrades	42
3.4	Reagenzien und Chemikalien	42
3.5	Mikroorganismen	43
4	ERGEBNISSE	44
4.1	Betrieb eines konventionellen Modellbiofilters	44
4.1.1	Abbau von Limonen im konventionellen Modellbiofilter	44
4.1.2	pH-Wert und Feuchtigkeit des Biofiltermaterials	45
4.1.3	Aerobe Gesamtkeimzahl des Filtermaterials	46
4.1.4	Mikrobiologische Zusammensetzung des Biofiltermaterials	47
4.2	Gewinnung und Anreicherung Limonen-abbauender Mikroorganismen	48
4.2.1	Lebendkeimzahl und pH-Wert der Anreicherungskulturen	48
4.2.2	Wachstum der Mikroorganismen auf verschiedenen Nährmedien	49
4.2.3	Isolierung von Reinkulturen	49
4.2.3.1	Abbau von Limonen durch Reinkulturen	50
4.2.3.2	Kultivierung Limonen-abbauender Isolate	52
4.3	Limonenabbau im Batch-Verfahren	53
4.3.1	Abbaukinetik der Batch-Kulturen unterschiedlicher Quellen	54
4.3.2	Einfluß der Substratkonzentration auf den Abbau von Limonen	57
4.3.3	Metabolite des Limonenabbaus	61
4.4	Taxonomische Einordnung der Limonen-abbauenden Isolate	64
4.4.1	Zell- und Koloniemorphologie	64
4.4.2	Molekularbiologische Charakterisierung	66

ABKÜRZUNGEN

4.4.3	Chemotaxonomische Charakterisierung: Analyse der Fettsäuren aus Bakterien	68
4.4.4	Physiologisch-biochemische Charakterisierung	70
4.4.5	Untersuchung der optimalen Wachstumsbedingungen	73
4.5	Überführung der Limonen-adaptierten Batch-Kulturen in den Biofilter	74
4.5.1	Betrieb der Modellbiofilter	74
4.5.2	Wirksamkeit der Inokulationskulturen im Biofilter	74
4.5.3	Untersuchung des pH-Wertes, der Materialfeuchte und der Temperatur	76
4.5.4	Untersuchungen zur Mikroorganismendichte im Filtermaterial	78
4.5.5	Qualitative mikrobiologische Komposition des Biofiltermaterials	79
5	DISKUSSION	82
5.1	Gewinnung und Anreicherung Limonen-abbauender Bakterien	82
5.2	Isolierung Limonen-abbauender Reinkulturen	83
5.3	Taxonomische Einordnung der Isolate	85
5.4	Mikrobieller Abbau von Limonen durch die Kulturen im Batch-Verfahren	87
5.5	Einfluß der Substratkonzentration auf den Limonenabbau	91
5.6	Abbau von Limonen im Modellbiofilter	93
5.7	Wirksamkeit der Inokulationskulturen im Biofilter	97
5.8	Schlußfolgerungen und Ausblick	100
6	ZUSAMMENFASSUNG	101
7	SUMMARY	103
8	LITERATURVERZEICHNIS	105
	ANHANG	
	Übersichten: A 1-A 2	
	Tabellen: A 3-A 30	
	Abbildungen: A 31-A 33	
	DANKSAGUNG	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die in dieser Arbeit verwendeten Einheiten und Symbole sind nach den Empfehlungen des SI-Einheitensystems nachfolgend aufgeführt. Zudem wurden weitere Abkürzungen benutzt:

A.	Aspergillus
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
Ac.-Nr.	Accession-Nummer
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
B.	Bacillus
BF	Biofilter
bzw.	beziehungsweise
C.	Candida
ca.	circa
CASO	Caseinpepton Sojamehlpepton-Agar
c_G	Geruchsstoffkonzentration
c_{Grein}	Geruchsstoffkonzentration im Reingas
c_{Groh}	Geruchsstoffkonzentration im Rohgas
c_{rein}	Reingaskonzentration
c_{roh}	Rohgaskonzentration
d	Tag
dB_G	Dezibel Geruch
DNA	deoxyribonucleic acid
DSMZ (DSM)	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E.	Escherichia
Fa.	Firma
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GE	Geruchseinheit

ABKÜRZUNGEN

GLC	Gas Liquid Chromatography
h	Stunden
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HAC	Entfärbelösung
HCl	Salzsäure
hPa	Hektopascal
IK	Inokulationskultur
KBE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KW	Kohlenwasserstoff
l	Liter
L.	Listeria
LKZ	Lebendkeimzahl
m	Meter
M	Protein Marker
m ³	Kubikmeter
MBA	mechanisch-biologische Aufbereitung
MF	Materialfeuchte
mg	Milligramm
min	Minute
MIS	Mikrobielles Identifizierungssystem
ml	Milliliter
MM	Mineralsalzmedium
mm	Milimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MS	Massenspektrometrie
n	Anzahl, Probenumfang
NA	Nähragar
NaCl	Natriumchlorid
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
o. g.	oben genannter
OD	Optische Dichte

ABKÜRZUNGEN

P.	Pseudomonas
p. A.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P _G	Geruchspegel
pH	pH-Wert
PNPG	p-Nitro-Phenyl-β-D-Galactopyranosid
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
Ref.	Referenzstamm
rRNA	ribosomale ribonucleic acid
s	Sekunden
S	Standardabweichung
S.	Salmonella
Sa.	Saccharomyces
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SI	similarity index, Ähnlichkeitsindex
ssp.	subspezies
Staph.	Staphylococcus
t	Zeit
T.	Trichophyton
TA	Technische Anleitung
Tab.	Tabelle
tert. BME	tertiäres Butylmethylether
TIC	Total-Ionen-Chromatogramm
TM	Trockenmasse
TOC	organische Kohlenstoffgesamtfracht
TSA	Tryptic Soy Agar
TSBA	Trypticase Soy Broth Agar
T _w	Entdeckungsschwellenwert in g/l Wasser
u.	und
u. a.	und andere
U/min	Umdrehungen je Minute

ABKÜRZUNGEN

UFZ	Umweltforschungszentrum
usw.	undsoweiter
UV	ultraviolet light
UVPG	Gesetz zur Prüfung der Umweltverträglichkeit
V	Volt
v/v	volume per volume
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
VIS	visible light
v_u	unspezifische Abbaurate
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight
x g	Fallbeschleunigung
x_0	Biomassekonzentration
x	arithmetischer Mittelwert
z. A.	zur Analyse
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent
η	Wirkungsgrad
η_G	Geruchsminderungsgrad
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol

1 EINLEITUNG

Die stetig wachsende Industrialisierung führt zu fortschreitender Verunreinigung der Atmosphäre mit organischen und anorganischen Substanzen (SCHMIEDING 1996). Dabei stellt die Beseitigung von Geruchsstoffen aus Abluftströmen der Industrie, Landwirtschaft, der Tierkörperverwertung sowie aus Abfallwirtschaftsbetrieben ein Problem von wachsender gesellschaftlicher Relevanz dar (GUST et al. 1979 b; PRINZ 1992; HOLSTE et al. 1995). Die Zunahme von Abfallreinigungsanlagen und damit verbundene Keimemissionen werden als mögliche Gesundheitsgefährdung der Menschen angesehen (BRUCKMANN u. MÜLDER 1982; ECKRICH et al. 1996; BÜNGER et al. 1999). Auch schädigende Einflüsse auf die Umwelt können nicht ausgeschlossen werden (DRATWA 1968; ANGRICK 1987). Für Geruchsbelastungen, die in der Vergangenheit noch toleriert wurden, sind heute schärfere gesetzliche Anforderungen zu erfüllen. (TA LUFT 1986; BUNDES-IMMISSIONS-SCHUTZGESETZ 1990). Die Emissionen aus Abfallbehandlungsanlagen müssen folglich soweit vermindert werden, daß sie keine Belästigung für die Umwelt darstellen. Insbesondere werden für die Abluft aus Anlagen zur mechanisch-biologischen Aufbereitung von Abfällen (MBA-Anlagen) zukünftig strengere Grenzwerte bezüglich des Gesamtkohlenstoffgehaltes gelten. (ANON. 1999, 2000; BUNDES-IMMISSIONSSCHUTZ-VERORDNUNG 2000). Um die gesellschaftliche Akzeptanz bestimmter Produktions- und Abfallbehandlungsmaßnahmen (z. B. Kompostierung) zu sichern, ist eine Abluftreinigung unumgänglich (DAMMANN et al. 1996). Dabei sind biologische Verfahren eine kostengünstige, umweltfreundliche und auf lange Sicht hocheffektive Methode (GUST et al. 1979 a; KOCH et al. 1982; SABO 2000; HEINIG et al. 2000; BREEGER 2000).

Limonen zählt wegen seiner leichten Flüchtigkeit, der sehr schlechten Wasserlöslichkeit und aufgrund seiner antimikrobiellen Wirkung zu den schwer abbaubaren Verbindungen und stellt als pflanzlich gebildeter Terpenkohlenwasserstoff eine wesentliche Geruchskomponente in der Abluft der Bioabfallkompostierung sowie im Deponiegas dar (YOUNG u. PARKER 1984; JANSON 1991; PÖHLE 1994; HEINIG 1998). Die Reinigung dieser Abluftströme hinterläßt Limonen häufig in Konzentrationen, die zu einer Geruchsbelästigung führen (PÖHLE u. KLICHE 1996). Die Abbauleistungen der Biofilter erweisen sich bei diesem Substrat häufig als unzureichend oder sind durch große Schwankungen geprägt (JÄGER u. JAGER 1978). Um eine lange Adaptationsphase der Mikroorganismen an das zugeführte Substrat zu vermeiden und somit die Einlaufzeit für Biofilter zu verkürzen, ist ein Animpfen

mit an den Geruchsstoff adaptierten Mikroorganismen sinnvoll (VDI-RICHTLINIE 3477/1991; GOTTSCHALK u. KNACKMUSS 1993; BAYER 1995; HUBER u. MENNER 1995). Die Intensivierung des mikrobiellen Abbaus von Limonen in Biofiltern ist daher als vordringliches Anliegen bei der Verbesserung des hygienischen Status von Kompostierungsprozessen anzusehen.

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung von Möglichkeiten zur Verbesserung der mikrobiellen Elimination von Limonen-Emissionen aus der Intensivrotte der Bioabfallkompostierung mit dem Biofilterverfahren. Die Grundidee zur Intensivierung des Limonenabbaus bestand in der Inokulation eines Modellbiofilters mit einer Anreicherungskultur, die Limonen effektiv abbauen kann. Solche Inokulationskulturen sollten durch Anreicherung aus Umweltproben in Schüttelkulturen gewonnen werden. An eine Inokulationskultur bestehen dabei wesentliche Anforderungen: die im Biofilter-Trägermaterial enthaltenen Substanzen bzw. Nährstoffquellen dürfen den Limonenabbau nicht negativ beeinflussen und die Kultur muß sich in die mikrobielle Gemeinschaft verlustarm integrieren lassen. Die Anreicherungskulturen sollten vergleichend bezüglich ihres Abbauverhaltens für Limonen untersucht werden. Die Wirksamkeit der Inokulationskulturen zur Optimierung des Limonenabbaus war im Überföhrungsversuch mit zwei parallel betriebenen Modellbiofiltern zu testen. Abschließend sollten die am Limonenabbau beteiligten Spezies der Inokulationskulturen mikrobiologisch hinsichtlich der taxonomischen Einordnung charakterisiert werden.

2 LITERATUR

2.1 Kompostierung von Bioabfall - ein Überblick

Bis zu Beginn der 80 er Jahre nahm die biologische Abfallbehandlung eher eine unbedeutende Stellung ein. Deponien galten als billige Variante der Beseitigung. In heutiger Zeit arbeiten allein in Deutschland über 600 Kompostierungsanlagen und mehr als 30 Vergärungsanlagen mit steigender Tendenz. Ursachen dieses Anstiegs sind die deutliche Qualitätsverbesserung der Produkte, die Einführung gesetzlicher Rahmenbedingungen und die Umsetzung der Forschungsergebnisse in die Praxis (BIDLINGMAIER 2000). Im Haushalt oder auch in Gewerbe- und Industriebetrieben anfallender Bio- und Grünabfall ist im Sinne des subjektiven Abfallbegriffes des KREISLAUFWIRTSCHAFTS- UND ABFALLGESETZES (1994) grundsätzlich als Abfall anzusehen, der einer umweltverträglichen Verwertung unterzogen werden muß.

Für die Verwertung von getrennten Siedlungsabfällen stellt die Kompostierung das wichtigste Verwertungsverfahren von praktischem Nutzen dar. Etwa ein Drittel des anfallenden Hausmülls gilt als biologisch abbaubar (HOFMANN 1996).

Kompostierungsanlagen, in denen Bio- und Grünabfall verarbeitet wird, sind Abfallbehandlungsanlagen, die einer Umweltverträglichkeitsprüfung nach dem UVPG (1990) unterzogen werden müssen, bei der die Auswirkungen der geplanten Anlage auf die Umwelt (Menschen, Tiere, Pflanzen, Boden, Wasser, Luft usw.) ermittelt und bewertet werden (BIDLINGMAIER 2000).

Bioabfall besteht nach WEFING u. FRIEDEL (1989), POHLMANN (1990), BIDLINGMAIER (1992), TIDDEN u. OETJEN-DEHNE (1992) jahreszeitlich und regional bedingt aus vier Hauptgruppen von Inhaltsstoffen:

1. Küchenabfälle (Lebensmittel- und Speisereste, Obst, Eischalen, Kaffeefilter u. a.)
2. Blumenerde, Topfpflanzen
3. Gras, Laub, Baum- und Heckenschnitt
4. Papierabfälle (z. B. Zellstoff).

Der aerobe mikrobiologische Abbau bzw. Umbau, der zu einer Mineralisation und teilweisen Humifizierung dieser organischen Substanzen führt, wird als Kompostierung bezeichnet (DEBERTOLDI et al. 1985; SCHEFFOLD 1985).

Der Abbau organischen Materials, wie Bioabfall, kann aerob oder anaerob erfolgen. Für aerobe Organismen ist elementarer Sauerstoff essentiell, da dieser zur Oxidation der Nährstoffe benötigt wird. Als Energiequelle dient dabei die aus der Assimilation durch Elektronentransportphosphorylierung gewonnene Stoffwechselenergie. Unter anaeroben Bedingungen können chemoorganotrophe Organismen biochemische Energie durch Elektronentransportphosphorylierung erzeugen. Bei der Kompostierung nutzen heterotrophe Organismen den Kohlenstoff aus organischem Substrat als Energiequelle einerseits zum Abbau höhermolekularer Verbindungen, andererseits zur Biosynthese der Zellkomponenten.

Nach BIDLINGMAIER (2000) werden die organischen Verbindungen in vier bei der Kompostierung bedeutsame Hauptgruppen eingeteilt:

1. **Kohlenhydrate** wie Zucker, Stärke, Zellulose (besonders in Pflanzenmaterial)
2. **Fette, Öle, Wachse** (besonders in Fleisch, Pflanzenmaterial, Wurzeln und Samen)
3. **Proteine** (besonders in Fleisch, Fisch, Gemüse)
4. **Lignine** (besonders in Holz, Blättern, Rinde, Gemüse und Pflanzenfasern).

Während der Kompostierung wird Wärmeenergie freigesetzt. Da nur ein Teil dieser Wärme nach außen abgegeben wird, kommt es im Rottematerial zu einer Selbsterhitzung (HOGAN et al. 1989).

Der Rotteverlauf wird in charakteristische Phasen unterteilt (GRAY u. BIDDLESTONE 1981):

1. mesophile Phase (Temperatur: 16-40 °C, pH-Wert: 5,5-7,0, Abbau leichter abbaubarer Verbindungen)
2. thermophile Phase (Temperatur: 40 -70 °C, pH-Wert: 6-9, Absterben der Pilze, Dominanz sporenbildender Bakterien und Aktinomyzeten)
3. Abkühlungs- oder Umbauphase (Temperatur: 70-20 °C, pH-Wert: um 7, Abbau schwer abbaubarer Verbindungen, Neubesiedelung mit Pilzen)
4. Reifephase (Temperatur: < 20 °C, pH-Wert: 7-8).

Die wichtigsten an der Kompostierung beteiligten Mikroorganismen sind Bakterien, einschließlich Aktinomyzeten, Pilze und Protozoen, die nach bevorzugtem Temperaturbereich in mesophile (Optimum: 25-35 °C) und thermophile (Optimum: 50-55 °C) Mikroorganismen unterschieden werden können (BIDLINGMAIER 2000). In der Tabelle 1 sind die wichtigsten Milieubedingungen der Mikroorganismen dargestellt.

Tab. 1: Vergleich der wichtigsten Milieubedingungen der Mikroorganismen während der Kompostierung (KROGMANN 1994)

	Bakterien	Aktinomyzeten	Pilze
Substrat		für schwer abbaubare Substrate geeignet	für schwer abbaubare Substrate geeignet
Feuchtigkeit		trockenere Bereiche	trockenere Bereiche
Sauerstoff		niedrigste Anforderungen	bevorzugt gut belüftete Bereiche
pH-Wert-Optimum	neutral bis schwach alkalisch	neutral bis schwach alkalisch	schwach sauer
pH-Wert-Bereich	6-7,5		5,5-8
mechanische Umsetzung	kein Einfluß	ungünstig	ungünstig
Bedeutung während der Rotte	80-90 % der Abbauleistung		
Temperatur	bis 75 °C, Reduzierung der Abbauleistung bei höheren Temperaturen	bei 65 °C vermutlich Temperaturgrenze	bei 60 °C Temperaturgrenze

Für die angestrebte Akzeptanz der Bioabfallkompostierung bei der Bevölkerung ist neben der Einhaltung und Umsetzung hygienischer Aspekte (HOFMANN 1996) auch die Gewährung einer schadlosen Kompostanwendung hinsichtlich des Vorkommens und Verhaltens von Xenobiotika erforderlich. Untersuchungen von VAN RAAIJ et al. (1996) und SIHLER et al. (1996) zeigten, daß beispielsweise polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und polychlorierte Biphenyle (PCB) aus Baum- und Strauchschnitt sowie Rindenmaterial in relevanten Konzentrationen auftreten können, wobei die Belastung in Ballungsgebieten gegenüber ländlichen Bereichen höher ist.

Wesentliche Qualitätsmerkmale stellen die Kompostreife sowie die Kompoststabilität bei der Kompostierung dar, die zur Kontrolle des Prozeßablaufes und als Vergleichskriterium verschiedener Kompostierungstechniken in den Kompostierungsanlagen genutzt werden können (BECKER et al. 1996). Die Durchführung sogenannter Ringanalysen zur Kompostgütesicherung brachte eine positive Entwicklung der Kompostanalytik (KREFT u. BIDLINGMAIER 1996).

2.1.1 Geruchsemissionen bei der Kompostierung von Bioabfall

Die Freisetzung umweltrelevanter Emissionen bei der biologischen Abfallbehandlung stellt nicht nur ein ökologisches Problem dar, sondern ist auch im Hinblick auf das Ansehen der Kompostierungsanlagen in der Bevölkerung von großer Bedeutung. (BIDLINGMAIER u. GRAUENHORST 1996). Besonders bei der Bioabfallkompostierung entstehen Geruchs-

emissionen, die zu einer erheblichen Belästigung der Anwohner im Anlagenumfeld führen. Die zunehmende Forderung besteht demnach in der Vermeidung bzw. Beherrschung von Geruchsemissionen (JÄGER u. JAGER 1978; DAMMANN et al. 1996; BOCKREIS u. JAGER 1998; MÜSKEN u. BIDLINGMAIER 1998). Ein objektive Methode bei der Bewertung von Geruchsbehandlungsanlagen stellt die Geruchsanalytik mittels Olfaktometrie dar (DAMMANN et al. 1996). Als weitere effiziente Meßmethodik bietet sich der kombinierte Einsatz von Sensoren und Neuronalen Netzen wie beispielsweise die „elektronische Nase“ an, wobei die Technologie für Kompostwerke noch nicht ausgereift ist und somit weiterer Entwicklungsbedarf besteht (BOCKREIS u. JAGER (1998).

Eine erste Einteilung der Emissionen eines Kompostwerkes läßt sich nach Emissionspfaden vornehmen (BIDLINGMAIER u. GRAUENHORST 1996; MÜSKEN u. BIDLINGMAIER 1998; BIDLINGMAIER 2000):

- Wasser (Sickerwasser, Kondenswasser),
- Boden (Schadstoffe im Kompost),
- Luft (Gerüche, Staub).

Hinsichtlich der auftretenden Geruchsemissionen bei der Kompostierung können technisch drei mögliche Emissionsquellen unterschieden werden (JÄGER u. JAGER 1978):

- vom Rohmüll ausgehende Geruchsemissionen, die beim Abladen und Stapeln im Annahmeteil des Werkes frei werden,
- Geruchsstoffe, die in der Abluft gesteuerter Rotteprozesse enthalten sind,
- Geruchsstoffe, die beim Umgang mit aktivem Material auf dem Kompostwerkgelände frei werden.

Nach JÄGER u. JAGER (1978) lassen sich wiederum drei prinzipielle Geruchsarten unterscheiden:

1. **Geruchsstoffe der Ausgangsprodukte (stoffeigene Gerüche)**
 - abfallartspezifische Substanzen aus Müll und Klärschlamm (z. B. Terpene)
 - Bioabfall (Limonen u. a. Terpene)
2. **Biogene Geruchsstoffe**
 - Faul- und Gärungsstoffwechselprodukte
 - verfahrens- und rottespezifische Stoffwechselprodukte
 - anaerob-aerobe Übergangsstoffwechselprodukte
3. **Abiologische Geruchsstoffe**
 - Pyrolyse-, Maillard- und Autoxidationsprodukte.

Zur Ermittlung und Analyse emittierter Verbindungen aus der Kompostabluft kommen zahlreiche Verfahren zur Anwendung: Geruchsstoffkonzentrationen werden mit einem Olfaktometer bestimmt. Für die Einzelstoffanalytik eignet sich der Gaschromatograph, der mit einem Flammenionisationsdetektor bzw. mit einem Massenspektrometer gekoppelt ist. Bei der Ermittlung von Summenparametern kommt dagegen der Gaschromatograph, ausgestattet mit einem FID, zum Einsatz (JAGER 1989; MAYER 1990, PÖHLE 1994; MANNEBECK u. MANNEBECK 1996).

JAGER und SCHILDKNECHT (1979 a) beschreiben in ihrer Arbeit die Ermittlung von 458 Einzelsubstanzen in der Abluft einer Hausmüllkompostierung mittels GC-MS-Analytik. Etwa 100 Substanzen wurden als geruchsaktive Verbindungen identifiziert. PÖHLE (1994) konnte gaschromatographisch-massenspektrometrisch etwa 160 Substanzen in der Abluft der Bioabfallkompostierung nachweisen.

Bei der Kompostierung entstehen Gerüche durch mikrobielle Umsetzung und chemische Reaktionen beim Abbau bzw. Umbau organischen Materials. Chemische Substanzen, die eine Geruchswahrnehmung hervorrufen, müssen:

- flüchtig (Molekulargewicht bis 350 g/mol)
- lipophil sein, eine
- Mindestwasserlöslichkeit besitzen sowie mit einer
- funktionellen Gruppe (Carbonyl-, Hydroxylreste usw.) ausgestattet sein.

Zum größten Teil handelt es sich dabei um organische Verbindungen (JAGER u. SCHILDKNECHT 1979 b; OHLOFF 1990; FITZNER 1998).

Diese Geruchsemissionen lösen beim Menschen unangenehme Geruchsempfindungen aus. Häufig kommt es aus der Bevölkerung zu Beschwerden, da diese sich in ihrem Wohlbefinden beeinträchtigt fühlt. Die Geruchsbelästigung spielt sich vorrangig auf psychischer Ebene des Menschen ab. Im Zusammenhang mit dem Auftreten von Gerüchen im alltäglichen Lebensumfeld werden neben körperlichen Symptomen und Beschwerden über soziale und verhaltensseitige Einschränkungen des persönlichen Lebensraumes, wie die Behinderung von Aktivitäten, Eindruck des Ausgeliefertseins, vor allem Befindlichkeitsstörungen genannt. (HANGARTNER et al. 1998; WINNEKE u. STEINHEIDER 1998). Das Lästigkeitspotential eines Geruches hängt dabei von seinem Charakter (Hedonie), seiner Intensität und seiner Wahrnehmungshäufigkeit ab (JUNKER 1998).

2.1.2 Limonen als charakteristische Geruchskomponente bei der Kompostierung

Die in der Abluft von Kompostierungsanlagen gefundenen Substanzen können verschiedenen Stoffklassen zugeordnet werden (JAGER u. SCHILDKNECHT 1979 a; JÄGER u. JAGER 1980; MAYER 1990; PÖHLE 1994):

- niederen Fettsäuren,
- niedermolekularen Alkoholen, Aldehyden, Ketonen, Estern,
- schwefelhaltigen, organischen Verbindungen,
- Terpenen (besonders Limonen),
- stickstoffhaltigen Heterozyklen,
- Kohlenwasserstoffen,
- anorganischen Osmogenen (H_2S , NH_3).

Limonen wird als stoffeigener Geruch aus organischem Material (z. B. Bioabfall) während des Kompostierungsprozesses freigesetzt. Terpenkohlenwasserstoffe werden als Hauptbestandteile der Biofilterabluft bei der Reinigung organischer Emissionen beschrieben (EITNER 1984; WILKEN 1993). So spielt dieser Geruchsstoff bei den von JAGER und SCHILDKNECHT (1979 b) in der Rotteabluft der Kompostierung gefundenen Einzelkomponenten neben Ethanol, Diacetyl und Acetoin die dominierende Rolle in der ersten Rottestufe, dem Übergang vom Rohmüll-Klärschlammgemisch zu rottendem Frischkompost. Limonen wird in der Gasphase der Müllkompostierung als geruchsintensive Hauptkomponente neben Ethanol diskutiert, wobei die quantitativen Ergebnisse der Einzelstoffanalytik für Limonen, Ethanol, Diacetyl und Acetoin in der Abluft in Beziehung zu den Ergebnissen der organischen Kohlenstoffgesamtfracht (TOC) gesetzt wurden. Sehr häufig gelingt der Nachweis von Limonen in unterschiedlichen Konzentrationen aus der Kompostierungsabluft. MAYER (1990) fand Limonenkonzentrationen bis $3,3 \text{ mg/m}^3$ in der Rotteabluft. Für eine Einzelprobe wird der Geruchsstoff in einer Abluftkonzentration von 18 mg/m^3 angegeben. Die spezifische Abbauleistung der mit Rotteabluft betriebenen Biofilter lag für Limonen bei maximal 72 %. (JÄGER u. JAGER 1978; JAGER 1979; JÄGER u. JAGER 1980).

HEIDA et al. (1995) untersuchten die Reinluftqualität einer vollständig überdachten Kompostierungsanlage und ermittelten für Limonen Maximalkonzentrationen von bis zu $140 \text{ } \mu\text{g/m}^3$. Auch PÖHLE (1994) gelang der kontinuierliche Nachweis von Limonen aus der Intensivrotte der Bioabfallkompostierung. Limonen besaß dabei ein Konzentrationsmaximum von 18 bis 2500 mg/m^3 , welches eine Dynamik vom 1. bis zum 5. Versuchstag erkennen ließ.

Zum Versuchsende hin folgte eine Abnahme des Limonens auf Konzentrationen von 0,3 bis 5 mg/m³. Die prozentuale Nachweishäufigkeit von Einzelsubstanzen nach Versuchswochen ergaben für Limonen in den ersten zwei und in der vierten Versuchswoche Werte von 100 %, in der dritten Versuchswoche eine Häufigkeit von 92,9 %. Bei α -Pinen, β -Pinen und Caren lag die Nachweishäufigkeit von 20 bis 87 % deutlich darunter. Das Niveau des Gesamtemissionsstromes für Limonen, angegeben mit bis zu 5638 mg/kg Trockensubstanzgehalt Ausgangsmaterial (bei einer Rottedauer von 21 Tagen), liegt demnach sehr hoch und muß sowohl aus der Sicht der Geruchsstoffausbreitung als auch aus umwelthygienischer Sicht neu bewertet werden (PÖHLE u. KLICHE 1996).

Weiterhin konnte Limonen im Kondensat und im Sickerwasser zum Teil über den gesamten Rotteprozeß der Kompostierung nachgewiesen werden, aber in weitaus niedrigeren Konzentrationen als in der Gasphase. Andere Terpene wurden dagegen nur an einzelnen Versuchstagen in der wässrigen Phase analysiert (PÖHLE 1994).

Terpene stellen ebenfalls eine der Hauptkomponenten von Brauereisud-Emissionen dar. Weiterhin wurde Limonen als eine an Schwebestaub gebundene Geruchskomponente bei der Haltung von Schweinen auf Tiefstreu nachgewiesen (WÄCHTER et al. 1986; STEIN 1993). Auch bei Deponien tritt Limonen als charakteristische Geruchskomponente auf. So konnten Limonen und Alkylbenzole neben Estern, organischen Schwefelverbindungen und 2-Butanol als potentielle Geruchsstoffe im Deponiegas festgestellt werden, die gemeinsam mit den Kohlenwasserstoffen für den typischen „background smell“ (Hintergrundgeruch) verantwortlich sind (YOUNG u. PARKER 1984; JANSON 1991).

2.2 Biologische Abluftreinigung

Die biologische Abluftreinigung ist erst mit Beginn der 60 er Jahre als eigenständige Technik entdeckt und gefördert worden und wurde zunächst zur Behandlung leicht abbaubarer Abluftinhaltsstoffe erfolgreich in der Landwirtschaft, speziell in Betrieben der Intensivtierhaltung angewendet (JAGER u. SCHILDKNECHT 1979 b; SABO 1991; SABO et al. 1996). Inzwischen sind die Methoden der Abluftbehandlung für die Reinigung von Abluftströmen aus den verschiedensten Industriezweigen weiterentwickelt worden (BRAUER 1984; SABO et al. 1996). Voraussetzungen für das Funktionieren der biologischen Abluftreinigung sind die biologische Abbaubarkeit und die Fähigkeit zur Sorption der Abgasinhaltsstoffe (SABO et al. 1996). Mikroorganismen sind aufgrund ihrer enormen Fähigkeit zur Anpassung und Spezialisierung auf natürliche Weise in der Lage, ein breites Spektrum

luftverunreinigender Stoffe organischen Ursprungs abzubauen (JAGER u. SCHILDKNECHT 1979 b). Die beteiligten Mikroorganismen bewirken dabei eine Stoffumsetzung zu Kohlendioxid, Wasser und Biomasse.

Auch schwer abbaubare Verbindungen können durch Sorption an die Biomasse von den Mikroorganismen verfügbar gemacht werden. Nachteilig sind allerdings die langen Adaptationszeiten, die seitens der Mikroorganismenpopulationen an die zu reinigenden Inhaltsstoffe erforderlich sind. Mit dem Beimpfen einer passenden Mikroorganismenpopulation kann diese Phase verkürzt werden (DRATWA 1968; GUST et al. 1979 a; VDI-RICHTLINIE 3477/1991; SABO et al. 1996; HÜBNER 1997). Biologische Verfahren zeichnen sich durch einen geringen Investitionsaufwand und niedrige Betriebskosten aus und können als echte Alternative zu den herkömmlichen Abluftbehandlungsverfahren angesehen werden (HÜBNER 1997). Aus ökologischer als auch ökonomischer Sicht stellt die biologische Abluftreinigung gegenüber rein physikalisch-chemischen oder thermischen Methoden der Abgasreinigung daher ein sehr vorteilhaftes Verfahren dar (GUST et al. 1979 b; SABO 1991; BARDTKE et al. 1992).

2.2.1 Verfahren der biologischen Abluftreinigung

Das Prinzip aller biologischen Abluftreinigungsverfahren beruht auf der Übertragung der Abgasinhaltsstoffe aus der Gasphase in die wässrige Umgebung der in einem Flüssigkeitsfilm lebenden Mikroorganismen und dem mikrobiellen Abbau der gelösten Schadstoffe in weniger belastende bzw. unbedenkliche Verbindungen (GUST et al. 1979 a; GUST et al. 1979 b; BRAUER 1984). Zunächst kommt es zur Sorption der zu eliminierenden Stoffe. Sorption ist die „Bezeichnung für Vorgänge, bei denen ein Stoff durch einen anderen, mit ihm in Berührung stehenden Stoff selektiv aufgenommen oder angelagert wird“ (VDI-RICHTLINIE 3477/1991). Die Sorption wird unterschieden in Adsorption und Absorption. Unter Adsorption ist die Anreicherung von Elektronen, Ionen oder Molekülen aus einer angrenzenden Phase an einer Grenzfläche zu verstehen (BARROW 1984). Die Adsorbate (Gase, Dämpfe oder in Flüssigkeiten gelöste Stoffe) werden an Festkörperoberflächen, den Adsorptionsmitteln gebunden (HIPPCHEM 1985). Die Absorption dagegen bezeichnet den Vorgang der „gleichmäßigen Verteilung eines Stoffes in einem oder mehreren“ anderen, wobei die Grenzflächen zwischen den beteiligten Stoffen verschwinden (NEUMÜLLER 1979). Das Gas (Absorbat) wird dabei in einer Flüssigkeit, dem Absorptionsmittel gelöst (HIPPCHEM 1985).

Die biologische Abluftreinigung wird in folgende Verfahren unterschieden:

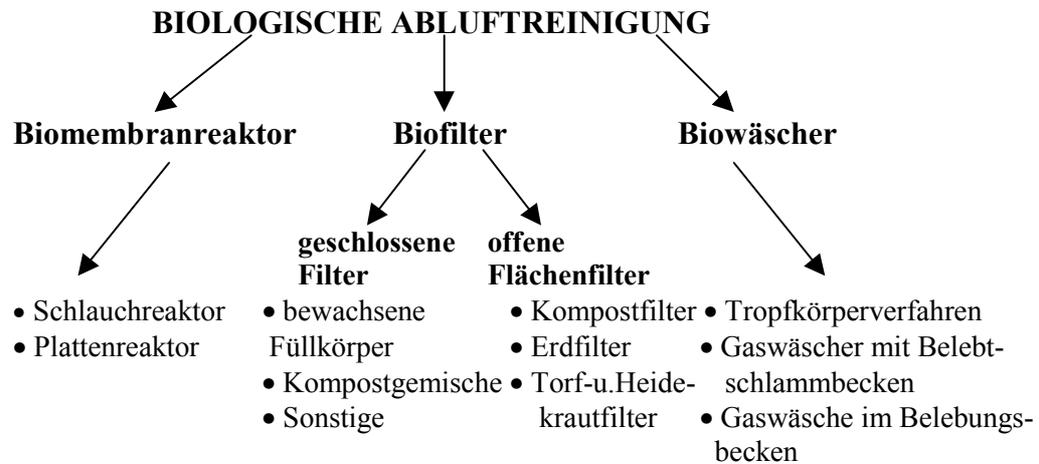


Abb. 1: Schematische Darstellung der zur Zeit bekannten Abluftreinigungsverfahren (SABO 1991)

Das **Biofilterverfahren** wird aufgrund seiner einfachen Verfahrenstechnik bei hohen Leistungsreserven am häufigsten in der biologischen Abluftreinigung eingesetzt. Belastete Abluft wird im Biofilter durch organisches Filtermaterial (z. B. Baumrinden-, Müllkomposte, Koks-Kompost-Gemische, Fasertorf und Heidekraut u. a.) geleitet. Beim Durchströmen der belasteten Abluft durch das Filtermaterial werden die luftverunreinigenden Stoffe auf der Oberfläche der Trägersubstanzen sorbiert. Dabei laufen einerseits Adsorptionsprozesse an der Materialoberfläche des Biofilters ab, andererseits kommt es zu Absorptionsvorgängen durch die im Filtermaterial vorliegende wässrige Phase. Ein ständiger Feuchtigkeitsfilm auf der Oberfläche des Filtermaterials ist notwendig, da biochemische Umsetzungsreaktionen nur in wässriger Umgebung durch Mikroorganismen stattfinden können. Nach Inbetriebnahme ist bis zum Erreichen der vollen Leistungsfähigkeit eine Anpassungszeit notwendig, die wenige Stunden bis mehrere Wochen dauern kann. Das Biofilterverfahren eignet sich besonders zur Reinigung sehr großer, schwach belasteter Abluftmengen und zur Geruchsminderung (DRATWA 1968; GUST et al. 1979 a; STEINMÜLLER et al. 1979; SABO 1991; VDI-RICHTLINIE 3477/1991; BARDTKE et al. 1992, SABO et al. 1996).

Der **Biowäscher** besteht aus der Absorbereinheit und dem Belebungsbecken. Die schadstoffbelastete Abluft wird in der Absorbereinheit mit der Waschflüssigkeit (Absorbens) in Kontakt gebracht und die luftverunreinigenden Stoffe ausgewaschen. Die Elimination der Schadstoffe geschieht durch Mikroorganismen im Belebungsbecken. Wichtigste Voraussetzungen für die Anwendung dieses Verfahrens sind eine gute Wasserlöslichkeit und die mikrobiologische Abbaubarkeit der Abgasinhaltsstoffe. Zur Regenerierung des Waschwassers werden ent-

sprechende Mikroorganismensuspensionen eingesetzt. Eine gute Durchmischung von Suspension und Abwasser sowie Belüftung bewirkt einen verbesserten Abbauwirkungsgrad (GUST et al. 1979 b; KOHLER 1990; SABO 1991; SCHIPPERT 1994; SABO et al. 1996; VDI-RICHTLINIE 3478/1996; HÜBNER 1997). Eine besondere Form ist der Biotropfkörperwäscher, der eine Zwischenform zwischen dem Biowäscher und Biofilter darstellt. Die Mikroorganismen sind auf inerten Füllkörpern (Blähton, synthetische Trägermaterialien) angesiedelt und die Waschflüssigkeit im Abluftstrom über dem Biofilterbett verregnet. Dieses Verfahren findet bevorzugt bei leicht wasserlöslichen Substanzen Anwendung (KOHLER 1990; SCHIPPERT 1987; SABO et al. 1996).

Das Prinzip des **Biomembranreaktors** beruht auf dem Transport der zu reinigenden Abluft durch eine Silikon-Kautschuk-Membraneinheit, die von einer ständig bewegten Flüssigkeit umgeben ist. Nach Aufnahme und Diffusion der organischen Substanzen in die Membran, kommt es zum mikrobiellen Abbau der an der Außenseite der Membran haftenden Mikroorganismen. Dieses Verfahren ermöglicht somit die Überführung schwer wasserlöslicher, leicht flüchtiger Verbindungen aus der Gasphase in die Flüssigkeit und den anschließenden Kontakt mit einer biologisch aktiven Biomasse (SABO 1991; BARDTKE et al. 1992; SABO et al. 1996; HEINIG 1998).

2.2.2 Mikrobiologische Grundlagen der biologischen Abluftreinigung

Viele organische und einige anorganische Verbindungen werden in der Natur von Mikroorganismen abgebaut und die Umsetzungsprodukte zum Aufbau eigener Biomasse verwendet. Die dafür notwendige Energie wird während der biochemischen Reaktion freigesetzt (BARDTKE 1990). SWISHER (1970) definiert den Abbau als „Zerstörung chemischer Verbindungen durch die biologische Aktivität lebender Mikroorganismen“. Unterschieden wird zwischen dem:

- dem primären biologischen Abbau und
- dem vollständigen biologischen Abbau.

Primärer biologischer Abbau bedeutet die Veränderung des Moleküls durch Oxidation oder andere Prozesse, so daß seine charakteristischen Eigenschaften verloren gehen. Unter dem vollständigen biologischen Abbau ist die völlige Umwandlung eines Stoffes in Kohlendioxid, Wasser, anorganische Salze und Biomasse zu verstehen.

Mikrobielle Umsetzungsreaktionen von Schadstoffen finden stets in der wässrigen Phase statt. Der Umwandlungsprozeß kann durch eine Formel vereinfacht ausgedrückt werden (BRAUER 1984; SABO 1991, BARDTKE et al. 1992; STEIN 1992):

belastende Abluftinhaltsstoffe + O₂► CO₂ + H₂O + Biomasse + Energie

Dieser Oxidationsprozeß der zu beseitigenden Substanzen erfordert stets eine optimale Mikroorganismenpopulation, die sich erst durch Auslese (Selektion) ergibt (BRAUER 1984). Werden Mikroorganismen also einem neuen Substrat ausgesetzt, so laufen zunächst mikrobielle Anpassungsmechanismen ab (SWISHER 1970).

Der mikrobiologische Abbau kann anhand der Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen quantitativ und qualitativ beurteilt werden. Grundsätzlich sind zwei mikrobielle Vorgänge zu unterscheiden (SOULAS 1982; SCHLEGEL 1992; GOTTSCHALK u. KNACKMUSS 1993):

Metabolismus bedeutet die enzymatische Umwandlung einer organischen Verbindung in Biomasse und andere Reaktionsprodukte unter Energiegewinn. Ein vollständiger Abbau ist möglich (Mineralisation).

Ko-Metabolismus bezeichnet die zufällige enzymatische Umwandlung einer organischen Verbindung, wobei diese weder als Kohlenstoff- noch als Energiequelle dient, folglich ohne Energiegewinn abläuft. Die abzubauenen Substrate unterliegen „zufälligen“ stofflichen Veränderungen, wobei diese Stoffe nicht vollständig abgebaut werden (keine Mineralisation). Die so entstandenen Produktgemische unterliegen weiteren biologischen und chemischen Reaktionen.

Der mikrobielle Abbau schadstoffbelasteter und geruchsintensiver Abluftströme ist im Wesentlichen an folgende Voraussetzungen gebunden (GUST et al. 1979 a; GOTTSCHALK u. KNACKMUSS 1993; SABO et al. 1996; HÜBNER 1997):

wässriges Milieu,

niedrige Schadstoffkonzentrationen und Möglichkeit der enzymatischen

Umsetzung,

Fähigkeit zu Sorptionsvorgängen auf das Trägermaterial,

biologische Abbaubarkeit,

keine Inhibierung des biologischen Abbauprozesses durch Umsetzungsprodukte.

Bakterienpopulationen setzen sich aus autotrophen (Ernährung aus anorganischen Verbindungen) und heterotrophen (Nutzung organischer Verbindungen als Energie- und Kohlenstoffquelle) Mikroorganismen zusammen, die wiederum unterschiedliche Temperaturbereiche bevorzugen. Hier kann zwischen psychrophilen (Temperaturoptimum: 15-18 °C), mesophilen (Optimum: 20-45 °C) und thermophilen (Optimum: 55-75 °C) Organismen unterschieden werden. Für die Aufrechterhaltung ihrer Lebensbedingungen benötigen die Mikroorganismen

zum Wachstum neben Wasser noch andere Nährstoffe, wie Kohlenstoff, Stickstoff, Phosphor, Mineralstoffe und Spurenelemente. Der Sauerstoffgehalt des Wassers sollte für strikte Aerobier mindestens 0,5 bis 1,0 mg/l betragen (DRATWA 1968; STEINMÜLLER et al. 1979; BRAUER 1984).

In Bezug auf das Biofilterverfahren sind optimale Abbauleistungen durch eine aktive Mikroorganismenpopulation nur dann zu erwarten, wenn im Filtermaterial entsprechende Milieubedingungen (Feuchtigkeit, Temperatur, Nährstoff usw.) innerhalb bestimmter Grenzen eingehalten werden. Als Filtermaterial sind neben Rindenmulch, Torf- und Heidekrautgemischen und inerten Materialien vor allem Komposte geeignet (VDI-RICHTLINIE 3477/1991). Durch Zusatz von Aktivkohle zum Filtermaterial kann die Sorptionsfähigkeit und Mikrobenbesiedelung erhöht und damit die Abbauleistung des Biofilters verbessert werden (KLICHE et al. 1998).

Die Feuchtigkeit der Filtermaterialien sollte im Bereich von 30-60 % (w/w) liegen (HIPPCHEN 1985; EITNER 1989; VDI-RICHTLINIE 3477/1991; SABO 1991; BARDTKE et al. 1992). Eine Materialfeuchte unter 30 % (w/w) führt nach SABO et al. (1994) zur Einstellung der Abbautätigkeit der Mikroorganismen. HÜGLE u. MANNEBECK (1993) empfehlen daher, die Zuluft eines Biofilters auf über 97 % (w/w) Feuchte zu bringen.

Die Abgastemperatur sollte 60 °C nicht überschreiten, allerdings über dem Gefrierpunkt liegen. Die meisten Bakterien eines Biofilters arbeiten bei Temperaturen von 25 bis 30 °C (STEINMÜLLER et al. 1979; VDI-RICHTLINIE 3477/1991). Der Temperaturbereich von 15-40 °C ist in der biologischen Stufe optimal (KNAUF 1998).

Der pH-Wert übt Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit des Schadstoffumsatzes durch die Mikroorganismen sowie auch auf die Zusammensetzung der Mikroorganismenpopulationen aus. Deshalb sind extreme pH-Bereichsverschiebungen des Trägermaterials zu vermeiden (VDI-RICHTLINIE 3477/1991). KNAUF (1998) gibt als allgemeinen Faustwert für das Funktionieren eines biologischen Systems einen pH-Bereich von 5,5-8,0 an. Das Wachstum von Bakterien findet bevorzugt im neutralen bis schwach alkalischen Bereich statt (DRATWA 1968).

2.3 Vorkommen und Eigenschaften von Limonen als Naturstoff in der Umwelt

Limonen (1,8-p-Menthadien, 4-Isopropenyl-1-methylcyclohexen) gehört als organische Verbindung in die Stoffklasse der monocyclischen Terpenkohlenwasserstoffe. Als biogene Komponente ist es Bestandteil zahlreicher ätherischer Öle (Kümmel-, Dill-, Edeltannen-, Fichtennadel-, Harz-, Muskatnuß-, Campheröl usw.) In den Agrumenölen (ätherische Öle der

Zitrusfrüchte, wie Orangen- Zitronen-, Bergamott-, Limettenöl u. a.) macht das Limonen bis zu 97 % ihrer Bestandteile aus (BEILSTEIN 1922, 1930, 1939, 1943; WAGNER u. KÜHMEDT 1970; WÜNSCH 1980; KRASNOBAJEV 1984; BENINCASA et al. 1990; FALBE u. REGITZ 1990; OHLOFF 1990). Mittels aus verschiedenen Pflanzen isolierten Enzymen, wie Limonen-Synthase bzw. Pinen-Cyclase, wurde die Biosynthese von Limonen aus Geranyldiphosphat bzw. Geranylpyrophosphat untersucht (ROJAS et al. 1983; CROTEAU u. SATTERWHITE 1989; RAJAONARIVONY et al. 1992; SAVAGE et al. 1994; ADAM et al. 1996, YUBA et al. 1996). Limonen wurde in Insekten, Mikroorganismen sowie in Meeresorganismen gefunden (SCHEUER 1978; DEV 1982; KRASNOBAJEV 1984). So wurde bei einem toxischen Stamm von *Fusarium sporotrichioides* Sherbakoff und den toxischen und nicht toxischen Stämmen von *Penicillium verrucosum* Dierckx in der auf Tenax angereicherten Inkubationsluft Limonen gaschromatographisch identifiziert (PASANEN et al. 1996). Durch Erhitzen von Dihydrocarveol mit Boroxid bzw. aus α -Pinen durch Erhitzen mit Benzoesäure wird Limonen neben anderen Produkten gebildet (BEILSTEIN 1930, 1939). Limonen riecht zitronen-, orangen- bis terpentinartig. Die Verbindung ist sehr schlecht wasserlöslich, dagegen gut löslich in Alkohol und Diethylether. Es ist weiterhin durch eine starke Lipoidlöslichkeit gekennzeichnet. Limonen besitzt einen sehr niedrigen Geruchsschwellenwert, der von MAYER (1990) mit 200 mg/m^3 , bei DE VOS et al. (1990) mit $2,45 \text{ mg/m}^3$ beschrieben wird. Der Entdeckungsschwellenwert, ausgedrückt als meßbarer Konzentrationsunterschied eines gelösten Stoffes gegen sein reines Lösungsmittel, wird für Limonen in Wasser mit $T_w = 10 \text{ ppb}$ angegeben (BUTTERY et al. 1971; OHLOFF 1990). Das Molekulargewicht dieses Terpens beträgt $136,24 \text{ g/mol}$, die Dichte $0,842 \text{ g/ml}$. Die Siedetemperatur liegt bei $177 \text{ }^\circ\text{C}$. Limonen ist eine flüchtige Verbindung, was durch den Dampfdruck von $2,1 \text{ hPa}$ bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ bedingt ist (SIMONSEN 1953; WEAST et al. 1986; OHLOFF 1990; HEINIG 1998).

In Konzentrationen von $\geq 0,50 \text{ mg/l}$ Kulturflüssigkeit führt Limonen zu einer vollständigen Wachstumshemmung verschiedener Spezies der Gattung *Bacillus*, wie *B. thuringiensis*, *B. subtilis* u. a. (ANDREWS et al. 1980). SIERRA-ALVAREZ UND LETTINGA (1990) ermittelten für Limonen Konzentrationen von $175\text{-}250 \text{ mg/l}$, die gegenüber methanogenen Bakterien einen Inhibitionseffekt von 80 % bewirken. KARLBERG et al. (1992) entdeckten bei Limonen ein sensibilisierendes Potential, welches zur Bildung potentieller Allergene führt und durch Oxidationsprozesse ausgelöst wird. Weiterhin stellt Limonen ein für männliche Ratten spezifisches Nephrotoxin und Nephrokarzinogen dar, das in der Lage ist, Nierentumoren bei bestimmten Rattenstämmen zu induzieren. Die Toxizität resultiert dabei aus der

Interaktion zwischen einem Umsetzungsprodukt des Limonens (cis-d-Limonen-1,2-oxid) und einem rattenspezifischen Protein (α 2u-Globulin). Für Mäuse trifft dieser Effekt nicht zu (LEHMAN-McKEEMAN et al. 1989; LEHMAN-McKEEMAN et al. 1990; DIETRICH u. SWENBERG 1991; HARD u. WHYSNER 1994). Bei Hunden konnten Limonen-induzierte Nephropathien durch orale Gaben von Limonen nicht nachgewiesen werden (WEBB et al. 1990). Demgegenüber berichten Autoren von einer chemopräventiven Aktivität des Limonens gegenüber verschiedenen Tumorarten bei Nagern, wie Mamma-, Haut-, Lungen- und Lebertumoren und den möglichen Einsatz als wirksames chemotherapeutisches Mittel zur Behandlung maligner Tumoren des Menschen (CROWELL et al. 1994; GOULD et al. 1994; HOHL 1996; POTTER u. STEINMETZ 1996; BARDON et al. 1998; CHEN et al. 1998; CROWELL 1999).

2.3.1 Bedeutung und Verwendung von Limonen

Limonen ist ein leicht verfügbares Naturprodukt und besitzt aufgrund seiner Geruchseigenschaften große wirtschaftliche Bedeutung in der Parfümindustrie sowie zur Herstellung naturidentischer Duft- und Geschmacksstoffe (ERICKSON 1976; ABRAHAM et al. 1985; KIESLICH et al. 1986; OHLOFF 1990; BOUWMEESTER et al. 1998). CADWALLADER et al. (1989) sowie BRADDOCK und CADWALLADER (1992) berichten über neue Verfahren zur Herstellung von Produkten aus Zitrusfrüchten, die in der Lebensmittelindustrie genutzt werden und einen hohen Reinheitsgrad der darin enthaltenen Bestandteile, wie Limonen gewährleisten. Terpene dienen als Ausgangsmaterial zur chemischen Synthese verschiedener Verbindungen und finden daher in der Farben- und Lackindustrie sowie in der pharmazeutischen Industrie Verwendung (ABRAHAM et al. 1984; FALBE u. REGITZ 1990). Limonen ist ebenfalls zur Zersetzung von Ozon befähigt, das unter anderem entsteht, wenn elektrische Geräte (z. B. in der Corona-Aufladevorrichtung bei Kopiergeräten und Laserdruckern) für industrielle Zwecke elektrische Entladungen erzeugen (ICHIRO u. KANAGAWA. 1988; KANAGAWA u. KANAGAWA 1991).

Untersuchungen zu den Abwehrmechanismen der Pflanzen ergaben eine besondere Bedeutung von Limonen als Abwehrtoxin für bestimmte Larvenarten von Schadinsekten (RUDNEW u. SMEJANEZ 1969; CZAJKA 1997). Eine antimikrobielle Wirkung gegen verschiedene Bakterien (*B. subtilis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus*) Hefen (*C. albicans*, *Sa. cerevisiae*) sowie Pilzen (*T. mentagrophytes*, *A. niger*), die von Limonen enthaltenden ätherischen Ölen ausgeht, konnte ebenfalls nachgewiesen

werden (SMIRNOFF 1972; YOUSEF u. TAWIL 1979; JANSSEN et al. 1984; URIBE u. PENA 1990; FLAMINI et al. 1999). Dieser Effekt kann durch Oxidation des Terpens noch verstärkt werden (CHASTEIN et al. 1992). Limonen wird daher als antimikrobieller Wirkstoff in Desinfektionsmitteln sowie aseptischen Reinigungsmitteln eingesetzt (HAGEN et al. 1980; MOLDOVANYI et al. 1988).

2.3.2 Mikrobieller Abbau von Limonen

Limonen dient als Ausgangsstoff für die mikrobielle Umwandlung zu hochwertigeren Monoterpenen. Wegen seiner sehr schlechten Wasserlöslichkeit und leichten Flüchtigkeit ist es als relativ langsam mikrobiologisch abbaubare Verbindung anzusehen. Dennoch haben verschiedene Autoren die Möglichkeit der mikrobiellen Umwandlung von Limonen beschrieben (Abb. 2). Aus dem Boden wurde beispielsweise *Pseudomonas* PL (*Pseudomonas putida arvilla*) isoliert, das Limonen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten kann. Die Anreicherung erfolgte über 24 Stunden bei 28 °C in Batch-Kultur mit Mineralsalzmedium und unter Zugabe von 0,3-0,6 % (v/v) Limonen. Ein Abbauweg von Limonen führt dabei zur Bildung von Carveol, das nachfolgend zu Carvon und 1-p-Menthen-6,9-diol oxidiert wird. Über einen zweiten Abbauweg entsteht Dihydrocarvon und 8-p-Menthen-1,2-cis-diol. Bei Zusatz von 1 % Glukose wird Limonen über einen dritten Abbauweg durch β -Oxidation zu Perillylalkohol, Perillylaldehyd, Perillensäure und zu β -Isopropenylpimelinsäure bzw. β -Isopropenylpimelyl-CoA abgebaut. Diese Verbindung wird in mehreren Zwischenstufen weiter zu korrespondierender Dihydroxysäure oxidiert (DHAVALIKAR u. BHATTACHARYYA 1966; DHAVALIKAR et al. 1966, KRASNOBAJEV 1984, TRUDGILL 1986). Auch ein an Linalool adaptiertes Bakterium, *Pseudomonas incognita*, ist zur Verwertung von Limonen in Schüttelkultur befähigt, wobei das Substrat über die zuletzt genannten Metabolisierungsprodukte vollständig zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut wird (MADYASTHA et al. 1977; RAMA DEVI u. BHATTACHARYYA 1977 a, b; MADYASTHA u. RENGANATHAN 1984).

DHERE und DHAVALIKAR (1970) isolierten aus Abwasser einen Bakterienstamm der Familie Enterobacteriaceae, der in der Lage ist, auf Limonen als einzige Kohlenstoffquelle zu wachsen. Die Substratkonzentration wird mit 0,2 % (v/v) angegeben. Nach Ansäuerung der Fermentationskultur und der Extraktion mit Ether und Chloroform konnten ausschließlich Dihydroperillensäure und Perillensäure als saure Umsetzungsprodukte nachgewiesen werden, während die neutrale Fraktion nur Spuren nicht weiter identifizierbarer Metaboliten enthielt.

CADWALLADER et al. (1989) beschreiben den mikrobiellen Umbau von Limonen zu α -Terpineol und Perillensäure durch *Pseudomonas gladioli*, wobei das Bakterium aus Kiefernrinde und -saft gewonnen und angereichert wurde. Wegen der leichten Flüchtigkeit der Verbindung wurden Inkubationstemperaturen zwischen 25 °C und 28 °C gewählt, so daß die Bakterienzellen das Substrat vor Verdampfung nutzen konnten. SPEELMANS et al. (1998) gewannen aus Schlamm einen neuen Stamm, *Pseudomonas putida* GS1, der Limonen hauptsächlich zu Perillensäure metabolisiert, wobei durch den Einsatz von Emulgatoren die Bioverfügbarkeit des Substrates erhöht werden konnte.

Aus Orangenschalen isolierten CHANG und ORIEL (1994) ein thermophiles Bakterium, *Bacillus stearothermophilus* BR388, das Limonen als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Als Endprodukte entstehen hauptsächlich Perillylalkohol und geringe Mengen Perillylaldehyd sowie α -Terpineol. Die Biomasseproduktion aus dem Limonen konnte durch Zugabe von 0,125 g/l Hefeextrakt gesteigert werden. Limonenkonzentrationen > 0,15 % (v/v) führten dagegen zu einer starken Wachstumshemmung des Bakterienstammes. CHANG et al. (1995) transformierten die für den Limonenkatabolismus verantwortlichen Chromosomenfragmente von *Bacillus stearothermophilus* BR388 in *Escherichia coli*. Ihnen gelang es, den funktionellen Abbauweg für dieses Monoterpen erfolgreich zu klonen. SAVITHIRY et al. (1997) fanden in einem geklonten Fragment von *E. coli* ein auf den Genen codiertes thermostabiles Enzym, Limonen-Hydratase, das maßgeblich für die Umwandlung von Limonen in α -Terpineol verantwortlich ist. Durch die Klonierung des Limonenabbauweges könnte die Produktion wertvoller Metaboliten gezielt beeinflusst werden.

In Frischwassersedimenten entdeckten VAN DER WERF et al. (1999) ein vorher noch nicht beschriebenes grampositives Bakterium, das Limonen über die Limonen-1,2-epoxidhydrolase erst zu Limonen-1,2-diol, dann zu 1-Hydroxy-2-oxolimonen und schließlich zu 3-Isopropenyl-6-oxoheptanyl-CoA metabolisiert. Hierbei handelt es sich um einen neuen vollständigen Abbauweg für Limonen. Die zuvor in Flüssigkultur auf Dihydrocarveol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle angereicherten Bakterienzellen wurden anschließend auf Agarplatten mit Mineralsalzmedium überimpft und unter Limonenatmosphäre bebrütet. Einzelne Kolonien wurden isoliert und deren Reinheit auf Agarplatten, die Hefeextrakt und Glukose enthielten, überprüft. Mittels chemotaxonomischer und genetischer Untersuchungen konnte dieser Bakterienstamm als *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 identifiziert werden (BARBIRATO et al. 1998; VAN DER WERF et al. 1998; VAN DER WERF 2000).

Von über 800 verschiedenen Mikroorganismen aus internationalen Stammsammlungen, die einem umfangreichen Screening unterzogen wurden, fanden KIESLICH et al. (1986) ins-

gesamt 320 Stämme, die Limonen mikrobiell angreifen können. Darunter befanden sich neben verschiedenen Bakterien auch eine Reihe von Pilzen. So sind die Pilzstämme *Chaetomium cochlioides* DSM 1909 und *Chaetomium globosum* DSM 62109 in der Lage, dieses Substrat zu cis-Carveol abzubauen. *Diplodia gossypina* ATCC 10936, *Corynespora cassiicola* DSM 62475 und *Gibberella cyanea* fermentieren Limonen unter Akkumulation von p-Menth-8-en-1,2-diol. Wegen der ungünstigen chemischen Eigenschaften und durch die Toxizität des Limonens mußte eine spezielle Fermentationstechnik entwickelt werden, bei der Limonen kontinuierlich der Anreicherungskultur zugeführt wurde (ABRAHAM et al. 1984; ABRAHAM et al. 1985). Bei der mikrobiellen Transformation des Limonens durch *Pleurotus sapidus* werden hauptsächlich Carveol und Carvon gebildet (ONKEN u. BERGER 1999). *Penicillium digitatum* und *Penicillium italicum* bauen Limonen zu Carveol und p-Mentha-2,8-dien-1-ol sowie 3-Isopropenylpimelin-Co A ab. Die Schimmelpilze wurden von verwesenden Orangen gewonnen und mit 0,5 % (v/v) Limonen inkubiert. Um eine bessere Bioverfügbarkeit zu erreichen, wurde das Substrat zuvor in 0,25 % (v/v) Ethanol gelöst (BOWEN 1975). *Penicillium digitatum* DSM 62840 und eine Spezies der Gattung *Cladosporium* (bezeichnet als T₇) bauen den Geruchsstoff zu α -Terpineol bzw. Limonenglycol ab (KRAIDMAN et al. 1969; MUKHERJEE et al. 1969; MUKHERJEE et al. 1973; STUMPF et al. 1982).

Limonen entsteht selbst als Umsetzungsprodukt während der Biotransformation von Geraniol und Menthol durch *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium* bzw. von α -Pinen durch *Bacillus pallidus* BR425 (FIGUEIREDO et al. 1996; SAVITHIRY et al. 1998).

Struktur-Aktivitäts-Analysen von GILBERT und CROWLEY (1997) mit Limonen zeigen, daß besonders die Verbindungen mit einer ungesättigten p-Menthan-Struktur die stärkste Ko-Metabolismus-Aktivität gegenüber PCB-Verbindungen aufweisen, die durch den Bakterienstamm *Arthrobacter* B1B angegriffen und aufgespalten wird. Sie steigern folglich die Abbauraten während des mikrobiologischen Abbaus von PCB-Verbindungen durch Bodenbakterien. MISRA et al. (1996) nahmen anhand von Batchexperimenten mit Nadelwaldboden und Hartholzproben als Inokula eine Einschätzung des Biotransformationspotentials einiger Monoterpene (d-Limonen, α -Pinen, γ -Terpinen) vor. Sie stellten unter anderem fest, daß die Erhöhung der Biomasse und Headspace-Kohlendioxid-Konzentration parallel mit einer Verminderung der Monoterpene einhergeht. Diese Untersuchungen bestätigen das Verschwinden der Monoterpene als Ergebnis der biologischen Umwandlung bei gleichzeitigem mikrobiellen Wachstum und Mineralisation.

Limonen ist von vielen Mikroorganismen mikrobiologisch angreifbar. Die meisten Bakterien und Pilze können dieses Substrat allerdings nur bis zu einer bestimmten Zwischenstufe abbauen, wobei es häufig zu einer Akkumulation unerwünschter Zwischenprodukte aus dem Intermediärstoffwechsel kommt. Einerseits könnte der Stoffwechsel der Mikroorganismen durch die Zugabe hemmender Enzyme, die für diese Reaktionen verantwortlich sind, beeinflusst werden. Zum anderen ließen sich unerwünschte Enzyme durch Mutation der hyperaktiven Stämme oder durch den Einsatz gezielter Mikroorganismen ausschalten (KIESLICH et al. 1986).

Die mikrobiellen Abbaupfade für Limonen sollen abschließend in der Abb. 2 von VAN DER WERF et al. (1999) noch einmal zusammengefaßt werden.

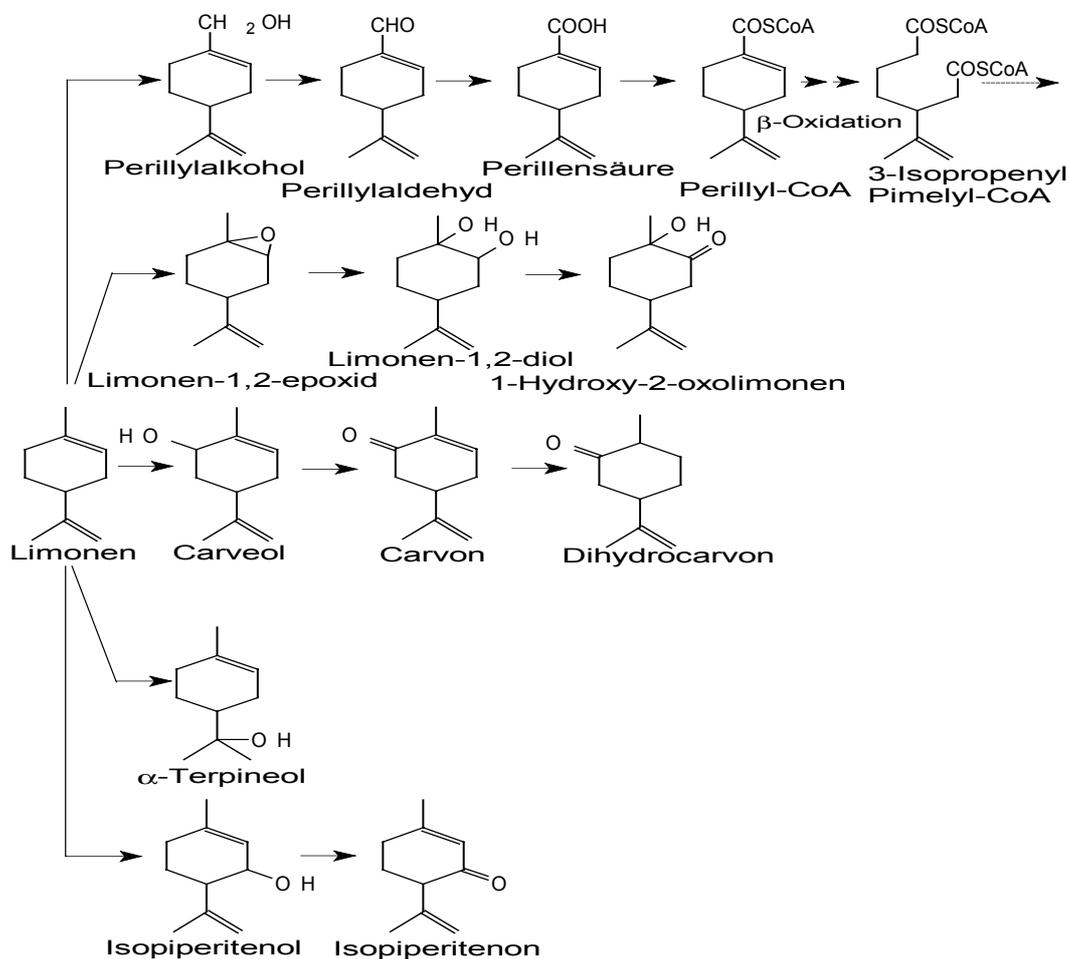


Abb. 2: Bekannte mikrobielle Abbaupfade für Limonen nach VAN DER WERF et al. (1999)

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Mikrobiologische Untersuchungen

3.1.1 Gewinnung und Anreicherung Limonen-abbauender Mikroorganismen

Insgesamt wurden vier Schüttelkulturen über einen Zeitraum von 90 Tagen durch Wachstum auf Limonen im Laufe der Passagen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle angereichert. Als Inokulationsquellen dienten verschiedene Umweltproben:

- Probe 1: ein Gemisch aus Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde,
- Probe 2: Nadelwaldboden,
- Probe 3: Schalen von Zitrusfrüchten,
- Probe 4: Bioabfall.

Auf Grund der Toxizität von Limonen erfolgte die Anreicherung nach dem fed-batch-Prinzip (sukzessive Nachdosierung des Substrates ohne Entnahme von Biomasse). Die Schüttelkulturen wurden in gekerbten Erlenmeyerkolben (250 ml) mit Schraubdeckel und Teflonsepten (Schott, Mainz) mit einem Mineralsalzmedium nach Seubert (Tab. 2), modifiziert nach Mitzkat, und 0,5 g einer der oben genannten Umweltproben angesetzt und in einem Rotationschüttler (Typ SM 258, Bühler, Unterschleißheim) bei 28 °C und 130 U/min bebrütet. Zunächst wurde eine Limonenkonzentration von 1 g/l Mineralsalzmedium zugegeben, wobei sich jedoch nur ein geringer Anteil in der wässrigen Phase löste. Nach wiederholter Überimpfung in Mineralsalzmedium wurde die Substratkonzentration auf 0,5 g/l reduziert. Nach Erreichen einer starken Trübung der Kultur ($OD_{550} = 1,5-1,8$) durch mikrobielles Wachstum erfolgte nach 3-7 Tagen eine Passage von 2 ml je Probe im Verhältnis 1:10, später 1:20, in frisches Medium. Während der Inkubation wurde der pH-Wert kontrolliert und das Wachstum der Bakterien durch Trübungsmessung und mittels Spatelplattenverfahren verfolgt.

Tab. 2: Mineralsalzmedium (SEUBERT 1960), modifiziert nach Mitzkat und Spurenelementlösung

MINERALSALZMEDIUM (pH = 7,0)	SPURENELEMENTLÖSUNG
3,0 g/l K_2HPO_4	0,1 g/l $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$
1,8 g/l KH_2PO_4	0,1 g/l H_3BO_3
1,0 g/l NH_4NO_3	0,03 g/l KJ
0,2 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,1 g/l $MnCl_2 \times 4 H_2O$
0,01 g/l $CaCl_2 \times 2 H_2O$	0,02 g/l $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
0,01 g/l $FeSO_4 \times 7 H_2O$	0,01 g/l $CuSO_4 \times 5 H_2O$
10 ml/l Spurenelementlösung	0,05 g/l $CoCl_2 \times 6 H_2O$
1,0 l A. dest.	1,0 l A. dest.

Das Mineralsalzmedium sowie die Spurenelementelösung wurden 15 min bei 121 °C und 120 kPa autoklaviert.

3.1.2 Anreicherung der Batch-Kulturen für die Untersuchungen zum Limonenabbau

Anreicherung der Batch-Kulturen für die quantitativen Untersuchungen zum Limonenabbau

Die Batch-Kulturen wurden in gasdicht verschlossenen Erlenmeyerkolben mit 18 ml Mineralsalzmedium (pH-Wert = 7,0) angesetzt. Als Inokula dienten 2 ml gewaschenes Zellmaterial einer an Limonen adaptierten Vorkultur (spätlogarithmische Phase) mit einer eingestellten optischen Dichte von 0,5 bei 550 nm. Limonen wurde entsprechend dem Versuchsansatz in Konzentrationen von 800-4200 mg/l Mineralsalzmedium zugegeben. Die Kontrollproben enthielten 20 ml Medium und Limonen in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Bebrütung erfolgte auf Schüttelthermostaten (Typ SM 258 und TH 25 Swip, Bühler, Unterschleißheim) bei 28 °C.

Anreicherung der Reinkulturen für die qualitativen Untersuchungen zum Limonenabbau

Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von 250 ml (Abschnitt 3.1.1) wurden mit 40 ml Mineralsalzmedium befüllt. Mit einer sterilen Impföse wurden 10 µl Zellmaterial von einem Komplexmedium (Nähragar, Merck) abgenommen und in die Kolben gegeben. Die Limonenzugabe erfolgte in einer Konzentration von 0,5 g/l und die Bebrütung bei 28 °C auf einem Rotationsschüttler maximal 154 Stunden.

3.1.3 Aufreinigung des Probenmaterials und Isolierung von Reinkulturen

Die Reinkulturen wurden aus den auf Limonen angereicherten vier Mischkulturen isoliert. Die Aufreinigung erfolgte durch zweimaliges Waschen der Kulturen in frischem Mineralsalzmedium mit einem pH-Wert von 7,0. Nach dem Herstellen logarithmischer Verdünnungsreihen bis 10^{-8} wurden die Kulturen auf verschiedene Komplex- und Selektivnährmedien überimpft. Dabei kamen Nähragar, CASO-Agar, Cetrimit-Agar, Endo-Agar, MacCONKEY-Agar sowie Pseudomonas-Agar F und P (Merck, Darmstadt) zum Einsatz. Die beimpften Platten wurden insgesamt 72 Stunden bei 28 °C unter Limonenatmosphäre von ca. 13 g/l bebrütet. Ausgewählt wurden Platten mit maximal 100 Kolonien, und der vierte Teil, maximal 25 Einzelkolonien, abgeimpft. Die Isolate wurden zur Reinigung mindestens zweimal überimpft und mikroskopisch auf ihre morphologische Reinheit geprüft.

Für die Bezeichnung der Bakterienstämme wurde der Buchstabe L für Limonen abbauendes Isolat gewählt, gefolgt von der Probennummer der Batch-Kultur (1-4) sowie der Reihenfolge der isolierten Stämme der jeweiligen Batch-Kultur.

3.1.4 Stammhaltung der Batch-Kulturen und der Isolate

Die kurzzeitige Aufbewahrung der Isolate erfolgte auf Komplexmedium (Nähragar und CASO-Agar) und als Schrägagarkulturen bei 6 °C. In Abständen von 20-30 Tagen (Agarplatten) bzw. 90 Tagen (Schrägagarkulturen) wurden die Reinkulturen überimpft und dabei auf Verunreinigungen kontrolliert. Die Batch-Kulturen wurden über kurze Zeiträume in gasdicht verschlossenen Schraubgläsern (Schott, Mainz) bei 6°C aufbewahrt.

Für die langfristige Lagerung wurden Glyzerinkulturen (20 % in der Endkonzentration) angelegt und bei -20 °C aufbewahrt.

Weiterhin diente das MicrobankTM-System (Mast Diagnostika, Reinfeld) zur schonenden Aufbewahrung der Bakterienisolate in Gefrierkulturen. Die Kryoröhrchen enthalten poröse Keramik-Kügelchen in einem speziellen Kryomedium. Dazu wurden mit einer sterilen Impföse mehrere 24 Stunden alte saubere Kolonien von Nähragar abgenommen und in das Medium eingerieben. Nach vorsichtigem Schütteln und Binden der Organismen an die poröse Oberfläche der Kügelchen wurde das Kryomedium mit einer sterilen Pipette abgehoben und verworfen. Die Lagerung der Kryoröhrchen erfolgte bei -70 °C.

3.1.5 Untersuchung des Bakterienwachstums der Batch-Kulturen

3.1.5.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die indirekte Bestimmung der Keimzahl der Schüttelkulturen erfolgte photometrisch mittels Absorptionmessung. Bei Wellenlängen von 550-600 nm wurde die Extinktion in Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm (Präzisions-Küvetten aus Quarzglas, Suprasil) im UV/VIS-Spektrometer Lambda Bio (Perkin Elmer, Überlingen) gemessen.

3.1.5.2 Bestimmung der Lebendkeimzahl

Die Lebendzellzahl der Kulturen wurde durch direkte Zählung der koloniebildenden Einheiten (KBE) mit dem Spatelplattenverfahren bestimmt. Aus der jeweiligen Stammlösung wurden logarithmisch Verdünnungsreihen bis 10^{-8} erstellt und die Keimsuspensionen mit

sterilen Drigalski-Spateln auf Nähragar-Platten (Doppelansatz) bis zur Oberflächentrockne ausgespatelt und die Platten bei 28 °C 48 Stunden bebrütet. Für die Auswertung wurden Platten mit 50-150 Kolonien herangezogen und die Lebendzellzahl nach folgender Formel berechnet (SÜßMUTH et al. 1999).

$$(10 \times n + 1 \times 100) \times (1 / 11) \times VF$$

n...gezählte Kolonien zwischen 50 und 150, Ergebnis in KBE/ml
VF...Verdünnungsfaktor

3.1.6 Untersuchung des aeroben Bakterienwachstums in Modellbiofiltern

3.1.6.1 Ermittlung der Keimzahl aus dem Filtermaterial eines konventionellen Biofilters

Die Bestimmung der Keimzahlen in KBE/g Biofiltermaterial (Feuchtgewicht) erfolgte vor und während des Biofilterbetriebes mit Limonen. Die Methode der Probennahme ist im Abschnitt 3.3.2.3 beschrieben. Die Bestimmung der Keimzahl als Lebendzellzahl ist dem Abschnitt 3.1.5.2 zu entnehmen.

3.1.6.2 Ermittlung der Keimzahl aus dem Filtermaterial der Modellbiofilter

Die Keimzahlen wurden vor Inbetriebnahme und während der 150-tägigen Laufzeit beider Biofilter aus dem Filtermaterial bestimmt. Die Probennahme wird in Abschnitt 3.3.2.3 beschrieben.

Wegen der guten Reproduzierbarkeit und des geringen Zeitaufwandes erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl als direkte mikroskopische Zählung der Partikel, wobei sich die Zellzahlen in den zu untersuchenden Kompostproben sicher von den Kompostpartikeln unterscheiden ließen. Zur quantitativen Erfassung der Zellzahlen diente die Neubauer-Zählkammer, welche mit einer Netzeinteilung nach Thoma ausgestattet war. Das Zählfeld ist in 16 Großquadrate, jedes Großquadrat in 16 Kleinquadrate unterteilt, die eine Seitenlänge von 0,05 mm besitzen. Der Abstand zwischen Deckglas und Gitternetz beträgt 0,1 mm. Für jedes Kleinquadrat ergibt sich folgendes Volumen:

$$0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,00025 \text{ mm}^3$$

Die Bakterienzahl pro ml wurde aus der durchschnittlichen Zahl der Bakterien pro Kleinquadrat ermittelt, mit dem Kammerfaktor 4×10^6 multipliziert und anschließend unter Berücksichtigung der gewählten Verdünnungen auf 1g Biofiltermaterial (Feuchtgewicht) umgerechnet (SÜßMUTH et al. 1999).

3.1.7 Untersuchung der aeroben mikrobiellen Zusammensetzung des Biofiltermaterials

Vor Versuchsbeginn und während des Biofilterbetriebes wurde Filtermaterial aus beiden Biofiltern entnommen und nach Aufreinigung des Probenmaterials Reinkulturen isoliert. (Abschnitte 3.3.2.3 und 3.1.3). Die Isolate wurden **taxonomisch** (Zell- und Koloniemorphologie, Beweglichkeitsprüfung, Gram-Färbung, Aminopeptidase-Test, Abschnitte 3.1.9.1), **physiologisch-biochemisch** (Verhalten gegenüber Sauerstoff, Schwefelwasserstoffbildung, Bildung von Indol aus Tryptophan, API und BBLTM Testsysteme, Abschnitte 3.1.9.4-3.1.9.4.2, 3.1.9.5) und **chemotaxonomisch** (Fettsäureanalyse, Abschnitt 3.1.9.3) untersucht.

3.1.8 Anzucht größerer Mengen von Bakteriensuspension für die Inokulation des Modellbiofilters

Zur Anzucht von insgesamt fünf Litern Inokulationskultur wurden 10 gasdicht verschlossene Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von einem Liter mit je 0,5 Litern Mineralsalzmedium (pH-Wert 7) beschickt und 50 ml einer Vorkultur (spät-logarithmische Phase) zugegeben. Die Vorkultur bestand aus einem Mix der vier an Limonen adaptierten Anreicherungskulturen. Die Limonenkonzentration lag bei 0,4 g/l. Die Erlenmeyerkolben wurden 48-72 Stunden auf einem Schüttelthermostat (TH 25 Swip, Bühler, Unterschleißheim) bei 30 °C bebrütet. Während der Bebrütung erfolgte eine Kontrolle der Bakterienzellzahl mit der Neubauer-Zählkammer (Abschnitt 3.1.6.2).

3.1.9 Untersuchungen zur Taxonomie der Limonen-abbauenden Isolate

3.1.9.1 Zell- und Koloniemorphologie

Die Zell- und Koloniemorphologie der Isolate wurde mit dem System-Mikroskop Olympus BX 40 (Tokyo, Japan) untersucht. Die lichtmikroskopische Betrachtung der Einzelzellen erfolgte bei 400-1000facher Vergrößerung. Die Zellabmessungen wurden mit einem Okularmikrometer vorgenommen. Die morphologische Reinheit der Kulturen wurde bei 100-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop überprüft.

Gram-Färbung

Die Gram-Färbung wurde mit 24-48 Stunden alten, bei 28 °C bebrüteten Bakterien nach der Methode von WINKLE (1979) durchgeführt.

Beweglichkeit

Die Beweglichkeit der Bakterien wurde zunächst im Nativpräparat geprüft. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen isotonische Natriumchloridlösung gegeben und wenig Zellmaterial darin verrieben. Die Beurteilung erfolgte mit einem Ölimmersionsobjektiv am System-Mikroskop Olympus BX 40. Weiterhin wurde die Beweglichkeit der Bakterien mit SIM-Medium (Merck, Darmstadt) in Reagenzröhrchen getestet. Nach Beimpfung der Röhrchen und Inkubation der Stichkulturen bei 28 °C wurde deren Wachstum nach 24 und 48 Stunden beurteilt. Beweglichkeit zeigte sich durch diffuse Trübung des Nährbodens in der Umgebung des Stichkanals, Unbeweglichkeit durch Wachstum ausschließlich entlang des Stichkanals. Als Teststämme wurden *E. coli* (beweglich) und *Klebsiella pneumoniae* (unbeweglich) eingesetzt.

Aminopeptidase-Test

Eine gut gewachsene Einzelkolonie wurde in 0,2 ml destilliertem Wasser bis zur deutlichen Opaleszenz suspendiert. Das Bactident[®] Aminopeptidase-Teststäbchen (Merck, Darmstadt) wurde mit der Reaktionszone in die Bakteriensuspension eingetaucht und bei 37 °C, 10-30 Minuten, inkubiert. Die Ablesung erfolgte jeweils nach 10 und 30 Minuten, wobei eine positive Reaktion (Anwesenheit der L-Alanin-Aminopeptidase) durch deutliche Gelbfärbung der Bakteriensuspension angezeigt wird. Als Teststämme wurden *P. fluorescens* (positive Kontrolle) und *Staph. aureus* (negative Kontrolle) verwendet.

3.1.9.2 Molekularbiologische Untersuchungen

3.1.9.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Abklärung bestehender Unterschiede der Gesamtzellproteine der Limonen abbauenden Isolate (*L1,2*, *L2,4*, *L2,6*, *L3,6*, *L3,8*, *L4,10*) wurde eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Standardverfahren von (SAMBROOK et al. 1989) durchgeführt. Die Gesamtzellproteine wurden dazu elektrophoretisch in einem 10 %igen Trenngel aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes aufgetrennt. Für die Gel-

Elektrophorese wurde die Mini-Protean II[®]-Elektrophoreseapparatur sowie das Netzgerät Powerpack 200[®] (Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) verwendet. Zunächst wurden auf Nähragar kultivierte Einzelkolonien in 30 µl 4 x Laemmli-Puffer resuspendiert (LAEMMLI 1970). Nach Hitzedenaturierung der Proben (5 min bei 95 °C) folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 13000 x g. Von den im Überstand gelösten Proteinen wurden je Probe 5,5 µl auf das Gel aufgebracht. Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180 V.

Färbemethoden für Polyacrylamidgele

Zur Darstellung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde die Protein-Färbung mittels Coomassie[®]-Brillantblau G-250 vorgenommen. Die Färbung des Gels erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Anschließend wurde das Gel in vier Arbeitsschritten für jeweils 15 Minuten in Entfärbelösung (10 % HAC + Methanol) inkubiert, um ungebundene Farbpigmente zu entfernen. Die so gefärbten Proteinbestandteile waren als dunkelblaue Banden zu erkennen.

In den Übersichten A 1, A 2 (Anhang) sind die verwendeten Puffer und Reagenzien aufgeführt.

3.1.9.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Präparation der genomischen DNA

Die zu testenden Isolate (*L2,6*, *L3,6* und *L3,8*) wurden auf Festmedium (Nähragar) für 24 Stunden bei 28 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Resuspension einzelner Kolonien in 150 µl bidestilliertem Wasser in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Die DNA-Doppelstränge wurden 10 Minuten bei 94 °C im Vortemp 56 EVC (Martinsried) erhitzt und die Zellen durch Aufkochen lysiert. Nach Zentrifugation der Proben (5 min, 4 °C, 15.000 x g) wurden vom Überstand 5 µl direkt für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt.

PCR-Reaktionsbedingungen

Um eine genaue Spezieszuordnung der verschiedenen Isolate: *L2,6*, *L3,6* und *L3,8* zu ermöglichen, sollten zunächst die 16S rRNA-Sequenzen amplifiziert und anschließend mit computerbasierter DNA-Sequenzanalyse untereinander und mit bereits bestehenden Nukleotidsequenzen verglichen werden. Zur Amplifizierung der Gensequenzen wurden die PCR-

Reaktionsbedingungen folgendermaßen gewählt: Als Primer dienten die Standard-Universalprimer:

17f 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' und

1492rev 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

(VBC-Genomics, Wien, Austria). Diese ermöglichen die Verfielfältigung von 16S rRNA-Sequenzen gramnegativer Bakterien. Weiterhin wurde 1 U *Taq* DNA Polymerase, 3 µl genomischer DNA, 1 µM jedes Primers und 100 µM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat in einem Geneamp 2400[®] Thermocycler (Perkin Elmer Corp., Norwalk, USA) eingesetzt. Folgende Zyklus-Bedingungen wurden eingestellt: 80 s Denaturierung bei 94 °C, 80 s Extension bei 72 °C. Die Annealing Bedingungen für die Amplifikation wurden entsprechend des Guanin/Cytosin-Gehaltes der eingesetzten Oligonukleotide gewählt und lagen bei 53 °C und 40 Sekunden. Der Nachweis des Amplifikates erfolgte durch Elektrophorese in einem 1 %igen (w/v) Agarose-Gel und anschließende Färbung mit Ethidiumbromid. Die Reinigung des PCR-Produktes wurde mittels eines PCR Purification Kit[™] (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA) durchgeführt. Die Sequenzierung der PCR-Fragmente erfolgte unter Verwendung der Primer 27f und 1492rev.

Erhaltene Dienstleistungen: Genetischer Vergleich mittels 16S rRNA-Analyse

Der Vergleich der Nukleotid-Sequenzen erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von SANGER et al. (1977) und wurde mit dem LI-COR DNA sequencer model 4000[®] von der Firma VBC-Genomics (Wien, Österreich) durchgeführt. Die sequenzierten PCR-Produkte wurde schließlich mittels Datenbankanalysen unter Anwendung der Computersoftware Wisconsin Package version 8.1 UNIX[®] ermittelt.

3.1.9.3 Chemotaxonomische Untersuchungen: Analyse der Fettsäuren aus Bakterien

Die Bestimmung des Gesamtzellfettsäuremusters erfolgte nach der von MILLER und BERGER (1985) beschriebenen Methode.

Zunächst wurde durch die Anzucht der Reinkulturen auf TSBA (Trypticase Soy Broth Agar) Zellmasse gewonnen. Nach 24-stündiger Inkubation bei 28 °C wurde eine gehäufte Impföse (ca. 20 mg) Probenmaterial geerntet und in ein Duran-Röhrchen mit Schraubverschlußkappe und Teflonseptum (GL 14; Schott, Mainz) gegeben. Die Extraktion der Gesamtzellfettsäuren mit anschließender Veresterung wurde nach der von MOSS (1981) entwickelten und von MILLER (1982) und SASSER (1990) modifizierten Methode vorgenommen. Die Quanti-

fizierung und Identifizierung der Fettsäuremethylester erfolgte gaschromatographisch mit dem Modell HP 5890 A, Microbial Identification System (Hewlett-Packard, USA).

GC-Parameter:

Kapillarsäule:	Ultra 2 (crosslinked 5 % Phenylmethylsilikon, 25 m x 0,2 mm)
Splitverhältnis:	100:1
Säulentemperatur:	initial = 170 °C, 5°C/min; final = 270 °C, 2 min
Injektortemperatur:	250 °C
Detektortemperatur:	300 °C
Detektor:	FID
Septumspülung:	5 ml/min
Injektionsvolumen:	5 µl
Trägergas:	Wasserstoff

Die Tabelle 3 erfaßt die Chemikalien zur chemischen Aufbereitung und gaschromatographischen Analyse der Fettsäuren.

Tab. 3: Chemikalien der gaschromatischen Fettsäureanalyse

Substanz	Firma
Natriumhydroxid (p. A.)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 37 % (p. A.)	Merck, Darmstadt
Methanol (p. A.)	Merck, Darmstadt
n-Hexan (z. A.)	Merck, Darmstadt
tert. Butylmethylether (z. A.)	Merck, Darmstadt
H ₂ 5,0	Linde, Unterschleißheim
N ₂ 5,0	Linde, Unterschleißheim
synthetische Luft, KW-frei	Linde, Unterschleißheim

3.1.9.4 Qualitative physiologisch-biochemische Untersuchungen

Die biochemischen Stoffwechseleigenschaften der Reinkulturen wurden mittels standardisierter Testsysteme untersucht. Die optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, osmotische Empfindlichkeit (NaCl-Toleranz) wurden für die Limonen-abbauenden Batch-Kulturen ermittelt.

3.1.9.4.1 API 20 NE-Identifizierungssystem

Das standardisierte System (bioMerieux, Nürtingen) zur Identifizierung gramnegativer Stäbchen, die nicht zur Familie der Enterobacteriaceae gehören, wurde gemäß der Hersteller-

anleitung für die Isolate aus dem Biofilterversuch 1 und für die Limonen-abbauenden Isolate verwendet. Die Ablesung der Mikroröhrchen erfolgte nach 24- und 48-stündiger Inkubation bei 28 °C. Als Teststamm diente *P. aeruginosa*. Die getesteten Substrate sind in der Tabelle A 3 (Anhang) aufgeführt. Zur Auswertung wurde der Analytische Profilindex herangezogen (API SYSTEM 1992).

3.1.9.4.2 BBL CRYSTAL-Identifizierungssysteme

Hierbei wurden die Testsysteme zur Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen gramnegativen Stäbchen sowie zur Identifizierung grampositiver Bakterien (Becton Dickinson, Sparks) nach Anweisung des Herstellers verarbeitet. Die Testsubstrate und Verfahrensprinzipien sind in den Tabellen A 4 und A 5 (Anhang) enthalten. Die Ablesung der Panels erfolgte nach 20-stündiger Inkubationszeit bei 35 °C im Panel-Betrachter. *P. aeruginosa* (gramnegativ) und *Streptococcus agalactiae* (grampositiv) wurden als Kontrollstämme mitgeführt. Die Auswertung wurde anhand des Elektronischen Codebuches für das BBL CRYSTAL-Identifizierungssystem vorgenommen (BBL CRYSTAL 1998).

3.1.9.4.3 MicroLog-Testsystem

Das Automatisierte Mikrobielle Identifizierungssystem, BIOLOG Inc. (Hayward, CA, USA) wurde ursprünglich für die schnelle Identifizierung von Reinkulturen besonders klinisch relevanter Mikroorganismen auf der Basis ihres typischen Substratverwertungsspektrums entwickelt. (BOCHNER 1989 a, b, 1993).

Die biochemische Untersuchung der Limonen-abbauenden Isolate mit dem MicroLog 2-System erfolgte am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie. Getestet wurde die Oxidation von 95 Kohlenstoffquellen und das für jeden Mikroorganismus spezifische metabolische Muster mit einer Datenbank verglichen. Bei der Aufarbeitung der Proben wurde entsprechend der im MicroLog-Benutzerhandbuch enthaltenen Anwendungsvorschrift vorgegangen. (BIOLOG INC., 1993).

Bakterienmasse wurde von zuvor auf TSA (Tryptic Soy Agar) angereicherten, 24 Stunden bei 28 °C inkubierten Platten gewonnen. GN/GP-Inokulationsflüssigkeit wurde mit Kulturmaterial beimpft, homogenisiert und mit dem Turbidimeter entsprechend den Turbidity Standards auf eine Dichte von $OD_{590nm} = 0,286$ eingestellt. Die Inokulation der Bakteriensuspension erfolgte auf Biolog GN 2 Micro-Platten, die anschließend 24 Stunden

bei 30 °C inkubiert wurden. Diese Platten enthalten neben den in der Tabelle A 6 (Anhang) aufgeführten Substraten den Redoxfarbstoff Tetrazoliumviolett, der als Indikator dient und in oxidiertem Zustand farblos und in reduzierter Form eine Purpur-Färbung annimmt. Die Ablesung der Platten erfolgte mit dem MicroStationTM reader unter Nutzung der MicroLog 2 software. Die Angabe der Spezies-Identifikation erfolgte als similarity Index (Ähnlichkeits-Index), der für ein akzeptables Resultat nach 24-stündiger Inkubation mindestens 0,5 betragen sollte.

3.1.9.5 Durchführung weiterer physiologisch-biochemischer Untersuchungen

Katalase-Reaktion

Auf einem Objektträger wurde eine Bakterienkolonie mit einem Tropfen isotonischer Natriumchloridlösung homogenisiert und ein Tropfen Bactident Katalase Reagenz (Merck, Darmstadt) dazugegeben. Eine sofort eintretende Bläschenbildung zeigte eine positive Reaktion an (Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser). Als Referenzstämme dienten *Streptococcus agalactiae* (Katalase-negativ) und *P. fluorescens* (Katalase-positiv).

Cytochromoxidase-Reaktion

Zum Nachweis der Cytochromoxidase in Mikroorganismen wurde eine Bakterienkolonie auf die Reaktionszone des Bactident Oxidase-Teststäbchens (Merck, Darmstadt) aufgebracht und verrieben. Stellte sich innerhalb von 20-60 Sekunden eine Blaufärbung ein, wurde das als positives Ergebnis gewertet. Der Kontrolltest wurde mit *P. fluorescens* (Oxidase-positiv) und *E. coli* (Oxidase-negativ) durchgeführt.

SIM-Medium:

Dieses Testmedium (Merck, Darmstadt) wurde für die Prüfung auf Sulfidbildung, Indolbildung sowie Beweglichkeit (Abschnitt 3.1.9.1) verwendet. Der Nährboden wurde mit Reinkulturen im Stichverfahren beimpft und 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Die Ablesung erfolgte nach 24 und 48 Stunden. H₂S-Bildung zeigt sich durch Schwärzung im Wachstumsbereich. Anschließend wurde das Medium mit KOVACS-Indolreagenz (Merck, Darmstadt) überschichtet, wobei Indolbildung zu einer purpurroten Verfärbung der Reagenzschicht führt.

3.1.9.6 Untersuchung der optimalen Wachstumsbedingungen

Die Untersuchungen dienten zur Ermittlung des Temperatur- und pH-Optimums sowie der osmotischen Empfindlichkeit der Limonen-abbauenden Batch-Kulturen. Die Versuchsansätze (Dreifachansätze) wurden in gasdicht verschlossenen Erlenmeyerkolben mit 40 ml Mineralsalzmedium (pH 7,0), 4 ml Kulturflüssigkeit (spätlogarithmische Phase bei $OD_{550\text{ nm}} = 0,5$) sowie 0,5 g Limonen je Liter Medium vorgenommen. Das Wachstum der Batch-Kulturen wurde photometrisch durch Trübungsmessung bestimmt.

3.1.9.6.1 Bestimmung der Temperaturabhängigkeit des Wachstums

Das Wachstumsverhalten der Batch-Kulturen wurde in Abhängigkeit verschiedener Inkubationstemperaturen in einem Bereich von 6-42 °C bei einem pH-Wert von 7,0 untersucht. Die Bebrütung erfolgte in Kühlschränken, Brutschränken und auf temperierbaren Schüttelthermostaten mit nahezu konstanten Temperaturen. Aus den Wachstumskurven wurde die optimale Wachstumstemperatur der jeweiligen Batch-Kultur ermittelt.

3.1.9.6.2 Bestimmung der pH-Wert Abhängigkeit des Wachstums

Das Wachstum der Batch-Kulturen wurde im pH-Wert-Bereich von 4,0 und 8,0 bei einer Temperatur von 30 °C durch Trübungsmessung verfolgt. Die Einstellung der pH-Werte im Mineralsalzmedium erfolgte am MP 120 pH-Meter (Mettler Toledo, Steinbach) durch Zugabe von 0,1 normaler Salzsäure bzw. 0,1 normalem Natriumhydroxid. Der pH-Wert wurde während des gesamten Versuchszeitraumes kontrolliert und gegebenenfalls reguliert. Die Ermittlung der pH-Optima erfolgte aus den Wachstumskurven der Batch-Kulturen.

3.1.9.6.3 Bestimmung der osmotischen Empfindlichkeit (NaCl-Toleranz)

Der Einfluß von Natriumchlorid auf das Wachstum der Batch-Kulturen wurde bei Konzentrationen von 0-5%, w/v ermittelt. Nach Zugabe steigender Mengen Natriumchlorid wurden die Ansätze bei optimalen Temperatur- und pH-Bedingungen inkubiert. Die osmotische Empfindlichkeit entspricht der höchsten NaCl-Konzentration, bei der die Kulturen noch gewachsen sind.

3.2 Chemisch-analytische Untersuchungen

3.2.1 Gaschromatographische Analytik von Limonen

3.2.1.1 Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von Limonen im konventionellen Biofilter

Probennahme

Dreimal wöchentlich erfolgte die Entnahme gasförmiger Proben aus dem Roh- und Reingas des Biofilters. Dazu wurden 30 ml des zu untersuchenden Gases mittels Glasspritze durch ein mit Tenax TA gefülltes Adsorptionsröhrchen, CBR 150 (AMA, Hilden) gezogen und zur Sicherung der Probe in eine Rohrhülse mit Septenverschluß (AMA, Hilden) eingelegt.

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse

Die Kombination zweier Methoden, die Trennung und anschließende Identifizierung ist besonders bei der Analyse komplexer Gemische (z. B. Kompostierungsabluft) von Bedeutung, da selbst die Identität bereits bekannter Geruchsstoffe allein mit den Retentionsdaten aus der GC-Trennung nicht festgestellt werden kann (SCHOMBURG 1987).

Die zuvor auf Tenax angereicherten Proben wurden durch thermische Desorption mit anschließender Cryofokussierung auf eine mit Stickstoff gekühlten Vorsäule (Innendurchmesser 1mm) gegeben. Nach Zwischenfokussierung der von Tenax desorbierten Substanzen erfolgte eine splitlose Probenaufgabe auf die Trennkapillare des Gaschromatographen. Es wurden folgende Versuchsparameter gewählt.

Probenaufgabe/Thermische Desorption

Kapillar-Aufgabesystem:	KA-D, Purge-and Trap-System (AMA, Hilden)
Desorption:	Temperatur: 230 °C Zeit: 8 min Trägergas: Helium Desorptionsfluß: 12 ml Helium/min
Vorsäule:	
Adsorptionstemperatur:	-150 °C
Desorptionstemperatur:	250 °C
Desorptionszeit:	3 min
Füllung:	Thermotrap TA

Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Gaschromatograph:	HP 5890 II (Hewlett-Packard, USA)
Kapillarsäule:	Ultra 2 (crosslinked 5 % Phenylmethylsilikon, 50 m x 0,20 mm, Filmdicke: 0,33 µm)
Säulentemperatur:	45 °C, 4 min, 10 °C/min auf 230 °C 230 °C, 5 min
Splitverhältnis:	1:25
Detektor:	HP 5972 A (Hewlett-Packard, USA massenspektrometrischer Detektor Interfacetemperatur: 280 °C Scan-Verfahren
Trägergas:	Helium, 70 kPa Vordruck

Bei der quantitativen Auswertung des Limonen-Gehaltes wurden die integrierten Flächen unter den Peaks der Messungen mit denen analog behandelte Limonen-Eichproben verglichen und die Flächen als arithmetische Mittel von drei bis vier Probeaufgaben berechnet.

3.2.1.2 Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung von Limonen in Modellbiofiltern

Probennahme

Zur Bestimmung des Limonen-Gehaltes in Roh- und Reingas wurden zweimal wöchentlich Gasproben entnommen und anschließend quantitativ analysiert. Pro Meßstelle wurden 120 ml Luft mit einer DESAGA-Pumpe (Flußrate ca. 0,4 l/min) über ein Adsorberröhrchen (Original-Keramikröhrchen für Mikrowellenthermodesorber ACHROMA, Müllheim) gesaugt. Vor dem Probenröhrchen befand sich ein zur Partikelabscheidung mit silanisierter Glaswolle gefülltes Schutzröhrchen.

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse

Die Probenahmeröhrchen wurden thermisch desorbiert und mittels GC-MS die Peakflächen für Limonen bestimmt. Die analytischen Parameter sind nachfolgend aufgeführt.

Thermische Desorption

Thermodesorber:	Rektorik-Mikrowellenthermodesorber MW-1 (ACHROMA, Müllheim)
Desorption:	Energiestufe 7 Zeit: 30 s Trägergas: Helium 5,0 Desorptionsfluß: 15 ml/min
Interface zum GC:	190 °C

Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Gaschromatograph:	HP 5890 II (Hewlett-Packard, USA)
Kapillarsäule:	HP-5 MS (Polydimethylsiloxan mit 5 % Phenylsubstituenten 30 m x 0,25 mm, Filmdicke: 1 µm)
Säulentemperatur:	60 °C (4 min), 12 °C/min 280 °C, 10 min
Splitverhältnis:	1:25
Injektortemperatur:	280 °C
Detektor:	HP 5972 A (Hewlett-Packard, USA) massenspektrometrischer Detektor Interfacetemperatur: 280 °C Scan-Verfahren
Trärgas:	Helium, 70 kPa Vordruck

Die Analysenwerte der einzelnen Messungen wurden als Summe der integrierten Peakflächen für Limonen aus den Massenzahlen ($m/z = 93$ und $m/z = 68$) berechnet.

3.2.2 Bestimmung der Kinetik des Limonenabbaus

Der Ansatz der Proben wurde unter den in Abschnitt 3.1.2 aufgeführten Bedingungen vorgenommen. Die gaschromatographische Analyse von Limonen erfolgte in der organischen Phase durch Extraktion des Limonens mittels tertiärem Butylmethylether (tert. BME) aus dem Mineralsalzmedium. Dazu wurde der Kolbeninhalt in ein Teflon-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 ml tert. BME zugegeben. Mit je 2,5 ml tert. BME wurden die Kolbenwände zweimal nachgespült und der Inhalt ebenfalls in das Röhrchen gefüllt. Die beiden Phasen wurden mit dem Vortex (Genie 2TM, N.Y., USA) gut durchmischt und anschließend 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Mit einer Mikroliterspritze erfolgte die Entnahme von 2 µl aus der oberen organischen Phase (tert. BME und Limonen) und das Einspritzen der Probe auf den Säulenkopf des Gaschromatographen, der mit einem FID ausgestattet war.

Versuchsparameter für den GC:

Gaschromatograph:	HP 5890 A (Hewlett-Packard, USA)
Kapillarsäule:	HP-5 MS (crosslinked, 5 % Phenylmethylsilikon, 30 m x 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm)
Säulentemperatur:	max 250 °C
Initialzeit:	110 °C, 3 min
Temperaturprogramm:	20 °C/min auf 250 °C; 250 °C, 11 min
Injektortemperatur:	250 °C
Detektortemperatur:	260 °C, 68 °C
Detektor:	FID
Trärgas:	Wasserstoff
Injektionsvolumen:	2 µl

Die quantitative Bestimmung des Limonens erfolgte aus den integrierten Peakflächen des zu untersuchenden Geruchsstoffes als arithmetisches Mittel von drei bis vier Probeaufgaben. Durch Erstellen einer Eichkurve wurde der Limonengehalt der einzelnen Messungen in mg je Liter Mineralsalzmedium berechnet.

Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden sterile Kontrollproben mitgeführt.

3.2.3 Bestimmung der Metaboliten des Limonenabbaus

Die Probenvorbereitung erfolgte wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben. Durch die parallele Untersuchung steriler Kontrollproben (Mineralsalzmedium + Limonen) und Nullproben (Mineralsalzmedium + Batch-Kultur) sollte sichergestellt werden, daß das verwendete Limonen mit einer Reinheit > 95 % nur die typischen tolerierbaren chemischen Verunreinigungen enthält und der Limonenabbau nicht durch abiotische Faktoren beeinflusst wird. Die Degradation des Limonen wurde gaschromatographisch mittels Flammenionisationsdetektor verfolgt. Die in den Chromatogrammen enthaltenen Peaks wurden zunächst anhand bekannter Retentionszeiten für tert. BME und Limonen verglichen. Proben mit möglichen Metaboliten (α -Terpineol, 1,2-Diole, Perillylalkohol) wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und so bis zur Trockne eingeengt, anschließend in 5 μ l Hexan aufgelöst und davon 1-3 μ l gaschromatographisch-massenspektrometrisch (Abschnitt 3.2.1.2) untersucht.

3.2.4 Olfaktometrische Untersuchungen

3.2.4.1 Olfaktometrische Bestimmung von Limonen in Modellbiofiltern

Für diese Untersuchungen wurde ausschließlich das Verfahren zur Bestimmung der Geruchstoffkonzentration nach der VDI-RICHTLINIE, 3881/1-4 (1986) angewendet.

Probennahme

Die Probenentnahme für die olfaktometrischen Untersuchungen erfolgte zweimal wöchentlich mit dem Probennahmegerät (ECOMA, Mannebeck, Honigsee). Nach Bedienungsanleitung (MANNEBECK u. MANNEBECK 1998) wurden aus Melitta-Bratfolie Probebeutel gefertigt. Mit dem Probennehmer wurden mittels erzeugtem Unterdruck Gasproben aus dem Roh- und

Reingas beider Biofilter in die Probenbeutel gesaugt. Die Proben wurden spätestens zwei Stunden nach der Entnahme in einem geruchsneutralen Raum olfaktometrisch untersucht.

Bestimmung der Geruchsstoffkonzentration

Mit dem Olfaktometer TO7 (ECOMA, Mannebeck, Honigsee) wurden die Geruchsemissionen für Limonen aus dem Roh- und Reingas der Modellbiofilter quantifiziert und ausgewertet (MANNEBECK1993; MANNEBECK u. MANNEBECK 1999). Den Probanden wurde im unterschweligen Bereich mit steigenden Konzentrationen die zu untersuchende Probe zur Beurteilung angeboten. Nach dem ersten erkennbaren Geruchseindruck war die Geruchsschwelle erreicht worden. Im Ergebnisprotokoll wurden die Geruchsstoffkonzentration als Vielfaches der Geruchsschwellenkonzentration in Geruchseinheiten je m³ (GE/m³) sowie die Geruchspegel P_G (dB_G) und die statistischen Werte angegeben. Die Geruchsstoffkonzentration entspricht dabei der Verdünnung der zu untersuchenden Gasprobe bis zur Geruchsschwelle. Der Geruchsminderungsgrad η_G beschreibt als technischer Wirkungsgrad die Minderung des Emissionsgeruchsstoffstromes und wurde aus den Geruchsstoffkonzentrationen für Roh- und Reingas für beide Biofilter berechnet (VDI-RICHTLINIE, 3881/1-4 1986).

$$\eta_G = \frac{c_{G, \text{roh}} - c_{G, \text{rein}}}{c_{G, \text{roh}}}$$

η_G Geruchsminderungsgrad

$c_{G, \text{roh}}$ Geruchsstoffkonzentration im Rohgas

$c_{G, \text{rein}}$ Geruchsstoffkonzentration im Reingas

3.2.4.2 Olfaktorische Untersuchung zum Limonenabbau der Reinkulturen

Bei allen 44 zuvor isolierten Reinkulturen wurde der Limonenabbau in Batch-Kulturen olfaktorisch untersucht. Die Isolate wurden als Dreifachansätze in gasdicht verschlossenen Erlenmeyerkolben mit Mineralsalzmedium, Bakterienkultur und Limonen (0,5 g/l) bei 28 °C auf einem Schüttelthermostat inkubiert und der Limonenabbau über einen Zeitraum von bis zu 154 Stunden olfaktorisch verfolgt. Dazu wurde der olfaktorisch wahrnehmbare Limonengeruch zur Bewertung nach folgendem Schema herangezogen.

Limonengeruch:

- nicht feststellbar; + schwach; ++ mäßig; +++ stark;
+++ unbekannter intensiver Geruch

Die selektierten Isolate wurden in zwei weiteren Versuchen diesem Test unterzogen, um die Ergebnisse zu überprüfen.

3.2.5 Bestimmung des pH-Wertes

Batch-Kulturen

Der pH-Wert der Batch-Kulturen wurde durch direkte Messung im Medium mit dem MP 120 pH-Meter (Mettler Toledo, Urdorf) jeweils vor Versuchsbeginn, danach täglich bestimmt. Zur Eichung der Elektrode dienten standardisierte Pufferlösungen mit den pH-Werten 4,01 und 7,0 (Mettler Toledo, Urdorf).

Biofiltermaterial

Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte zweimal wöchentlich aus dem Filtermaterial verschiedener Filterbetthöhen beider Biofilter. Je 1 g Probenmaterial wurde in 100 ml Ringerlösung (Merck, Darmstadt) gegeben und 30 min bei 500 U/min mit einem Magnetstab gerührt. Der pH-Wert wurde danach direkt in der Probenlösung mit dem MP 120 pH-Meter (Mettler Toledo, Urdorf) gemessen.

3.2.6 Bestimmung der Trockensubstanz und der Materialfeuchte des Biofiltermaterials

Eine Probe von 1 g Filtermaterial (Feuchtgewicht) je Biofilter wurde bei einer Temperatur von 105 °C im Moisture Analyzer MA 30 (Sartorius, Göttingen) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der prozentuale Wassergehalt wurde aus dem vor und nach der Trocknung ermittelten Probengewichtes bestimmt.

$$TM \text{ (\%)} = \frac{\text{Gewicht der Probe vor Trocknung}}{\text{Gewicht nach Trocknung}} \times 100 \%$$

Die Materialfeuchte (MF) wurde anschließend aus der Differenz 100 % und dem Trockenmassegehalt TM in % berechnet.

$$MF \text{ (\%)} = 100 \% - TM \text{ (\%)}$$

Ebenso wurde das Filtermaterial Koks behandelt. Durch Bildung des arithmetischen Mittelwertes wurde die Materialfeuchte aus den Meßergebnissen beider Filterkomponenten ermittelt.

3.2.7 Bestimmung der Temperatur im Modellbiofilter

Die Messung der Temperatur erfolgte täglich in den vier verschiedenen Filterbetthöhen mit dem Präzisions-Meßgerät Testo 452. Hierfür wurde der Meßfühler direkt durch die Probenahmeöffnung bis zur Mitte der Biofiltersäule geschoben und die Temperatur gemessen. Durch Mittelwertbildung wurde die Durchschnittstemperatur je Biofilter ermittelt.

3.3 Biofilterversuche

Beide Versuchsanlagen entsprachen bezüglich der Eigenschaften dem Prinzip von Modellbiofiltern im technischen Einsatz. Durch diese im folgenden als Modellbiofilter bezeichneten Anlagen wurde kontinuierlich Luft von oben geleitet, die mit einer definierten Konzentration des Geruchstoffes Limonen beladen war (Rohluft). Nach Sorption und mikrobiellem Abbau des organischen Substrates im Filterbett verließ die gereinigte Luft als sogenanntes Reingas oder Reinluft die Biofilter.

3.3.1 Versuche mit einem konventionellen Biofilter

3.3.1.1 Aufbau und Betrieb

Der Modellbiofilter bestand aus einem Plexiglaszylinder, der bei einer Füllhöhe von ca. 2,0 Metern und einem Volumen von 66 Litern als Trägermaterial ein Gemisch aus 60 % Koks und 40 % Kompost enthielt. Mittels eines Kompressors wurde kontinuierlich ein Volumenstrom von anfangs 6 m³/h nach 80 Tagen 10 m³/h nach unten durch den Filter gesaugt. Mittels einer Präzisionsdosierpumpe M16 (Reichert, Heidelberg) wurde Limonen in Konzentrationen von zunächst 0,44 ml/h, nach 80 Tagen 0,88 ml/h über einen Teilluftstrom von 300 l/h dem Rohluftstrom zudosiert. Limonen wurde dabei durch Erhitzung mittels eines Heizschlauches in die Gasphase überführt. Die Befeuchtung des Filtermaterials wurde über eine Schlauchpumpe nach dem Kreislaufprinzip realisiert, wobei eine tägliche Erneuerung der verbrauchten Wassermenge von oben erfolgte. Der Limonengehalt in Roh- und Reingas wurde mehrmals wöchentlich bestimmt. Der Biofilter wurde über einen Zeitraum von insgesamt 121 Tagen betrieben.

3.3.2 Überführungsversuche parallel laufender Modellbiofilter

3.3.2.1 Aufbau und Betrieb

Die Anlage wurde nach HIPPCHEM (1985) in zwei Abschnitte untergliedert, in den Beschickungsteil und den Biofilterteil. Der Versuchsaufbau kann der Abbildung 3 entnommen werden.

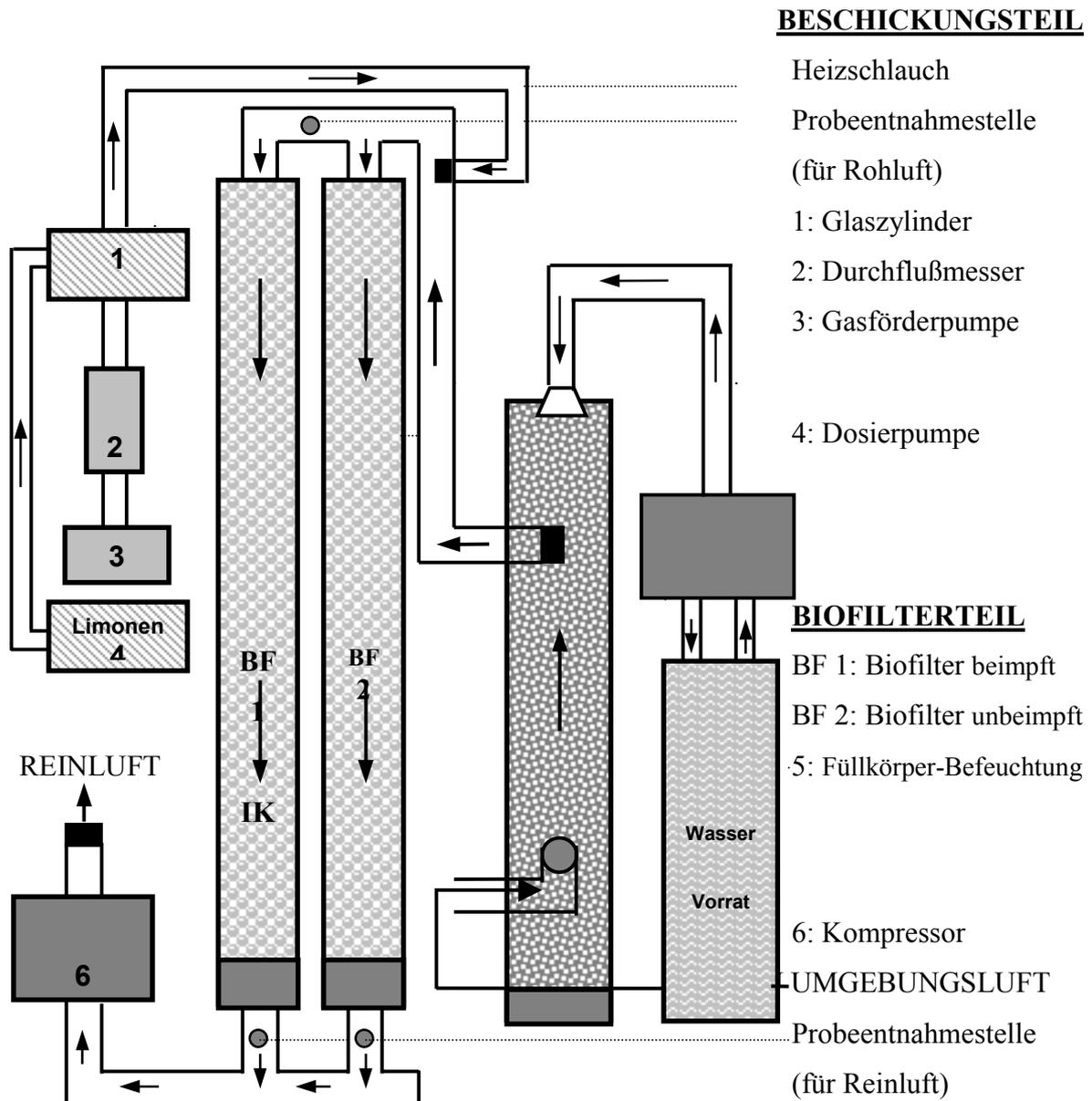


Abb. 3: Modellbiofilteranlage (schematisch)

Beschickungsenheit

Beide Biofilter wurden mit einem Volumenstrom von je 6 m³/h und einer Limonenkonzentration von 0,45 ml/h betrieben. Zuvor wurde das Limonen erhitzt und in den gasförmigen Zustand überführt. Mittels einer Präzisionsdosierpumpe M 16 (Reichert, Heidelberg) wurde das Limonen durch einen Teilluftstrom von 300 l/h unter Verwendung eines Heizschlauches dem Rohluftstrom zudosiert. Dieser kleinere Luftstrom wurde dabei mit einem Schwebekörperdurchflußmesser reguliert. Der konstant gehaltene Hauptluftstrom wurde mit Wasserdampf beschickt, der über eine Befeuchtungseinrichtung mit Füllkörpern bereitet wurde. Dadurch wurde ein Austrocknen des Filtermaterials sicher vermieden. Da die biochemischen Umsetzungen der Mikroorganismen nur in der wässrigen Phase stattfinden, ist ein optimaler Wassergehalt des Filtermaterials eine notwendige Voraussetzung für die Wirksamkeit eines Biofilters. Bei einem Wassergehalt im Filtermaterial von > 30 % ist die darin enthaltene Luft annähernd gesättigt. (BARDTKE et al. 1992).

Biofiltereinheit

Zwei Modellbiofilter im Technikumsmaßstab wurden aufgebaut. Sie bestanden aus Plexiglaszylindern, die mit einem Gemisch aus 60 % Koks (Ø 20-40 mm) und 40 % Kompost befüllt waren. Der Biofilter 1 wurde regelmäßig mit Inokulationskultur (IK) beimpft, dem Biofilter 2 dagegen Mineralsalzmedium zugeführt. Zur Entnahme von Gasproben waren entsprechende Öffnungen vor und nach der Biofiltereinheit angebracht und mit Gummistopfen verschlossen.

3.3.2.2 Versuchsparameter

Die verwendeten Versuchsparameter sind nachstehend zusammengefaßt.

Biofiltersäulen:	2 Plexiglaszylinder
Füllhöhe:	ca. 2,00 m
Füllvolumen:	ca. 66 Liter
Biofiltermaterial:	Koks-Kompost-Gemisch
Rohgasvolumenstrom:	6 m ³ /h
Teilluftstrom:	0,3 m ³ /h
Dosierung des Limonens :	0,44 ml/h
Umgebungstemperatur:	22-30 °C
Befeuchtung:	Füllkörper-Kolonne
Tägliche Wasserzugabe:	5-10 l
Betriebszeit:	150 Tage

3.3.2.3 Probennahme

Insgesamt 2 g Filtermaterial wurden mit in Alkohol abgeflamten Instrumenten (scharfer Löffel, Pinzette) aus den vier Probenahmeöffnungen eines Biofilters gewonnen. Für die Ansätze wurden je 1 g Probenmaterial ausgewogen, mit 100 ml Ringerlösung versetzt und 30 Minuten auf einem Magnetrührgerät (H+P Labortechnik, München) bei 500 U/min homogenisiert.

3.3.2.4 Überführung der Anreicherungskulturen in den Modellbiofilter

Zur Inokulation des Biofilters 1 wurden zweimal wöchentlich jeweils fünf Liter der Inokulationskultur mit einer Bakterienzellzahl von $2,0-6,0 \times 10^8$ mittels einer Schlauchpumpe bei einem Volumenstrom von 10 l/h über dem Biofilterbett verrieselt. Nach Passieren des Filterbettes wurde das Sickerwasser erneut zweimal auf die Biofiltersäule gegeben. Für Biofilter 2 wurde anstelle der Inokulationskultur Mineralsalzlösung verwendet.

3.3.2.5 Bestimmung des Wirkungsgrades

Die Wirksamkeit eines Biofilters kann unter anderem über den Wirkungsgrad beurteilt werden. Die Messungen sind allerdings erst nach einer angemessenen Betriebszeit des Biofilters vorzunehmen. Der Wirkungsgrad wird definiert als Differenz der Massenanteile des zu untersuchenden Geruchsstoffes vor und nach dem Filter bezogen auf den Massenanteil des Geruchsstoffes im Rohgas (VDI-RICHTLINIE 3477/ 1991). Der Wirkungsgrad entspricht also der prozentualen Verminderung der Abluftinhaltsstoffe (HIPPCHEN 1985). Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$\eta = \frac{c_{\text{roh}} - c_{\text{rein}}}{c_{\text{roh}}} \times 100 \%$$

3.4 Reagenzien und Chemikalien

Das für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendete Limonen wurde von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Alle anderen benötigten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht gesondert hervorgehoben, in den Reinheitsstufen „pro analysi“, „reinst“, „zur

Analyse“ oder „für die Mikrobiologie“ von den Firmen (Merck) Darmstadt sowie Riedel de Haën (Seelze) verwendet.

3.5 Mikroorganismen

Alle Limonen-abbauenden Bakterienstämme wurden aus natürlichen Umweltquellen gewonnen und angereichert. Die nachstehend in Klammern mit „DSM“ und Numerierung bezeichneten Bakterienstämme wurden aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig) des Stammsammlungs-Katalogs DSMZ (2000) bezogen. Alle anderen Referenzstämme wurden der Stammsammlung des Institutes für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig entnommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Betrieb eines konventionellen Modellbiofilters

Während eines Zeitraumes von 121 Tagen wurde ein Modellbiofilter betrieben, wobei diesem über den Zuluftstrom kontinuierlich Limonen zugeführt wurde. Ziel des Versuches war es, Erkenntnisse zur Phase der Adaptation und Anreicherung der zum Limonenabbau befähigten Mikroorganismen im Biofiltermaterial zu erhalten sowie Aussagen zum Abbaupotential unter den Bedingungen der Abluftbehandlung im Biofilter zu treffen, um daraus Möglichkeiten zu dessen Intensivierung für die folgenden Biofilterversuche abzuleiten.

4.1.1 Abbau von Limonen im konventionellen Modellbiofilter

Zur Beurteilung des Abbaupotentials des Biofilters wurde die Limonenkonzentration in Roh- und Reingas ein- bis zweimal wöchentlich gaschromatographisch bestimmt und der Wirkungsgrad errechnet. Die Tabelle A 7 (Anhang) zeigt die Ergebnisse der Roh- und Reingaskonzentration und die ermittelten Wirkungsgrade η in % während der Biofilterbetriebszeit. Nach einer langen Adaptationsphase von 81 Tagen konnten bei einem Luftvolumenstrom von $10 \text{ m}^3/\text{h}$ und einer Rohgaskonzentration von $121 \text{ mg}/\text{m}^3$ Biofilterwirkungsgrade zwischen 74,9 % am 82. Versuchstag und 94,4 % am 96. Versuchstag bei einer Rohgaskonzentration von $66,0 \text{ mg}/\text{m}^3$ ermittelt werden. Nach 111 Tagen arbeitete der Biofilter mit einem Wirkungsgrad von 80,4 % und pendelte sich bis zum Versuchsende auf Werte zwischen 72,5 und 82,1 % ein. Besonders in der Anfangsphase traten erhebliche Meßwertschwankungen auf, so daß die Methode der Probennahme (Verkleinerung des Probenahmevolumens) und gaschromatographischen Analytik (Temperaturprogramm des GC-MS) optimiert werden mußte.

In der Abbildung 4 sind die Roh- und Reingaskonzentrationen des Biofilters in Abhängigkeit von der Biofilterlaufzeit dargestellt.

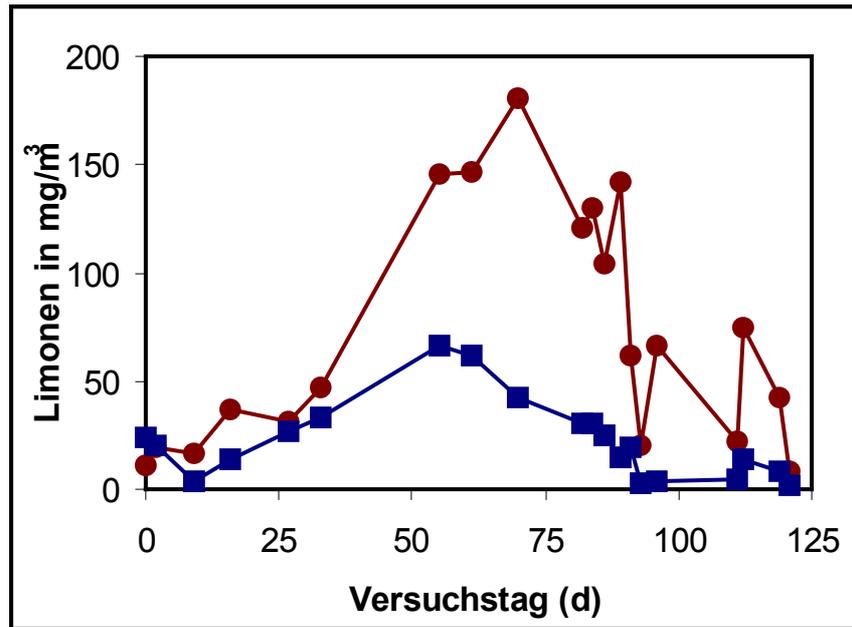


Abb. 4: Limonenkonzentrationen in ●.Roh- und ■.Reingas des Modellbiofilters 1, einschließlich einer 81-tägigen Adaptationsphase, in Abhängigkeit von der Biofilterlaufzeit in Tagen (d)

4.1.2 pH-Wert und Feuchtigkeit des Biofiltermaterials

Da die Wirksamkeit eines Biofilters über längere Zeit von entsprechenden Milieubedingungen im Filtermaterial abhängig ist, wurden die Feuchtigkeit des Filtermaterials und der pH-Wert mitbestimmt. Die Messung des pH-Wertes und der Feuchtigkeit erfolgte vor Inbetriebnahme und während der Betriebszeit des Biofilters. Der pH-Wert wurde aus dem wässrigen Eluat des Probenmaterials ermittelt. Durch die Bestimmung der Trockensubstanz einer definierten Probenmenge wurde die Materialfeuchte errechnet. Um eine Austrocknung des Biofilters durch den erwärmten Rohluftstrom zu verhindern, wurde dem Filtermaterial auf dem Weg über eine Befeuchtungseinrichtung regelmäßig Wasser zugeführt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Feuchtigkeit des Filtermaterials in % (w/w) und pH-Wert des mit Limonen betriebenen Modellbiofilters 1

	1. Versuchstag	82. Versuchstag	120. Versuchstag
Feuchtigkeit (% w/w)	40,5	44,2	42,5
pH-Wert	7,4	7,5	7,6

Insgesamt zeigten die Werte der Materialfeuchte (40,5-44,2 %, w/w) und des pH-Wertes im Filtermaterial (7,4-7,6), verglichen mit dem pH-Optimum von 5,5-8,0 (KNAUF 1998), nur unwesentliche Änderungen und begünstigten die Funktionsfähigkeit des Biofilters.

4.1.3 Aerobe Gesamtkeimzahl des Filtermaterials

Da in der Anpassungsphase der Mikroorganismen an den zugeleiteten Geruchsstoff Limonen neben Änderungen des Mikroorganismenspektrums ebenfalls Einflüsse auf die Keimzahlen der vorhandenen Populationen erwartet wurden (SOULAS 1982), erfolgten Untersuchungen zur mikrobiellen Besiedelung des Filtermaterials mit der Bestimmung der Keimzahl vor und während des Betriebes des Modellbiofilters mit Limonen. Probenmaterial wurde nach entsprechender Aufbereitung auf ein Komplexnährmedium überimpft, 48 h bei 28 °C bebrütet und die Lebendzellzahl durch direkte Zählung der koloniebildenden Einheiten (KBE) ermittelt.

Zur Berechnung der Lebendzellzahl der Mikroorganismen wurde die Formel nach SÜßMUTH et al. (1999) herangezogen (Abschnitt 3.1.5.2).

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

Tab. 5: Aerobe Keimzahl-Bestimmung in KBE/g Filtermaterial vor Inbetriebnahme und während der Betriebszeit des Biofilters mit Limonen einschließlich der 81-tägigen Adaptationszeit

Versuchstag	Lebendzellzahl in KBE/g Filtermaterial
	vor Inbetriebnahme
0	$5,2 \times 10^6$
	Adaptationsphase
40	$4,5 \times 10^5$
76	$7,0 \times 10^6$
	Ende der Adaptationsphase
82	$2,7 \times 10^8$
96	$4,9 \times 10^8$
121	$7,2 \times 10^8$

Vor Versuchsbeginn konnte aus dem Ausgangsfiltermaterial eine Lebendzellzahl von $5,2 \times 10^6$ KBE/g Filtermaterial ermittelt werden, die während der Einlaufphase des Modellbiofilters nach 40 Tagen auf $4,5 \times 10^5$ KBE/g Filtermaterial sank, allerdings am 76. Versuchstag

7,0 x 10⁶ KBE/g Filtermaterial erreichte und nach Ende der Anpassungsphase von 2,7 auf 7,2 x 10⁸ KBE/g Filtermaterial leicht anstieg.

4.1.4 Mikrobiologische Zusammensetzung des Biofiltermaterials

Hierzu wurden Proben vor Inbetriebnahme und während der Einlaufphase des Limonenbeschickten Modellbiofilters aus dem Filtermaterial entnommen und nach Überimpfen von Komplexnährmedium auf Selektivnährböden insgesamt 26 Isolate gewonnen.

Mittels morphologischer Kriterien, standardisierter biochemischer Tests (und API 20 NE-Testsystem) und chemotaxonomischer Methoden (MIS) wurden diese Isolate untersucht. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6: Qualitative Zusammensetzung der Bakterienflora (alphabetische Reihenfolge) vor Inbetriebnahme und während einer 40-tägigen Adaptationsphase des mit Limonen beschickten Modellbiofilters

Bakterienflora am 0. Versuchstag	Bakterienflora am 40. Versuchstag
<i>Achromobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Chromobacter</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Chryseomonas</i>
<i>Erwinia</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Salmonella</i>	<i>Serratia</i>
<i>Serratia</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Sphingomonas</i>	

Während der Anpassungsphase kam es zu einer Abnahme des Bakterienspektrums von 15 auf 11 Isolate und zu einer Selektion typischer Gattungen, wie *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Chryseomonas*, *Flavobacterium*, *Serratia* und *Shewanella*.

4.2 Gewinnung und Anreicherung Limonen-abbauender Mikroorganismen

Insgesamt wurden vier Mischkulturen über einen Zeitraum von 90 Tagen durch Wachstum auf Limonen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle angereichert. Als Inokulationsquellen dienten verschiedene Umweltproben, in denen Limonen natürlicherweise vorkommt. Damit konnten günstige Voraussetzungen für eine soziale Adaptation an den abzubauenen Geruchsstoff geschaffen werden. Auf Grund der Toxizität von Limonen erfolgte die Anreicherung nach dem fed-batch-Prinzip in einem Mineralsalzmedium. Die Limonenkonzentration lag anfangs bei 1 g/l und wurde nach den ersten Passagen in frisches Medium um die Hälfte auf 0,5 g/l reduziert. Die hohe Anfangskonzentration führte gezielt zu einem rasch ansteigenden Selektionsdruck innerhalb der Mikroorganismenpopulationen wobei durch deren besondere Eigenschaften und enzymatische Adaptation nur solche Mikroorganismen wachsen konnten, die Limonen bzw. dessen Metabolite verwerteten.

4.2.1 Lebendkeimzahl und pH-Wert der Anreicherungskulturen

Eine optimale Anreicherung der Kulturen ist nur zu erwarten, wenn günstige Milieubedingungen für die Mikroorganismen vorliegen.

Zur besseren Beurteilung des Wachstums und um eine mögliche qualitative Verschiebung der Populationen in den Batch-Kulturen erfassen zu können, wurde der pH-Wert regelmäßig bestimmt und gleichzeitig die Lebendkeimzahl ermittelt. Kurz nach der regelmäßigen Passage in frischem Mineralsalzmedium mit einem pH-Wert von 7,0 wurde ein Absinken des pH-Wertes auf 6,2-6,5 bei den Kulturen aus Kiefernzapfen,-nadeln und -rinde, Nadelwaldboden und Schalen aus Zitrusfrüchten festgestellt. Eine mitgeführte Kontrollprobe zeigte annähernd konstante pH-Werte von 6,8-7,0. Nach sechs Wochen Anreicherung dagegen pegelte sich der pH-Wert bei allen vier Mischkulturen auf Werte zwischen 6,4-6,6 bis zur erneuten Überimpfung ein. Die mikrobielle Umsetzung des Limonens führt möglicherweise zu einer Anhäufung von Stoffwechselprodukten, welche gleichzeitig eine Absenkung des pH-Wertes zur Folge haben kann.

Nach 10-tägiger Anreicherung konnten mit dem Spatelplattenverfahren Lebendkeimzahlen zwischen 3×10^8 und $1,5 \times 10^9$ KBE/ml ermittelt werden. Nach 20 Tagen sanken die Lebendkeimzahlen der Kulturen auf Werte zwischen $8,3 \times 10^7$ und $2,0 \times 10^8$ KBE/ml. Die Zugabe des Substrates Limonen führte offenbar zur Anpassung der Mikroorganismen durch Selektion der zum Abbau des Geruchsstoffes befähigten Mikroorganismenpopulationen. Nach

90-tägiger Anreicherung wurden Lebendkeimzahlen zwischen $1,2 \times 10^8$ und $3,2 \times 10^9$ KBE/ml ermittelt.

Die tägliche olfaktorische Kontrolle ergab weiterhin, daß Limonen in allen vier Kulturen wahrscheinlich ohne Akkumulation von geruchsintensiven Metaboliten abgebaut wurde.

4.2.2 Wachstum der Mikroorganismen auf verschiedenen Nährmedien

Um tatsächlich nur solche Bakterien zu erfassen, die in der Lage sind, Limonen als einzige Wachstums- und Energiequelle bzw. dessen Stoffwechselprodukte zu verwerten, wurde das Wachstum der Mikroorganismen zuerst auf verschiedenen Festmedien, wie Minimalmedium mit und ohne Zusatz von Mineralsalzen unter Zugabe von 0,1 ml Limonen, untersucht. Auf dem Agar-Agar-Minimalmedium ohne Mineralsalz wuchsen $1,5 \times 10^4$ KBE/ml Kultur, auf dem Minimalmedium mit Mineralsalzzusatz $7,3 \times 10^3$ KBE/ml Kultur. Alle Kolonien waren sehr klein, nahezu farblos und insgesamt nur bei sechsfacher Vergrößerung mit der Lupe zählbar. Nach wiederholter Überimpfung blieb das Wachstum teilweise ganz aus.

Es wurde auf die Verwendung von Komplexmedien übergegangen. Sehr geeignet erwiesen sich Nähragar wie auch CASO-Agar als hemmstoff- und indikatorfreie Universalnährböden zur Anzucht weniger anspruchsvoller Mikroorganismen. Nach Überimpfen mit Kulturflüssigkeit und Bebrütung dieser Medien unter Limonenatmosphäre wuchsen bereits nach 24 Stunden kleine, nach 48 Stunden mittelgroße gut zählbare morphologisch eindeutig abgegrenzte Kolonien. Es konnten Lebendkeimzahlen von bis zu $3,2 \times 10^9$ KBE/ml Kulturflüssigkeit gezählt werden.

Zur Isolierung von Reinkulturen, zur Gewinnung von Biomasse für weitere Versuche, ebenso für die Durchführung der physiologisch-biochemischen Untersuchungen und als Anzuchtmedium zum Anlegen von Stammkulturen wurden die Komplexmedien Nähragar und CASO-Agar durch Bebrütung unter Limonenatmosphäre verwendet.

4.2.3 Isolierung von Reinkulturen

Die Reinkulturen wurden aus den zuvor auf Limonen angereicherten vier Mischkulturen, die von unterschiedlichen natürlichen Umweltproben stammen, isoliert. Um möglichst alle aeroben Limonen-abbauenden Bakterien zu erfassen, wurde Komplexmedium sowie aus-

gewählte Selektivnährmedien verwendet. Die auf Nähragar und CASO-Agar isolierten Kolonien waren gut erkennbar, teilweise von sehr unterschiedlicher Größe, allerdings morphologisch schwer zu unterscheiden. Zur besseren Übersicht wurden daher alle Isolate gleichzeitig auf Komplexmedium (Nähragar) überimpft. Die hier gewachsenen Kolonien zeigten unterschiedlichste Merkmale in ihrer Zell- und Koloniemorphologie, wodurch sich die Isolate gut voneinander abgrenzen ließen.

Insgesamt konnten aus den vier Anreicherungskulturen 44 Isolate gewonnen werden. Von diesen zeigten 11 Reinkulturen ein positives, alle anderen ein negatives Gram-Verhalten.

Aus den Anreicherungskulturen ergaben die nachfolgend genannten Zahlen an Isolaten:

- Probe 1 (Gemisch aus Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde): **13 Isolate**
- Probe 2 (Nadelwaldboden): **7 Isolate**
- Probe 3 (Schalen von Zitrusfrüchten): **8 Isolate**
- Probe 4 (Bioabfall): **16 Isolate**

Zur weiteren Aufreinigung der isolierten Stämme wurden diese zweimal auf Nähragar überimpft. Für die anschließende Stammhaltung eignet sich die Überführung der Reinkulturen auf CASO-Schrägagar.

4.2.3.1 Abbau von Limonen durch Reinkulturen

Bei den aus angereicherten Mischkulturen isolierten 44 Reinkulturen kann nicht davon ausgegangen werden, daß alle Isolate in der Lage sind, Limonen zu mineralisieren. Da aber nur die Bakterien, die in den vorliegenden Untersuchungen nach olfaktorischer Kontrolle offenbar über komplette Abbauewege verfügen, für die Inokulation in den Biofilter interessant sind, wurde das Wachstum aller Reinkulturen auf Limonen in Batch-Kultur überprüft und olfaktorisch beurteilt. Für diese Versuche wurde eine Limonenkonzentration von 0,5 g/l je Probe eingesetzt und alle Ansätze bis maximal 154 Stunden auf einem Schüttelthermostat bei 28 °C bebrütet.

Von allen untersuchten Reinkulturen war nur bei insgesamt sechs Isolaten eine stetige Abnahme des Limonengeruches feststellbar (Tabellen A 8-11, Anhang). Bei Isolat *L4,10* konnte Limonen bereits nach 24 Stunden, bei den Isolaten *L1,2*, *L2,4*, *L2,6*, *L3,6* und *L3,8* nach 48 Stunden olfaktorisch nicht mehr wahrgenommen werden. Während des Wachstums auf Limonen zeigten diese Batch-Kulturen eine kontinuierliche Zunahme der Trübung. Kurz

nach Animpfung der Ansätze wurde eine kaum wahrnehmbare Trübung beobachtet, die sich über einen Versuchszeitraum von sechs Tagen zu einer kräftigen ockergelben Färbung entwickelte. Zur Absicherung der Untersuchungen wurden die Isolate wiederholt auf Limonenabbau geprüft und die Ergebnisse bestätigt. Einige der übrigen Reinkulturen konnten Limonen zugunsten anderer geruchsintensiver Verbindungen chemisch umwandeln, wodurch Geruchsnuancen von süßlich bis fruchtig oder auch scharf bis stechend entstanden. Auch bei diesen Isolaten wurde von weiteren Untersuchungen abgesehen.

Die nachstehenden Tabellen 7 und 8 zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Tab. 7: Olfaktorische Beurteilung des Limonenabbaus isolierter Bakterienstämme in Batch-Kulturen

Isolat	Olfaktorische Beurteilung des Limonengeruches der Batch-Kultur 1 (Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde)	Isolat	Olfaktorische Beurteilung des Limonengeruches der Batch-Kultur 4 (Bioabfall)
L1,1a	++	L4,1	++
L1,1b	++	L4,2	++
L1,2	-	L4,3	++
L1,4a	++	L4,4	++
L1,4b	++	L4,5	+++
L1,5	++	L4,6	++
L1,7	++	L4,7	++
L1,8	+++	L4,8	++
L1,9	+	L4,9	++
L1,10	++	L4,10	-
L1,11	++	L4,11	++
L1,12	++	L4,14	++
L1,13	+	L4,15	++
		L4,16a	++
		L4,16b	++

Inkubation: 28 °C, 120-154 Stunden

Limonengeruch:

- nicht feststellbar; + schwach; ++ mäßig; +++ stark;
- +++ unbekannter intensiver Geruch

Tab. 8: Olfaktorische Beurteilung des Limonenabbaus isolierter Bakterienstämme in Batch-Kulturen

Isolat	Olfaktorische Beurteilung des Limonengeruches der Batch-Kultur 2 (Nadelwaldboden)	Isolat	Olfaktorische Beurteilung des Limonengeruches der Batch-Kultur 3 (Schalen von Zitrusfrüchten)
L2,1a	++	L3,1	+
L2,1b	++	L3,2	++
L2,2	-	L3,3	+
L2,3	++	L3,4	++
L2,4	-	L3,5	+
L2,5	++	L3,6	-
L2,6	-	L3,7	+++
		L3,8	-

Inkubation: 28 °C, 120-154 Stunden

Limonengeruch:

- nicht feststellbar; + schwach; ++ mäßig; +++ stark;
- +++ unbekannter intensiver Geruch

Durch olfaktorische Beurteilung konnten sechs Bakterienstämme selektiert werden, die nach den olfaktorischen Ergebnissen geurteilt Limonen vollständig metabolisieren. Diese Reinkulturen wurden in weiteren Versuchen einer umfangreichen mikrobiologischen Untersuchung zur deren Identifizierung unterzogen, um eine taxonomische Einordnung dieser Stämme vornehmen zu können.

4.2.3.2 Kultivierung Limonen-abbauender Isolate

Für die Anzucht dieser wenig anspruchsvollen Reinkulturen, z. B. zur Gewinnung von Biomasse und für weitere mikrobiologische Untersuchungen, eignen sich besonders solche Komplexmedien wie: Nähragar und CASO-Agar.

Bei einer Bebrütungstemperatur von 28 °C und unter Limonenatmosphäre im Brutschrank (13 g/l) wachsen nach 24 Stunden kleine aber gut sichtbare, nach 48 Stunden mittelgroße bis große ockerfarbene Kolonien.

Das Anlegen einer Stammsammlung ist mit der Überführung der Stämme auf Nähragar und CASO-Schrägagar röhren problemlos möglich, wenn diese in Abständen von 2-3 Monaten überimpft werden. Nach Prüfung einer sehr langen Aufbewahrungsdauer von sechs Monaten und einer Temperatur von 6 °C zeigten die Isolate nach Überimpfung auf Platten mit Komplexmedium nur noch ein spärliches Anwachsen. Deshalb sind die Schrägagarkulturen bevorzugt bei 20 °C aufzubewahren (SÜBMUTH et al. 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Stammhaltung ist die Anfertigung von Gefrierkulturen unter Nutzung des Microbank™-Systems. Die Kryoröhren, ausgestattet mit einem Kryomedium und Keramikkügelchen sind durch deren einfache Handhabung besonders geeignet. Die Wiederanzucht auf Festmedium (Nähragar und CASO-Agar) gelang in jedem Fall problemlos.

Kultivierung Limonen-abbauender Batch-Kulturen

Zur Anreicherung größerer Mengen Inokulationskultur mit einer hohen Mikroorganismendichte zwecks Überführung in den Biofilter wurde ein Mineralsalzmedium nach Mitzkat entwickelt. Dort wurden Lebendkeimzahlkonzentrationen bis zu $6,0 \times 10^8$ KBE/ml erreicht. Die Zusammensetzung des Mineralsalzmediums ist der Tabelle 2 (Abschnitt 3.1.1) zu entnehmen.

4.3 Limonenabbau im Batch-Verfahren

Nach 90-tägiger Anreicherung wurden die gewonnenen Anreicherungskulturen hinsichtlich ihres Degradationsverhaltens für Limonen charakterisiert. Die gaschromatographische Bestimmung von Limonen mittels Flammenionisationsdetektor gelang in tertiärem Butylmethylether. Die Abbauraten wurden im Batch-Verfahren bestimmt. Die Wahl des Konzentrationsbereiches für Limonen erfolgte so, daß Konzentrationen, bei denen die Abbaurate maximal ist, ermittelt werden konnten. Zur weiteren Charakterisierung des Limonenabbaus wurden ebenfalls optische Dichte, Lebendkeimzahl der Bakterien und der pH-Wert mit erfaßt. Als Inokula dienten 2 ml gewaschenes Bakterienmaterial (spät-logarithmische Phase) bei eingestellter optischer Dichte von 0,5 (OD_{550nm}). Den Probenansätzen wurde Limonen in gaschromatographisch ermittelten Konzentrationen von 536,5-889,5 mg/l zugesetzt, wobei sich das Substrat hauptsächlich als Limonenfilm auf der Flüssigkeitsoberfläche befand und sich nur ein geringer Anteil in der wässrigen Phase löste.

4.3.1 Abbaukinetik der Batch-Kulturen unterschiedlicher Quellen

Zur quantitativen Bestimmung des Limonenabbaus der verschiedenen Batch-Kulturen wurde deren Abbaukinetik aufgenommen und eine Wachstumskurve erstellt. Die Anzucht erfolgte in Mineralsalzmedium mit einem pH-Wert von 6,9 und gaschromatographisch ermittelten Limonenkonzentrationen von 536,5-889,5 mg/l. Die Proben wurden bei 28 °C auf einem Schüttelthermostat bei 130 U/min bebrütet. Die Anreicherungskulturen wurden aus unterschiedlichen Umweltmaterialien gewonnen:

- Batch-Kultur 1: **Gemisch aus Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde,**
- Batch-Kultur 2: **Nadelwaldboden,**
- Batch-Kultur 3: **Schalen von Zitrusfrüchten,**
- Batch-Kultur 4: **Bioabfall.**

Die Abbildungen 5 und 6 sowie die Tabellen A 12 und A 13 (Anhang) zeigen den Limonenabbau durch die beschriebenen Batch-Kulturen im Vergleich zu einer Kontrollprobe ohne Inokulum aus den Abbaukinetik-Versuchen 1 und 2.

Nach einer Initialphase von 17 bis 29 Stunden wurde ein rascher Abbau des Limonens gaschromatographisch gemessen. Bereits nach 41 Stunden war Limonen in der aus Bioabfall gewonnenen Batch-Kultur bei einer Anfangskonzentration von 536,5 mg/l im Versuch 1 weder gaschromatographisch noch olfaktorisch nachweisbar. Nach 53 Stunden folgten die anderen Batch-Kulturen, die das Substrat nach Anfangskonzentrationen von 712,5-759,5 mg/l ebenfalls bis unter die Nachweisgrenze mineralisierten. Im zweiten Abbaukinetik-Versuch konnte bei den aus Zitrusfrüchten und Bioabfall gewonnenen Anreicherungskulturen bei anfangs ermittelten Substratkonzentrationen von 867-889,5 mg/l und einer Lag-Phase von 17 Stunden eine vollständige Degradation des Geruchsstoffes nach 59 Stunden gaschromatographisch analysiert werden. Nach Ausgangskonzentrationen des Limonens von 724-770 mg/l und einer Adaptationsphase von 10-18 Stunden erfolgte ebenfalls ein kontinuierlicher Geruchsstoffabbau durch die aus Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde sowie Nadelwaldboden angereicherten Batch-Kulturen. Allerdings blieben bei beiden Kulturen nach 45 Stunden Restkonzentrationen von 3,3-4,0 mg/l gaschromatographisch nachweisbar. Olfaktorisch war jedoch kein Limonen feststellbar. Die Limonenkonzentrationen zeigten in den parallel untersuchten Kontrollproben geringfügige Schwankungen, blieben ansonsten annähernd konstant. Umsetzungsreaktionen, die nicht auf die Aktivität der Mikroorganismen zurückzuführen sind, wurden somit ausgeschlossen.

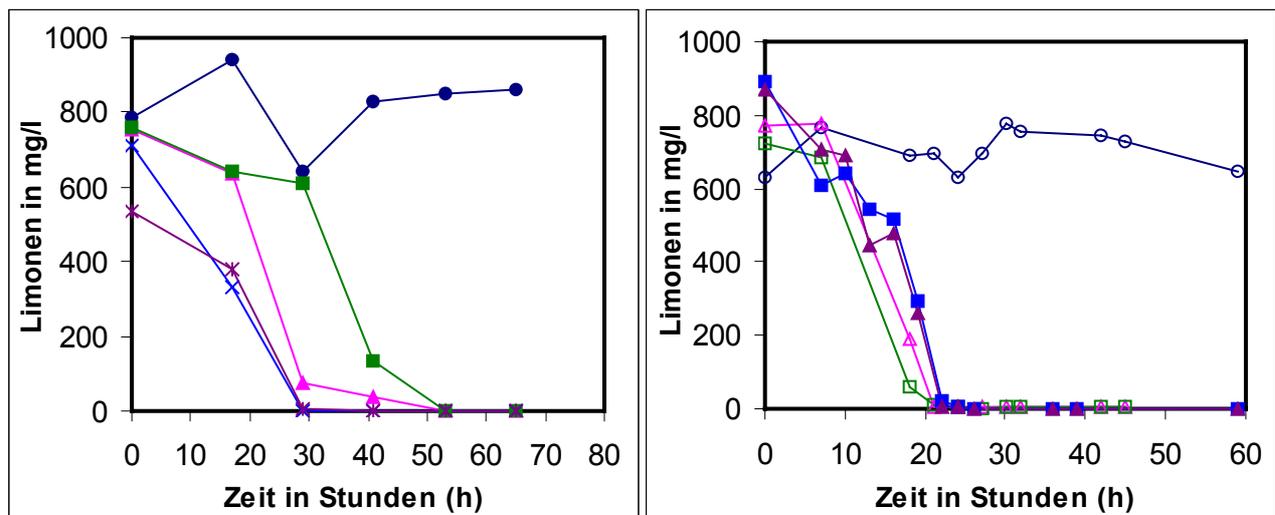


Abb. 5 und 6: Abbaukinetik von Limonen durch die Batch-Kulturen, **Versuch 1:** Limonenkonzentration in mg/l der Batch-Kulturen aus ▲... Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde; ■... Nadelwaldboden; ..x... Schalen von Zitrusfrüchten; ...*... Bioabfall; ●... Kontrollprobe ohne Inokulum; **Versuch 2:** Limonenkonzentration in mg/l der Batch-Kultur aus ▲... Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde; □... Nadelwaldboden; ■... Schalen von Zitrusfrüchten; ▲... Bioabfall; ○... Kontrollprobe ohne Inokulum

Die maximale Umsetzung des Limonens war nach einer Adaptationsphase von 18-29 Stunden (Versuch 1) bzw. 8-17 Stunden (Versuch 2) in der spätlogarithmischen Phase der Batch-Kulturen zu beobachten. Ein starkes Wachstum auf Limonen zeigte die aus Zitrusfrüchten gewonnene Batch-Kultur nach 41-44 Stunden mit optischen Dichten von 1,429-1,450 bei 550 nm. Nach Verbrauch des Substrates stagnierte das Wachstum der Bakterien wie erwartet durch den Übergang in die stationäre Phase nach 48 Stunden im ersten Versuch und nach 30 Stunden im zweiten Abbaukinetik-Versuch. Die verbleibenden Konzentrationen von 3,3-4,0 mg Limonen je Liter konnten durch die Bakterien nicht weiter mikrobiologisch umgesetzt werden. Möglicherweise war die vorhandene Bakterienkonzentration von $2,0 \times 10^8$ KBE/ml (Tab. A 14, Anhang) nicht mehr ausreichend, um Limonen vollständig zu degradieren. Eine optimale Sauerstoffversorgung war jedoch gewährleistet (Abschnitt 5.4).

Der Ausgangs-pH-Wert des Mineralsalzmediums von 6,9 sank mit den Kulturen in beiden Versuchen auf 6,3-6,6. Dieser pH-Wert Abfall ist sicher im Zusammenhang mit der Anhäufung von Stoffwechselprodukten während des Limonenabbaus zu sehen (Tab. A 12, A 14 Anhang).

Die Abbildungen 7 und 8 und die Tab. A 12, 14 (Anhang) zeigen das durch Trübungsmessung ermittelte Wachstum der Anreicherungskulturen in den Abbaukinetik-Versuchen 1 und 2.

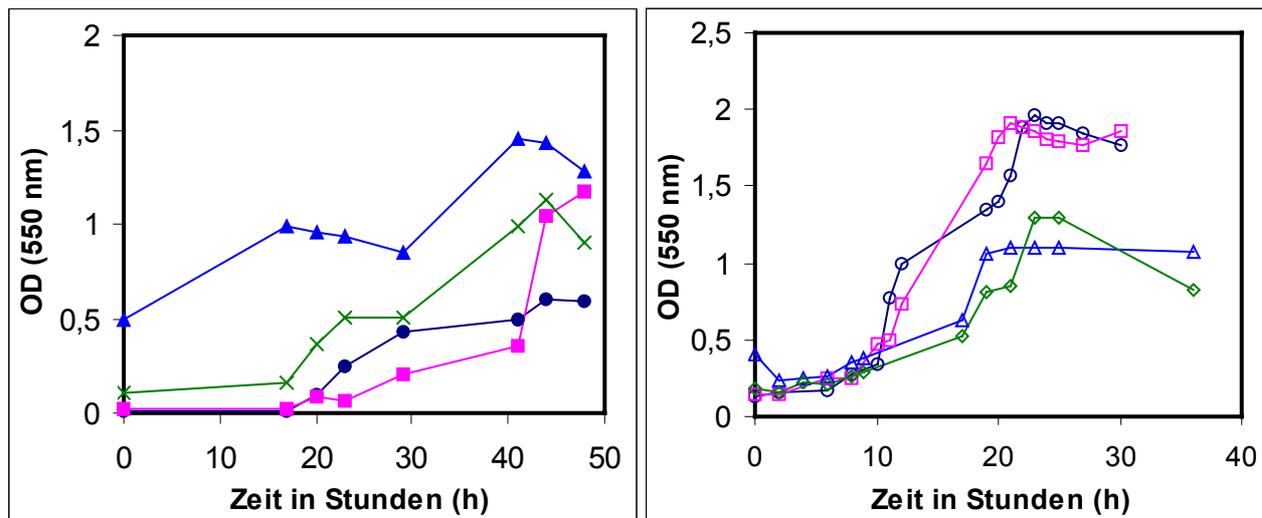


Abb. 7 und 8: Verlauf des Wachstums der Batch-Kulturen auf Limonen bei einer optische Dichte von 550 nm; **Versuch 1:** Batch-Kultur aus ●... Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde; ■... Nadelwaldboden; ▲... Schalen von Zitrusfrüchten; ..x... Bioabfall; **Versuch 2:** Batch-Kultur aus ○... Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde; □... Nadelwaldboden; ..△... Schalen von Zitrusfrüchten; ..◇... Bioabfall

Die unpezifischen maximalen Abbauraten der Kulturen wurden in Batch-Versuchen bestimmt und in der Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Ermittelte unpezifische maximale Abbauraten (v_u) der Batch-Kulturen bei gegebener Biomassekonzentration am Anfang (x_0)

Abbaurrate (v_u) in $\text{mg l}^{-1} \text{h}^{-1}$	Batch-Kultur 1 Fichtenzapfen....	Batch-Kultur 2 Nadelwaldboden	Batch-Kultur 3 Zitrusfrüchte	Batch-Kultur 4 Bioabfall
Versuch 1	46,7	39,6	27,5	30,9
Versuch 2	53,1	56,6	74,3	71,1
x, n =2	49,9	48,1	50,9	51,0

4.3.2 Einfluß der Substratkonzentration auf den Abbau von Limonen

Der Limonenabbau zweier ausgewählter Anreicherungskulturen wurde in Batch-Versuchen bestimmt. Die gaschromatographisch ermittelten Konzentrationsbereiche lagen zwischen 1250 und 4935 mg Limonen je Liter Mineralsalzmedium. Hohe Konzentrationen dieses Geruchsstoffes inhibieren den Abbauprozess der Mikroorganismen. Möglicherweise können Aussagen zum toxischen Bereich getroffen werden. Das Abbauverhalten der Batch-Kulturen wurde bei steigender Substratkonzentration gaschromatographisch untersucht. Weiterhin wurde der pH-Wert über den gesamten Versuchszeitraum mitbestimmt. Die Beurteilung des Wachstum wurde durch Trübungsmessung bei einer optischen Dichte von 600 nm vorgenommen. Die Probenvorbereitung ist im Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Die Abbildungen 9 und 10 sowie die Tabellen A 16-18 (Anhang) charakterisieren das Abbauverhalten der zum einen aus einem Gemisch von Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde angereicherten Batch-Kultur (Probe 1) zum anderen der aus Nadelwaldboden gewonnenen Anreicherungskultur (Probe 2) bei unterschiedlichen Limonenkonzentrationen. Parallel zur Untersuchung des Limonenabbaus wurde der Limonengehalt zweier steriler Kontrollproben gaschromatographisch bestimmt. Unter sterilen Bedingungen war keine Abnahme der Limonenkonzentration festzustellen, wie den Tabellen A 15, A 18 (Anhang) entnommen werden kann.

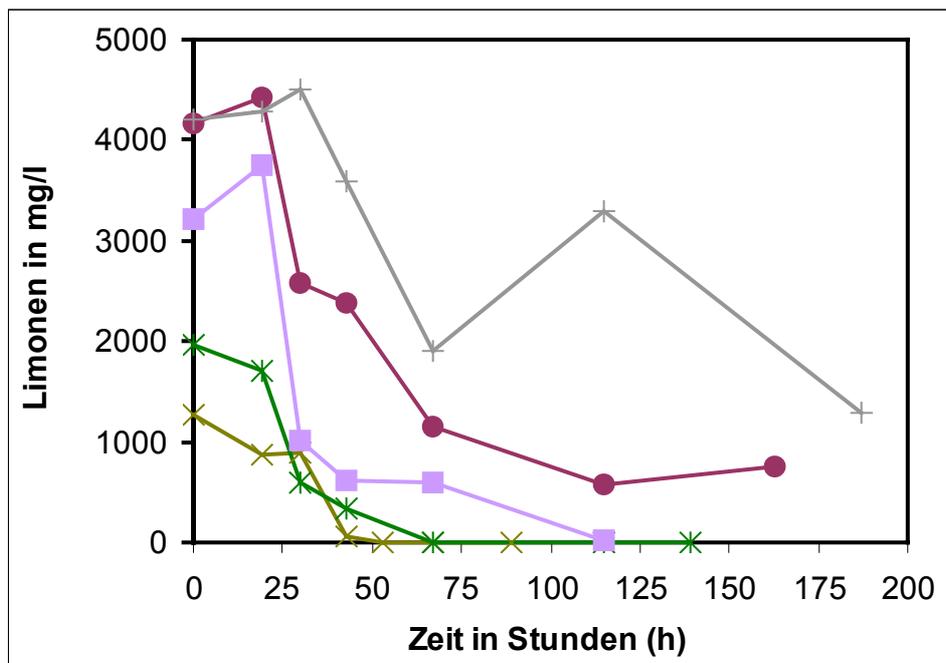


Abb. 9: Limonenabbau durch die Batch-Kultur 1 (**Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde**), Limonenkonzentration in mg/l bei Limonen-Anfangskonzentrationen von x.1275 mg/l; *.1957 mg/l; ■.3206 mg/l; ●.4164 mg/l; +.4202 mg/l;

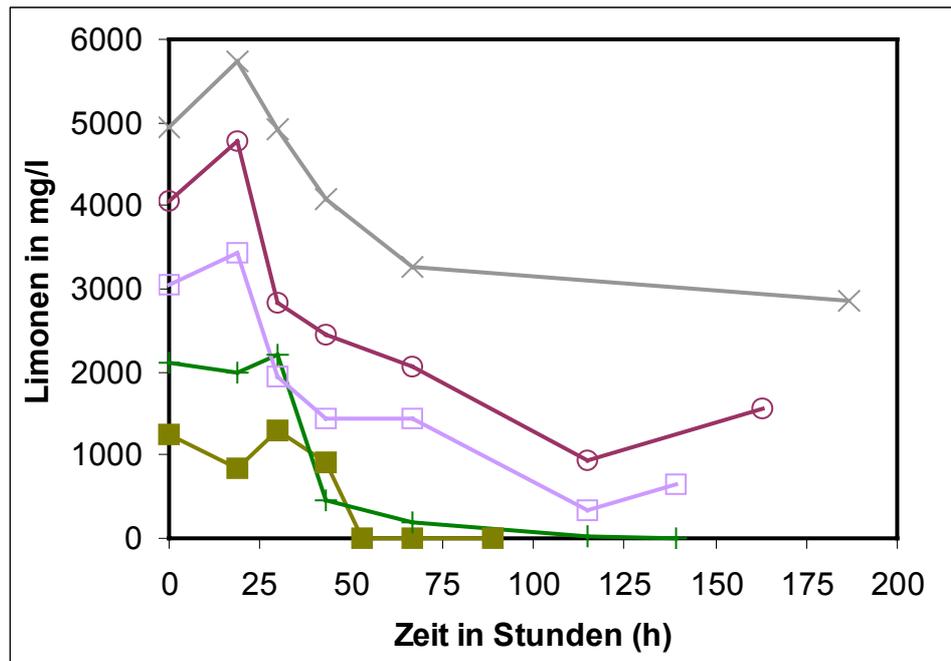


Abb. 10: Limonenabbau durch die Batch-Kultur 2 (**Nadelwaldboden**), Limonenkonzentration in mg/l bei Anfangskonzentrationen von ■.1250 mg/l; +.2106 mg/l; □.3045 mg/l; ○.4062 mg/l; ×.4935 mg/l

Substratkonzentration von **1250-2106 mg Limonen je Liter** Mineralsalzmedium führten nach 53-115 Stunden bei einer Adaptationsphase von 17 bis 29 Stunden bei beiden Kulturen zu einer vollständigen Mineralisierung des Limonens. Die aus Nadelwaldboden angereicherte Kultur wies nach 139 Stunden einen Limonengehalt von 9,5 mg/l auf, was einem Limonenabbau von 99,5 % entspricht. Limonengeruch konnte nicht festgestellt werden.

Limonenkonzentrationen **3045-3206 mg/l** wurden von den Batch-Kulturen zu 84-90 % abgebaut.

Die mikrobielle Umwandlung von Limonen durch die Bakterien wurde dagegen bei Anfangskonzentrationen von **4062-4935 mg/l** stark inhibiert, wobei der Geruchsstoffabbau sich hier nur in einem Bereich zwischen 40 bis maximal 80 % bewegte, was als antimikrobielle Wirkung des Limonens in diesen Konzentrationsbereichen zu deuten ist.

Insgesamt führten Substratkonzentrationen von 1250-3206 mg/l zu einer Stimulierung der Degradation durch die aus Fichtenzapfen -nadeln und -rinde stammenden Bakterienkultur, während bei einem Limonengehalt von 4161 mg/l eine Substratsättigung eintrat und eine Hemmung der mikrobiellen Umsetzung des Substrates folgte. Bei der aus Nadelwaldboden angereicherten Kultur zeigten Limonenkonzentrationen > 4042 mg/l eine Inhibierung des Limonenabbaus.

Die Untersuchungen zur Ermittlung der unspezifischen Abbauraten der Batch-Kulturen ergaben bei gaschromatographisch gemessenen Limonenkonzentrationen der Batch-Kultur 1 von 3206 mg/l eine maximale Abbaurate von 248,3 mg l⁻¹h⁻¹, bei einer Limonenkonzentration von 4062 mg/l der Batch-Kultur 2 eine maximale Abbaurate von 176,4 mg l⁻¹h⁻¹.

Die Abbildung 11 enthält die unspezifischen maximalen Abbauraten der Batch-Kulturen.

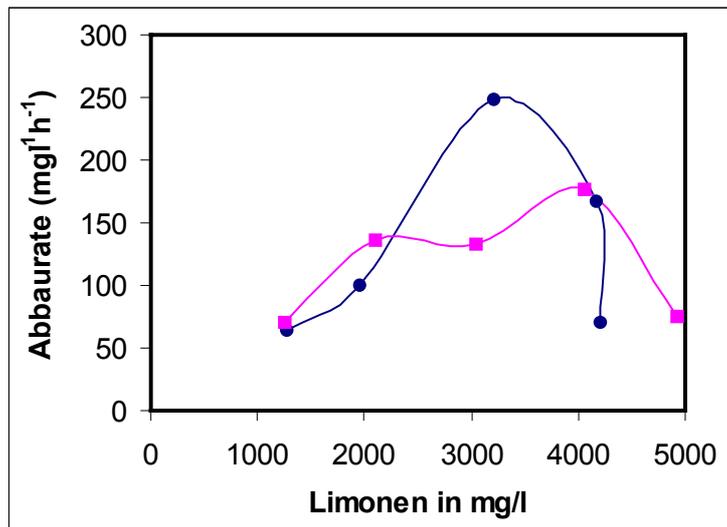


Abb. 11: Ermittelte unspezifische maximale Abbauraten (v_u) bei unterschiedlichen Limonen-Anfangskonzentrationen der Batch-Kulturen bei gegebener Biomassedichte am Anfang (x_0) in mg l⁻¹h⁻¹; ..●. Kultur 1 (Fichtenzapfen); ..■. Kultur 2 (Nadelwaldboden)

Die Abbildungen 12 und 13 sowie die Tabellen A 19-22 (Anhang) zeigen das durch Trübungsmessung ermittelte Wachstum der Mikroorganismen bei Substratkonzentrationen des Limonens von 1250 bis 4935 mg/l.

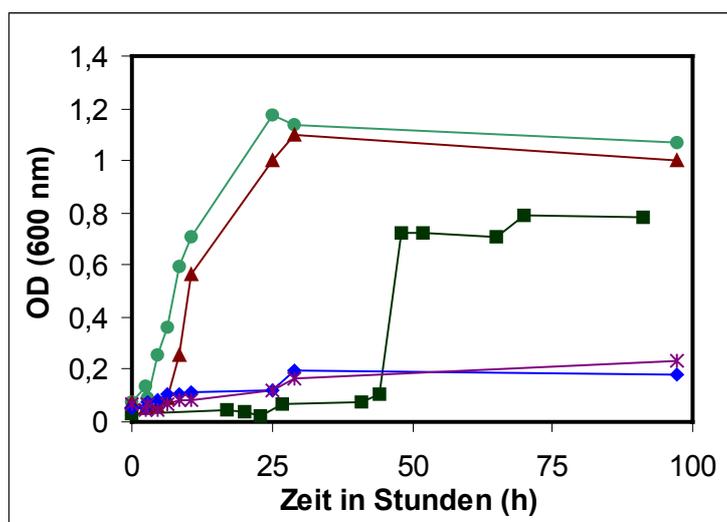


Abb. 12: Verlauf des Wachstums der Batch-Kultur 1 (**Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde**) bei einer OD von 600 nm und unterschiedlichen Limonen-Anfangskonzentrationen im Mineralsalzmedium von: ■.1275 mg/l; ●.1957 mg/l; ▲.3206 mg/l; ◆.4164 mg/l; *.4202 mg/l

Die Dosierung von 1250 bis zu 2106 mg Limonen je Liter Mineralsalzmedium ergab ein deutliches Wachstum der Mikroorganismen in der Exponentialphase beider Batch-Kulturen. Durch gaschromatographische Analyse wurde in dieser Zeit der effektivste Limonenumsatz ermittelt. Bei letztgenannter Konzentration war allerdings schon eine Verzögerung der Lag-Phase erkennbar. Die stationäre Wachstumsphase wurde nach 30 bis 48 Stunden erreicht. Bei Limonenzugaben von 3045 bis 4935 mg/l zeigte sich ein stark verzögertes bzw. stagnierendes Wachstum der Bakterien in den Anreicherungskulturen. Diese Wachstumskurven bestätigen die Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchungen, bei denen ein mittlerer Limonenabbau von 40 bis 60 % festgestellt wurde.

Während der Durchführung einfacher Wachstumstests auf Komplexmedium (Nähragar) konnte kurze Zeit nach dem Versuchsansatz mit zunehmender Limonenkonzentration eine Abnahme der Lebendkeimzahlen im Versuchszeitraum beobachtet werden (Tabellen A 20-22, Anhang).

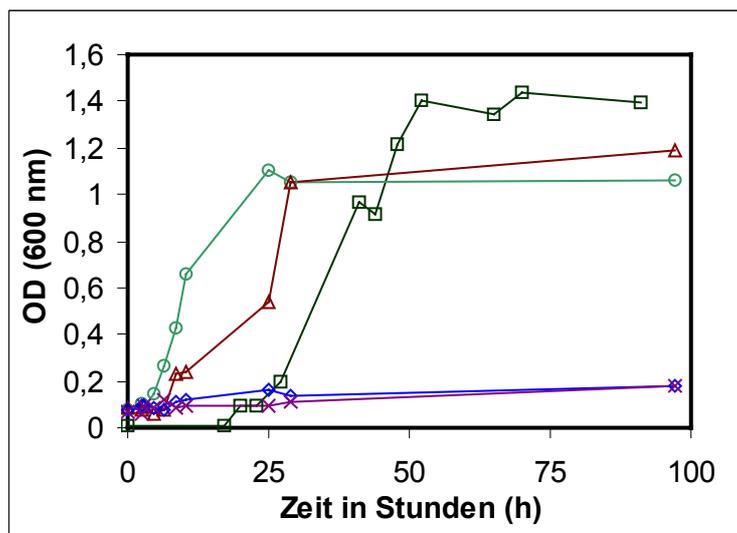


Abb. 13: Verlauf des Wachstums der Batch-Kultur 2 (**Nadelwaldboden**) bei einer OD von 600 nm und unterschiedlichen Limonen-Anfangskonzentrationen im Mineralsalzmedium von: □...1250 mg/l; ○...2106 mg/l; △...3045 mg/l; ◇...4062 mg/l; *...4935 mg/l

Der Limonenabbau ging bei beiden Proben mit einer pH-Wert-Erniedrigung von 6,9 auf 6,1 einher, wobei dieser Abfall verstärkt in höheren Konzentrationsbereichen auftrat (Tab. A 20-22, Anhang). Die Kontrollproben zeigten dagegen keine nennenswerten pH-Wert Veränderungen (Tab. A 19, Anhang).

Diese Versuche zeigten, daß das Limonen in Konzentrationen $> 4062 \text{ mg/l}$ zu einem stark verzögerten Abbau der untersuchten Batch-Kulturen führt. Diese Hemmung der Aktivität der Mikroorganismen kann Folge des verminderten Zutritts von Sauerstoff ins Kulturmedium oder der Toxizität der Abbauprodukte des Limonens sein.

Hinsichtlich des Einflusses der Substratkonzentration auf das Abbauverhalten der Batch-Kulturen konnten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Limonenabbau lassen eine ähnliche mikrobiologische Zusammensetzung trotz unterschiedlicher Ausgangsmaterialien der vier Batch-Kulturen erwarten.

4.3.3 Metabolite des Limonenabbaus

Als ergänzende Untersuchungen zum Limonenabbau wurde eine qualitative und quantitative Bestimmung der Metabolite im Verlauf der Degradation des Limonens vorgenommen. Dabei sollten allerdings nur solche leicht flüchtigen Komponenten berücksichtigt werden, die durch eigene Geruchsintensität auffallen. Der Nachweis möglicher niedermolekularer Substanzen aus dem Limonen-Stoffwechsel erfolgte in tertiärem Butylmethylether zunächst mit dem Gaschromatographen unter Verwendung eines Flammenionisationsdetektors. Zusätzlich wurden die Proben am Gaschromatographen, der mit einem Massenspektrometer gekoppelt war, untersucht. Da alle vier Batch-Kulturen ein sehr ähnliches Abbauverhalten für Limonen aufwiesen, wurde nur die aus Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde angereicherte Kultur für diesen Versuch herangezogen. Hierzu wurde Mineralsalzmedium mit einem pH-Wert von 6,9 mit Kulturflüssigkeit aus einer über längere Zeit an Limonen adaptierten Vorkultur beimpft und Limonen in einer Konzentration von 500 mg/l zugeführt. Parallel dazu erfolgte der Ansatz von Kontrollproben (Mineralsalzmedium und Limonen) sowie Nullproben (Mineralsalzmedium und Batch-Kultur). Alle Proben wurden bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Schüttelthermostat inkubiert. Die Abbildung 14 zeigt das am GC erstellte Chromatogramm der Batch-Kultur nach einer Inkubation von 66 Stunden.

Nach einer Retentionszeit von rund einer Minute befand sich das für die Analyse verwendete tertiäre Butylmethylether durch den größten Ausschlag im erwarteten Rahmen. Der prozentuale Anteil lag bei $99,9 \%$ aller flächenmäßig erfaßten Peaks. Diesem folgte das Limonen nach einer Retentionszeit von $2,240 \text{ Minuten}$ mit einem sehr kleinen Peak und einem prozentualen Anteil von $0,00025 \%$. Das entspricht einem Limonengehalt von $1,04 \text{ mg/l}$. Die Ausgangskonzentration lag bei 500 mg/l .

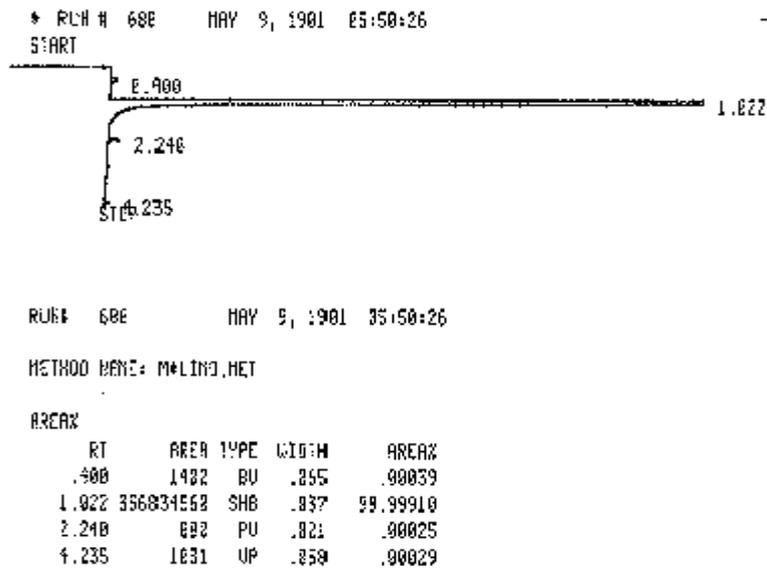


Abb. 14: Chromatogramm der aus Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde gewonnenen Batch-Kultur, nach 66-stündiger Degradation; Retentionszeit: 1,022 min tert. Butylmethylether; Retentionszeit: 2,240 min Limonen

Durch parallel untersuchte Kontrollproben und Nullproben wurde sichergestellt, daß der Limonenabbau in der Batch-Kultur nicht durch andere als durch die üblicherweise im Limonen zu tolerierenden chemischen Verunreinigungen beeinflusst wurde, und eine abiotische Umsetzung des Limonens ausgeschlossen werden konnte. In der Abbildung 15 ist das Chromatogramm des Gaschromatographen, ausgestattet mit einem FID, aus einer Kontrollprobe dargestellt. Im Vergleich dazu zeigt die Abbildung 16 das Total-Ionen-Chromatogramm für Limonen des Gaschromatographen mit MS-Kopplung. In der Abbildung 17 ist das typische Massenspektrum dieses Geruchsstoffes enthalten.

Weitere der im Total-Ionen-Chromatogramm vorhandenen Peaks bezeichnen einen prozentualen Anteil von rund 5 % organischer Verbindungen, die in dem industriell hergestellten Limonen zur Synthese (MERCK) enthalten sind.



Abb. 15: Chromatogramm einer Kontrollprobe (Mineralsalzmedium und Limonen) nach 18-stündiger Inkubation, 1)...tert. Butylmethylether (Retentionszeit: 1.043 min); 2)... Limonen bei einer Konzentration von 500 mg/l, (Retentionszeit: 2.330 min)

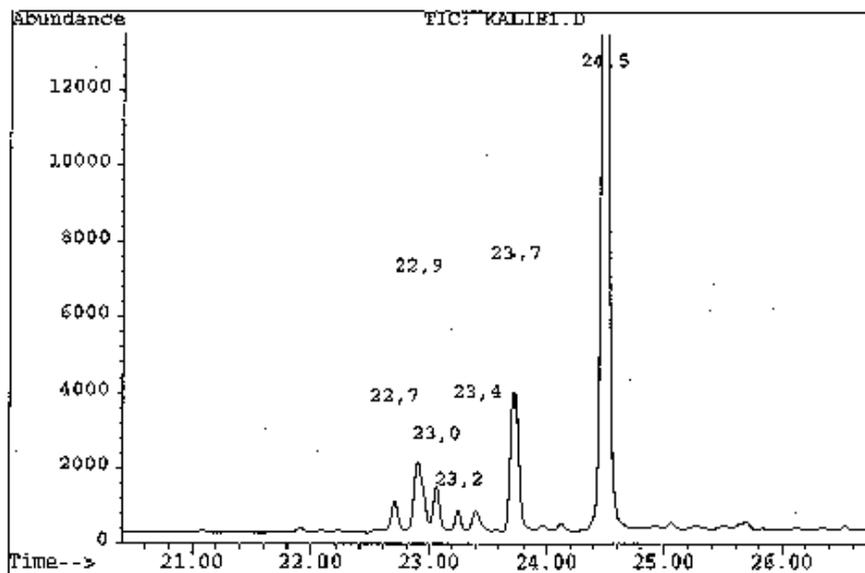


Abb. 16: Total-Ionen-Chromatogramm (TIC) für Limonen, Reinheit > 95 % und andere enthaltene organische Verbindungen nach ermittelten Retentionszeiten:

- 24,5 min Limonen
- 23,0 min 1,3-Cyclohexadien,1,2,6,6-tetramethyl
- 23,7 min 1,4-Cyclohexadien,3,3,6,6-tetramethyl
- 23,4 min 1,3-Cyclohexadien,1,5,5,6-tetramethyl
- 22,9 min β -Myrcen
- 22,7 min Camphen
- 23,2 min 1,3-Cyclohexadien,1,3,5,5-tetramethyl

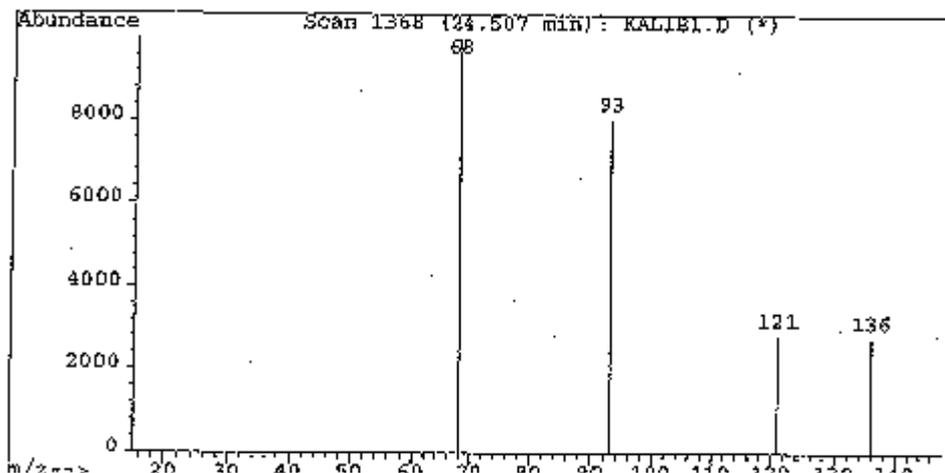


Abb. 17: Massenspektrum für Limonen

Metabolite, die auf andere flüchtige organische Intermediärverbindungen (Geruchsstoffe) hindeuten könnten, waren gaschromatographisch weder mit dem Flammenionisationsdetektor noch am Gaschromatographen mit MS-Kopplung nachweisbar, was auf eine vollständige Oxidation des Geruchsstoffes zu Kohlendioxid und Wasser hinweist. Die Proben hinterließen hinsichtlich ihrer Geruchsnote einen neutralen Eindruck.

4.4 Taxonomische Einordnung der Limonen-abbauenden Isolate

Während vorangegangener Versuche gelang es, aus den vier angereicherten Batch-Kulturen unterschiedlicher Umweltmaterialien sechs Bakterienstämme zu isolieren, die in der Lage sind, Limonen ohne Akkumulation geruchsintensiver Intermediärverbindungen zu metabolisieren. Für die taxonomische Einordnung wurden die Zell- und Koloniemorphologie beschrieben sowie molekularbiologische, chemotaxonomische und physiologisch-biochemische Untersuchungen vorgenommen.

4.4.1 Zell- und Koloniemorphologie

Ausgewählte 24-48 Stunden alte Kolonien der Isolate wurden auf festem Nährboden makroskopisch betrachtet und mikroskopisch die Einzelzellen mit dem Phasenkontrastmikroskop sowie die Gram-Färbungen beurteilt. In den Tabellen 10 und 11 sind die charakteristischen morphologischen Merkmale der sechs Isolate zusammengefasst.

Tab. 10: Makroskopische Beurteilung der Isolate nach 24 bis 48-stündiger Inkubation bei 28 °C anhand ihrer Koloniemorphologie

Makroskopische Beurteilung						
Isolat	L1,2	L2,4	L2,6	L3,6	L3,8	L4,10
Kolonie						
Ø (mm)						
nach:						
(24 h)	0,2-0,7	0,2-0,7	0,1-0,3	0,8-1,1	0,6-1,1	0,5-1,1
(48 h)	0,8-1,5	1,0-2,0	0,7-1,0	1,1-2,2	0,7-1,8	0,9-1,9
Gestalt						
Farbe	ocker/ hellbraun	ocker/ hellbraun	beige/ gelbbraun	ocker/ hellbraun	ocker/ hellbraun	ocker/ hellbraun
Oberfläche	glatt, glänzend, opak					
Form	rund, flach					
Rand	glatter Rand					

Tab. 11: Mikroskopische Beurteilung der Isolate nach 24 bis 48-stündiger Inkubation bei 28 °C anhand ihrer Zellmorphologie

Mikroskopische Beurteilung						
Isolat	L1,2	L2,4	L2,6	L3,6	L3,8	L4,10
Einzelzelle						
Größe (µm)						
Breite	0,3-0,6	0,3-0,6	0,3-0,5	0,2-0,5	0,2-0,5	0,3-0,5
Länge	0,8-1,0	0,8-1,0	0,8-1,1	0,6-1,1	0,6-1,1	0,6-1,1
Form						
kurze Stäbchen gerade, leicht gekrümmt						
beweglich						
Nativpräparat:	ja	ja	nein	ja	ja	ja
SIM-Medium:	ja	ja	nein	ja	ja	ja
Gram-Färbung						
gramnegativ						
L-Alanin-Amino-peptidase:						
gelb positiv = gramnegativ	positiv gramnegativ					

Verhalten gegenüber Sauerstoff

Bakterien zeigen ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Sauerstoff, worauf deren Einteilung in strikt aerobe, fakultativ anaerobe, mikroaerophile und strikt anaerobe Mikroorganismen beruht.

Die Bakterienisolate wurden auf das Vorhandensein der Enzyme Katalase und Cytochromoxidase getestet.

Katalase-Reaktion

Das Enzym ist an der Zersetzung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu Sauerstoff und Wasser beteiligt. Der von der Bakterienzelle aufgenommene Sauerstoff wird zu Peroxidradikalen, Radikalanionen und H₂O₂ metabolisiert. Durch die Anwesenheit der Katalase können diese toxischen Umsetzungsprodukte entgiftet werden. Eine katalasepositive Reaktion wird durch sofort einsetzende Bläschenbildung angezeigt.

Cytochromoxidase-Reaktion

Die Cytochromoxidase als Enzym der Eisenporphyringruppe bildet den terminalen Komplex der Atmungskette, der mit Sauerstoff reagiert. Bei positiven Organismen färbt sich die Reaktionszone blau bis blauviolett. Der Tabelle 12 sind die Testergebnisse zu entnehmen.

Tab. 12: Prüfung der Bakterienisolate sowie der Referenzstämme *P. fluorescens* ATCC 13525, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 und *E. coli* ATCC 11229 auf das Vorhandensein von Katalase und Cytochromoxidase

Isolat	L1,2	L2,4	L2,6	L3,6	L3,8	L4,10	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. coli</i>
Katalase				+			+	-	/
Cytochromoxidase				+			+	/	-

+ positive Reaktion - negative Reaktion / nicht getestet

Alle Bakterienisolate zeigten eine eindeutig positive Katalase- als auch Cytochromoxidaserreaktion. Es handelt sich bei diesen Stämmen folglich um Bakterienstämme deren Energiegewinn durch aerobe Atmung erfolgt.

4.4.2 Molekularbiologische Charakterisierung

Gel-Elektrophorese

Die Isolate (*L1,2, L2,4, L2,6, L3,6, L3,8, L4,10*) waren biochemisch sowie chemotaxonomisch nicht weiter zu differenzieren. Eine einfache Methode zur Darstellung signifikanter Unterschiede im Gesamtzellproteinmuster von Bakterien ist die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS PAGE).

Die nachstehende Abbildung 18 des Polyacrylamid-Gels zeigt eine Übersicht der aufgetrennten Gesamtzellproteinmuster entsprechend ihres Molekulargewichtes.

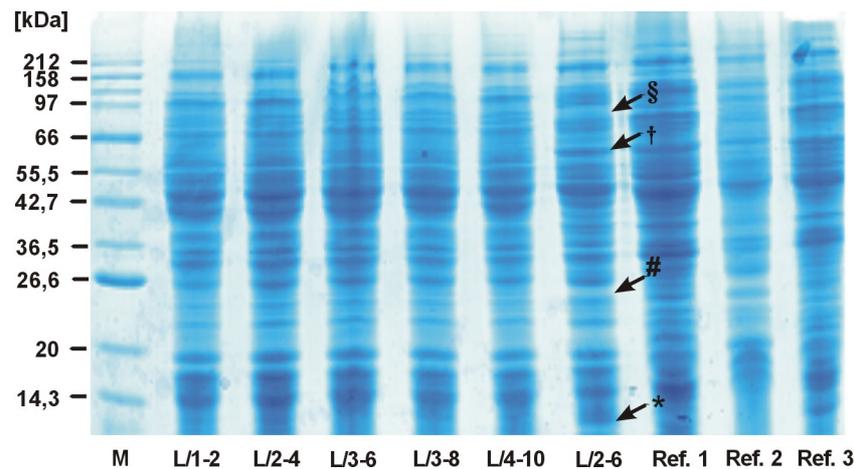


Abb. 18: Coomassie gefärbtes Gesamtzellprotein Polyacrylamid-Gelelektrophorese der aus den Batch-Kulturen 1-4 isolierten Limonen-abbauenden **Isolate**: *L/1-2* (Spur 2), *L/2-4* (Spur 3), *L/3-6* (Spur 4), *L/3-8* (Spur 5), *L/4-10* (Spur 6), *L/2-6* (Spur 7) und **Referenzstämmen**: Ref. 1 *P. aeruginosa*, ATCC 9027 (Spur 8); Ref. 2 *P. fluorescens*, ATCC 13525 (Spur 9); Ref. 3 *P. putida*, DSMZ 50906 (Spur 10); **M**: Protein Marker, Broad Range (Spur 1)

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbestandteile der Proben waren im Polyacrylamid-Gel als dunkelblaue Banden erkennbar. Der Protein Marker (Broad Range) diente als Laufkontrolle bzw. Molekulargewichtsvergleich der Standardproteine. Der Vergleich einzelner Proteinbanden ergab, daß es sich bei den Isolaten *L1,2*, *L2,4* und *L4,10* um identische Bakterienstämme handelt. Das Isolat *L2,6* zeigte signifikante Unterschiede im Gesamtzellproteinmuster gegenüber den übrigen Isolaten und getesteten Referenzstämmen: *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *P. fluorescens* (ATCC 13525) und *P. putida* (DSMZ 50906) mit einem sehr ähnlichen Gesamtzellproteinmuster untereinander und konnte von diesen eindeutig abgegrenzt werden. Aus diesem Grund wurde Isolat *L2,6* zum Vergleich zweier weiterer Isolate *L3,6* und *L3,8* zur DNA-Sequenzanalyse herangezogen. Die Unterschiede im Gesamtzellproteinmuster des Isolates *L2,6* sind in der Abb. 18 durch Pfeile gekennzeichnet. Aus technischen Gründen wurde in der Abb. 18 eine abweichende Schreibweise für die Bakterienstämme genutzt.

Genetischer Vergleich durch 16S rRNA-Sequenzanalyse

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde einerseits zum Vergleich der Nukleotidsequenzen des Isolates *L2,6* gegenüber den Isolaten *L3,6* und *L3,8* durchgeführt. Andererseits diente die PCR der Genotypisierung und eindeutigen Speziesidentifikation der Limonen-abbauenden Bakterienstämme. Durch die VBC-Genomics GmbH Wien erfolgte bei den Isolaten *L2,6*, *L3,6* und *L3,8* eine **16S rRNA-Teilsequenzanalyse**. Der Vergleich der Nukleotidsequenzen

der Limonen-abbauenden Isolate mit bekannten Gensequenzen der EMBL-Datenbank für Nukleotide führte zu folgenden Sequenzidentitäten. Die Ergebnisse sind in der Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13: Sequenzidentitäten in % der Limonen-abbauenden Isolate: *L2,6*, *L3,6*, *L3,8* mit bekannten Gensequenzen der EMBL-Datenbank für Nukleotide

Isolat	nächste verwandte Spezies	% Identität zur Spezies
<i>L2,6</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i> (Ac.-Nr.: 094734)	96 %
<i>L3,6</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (Ac.-Nr.: 76653)	97 %
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (Stamm: LMG 1225T)	97 %
<i>L3,8</i>	<i>Pseudomonas sp. B13</i> (Ac.-Nr.: 039489)	98 %

4.4.3 Chemotaxonomische Charakterisierung: Analyse der Fettsäuren aus Bakterien

Zur weiteren Charakterisierung der Bakterienisolate wurden anhand phänotypischer Merkmale die chemotaxonomischen Eigenschaften durch Analyse der Fettsäuren aus Bakterien mit dem Mikrobiellen Identifizierungssystem (MIS) untersucht.

Zelluläre Fettsäuren werden definiert als Bestandteil aller zellulären Lipide mit einer Kohlenstoff-Kettenlänge von 9 bis 20 Atomen. Sie sind in der Zellmembran aller Prokaryonten und Eukaryonten als Bestandteil der Glykolipide und Phospholipide lokalisiert und bilden den Grundbaustein der Lipopolysaccharide (WELCH 1991). Je nach Häufigkeit und Vorkommen von gesättigten, ungesättigten, verzweigten, zyklischen oder hydroxylierten Fettsäuren und entsprechend der Kettenlänge können Bakterien identifiziert werden. Gramnegative Bakterien besitzen eine komplexe zweischichtige Zellwand mit einer dünnen

Peptidoglykanschicht, die außen von einer Doppelmembran aus Lipopolysacchariden und Phospholipiden umgeben ist. Sie enthalten im Gegensatz zu grampositiven Bakterien alle Fettsäuretypen. Sie besitzen generell einen höheren Anteil gesättigter und ungesättigter Fettsäuren (SÜßMUTH et al. 1999). Die O-Seitenketten der gramnegativen Bakterien sind sehr variabel und werden für die Einteilung der Bakterien in verschiedene Stämme herangezogen.

Für die Analyse der Fettsäuren wurde zuvor von einem definierten Festmedium (TSBA = Trypticase Soy Broth Agar) Bakterienmasse gewonnen (Bebrütung 24 Stunden bei 28 °C). Nach entsprechender Aufbereitung wurden die gebildeten flüchtigen Fettsäuremethylester gaschromatographisch aufgetrennt und die Gesamtzellfettsäuremuster bestimmt. Die Ergebnisse der Fettsäureanalyse sind in der Tabelle 14 zusammengefaßt. Hierbei dominierten bei allen Isolaten sowie den Referenzstämmen die Fettsäuren: **18:1 ω7c/ω9t/ω12t** mit sehr hohen Anteilen von 16,72-38,57 %, die Fettsäure **16:0** mit einem Gehalt von 18,85-30,52 %, **16:1 ω7c** mit 6,93-31,68 %, **10:0 3OH** mit 3,13-5,01 %, **12:0** mit 3,01-8,77 %, **12:0 2OH** mit 3,43-5,35 %, die bei Isolat *L2,6* nicht nachgewiesen wurde und **12:0 3OH** mit einem Anteil von 3,24 bis 4,6 % am Gesamtzellfettsäuremuster. Weiterhin erschienen im Fettsäureprofil bei allen Proben übereinstimmend die Fettsäuren **14:0** und **17:0 cyclo**, wobei hier der hohe Gehalt von 17,9 % beim Isolat *L2,4* auffiel und die Fettsäure **18:0** mit geringem Vorkommen von maximal 1,14 %. Diese sogenannten Hauptfettsäuren bestimmen das in der Fachliteratur mehrfach beschriebene charakteristische Fettsäuremuster der Gattung *Pseudomonas*, wobei jede einzelne Spezies ein individuelles Profil aufweist und dadurch identifiziert, bzw. eine Einteilung in acht GLC-Gruppen (Gas Liquid Chromatography) vorgenommen wird (MOSS et al. 1972; MOSS u. DEES 1976; IKEMOTO et al. 1978; VEYS et al. 1989; WELCH 1991; LIPSKI et al. 1992). Durch Vergleich der Fettsäureprofile untereinander als auch mit getesteten Referenzstämmen sowie den Literaturdaten bekannter Spezies war bei den vorliegenden Isolaten unter Verwendung des MIS die eindeutige Zuordnung zur Gattung *Pseudomonas* möglich. Für die Isolate *L1,2*, *L3,6*, *L3,8* und *L4,10* wurde anhand des vom MIS automatisch errechneten 'Ähnlichkeitsindex' (SI) von 0,604-0,663 die Spezies *P. aruginosa* ermittelt, was eine gute Identifizierung darstellt. Doch zeigten einige Fettsäuren dieser Isolate signifikante Unterschiede zu dem Fettsäureprofil der publizierten Spezies *P. aruginosa*. Die sichere Speziesidentifikation der Isolate gelang mit diesem Identifizierungssystem nicht.

Tab. 14: Gesamtzellfettsäuremuster der Isolate *L1,2, L2,4, L2,6, L3,6, L3,8, L4,10* und den Referenzstämmen *P. fluorescens* ATCC 13525 und *P. putida* DSM 50906 (Fettsäuren in % zum Gesamtzellfettsäuremuster)

Fettsäuren %	L1,2	L2,4	L2,6	L3,6	L3,8	L4,10	Pseudomonas fluorescens	Pseudomonas <i>putida</i>
							ATCC 13525	DSM 50906
10:0	0,21	n.n.	n.n.	n.n.	0,15	0,91	n.n.	n.n.
10:0 3OH	3,13	4,51	4,54	3,85	3,64	5,01	3,60	3,15
12:0	3,53	4,22	8,77	3,70	3,68	3,53	3,01	3,28
12:0 2OH	3,47	5,35	n.n.	3,51	3,43	4,31	4,58	4,12
12:0 3OH	3,24	4,60	4,60	4,17	4,05	4,11	4,05	4,28
14:1 ISO E	0,20	n.n.	n.n.	0,52	0,44	0,15	0,28	n.n.
14:0	0,68	1,77	3,24	0,79	0,67	0,65	0,29	0,36
15:1 ω8c	n.n.	n.n.	0,26	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
15:0	n.n.	n.n.	0,86	n.n.	n.n.	n.n.	0,52	0,41
15:0 ISO 3OH	n.n.	n.n.	1,46	0,75	0,49	n.n.	n.n.	n.n.
16:1 ω7c	22,79	6,93	18,02	23,52	23,84	20,77	31,46	31,68
16:0	24,26	28,30	18,85	23,59	23,09	23,40	30,12	30,52
17:1 ω8c	n.n.	n.n.	0,78	n.n.	n.n.	n.n.	0,35	0,33
17:0 cyclo	0,59	17,90	5,18	0,22	0,24	0,88	2,42	3,08
17:0	n.n.	n.n.	0,80	n.n.	n.n.	n.n.	0,79	0,71
18:0	0,41	0,21	0,35	0,41	0,41	0,39	1,14	1,13
18:1 ω7c/ω9t/ω12t	37,97	20,96	38,57	34,97	35,87	35,18	17,39	16,72
19:0 cyclo ω8c	n.n.	5,36	8,44	n.n.	n.n.	0,18	n.n.	0,25

n.n. nicht nachgewiesen, Die Fettsäuren 9:0, 12:1 3OH von Isolat L4,10 sind nicht in der Tabelle enthalten.

4.4.4 Physiologisch-biochemische Charakterisierung

Die physiologisch-biochemischen Untersuchung der Bakterien erfolgte anhand genetisch determinierter Stoffwechseleigenschaften, wie die Verwertung verschiedener Substrate (z. B. Zucker, Aminosäuren), die Bildung charakteristischer Stoffwechselprodukte (z.B. Indol und

H₂), die Produktion bestimmter Enzyme sowie die Bildung von Pigmenten (z. B. Fluorescein oder Pyocyanin) bei einer Vielzahl von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* (STANIER et al. 1966; PALLERONI 1984).

Die Untersuchung der Stoffwechseleigenschaften der Bakterienisolate wurde unter anderem mit dem MicroLog-Testsystem vorgenommen. Weiterhin wurden das standardisierte API 20 NE-Testsystem sowie das BBL CRYSTAL-Identifizierungssystem eingesetzt.

MicroLog-System

Dieses System nutzt die Fähigkeit aller Mikroorganismen, spezielle Kohlenstoffquellen zu verwerten, bei dem für jeden Organismus ein einzigartiges Muster entsteht. Dabei wird die Oxidation von 95 Kohlenstoffquellen getestet und ein sogenannter metabolischer „fingerprint“ erstellt. Als Indikator dient der Redoxfarbstoff Tetrazoliumviolett, der in oxidiertem Zustand farblos, in reduziertem Zustand eine Purpur-Färbung annimmt. Aus der Tabelle A 6 (Anhang) können die getesteten Kohlenstoffquellen entnommen werden. Die Ergebnisse der oxidativen Umsetzungen der Isolate sowie der Referenzstämme befinden sich in den Tabellen A 23-25 (Anhang). Die Ablesung der Mikrotiterplatten erfolgte mit dem MicroStation™ reader unter Anwendung der MicroLog 2 software. In der Tabelle 15 ist der für jedes Isolat mittels der Software errechnete Ähnlichkeitsindex (similarity index) dargestellt, mit der Datenbank des Systems verglichen und dem wahrscheinlichsten Taxon zugeordnet.

Tab. 15: Errechneter Ähnlichkeitsindex (SI) und Spezies Identifikation mit dem MicroStation™ reader, anhand der MicroLog 2 software

Isolat	L1,2	L2,4	L2,6	L3,6	L3,8	L4,10
similarity Index	0,452	0,442 0,119	0,515	0,488	0,595	0,515
Spezies	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	<i>Pseudomonas azelaica</i> <i>Pseudomonas nitroreducens</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>

Bebrütung: 24 Stunden, 28 °C

Laut MicroLog Benutzerhandbuch ist für die richtige Interpretation der Ergebnisse die Höhe des similarity Index‘ ausschlaggebend. Nach einer 16-24-stündigen Bebrütungsdauer kann ein Index von 0,50 als akzeptable Identifikation angesehen werden. Die Isolate L1,2, L2,4 und

L3-6 lagen mit 0,442-0,452 unter dem angegebenen Index, die anderen wenig über 0,50. Als Spezies Identifikation wurde bei 4 Isolaten *P. nitroreducens*, bei einem Isolat *P. pseudoalcaligenes* und bei einem Isolat *P. azelaica* (an erster Stelle) und *P. nitroreducens* (an zweiter Position) angegeben. So ergab der similarity Index bei keinem Isolat eine gute bis sehr gute Identifizierung. Eine sichere Speziesidentifikation wurde daher als unzureichend hinsichtlich der Aussagekraft des similarity Index⁶ angesehen. Eindeutig war bei allen Isolaten die Zuordnung zur Gattung *Pseudomonas*.

BBL CRYSTAL-Identifizierungssysteme

Dieses Testsystem zur Identifizierung von Enterobacteriaceae und anderen aeroben gramnegativen Stäbchen sowie grampositiven Bakterien diente zur Untersuchung der Stoffwechseleigenschaften der Isolate anhand der in den Tabellen A 4, A 5 (Anhang) aufgeführten Substrate. Die Ergebnisse dieses Identifizierungssystems beinhaltet die Tabelle A 26 (Anhang). Der überwiegende Teil der Substrate zeigte bei allen Isolaten eine negative Reaktion. Bis einschließlich p-n-p-N-Azetyl-Glukosamid zeigten alle Isolate übereinstimmende Ergebnisse. Ausgenommen p-n-p-Phosphat wird durch das Isolat L2,6 nicht enzymatisch hydrolysiert. Unterschiede in den Reaktionen zeigte dieses Isolat bei der enzymatischen Hydrolyse von γ -L-Glutamyl-p-Nitroanilid, Harnstoff, beim Abbau von Glyzin sowie anaeroben Katabolismus von Arginin durch nicht eindeutige Reaktionen (\pm) gegenüber den übrigen Isolaten. Die Stoffwechseleigenschaften dieser Bakterienisolate ergaben nahezu identische Ergebnisse. Ausnahmen bildeten die Verwertung von Malonat (bei L1,2 positiv, L2,4, L3,8 keine eindeutige Reaktion, L2,6, L3,6, L4,10 negativ) und die Reduktion des Tetrazoliums zu Formazan (L1,2, L3,6, L4,10 positiv, L2,4 keine eindeutige Reaktion, L2,6, L4,10 negativ). Lysin zeigte bei L2,4 keine eindeutige Reaktion und wurde bei L2,6 nicht anaerob katabolisiert. Die Ergebnisse der biochemischen Tests bestätigten übereinstimmend die Zugehörigkeit zur Gattung *Pseudomonas*. Keine der für die Isolate errechneten Profilnummern konnte einem im Elektronischen Codebuch enthaltenen Taxon eindeutig zugeordnet werden.

Weitere mit dem API 20 NE-System durchgeführten Tests, wie die Reduktion von Nitrat zu Nitrit verliefen übereinstimmend negativ, die Reduktion von Nitrat zu Stickstoff mit Ausnahme des Isolates L2,6 positiv. Glukose wurde von keinem Isolat fermentiert. Die Gelatineverflüssigung durch proteolytische Enzyme ergab ein negatives Ergebnis. Tryptophan wurde nicht zu Indol abgebaut.

Die Prüfung der Schwefelwasserstoff-Bildung auf SIM-Medium verlief negativ.

4.4.5 Untersuchung der optimalen Wachstumsbedingungen

Die Ermittlung optimaler Wachstumsbedingungen diente zur Klärung spezieller Nährstoffansprüche und der osmotischen Eigenschaften der Batch-Kulturen sowie zur Eingrenzung des Wachstums in einem bestimmten Temperatur- und pH-Wert Bereich. Die erzielten Ergebnisse bildeten die Grundlage für die anschließende erfolgreiche Inokulation der Bakterienstämme sowie für die Untersuchungen zum Limonenabbau durch die Batch-Kulturen im Biofilter.

Optimale Wachstumstemperatur

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde das Wachstum der Batch-Kulturen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen in einem Bereich von 6 °C bis 42 °C bei einem pH-Wert von 7,0 photometrisch (OD = 550 nm) untersucht. Den Abbildungen A 31 (Anhang) ist zu entnehmen, daß bei Temperaturen von 25 °C bis 30 °C bei allen Batch-Kulturen übereinstimmend ein starkes Wachstum im Mineralsalzmedium zu beobachten war. Temperaturen von 15 °C bzw. 37 °C führten zu einem stark vermindertem Wachstum nach verlängerter Adaptationsphase. Bei Inkubationstemperaturen von 6 °C und 42 °C blieb das Wachstum der Bakterien vollständig aus. Nach einer Lag-Phase von ca. 20 Stunden wurden bei einer Bebrütungstemperatur von 30 °C optische Dichten von > 1,0 bis 1,4 nach 25 bis 30 Stunden ermittelt. Dieses Ergebnis entspricht der optimalen Wachstumstemperatur aller Batch-Kulturen.

pH-Optimum

Phosphatpuffer enthaltendes Minimalmedium wurde mittels pH-Meter auf pH-Werte zwischen 4,0 bis 8,0 eingestellt und das Wachstum der Kulturen bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C durch Trübungsmessung (OD = 550 nm) ermittelt. Wie in den Abbildungen A 32 (Anhang) dargestellt, konnte bei pH-Werten zwischen 6,5 und 7,0 ein intensives Wachstum der Bakterien beobachtet werden. pH-Werte von 6,0 und 7,5 führten zu einer deutlichen Verlängerung der Initialphase und zu einer Wachstumshemmung. PH-Werte von 4,0 und 8,0 beeinträchtigten die Bakterien soweit, daß eine Vermehrung ausgeschlossen war. Das Mineralsalzmedium mit einem eingestellten pH-Wert von 7,0 zeigte nach einer Lag-Phase von ca. 15 Stunden eine starke Zunahme der Trübung, wobei nach 21 bis 26 Stunden

optische Dichten von 1,2 bis 1,5 erreicht wurden. Demnach wirkt sich ein pH-Wert von 7,0 optimal auf das Wachstum aller Batch-Kulturen im Mineralsalzmedium aus.

Osmotische Empfindlichkeit (NaCl-Toleranz)

Minimalmedium mit einem pH-Wert von 7,0 wurde mit 0 %, 1 % und 2 % Kochsalz versetzt und nach Beimpfung mit Kulturflüssigkeit und Zugabe von Limonen das Wachstum der Batch-Kulturen bei einer Temperatur von 30 °C durch Extinktionsmessung verfolgt. Während die Batch-Kulturen ohne NaCl-Zusatz eine starke Trübung aufwiesen, war ab einer Konzentrationen von 1 % kein Wachstum der Bakterien zu beobachten. Nach einer Initialphase von etwa 24 Stunden wurden aus dem Mineralsalzmedium ohne NaCl-Zugabe durch stetige Zunahme der Trübung Werte von rund 1,0 bis 1,4 ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen A 33 (Anhang) dargestellt. Die osmotische Empfindlichkeit der Batch-Kulturen, gemessen an den höchsten NaCl-Konzentrationen, ist bei einheitlich 0 % am geringsten.

4.5 Überführung der Limonen-adaptierten Anreicherungskulturen in den Biofilter

4.5.1 Betrieb der Modellbiofilter

Zwei parallel betriebene Biofilter wurden über einen Zeitraum von insgesamt 150 Tagen über einen Zuluftstrom kontinuierlich mit Limonen beschickt. Beide Biofilter wurden mit einem Volumenstrom von je 6 m³/h und einer Limonenkonzentration von je 0,46 ml/h betrieben. Zur Inokulation des Biofilters 1 wurde regelmäßig ein Mix der vier an Limonen adaptierten Anreicherungskulturen entsprechender Mikroorganismendichte über dem Biofilterbett verrieselt, um eine schnelle Adaptation der Bakterienkultur im Filtermaterial zu erreichen. Zweimal wurde die Inokulation des Biofilters 1 über einen Zeitraum von 25 Tagen ausgesetzt. Nach diesen Phasen erfolgte wiederum eine 25-tägige Beimpfung des Biofilters. Hiermit sollte die Stabilität der Anreicherungskulturen hinsichtlich ihres Abbauvermögens für Limonen im Biofilter untersucht werden.

4.5.2 Wirksamkeit der Inokulationskulturen im Biofilter

Die Wirksamkeit der Strategie, den Limonenabbau in Biofiltern durch Inokulation mit einer leistungsfähigen Anreicherungskultur zu verbessern, wurde im Überführungsversuch in zwei

Modellbiofiltern untersucht. Der zweite Biofilter diente dabei als nicht inokulierter Vergleich (Kontrolle). Biofilter 1 zeigte mit nur 34 Tagen Einlaufzeit eine umgehende Adaptation an den zugeleiteten Geruchsstoff, Tabelle A 27 (Anhang). Die Limonenkonzentration in Roh- und Reingas wurde zweimal wöchentlich gaschromatographisch bestimmt und die Wirkungsgrade für beide Biofilter ermittelt. Vergleichend dazu wurden im Biofilterversuch 2 olfaktometrische Untersuchungen beider Biofilter zur Bestimmung der Geruchsstoffkonzentrationen in GE/m³ für Limonen in Roh- und Reingas vorgenommen und die Geruchsminderungsgrade (η_G) errechnet. In den Abbildungen 19 und 20 sind die durch GC-MS und Olfaktometrie ermittelten Roh- und Reingaskonzentrationen für Limonen in mg/m³ bzw. GE/m³ beider Biofilter dargestellt. Die Wirkungsgrade η in % als massenanteilige Minderung des Abluftinhaltsstoffes sowie die Geruchsminderungsgrade (η_G) in % als Minderung des Emissionsgeruchsstoffstroms sind in den Tabellen A 27-30 (Anhang) enthalten.

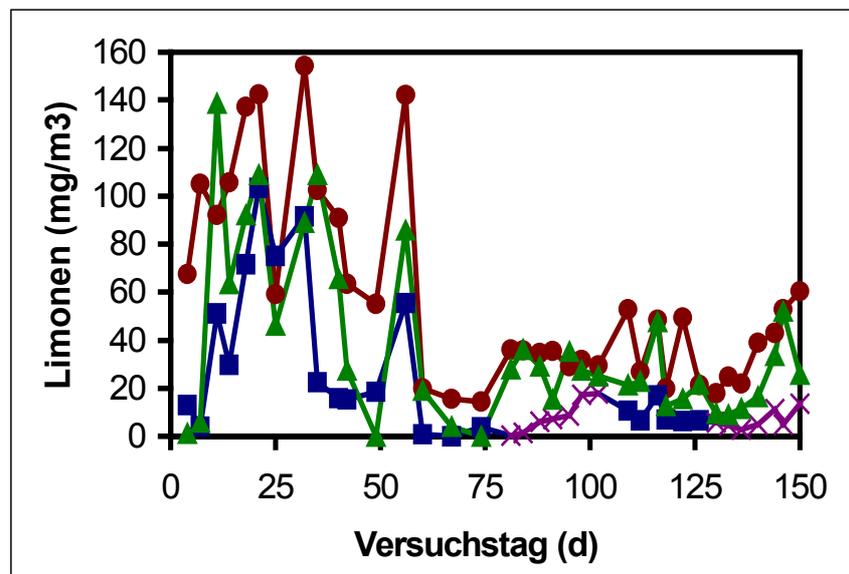


Abb. 19: Gaschromatographisch ermittelte Limonenkonzentrationen in Roh- und Reingas (mg/m³) in Abhängigkeit von der Biofilterlaufzeit in Tagen (d): ●... Rohgaskonzentration ■... Biofilter 1 (mit Inokulationskultur); ▲. Biofilter 2 (ohne Inokulationskultur); ..x.. Aussetzen der Inokulation

Nach einer kurzen Einlaufzeit von 34 Tagen konnten für den Biofilter 1 (mit Inokulationskultur) Wirkungsgrade von 78 %, nach 40 Tagen 82 % und nach 67 Tagen sogar 100 % ermittelt werden. Biofilter 2 (ohne Inokulationskultur erreichte dagegen Wirkungsgrade von 57 % nach 42 Tagen und maximal 74 % am 67. Versuchstag. Außerdem waren sehr starke Konzentrationsschwankungen besonders während der Adaptationsphase zu beobachten. Ein Aussetzen der Inokulation führte beim Biofilter 1 im ersten Teilversuch (Tab. A 28) zu einer Absenkung des Wirkungsgrades von 99 % auf 40 % am 102. Versuchstag. Durch eine

erneute Beimpfung konnte der Wirkungsgrad auf 87 % am 122. Versuchstag (Tab. A 28) gesteigert werden. Die ausbleibende Inokulation führte dagegen im zweiten Teilversuch nicht zu einer Beeinträchtigung im Limonenabbau. Der Wirkungsgrad blieb bei Werten zwischen 82 % und 91 % (133.-146. Versuchstag) annähernd konstant (Tab. A 28).

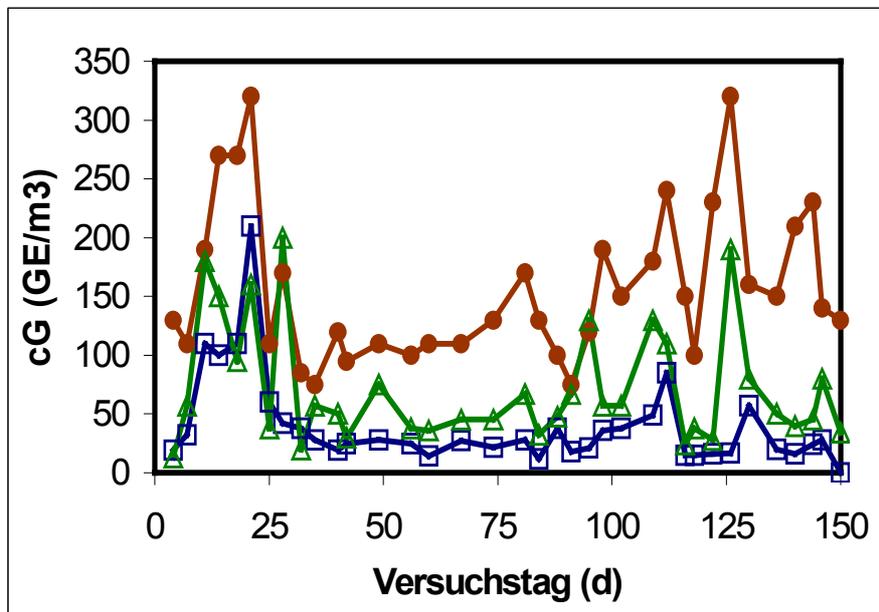


Abb. 20: Olfaktometrisch ermittelte Geruchsstoffkonzentrationen (c_G) in GE/m^3 aus dem Roh- und Reingas in Abhängigkeit von der Biofilterlaufzeit in Tagen (d): ●... Rohgaskonzentration □... Biofilter 1 (mit Inokulationskultur); ▲... Biofilter 2 (ohne Inokulationskultur); ..+.. Aussetzen der Inokulation

Die olfaktometrisch gemessenen Geruchsstoffkonzentrationen zur Errechnung der Geruchsminderungsgrade stimmten mit den Ergebnissen der GC-MS-Analyse annähernd überein. Hier wurden Wirkungsgrade von 84 % nach 40 Tagen, 91 % nach 84 Tagen und 100 % nach 150 Tagen Betriebszeit ermittelt (Tab. A 30).

4.5.3 Untersuchung des pH-Wertes, der Materialfeuchte und der Temperatur

Die Funktionsfähigkeit eines Biofilters wird unter anderem durch Materialeigenschaften, wie konstante Feuchte und pH-Gleichgewicht positiv beeinflusst. Die Aktivität der Mikroorganismen ist nur dann optimal gewährleistet, wenn günstige Temperaturverhältnisse mit geringem Schwankungsbereich im Biofiltermaterial bestehen. Diese Parameter wurden im gesamten Versuchszeitraum erfaßt.

pH-Wert

Die Untersuchungen ergaben bei den Biofiltern während der gesamten Betriebszeit kaum pH-Bereichsverschiebungen. Beim Biofilter pegelte sich der pH-Wert von anfangs 7,2 nach Ablauf der Adaptationsphase auf einen Wert von 6,7-6,8 ein, was auf die Beimpfung mit Inokulationskultur mit einem pH-Wert von 6,7-6,8 zurückzuführen ist. Unwesentlich änderte sich der pH-Wert dagegen bei Biofilter 2 (ohne Inokulationskultur) bei Werten zwischen 7,0 und 7,3. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 16 zusammengefaßt.

Tab. 16: pH-Werte während der 150-tägigen Betriebszeit zweier Modellbiofilter

Versuchstag	pH-Wert	
	Biofilter 1 (mit Inokulationskultur)	Biofilter 2 (ohne Inokulationskultur)
1	7,2	7,0
21	6,9	7,2
35	6,8	7,2
60	6,8	7,2
95	6,7	7,3
146	6,7	7,1

Materialfeuchte und Temperatur des Biofiltermaterials

Ein optimaler Feuchtigkeitsgehalt von 40-60% (w/w) wurde über einen Wasserdampf-befeuchter unter Verwendung von Füllkörpern realisiert. Die Versuche wurden bei Umgebungstemperaturen von 22-30 °C durchgeführt. Die Untersuchungen zur Materialfeuchte erfolgten vor und während der Biofilterlaufzeit durch Bestimmung der Trockensubstanz. Die Filterbettemperaturen lagen bei 26-28 °C, die Feuchte der Biofiltermaterialien bei 42-44 % (w/w), was für den Betrieb von biologischen Abluftreinigungsanlagen als günstig angesehen wird (VDI-RICHTLINIE 3477/1991; KNAUF 1998).

In der Abbildung 21 sind die Materialfeuchte und die Temperatur des Biofiltermaterials graphisch dargestellt.

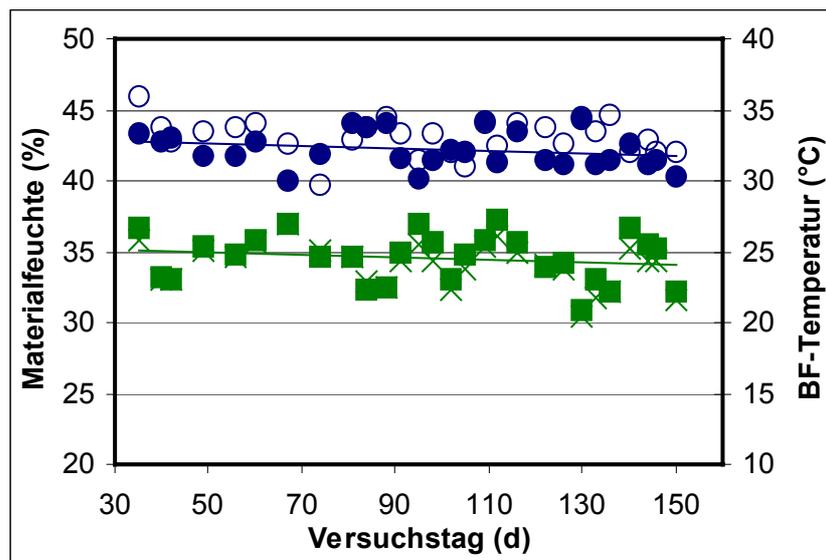


Abb. 21: Materialfeuchte (%w/w) und Temperatur des Biofiltermaterials (°C) in Abhängigkeit von der Biofilterlaufzeit nach einer 34-tägigen Adaptationsphase, ●. Feuchte, ■ Temperatur des Biofilters mit Inokulationskultur, ○.. Feuchte, x. Temperatur des Biofilters ohne Kultur

4.5.4 Untersuchungen zur Mikroorganismendichte im Filtermaterial

Die Gesamtkeimzahl des Biofiltermaterials wurde vor Inbetriebnahme und während der Laufzeit beider Biofilter mikroskopisch mit der Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Die Untersuchungsergebnisse werden durch die Abb. 22 veranschaulicht.

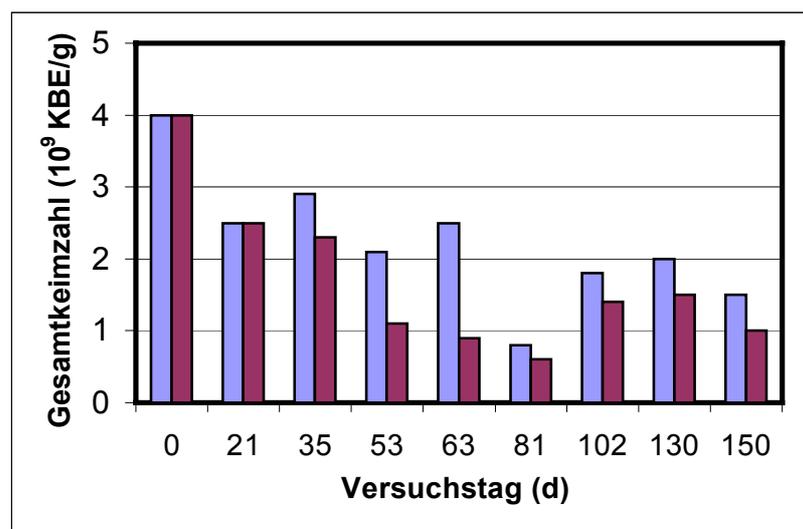


Abb. 22: Gesamtkeimzahl in KBE/g Biofiltermaterial in Abhängigkeit von der Biofilterlaufzeit in Tagen; ■..Biofilter 1 (mit Inokulationskultur); ■..Biofilter 2 (ohne Inokulationskultur)

Die Mikroorganismendichte lag vor Inbetriebnahme der Biofilter bei $4,0 \times 10^9$ KBE/g Filtermaterial. Während der 34-tägigen Adaptationsphase sank die Gesamtkeimzahl leicht auf $2,3-2,9 \times 10^9$ KBE/g. Nach Aussetzen der Inokulation am 81. Versuchstag war ein Rückgang der Keimzahl auf 8×10^8 KBE/g im Biofilter 1 zu beobachten. Bis zum Versuchsende wurden wieder Werte von $1,8-2,0 \times 10^9$ KBE/g Biofiltermaterial erreicht. Für Biofilter 2 wurden mittlere Gesamtkeimzahlen zwischen $6,0 \times 10^8$ und $1,5 \times 10^9$ KBE/g Filtermaterial ermittelt, die sich während der gesamten Betriebszeit unter der des beimpften Biofilters bewegten. Die geringfügigen Änderungen der Gesamtkeimzahlen können eine Veränderung der Mikroorganismenpopulation im Biofilter 1 oder eine physiologische Anpassung der ursprünglichen Spezies bedeuten.

4.5.5 Qualitative mikrobiologische Komposition des Biofiltermaterials

Durch die mikrobiologische Charakterisierung der aus beiden Biofiltern entnommenen Proben sollten Veränderungen hinsichtlich der Diversität der Mikroorganismenspezies während der Biofilterlaufzeit geklärt und Aussagen über die unterschiedlichen Abbaukapazitäten für Limonen beider Biofilter getroffen werden.

Vor Versuchsbeginn und während der Laufzeit beider Biofilter wurden Filtermaterialproben nach Aufreinigung und Isolierung von Reinkulturen taxonomisch, physiologisch-biochemisch und chemotaxonomisch untersucht. Einige Isolate konnten nicht identifiziert werden. In den Tabellen 17 und 18 sind Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen zusammengefaßt.

Tab. 17: Mikrobiologische Zusammensetzung der Bakterienflora im Filtermaterial beider Biofilter vor Versuchsbeginn

Bakterienflora im Filtermaterial beider Biofilter vor Inbetriebnahme
<i>Arthrobacter</i>
<i>Bacillus</i>
<i>Leifsonia</i>
<i>Micrococcus</i>
<i>Rhodococcus</i>
<i>Pseudomonas</i>
<i>Sphingomonas</i>
<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Streptococcus</i>

Tab. 18: Mikrobiologische Charakterisierung der Bakterienflora im Filtermaterial während der Betriebszeit beider Biofilter mit Limonen

Bakterienflora im Filtermaterial beider Biofilter nach einer 34-tägigen Adaptationsphase	
Biofilter 1 (mit Inokulationskultur)	Biofilter 2 (ohne Inokulationskultur)
<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Brevundimonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Leifsonia</i>	
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Stenotrophomonas</i>	
Bakterienflora im Filtermaterial beider Biofilter nach einer 63-tägigen Betriebszeit	
<i>Acinetobacter</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Clavibacter</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Clavibacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Enterobacter</i>	
<i>Leifsonia</i>	
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Shewanella</i>	
<i>Stenotrophomonas</i>	
Bakterienflora im Filtermaterial beider Biofilter nach einer 150-tägigen Betriebszeit	
<i>Aeromonas</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Clavibacter</i>	<i>Leifsonia</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium</i>
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>

Nach Ablauf der Adaptationsphase wurde eine leichte Abnahme der Diversität des Bakterienspektrums festgestellt. Die Änderung in der mikrobiologischen Komposition des Biofiltermaterials führte zur Selektion charakteristischer Gattungen wie *Aeromonas*,

Clavibacter, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Stenotrophomonas* und *Bacillus*. Mit fortgeschrittener Biofilterlaufzeit (nach 63 und 150 Tagen) ergab die mikrobiologische Charakterisierung aus dem beimpften Biofilter den gehäuften Nachweis von *P. fluorescens*, *P. putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas caviae* und *Aeromonas sobria*. Die mikrobiologisch untersuchten Proben des Biofilters 2 (ohne Inokulationskultur) zeigten dagegen eine stärkere Anwesenheit von *Enterobacter cloacae* und verschiedener Spezies der Gattung *Bacillus*. *P. fluorescens*, *P. putida* und *Stenotrophomonas maltophilia* wurden ebenfalls identifiziert, jedoch nicht in der Intensität wie es bei dem inokulierten Biofilter der Fall war. Spezies der Gattung *Leifsonia* konnten dagegen nicht nachgewiesen werden.

5 DISKUSSION

5.1 Gewinnung und Anreicherung Limonen-abbauender Bakterien

Limonen ist ein weit verbreiteter Naturstoff und Bestandteil zahlreicher ätherischer Öle. Als biogene Komponente ist es weiterhin maßgeblich an der Entstehung von Gerüchen während der Kompostierung von Bioabfall beteiligt (JAGER u. SCHILDKNECHT 1979 a; MAYER 1990; SMET et al. 1997). Die Erwägung, eine umgehende soziale Adaptation einer wirksamen Mikroorganismenflora an das Substrat zu erreichen, führte zur Auswahl der beschriebenen Inokulationsquellen, da in diesen zum Limonenabbau geeignete Mikroorganismen zu erwarten waren. Die von mehreren Autoren DHAVALIKAR u. BHATTACHARYYA (1966), DHAVALIKAR et al. (1966), DHERE u. DHAVALIKAR (1970), MUKHERJEE et al. (1973), RAMA DEVI u. BHATTACHARYYA (1977 a, b), COOK et al. (1983), KRASNOBAJEW (1984), CADWALLADER et al. (1989), MISRA et al. (1996), VAN DER WERF et al. (1999) beschriebene Strategie, Limonen-abbauende Mikroorganismen in einem Mineralsalzmedium mit diesem Substrat anzureichern, gelang in der vorliegenden Dissertation problemlos. Wegen der physikalisch-chemischen Eigenschaften (leicht flüchtig, schwer wasserlöslich) und der Toxizität des Limonens in höheren Konzentrationen gegenüber verschiedenen Mikroorganismen sehen ABRAHAM et al. (1985) die konventionellen Anreicherungsverfahren hinsichtlich des Umsetzungsgrades für Limonen als eher ungeeignet an und entwickelten eine spezielle Technik der kontinuierlichen Substratzufuhr im Bioreaktor. Eine weitere Möglichkeit der selektiven Anreicherung besteht in der Immobilisierung separater Zellen, die eine weiterführende Nutzung oder die kontinuierliche Wirksamkeit in Bioreaktoren gestatten. In einigen Fällen wurde die mikrobielle Transformation von Terpenverbindungen mit isolierten Enzymen vorbereitet. Durch gezielt herbeigeführte Mutationen sind ausgewählte Mikroorganismen in der Lage, Terpene zu verwerten, auf denen sie zuvor nicht zu wachsen vermochten. Der daraus resultierende Enzymdefekt ermöglicht die Aufrechterhaltung für die Metabolisierung essentieller Abbauschritte, wobei eine Akkumulation von erwünschten bzw. unerwünschten Umsetzungsprodukten nicht ausgeschlossen werden kann. Durch Substitution halogenierter Substratanaloga lassen sich solche veränderten Mikroorganismen zum Terpenabbau sogar noch effektiver anreichern (KRASNOBAJEW 1984).

Aufgrund der bekannten antimikrobiellen Wirkung des Limonens erfolgte die Anreicherung Limonen-abbauender Kulturen nach dem fed-batch-Prinzip. Die Voranreicherung der Mikroorganismen wurde auf Limonen mit relativ hohen Anfangskonzentrationen von 1 g/l

durchgeführt, um durch den umgehend einsetzenden Selektionsdruck tatsächlich nur solche Bakterien anzureichern, die das Substrat als Energie- und Kohlenstoffquelle verwerten konnten und durch Wachstum auf Limonen Biomasse bilden. Da es sich bei Limonen wie bei vielen anderen Geruchsstoffen um eine stark hydrophobe Verbindung handelt, löste sich nur ein geringer Anteil in der wässrigen Phase. Das Limonen befand sich zunächst als Film auf der Flüssigkeitsoberfläche der Kultur.

In dieser Arbeit war die Anreicherung von vier Batch-Kulturen unterschiedlicher Herkunft erfolgreich, die Limonen als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Nach 90-tägiger Anreicherung konnten mit dem Spatelplattenverfahren Lebendzellzahlen zwischen $1,25 \times 10^8$ und $3,2 \times 10^9$ KBE/ml ermittelt werden. Dies dokumentiert die Realisierbarkeit der Anreicherung hoher Mikroorganismenkonzentrationen aus Umweltproben, die als leistungsfähige Inokulationskulturen für Biofilter eingesetzt werden können. Während DHAVALI-KAR et al. (1966) für die Voranreicherung der Pseudomonaden als Cosubstrat 1 % (w/v) Glucose verwendeten, empfiehlt BOWEN (1975), das Limonen zuvor in Ethanol zu lösen. Eine verbesserte Bioverfügbarkeit des Substrates ließ sich mit der Verfahrensweise in Vorversuchen dieser Studie nicht bestätigen, so daß die Untersuchungen für die vorliegende Dissertation weiter keine Berücksichtigung fanden. MUKHERJEE et al. (1973) und CHANG und ORIEL (1994) konnten durch die Zugabe von 0,01-0,1 % (w/v) Hefeextrakt eine Steigerung der Biomasseproduktion der angereicherten Mikroorganismen erreichen. Die genannten Substrate bewirkten in den vorangegangenen Untersuchungen zwar ein verstärktes Wachstum der Bakterien in Schüttelkultur, doch führten sie nicht zu einer Steigerung der Abbauraten. Die Batch-Kulturen zeigten sich von zusätzlichen Kohlenstoffquellen unabhängig, was als Vorteil für die unkomplizierte Anreicherungstechnik zu sehen ist. Die Anreicherung hoher Mikroorganismenkonzentrationen aus Umweltproben und die Gewinnung leistungsfähiger Limonen-abbauender Bakterienkulturen für Biofilter ist auf diesem Wege gut realisierbar.

5.2 Isolierung Limonen-abbauender Reinkulturen

Zum Wachstum und Vermehrung sowie zur Isolierung Limonen-abbauender Bakterien wurden verschiedene Festmedien eingesetzt. Während HIPPCHEM (1985) die Methode der Zufuhr von Abluftmodellsubstanzen durch Diffusion über die Gasphase erfolgreich anwendete, beschreiben CADWALLADER et al. (1989) sowie CHANG und ORIEL (1994) die Überführung der Anreicherungskulturen auf Mineralsalzmedium, denen anschließend 0,1 ml Limonen in die Petrischale gegeben wurde. Durch Verdunstung des Limonens bei Bebrütungstemperaturen von ≥ 25 °C nahmen die Mikroorganismen das Substrat über die Gasphase

auf. Der zuletzt beschriebene Weg führte in der vorliegenden Arbeit nicht zum Erfolg, da ein langsames Wachstum von farblosen Kolonien mit sehr geringer Größe zu beobachten war und eine weitere Isolierung von Reinkulturen somit nicht ermöglichte. Nach wiederholten Überimpfungen kam das Wachstum gar völlig zum Erliegen. Der Einsatz von Endo- und MacCONKEY-Agar brachte keine befriedigenden Ergebnisse. Auch die zur Isolierung von Bakterien der Gattung *Pseudomonas* üblichen Selektivnährmedien wie Cetrimid-Agar, Pseudomonas-Agar F und P erwiesen sich als ungeeignet, obwohl die Bakterien ein starkes Wachstum zeigten, allerdings morphologisch schwer voneinander zu unterscheiden waren. Mit der Verwendung von Komplexmedien, wie Nähragar und CASO-Agar gelang die Isolierung von insgesamt 44 Reinkulturen. Die Inkubation aller getesteten Nährmedien erfolgte bei 28 °C unter einer Limonenatmosphäre von 13 g/l. Mit diesen Universalnährmedien läßt sich folglich ein breites Mikroorganismenspektrum erfassen, wobei es sich bei den Limonen-abbauenden Isolaten offenbar um weniger anspruchsvolle Bakterien handelt und für eine mühelose Kultivierung und Isolierung spricht. Die Vermehrung und Kultivierung solcher Bakterien, die keine speziellen Nährstoffansprüche stellen, ist auch auf Nähragar enthaltenden Schrägagarröhrchen problemlos möglich. Nach Beimpfung und 24-stündiger Inkubation ist eine Haltbarkeitsdauer von sechs Monaten bei 25 °C ohne Verlust der Lebensfähigkeit der Bakterien gewährleistet (DHAVALIKAR u. BHATTACHARRYA 1966). Die Aufbewahrung der Schrägagarkulturen bei 6 °C führte jedoch in den vorliegenden Untersuchungen nach sechs Monaten nur zu einem spärlichen Anwachsen der Bakterienstämme auf Komplexmedium. Dagegen war die Anzucht von Gefrierkulturen auf Festmedium erfolgreich.

Die Anreicherungstechniken wirken wegen der Medienzusammensetzung und der Inkubationsbedingungen selektiv auf bestimmte Mikroorganismenpopulationen (BENDINGER 1992). Einige Wissenschaftler berichten von einem geringen Anteil, etwa 0,1-1 % der tatsächlich anzureichernden bzw. kultivierbaren Mikroorganismen, die auf den verfügbaren Nährböden anwachsen. Die von Nähragar isolierten Spezies repräsentieren daher nur eine Minderheit der natürlich vorkommenden Bakterienflora (OLSEN u. BAKKEN 1987; BOLLAG u. BOLLAG 1992). RASCHKE (1999) beobachtete nach wiederholter Passage in frisches Medium einen teilweisen Verlust von zuvor in Minimalmedium angereicherten Bakterienstämmen, der durch eigene Untersuchungen bestätigt werden kann. Folglich ist mit der zur Anreicherung, Kultivierung und Isolierung angewandten Technik das Erfassen verschiedener Limonen-abbauender Mikroorganismen begrenzt.

5.3 Taxonomische Einordnung der Isolate

Die Aufreinigung der vier Batch-Kulturen aus unterschiedlichen Quellen führte zur Isolierung von 44 Reinkulturen, von denen sechs Isolate zum Limonenabbau befähigt sind, die offensichtlich über komplette Abbauwege verfügen und deshalb umfangreichen mikrobiologischen Untersuchungen zu deren genaueren Charakterisierung und Identifizierung unterzogen wurden.

Die zell- und koloniemorphologische Charakterisierung der Isolate sowie der Vergleich mit verschiedenen taxonomischen Studien war im Hinblick auf die Einordnung der Isolate in eine Gruppe der Prokaryonten eher unbedeutend, da es sich bei den typischen Verwertern organischer Substrate als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle, wie mono-, heterozyklische und aromatische Verbindungen, häufig um aerobe gramnegative Bakterien handelt (STANIER et al. 1966; PALLERONI 1984; PALLERONI 1991; SÜBMUTH et al. 1999).

Die Untersuchung der Stoffwechseleigenschaften erfolgte zunächst physiologisch-biochemisch unter Verwendung von API- und BBL-Crystal-Testsystemen. Die Wachstumstests auf verschiedenen biochemischen und enzymatischen Substraten waren zur physiologisch-biochemischen Charakterisierung der Isolate von Nutzen. Anhand dieser Tests konnte die Zugehörigkeit der Isolate zur Gattung *Pseudomonas* festgestellt werden. Eine eindeutige Zuordnung der Isolate zu einem einzelnen Taxon der im Elektronischen Codebuch verfügbaren Profildnummern blieb dagegen erfolglos. Da die gebräuchlichen standardisierten Tests hauptsächlich auf die Identifizierung humanmedizinisch relevanter Bakterien ausgerichtet sind, die Limonen-abbauenden Bakterien aber aus verschiedenen Umweltmaterialien entstammen, waren die Ergebnisse zu erwarten. Solche Testsysteme sind zur Identifizierung von Feldisolaten daher ungeeignet. Weitere biochemische Untersuchungen mit dem MikroLog-System lassen anhand des ermittelten Ähnlichkeitsindex⁷ (0,452-0,595) ebenfalls eine Einordnung der Isolate in die Gattung *Pseudomonas* zu, der laut Benutzerhandbuch als akzeptabel gewertet werden kann, allerdings für die eindeutige Spezieszuordnung nicht ausreichte. Die mit diesem System bestimmbar Substratverwertungsmuster eignen sich zur schnellen Einschätzung der Dynamik einer autochthonen Bodenmikroorganismenbiozönose und zur Bewertung ihres mikrobiologischen Abbaupotentials (WÜNSCHE et al. 1995).

Zur chemotaxonomischen Charakterisierung wurden die Gesamtzellfettsäuremuster der Isolate bestimmt und die Fettsäureprofile untereinander, mit getesteten Referenzstämmen als auch mit publizierten Fettsäuremustern verglichen. Durch die Präsenz der für Pseudomonaden charakteristischen Fettsäuren (Tab. 13) gelang die eindeutige Zuordnung zu diesem Genus. Das Isolat L2,6 wies gegenüber den übrigen Isolaten sowie den Teststämmen zum Teil stark

abweichende Fettsäuregehalte von 12:0 (8,77 %) , 14:0 (3,24 %) und 17:0 cyclo (5,18 %) auf. Nach VEYS et al. (1989) spricht die Anwesenheit der Fettsäuren: 10:0 3OH und 12:0 3OH sowie das Fehlen der Fettsäure 12:0 2OH für die Zugehörigkeit zur GLC-Gruppe 3 (*P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*), was für dieses Isolat zutreffend ist. Die für *P. pseudoalcaligenes* von MOSS et al. (1972), MOSS und DEES (1976) sowie MOSS (1981) beschriebene typische Produktion großer Mengen Isobutter- und Isovaleriansäure als auch die fehlende Bildung von Propionsäure war aus dem Fettsäuremuster nicht entnehmbar. Die anderen Stämme ließen sich gut von *P. fluorescens* sowie *P. putida* abgrenzen. Der für die Isolate *L1,2*, *L3,6*, *L3,8*, und *L4,10* ermittelte Ähnlichkeitsindex von > 0,5 spricht zwar nach OSTERHOUT et al. (1991) bei 22-26 Stunden alten Bakterienzellen für eine gute Identifizierung von *P. aeruginosa*, doch wies der Vergleich prozentualer Anteile der Fettsäuren 12:0 2OH, 16:1 ω 7c, 16:0 sowie 19:1 18:1 ω 7c/ ω 9t/ ω 12t signifikante Unterschiede gegenüber den Literaturdaten auf, so daß diese Spezies eher ausgeschlossen wird. Ein mit Limonen getesteter Referenzstamm *P. aeruginosa* ATCC 9027 war zudem nicht in der Lage, Limonen zu verwerten. Obwohl LIPSKI et al. (1992) die Fettsäureanalyse als sehr hilfreiche Methode zur Differenzierung und Charakterisierung von Biofilterisolaten beschreibt, muß Anwendbarkeit des MIS zur Speziesidentifizierung der Isolate hier als begrenzt angesehen werden. Ergänzende chemotaxonomische Untersuchungen, wie die der bei allen Pro- und Eukaryonten enthaltenen Polyamine und der polaren Lipide erlauben eine Einteilung in die Unterklassen prokaryotischer Bakterien, wobei das Taxon *Pseudomonas* der Gamma-Subklasse zugeordnet wird. Die Bestimmung respiratorischer Chinone anhand ihrer Isopreneinheitenanzahl sowie deren Seitenkettenlänge geben zusätzliche Hinweise für die Identifizierung neuer Isolate (BUSSE et al. 1992; BUSSE et al. 1996).

Die Proteingel-Elektrophorese stellt eine sehr vorteilhafte und weitverbreitete Methode dar, mit der sich zu untersuchende Bakterienstämme untereinander als auch mit den Referenzstämmen *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. fluorescens* ATCC 13525 und *P. putida* DSMZ 50906 sehr gut vergleichen lassen, wobei die ermittelten Gesamtzellproteinmuster bedeutende Informationen zum Verwandtschaftsgrad einzelner Stämme geben (SCHLEIFER u. STACKEBRANDT 1983; BUSSE et al. 1996). Durch Vergleich einzelner Proteinbanden im Gesamtzellproteinmuster werden die Isolate *L1,2*, *L2,4* und *L4,10* als identisch betrachtet. Das Proteinbandenprofil von Isolat *L2,6* weist auf signifikante Unterschiede gegenüber den übrigen Isolaten und Referenzstämmen hin. Eine 16S rRNA Sequenzanalyse der Isolate *L2,6*, *L3,6* und *L3,8* sollte im Vergleich mit bereits bekannten Nukleotidsequenzen Aufschluß über deren Verwandtschaftsgrad und Spezieszugehörigkeit geben. Der Vergleich der vollständigen Sequenz des Isolates *L3,6* ergab eine Identität von 97 % mit *P. alcaligenes* und *P. pseudoalcaligenes* LMG1225T, wobei STACKEBRANDT und GOEBEL (1994) Sequenzidentitäten

von über 97 % als aussagekräftigen Hinweis ansehen, die die Zuordnung zu einem Genus erlauben. Hier kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem Isolat *L3,6* um eine neue bisher nicht beschriebene Spezies innerhalb der Gattung *Pseudomonas* handelt. Die Teilsequenzanalyse von Isolat *L3,8* führte im Vergleich mit bereits sequenzierten Stämmen einer Datenbasis zu einer 98 % igen Übereinstimmung mit *Pseudomonas sp.* B13. Die Teilsequenzanalyse des Isolates *L2,6* zeigte eine Identität von 96 % gegenüber der nächsten verwandten Spezies *P. mendocina*, so daß hier damit gerechnet werden muß, daß dieses Isolat zu einem neuen Genus gehört. Da keine der ermittelten Teilsequenzen eine Identität von 100 % aufweist, deutet dies ebenfalls auf die Zugehörigkeit zu einer neuen Spezies hin. Doch ist eine vollständige 16S rRNA Sequenzierung beider Isolate notwendig. Die endgültige taxonomische Einordnung neuer Isolates ist nach DE LEY (1992) erst nach einem Sequenzvergleich durch DNA-DNA-Hybridisierungen mit verwandten Spezies sicher möglich. Viele bisher identifizierte Organismen teilten sich beinahe identische 16S rRNA Sequenzen, wiesen aber durch DNA-Hybridisation Homologiewerte < 70 % auf und präsentieren damit individuelle Spezies (WAYNE et al. 1987; STACKEBRANDT u. GOEBEL 1994).

Zusammenfassend kann herausgehoben werden, daß biochemische und taxonomische Untersuchungen allein für eine Identifikation der Isolate nicht ausreichend waren. Erst mittels der 16S rRNA Sequenzanalyse ließen sich eindeutig Unterschiede zwischen bekannten Spezies innerhalb des Genus *Pseudomonas* feststellen sowie Unterschiede der Isolate untereinander nachweisen. Es handelt sich bei den isolierten Limonen-abbauenden Bakterienstämmen *L3,6*, *L3,8* und *L2,6* eindeutig um verschiedene Spezies, die dem Genus *Pseudomonas* zugeordnet wurden.

5.4 Mikrobieller Abbau von Limonen durch die Kulturen im Batch-Verfahren

Viele Bakterien besitzen für natürliche und synthetische Verbindungen ein größeres Abbau-potential, als es häufig angenommen wird. Die Gründe dafür liegen in einem breiten Substrat-spektrum, der enormen Anpassungsfähigkeit sowie in der hohen Stoffwechselaktivität der Bakterien (GOTTSCHALK u. KNACKMUS 1993). BOLLAG und BOLLAG (1992) bezeichnen den mikrobiellen Abbau als „Zersetzung einer Substanz durch die Aktivität biologischer Wirkstoffe, speziell durch Mikroorganismen“. Der Abbauprozess von Geruchsstoffen unter Beteiligung mehrerer verschiedener Mikroorganismen kann durch Verlust und Fehl-leiten aber auch durch die Akkumulation nicht weiter abbaubarer Metaboliten sehr anfällig sein. Solche Interaktionen von Mikroorganismen mit komplementären Abbaueigenschaften können sich im Sinne eines vollständigen Abbaus ungünstig auswirken und zur Anreicherung

wiederum unerwünschter geruchsbelasteter Verbindungen führen (GOTTSCHALK u. KNACKMUSS 1993).

Im Hinblick auf die Beseitigung von Schad- und Geruchsstoffen, wie z. B. Limonen ist die vollständige mikrobielle Mineralisierung dieses komplexen Stoffes in einfache anorganische Bestandteile, wie Kohlendioxid, Wasser und Mineralsalze bedeutsam. Diese Prozesse werden einerseits durch eine einzelne Spezies realisiert, andererseits kann die Kombination metabolisierender und/oder ko-metabolischer Vorgänge mehrerer Arten notwendig sein (HORVATH 1972; HOPPER 1978; LINGENS 1979). Da sich Limonen durch eine starke Hydrophobie auszeichnet und den Mikroorganismen dadurch eher schwer zugänglich ist, kann nach SWISHER (1970) von einer Anpassungszeit (Adaptation) ausgegangen werden, in der sich die vier Batch-Kulturen durch verschiedene Mechanismen auf den ihnen zugeführten Geruchsstoff eingestellt haben. Adaptation bedeutet, daß sich einzelne, individuelle Zellen an neue Bedingungen, wie z. B. das Vorhandensein neuer Substrate gewöhnen und diese eventuell für sich nutzen können. Eine sehr schnelle Reaktion ist z. B. die enzymatische Adaptation oder die induzierte Enzymsynthese, bei der die Enzyme nur bei Anwesenheit des abzubauenen Substrates synthetisiert werden und durch den bestehenden Selektionsdruck die Bildung dieser Enzyme bereits angeregt wurde (SCHLEGEL 1992). Die vollständige Mineralisierung einer Verbindung erfordert neben den notwendigen Enzymen auch die Bildung geeigneter Transport- und Regulationsmechanismen (BETZ et al. 1974; KNACKMUSS 1979). Zum effektiven Abbau von Limonen waren die Kulturen nach einer Anreicherungszeit von 90 Tagen in der Lage, so daß hier auf die Adaptation der Bakterien durch natürliche Selektion entsprechend des Substratangebotes zu schließen ist. Die Zufuhr des Limonens als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle führte zur Dominanz einzelner Bakterienpezies, die sich durch besondere Eigenschaften auszeichnen. Andere Arten unterlagen, indem sie ganz oder teilweise abstarben. Verschiedene Selektionsmechanismen sind bekannt: Mikroorganismen, die über günstige genetisch determinierte Eigenschaften verfügen, sind konkurrenzfähiger und dadurch im Vorteil. Zum anderen bewirken spontane Mutationen die Entstehung neuer für den Abbau günstiger Eigenschaften (HIPPCHEM 1985). Einen weiteren Mechanismus beschreibt KNACKMUSS (1979) als Austausch genetischen Materials zwischen einzelnen Stämmen, die dadurch einen Selektionsvorteil genießen. Die für den Abbau der Substrate benötigten Enzyme sind dabei auf Plasmiden codiert.

CLAUS (1981) betont in seiner Arbeit, daß zur Optimierung mikrobiologischer Abbauprozesse nicht nur Kenntnisse über die beteiligten Mikroorganismen und ihre Nährstoffansprüche erforderlich sind, sondern auch deren Abbaukinetik und Regulationsmechanismen berücksichtigt werden müssen. In dieser Arbeit wurden Limonen-abbauenden Batch-Kulturen hinsichtlich ihrer Abbaukinetik vergleichend charakterisiert. Dazu wurde das Degradations-

vermögen der gewonnenen Anreicherungskulturen unterschiedlicher Quelle für Limonen gaschromatographisch untersucht und Abbaukurven erstellt. Bei Anfangskonzentrationen von 536,5-759,5 mg Limonen je Liter Mineralsalzmedium mit einem pH-Wert von 7,0 war im Versuch 1 nach 53 Stunden Inkubationszeit (28 °C) bei allen Proben Limonen weder gaschromatographisch noch olfaktorisch feststellbar. Abgesehen von geringfügigen Schwankungen des Limonengehaltes verhielten sich die mitgeführten Kontrollproben annähernd konstant, wobei hier methodische Meßfehler in Betracht gezogen werden müssen. Zur gaschromatographischen Bestimmung der Limonenkonzentrationen in Schüttelkultur wurde die Verbindung durch wiederholtes Ausschütteln mittels tertiärem Butylmethylether extrahiert und anschließend zentrifugiert. Wegen der leichten Flüchtigkeit mußte mit Verlusten gerechnet werden, die aber auch Folge abiotischer Prozesse sein konnten. Da der Probenansatz in gasdicht verschlossenen Erlenmeyerkolben erfolgte, war ein Entweichen durch aufgeschraubte Teflonsepten aber nicht gegeben. Eine abiotisch bedingte Konzentrationsminderung von Limonen wird daher ausgeschlossen und von einem vollständigen Limonenabbau ausgegangen. Im Versuch 2 zeigten die Proben 3 und 4 nach 59 Stunden ein Abbauverhalten bis unter die Nachweisgrenze. Olfaktorisch hinterließen diese Proben einen neutralen Geruchseindruck. Ausführliche Untersuchungen zur Sauerstoffkonzentration der Proben zeigten in vorangegangenen Versuchen bei einer Bebrütungstemperatur von 28 °C keine Werte unterhalb 90 bis 95 % der Sättigungsgrenze. Eine Sauerstoff-Limitation kommt als wachstumslimitierender Faktor somit nicht in Frage.

Nach einer Lag-Phase von 18 bis 21 Stunden (Versuch 1) und von 8 bis 17 Stunden (Versuch 2) ohne nennenswerte Konzentrationsminderung von Limonen konnte dagegen in den exponentiellen Wachstumsphasen aller Kulturen ein starkes Abbauverhalten festgestellt werden. Die stationäre Wachstumsphase wurde nach ca. 30 bis 48 Stunden erreicht, was sicher auf einen Substratmangel zurückzuführen ist und zum Wachstumsstillstand sowie zur Abnahme der Bakterienzahl führte. Der pH-Wert zeigte bei den sterilen Kontrollproben eine annähernde Konstanz. Dagegen fiel der pH-Wert bei allen Proben zum Versuchsende hin von 6,9 des Mineralsalzmediums in den sauren Bereich von 6,6 bis 6,3 (Tab. A 12, A 14, Anhang). Möglicherweise führte eine Ansammlung der als Stoffwechselprodukte entstandenen negativ geladenen Teilchen zu diesem Effekt.

Insgesamt wurden trotz der unterschiedlichen Inokulationsquellen bei Substratkonzentrationen von 536,5-889,5 mg/l keine wesentlichen Unterschiede in der Kinetik des Limonenabbaus bei den vier Anreicherungskulturen festgestellt. Alle Batch-Kulturen unterschiedlicher Herkunft waren in der Lage, Limonen als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle ohne Zufuhr von Cosubstraten zu verwerten und den Geruchsstoff vollständig ohne Akkumulation geruchsintensiver Metaboliten zu mineralisieren. Die mittleren Abbauraten

lagen zwischen 48,1 und 51,0 mg l⁻¹h⁻¹. Weiterhin sind alle Anreicherungskulturen zum Wachstum auf Limonen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle bei gleichzeitiger Bildung von Biomasse befähigt. Damit wird deutlich, daß Limonen-abbauende Mikroorganismen ubiquitär vorkommen und keine besonderen Standort- und Milieuanforderungen für Anreicherungen nach dem fed-batch-Prinzip stellen. Dies kann als weiterer Vorteil des Konzeptes gegenüber dem aufwendigen Arbeiten mit Reinkulturen gewertet werden.

Metabolite ließen sich mit den am Institut etablierten gaschromatographischen Methoden nicht nachweisen. Während der mikrobiellen Umsetzung des Limonens wurden wiederholt Proben mit erwarteten Metaboliten, wie α -Terpineol, 1,2-Diole, Perillylalkohol, Perillensäure oder 3-Isopropenylpimelinsäure mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und so bis zur Trockne eingengt, in Hexan aufgenommen und gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht. Möglicherweise führte die Methodik der Probeneinengung (Einfrieren) zu einem Verlust entstandener Intermediärverbindungen, so daß sich geringste Konzentrationen gaschromatographisch nicht mehr detektieren ließen. In den vorliegenden Untersuchungen verhielten sich die Batch-Kulturen nach erfolgtem Limonenabbau geruchsneutral, weshalb auf erweiterte Verfahrenstechniken zum Nachweis von Metaboliten bewußt verzichtet wurde. Von Bedeutung ist weiterhin die Tatsache, daß es sich bei den Limonen-metabolisierenden Anreicherungskulturen um Mischpopulationen handelt. Nach BOLLAG und BOLLAG (1992) sowie GOTTSCHALK und KNACKMUSS (1993) ist ein gesteigerter biologischer Abbaugrad erst dann zu erwarten, wenn sich die Bakterien einer Mischkultur in ihren vorhandenen mikrobiellen Aktivitäten des Partialabbaus ergänzen und gemeinsam die Mineralisierung der zugeführten Substanz bewirken. Offenbar führten synergistische Wechselwirkungen innerhalb der angereicherten Mischkulturen zu einem vollständigen Abbau des Geruchsstoffes in Flüssigkultur. Mikrobielle Mischpopulationen besitzen gegenüber einzelnen Spezies ein höheres und vielseitiges Abbaupotential. Die Autoren weisen allerdings darauf hin, daß ein Zusammenwirken von Mikroorganismen mit komplementären Abbaueigenschaften im Sinne einer vollständigen Degradation kritisch sein kann, wenn entstandene Umsetzungsprodukte nicht weiter mikrobiologisch abbaubar sind oder abiotischen Folgereaktionen unterliegen.

In der zum mikrobiellen Abbau von Limonen bekannten Literatur wurden die Abbaumechanismen ausschließlich anhand einzelner Mikroorganismenspezies oder Stämme untersucht. Auffällig ist hierbei, daß bei den bisher für Limonen aufgedeckten Abbauwegen nur zwei von ihnen zu einer vollständigen Metabolisierung des Geruchsstoffes führen. Bei den isolierten Mikroorganismen handelt es sich hauptsächlich um verschiedene Bakterien der Gattung *Pseudomonas*, die Limonen zu Perillyl-CoA bzw. 3-Isopropenyl-pimelyl-CoA und letztendlich zu Kohlendioxid und Wasser oxidieren (DHAVALIKAR u. BHATTACHARYYA

1966; DHAVALIKAR et al. 1966; DHERE u. DHAVALIKAR 1970; MADYASTHA et al. 1977; RAMA DEVI u. BHATTACHARYYA 1977 a, b; MADYASTHA u. RENGANATHAN 1984; TRUDGILL 1986; CADWALLADER et al. 1989).

Mit der mikrobiellen Umwandlung von Limonen durch *Rhodococcus erythropolis* DCL14 entdeckten VAN DER WERF et al. (1999) einen zweiten vollständigen Abbauweg, bei dem der Geruchsstoff über 1-Hydroxy-2-oxolimonen zu 3-Isopropenyl-6-oxoheptanoat, dann zu 3-Isopropenyl-6-oxoheptanyl-CoA transformiert wird und letztendlich über die β -Oxidation zu Kohlendioxid und Wasser zerfällt.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen weisen bei den Limonen-abbauenden Bakterien auf Bakterien der Gattung *Pseudomonas* hin. Im Zusammenhang mit der Biokonversion von natürlichen sowie naturfremden Substanzen, den Xenobiotika, werden immer wieder Vertreter der Pseudomonaden als universelle Substratverwerter hervorgehoben (SCHLEGEL 1992; SÜBMUTH et al. 1999). Das Fehlen möglicher Metaboliten, wie α -Terpineol, Perillenalkohol oder Perillensäure spricht für einen intakten Biosyntheseweg, der durch die am Abbau beteiligten Enzymsysteme der gewonnenen Bakterienkulturen realisiert wird. Das zugeführte Substrat wurde dabei sofort mikrobiell zu Reaktionsprodukten abgebaut, die nicht nachweisbar waren. Die Schlußfolgerung der vollständigen Oxidation des Geruchstoffes durch die angereicherten Bakterien in den eigenen Untersuchungen kann somit noch bekräftigt werden. Bakterien mit kompletten und effektiven Abbauwegen sollten daher bevorzugt zum Abbau von Schad- und Geruchsstoffen in der biologischen Abluftreinigung eingesetzt werden. Um den Limonenabbau durch die angereicherten Mischbiozönosen noch effizienter zu gestalten, ist die Optimierung der Nährstoffbedürfnisse erforderlich, was durch die Anwendung des Mineralsalzmediums nach Mitzkat sowie durch die ermittelten optimalen Wachstumsbedingungen (Abschnitt 4.4.5) realisiert wurde.

5.5 Einfluß der Substratkonzentration auf den Limonenabbau

Der mikrobielle Abbau kann von der Konzentration der zugeführten Geruchs- oder Schadstoffe abhängig sein. Bakterien besitzen wegen ihrer geringen Größe und dem daraus resultierenden günstigen Oberflächen-Volumen-Verhältnis sehr gute Voraussetzungen für die rasche Energiegewinnung und den Stofftransport in die Zelle. Sie sind so in der Lage, mehr Substrate aufzunehmen und Energie in Form von ATP zu synthetisieren. Substratmangel führt z. B. dazu, daß die Energie, die sie für die Aufrechterhaltung ihrer Cytoplasmamembranen benötigen, nicht mehr ausreicht und zum Absterben der Zellen führt (GOLDSTEIN et al. 1985; GOTTSCHALK u. KNACKMUSS 1993). Bekannt ist, daß vorhandene Enzyme Substanzen mit steigender Substratkonzentration schneller umsetzen. Untersucht man den

Einfluß der Substratkonzentration auf die mikrobielle Umsetzung dieser Verbindung durch angereicherte Mikroorganismen, so ist dies mit der Bestimmung der Aktivität der am Abbau beteiligten Enzyme möglich. Aus der Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion (v) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (S) erhält man die Substratsättigungskurve. Die Michaelis-Menten-Konstante gibt die Substratkonzentration an, bei der das Enzym zur Hälfte mit Substrat gesättigt ist und die halbmaximale Geschwindigkeit erreicht hat. Die maximale Geschwindigkeit ist bei Substratüberschuß erreicht, wenn das Enzym also substratgesättigt ist (SABO 1991; KÖHLER und HOFMANN 1992; SCHLEGEL 1992, SÜßMUTH et al. 1999). Hohe Substratkonzentrationen können zu toxischen Effekten führen, die sich z. B. in einer Schädigung der Cytoplasmamembran sowie in der Hemmung der Enzymsynthese äußert. Folge ist eine Wachstumshemmung der Mikroorganismen verbunden mit einem verminderten Abbau der zugeführten Verbindungen (EDWARDS 1970). Das Hemmungsverhalten von Schadstoffen industrieller Herkunft kann ebenfalls durch eine Inhibitor-Funktion beschrieben werden, in die die Hemmkonstante K_i eingeht, wobei der Hemmeffekt ebenfalls eine Abnahme der maximalen Abbaukapazität der Mikroorganismen hervorruft (ANDREWS 1968).

Die antimikrobielle Wirkung des Limonens ist vielfach beschrieben worden. Limonenkonzentrationen von $\geq 0,05$ g/l führen zu einer vollständigen Wachstumshemmung einiger Spezies der Gattung *Bacillus*. CHANG und ORIEL (1994) ermittelten eine starke Beeinträchtigung des Wachstums von *Bacillus stearothermophilus* BR388 bei Limonenkonzentrationen $> 1,2$ g/l. Methanogene Bakterien werden bei Substratkonzentrationen von 0,09-0,15 g/l zu 50 % inhibiert, bei einem Limonengehalt $> 0,17$ g/l liegt der Effekt sogar schon bei 80 % (ANDREWS et al. 1980; ABRAHAM et al. 1985; SIERRA-ALVAREZ UND LETTINGA 1990). Weniger als 5 % mikrobielle Umsetzung durch *Penicillium italicum* und *Penicillium digitatum* fand BOWEN (1975) bei einer Limonendosierung > 16 g/l in der Fermentationskultur. DHAVALIKAR und BHATTACHARYYA (1966) beobachteten dagegen bei Anfangskonzentrationen von 2,5-3,3 g/l eine vollständige Substratverwertung durch die von ihnen angereicherten Pseudomonaden. Vorangegangene Tests zeigten, daß der Limonengehalt für eine optimale Umsetzung in einem Bereich zwischen 2,5-5,0 g/l liegen sollte. Auch nach Zugabe sehr hoher Limonenkonzentrationen von 16,8 g/l konnte von DHAVALIKAR (1964) in diesen Tests keine toxische Wirkung auf die isolierten Bakterien festgestellt werden, was für eine außerordentliche Resistenz dieser Isolate spricht.

In dieser Arbeit wurde der Limonenabbau sowie das Wachstum zweier ausgewählter Batch-Kulturen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen untersucht (Abschnitt 4.3.2). Anfangskonzentrationen von 1250-2106 mg/l wurden von beiden Kulturen vollständig mikrobiell umgesetzt. Eine Konzentrationssteigerung auf 3045-3206 mg/l führte zu einem eingeschränkten Limonenabbau mit dem Nachweis geringer Restkonzentrationen. Die Bakterien

zeigten ein starkes Wachstum bei einer leicht verzögerten Lag-Phase. Die maximalen Abbauraten von 176,4-248,3 mg l⁻¹h⁻¹ bewegten sich in einem Konzentrationsbereich von 3206-4062 mg/l Medium. Eine sehr deutliche Substrathemmung bewirkten Limonenkonzentrationen > 4062 mg/l. Das Bakterienwachstum war stark verzögert und stagnierte schließlich ganz. Höhere Limonenkonzentrationen > 4062 mg/l üben offensichtlich eine toxische Wirkung auf Bakterienzellen aus. Dieser Effekt kann sich in einer Hemmung der Enzymaktivität äußern oder die Folge des verminderten Zutritts von Sauerstoff ins Kulturmedium sein, da sich das Substrat bei Zugabe zunächst auf der Flüssigkeitsoberfläche ausbreitete. Auch eine Akkumulation toxischer Abbauprodukte könnte sich inhibierend auf die weitere Verwertung des Limonens auswirken. Ein maximaler Abbau toxischer und/oder schwer wasserlöslicher Schadstoffe durch Bakterien ist folglich eher zu erwarten, wenn solche Verbindungen über einen längeren Zeitraum in niedrigeren Konzentrationen der Flüssigkultur zugeführt werden.

5.6 Abbau von Limonen im Modellbiofilter

Der Abbau der in hohen Konzentrationen in der Kompostierungsabluft vorhandenen und sehr schlecht wasserlöslichen Terpenverbindung ist im Biofilter häufig mit langen Anpassungszeiten verbunden und geschieht oft unbefriedigend mit stark schwankendem Wirkungsgrad (JÄGER u. JAGER 1978; GIESE 1995; HEIDA et al. 1995).

Eine erste Beurteilung des Abbaupotentials für Limonen erfolgte zunächst mittels eines konventionellen Modellbiofilters, um erste Aussagen zur Adaptationsphase und Anreicherung von Limonen-abbauenden Mikroorganismen im Biofilter treffen zu können (Abschnitt 4.1.1). Dieser Versuch zeichnete sich vor allem durch die lange Adaptationsphase von 81 Tagen aus, in der das Limonen mit sehr niedrigem Wirkungsgrad von 0 bis maximal 76,6 % mikrobiell umgesetzt wurde. Nach Erschöpfen der spezifischen Sorptionskapazität des Filtermaterials ist die Adaptationsphase durch einen zunehmenden Abbau des sorbierten Abluftinhaltsstoffes durch die an den Geruchsstoff adaptierten Mikroorganismen geprägt (HIPPCHEM 1985). So pegelte sich der Biofilter nach 81 Tagen auf Wirkungsgrade zwischen 72,5 und 82 % ein und erreichte die Gleichgewichtsphase zwischen Sorption und mikrobiellem Abbau. Die maximale Abbauleistung von 94,4 % konnte einmalig am 96. Versuchstag bei Rohgaskonzentrationen 66 mg/m³ festgestellt werden. Nach SABO (1991) ist die Dauer der einzelnen Phasen vom Trägermaterial als auch von der Zusammensetzung der Abluftkomponenten abhängig. Ist die Adaptationszeit sehr lang, kann die Sorptionskapazität des Filtermaterials erschöpft sein, bevor überhaupt ein mikrobieller Abbau stattfindet. Die Lebendkeimzahl lag anfangs recht niedrig bei 4,5 x 10⁵ bis 5,2 x 10⁶ KBE/g Filtermaterial. Stabilere Werte wurden erst ab dem

82. Versuchstag von $2,7-7,2 \times 10^8$ erreicht. Diese Ergebnisse lassen auf einen langwierigen Selektionsprozeß der zum Limonenabbau befähigten Mikroorganismenpopulationen im Filtermaterial schließen.

Unterschiede in den Keimzahlen zwischen adaptiertem und nichtadaptiertem Filtermaterial weisen nach REICHARDT (1978) und HIPPCHEM (1985) auf eine Verschiebung innerhalb der Populationsstruktur der Mikroorganismen hin. Viele Stoffe sind erst nach einer Adaptationszeit verwertbar, wenn sich die Mikroflora z. B. durch die natürliche Selektion auf das neue Substrat eingestellt hat. (SWISHER 1970). Da besonders in der Anpassungsphase auffällige Meßwertschwankungen zu beobachten waren, mußten weiterhin Veränderungen in der Probenahmetechnik durch Verkleinerung des Probenahmenvolumens sowie in der gaschromatographischen Analytik durch die Optimierung des GC-MS Temperaturprogrammes vorgenommen werden.

Die vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, wie problematisch es ist, geringe Konzentrationen der geruchsintensiven Verbindung Limonen unter Anwendung des Biofilterverfahrens zu beseitigen. Zur weiteren Intensivierung des Limonenabbaus wurden Überführungsversuche mit Limonen-abbauenden Anreicherungskulturen in zwei parallel betriebenen Modellbiofiltern (Abschnitt 3.3.2), die mit Limonen beschickt wurden, durchgeführt. Beim Durchsatz beider Biofilter mit unbelasteter Umgebungsluft konnten Limonen bzw. andere organische Verbindungen gaschromatographisch nicht analysiert werden, so daß die im abluftbelasteten Biofilter ermittelten Reingaskonzentrationen dem tatsächlichen durch die Bakterien abgebauten Limonengehalt entsprachen. Kurz nach Inbetriebnahme der Biofilter wurde Limonen stark schwankend abgebaut (Abb. 19) Die anfangs ermittelten Wirkungsgrade bis zu 98 % lassen auf eine hohe Sorptionskapazität des Trägermaterials (Koks-Kompost-Gemisch) schließen (HIPPCHEM 1985). Mit der kurzen Anpassungszeit von 34 Tagen (beimpfter Biofilter = BF 1) und ca. 45 Tagen (unbeimpfter Biofilter = BF 2) konnte die Adaptationsphase gegenüber dem ersten Biofilterversuch eindeutig verkürzt werden. Danach wurde Limonen im beimpften Biofilter mit Wirkungsgraden zwischen 78 und 100 % bei Rohgaskonzentrationen von $15,6-102,4 \text{ mg/m}^3$ eliminiert. Im unbeimpften Biofilter wurde der Geruchsstoff dagegen zwischen 0-68,5 % sowie einmalig bis zu 74 % abgebaut. Die Abbauleistung bewegte sich damit deutlich unter der des inokulierten Filters. Das Unterlassen der Inokulation führte zu einer Absenkung des Wirkungsgrades von 99 % auf 40 % innerhalb von 21 Tagen, wobei die Biofilteraktivität durch erneute Beimpfung auf 87 % gesteigert werden konnte. Wiederholtes Aussetzen der Beimpfung übte dagegen keinen hemmenden Einfluß auf die Funktionsleistung des Biofilters aus, was die ermittelten hohen Wirkungsgrade zwischen 82 % und 91 % verdeutlichen. Auch in den Versuchszeiträumen ohne Applikation von Anreicherungskultur wurde Limonen vom

Biofilter 1 effektiver abgebaut. Die durch Olfaktometrie bestimmten Geruchsstoffkonzentrationen (Abb. 20) und ermittelten Geruchsminderungsgrade zwischen 84 % und 100 % (Tab. A 29-30, Anhang) nach abgeschlossener Adaptationszeit bestätigen die Ergebnisse der GC-MS-Analyse. Zu erwähnen ist hier der sogenannte Eigengeruch von Biofiltermaterialien, der häufig als Grund für die unvollständige Geruchsstoffelimination bis zur Geruchsschwelle angesehen wird. EITNER (1984) untersuchte den Eigengeruch von Kompost und stellte anfangs Werte von bis zu 50 GE/m³ nach einigen Tagen maximal 6 GE/m³ fest. Die Analyse dieser Geruchsstoffe ergab, daß unter anderem Limonen mit für diesen Geruch verantwortlich ist. Nach der VDI-RICHTLINIE 3881 (1986) werden Veränderungen in der Geruchsqualität, bedingt durch den Eigengeruch des Biofilters, durch den Geruchsminderungsgrad nicht berücksichtigt. Trotzdem erfüllen solche Biofilter ihre Reinigungsfunktion (VDI-RICHTLINIE 3477/1991).

Zu bemerken ist, daß die Meßwerte insbesondere die der Rohgaskonzentration als auch die ermittelten Geruchsstoffkonzentrationen größere Schwankungen aufwiesen, die im Zusammenhang mit dem Verfahren der Limonendosierung im Beschickungsteil des Biofilters zu sehen sind. Die Zufuhr der schwer wasserlöslichen, leicht flüchtigen Verbindung gestaltete sich methodisch recht schwierig. Um eine günstigere Sorption der Abluftkomponente im Trägermaterial zu erreichen und die Aufnahme des Substrates durch die Mikroorganismen zu optimieren, wurde die leicht flüchtige Verbindung zunächst in einem beheizten Glaszylinder verdunstet und somit in die Gasphase überführt und dem Rohluftstrom zugegeben. Das Beheizen des mit Limonen beschickten Glaszylinders führte zu einem Festsetzen und Verkleben des Limonens an den zuführenden und ableitenden Verbindungsstücken, wodurch eine mehrmalige Reinigung bzw. ein Austauschen des gesamten Glaszylinders erforderlich war, so daß hier größte Verluste der Rohgaskonzentrationen durch Schwankungen in der Limonenzufuhr wahrscheinlich sind. Andererseits werden in der Literatur häufig sorptive Verluste von Gasspuren als Ursache für analytische Fehlmessungen genannt, die auf absorptive und adsorptive Wandeffekte verschiedener Materialien, wie z. B. Glasoberflächen zurückzuführen sind (BACHHAUSEN et al. 1985).

Im Hinblick auf die Anforderungen an die Begrenzung der organischen Kohlenstoff-Gesamtfracht (TOC) wurde auf die Probleme der Reinigung belasteter Abluft mittels biologischer Abluftreinigungsanlagen, insbesondere beim Einsatz konventioneller Biofilter, in letzter Zeit häufiger hingewiesen (ANON. 1999, 2000; HEINIG et al. 2000; SABO 2000). Kritisch bemerkte RAFFLENBEUL (2000), daß diese Anlagen in ihrem Anwendungsbereich nur unbefriedigend funktionieren. Die Intensivierung des Limonenabbaus durch adaptierte Bakterienkulturen im Biofilter würde daher gleichzeitig bedeuten, die physikalisch-technolo-

gischen Parameter in die künftigen Untersuchungen miteinzubeziehen und sie gegebenenfalls zu optimieren.

Als Trägermaterial wurde ein Koks-Kompost-Gemisch gewählt. Kompost stellt ein komplexes Nährmedium dar, mit dem ein vielfältiges Mikroorganismenspektrum angesiedelt werden kann. HEINIG et al. (2000) betonen in ihrer Arbeit die Optimierung verfahrenstechnischer Parameter, insbesondere bei der Verwendung von Kompost als Strukturmaterial. Eine Vernässung oder Setzung von Kompostmaterial verursacht höhere Druckverluste und bedeutet gesteigerte Energiekosten. Nach SABO (1990) bewirkt eine Erhöhung des Feuchtegehaltes auf 40-50 % (w/w) besonders bei feinkörnigem Material, wie Kompost, eine Abnahme der Filtermaterialdurchlässigkeit um ca. 20 %, was wiederum eine Erhöhung der Druckverluste nach sich zieht. Um nachteilig wirkende Verdichtungen und hohe spezifische Druckverluste zu vermeiden, wurde Aktivkoks als Strukturmaterial und Adsorbens hinzugefügt. KLICHE et al. (1998) hoben weiterhin die gesteigerte Sorptionsfähigkeit und die damit verbundene Verbesserung der Abbauleistung durch Verwendung dieses Strukturmaterials als großen Vorteil heraus. Durch die große Oberfläche wurde ein zusätzlicher Aufwuchs von Mikroorganismen angestrebt. Außerdem kann durch eine größere Stoffaustauschfläche der Stofftransport verbessert werden (BARDTKE et al. 1992). Die Anwesenheit möglichst vieler Poren ähnlicher Größe führt zu einer gleichmäßigeren Geschwindigkeitsverteilung über dem Biofilterquerschnitt, was sich wiederum günstig auf das Verweilzeitverhalten im Biofilter auswirkt und eine Möglichkeit zur Optimierung darstellt. Die Verweilzeit ist für die Effizienz biochemischer Umsetzungsreaktionen mit entscheidend (SABO 1991; BARDTKE et al. 1992; HEINIG 1998). Druckverluste der Strömung im Filtermaterial entstehen durch betriebsbedingte Verdichtungen und werden durch stetig schwankende Wassergehalte im Trägermaterial noch verschärft. Während längerer Standzeiten (2-3 Jahre) muß das Trägermaterial häufig gelockert oder gar ausgewechselt werden. Die Aufrechterhaltung der Materialstruktur gelang im zweiten Biofilterversuch problemlos mit dem verwendeten Koks-Kompost-Gemisch. Die zusätzliche Auflockerung des Trägermaterials war während der 150-tägigen Betriebszeit daher nicht erforderlich und stellt im Hinblick auf die Minderung des Strömungswiderstandes eine weitere Optimierungsmaßnahme dar.

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Wirksamkeit eines Biofilters stellt ein optimaler Wassergehalt dar, der zur Gewährleistung der mikrobiologischen Aktivität in einem Bereich zwischen 20-60 % (w/w) liegen sollte (WINDSPERGER 1989). Die biochemische Umsetzung der Abluftinhaltsstoffe in den Mikroorganismen setzt die Anwesenheit von Wasser als Lösungsmittel voraus. Unterhalb eines Mindestfeuchtegehaltes von 30 % läßt die mikrobielle Aktivität deutlich nach oder stellt sich ganz ein (BARDTKE et al. 1992; SABO et al.

1994). Durch ausgetrocknete Zonen im Filtermaterial gelangt die schadstoffbelastete Luft ungereinigt hindurch und führt zu einer Verschlechterung des Wirkungsgrades. Ungünstig wirkt sich auch eine ungleichmäßige Wasserverteilung oder eine Vernässung im Biofilterbett aus, so daß schlecht belüftete Nässezonen oder eine Kanalbildung das Abbauverhalten aerober Mikroorganismen nachteilig beeinflussen. VAN LITH (1989) stellte fest, daß eine Überfeuchtung zu einer Verdichtung des Biofilters und zur Entstehung nicht durchströmter Zonen führt. Für die Aufrechterhaltung einer optimalen Materialfeuchte sieht der Autor daher die Feuchtesättigung der Biofilterzuluft an. SABO (1991) beschreibt, daß für einen optimalen Feuchtegehalt von 40-50 % (w/w) eine Luftfeuchte von 100 % notwendig ist. Ein einmal ausgetrocknetes Filterbett (Feuchte < 5 %, w/w) läßt sich auch durch eine 100 % gesättigte Zuluft nicht wieder aktivieren (SABO et al. 1994). Durch den Einsatz der Füllkörper-Befeuchtungseinrichtung konnte mit einer 100 % igen Wasserdampfsättigung eine gleichmäßige Durchfeuchtung des Filtermaterials zwischen 42-44 % (w/w) erreicht werden. Die Erwärmung des Rohluftstromes um 3-4 °C gegenüber der Umgebungstemperatur führte sogar zu einer von HEINIG et al. (2000) beschriebenen Übersättigung des Rohluftstromes, die einen stabilen Biofilterbetrieb gewährleistete. Eine Austrocknung konnte so vermieden werden. Dieses Verfahren ist daher in jedem Fall der problematischen Tropfbefeuchtung vorzuziehen, die im ersten Biofilterversuch zum Einsatz kam, und zu den schon erwähnten Effekten, wie Nässezonen- und Kanalbildung führte.

5.7 Wirksamkeit der Inokulationskulturen im Biofilter

Informationen zur Optimierung des Limonenabbaus im Biofilter mittels Animpfkulturen existierten bisher kaum. In dieser Arbeit wurden erstmals konkrete Untersuchungen zum Limonenabbau im Biofilter mit adaptierten Bakterienkulturen vorgenommen. Die Strategie bestand in der Verbesserung des Limonenabbaus im Biofilter durch eine leistungsfähige an den Geruchsstoff adaptierte Mischkultur bei gleichzeitiger Optimierung physikalisch-technischer Parameter. Während dem einen Biofilter ein Mix der vier angereicherten Bakterienkulturen appliziert wurde, diente ein zweiter nicht inokulierter Biofilter als Vergleich. Nach Adsorption des Substrates an das Filtermaterial erfolgt die schrittweise biologische Umsetzung durch die Kompostmikroflora, die sich je nach Substratangebot entwickelt. Frisches Filtermaterial enthält eine große mikrobielle Diversität unterschiedlicher Populationsdichten, wobei nur wenige Mikroorganismen zum Schadstoffabbau in der Lage sind. Anpassungszeiten von wenigen Stunden bis zu mehreren Wochen sind erforderlich. Zur Verkürzung der Adaptationsphase kann das Filtermaterial mit geeigneten Mikroorganismen beimpft werden (GUST et al. 1979 a; VDI-RICHTLINIE 3477/1991; STEIN 1992). In der

vorliegenden Arbeit konnte mit der Applikation der Mischkultur in das Trägermaterial eine signifikante Verkürzung der Adaptationsphase um 47 Tagen gegenüber dem ersten Biofilterversuch erreicht werden, was den sinnvollen Einsatz dieser Inokulationskultur hervorhebt. Auch die im vorherigen Abschnitt geführten Betrachtungen der Abbauleistungen fällt zugunsten des beimpften Biofilters aus, die über den gesamten Versuchszeitraum gesehen eindeutig besser ausfielen. Der Einsatz von Starterkulturen in der Abwassertechnik, zur mikrobiologischen Bodensanierung oder zur Verbesserung der Abbaupazitäten im Biofilter ist Gegenstand zahlreicher Diskussionen, wobei die Meinungen stark auseinander gehen. In einem mit DMDS belasteten Biofilter konnte RASCHKE (1999) eine Erhöhung der Abbaupazität durch die Animpfung mit adaptierten Misch- oder Reinkulturen bzw. durch gezielte Stimulierung der am Abbau beteiligten Stämme Mikroorganismen nachweisen. Nach Ergebnissen von KÄMPFER et al. (1995) haben Starterkulturen nur geringe Chancen, sich z. B. im Boden bzw. in Mieten zu etablieren, obwohl Ausnahmen durch begünstigte Umstände nicht ausgeschlossen werden. Kritisch zu bemerken ist, daß sich die Untersuchungen der Forschungsgruppe einseitig auf die quantitative Betrachtung und den Vergleich der Bakterienzahlen im Boden von beimpften und unbeimpften Mieten stützten, die nur eine geringfügige Erhöhung der Zahlenwerte der mit Starterkultur versetzten Mieten ergab. Die Zusammenlegung der Artenspektren der Mietenproben brachte keine mikrobiologisch differenzierbare Veränderung der Mikroflora mit sich, so daß die Autoren eine Etablierung der veränderten Mikroflora ausschlossen. Die eigenen Überführungsversuche brachten bei der Bestimmung der Mikroorganismendichte im Biofilter ähnliche Ergebnisse. Im beimpften Biofilter lagen die Gesamtzellzahlen nach der Adaptation nur unwesentlich über denen im Biofilter ohne Kultur. Die mikrobiologische Charakterisierung des Biofiltermaterials zeigte eine leichte Abnahme der mikrobiologischen Diversität innerhalb der Mikroorganismenbiozönose und führte in der Gleichgewichtsphase zur Selektion charakteristischer Gattungen, wie *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* und *Aeromonas*, die physiologisch-biochemisch gehäuft nachgewiesen werden konnten. Bei den Limonen-abbauenden Mikroorganismen handelt es sich nicht um Abbauspezialisten, da viele ubiquitär vorkommende Mikroorganismen in der Lage sind, Limonen mikrobiell umzusetzen. Die Wirksamkeit der Inokulationskulturen im Biofilter läßt sich daher mittels einseitiger taxonomischer Charakterisierung nicht analysieren, was das Wiederfinden und die Erfassung der aktiv Limonen-abbauenden Mikroflora sehr schwierig macht. Die Populationsdichte eines Biofilters läßt sich mit den derzeitigen Methoden nicht exakt bestimmen. Die Abbauleistung von Biofiltern sollte daher auf das Volumen des Biofilters bezogen werden (BARDTKE 1990). GIESE (1995) weist ebenfalls auf die Schwierigkeiten hin, die Reinigungsleistung in einem mit Kompostierungsabluft belasteten Biofilter einer konkreten Mikroorganismenzusammensetzung oder einer ent-

sprechenden Besiedelungsdichte zuzuordnen. Durch die Bestimmung mittlerer Keimzahlen konnte nicht auf die Wirksamkeit eines Biofilters geschlossen werden. Auch das Einbringen hochkonzentrierter Animpfkulturen führte nicht zur Intensivierung des Geruchsstoffabbaus im Biofilter. Hohe Eliminationskapazitäten für Limonen, bei einer Startphase von weniger als fünf Tagen, beobachtete SMET (1997), wobei eine Animpfung des mit Kompost als Trägermaterial befüllten Biofilters nicht notwendig war. Dagegen sind die Hersteller von schadstoffadaptierten Mikroorganismen von deren Wirksamkeit überzeugt. Sie weisen allerdings bei der Anwendung auf die Einhaltung mehrerer mikrobiologischer Erfordernisse hin (BEYER 1995). Die GC-MS-Analyse sowie die Bestimmung der Geruchsstoffkonzentration waren in der vorliegenden Arbeit dagegen geeignete Methoden, mit denen die Wirksamkeit der Inokulationskulturen im Biofilter eindeutig nachgewiesen werden konnte. Auch CLAUS (1993) vertritt in seiner Arbeit zum Abbau von Methylsulfiden die Ansicht, daß sich die Verwertung dieser Schadstoffe nur mittels gaschromatographischer Analyse belegen läßt, da die durch Wachstumstest ermittelten Eigenschaften der Bakterien nur indirekte Hinweise auf deren Funktion im Biofilter geben. Nach BENDINGER (1992) ist die Quantifizierung der Abbauleistung eines Biofilters der erste Indikator für die metabolische Aktivität der Mikroflora. Der Autor stellt heraus, daß die große Speziesvielfalt einer Inokulationskultur die Anwesenheit geeigneter Organismen begünstigt, die sich vermehren und zu einem Anstieg der adaptierten Flora führt. Je besser die Kultur ist, mit der der Biofilterbetrieb gestartet wird, um so schneller kann ein effektiver Biofilterprozeß erwartet werden. Häufig wird eine Beimpfung von synthetischem oder inertem Biofiltermaterial empfohlen, bei dem ein biologischer Aufwuchs erst geschaffen werden muß. Von Bedeutung ist ebenfalls die Abluftzusammensetzung. Bei wechselnden Abluftkomponenten werden in der Umwelttechnik eher Mischkulturen eingesetzt, die als breitere Population komplexer am Schadstoffabbau beteiligt sind und gleichzeitig unempfindlicher auf Milieuveränderungen reagieren. (VDI-RICHTLINIE 3477/1991; KOBELT 1998). Als Modellmikroorganismen wurden von HUBER und MENNER (1995), z. B. *P. putida* und *E. coli* eingesetzt, die sich nicht zu stark in ihren Wachstumsbedingungen und Substratansprüchen unterscheiden und somit die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Mischkulturfermentation erfüllen. Auf ein allgemeines Mischkultursystem lassen sich diese Ergebnisse nach Meinung der Autoren allerdings nicht übertragen, da mit zunehmender Dichte der beteiligten Spezies auch erhöhte Wechselwirkungen und Milieuansprüche zu erwarten sind. Die Autoren stellten weiterhin fest, daß durch den sofortigen Einsatz von Starterkulturen die Reinigungsleistung einer Anlage in Problemsituationen aufrechterhalten bzw. in kurzer Zeit wieder hergestellt werden konnte. Die notwendige Bereitstellung der Vorkulturen wird durch Stammkulturen realisiert. Da die für die Animpfung erforderlichen Mengen durch Fermentation frisch erzeugt werden, ist das

Verfahren insgesamt sehr zeitaufwendig. Durch eigene Untersuchungen zur Anzucht der Inokulationskultur mit entsprechender Mikroorganismendichte kann diese Aussage bestätigt werden. Die direkte Inokulation mit lagerstabilen, aber dennoch hoch aktiven Starterkulturen (z. B. Lyophilisate, getrocknete Bakterienkulturen) wäre dagegen eine echte Alternative. Die erfolgreiche Intensivierung des Limonenabbaus war an eine langwierige und recht aufwendige Inokulation der Limonen-abbauenden Mischkulturen gebunden, bis sich die Kultur vollständig etabliert hatte und von weiteren Beimpfungen abgesehen werden konnte.

5.8 Schlußfolgerungen und Ausblick

Eine Anreicherung von Limonen-abbauenden Mikroorganismen in Batch-Kultur ist prinzipiell möglich. Die Inokulationskulturen übten ganz offensichtlich einen bedeutenden Einfluß auf die Reinigungsfunktion des beimpften Biofilters 1 aus. So konnte die Anlaufphase des Biofilters deutlich reduziert werden. Die Wirksamkeit der an Limonen adaptierten Anreicherungskulturen hat sich im Überführungsversuch bei Applikation in einen Modellbiofilter bestätigt. Die Untersuchungsergebnisse zeigen die erfolgreiche Inokulation des Biofilters mit einer Bakterienkultur, die zu einer Erhöhung der Konzentration ubiquitärer, aber an Limonen adaptierter Bakterien im Biofilter führt, die eine Effektivierung des Limonenabbaus bewirkten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen weiterhin, daß mit der quantitativen Bestimmung der Gesamtkeimzahl sowie mit der Beschreibung morphologischer Charakteristika die Wirksamkeit der Inokulationskulturen nicht beurteilt werden kann. Meßbar ist dies nur am Abbauerfolg. Eine besondere Bedeutung kommt der physiologischen Adaptation der Mikroorganismen zu, die mit der Herausbildung geeigneter Enzymsysteme, für das Abbauvermögen verantwortlich sind, die wiederum weiterführende Untersuchungen erfordern und interessante Ergebnisse erwarten lassen. Für die Praxis sollte anschließend ein Verfahren entwickelt werden, um den Limonenabbau im Biofilter weiter zu intensivieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Lillian Mitzkat

Die Optimierung des mikrobiellen Abbaus von Limonen in Biofiltern

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig

104 S., 25 Abb., 46 Tab., 2 Übers., 239 Lit.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Untersuchung von Möglichkeiten zur Intensivierung des mikrobiellen Abbaus des Geruchstoffes Limonen unter Anwendung des Biofilterverfahrens. Limonen stellt eine wesentliche Geruchskomponente bei der Intensivrotte der Bioabfallkompostierung dar und wird bisher in biologischen Abluftreinigungsanlagen oft nur unzureichend eliminiert. Dies führt zu einer Geruchsbelästigung des Personals und angrenzender Wohngebiete. Die Verbesserung des hygienischen Status der Bioabfallkompostierung und eine damit verbundene Steigerung ihrer gesellschaftlichen Akzeptanz erfordert daher ein Biofilterverfahren, das hinsichtlich des Limonenabbaus optimiert wird. Die Zuverlässigkeit von Biofiltern ist neben der Einstellung und Optimierung technischer Parameter auch von der biologischen Aktivität der im Strukturmaterial vorhandenen Mikroorganismenbiozönose abhängig. Viele zum mikrobiellen Abbau von Limonen befähigte Mikroorganismen sind zwar bekannt, doch handelt es sich bei den beschriebenen Abbaumechanismen hauptsächlich um eine unvollständige Mineralisierung dieses Geruchstoffes, die zu einer Anreicherung wiederum geruchsbelasteter Verbindungen führt.

In dieser Arbeit wurden aus Umweltproben (Fichtenzapfen, -nadeln, -rinde; Waldboden; Schalen von Zitrusfrüchten; Bioabfall) vier bakterielle Mischpopulationen, die zur Verwertung von Limonen als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle in der Lage sind und durch Wachstum auf diesem Substrat Biomasse bilden, in Schüttelkultur durch Metabolisierung von Limonen erfolgreich angereichert. Hinsichtlich ihrer Abbaukinetik für Limonen wiesen alle Batch-Kulturen eine starke Ähnlichkeit auf. Limonen wurde bei Anfangskonzentrationen von 536,5-889,5 mg/l nach 41-59 Stunden und mittleren Abbauraten von 48,1-51,0 mg l⁻¹h⁻¹ durch die Batch-Kulturen bis unter die Nachweisgrenze abgebaut. Nach erfolgter Degradation hinterließen die Proben einen neutralen Geruchseindruck. Eine Akkumulation von Metaboliten oder Endprodukten konnte gaschromatographisch nicht nachgewiesen werden, was auf einen vollständigen Limonenabbau hindeutet. Substratkonzentrationen von > 4042 mg/l führten dagegen zu einer Inhibierung des Limonenabbaus und zu einer Stagnation des Wachstums bzw. zum Absterben der Bakterien in den Schüttelkulturen.

Die mikrobiologische Grobcharakterisierung führte zur Isolierung von insgesamt 44 Reinkulturen, die einzeln auf Limonenabbau getestet wurden. Es gelang, sechs Bakterien-

stämme zu isolieren, die in der Lage waren, Limonen ohne Akkumulation geruchsintensiver Intermediärverbindungen abzubauen. Mittels physiologisch-biochemischer sowie chemotaxonomischer Untersuchungen wurden die Bakterienisolate vorbehaltlich der Nachfolgeuntersuchungen der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet. Die molekularbiologische Untersuchung mittels Proteingel-Elektrophorese ergab durch Vergleich einzelner Proteinbanden im Gesamtzellproteinmuster der Isolate untereinander sowie mit Referenzstämmen die Identität der Isolate *L1,2*, *L2,4* und *L4,10*. Isolat *L2,6* wies deutliche Unterschiede im Proteinbandenprofil gegenüber den übrigen Isolaten und Referenzstämmen auf und wurde zum Vergleich der Isolate *L3,6* und *L3,8* zu einer 16S rRNA Teilsequenzanalyse herangezogen. Die vollständige Sequenzanalyse des Isolates *L3,6* führte zu einer Identität von 97 % mit *P. alcaligenes*. Hier muß davon ausgegangen werden, daß es sich um eine neue bisher nicht beschriebene Spezies der Gattung *Pseudomonas* handelt. Isolat *L2,6* zeigte in der Teilsequenzanalyse eine Übereinstimmung von 96 % mit *P. mendocina*, was für die Zugehörigkeit zu einem neuen Genus spricht. Der Vergleich der Teilsequenzen von Isolat *L3,8* mit denen bekannter Spezies ergab eine Identität von 98 % mit *Pseudomonas* sp. B13. Die endgültige taxonomische Einordnung ist allerdings erst nach einem Sequenzvergleich durch DNA-DNA-Hybridisierungen mit bisher sequenzierten Spezies möglich. Die Limonen-abbauenden Bakterienstämme *L2,6*, *L3,6* und *L3,8* repräsentieren daher eindeutig verschiedene Spezies, die vorläufig dem Genus *Pseudomonas* zugeordnet wurden.

Die Wirksamkeit der Strategie, den Limonenabbau im Biofilter durch den Einsatz einer leistungsfähigen Anreicherungskultur (Mix der vier Anreicherungskulturen) zu verbessern, wurde im Überführungsversuch in zwei parallel laufenden Modellbiofiltern gaschromatographisch untersucht. Aus dem inokulierten Biofilter wurden Wirkungsgrade bis zu 100 % nach 67 Tagen Laufzeit bei kaum geänderter Gesamtkeimzahl ermittelt. Auch nach Einstellung der Beimpfung betrug die Konzentrationsminderung für Limonen bis zu 89 %. Die Einlaufphase des inokulierten Biofilters konnte gegenüber einem konventionellen Biofilter um 46 Tage auf 35 Tage wirksam verkürzt werden. Eine mikrobiologische Charakterisierung der aus zwei Biofiltern isolierten Bakterienkulturen ergab nicht die erwarteten Unterschiede hinsichtlich der mikrobiologischen Besiedelung des Filtermaterials beider Biofilter. Die Wirksamkeit der Inokulationskulturen im Biofilter ließ sich gaschromatographisch und olfaktometrisch anhand der eliminierten Limonen- oder Geruchsstoffkonzentrationen eindeutig nachweisen. Die Unterschiede in den Abbauleistungen beider Biofilter widerspiegeln sich folglich nicht deutlich in den taxonomischen Merkmalen der Bakterienbiozösen. Vielmehr ist die mit der Ausbildung spezieller Enzymsysteme verbundene physiologische Adaptation verschiedenster Bakterienpezies entscheidend, um eine Optimierung des mikrobiellen Abbaus von Limonen in Biofiltern zu erreichen.

7 SUMMARY

Intensification of the microbial biodegradation of limonene in biofilters

Lillian Mitzkat

Institute of Animal Hygiene and Public Veterinary Health

Veterinary Faculty of the University of Leipzig

104 p., 25 fig., 46 tab., 2 suppl., 239 ref.

This study aimed to investigate the opportunities for the intensification of the microbial biodegradation of the odourous compound limonene by biofiltration as a biological waste gas treatment technology. Limonene represents a considerable odourous component during the intensive composting process of organic waste materials and its elimination capacity by using the biological waste gas treatment facilities is so far insufficient. This results to a molestation of the staff of composting facilities and adjacent residential areas by odours. The improvement of the hygienic status of the composting process connected with the increase of their social acceptance requires a biofilter system which is to be optimized regarding the biodegradation of limonene. The reliability of such biological deodorizing methods depends on the adjustment and optimisation of technological parameter as well as on the biological activity of limonene metabolizing microorganism microbiota in the carrier material. Though a wide range of limonene utilizing microorganisms are known, but the described bioconversion processes deal with mainly incomplete mineralization of these odourous compound resulting again in an accumulation of further volatile odourous substances.

In this study four mixed bacterial population were successfully obtained from organic material samples (fir cone, fir needles, fir bark; coniferous forest soil; parings from citrus fruits; bio waste) by a simple enrichment technique (semicontinuous fed-batch principle) using limonene as the sole carbon and energy source, accompanied by microbial growth and mineralization. In consideration of the degradation kinetics of limonene all of the batch-cultures have shown high similarity. By initial concentrations of 536,5-889,5 mg/l after 41-59 hours and middle degradation rates of 48,1-51,0 mg l⁻¹h⁻¹ limonene was degraded by bacterial cultures under the detection limit and samples have had a more neutral odourous impression. An accumulation of metabolites and other final products couldn't be detected by gaschromatography and this indicates a complete limonene bioconversion. Substrate concentrations greater than 4042 mg/l inhibited outright the biodegradation of this odourous compound as well as the growth of these bacteria and entailed finally to a toxic effect of the cells.

Through microbial characterization 44 aerobic pure strains were isolated which were individually tested on limonene degradation. The isolation of six bacteria strains that were capable of limonene degradation without accumulation of other intermediate odourous compounds were achieved. Physiological, biochemical as well as chemotaxonomic characterization tests assigned the bacterial isolates subject to additional tests to the genus *Pseudomonas*. Phylogenetic investigation by using polyacrylamid gel electrophoresis revealed through comparison of the several protein bands in the whole protein pattern of the isolates with each other as well as with reference strains the identity of the isolates *L1,2*, *L2,4* and *L4,10*. The isolate *L2,6* showed clear differences in the protein pattern to the other isolates and reference strains and was taken with regard to a comparison of the isolates *L3,6* and *L3,8* to a partial 16S rRNA sequence analysis. The complete 16S rRNA analysis of the isolate *L3,6* led to an identity of 97 % with *P. alcaligenes*. It has to be assumed here that the isolate is different from species previously described and represents a new species of the genus *Pseudomonas*. Partial 16S rRNA analysis of the isolate *L2,6* showed a similarity of 96 % between the isolate and *P. mendocina* and indicate that this isolate is a member of a new genus. Partial 16S rRNA sequence comparison of the isolate *L3,8* with corresponding fragments from reference strains listed in the data bank of nucleotides resulted in a similarity of 97 % with *Pseudomonas sp.* B13. For the definitive taxonomic arrangement of these isolates DNA-DNA hybridization with related species are required. The limonene degrading isolates represent clearly different species provisionally allocated to the genus *Pseudomonas*.

The effectiveness of the strategy to enhance the removal capacity for limonene with an efficient enrichment culture (mix of the four batch cultures) was tested in two parallel running biofilters (one inoculated and one biofilter without inoculation) and the degradation of limonene was followed. Chemical analysis was carried out by gas chromatography mass spectrometry. From the inoculated biofilter an efficiency up to 100 % was determined after 67 days running time and the total cell count altered scarcely. Also after a discontinue of the inoculation the elimination capacity for limonene amounted up to 89 %. The adaption time of the inoculated biofilter was successfully reduced from 81 to 35 days compared to a conventional biofilter. A microbial characterization of the isolated bacterial cultures from biofilters did'nt show the expected differences concerning the microbial composition of the carrier material of both biofilters. The activity of the enrichment cultures could be clearly proved by gaschromatography and olfactometry by means of the eliminated limonene concentrations. Therefore the differences of the elimination capacity of both biofilters didn't clearly appear in the taxonomic characteristics of the bacterial microbiota. Decisive is rather the physiological adaption of various bacterial species by formation of special enzyme systems to achieve an optimisation of the microbial degradation of limonene in biofilters.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ABRAHAM, W. R., H. M. HOFFMANN, K. KIESLICH, G. RENG u. B. STUMPF (1984):
Formation and production of 1,2- trans-glycols from various monoterpenes with 1-menthene
skeleton by microbial transformations with *Diplodia gossypina*.
in: Third European Congress of Biotechnology. München, 1984, Vol. 1, Kongr.ber., S.245-
248

ABRAHAM, W. R., H. M. HOFFMANN, K. KIESLICH, G. RENG u. B. STUMPF (1985):
Microbial transformations of some monoterpenoids and sesquiterpenoids.
Ciba Found. Symp 111, 146-160

ADAM, K.-P. J. CROCK u. R. CROTEAU (1996):
Partial purification and characterization of a monoterpene cyclase, limonene synthase, from
the Liverwort *Ricciocarpos natans*.
Arch. Biochem Biophys. 332, Nr. 2, 352-356

ANDREWS, J. F. (1968):
A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory
substrates.
Biotechn. Bioeng. 10, 707-723

ANDREWS, R. E., L. W. PARKS u. K. D. SPENCE (1980):
Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms.
Appl. Environ. Microbiol. 40, Nr.2, 301-304

ANGRICK, M. (1987):
Gaszusammensetzung, Emission und Reinigungstechniken bei ausgewählten Anlagen zur
Deponiegasnutzung.
Müll u. Abfall 4, 142-150

ANONYMUS (1999):
Anforderungen an die Abluftreinigung von MBA.
WLB Wasser, Luft u. Boden 11-12, 56-57

ANONYMUS (2000):
Neuer Standard für die MBA-Abluftreinigung.
Umweltmagazin 3, 44-45

API SYSTEM (1992):
Analytischer Profilindex
5. Aufl., BioMerieux, Nürtingen

BACHHAUSEN, P., N. BUCHHOLZ u. H. HARTKAMP (1985):
Wandeffekte in der Gasspurenanalyse.
Fresenius Z. Anal. Chem. 322, 336-342

- BARBIRATO, F., J. C. VERDOES, J. A. DE BONT u. M. J. VAN DE WERF (1998)
The *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 limonene-1,2-epoxide hydrolase gene encodes an enzyme belonging to a novel class of epoxide hydrolases.
FEBS Lett. 438, 293-296
- BARDON, S., K. PICARD u. P. MARTEL (1998):
Monoterpenes inhibit cell growth, cell cycle progression and cyclin D1 gene expression in human breast cancer cell lines.
Nutr. Cancer 32, Nr. 1, 1-7
- BARDTKE, D. (1990):
Mikrobiologische Voraussetzungen für die biologische Abluftreinigung.
in: K. FISCHER (Hrsg.): Biologische Abluftreinigung.
Expert-Verlag, Ehningen, S.1 ff.
- BARDTKE, D., K. FISCHER, u. F. SABO (1992):
Entwicklung und Erprobung von Hochleistungsbiofiltern.
Forschungsbericht zum Projekt Europäisches Forschungszentrum für Maßnahmen zur Luftreinhaltung (PEF) 1992
- BARROW, G. M. (1984):
Physikalische Chemie.
5. Aufl., Verlag Vieweg, Braunschweig, Wiesbaden
- BAYER, E. (1995):
Mikrobiologische Bodensanierung mit vorgezüchteten Mikroorganismen (Starterkulturen).
Mitteilungsblatt der GDCh-Fachgr. Umweltchemie und Ökotoxikologie 1, Nr. 2, 12-14
- BBL CRYSTAL (1998):
Elektronisches Codebuch für das BBL CRYSTAL Identifizierungssystem.
Becton Dickinson Europe, Meylan Cedex, Fra.
- BECKER, G., A. KÖTTNER u. B. GALLENKEMPER (1996):
Bewertungskriterien für das Rottestadium von Bioabfallkompost.
in: R. STEGMANN (Hrsg.): Hamburger Berichte 11, Neue Techniken der Kompostierung.
Verlag Economica, Bonn, S. 7-19
- BEILSTEIN (1922):
in: B. DRÄGER u. B. JACOBSON (Hrsg.): Handbuch der organischen Chemie.
Verlag Julius Springer, Berlin, Bd. 5., S. 33-139
- BEILSTEIN (1930):
in: F. RICHTER (Hrsg.): Handbuch der organischen Chemie.
Verlag Julius Springer, Berlin 1. Erg.w., Bd. 5, S. 70-73
- BEILSTEIN (1939):
in: F. RICHTER (Hrsg.): Handbuch der organischen Chemie.
Verlag Julius Springer, Berlin, 2. Erg.w., Bd. 5, S. 88-91

BEILSTEIN (1943):

in: H.-G. BOIT (Bearb.): Handbuch der organischen Chemie.
Verlag Springer, Berlin, 3.Erg.w., Bd. 5.,S. 346-353

BENDINGER, B. (1992):

Microbiology of biofilters for the treatment of animal- rendering plant emissions: Occurrence, identification and properties of isolated *Coryneform bacteria*.
Osnabrück, Univ., Fachber. Biol. u. Chem., Diss.

BENINCASA, M., F. BUIARELLI, G. P. CARTONI u. F. COCCIOLI (1990):

Analyses of Lemon and Bergamot essential oils by HPLC with microbore columns.
Chromatographia 30, Nr. 5-6, 271-276

BETZ, J. L., P. R. BROWN, M. I. SMITH u. P. H. CLARKE (1974):

Evolution in action.
Nature, 247, 261-264

BIDLINGMAIER, W. (1992):

Charakteristik fester Abfälle in Hinblick auf ihre biologische Zersetzung.
in: G. HÖSEL, W. SCHENKEL u. H. SCHNURER (Hrsg.): Müll-Handbuch, Kz.5303,
Lieferung 4/92
Verlag Erich Schmidt, Berlin

BIDLINGMAIER, W. (2000):

Biologische Abfallverwertung.
Verlag Eugen Ulmer & Co, Stuttgart

BIDLINGMAIER, W., u. V. GRAUENHORST (1996):

in: R. STEGMANN (Hrsg.): Geruchsemissionen von Kompostierungsanlagen.
Hamburger Berichte 11, Neue Techniken der Kompostierung.
Verlag Economia, Bonn, S. 441-458

BIOLOG INC. (1993):

MicroStation System (Instruction for use).
Biolog Inc., Hayward, CA, USA

BOCHNER, B. R. (1989 a):

Sleuthing out bacterial identities.
Nature 339, 157-158

BOCHNER, B. R. (1989 b):

„Breathprints“ at the microbial level.
ASM News 55, 536-539

BOCHNER, B. R. (1993):

Identification and taxonomy of over 1100 species of bacteria and yeasts based on carbon source utilization patterns (Biolog data Base Release 3.50, 9.1.93).
Poster publication FEMS Meeting: Identification of bacteria.
Present trends-future prospects. Granada, Spain

- BOCKREIS, A., u. J. JAGER (1998):
Einsatz einer „künstlichen Nase“ zur kontinuierlichen Geruchsüberwachung von Kompostierungsanlagen.
VDI-Verlag Düsseldorf, VDI Berichte Nr. 1373, S. 89-97
- BOLLAG, W. B., u. J.-M. BOLLAG (1992):
Biodegradation.
in: J. LEDERBERG (Hrsg.): Encyclopedia of Microbiology.
Academic Press, San Diego, Bd. 1, S.269-276
- BOUWMEESTER, H. J., J. GERSHENZON, M. C. J. M. KONINGS u. R. CROTEAU (1998):
Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway.
Plant Physiol. 117, 901-912
- BOWEN, E. R. (1975):
Potential by- products from microbial transformation of d-limonene.
Proc. Fla. State Hort. Soc. 88, 305-308
- BRADDOCK, R. J., u. K. R. CADWALLADER (1992):
Citrus by- products manufacture for food use.
Food Technol. 40, Nr.2, 105-110
- BRAUER, H. (1984):
Biologische Abluftreinigung.
Chem.-Ing.-Tech. 56, Nr. 4, 279-286
- BREEGER, A. (2000):
Abluftreinigungstechnologien für mechanisch-biologische Abfallbehandlungsanlagen.
WLB Wasser, Luft u. Boden 9, 58-59
- BRUCKMANN, P., u. W. MÜLDER (1982):
Der Gehalt an organischen Spurenstoffen in Deponiegasen.
Müll u. Abfall 12, 339-346
- BÜNGER, J., M. MÜLLER, P. RUHNAU, T. SCHULZ, G. WESTPHAL, B. DREEßEN, K. STALDER u. E. HALLIER (1999):
Erfassung von Exposition und Gesundheitsrisiken durch luftgetragene biologische Arbeitsstoffe in der Abfallwirtschaft.
Zbl. Arbeitsmed. 49, 182-190
- BUSSE, H. J., E. B. M. DENNER u. W. LUBITZ (1996):
Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics.
J. Biotechnol. 47, 3-38
- BUSSE, H.-J., T. EL-BANNA, H. OYAIZU u. G. AULING (1992):
Identification of xenobiotic-degrading isolates from the beta subclass of the *Proteobacteria* by a polyphasic approach including 16S rRNA partial sequencing.
Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 19-26

- BUTTERY, R. G., R. M. SEIFERT, D. G. GUADAGNI u. L. C. LING (1971):
Characterization of additional volatile components of tomato.
J. Agric. Food Chem. 19, 524
- CADWALLADER, K. R., R. J. BRADDOCK., M. E. PARISH u. D. P. HIGGINS (1989):
Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*.
J. Food Sci. 54, Nr. 5, 1241-1245
- CHANG, H. C., D. A. GAGE u. P.J. ORIEL (1995):
Cloning and expression of a limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus*
in *Escherichia coli*.
J. Food Sci. 60, Nr. 3, 551-553
- CHANG, H. C., u. P. ORIEL (1994):
Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*.
J. Food Sci. 59, Nr. 3, 660-662
- CHASTAIN, D.E., E. SANDERS, W. JR. EUGENE u. C. C. SANDERS (1992):
Process for producing reference bactericidal endpoint (RBE) limonene by oxidation.
Patent. Nr. 5,153,229 (USA)
- CHEN, H., K. K. CHAN u. T. BUDD (1998):
Pharmacokinetics of d-limonene in the rat by GC-MS assay.
J. Pharm. Biomed. Anal. 17, 631-640
- CLAUSS, G. (1981):
Über den mikrobiellen Abbau von Geruchsstoffen aus Abluftströmen unter besonderer
Berücksichtigung des Metabolismus von Indol und Skatol.
Darmstadt, Techn. Hochsch., Fachber. Biol., Diss.
- COOK, A. M., H. GROSSENBACHER u. R. HÜTTER (1983):
Isolation and cultivation of microbes with biodegradative potential.
Experientia 39, 1191-1198
- CROTEAU, R., u. D. M. SATTERWHITE (1989):
Biosynthesis of monoterpenes.
J. Biol. Chem. 264, Nr. 26, 15309-15315
- CROWELL, P. L., C. E. ELSON, H. H. BAILEY, A. ELEGBEDE, J. D. HAAG u. M. N. GOULD (1994):
Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent d-limonene.
Cancer Chemother. Pharmacol. 35, 31-37
- CROWELL, P.L. (1999):
Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes.
J. Nutr. 129, Nr. 3, 775-778
- CZAJKA, S. (1997):
Strategien der Infektabwehr.
PZ 142, Nr.27, 11-18

- DAMMANN, B., B. WIESE, K. HEINIG u. R. STEGMANN (1996):
Weitergehende Elimination von Gerüchen aus Kompost.
in: R. STEGMANN (Hrsg.): Hamburger Berichte 11, Neue Techniken der Kompostierung.
Verlag Economia, Bonn, S. 459-476
- DE BERTOLDI, M., G. VALLINI u. A. PERA (1985):
Technological aspects of composting including modelling and microbiology.
in: J. K. R. GASSER (Hrsg.): Composting of agricultural and other wastes.
Elsevier Applied Science Publishers, London, New York
- DE LEY (1992):
The proteobacteria: Ribosomal RNA cistron similarities and bacterial taxonomy.
in: A. BALOW, H. G. TRÜPFER, M. DWORKIN, W. HARDER u. K.-H. SCHLEIFER
(Hrsg.): The Prokaryotes-a handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation,
identification, applications.
2. Aufl., Verlag Springer, New York, Berlin, Bd. 2, S. 2111-2140
- DE VOS, M., F. PATTE, J. ROUAULT, P. LAFFOERT u. L. J. VAN GEMERT (1990):
Standardized human olfactory thresholds.
IRL Press, Oxford Univ., Oxford
- DEV, S. (Hrsg.) (1982):
Handbook of terpenoids-monoterpenoids.
CRC Press, Boca Raton, Fla., Bd. 1,2
- DHAVALIKAR, R. S. (1964):
Microbial transformation of terpenes.
Poona, Univ., Diss.
- DHAVALIKAR, R. S., P. N. RANGACHARI u. P. K. BHATTACHARYYA (1966):
Microbiological transformations of terpenes: Part IX- Pathways of degradation in a soil
Pseudomonad.
Indian J. Biochem. 3, Nr. 3, 158-164
- DHAVALIKAR, R. S., u. P. K. BHATTACHARYYA (1966):
Microbiological transformations of terpenes: Part VIII.- Fermentation of limonene by a soil
Pseudomonad.
Indian J. Biochem. 3, Nr. 3, 144-157
- DHERE, S. G., u. R. S. DHAVALIKAR (1970):
Microbial transformations of terpenoids: Limonene.
Science and Culture ??? 36, 292-293
- DIETRICH, D. R., u. J. A. SWENBERG (1991):
The presence of α_2 -globulin is necessary for d-limonene promotion of male rat kidney
tumors.
Cancer Res. 51, Nr. 13, 3512-3521

- DRATWA, H. (1968):
Das Biofilter, ein Verfahren zur Geruchsbeseitigung - Wirkungsweise und Einsatzmöglichkeiten.
Staub-Reinhalt. Luft 28, Nr. 12, 516-520
- DSMZ (2000):
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
Catalogue of strains.
<http://www.dsmz.de>
- ECKRICH, C., E. JAGER u. J. JAGER (1996):
Keimemissionen im Umfeld von Kompostierungsanlagen.
Forum Städte-Hyg. 47, 184-191
- EDWARDS, V. H. (1970):
The influence of high substrate concentration on microbial kinetics.
Biotechnol. Bioeng. 12, 679-712
- EITNER, D. (1984):
Untersuchungen über Einsatz und Leistungsfähigkeit von Kompostfilteranlagen zur biologischen Abluftreinigung im Bereich von Kläranlagen unter besonderer Berücksichtigung der Standzeit.
Aachen, Tech. Hochsch., Diss.
- EITNER, E. (1989):
Vergleich von Biofiltermaterialien anhand mikrobiologischer und bodenphysikalischer Kenndaten.
VDI-Verlag Düsseldorf, VDI-Berichte Nr. 735, S. 191-213
- ERICKSON, R. E. (1976):
The industrial importance of monoterpenes and essential oils.
Lloydia (Cinci) 39, 8-19
- FALBE, J., u. M. REGITZ (1990):
in: J. FALBE u. M. REGITZ (Hrsg.): RÖMPP Chemie Lexikon.
9. Aufl., Verlag Georg Thieme, Stuttgart, New York Bd. 3, S. 2513
- FIGUEIREDO, A. C., M. J. ALMENDRA, J. G. BARROSO u. J. J. C. SCHEFFER (1996):
Biotransformation of monoterpenes and sesquiterpenes by cell suspension cultures of *Achillea Millefolium* L. ssp. *Millefolium*.
Biotechnol. Lett. 18, Nr. 8, 863-868
- FITZNER, K. (1998):
Perceived Air Quality“ und Molekülgröße flüchtiger organischer Substanzen (VOC).
VDI-Verlag Düsseldorf, VDI Berichte Nr. 1373, S. 41-49
- FLAMINI, G., P. L. CIONI, R. PULEIO, I. MORELLI u. L. PANIZZI (1999):
Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi.
Phytother. Res. 13, 349-351

GIESE, I. (1995):

Untersuchungen zur Entwicklung eines neuartigen Biofilterverfahrens für die Reinigung geruchsintensiver Testgemische.

Leipzig, Univ., Vet.-med. Fak., Diss.

GILBERT, E. S., u. D. E. CROWLEY (1997):

Plant compounds that induce polychlorinated biphenyl biodegradation by *Arthrobacter* sp. strain B1B.

Appl. Environ. Microbiol. 63, Nr. 5, 1933-1938

GOLDSTEIN, R. M., L. M. MALLORY u. M. ALEXANDER (1985):

Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation.

Appl. Environ. Microbiol. 50, 977-983

GOTTSCHALK, G , u. H.-J. KNACHMUSS (1993):

Bakterien und der Abbau von Chemikalien: Natürliches und durch Kombination oder Konstruktion Erreichbares.

Angew. Chem. 105, Nr. 10, 1437-1448

GOULD, M. N., C. J. MOORE, R. ZHANG. B. WANG, W. S. KENNAN u. J. D. HAAG (1994):

Limonene chemoprevention of mammary carcinoma induction following direct in situ transfer of v-Ha-ras.

Cancer Res. 54, 3540-3543

GRAY, K. R., u. A. J. BIDDLESTONE (1981):

The composting of agricultural wastes.

in: B. STONEHOUSE, B. (Hrsg.): Biological husbandry, Butterworths, London, Boston

GUST, M., H. GROCHOWSKI u. S. SCHIRZ (1979 a):

Grundlagen der biologischen Abluftreinigung - Teil V. Abgasreinigung durch Mikroorganismen mit Hilfe von Biofiltern.

Staub-Reinhaltung Luft 39, Nr. 11, 397-402

GUST; M., F. SPORENBERG u. E. SCHIPPERT (1979 b):

Grundlagen der biologischen Abluftreinigung - Teil IV. Abgasreinigung durch Mikroorganismen mit Hilfe von Biowäschern.

Staub-Reinhaltung Luft 39, Nr. 9, 308-314

HAGEN, J., R. LEHMANN u. K. BASEMIR (1980):

Verwendung von Aldehyden als antimikrobielle Wirkstoffe.

Patent, Nr. 29 14 090 (Deutsches Patentamt München)

HANGARTNER, M., J. WUEST u. F. TUNESI (1998):

Die Häufigkeit von Geruchsereignissen als Maß für Geruchsbelästigung.

VDI-Verlag Düsseldorf, VDI Berichte, Nr.1373, S. 537-540

HARD, G. C., u. J. WHYSNER (1994):

Risk assessment of d-limonene: an example of male rat-specific renal tumorigens.

Crit. Rev. Toxicol. 24, Nr. 3, 231-254

HARDCASTLE, I. R., M. G. ROWLANDS, A. M. BARBER, R. M. GRIMSHAW, M. K. MOHAN, B. P. NUTLEY u. M. JARMAN (1999):
Inhibition of protein prenylation by metabolites of limonene.
Biochem. Pharmacol. 57, 801-809

HEIDA, H., F. BARTMAN u. S. C. VAN DER ZEE (1995):
Occupational exposure and indoor air quality monitoring in a composting facility.
Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 56, Nr. 1, 39-43

HEINIG, K. (1998):
Biofilter und Biowäscher: die Geruchseliminierung bei Kompostwerken.
Hamburger Berichte: Abfallwirtschaft.
Economica Verlag, Bonn, Bd. 14

HEINIG, K., B. WIESE, B. DAMMANN u. R. STEGMANN (2000):
Feuchtemessung beim Betrieb von Biofiltern.
WLB Wasser, Luft u. Boden 9, 60-65

HIPPCHEN, B. (1985):
Mikrobiologische Untersuchungen zur Eliminierung organischer Lösungsmittel in Biofiltern.
Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft.
Kommissionsverlag, München, Bd. 94

HOFMANN, R. (1996):
Hygiene bei der Kompostierung.
in: R. STEGMANN (Hrsg.): Hamburger Berichte 11, Neue Techniken der Kompostierung.
Verlag Economia, Bonn, S. 151-165

HOGAN, J. A., F. C. MILLER u. M. S. FINSTEIN (1989):
Physical modeling of the composting ecosystem.
Appl. Environ. Microbiol. 55, 1082-1092

HOHL, R. J. (1996):
Monoterpenes as regulators of malignant cell proliferation.
Adv. Exp. Med. Biol. 401, 137-146

HOLSTE, D., H. MANNEBECK, T. HÜGLE u. J. HOPP (1995):
Biofilter an Anlagen zur Tierkörperverwertung.
EP 12, 31-33

HOPPER, D. J. (1978):
Microbial degradation of aromatic hydrocarbons.
in: R. J. WATKINSON (Hrsg.): Developments in biodegradation of hydrocarbons-1.
Verlag Applied Science Publ. LTD, London, S. 85-112

HORVATH, R. S. (1972):
Microbial co-metabolismus and the degradation of organic compounds in nature.
Bact. Rev. 36, 146-155

- HUBER, S., u. M. MENNER (1995):
Starterkulturen für die Umwelttechnik: Mischkulturfermentation und -trocknung.
BIOforum 18, Nr.7-8, 246-251
- HÜBNER, R. (1997):
Biologische Abluftbehandlung in Industrie und Gewerbe.
WLB Wasser, Luft und Boden 5, 50-53
- HÜGLE, T., u. D. MANNEBECK (1993):
Befeuchtung von Biofiltern.
EP 3, 142-144
- ICHIRO, S., u. S. S. C. KANAGAWA (1988):
Ozon-Zersetzungsmittel
Patent, Nr. DE 37 28 802 A 1 (Deutsches Patentamt München)
- IKEMOTO, S., K. KATOH u. K. KOMAGATA (1978):
Cellular fatty acid composition in methanol-utilizing bacteria.
J. Gen. Appl. Microbiol. 24, 41-49
- JÄGER, B., u. J. JAGER (1978):
Geruchsbekämpfung in Kompostwerken am Beispiel Heidelberg.
Müll u. Abfall 2, 48-54
- JÄGER, B., u. J. JAGER (1980):
Ermittlung und Bewertung von Geruchsemissionen bei der Kompostierung von
Siedlungsabfällen.
Müll u. Abfall 1, 22-28
- JAGER, J. (1979):
Zur chemischen Ökologie der biologischen Abfallbeseitigung.
Univ. Heidelberg, Naturwiss. Fak., Diss.
- JAGER, J. (1989):
Geruchsemissionen und -immissionen bei der Kompostierung.
in: G. HÖSEL, W. SCHENKEL u. H. SCHNURER (Hrsg): Müll-Handbuch.
3. Aufl., Verlag Erich Schmidt, Berlin, Bd. 4, S. 1-22
- JAGER, J., u. H. SCHILDKNECHT (1979 a):
Zur chemischen Ökologie der biologischen Abfallbeseitigung – Umweltforschungsplan des
Bundesministers des Innern.
Univ. Heidelberg, Forschungsber. 10302407
- JAGER, J., u. H. SCHILDKNECHT (1979 b):
Grundlagen der biologischen Abluftreinigung.
Teil I – Chemie der organischen Luftverunreinigungen und Geruchsstoffe.
Staub-Reinhalt. Luft 39, Nr. 5, S. 145-148

JANSON, O.(1991):

Analytik, Bewertung und Bilanzierung gasförmiger Emissionen aus anaroben Abbauprozessen unter besonderer Berücksichtigung der Schwefel-Verbindungen.

Stuttgarter Berichte zur Abfallwirtschaft

Verlag Erich Schmidt GmbH & Co, Bielefeld

JANSSEN, A. M., J. J. C. SCHEFFER, A. SVENDSEN, A. BAERHEIM u. Y. AYNEHCHI (1984):

The essential oil of *Ducrosia anethifolia* (DC.) boiss. Chemical composition and antimicrobial activity.

Pharm. Weekbl. Sci. Ed. 6, Nr. 4, 157-160

JUNKER, A. (1998):

Belästigung als Funktion der Intensität, Hedonie und Häufigkeit von Gerüchen.

VDI-Verlag Düsseldorf, VDI Berichte, Nr. 1373, S. 373-381

KÄMPFER, P., L. FRIEDRICH, P. M. BECKER u. W. DOTT (1995):

Beeinflussung der Bodenpopulation durch Einsatz vorgezuchteter Mikroorganismen bei der Mietentechnologie.

Mitteilungsblatt der GDCh-Fachgr. Umweltchemie und Ökotoxikologie 1, Nr. 2, 14-17

KANAGAWA, S. T. Y., u. S. S. C. KANAGAWA (1991):

Ozon-zersetzende Zusammensetzung

Patent, Nr. DE 41 21 526 A 1 (Deutsches Patentamt München)

KARLBERG, A.-T., K. MAGNUSSON u. U. NILSON (1992):

Air oxidation of d-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens.

Contact Dermatitis 26, 332-349

KIESLICH, K., W. R. ABRAHAM, B. STUMPF, B. THEDE u. D. WASHAUSEN (1986):

Transformation of terpenoids.

in: E-J. BRUNKE (Hrsg.):

Progress in Essential Oil Research. XVI, Walter de Gruyter Verlag Berlin, New York, S. 367-394

KLICHE, R., H. PÖHLE, R. WILLIG, I. GIESE, J. ALTER, H.-J. REINHARDT u. H. MIETKE (1998):

Verfahren zur biologischen Abgas-/Abluft-Reinigung und Filtermaterial dazu.

Patent, Nr. 434 1467 (Deutsches Patentamt München)

KNACKMUS, H.-J. (1979):

Halogenierte und sulfonierte Aromaten-Eine Herausforderung für Aromaten abbauende Bakterien.

Forum Mikrobiol. 6, 311-317

KNAUF, S. (1998):

Gerüche in der Außenluft.

Seminar 433901, Mannheim

- KOBELT, G. (1998):
Die Bedeutung von Filtermaterialien und Starterkulturen in der biologischen Abluftreinigung.
EP 9, 40-41
- KOCH, W., H. G. LIEBE u. B. STRIEFLER (1982):
Betriebserfahrungen mit Bio-Filtern zur Reduzierung geruchsintensiver Emissionen.
Staub-Reinhalt. Luft 42, Nr. 12, 488-493
- KOHLER, H. (1990):
Biowäscher – Aufbau, Verfahrensvarianten, Dimensionierung.
in: K. FISCHER (Hrsg.): Biologische Abluftreinigung. Anwendungsbeispiele, Möglichkeiten
und Grenzen für Biofilter und Biowäscher.
Expert-Verlag, Ehningen, S. 74-82
- KÖHLER, M., u. K. HOFMANN (1992):
Grundriß der Biotechnologie.
Verlag Carl Hanser, München, Wien
- KRAIDMAN, G., B. B. MUKHERJEE u. I. HILL (1969):
Conversion of d-limonene into an optically active isomer if α - terpineol by *Cladosporium*
species.
Bacteriol. Proc. 69, 63
- KRASNOBAJEV V. (1984):
Terpenoids.
in: K. LISLICH (Hrsg.): Biotechnology-Biotransformations.
Verlag Chemie, Weinheim , Bd. 6a, S. 98-125
- KREFT, H., u. W. BIDLINGMAIER (1996):
Methodenhandbuch zur Analyse von Kompost - Ringanalysen zur Kompostgütesicherung.
in: R. STEGMANN (Hrsg.): Hamburger Berichte 11, Neue Techniken der Kompostierung.
Verlag Economica, Bonn, S. 303-312
- KROGMANN, U. (1994):
in R: STEGMANN (Hrsg.): Hamburger Berichte 7 Kompostierung.
Verlag Economica, Bonn
- LAEMMLI, U. K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685
- LEHMAN-McKEEMAN, L. D., D. CAUDILL, R. TAKIGIKU, R. E. SCHNEIDER u. J.
YOUNG (1990):
Comparative disposition of d-limonene in rats and mice: relevance to male rat-specific
nephrotoxicity.
Toxicol. Lett. 53, 193-195

LEHMAN-McKEEMAN, L. D., P. A. RODRIGUEZ, R. TAKIGIKU, D. CAUDILL u. M. L. FEY (1989):

d-Limonene induced male rat-specific nephrotoxicity: evaluation of the association between d-limonene and α_2 -globulin.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 99, 250-259

LINGENS, F. (1979):

Mikrobieller Abbau von Herbiziden und Fungiziden.

Forum Mikrobiol. 5, 240-248

LIPSKI, A., S. KLATTE, B. BENDINGER u. K. ALTENDORF (1992):

Differentiation of gram-negative, nonfermentative bacteria isolated from biofilters on the basis of fatty acid composition, quinone system, and physiological reaction profiles.

Appl. Environ. Microbiol. 58, 2053-2065

MADYASTHA, K. M., P. K. BHATTACHARYYA u. C. S. VAIDYANATHAN (1977):

Metabolism of a monoterpene alcohol, linalool, by a soil pseudomonad.

Can. J. Microbiol. 23, 230-239

MADYASTHA, K. M., u. V. RENGANATHAN (1984):

Metabolism of α -terpineol by *Pseudomonas incognita*.

Can. J. Microbiol. 30, Nr. 12, 1429-36

MANNEBECK, D., u. H. MANNEBECK (1998):

ECOMA-Probenahmegerät, Bedienungsanleitung.

Emissionsmeßtechnik und Consult Mannebeck GmbH, Honigsee

MANNEBECK, D., u. H. MANNEBECK (1999):

Olfaktometer TO7-System Mannebeck, Bedienungsanleitung.

Emissionsmeßtechnik und Consult Mannebeck GmbH, Honigsee

MANNEBECK, H. (1993):

Olfaktometer TO7-System Mannebeck, Kurzanleitung.

Inst. für Landwirtschaftliche Verfahrenstechnik, Universität Kiel

MANNEBECK, H., u. D. MANNEBECK (1996):

Leistungsfähigkeit der Olfaktometrie-Emissions- und Immissionsmessungen.

in: Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN: Aktuelle Aufgaben der Meßtechnik in der Luftreinhaltung.

VDI-Verlag Düsseldorf, VDI Berichte Nr. 1257, S. 93-104

MAYER, J. 1990):

Geruchsstoffe bei der Heißbrotte von Hausmüll

Tübingen, Univ., Chem. u. Pharm. Fak., Diss.

MERCK (1998):

Reagenzien, Chemikalien, Diagnostika.

Index-Katalog, Darmstadt

- MILLER, L. T. (1982):
A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids.
J. Clin. Microbiol. 16, S. 584-586
- MILLER, L., u. T. BERGER (1985):
Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids.
Hewlett Packard, Gas Chromatography, S. 228-241
- MISRA, G., E. PAVLOSTHATIS, E. M. PERDUE u. R. ARAUJO (1996):
Aerobic biodegradation of selected monoterpenes.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, Nr. 6, 831-838
- MOLDOVANYI, L., A. R. COX u. K. KLEIBER (1988):
Microbicidal formulation.
UK Patent, Nr. 2 203 339 A (GB)
- MOSS, C. W. (1981):
Gas-liquid chromatography as an analytical tool in microbiology.
J. Chromatogr. 203, S. 337-347
- MOSS, C. W., S. B. SAMUELS u. R. E. WEAVER (1972):
Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* Species.
Appl. Microbiol. 24, 596-598
- MOSS, C. W., u. S. B. DEES (1976):
Cellular fatty acids and metabolic products of *Pseudomonas* Species obtained from clinical systems.
J. Clin. Microbiol. 4, 492-502
- MUKHERJEE B. B., G. KRAIDMANN u. I. D. HILL (1969):
Cyclic vicinal glycols as microbial transformation products of some monocyclic terpene hydrocarbons.
Bacteriol. Proc. 69, 63
- MUKHERJEE B. B., G. KRAIDMANN u. I. D. HILL (1973):
Synthesis of glykols by microbial transformation of some monocyclic terpenes.
Appl. Microbiol. 25, Nr. 3, 447-453
- MÜSKEN, J., u. W. BIDLINGMAIER (1998):
Geruchsemissionen aus Kompostwerken.
VDI-Verlag Düsseldorf, ???VDI Berichte, Nr. 1373, S. 1-20
- NEUMÜLLER, O.-A. (1979):
RÖMPP Chemielexikon.
8. Aufl. Franckh'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart
- OHLOFF, G. (1990):
Riechstoffe und Geruchssinn – Die molekulare Welt der Düfte.
Verlag Springer, Berlin, Heidelberg

OLSEN, R. A. u. L. R. BAKKEN (1987):

Viability of soil bacteria: Optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups.

Microbial. Ecol. 13, 59-74

ONKEN, J., u. R. G. BERGER (1999):

Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*.

J. Biotechnol. 69, 163-168

OSTERHOUT, G. J., V. H. SHULL u. J. D. DICK (1991):

Identification of clinical isolates of gram-negative nonfermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system.

J. Clin. Microbiol. 29, 1822-1830

PALLERONI, N. J (1984):

in: N. R. Krieg u. J. G. Holt (Hrsg.): Bergey's Manual of systematic bacteriology.

Verlag Williams u. Wilkins, Baltimore, Bd. 1, S. 140-219

PALLERONI, N. J. (1991):

Human- and animal-pathogenic Pseudomonads.

in: A. BALOWS, H. G. TRÜPER, M. DWORKIN, W. HARDER u. K.-H. SCHLEIFER (Hrsg.): The Prokaryotes- a handbook on the biology of bacteria.

2. Aufl., Verlag Springer, New York, Heidelberg, Bd. 3, S. 3086-3103

PASANEN A.-L., S. LAPPALAINEN u. P. PASANEN (1996):

Volatile organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins.

Analyst 121, Nr. 12, 1949-1953

PÖHLE, H. (1994):

Geruchsstoffemissionen bei der Kompostierung von Bioabfall.

Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

PÖHLE, H., u. R. Kliche, R. (1996):

Geruchsstoffemissionen bei der Kompostierung von Bioabfall.

Zbl. Hyg. 199, 38-50

POHLMANN, M. (1990):

Getrennte Sammlung und Kompostierung der organischen Bestandteile des Hausmülls am Beispiel des Modellversuches Bio-Tonne im Landkreis Schweinfurt

Berlin Tech. Univ., Fachber. Informatik, Diss.

POTTER, J. D., u. K. STEINMETZ (1996):

Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents.

JARC Sci. Publ. 139, 61-90

PRINZ, B. (1992):

Methoden der Geruchserhebung und Geruchsbewertung in Nordrhein-Westfalen.

in: A. J. DRAGT u. J. VAN HAM (Hrsg.):

Biotechniques for air pollution abatement and odour control policies.

Verlag Elsevier, Amsterdam, London, S. 335-343

RAFFLENBEUL, R. (2000):

Stand der Abluftreinigungsverfahren nach mechanischen und mechanisch-biologischen Abfallbehandlungsanlagen.

WLB Wasser, Luft u. Boden 9, 54-57

RAJAONARIVONY, J. I. M., J. GERSHENZON u. R. CROTEAU (1992):

Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita*).

Arch. Biochem. Biophys. 296, Nr. 1, 49-57

RAMA DEVI J. u. P.K. BHATTACHARYYA (1977 a):

Microbial transformation of terpenes: Part XXIII- Fermentation of geraniol, nerol and limonene by a soil pseudomonad, *Pseudomonas incognita* (linalool strain).

Indian J. Biochem. Biophys. 14, 288-291

RAMA DEVI J. u. P.K. BHATTACHARYYA (1977 b):

Microbial transformations of terpenes: Part XXIV- Pathways of degradation of linalool, geraniol, nerol and limonene by *Pseudomonas incognita*.

Indian J. Biochem. Biophys. 14, 359-363

RASCHKE, A. (1999):

Isolierung und Untersuchung von Dimethyldisulfid-abbauenden Bakterienstämmen aus Biofiltern.

Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

REICHARDT, W. (1978):

Einführung in die Methoden der Gewässermikrobiologie.

Verlag Gustav Fischer, Stuttgart, New York, S. 159 ff.

ROJAS, M. C., L. CHAYET, G. PORTILLA u. O. CORI (1983).

Substrate and metal specificity in the enzymic synthesis of cyclic monoterpenes from geranyl and neryl pyrophosphate.

Arch. Biochem. Biophys. 222, Nr. 2, 389-396

RUDNEW, D. F., u. W. P. SMEJANEZ (1969):

Ursachen der Massenvermehrung einiger Forstschädlingsarten.

Anz. Schädlingkunde u. Pflanzenschutz 42, Nr. 12, 177-184

SABO, F. (1990):

Verfahrenstechnische Grundlagen der biologischen Abluftreinigung.

In: K. FISCHER (Hrsg.): Biologische Abluftreinigung.

Expert-Verlag, Ehningen, Bd. 2, S. 13-34

SABO, F. (1991):

Behandlung von Deponiegas im Biofilter.

Stuttgarter Berichte zur Abfallwirtschaft.

Verlag Erich Schmidt, Bielefeld, Bd. 47

SABO, F. (2000):

MBA-Abluftreinigung - Diskussion ohne ende oder Ende der Diskussion.

WLB Wasser, Luft u. Boden 4, 28-29

- SABO, F., T. SCHNEIDER u. M. MÖSSINGER (1994):
Entwicklung und Erprobung von geschlossenen Hochleistungsbiofiltern mit variabler Durchströmungsrichtung.
VDI-Verlag, Düsseldorf, VDI Berichte Nr. 1104, S. 521-525
- SABO, F., T. SCHNEIDER, K. FISCHER u. U. MOTZ (1996):
Biologische Abluftreinigung: Entwicklung, Stand der Technik und Potential.
WLB Marktspiegel Umwelttechnik 1996, 53-66
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH u. T. MANIATIS (1989):
Molekular cloning-laboratory manual.
2. Aufl., Verlag Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- SANGER, F., NICKLEN, S. u. COULSON, A. R. (1977):
DNA sequencing with chain terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5467
- SASSER, M. (1990):
Identification of bacteria through fatty acid analysis.
in: Z. KLEMENT, K. RUDOLPH u. D. SANS (Hrsg.): Methods in phytobacteriology.
Verlag, Akademiai, Budapest, S. 199-204
- SAVAGE, T. J., M. W. HATCH u. R. CROTEAU (1994):
Monoterpene synthase of *Pinus contorta* and related conifers.
J. Biol. Chem. 269, Nr. 6, 4012-4020
- SAVITHIRY, N., D. GAGE, W. FU u. P. ORIEL (1998):
Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR 425.
Biodegradation 9, 337-341
- SAVITHIRY, N., T. K. CHEONG u. P. ORIEL (1997):
Production of α -terpineol from *Escherichia coli* cells expressing thermostable limonene hydratase.
Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65, 213-220
- SCHEFFOLD, K. (1985):
Getrennte Sammlung und Kompostierung.
EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik GmbH, Berlin
- SCHEUER P. J. (Hrsg.) (1978):
Marine natural products.
Academic Press, New York, Bd. 2
- SCHIPPERT, E. (1987):
Chemisch-biologische Gaswäsche zur Reduzierung organischer Emissionen.
VDI-Tag., Biologische Reinigung industrieller Abgase.
Heidelberg, 1987
- SCHIPPERT, E. (1994):
Biowäschertechnologie.
VDI-Verlag, Düsseldorf, VDI Berichte Nr. 1104, S. 39-56

- SCHLEGEL, H. G. (1992):
Allgemeine Mikrobiologie.
7. Aufl., Verlag Thieme, Stuttgart, New York
- SCHLEIFER, K.-H., u. E. STACKEBRANDT (1983):
Molekular systematics of prokaryotes.
Annu. Rev. Microbiol. 37, 143-187
- SCHMIEDING, R. (1996):
Reaktionstechnische Untersuchungen des Styrolabbaus im Biofilter.
Paderborn, Univ.; Fachber. Chem. u. Chemietechn.; Diss.
- SCHOMBURG, G. (1987):
Gaschromatographie.
2. Aufl., Verlag VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- SEUBERT, W. (1960):
Degradation of isoprenoid compounds by microorganisms.
J. Bacteriol. 79, 426-434
- SIERRA-ALVAREZ, R., u. G. LETTINGA (1990):
The methanogenic toxicity of wood resin constituents.
Biol. Wastes 33, Nr. 3, 211-226
- SIHLER, A., D. CLAUß, K. GROSSI u. K. FISCHER (1996):
Untersuchung organischer Abfälle auf organische Schadstoffe und Charakterisierung anhand eines Handbuchs.
in: R. STEGMANN (Hrsg.): Hamburger Berichte 11, Neue Techniken der Kompostierung.
Verlag Economica, Bonn, S. 313-323
- SIMONSEN, J. L. (1953):
The simpler acyclic and monocyclic terpenes and their derivatives.
in: J. L. SIMONSEN u. L. N. OWEN (Hrsg.): The terpenes.
2. Auflage, Verlag At the University Press, Cambridge Bd. 1, S. 141-165
- SMET, E. L. DE BO, K. MAES u. H. VAN LANGENHOVE (1997):
Biofiltration of dimethyl sulfide, isobutyraldehyde, limonene and ammonia when present as single compounds or in binary mixtures.
Internat. Symposium: Biological waste gas cleaning, Maastricht, Netherlands, S. 249-256
- SMIRNOFF, W. A. (1972):
Effects of volatile substances released by foliage of *Abies balsamea*.
J. Invertebr. Pathol. 19, Nr. 1, 32-35
- SOULAS, G. (1982):
Mathematical model for microbial degradation of pesticides in the soil.
Soil Biol. Biochem. 14, 107-115

SPEELMANS, G., A. BIJLSMA u. G. EGGINK (1998):

Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 538-544

STACKEBRANDT, E., u. B. M. GOEBEL (1994):

Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.

Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 846-849

STANIER, R. Y., N. J. PALLERONI u. M. DOUDOROFF (1966):

The aerobic *Pseudomonads*: a taxonomic study.

J. Gen. Microbiol. 43, 159-271

STEIN, M. (1992):

Literaturstudie über neueste Tendenzen in der Geruchsbeseitigungstechnologie mittels Biofiltern.

Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak.

STEIN, M. (1993):

Untersuchungen zum organischen Staub als Träger von Geruchsstoffen.

Leipzig, Univ., Veterinärmed. Fak., Diss.

STEINMÜLLER, W., G. CLAUS, u., H. J. KUTZNER (1979):

Grundlagen der biologischen Abluftreinigung- Teil II. Mikrobiologischer Abbau von luftverunreinigenden Stoffen.

Staub-Reinhalt. Luft 39, Nr. 5, 149-152

STUMPF, B., W. R. ABRAHAM u. K. KIESLICH (1982):

Verfahren zur Herstellung von (+) α -Terpineol durch mikrobiologische Umwandlung von Limonen.

Patent, Nr. DE 3 243 090 (Deutsches Patentamt München)

SÜBMUTH, R., J. EBERSPÄCHER, R. HAAG u. W. SPRINGER (1999):

Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum.

2. Aufl. Verlag Thieme, Stuttgart, New York

SWISHER, R. D. (1970):

Surfactant science series.

Surfactant biodegradation

Verlag Marcel Dekker, New York, Bd. 3

TIDDEN, F., u. R. OETJEN-DEHNE (1992):

Modellversuch Bioabfallvergärung Ismaning – Sammlung und Vergärung von Bioabfällen aus dem Geschloßwohnbau.

Abfallwirtschaftjournal 4, 787-800

TRUDGILL, P. W. (1986):

Terpenoid Metabolism by *Pseudomonas*.

in: J. R. SOKATTCH u. N. L. ORNSTON (Hrsg.): The bacteria.

Verlag Academic Press, Orlando San Diego, Bd. 10, S 483-525

URIBE, S., u. A. PENA (1990):

Toxity of allelopathic monoterpene suspensions on yeast.
J. Chem. Ecol. 16, Nr. 4, 1399-1408

VAN DER WERF, M. J. (2000):

Purification and characterization of a Baeyer-Villiger mono-oxygenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 involved in three different monocyclic monoterpene degradation pathways.
Biochem. J. 347, 693-701

VAN DER WERF, M. J., H. J. SWARTS u. J. A. M. DE BONT (1999):

Rhodococcus erythropolis DCL 14 contains a novel degradation pathway for limonene.
Appl. Environ. Microbiol. 65 Nr. 5, 2092-2102

VAN DER WERF, M. J., K. M. OVERKAMP u. J. A. M. BONT (1998):

Limonene-1,2-Epoxyde hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases.
J. Bacteriol. 180, Nr. 19, 5052-5057

VAN LINTH, C. P. M. (1989):

Biofiltration, an essential technique in air pollution control.
in: L. J. BRASSER u. W. C. MULDER (Hrsg.): Man and his ecosystem.
Verlag Elsevier science publishers B. V., Amsterdam, Bd. 4, S. 393-398

VAN RAAJ, E., G. BRUHN u. U. FÖRSTNER (1996):

Identifizierung, Quantifizierung und Abbauverhalten ausgewählter organischer Schadstoffe im Kompost.
in: R. STEGMANN (Hrsg.): Hamburger Berichte 11, Neue Techniken der Kompostierung.
Verlag Economica, Bonn, S. 329-344

VEYS, A., W. CALLEWAERT, E. WAELKENS u. K. VAN DEN ABEELE (1989):

Application of gas-liquid chromatography to the routine identification of nonfermenting gram-negative bacteria in clinical specimens.
J. Clin. Microbiol. 27, 1538-1542

WÄCHTER, H., F. DRAWERT u. S. NITZ (1986):

Erprobung von verfahren zur qualitativen und quantitativen Erfassung von Geruchsstoffen.
VDI-Verlag, Düsseldorf, VDI-Berichte Nr. 561, 469-486

WAGNER, G., u. H. KÜHMSTEDT (Hrsg.) (1970):

in: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie.
2. Aufl., Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, S. 258-269

WAYNE, L. G., D. J. BRENNER, R. R. COLWELL, P. A. D. GRIMONT, O. KANDLER, M. I. KRICHEVSKY, L. H. MOORE, W. E. C. MOORE, R. G. E. MURRAY, E. STACKEBRANDT, M. P. STARR u. H. G. TRÜPER (1987):

Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics.
Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 463-464

- WEAST, C., M. J. ASTLE u. W. H. BEYER(Hrsg.) (1986):
CRC Handbook of chemistry and physics.
4. Aufl., Verlag CRC Press, Boca Raton, Florida, S. 31, 338
- WEBB, D. R., R. L. KANERVA, D. K. HYSELL, C. L. ALDEN u. L. D. LEHMAN-
McKEEMAN (1990):
Assessment of the subchronic oral toxicity of d-limonene in dogs.
Fd. Chem. Toxic. 28, Nr. 10, 669-675
- WEFING, H., u. F. FRIEDEL (1989):
Kompostierung von Biomüll in Bio-Containern.
in: K. J. THOME-KOZMIENSKY (Hrsg.): Recycling von Abfällen 1
EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik GmbH, Berlin
- WELCH, D. F. (1991):
Applications of cellular fatty acid analysis.
Clin. Microbiol. Rev. 4, 422-438
- WILKEN, M. (1993):
Analytische Methode: „Fingerprintanalyse“ – Screeninganalyse.
Schriftenreihe WAR 68, 39-53
- WINDSPERGER, A. (1989):
Einsatz biologischer Verfahren zur Reinigung lösungsmittelhaltiger Abgase.
GIT Supplement, Nr. 1, S. 24-33
- WINKLE, S. (1979):
Mikrobiologische und serologische Diagnostik.
Verlag Fischer, Stuttgart
- WINNEKE, G., u. B. STEINHEIDER (1998):
Expositions- Wirkungs- Zusammenhänge für Geruchsbelästigungen und Beschwerden: Eine
Übersicht.
VDI-Verlag Düsseldorf, VDI Berichte Nr. 1373, S. 361-371
- WÜNSCH, K.-H. (1980):
Einführung in die Chemie der Naturstoffe.
VEB Deutscher Verlag der Naturstoffe, Berlin
- WÜNSCHE, L., L. BRÜGGEMANN u. W. BABEL (1995):
Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to
assess population changes after hydrocarbon pollution.
FEMS Microbiol. Ecol. 17, 295-306
- YOUNG, P. J., u. A. PARKER (1984):
Origin and control of landfill odours.
Chem. Ind. 7, 329-333
- YOUSEF, R. T., u. G. G. TAWIL (1979):
Antimicrobial activity of volatile oil components.
Manuf. Chem. Aerosol News 50, Nr. 4, 59-63

YUBA, A., K. YAZAKI, M. TABATA, G. HONDA u. R. CROTEAU (1996):
CDNA cloning, characterization and functional expression of 4S(-)-limonene synthase from
Perilla frutescens.
Arch. Biochem. Biophys. 332, Nr. 21, 280-287

8.1 GESETZE UND VERORDNUNGEN

BUNDES-IMMISSIONSSCHUTZGESETZ (1990):
BImSchG - Gesetz zum Schutz vor schädlichen Umwelteinwirkungen durch
Luftverunreinigungen, Geräusche, Erschütterungen und ähnliche Vorgänge.
BGBl. I S. 880 ff.

BUNDES-IMMISSIONSSCHUTZVERORDNUNG (2000):
29 BImSchV- Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes
BGBl. I S. 735 ff.

KREISLAUFWIRTSCHAFTS- UND ABFALLGESETZ (1994):
KrW-/AbfG
BGBl. S. 2705 ff., geändert 1996, BGBl. I S. 1356 ff.

TA-LUFT (1986):
Erste Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Bundes-Immissionsschutzgesetz.
(Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft) vom 27.2.1986, GMBI. S. 95 ff.

UVPG (1990):
UVPG-Gesetz über die Umweltverträglichkeitsprüfung.
BGBl. I S. 205, geändert 1996, BGBl. I S. 1498 ff.

VDI-RICHTLINIE 3477 (1991):
Biologische Abgas-/Abluftreinigung: Biofilter.
in: Kommission Reinhaltung d. Luft im VDI: VDI-Handbuch Reinhaltung d. Luft.
Verlag Beuth, Berlin, Bd. 6

VDI-RICHTLINIE 3478 (1996):
Biologische Abgasreinigung – Biowäscher und Rieselbettreaktoren.
in: Kommission Reinhaltung d. Luft im VDI: VDI-Handbuch Reinhaltung d. Luft.
Verlag Beuth, Berlin, Bd. 6

VDI-RICHTLINIE 3881/BLATT 1-4 (1986):
Olfaktometrie-Geruchsschwellenbestimmung, Grundlagen.
in: Kommission Reinhaltung d. Luft im VDI: VDI-Handbuch Reinhaltung d. Luft.
Verlag Beuth, Berlin, Bd. 1

ANHANG

Übersicht A 1: Pufferlösungen und Reagenzien für die Gel-Elektrophorese

Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (30,8%)

Acrylamid	30,0% (w/v)
Bisacrylamid	0,8% (w/v)

Sammelpuffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)

Tris	6 g
A. dest.	60 ml

Der pH-Wert wird mit HCl auf 6.8 eingestellt und die Lösung auf 100 ml mit A. dest. aufgefüllt.

Trennpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6.8)

Tris	54,45 g
A. dest.	150 ml

pH-Wert mit HCl auf 8.8 einstellen und mit A. dest. auf 300 ml auffüllen.

Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)

APS	10% (w/v)
-----	-----------

Lösung vor dem Gebrauch frisch ansetzen.

Herstellung von Trenn- und Sammelgel (je 10 ml)

	Trenngel (12%)	Sammelpuffer
A. dest.	3,35 ml	1,3 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2,5 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	2,5 ml
10% (w/v) SDS-Lösung	100 µl	100 µl
Acrylamid-Stammlösung	4,0 ml	1,3 ml
10% (w/v) APS-Lösung	50 µl	50 µl
...N ^c -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5 µl	10 µl

SDS Proben-Puffer (Laemmli-Puffer, 8,0 ml)

A. dest.	3,0 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	1,0 ml
Glycerol	1,6 ml
10% SDS	1,6 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
0,5% Bromphenolblau (w/v)	0,4 ml

Übersicht A 2: Pufferlösungen und Reagenzien für die Gel-Elektrophorese

Coomassie blue (Färbelösung, 100 ml)

Coomassie blue G250	0,05 ml
Methanol	50 ml
Eisessig	10 ml
A. dest.	40 ml

Entfärbelösung (cHAC, 1000 ml)

Eisessig	100 ml
Methanol	50 ml
A. dest.	850 ml
HCL	5 % (v/v)

Tab. A 3: Substrate des API 20 NE-Testsystems

Testsubstrat	Abkürzung	Prinzip
KNO ₃	NO ₃	Die Nitratreduktion zu Nitrit zeigt eine rosa-rote Färbung. Bei der Nitratreduktion zu Stickstoff bleibt der Becher nach Zugabe von Zinkstaub farblos.
Tryptophan	TRP	Abbau von Tryptophan zu Indol zeigt rosa-rote Färbung.
Glukose	GLU	Glucosefermentation zeigt Farbumschlag von blau nach gelb (pH-Wert-Absenkung).
Arginin	ADH	Umwandlung des Arginins in Ammoniak durch Arginhydrolase, pH-Anstieg führt zum Farbumschlag von gelb nach orange/rot.
Harnstoff	URE	Freisetzung von Harnstoff durch Urease zeigt einen Farbumschlag von gelb nach rot (pH-Anstieg).
Äsculin	ESC	Hydrolyse durch β -Glucosidase bedingt Farbumschlag von gelb nach braun/schwarz.
Gelatine + Tusche	GEL	Hydrolyse mittels Proteasen führt zur Diffusion des schwarzen Pigments.
p-Nitro-Phenyl- β -D-Galactopyranosid	PNPG	Hydrolyse mittels β -Galactosidase führt zur Freisetzung von gelbem o-Nitrophenol.
Glucose	GLU	Assimilation führt zur Trübung des Substrates.
Arabinose	ARA	
Mannose	MNE	
Mannit	MAN	
N-Acetylglucosamin	NAG	
Maltose	MAL	
Gluconat	GNT	
Caprat	CAP	
Adipat	ADI	
Malat	MLT	
Citrat	CIT	
Phenylacetat	PAC	

Tab. A 4: Verfahrensprinzipien der im BBL CRYSTAL E/NF-System verwendeten Substrate

Testsubstrat	Abkürzung	Prinzip
Arabinose Mannose Saccharose Melibiose Rhamnose Sorbitol Mannitol Adonitol Galaktose Inositol	ARA MNS SUC MEL RHA SOR MNT ADO GAL INO	Die Verwertung dieser Kohlenhydrate führt zu einem Absinken des pH- Wertes, verbunden mit einem Indikatorumschlag (Phenolrot).
p-n-p-Phosphat p-n-p- α - β -Glukosid p-n-p-Galaktosid	PHO BGL NPG	Enzymatische Hydrolyse von farblosem aryl-substituiertem Glykosid oder Phosphatester führt zur Freisetzung von gelbem p-Nitrophenol.
Prolin-Nitroanilid	PRO	Die enzymatische Hydrolyse von farblosem Amidsubstrat setzt gelbes p- Nitroanilin frei.
p-n-p-Biphosphat p-n-p-Xylosid p-n-p- α -Arabinosid p-n-p-Phosphorylcholin p-n-p- β -Glukoronid p-n-p-N-Azetyl-Glukosamid	BPH BXY AAR PHC GLR NAG	Die enzymatische Hydrolyse von farblosem aryl-substituierten Glykosid oder Phosphatester führt zur Freisetzung von gelbem p-Nitrophenol.
γ -L-Glutamyl-p-Nitroanilid	GGL	Enzymatische Hydrolyse von farblosem Amidsubstrat setzt gelbes p- Nitroanilin frei.
Äskulin	ESC	Die Hydrolyse von Äskulin erzeugt ein schwarzes Präzipitat in Gegenwart von Eisen-III-Ionen.
p-Nitro-DL-Phenylalanin	PHE	Bei der oxydativen Desaminierung von Phenylalanin entsteht eine Braunfärbung in Gegenwart von Eisen-III-Ionen.
Harnstoff	URE	Hydrolyse von Harnstoff und das entstehende Ammonium führen zu dem Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau).
Glyzin Citrat Malonat	GLY CIT MLO	Durch Verwertung dieser Substrate entstehen alkalische Stoffwechselprodukte, die den Farbumschlag des pH-Indikators auslösen (Bromthymolblau).
Tetrazolium	TTC	Reduktion der Tetrazolium-Verbindung führt zur Bildung von rotem Formazan.
Arginin Lysin	ARG LYS	Anarober Katabolismus führt zu pH-Anstieg und zu einem Farbumschlag des Indikators (Bromkresolviolett).

Tab. A 5: Verfahrensprinzipien der im BBL CDYSTAT GP-System verwendeten Substrate

Testsubstrat	Abkürzung	Prinzip
Fluoreszierende negative Kontrolle	FCT	Standardisierte Kontrolle der fluoreszierenden Substratresultate
4MU- β -D-Glukosid Valin L-Phenylalanin 4MU- α -D-Glukosid l-Pyroglutaminsäure-AMC l-Tryptophan-AMC L-Arginin-AMC 4MU-N-Azetyl- β -D-Glukosid 4MU-Phosphat 4MU- β -D-Glukuronid L-Isoleucin	FGC FVA FPH FGS FPY FTR FAR FGA FHO FGN FIS	Enzymatische Hydrolyse der Amid- oder Glukosidverbindungen führt zur Freisetzung fluoreszierender Cumarinderivate.
Trehalose Lactose Methyl- α & β -Glukosid Saccharose Manitol Maltotriose Arabinose Glyzerin Fruktose	TRE LAC MAB SUC MNT MTT ARA GLR FRU	Die Verwertung dieser Kohlenhydrate bedingt eine pH-Wert-Absenkung und einen Indikatorumschlag (Phenolrot).
p-Nitrophenyl- β -D-Glukosid p-Nitrophenyl- β -D-Cellobiosid	BGL PCE	Die enzymatische Hydrolyse des farblosen Glykosids setzt gelbes p-Nitrophenol frei.
Prolin&Leucin-p-Nitroanilid	PLN	Die enzymatische Hydrolyse des farblosen Amidsubstrates setzt gelbes p-Nitroanilin frei.
p-Nitrophenyl-Phosphat p-Nitrophenyl- α -D-Maltosid o-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid	PHO PAM PGO	Die enzymatische Hydrolyse des Glukosids führt zur Freisetzung von gelbem p-Nitrophenol.
Harnstoff	URE	Die Hydrolyse des Harnstoffs und daraus gebildetes Ammoniak verursachen einen Farbumschlag des pH-Indikators (Bromthymolblau).
Eskulin	ESC	Durch Hydrolyse entsteht ein schwarzes Präzipitat in Gegenwart von Eisen-III-Ionen.
Arginin	ARG	Die Verwertung von Arginin führt zu pH-Wert-Anstieg und einem Farbumschlag des Indikators (Bromkresolviolett)

Tab. A 6: Kohlenstoffquellen, die bei den Isolaten L1,2, L2,4, L2,6, L3,6, L3,8, L4,10 mit dem MicroLog-Systems getestet wurden

	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10	A 11	A 12
Wasser		α -Dextro-	Dextrin	Glycogen	Tween 40	Tween 80	N-Acetyl-D-amin	N-Acetyl-D-Glucosamin	Adonitol	Arabinose	Arabitol	Cellobiose
B 1		B 2	B 3	B 4	B 5	B 6	B 7	B 8	B 9	B 10	B 11	B 12
Erythritol		Fructose	Fructose	Galactose	Gentiobiose	Glucose	Inositol	Lactose	Lactulose	Maltose	Mannitol	Mannose
C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8	C 9	C 10	C 11	C 12	
Melbiose	β -Methyl D-Glucose	Psicose	Raffinose	Rhamnose	Sorbitol	Saccharose	Trehalose	Turanose	Xylitol	Methyl-Pyruvat	Mono-Methyl-Succinat	
D 1	D 2	D 3	D 4	D 5	D 6	D 7	D 8	D 9	D 10	D 11	D 12	
Essig-säure	Aconitsäure	Zitronen-säure	Ameisen-säure	Galacton-säurelacton	Galacturon-säure	Glucosamin-säure	Glucosamin-säure	Glucoron-säure	Hydroxy-Butter-säure	Hydroxy-Butter-säure	Hydroxy-Butter-säure	Hydroxy-Butter-säure
E 1	E 2	E 3	E 4	E 5	E 6	E 7	E 8	E 9	E 10	E 11	E 12	
p-Hydroxy-Phenyllessig-säure	Itazon-säure	α -Keto-Butter-säure	α -Keto-Glutar-säure	α -Keto-Valerian-säure	D,L-Milch-säure	Malon-säure	Propion-säure	Quin-säure	Saccharin-säure	Sebazin-säure	Bernstein-säure	
F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9	F 10	F 11	F 12	
Bromo-succin-säure	Succinamid-säure	Glucoron-amid	Alaninamid	Alanin	Alanin	Alanin	Alanin	Asparagin	Asparagin-säure	Glutamin-säure	Glycyl-L-Asparagin-säure	Glycyl-L-Glutamin-säure
G 1	G 2	G 3	G 4	G 5	G 6	G 7	G 8	G 9	G 10	G 11	G 12	
L-Histidin	Hydroxy L-Prolin	L-Leucin	L-Ornithin	L-Phenyl-alanin	L-Prolin	L-Pyro-Glutamin-säure	D-Serin	L-Serin	L-Threonin	D,L-Carnitin	γ -Amino-Buttersäure	
H 1	H 2	H 3	H 4	H 5	H 6	H 7	H 8	H 9	H 10	H 11	H 12	
Urocamin-säure	Inosin	Uridin	Thymidin	Phenyl-ethylamin	Putrecin	2-Amino-Ethanol	2,3-Butandiol	Glycerol	D,L- α -Glycerol phosphat	Glucose-1-phosphat	Glucose-6-phosphat	

Tab. A 7: Limonenkonzentrationen in Roh- und Reingas $c_{\text{roh/rein}}$ in mg/m^3 ($\bar{x} \pm S$, $n = 3$) und daraus errechnete Wirkungsgrade η in % einschließlich einer 81-tägigen Einlaufphase des Modellbiofilters im Biofilterversuch 1

Versuchstag	Rohgaskonzentration $c_{\text{roh}} (\text{mg/m}^3)$	Reingaskonzentration $c_{\text{rein}} (\text{mg/m}^3)$	Wirkungsgrad η (%)
0	11,1 ± 16,9	24,3 ± 13,6	0
2	19,4 ± 3,9	20,6 ± 3,0	0
9	16,7 ± 0,8	4,1 ± 0,2	75,5
16	37,1 ± 4,2	13,9 ± 4,6	62,7
27	31,4 ± 1,6	26,5 ± 3,1	15,5
33	46,7 ± 4,0	32,9 ± 13,1	29,7
55	145,4 ± 4,7	66,3 ± 5,2	54,4
61	146,1 ± 6,1	61,7 ± 4,2	57,8
70	180,8 ± 0	42,3 ± 6,6	76,6
82	121,0 ± 5,1	30,4 ± 1,3	74,9
84	130,2 ± 9,9	30,3 ± 5,0	76,7
86	104,4 ± 19,3	25,0 ± 6,3	76,0
89	142,3 ± 3,8	15,1 ± 1,3	89,3
91	61,7 ± 27,9	19,0 ± 3,2	69,1
93	20,4 ± 6,6	2,8 ± 0,7	86,2
96	66,0 ± 4,0	3,7 ± 3,2	94,4
111	21,9 ± 4,0	4,3 ± 2,3	80,4
112	74,4 ± 10,4	13,3 ± 6,4	82,1
119	42,0 ± 3,8	8,2 ± 3,7	80,5
121	10,9 ± 0,1	3,0 ± 1,0	72,5

Limonenkonzentration: 0.-13. Tag, 11 ml/d; 14.-121.Tag, 21 ml/d

Luftstrom: 0.-63. Tag = 6 m^3/h ; 64.-81. Tag, 3 m^3/h ; 84.-121. Tag, 10 m^3/h

Tab. A 8: Olfaktorische Beurteilung des Limonenabbaus isolierter Reinkulturen aus der Batch-Kultur 1 (**Gemisch aus Fichtenzapfen, -nadeln und -rinde**) in einem Zeitraum von 154 Stunden

Olfaktorische Wahrnehmung von Limonen in der Zeit (t)							
in Stunden (h)							
Isolat	6	12	24	48	96	130	154
L1,1a	+++	+++	+++	++	++	++	++
L1,1b	+++	+++	++	++	++	++	++
L1,2	+++	+++	++	-	-	-	-
L1,4a	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L1,4b	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L1,5	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L1,7	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L1,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L1,9	+++	+++	+++	++	+	+	+
L1,10	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L1,11	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L1,12	+++	+++	+++	+++	++	+	++
L1,13	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

Tab. A 9: Olfaktorische Beurteilung des Limonenabbaus isolierter Reinkulturen aus der Batch-Kultur 2 (**Nadelwaldboden**) in einem Zeitraum von 154 Stunden

Olfaktorische Wahrnehmung von Limonen in der Zeit (t)							
in Stunden (h)							
Isolat	6	12	24	48	96	130	154
L2,1a	+++	+++	+++	++	++	++	++
L2,1b	+++	+++	++	++	++	++	++
L2,2	+++	+++	++	-	-	-	-
L2,3	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L2,4	+++	+++	++	-	-	-	-
L2,5	+++	+++	++	++	++	++	++
L2,6	+++	+	-	-	-	-	-

Tab. A 10: Olfaktorische Beurteilung des Limonenabbaus isolierter Reinkulturen aus der Batch-Kultur 3 (**Schalen von Zitrusfrüchten**) in einem Zeitraum von 120 Stunden

Isolat	Olfaktorische Wahrnehmung von Limonen in der Zeit (t) in Stunden (h)						
	6	12	24	48	72	96	120
L3,1	+++	+++	+++	+++	++	++	+
L3,2	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L3,3	+++	+++	+++	++	+	+	+
L3,4	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L3,5	+++	+++	+++	++	+	+	+
L3,6	+++	++	+/-	-	-	-	-
L3,7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L3,8	+++	+	+/-	-	-	-	-

Tab. A 11: Olfaktorische Beurteilung des Limonenabbaus isolierter Reinkulturen aus der Batch-Kultur 4 (**Bioabfall**) in einem Zeitraum von 120 Stunden

Isolat	Olfaktorische Wahrnehmung von Limonen in der Zeit (t) in Stunden (h)						
	6	12	24	48	72	96	120
L4,1	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L4,2	+++	+++	+++	++	++	++	++
L4,3	+++	+++	++	+++	+++	++	++
L4,4	+++	+++	++	++	++	++	++
L4,5	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L4,6	+++	+++	+++	++	++	++	++
L4,7	+++	+++	++	++	++	++	++
L4,8	+++	+++	++	++	++	++	++
L4,9	+++	+++	+++	+++	++	++	++
L4,10	+++	++	-	-	-	-	-
L4,11	+++	+++	++	++	++	++	++
L4,14	+++	+++	++	++	++	++	++
L4,15	+++	++	++	++	++	++	++
L4,16a	+++	+++	++	++	++	++	++
L4,16b	+++	+++	+++	+++	++	++	++

Limonengeruch- nicht feststellbar; +/- fraglich; + schwach; ++ mäßig; +++ stark
 +++ unbekannter intensiver Geruch

Tab. A 12: Limonenkonzentrationen, pH-Wert-Verlauf, Bestimmung des Wachstums der Kulturen durch Trübungsmessung und Lebendzellzahl-Bestimmung in KBE/ml ($\bar{x} \pm S$, n = 3) während des Limonenabbaus durch die Batch-Kulturen (Versuch 1)

Parameter	Kontrolle 20 μ l	Kultur 1 20 μ l	Kultur 2 20 μ l	Kultur 3 20 μ l	Kultur 4 20 μ l
pH-Wert					
0 h	6,90 \pm 0,01	6,90 \pm 0,01	6,90 \pm 0,01	6,90 \pm 0,00	6,90 \pm 0,01
17 h	6,73 \pm 0,00	6,77 \pm 0,01	6,44 \pm 0,00	6,78 \pm 0,02	6,31 \pm 0,01
29 h	6,81 \pm 0,02	6,67 \pm 0,02	6,65 \pm 0,02	6,27 \pm 0,01	6,45 \pm 0,01
53 h	n.g.	6,60 \pm 0,01	6,55 \pm 0,01	6,36 \pm 0,01	6,52 \pm 0,01
89 h	6,67 \pm 0,05	6,62 \pm 0,00	6,55 \pm 0,01	6,27 \pm 0,02	6,54 \pm 0,02
OD_{550 nm}					
0 h	0 \pm 0	0,006 \pm 0,001	0,021 \pm 0,001	0,495 \pm 0,000	0,108 \pm 0,001
17 h	0 \pm 0	0,006 \pm 0,001	0,025 \pm 0,002	0,990 \pm 0,004	0,159 \pm 0,001
20 h	0 \pm 0	0,101 \pm 0,004	0,090 \pm 0,001	0,959 \pm 0,131	0,370 \pm 0,002
23 h	0 \pm 0	0,250 \pm 0,069	0,060 \pm 0,001	0,935 \pm 0,002	0,506 \pm 0,005
29 h	0 \pm 0	0,427 \pm 0,004	0,199 \pm 0,011	0,852 \pm 0,007	0,503 \pm 0,004
41 h	0 \pm 0	0,497 \pm 0,005	0,360 \pm 0,003	1,450 \pm 0,004	0,990 \pm 0,002
44 h	0 \pm 0	0,601 \pm 0,002	1,047 \pm 0,005	1,429 \pm 0,007	1,134 \pm 0,011
48 h	0 \pm 0	0,596 \pm 0,004	1,173 \pm 0,033	1,280 \pm 0,023	0,906 \pm 0,003
53 h	0 \pm 0	0,534 \pm 0,002	1,062 \pm 0,002	1,590 \pm 0,007	1,011 \pm 0,002
65 h	0 \pm 0	0,657 \pm 0,005	0,951 \pm 0,013	1,405 \pm 0,002	1,016 \pm 0,016
70 h	0 \pm 0	0,632 \pm 0,010	1,018 \pm 0,005	1,571 \pm 0,004	1,104 \pm 0,007
89 h	0 \pm 0	0,624 \pm 0,002	1,021 \pm 0,018	1,471 \pm 0,003	1,051 \pm 0,011
LKZ in KBE/ml					
17 h	/	3,75 x 10 ⁷ \pm 0,35	8,78 x 10 ⁷ \pm 1,37	3,83 x 10 ⁸ \pm 1,57	4,52 x 10 ⁷ \pm 0,83
41 h	/	2,11 x 10 ⁹ \pm 0,28	7,00 x 10 ⁸ \pm 0,50	3,32 x 10 ⁹ \pm 0,65	3,36 x 10 ⁹ \pm 0,90
53 h	/	9,75 x 10 ⁸ \pm 3,75	1,15 x 10 ⁹ \pm 4,12	2,25 x 10 ⁹ \pm 0,39	1,85 x 10 ⁹ \pm 0,50
80 h	/	1,15 x 10 ⁹ \pm 2,51	3,62 x 10 ⁸ \pm 0,62	3,90 x 10 ⁸ \pm 0,90	1,43 x 10 ⁹ \pm 0,16
Limonen (mg/l)					
0 h	783,5 \pm 5,93	754,3 \pm 5,79	759,5 \pm 1,08	712,5 \pm 1,63	536,5 \pm 4,71
17 h	942,0 \pm 3,94	636,0 \pm 0,41	644,0 \pm 4,09	333,5 \pm 11,77	378,0 \pm 4,90
29 h	640,0 \pm 2,48	7,5 \pm 1,57	611,5 \pm 2,87	2,5 \pm 0,04	7,5 \pm 0,02
41 h	829,0 \pm 1,08	3,5 \pm 0,40	136,5 \pm 2,45	2,0 \pm 0,24	0,0 \pm 0,00
53 h	829,5 \pm 3,27	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00
65 h	859,0 \pm 3,34	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00
89 h	926,0 \pm 2,94	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00

n. g. = nicht gemessen

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Mineralsalzmedium

Tab. A 13: Limonenkonzentrationen ($\bar{x} \pm S$, $n = 3$) während des Limonenabbaus durch die Batch-Kulturen (Versuch 2)

Parameter	Versuchsverlauf					
	Kontrolle		Kultur 1	Kultur 2	Kultur 3	Kultur 4
	1	2	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
<i>quantitative Beurteilung</i>						
mg Limonen/ LMM						
0 h	629,5 \pm 16,75	882,5 \pm 10,00	770,0 \pm 2,44	724,0 \pm 7,34	889,5 \pm 5,50	867,0 \pm 13,07
7 h	765,0 \pm 16,25	681,0 \pm 7,96	775,5 \pm 7,35	683,5 \pm 10,43	608,5 \pm 9,40	704,0 \pm 12,47
10 h	/	725,5 \pm 5,72	/	/	641,0 \pm 8,30	692,0 \pm 11,83
13 h	/	476,5 \pm 6,12	/	/	542,5 \pm 17,49	446,0 \pm 3,77
16 h	/	673,0 \pm 0,41	/	/	518,0 \pm 10,84	476,5 \pm 0,00
18 h	/	/	191,0 \pm 4,70	60,5 \pm 0,72	/	/
19 h	/	689,5 \pm 0,00	/	/	295,0 \pm 5,31	263,0 \pm 12,47
21 h	695,0 \pm 12,04	/	3,8 \pm 0,20	11,0 \pm 0,24	/	/
22 h	/	611,5 \pm 6,53	/	/	19,7 \pm 0,47	4,6 \pm 0,20
24 h	/	630,5 \pm 8,78	3,2 \pm 0,74	2,8 \pm 0,08	5,5 \pm 0,00	4,3 \pm 0,04
26 h	/	698,0 \pm 22,25	/	/	1,8 \pm 0,16	1,6 \pm 0,18
27 h	/	/	6,4 \pm 0,24	2,7 \pm 0,10	/	/
30 h	778,0 \pm 1,03	/	3,3 \pm 0,08	3,1 \pm 0,00	/	/
32 h	757,5 \pm 15,90	/	3,3 \pm 0,16	3,5 \pm 0,08	/	/
36 h	/	/	/	/	0,8 \pm 0,04	1,1 \pm 0,10
39 h	/	/	/	/	0,6 \pm 0,14	0,4 \pm 0,00
42 h	743,0 \pm 16,50	/	3,8 \pm 0,05	3,3 \pm 0,08	/	/
45 h	726,0 \pm 2,25	/	4,0 \pm 0,08	3,3 \pm 0,24	/	/
59 h	/	645,5 \pm 3,06	/	/	0,0 \pm 0,00	0 \pm 0,00

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Ausgangsmedium

Tab. A 14: pH-Wert Verlauf, Bestimmung des Wachstums durch Trübungsmessung und Lebendkeimzahl-Bestimmung in KBE/ml ($\bar{x} \pm S$, $n = 2$) während des Limonenabbaus durch die Batch-Kulturen 1-4 (Versuch 2)

Parameter	Versuchsverlauf					
	Kontrolle		Kultur 1	Kultur 2	Kultur 3	Kultur 4
pH-Wert	1	2				
0 h	6,95 ± 0,00	6,90 ± 0,00	6,75 ± 0,01	6,71 ± 0,01	6,81 ± 0,01	6,80 ± 0,01
8 h	6,89 ± 0,01	6,89 ± 0,01	6,74 ± 0,01	6,72 ± 0,01	6,90 ± 0,01	6,87 ± 0,01
19 h	6,95 ± 0,01	6,91 ± 0,01	6,51 ± 0,01	6,47 ± 0,02	6,67 ± 0,01	6,65 ± 0,02
24 h	6,88 ± 0,02	6,90 ± 0,02	6,34 ± 0,08	6,34 ± 0,04	6,65 ± 0,03	6,61 ± 0,01
27 h	6,89 ± 0,01	6,89 ± 0,01	6,41 ± 0,01	6,38 ± 0,01	6,47 ± 0,01	6,41 ± 0,02
30 h	6,89 ± 0,02	6,87 ± 0,02	6,44 ± 0,03	6,41 ± 0,02	6,54 ± 0,04	6,54 ± 0,01
OD _{550nm}						
0 h	0 ± 0	0 ± 0	0,137 ± 0,000	0,143 ± 0,004	0,405 ± 0,000	0,186 ± 0,007
2 h	0 ± 0	0 ± 0	0,153 ± 0,002	0,141 ± 0,002	0,232 ± 0,001	0,159 ± 0,001
4 h	0 ± 0	0 ± 0	/	/	0,252 ± 0,003	0,225 ± 0,000
6 h	0 ± 0	0 ± 0	0,166 ± 0,001	0,247 ± 0,002	0,262 ± 0,001	0,204 ± 0,003
8 h	0 ± 0	0 ± 0	0,275 ± 0,000	0,243 ± 0,003	0,349 ± 0,002	0,268 ± 0,002
9 h	0 ± 0	0 ± 0	/	/	0,380 ± 0,001	0,293 ± 0,000
10 h	0 ± 0	0 ± 0	0,343 ± 0,001	0,471 ± 0,003	/	/
11 h	0 ± 0	0 ± 0	0,774 ± 0,022	0,495 ± 0,006	/	/
12 h	0 ± 0	0 ± 0	0,996 ± 0,000	0,735 ± 0,003	/	/
17 h	0 ± 0	0 ± 0	/	/	0,629 ± 0,004	0,530 ± 0,003
19 h	0 ± 0	0 ± 0	1,351 ± 0,000	1,643 ± 0,005	1,061 ± 0,000	0,808 ± 0,000
20 h	0 ± 0	0 ± 0	1,405 ± 0,008	1,817 ± 0,004	/	/
21 h	0 ± 0	0 ± 0	1,572 ± 0,001	1,912 ± 0,046	1,106 ± 0,004	0,856 ± 0,006
22 h	0 ± 0	0 ± 0	1,887 ± 0,004	1,885 ± 0,000	/	/
23 h	0 ± 0	0 ± 0	1,971 ± 0,003	1,863 ± 0,005	1,094 ± 0,011	1,302 ± 0,001
24 h	0 ± 0	0 ± 0	1,958 ± 0,005	1,802 ± 0,002	/	/
25 h	0 ± 0	0 ± 0	1,911 ± 0,002	1,793 ± 0,003	1,101 ± 0,003	1,299 ± 0,028
27 h	0 ± 0	0 ± 0	1,850 ± 0,002	1,773 ± 0,002	/	/
30 h	0 ± 0	0 ± 0	1,763 ± 0,014	1,854 ± 0,012	/	/
36 h	0 ± 0	0 ± 0	/	/	1,067 ± 0,005	0,822 ± 0,046
GKZ in KBE/ml (NA I)						
0 h			8,25 x 10 ⁷ ± 1,29	9,88 x 10 ⁷ ± 2,72	2,18 x 10 ⁸ ± 0,47	1,26 x 10 ⁸ ± 2,85
2 h			/	/	6,42 x 10 ⁷ ± 0,07	2,95 x 10 ⁷ ± 0,45
3 h			9,75 x 10 ⁷ ± 0,95	7,94 x 10 ⁷ ± 1,06	/	/
4 h			/	/	4,40 x 10 ⁷ ± 0,14	2,60 x 10 ⁷ ± 0,40
6 h			1,05 x 10 ⁸ ± 0,02	1,03 x 10 ⁸ ± 1,37	5,50 x 10 ⁷ ± 1,00	1,45 x 10 ⁷ ± 0,05
8 h			1,65 x 10 ⁸ ± 0,15	1,85 x 10 ⁸ ± 0,02	3,83 x 10 ⁸ ± 0,75	3,00 x 10 ⁷ ± 3,75
9 h			/	/	4,10 x 10 ⁸ ± 0,10	2,77 x 10 ⁷ ± 0,22
10 h			6,70 x 10 ⁸ ± 0,32	8,30 x 10 ⁸ ± 0,40	/	/
19 h			2,69 x 10 ⁹ ± 0,21	2,68 x 10 ⁹ ± 0,08	8,95 x 10 ⁸ 3,05	1,85 x 10 ⁸ ± 0,15
21 h			1,64 x 10 ⁹ ± 0,34	9,95 x 10 ⁸ ± 0,62	/	/
22 h			/	/	1,94 x 10 ⁹ ± 0,04	3,40 x 10 ⁸ ± 1,07
23 h			/	/	2,22 x 10 ⁹ ± 0,23	5,35 x 10 ⁸ ± 0,85
24 h			6,04 x 10 ⁹ ± 3,00	2,00 x 10 ⁸ ± 1,00	5,36 x 10 ⁹ ± 1,68	3,40 x 10 ⁹ ± 0,70
30 h			n. a.	4,10 x 10 ⁸ ± 0,69	/	/
32 h			2,40 x 10 ⁹ ± 1,00	1,14 x 10 ⁸ ± 6,15	/	/
36 h			/	/	3,95 x 10 ⁹ ± 0,55	3,68 x 10 ⁸ ± 0,03

n. a. = nicht auswertbar

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Ausgangsmedium

Tab. A 15: Limonenkonzentrationen ($\bar{x} \pm S$, $n = 3$), die mittels GC in den Kontrollproben bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen für Limonen ermittelt wurden (Versuch 3)

Parameter	Kontrolle			
	40 μ l	60 μ l	80 μ l	100 μ l
Limonen (mg/l) nach				
0 h	2166,5 \pm 30,6	2693,5 \pm 5,3	3380,0 \pm 7,3	4259,5 \pm 8,1
19,5 h	2203,5 \pm 6,1	2653,5 \pm 4,7	3333,0 \pm 10,6	4101,0 \pm 7,9
30,5 h	2119,5 \pm 6,3	2724,0 \pm 5,4	3411,0 \pm 9,6	4397,5 \pm 7,5
43,5 h	1731,5 \pm 10,6	2586,0 \pm 8,0	3113,0 \pm 13,0	3754,0 \pm 5,1
67,5 h	1784,5 \pm 2,5	2565,0 \pm 7,6	3475,0 \pm 6,2	4151,5 \pm 3,9
115,5 h	1685,5 \pm 4,0	2668,5 \pm 12,6	3776,0 \pm 7,9	4080,0 \pm 11,0
139,5 h	1724,0 \pm 8,6	2788,0 \pm 10,0	3385,0 \pm 9,9	4048,0 \pm 12,6
163,5 h	1649,5 \pm 2,8	2667,0 \pm 5,7	3660,0 \pm 5,3	4080,0 \pm 5,3
187,5 h	1701,0 \pm 8,2	2713,0 \pm 12,7	3373,5 \pm 10,0	4034,5 \pm 7,2

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Mineralsalzmedium

Tab. A 16: Limonenkonzentrationen ($\bar{x} \pm S$, $n = 3$), die mittels GC während des Limonenabbaus durch die Batch-Kultur 1 bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen für Limonen ermittelt wurden (Versuch 3)

Parameter	Batch-Kultur 1			
	40 μ l	60 μ l	80 μ l	100 μ l
Limonen (mg/l) nach				
0 h	1957,0 \pm 10,5	3206,0 \pm 17,7	4164,0 \pm 9,4	4202,5 \pm 10,7
19,5 h	1701,5 \pm 6,5	3744,5 \pm 16,3	4425,5 \pm 18,4	4293,0 \pm 5,6
30,5 h	596,5 \pm 35,0	1013,5 \pm 9,4	2578,5 \pm 1,4	4502,0 \pm 50,0
43,5 h	331,5 \pm 8,5	618,5 \pm 59,7	2388,5 \pm 50,6	3595,5 \pm 47,3
67,5 h	1,0 \pm 0,0	597,5 \pm 11,4	1151,5 \pm 14,0	1903,5 \pm 141,0
115,5 h	0,0 \pm 0,0	15,5 \pm 0,4	579,0 \pm 1,2	3288,0 \pm 65,3
139,5 h	0,0 \pm 0,0	/	/	/
163,5 h	0,0 \pm 0,0	/	758,0 \pm 2,3	/
187,5 h	0,0 \pm 0,0	/	/	1288,0 \pm 61,0

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Mineralsalzmedium

Tab. A 17: Limonenkonzentrationen ($\bar{x} \pm S$, $n = 3$), die mittels GC während des Limonenabbaus durch die Batch-Kultur 2 bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen für Limonen ermittelt wurden (Versuch 3)

Parameter	Batch-Kultur 2			
	40 μ l	60 μ l	80 μ l	100 μ l
Limonen (mg/l) nach				
0 h	2106,0 \pm 7,0	3045,0 \pm 8,0	4062,5 \pm 12,7	4935,5 \pm 11,0
19,5 h	1998,0 \pm 0,0	3421,5 \pm 28,6	4773,0 \pm 17,7	5746,5 \pm 78,0
30,5 h	2210,0 \pm 10,3	1956,0 \pm 40,0	2832,5 \pm 56,1	4924,5 \pm 27,5
43,5 h	451,0 \pm 22,5	1434,0 \pm 26,7	/	4088,5 \pm 27,7
67,5 h	181,0 \pm 0,0	1431,0 \pm 0,0	2060,5 \pm 41,5	3269,0 \pm 69,2
115,5 h	24,5 \pm 0,4	325,5 \pm 0,7	931,5 \pm 9,2	/
139,5 h	9,5 \pm 0,0	640,0 \pm 3,7	/	/
163,5 h	0,0 \pm 0,0	/	1569,0 \pm 21,0	/
187,5 h	0,0 \pm 0,0	/	/	2865,0 \pm 29,0

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Mineralsalzmedium

Tab. A 18: Limonenkonzentrationen ($\bar{x} \pm S$, $n = 3$), die mittels GC während des Limonenabbaus durch die Batch-Kulturen 1 und 2 sowie Kontrollproben bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen für Limonen ermittelt wurden (Versuch 3)

Parameter	Kontrolle	Kultur 1	Kultur 2
Limonen (mg/l) nach	30 μ l	30 μ l	30 μ l
0 h	1553,0 \pm 2,16	1275,5 \pm 3,49	1250,0 \pm 2,48
17 h	1352,5 \pm 2,12	874,0 \pm 0,82	829,0 \pm 1,63
29 h	1565,0 \pm 2,86	883,5 \pm 13,2	1286,0 \pm 15,0
41 h	1490,0 \pm 1,03	53,5 \pm 2,04	906,5 \pm 52,7
53 h	1510,0 \pm 1,08	1,5 \pm 0,07	0,0 \pm 0,00
65 h	1520,0 \pm 1,63	0,5 \pm 0,07	0,0 \pm 0,00
89 h	1622,0 \pm 1,87	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Mineralsalzmedium

Tab. A 19: pH-Wert-Verlauf, Wachstum und Lebendkeimzahl-Bestimmung in KBE/ml der Kontrollproben ($\bar{x} \pm S$, $n = 3$) bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen für Limonen (Versuch 3)

Parameter	Kontrolle				
	30 μ l	40 μ l	60 μ l	80 μ l	100 μ l
pH-Wert					
0 h	/	$7,00 \pm 0,08$	$7,00 \pm 0,08$	$7,00 \pm 0,08$	$7,00 \pm 0,08$
24 h	$6,76 \pm 0,02$	$6,91 \pm 0,01$	$6,92 \pm 0,01$	$6,92 \pm 0,01$	$6,92 \pm 0,02$
48 h	$6,78 \pm 0,01$	$6,92 \pm 0,01$	$6,92 \pm 0,01$	$6,90 \pm 0,01$	$6,93 \pm 0,01$
72 h	/	$6,91 \pm 0,00$	$6,80 \pm 0,02$	$6,88 \pm 0,01$	$6,72 \pm 0,07$
96 h	$6,71 \pm 0,02$	$6,92 \pm 0,01$	$6,91 \pm 0,02$	$6,89 \pm 0,04$	$6,91 \pm 0,00$
OD _{600nm}					
0 h	$0 \pm 0,00$				
2,5 h	$0 \pm 0,00$				
3,0 h	$0 \pm 0,00$				
4,5 h	$0 \pm 0,00$				
6,5 h	$0 \pm 0,00$				
8,5 h	$0 \pm 0,00$				
10,5 h	$0 \pm 0,00$				
25 h	$0 \pm 0,00$				
29 h	$0 \pm 0,00$				
97 h	$0 \pm 0,00$				
LKZ in KBE/ml					
17 h	/	/	/	/	/
24 h	/	/	/	/	/
96 h	/	/	/	/	/

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Mineralsalzmedium

Tab. A 20: pH-Wert-Verlauf, Wachstum und Lebendkeimzahl-Bestimmung in KBE/ml ($\bar{x} \pm S$, n = 3) während des Limonenabbaus durch die Batch-Kultur 1 bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen für Limonen (Versuch 3)

Parameter	Batch-Kultur 1			
	40 μ l	60 μ l	80 μ l	100 μ l
pH-Wert				
0 h	6,99 \pm 0,04	6,96 \pm 0,01	6,89 \pm 0,02	6,86 \pm 0,02
24 h	6,15 \pm 0,05	5,93 \pm 0,03	5,91 \pm 0,12	5,95 \pm 0,04
48 h	6,85 \pm 0,02	6,76 \pm 0,05	6,72 \pm 0,03	6,77 \pm 0,04
72 h	6,40 \pm 0,03	6,51 \pm 0,07	6,84 \pm 0,04	6,83 \pm 0,03
96 h	6,63 \pm 0,05	6,45 \pm 0,05	6,07 \pm 0,04	6,06 \pm 0,03
OD _{600nm}				
0 h	0,076 \pm 0,003	0,072 \pm 0,001	0,052 \pm 0,001	0,067 \pm 0,006
2,5 h	0,137 \pm 0,001	0,049 \pm 0,002	0,051 \pm 0,007	0,047 \pm 0,014
3,0 h	0,090 \pm 0,004	0,067 \pm 0,008	0,075 \pm 0,002	0,065 \pm 0,009
4,5 h	0,258 \pm 0,002	0,060 \pm 0,003	0,080 \pm 0,006	0,043 \pm 0,010
6,5 h	0,360 \pm 0,004	0,088 \pm 0,009	0,105 \pm 0,020	0,067 \pm 0,007
8,5 h	0,594 \pm 0,005	0,256 \pm 0,007	0,106 \pm 0,006	0,080 \pm 0,003
10,5 h	0,711 \pm 0,020	0,568 \pm 0,011	0,113 \pm 0,001	0,085 \pm 0,004
25 h	1,172 \pm 0,002	1,001 \pm 0,005	0,119 \pm 0,014	0,123 \pm 0,009
29 h	1,140 \pm 0,013	1,097 \pm 0,004	0,195 \pm 0,005	0,168 \pm 0,016
97 h	1,069 \pm 0,002	1,011 \pm 0,002	0,183 \pm 0,006	0,230 \pm 0,004
LKZ in KBE/ml				
17 h	2,59 x 10 ⁸ \pm 0,55	6,02 x 10 ⁶ \pm 1,50	2,00 x 10 ⁵ \pm 1,00	3,00 x 10 ⁵ \pm 1,00
24 h	6,95 x 10 ⁸ \pm 2,95	1,75 x 10 ⁸ \pm 0,25	1,43 x 10 ⁷ \pm 0,17	5,55 x 10 ⁶ \pm 1,55
96 h	1,65 x 10 ⁸ \pm 0,47	2,55 x 10 ⁷ \pm 1,55	1,00 x 10 ⁶ \pm 0,00	4,00 x 10 ⁶ \pm 3,00

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Mineralsalzmedium

Tab. A 21: pH-Wert-Verlauf, Wachstum und Lebendkeimzahl-Bestimmung in KBE/ml ($\bar{x} \pm S$, n = 3) während des Limonenabbaus durch die Batch-Kultur 2 bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen für Limonen (Versuch 3)

Parameter	Batch-Kultur 2			
	40 μ l	60 μ l	80 μ l	100 μ l
pH-Wert				
0 h	6,93 \pm 0,02	6,88 \pm 0,01	6,90 \pm 0,02	6,93 \pm 0,02
24 h	6,23 \pm 0,05	5,99 \pm 0,02	5,91 \pm 0,10	5,96 \pm 0,02
48 h	6,84 \pm 0,05	6,84 \pm 0,04	6,80 \pm 0,03	6,79 \pm 0,02
72 h	6,52 \pm 0,04	6,71 \pm 0,06	6,86 \pm 0,03	6,87 \pm 0,02
96 h	6,65 \pm 0,04	6,43 \pm 0,02	6,30 \pm 0,15	6,34 \pm 0,07
OD _{600nm}				
0 h	0,077 \pm 0,001	0,088 \pm 0,005	0,079 \pm 0,000	0,069 \pm 0,002
2,5 h	0,101 \pm 0,000	0,077 \pm 0,009	0,091 \pm 0,005	0,059 \pm 0,005
3,0 h	0,087 \pm 0,005	0,095 \pm 0,006	0,097 \pm 0,008	0,092 \pm 0,002
4,5 h	0,145 \pm 0,006	0,061 \pm 0,003	0,086 \pm 0,013	0,087 \pm 0,021
6,5 h	0,266 \pm 0,008	0,081 \pm 0,004	0,075 \pm 0,005	0,121 \pm 0,013
8,5 h	0,428 \pm 0,029	0,232 \pm 0,146	0,114 \pm 0,013	0,088 \pm 0,003
10,5 h	0,659 \pm 0,018	0,243 \pm 0,034	0,121 \pm 0,005	0,092 \pm 0,003
25 h	1,101 \pm 0,026	0,537 \pm 0,007	0,159 \pm 0,014	0,096 \pm 0,002
29 h	1,055 \pm 0,003	1,054 \pm 0,012	0,134 \pm 0,006	0,110 \pm 0,002
97 h	1,058 \pm 0,006	1,188 \pm 0,004	0,177 \pm 0,001	0,176 \pm 0,016
LKZ in KBE/ml				
17 h	1,62 x 10 ⁸ \pm 0,08	5,00 x 10 ⁶ \pm 1,00	4,50 x 10 ⁵ \pm 0,50	2,00 x 10 ⁵ \pm 1,00
24 h	1,27 x 10 ⁹ \pm 7,25	2,95 x 10 ⁷ \pm 1,95	6,37 x 10 ⁶ \pm 0,87	3,35 x 10 ⁶ \pm 0,85
96 h	1,20 x 10 ⁸ \pm 0,20	3,42 x 10 ⁷ \pm 2,42	2,45 x 10 ⁶ \pm 3,00	n.a.

n.a. = nicht auswertbar

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Mineralsalzmedium

Tab. A 22: pH-Wert Verlauf, Wachstum und Lebendkeimzahl-Bestimmung in KBE/ml ($\bar{x} \pm S$, n = 3) während des Limonenabbaus durch die Batch-Kulturen 1 und 2 bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen für Limonen (Versuch 3)

Parameter	Batch-Kultur	Batch-Kultur
	1	2
	30 μ l	
pH-Wert		
17 h	6,77 \pm 0,01	6,72 \pm 0,01
24 h	6,77 \pm 0,02	6,49 \pm 0,02
48 h	6,60 \pm 0,08	6,39 \pm 0,02
80 h	6,58 \pm 0,02	6,44 \pm 0,02
OD _{600nm}		
0 h	0,029 \pm 0,002	0,005 \pm 0,001
17 h	0,045 \pm 0,002	0,007 \pm 0,002
20 h	0,034 \pm 0,003	0,098 \pm 0,005
23 h	0,025 \pm 0,000	0,092 \pm 0,002
27 h	0,064 \pm 0,001	0,193 \pm 0,009
41 h	0,078 \pm 0,005	0,965 \pm 0,009
44 h	0,105 \pm 0,002	0,918 \pm 0,027
48 h	0,725 \pm 0,004	1,214 \pm 0,003
52 h	0,724 \pm 0,001	1,401 \pm 0,004
65 h	0,710 \pm 0,010	1,340 \pm 0,004
70 h	0,791 \pm 0,008	1,440 \pm 0,003
91 h	0,783 \pm 0,006	1,393 \pm 0,006
LKZ in KBE/ml		
17 h	4,36 x 10 ⁷ \pm 0,95	1,15 x 10 ⁸ \pm 3,30
40 h	5,63 x 10 ⁸ \pm 1,19	5,54 x 10 ⁹ \pm 2,77
53 h	4,00 x 10 ⁸ \pm 0,45	3,53 x 10 ⁹ \pm 1,05
80 h	2,25 x 10 ⁸ \pm 0,73	6,52 x 10 ⁸ \pm 1,12

Bebrütung bei 28 °C und pH 7 im Mineralsalzmedium

Tab. A 23: Ergebnisse der oxidativen Umsetzungen der Bakterienisolate (Bebrütung: 24 h bei 28 °C) 1.) L1,2; 2.) L2,4; 3.) L2,6; 4.) L3,6; 5.) L3,8; 6.) L4,10

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1.)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+/-	+
2.)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+/-	-
3.)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+/-	-
4.)	-	+	-	-	+	+/-	-	+/-	+	+/-	-	-
5.)	-	-	+/-	-	+	+	-	+/-	-	-	-	-
6.)	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
1.)	+/-	+	+/-	+/-	-	+	-	-	-	-	-	+
2.)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+/-
3.)	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.)	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5.)	+	+	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
6.)	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1.)	+/-	+	+	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	+
2.)	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
3.)	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
4.)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5.)	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	+	-	+/-	+
6.)	+	+	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	+
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
1.)	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
2.)	+	+	+	+/-	-	-	+	-	-	+/-	+	+/-
3.)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
4.)	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+/-
5.)	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
6.)	+	+	+	+	-	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
1.)	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
2.)	-	-	+/-	+	+/-	+	-	-	+	-	+/-	+
3.)	+/-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
4.)	+/-	+/-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
5.)	+/-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
6.)	-	+/-	+	+	+/-	+	-	-	+	-	+/-	+
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
1.)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2.)	+	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+	+	-	+/-
3.)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4.)	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-
5.)	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
6.)	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+	-	-
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
1.)	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	+	+	+	+
2.)	+/-	+	+/-	+/-	-	+	-	-	+	+	+	+
3.)	-	-	+	+	-	+	-	+	+/-	+	+/-	+
4.)	+/-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
5.)	+	+	+	+	-	+	+/-	-	+	+	+	+
6.)	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+/-	+	+
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
1.)	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2.)	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
3.)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4.)	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
5.)	+	+	-	+/-	+	+	+	-	-	-	-	+
6.)	+	+	-	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-

+ positive Reaktion - negative Reaktion +/- Grenzfall (keine eindeutige Reaktion)

Tab. A 24: Verwertungsschema der Kohlenstoffquellen für *P. nitroreducens* aus der MicroLog-Datenbank

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
-	-	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
+	+/-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+/-

Bebrütung 24 Stunden, 28 °C

Tab. A 25: Verwertungsschema der Kohlenstoffquellen für *P. pseudoalcaligenes* aus der MicroLog-Datenbank

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+	+	+
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
-	+/-	+/-	+	+/-	+	-	+/-	+/-	-	+/-	+
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
+	+/-	-	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	-	+/-
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+	-	+/-
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12
+/-	+/-	-	-	+/-	+	+/-	-	+/-	-	-	-

Bebrütung 24 Stunden, 28 °C

+ positive Reaktion - negative Reaktion +/- Grenzfall (keine eindeutige Reaktion)

Tab. A 26: Ergebnisse mit dem BBL CRYSTAL Identifizierungssystem für die Isolate *L1,2*, *L2,4*, *L2,6*, *L3,6*, *L3,8*, *L4,10* (Bebrütung 20 Stunden bei 35 °C)

Substrat	L1,2	L2,4	L2,6	L3,6	L3,8	L4,10
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
Galaktose	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
p-n-p-Phosphat	+	+	-	+	+	+
p-n-p- α - β -Glukosid	-	-	-	-	-	-
p-n-p-Galaktosid	-	-	-	-	-	-
Prolin-Nitroanilid	+	+	+	+	+	+
p-n-p-Biphosphat	-	-	-	-	-	-
p-n-p-Xylosid	-	-	-	-	-	-
p-n-p- α -Arabinosid	-	-	-	-	-	-
p-n-p-Phosphorylcholin	-	-	-	-	-	-
p-n-p- β -Glukoronid	-	-	-	-	-	-
p-n-p-N-Azetyl-Glukosamid	-	-	-	-	-	-
γ -L-Glutamyl-p-Nitroanilid	+	+	+/-	+	+	+
Äskulin	-	-	-	-	-	-
p-Nitro-DL-Phenylalanin	-	-	-	-	-	-
Harnstoff	+	+/-	+/-	+	+	+
Glyzin	+	+/-	+/-	+	+	+
Citrat	+	+	-	+	+	+
Malonat	+	+/-	-	-	+/-	-
Tetrazolium	+	+/-	-	+	+	-
Arginin	+	+	+/-	+	+	+
Lysin	+	+/-	-	+	+	+

Ergebnis: + positive Reaktion - negative Reaktion +/- keine eindeutige Reaktion

Tab. A 27: Roh- und Reingaskonzentrationen $c_{\text{roh/rein}}$ in mg/m^3 ($\bar{x} \pm S$, $n = 3$) für Limonen und errechnete Wirkungsgrade in % während der 34-tägigen Adaptationsphase der Modellbiofilter im Biofilterversuch 2

Versuchstag	BF1 (mit IK)			BF2 (ohne IK)	
	Limonen	Limonen	Wirkungsgrad	Limonen	Wirkungsgrad
	Rohgaskonz. mg/m^3	Reingaskonz. mg/m^3		Reingaskonz. mg/m^3	
4	$67,7 \pm 0,5$	$13,1 \pm 1,3$	80,6	$1,2 \pm 0,1$	98,2
7	$105,2 \pm 11,0$	$3,9 \pm 0,3$	96,3	$5,9 \pm 0,6$	94,4
11	$92,1 \pm 8,2$	$51,2 \pm 0,4$	44,4	$138,6 \pm 8,0$	0
14	$105,7 \pm 7,5$	$29,7 \pm 1,3$	71,9	$63,4 \pm 5,0$	40,0
18	$137,3 \pm 9,2$	$71,6 \pm 4,5$	47,9	$92,2 \pm 6,8$	32,8
21	$142,3 \pm 9,2$	$103,3 \pm 5,7$	27,4	$108,8 \pm 6,8$	23,5
25	$59,1 \pm 4,2$	$75,1 \pm 4,8$	0	$46,3 \pm 2,6$	21,7
28	$154,2 \pm 11,0$	$91,6 \pm 6,3$	40,6	$89,0 \pm 6,6$	42,3
35	$102,4 \pm 1,9$	$22,6 \pm 1,0$	77,9	$109,0 \pm 7,1$	0

Limonenkonzentration: $60,3 \text{ mg}/\text{m}^3$

Luftstrom: $6 \text{ m}^3/\text{h}$

BF1 mit Inokulationskultur, BF2 ohne Inokulationskultur

Tab. A 28: Roh- und Reingaskonzentrationen $c_{\text{roh/rein}}$ in mg/m^3 ($\bar{x} \pm S$, $n = 3$) für Limonen und errechnete Wirkungsgrade in % nach der 34-tägigen Adaptationsphase der Modellbiofilter im Biofilterversuch 2

Versuchstag	BF1 (mit IK)			BF2 (ohne IK)	
	Limonen	Limonen	Wirkungsgrad	Limonen	Wirkungsgrad
	Rohgaskonz. mg/m^3	Reingaskonz. mg/m^3		Reingaskonz. mg/m^3	
35	102,4 ± 10,9	22,6 ± 1,0	77,9	109,9 ± 7,1	0,0
40	91,1 ± 7,4	16,0 ± 0,7	82,4	65,6 ± 3,3	28,0
42	63,4 ± 3,2	15,3 ± 0,8	75,9	27,3 ± 1,7	56,9
49	55,3 ± 3,3	18,6 ± 0,6	66,4	/	/
56	142,2 ± 8,7	55,5 ± 3,1	61,0	85,9 ± 5,7	39,6
60	19,9 ± 2,2	0,9 ± 0,1	95,5	19,0 ± 1,7	4,5
67	15,6 ± 1,5	0 ± 0	100,0	4,0 ± 0,3	74,3
74	14,4 ± 1,2	3,8 ± 0,1	73,6	/	/
81	36,2 ± 4,7	0,3 ± 0,0	99,2	27,9 ± 2,3	22,9
84	35,7 ± 4,6	1,4 ± 0,1	96,1	36,1 ± 2,8	0,0
88	34,6 ± 4,7	6,0 ± 0,5	82,6	29,1 ± 3,1	15,9
91	35,5 ± 6,0	7,1 ± 4,1	80,0	15,4 ± 1,5	56,6
95	29,1 ± 3,9	8,7 ± 0,7	70,1	35,1 ± 3,1	0,0
98	31,7 ± 4,7	17,4 ± 1,4	45,1	27,4 ± 2,4	12,9
102	29,5 ± 4,2	17,8 ± 1,2	39,7	25,0 ± 2,7	15,2
109	52,8 ± 5,5	10,7 ± 1,1	80,0	21,4 ± 1,4	59,5
112	26,9 ± 3,6	6,7 ± 0,0	75,1	22,9 ± 1,6	15,0
116	48,4 ± 4,6	16,9 ± 0,9	65,1	47,7 ± 1,5	14,5
118	19,8 ± 1,9	6,9 ± 0,6	66,7	12,6 ± 0,7	36,4
122	49,3 ± 5,6	6,4 ± 0,5	87,0	15,5 ± 0,8	68,5
126	21,3 ± 2,3	6,5 ± 0,2	69,5	21,7 ± 1,7	0,0
130	17,8 ± 2,1	5,7 ± 0,5	68,0	9,4 ± 0,7	47,2
133	24,8 ± 2,7	4,5 ± 0,3	81,8	8,9 ± 0,6	64,1
136	22,0 ± 2,6	3,0 ± 0,3	86,4	11,6 ± 1,0	47,3
140	39,0 ± 5,1	4,9 ± 0,6	87,4	16,4 ± 1,3	57,9
144	43,1 ± 5,4	11,4 ± 0,9	73,5	33,4 ± 3,5	22,5
146	52,8 ± 5,4	4,8 ± 0,4	90,9	52,0 ± 4,4	1,5
150	60,3 ± 6,5	13,6 ± 1,2	77,4	25,7 ± 1,9	57,4

Limonenkonzentration: $60,3 \text{ mg}/\text{m}^3$

Luftstrom: $6 \text{ m}^3/\text{h}$

BF1 mit Inokulationskultur, BF2 ohne Inokulationskultur

Tab. A 29: Geruchsstoffkonzentrationen in Roh- und Reingas c_G roh/rein in GE/m^3 und Geruchspegel in dB_G ($x \pm S$, $n = 4$) für Limonen und errechnete Geruchsminderungsgrade in % während einer Biofiltereinlaufzeit von 34 Tagen der Modellbiofilter im Biofilterversuch 2

Versuchstag	BF1 (mit IK)					BF2 (ohne IK)		
	Limonen		Limonen		Geruchs- minderungsgrad (%)	Limonen		Geruchs- minderungsgrad (%)
	c_G im Rohgas GE/m^3	dB_G	c_G im Reingas GE/m^3	dB_G		c_G im Reingas GE/m^3	dB_G	
4	130	$21,0 \pm 1,9$	19	$12,8 \pm 2,2$	85,4	13	/	90,0
7	110	$20,5 \pm 2,6$	32	$15,0 \pm 2,8$	71,0	57	$17,5 \pm 4,9$	48,2
11	190	$22,8 \pm 0,9$	110	$20,3 \pm 2,9$	42,1	180	$22,5 \pm 1,8$	5,3
14	270	$24,3 \pm 0,9$	100	$20,0 \pm 3,1$	63,0	150	$21,8 \pm 2,3$	44,4
18	270	$24,3 \pm 0,9$	110	$20,3 \pm 1,6$	59,2	95	$19,8 \pm 0,9$	64,8
21	320	$25,0 \pm 1,0$	210	$23,3 \pm 2,0$	34,4	160	$22,0 \pm 1,4$	50,0
25	110	$20,3 \pm 1,6$	60	$17,8 \pm 1,6$	45,4	38	$15,8 \pm 1,8$	65,4
28	170	$22,3 \pm 1,8$	42	$16,3 \pm 2,2$	75,3	200	$23,0 \pm 1,7$	0
32	85	$19,3 \pm 2,5$	38	$15,8 \pm 2,8$	55,3	20	$13,0 \pm 1,6$	76,5
35	75	$18,8 \pm 1,3$	28	$14,5 \pm 1,9$	62,7	57	$17,5 \pm 0,9$	24,0

Limonenkonzentration: $60,3 \text{ mg}/\text{m}^3$ Luft

Luftstrom: $6 \text{ m}^3/\text{h}$

BF1 mit Inokulationskultur, BF2 ohne Inokulationskultur

Tab. A 30: Geruchsstoffkonzentrationen in Roh- und Reingas c_G roh/rein in GE/m^3 und Geruchspegel in dB_G ($\bar{x} \pm S$, $n = 4$) für Limonen und errechnete Geruchsminderungsgrade in % nach einer Biofiltereinlaufzeit von 34 Tagen der Modellbiofilter im Biofilterversuch 2

Versuchstag	BF1 (mit IK)					BF2 (ohne IK)		
	Limonen		Limonen		Geruchs- minderungsgrad	Limonen		Geruchs- minderungsgrad
	c_G im Rohgas GE/m^3	dB_G	c_G im Reingas GE/m^3	dB_G		c_G im Reingas GE/m^3	dB_G	
35	75	18,8 ± 1,3	28	14,5 ± 1,9	62,7	57	17,5 ± 0,9	24,0
40	120	20,8 ± 1,8	19	12,8 ± 1,3	84,2	50	17,0 ± 2,2	58,3
42	95	19,8 ± 2,3	25	14,0 ± 1,7	73,7	30	14,8 ± 2,0	68,4
49	110	20,5 ± 1,2	28	14,5 ± 1,9	74,5	75	18,8 ± 1,3	31,8
56	100	20,0 ± 0,8	25	14,0 ± 2,1	75,0	38	15,8 ± 2,3	62,0
60	110	20,5 ± 1,5	14	11,5 ± 1,7	87,3	36	15,5 ± 2,3	67,3
67	110	20,5 ± 1,5	27	14,3 ± 2,2	75,5	45	16,5 ± 2,0	59,1
74	130	21,0 ± 1,2	22	13,5 ± 1,3	83,1	45	16,5 ± 2,0	65,4
81	170	22,3 ± 1,8	28	14,5 ± 2,6	83,5	67	18,3 ± 1,9	60,6
84	130	21,3 ± 1,5	12	10,7 ± 1,2	90,8	32	15,0 ± 2,1	75,4
88	100	20,0 ± 1,4	38	15,8 ± 2,5	62,0	48	16,8 ± 2,1	52,0
91	75	18,8 ± 1,6	18	12,5 ± 1,3	76,0	67	18,3 ± 1,5	10,7
95	120	20,8 ± 1,0	21	13,3 ± 1,0	82,5	130	21,3 ± 1,7	0
98	190	22,8 ± 1,5	36	15,5 ± 1,8	81,1	57	17,5 ± 0,9	70,0
102	150	21,8 ± 1,6	36	15,5 ± 2,3	76,0	57	17,5 ± 1,7	62,0
109	180	22,5 ± 1,6	49	19,0 ± 3,1	62,4	130	21,3 ± 1,7	27,8
112	240	23,8 ± 1,0	85	19,3 ± 3,5	64,6	110	20,5 ± 1,9	54,2
116	150	21,8 ± 1,0	15	11,8 ± 1,6	90,0	24	13,8 ± 1,7	84,0
118	100	20,0 ± 1,4	15	11,8 ± 1,0	85,0	38	15,8 ± 3,7	62,0
122	230	23,5 ± 3,6	16	12,0 ± 1,2	93,0	28	14,5 ± 2,3	87,8
126	320	25,1 ± 1,4	17	12,3 ± 1,9	94,7	190	22,8 ± 2,7	40,6
130	160	22,0 ± 1,0	57	17,5 ± 1,7	64,3	80	19,0 ± 1,6	50,0
133	640	28,1 ± 1,6	36	15,5 ± 2,6	94,4	200	23,0 ± 3,1	68,7
136	150	21,8 ± 1,6	20	13,0 ± 2,5	86,7	50	17,0 ± 1,9	66,7
140	210	23,3 ± 1,8	16	12,0 ± 1,2	92,4	40	16,0 ± 2,6	80,9
144	230	23,5 ± 1,5	24	13,8 ± 3,0	89,6	45	16,5 ± 1,8	80,4
146	140	21,5 ± 1,8	28	14,5 ± 2,4	80,0	80	19,0 ± 3,3	42,8
150	130	21,0 ± 2,1	0	0 ± 0	100,0	34	15,3 ± 3,5	73,8

Limonenkonzentration: 60,3 mg/m³ Luft

Luftstrom: 6 m³/h

BF1 mit Inokulationskultur, BF2 ohne Inokulationskultur

Abb. A 31.1: Einfluß der **Temperatur** auf das Wachstum der Batch-Kulturen (aerobe Inkubation im Mineralsalzmedium bei pH 7) bei folgenden Inkubationstemperaturen: ■ 6 °C; □ 15 °C; ▲ 25 °C; ● 30 °C; ○ 37 °C; x... 42 °C

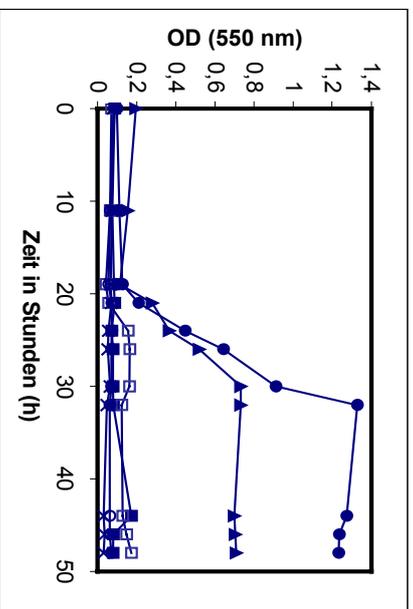


Abb. A 31.1: Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der aus Fichtenzapfen,-nadeln und -rinde gewonnenen Batch-Kultur

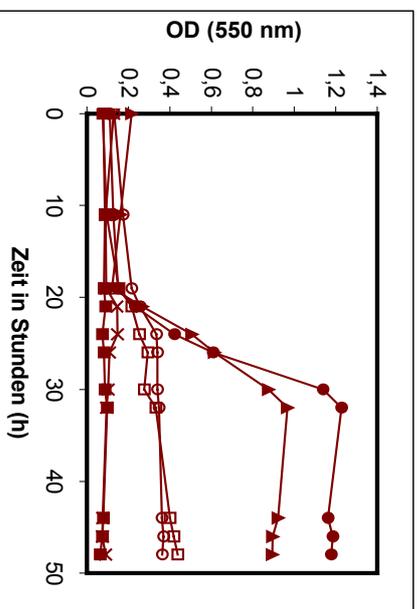


Abb. A 31.3: Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der aus Schalen von Zitrusfrüchten gewonnenen Batch-Kultur

Abb. A 31.2: Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der aus Nadelwaldböden gewonnenen Batch-Kultur

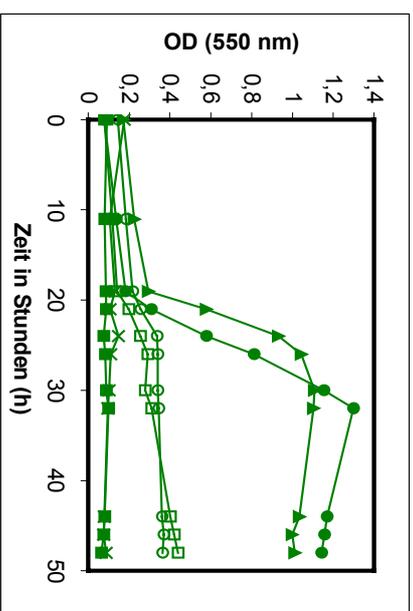


Abb. A 31.2: Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der aus Nadelwaldböden gewonnenen Batch-Kultur

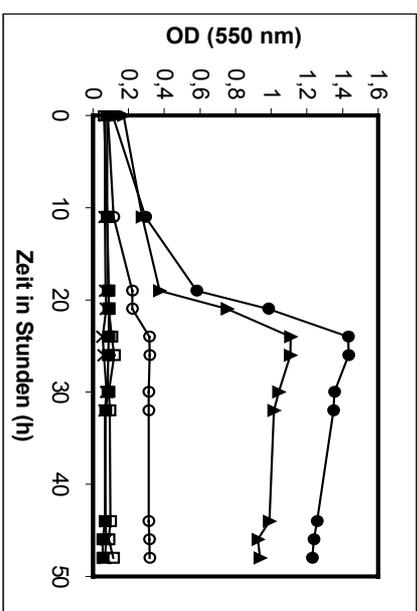


Abb. A 31.4: Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der aus Bioabfall gewonnenen Batch-Kultur

Abb. A 32: Einfluß des pH- Wertes auf das Wachstum der Batch-Kulturen (aerobe Inkubation im Mineralsalzmedium bei 30 °C) bei folgenden pH-Werten: ■4; □.5; ▲..6; x...6,5; ●...7; ○.7,5; +... 8

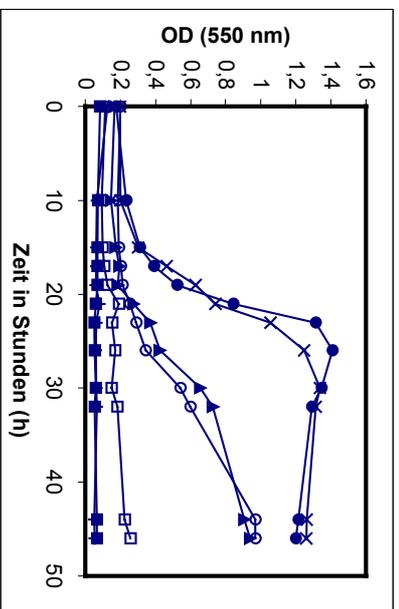


Abb. A 32.1 : Einfluß des pH- Wertes auf das Wachstum der aus Fichtenzapfen-,nadeln und -rinde gewonnenen Batch-Kultur

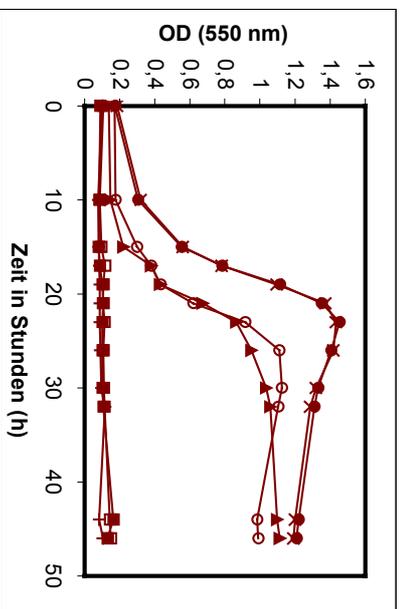


Abb. A 32.3: Einfluß des pH- Wertes auf das Wachstum der aus Schalen von Zitrusfrüchten gewonnenen Batch-Kultur

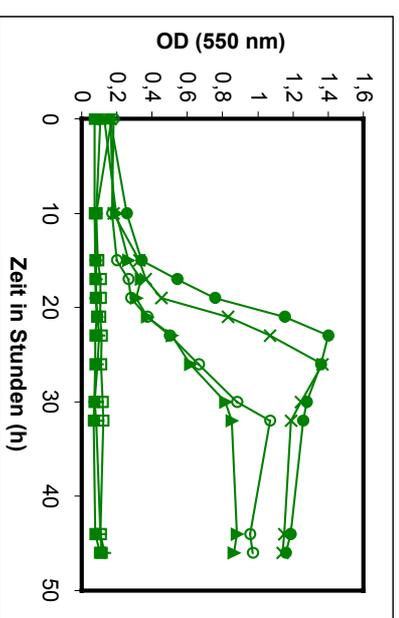


Abb. A 32.2: Einfluß des pH- Wertes auf das Wachstum der aus Nadelwaldboden gewonnenen Batch-Kultur

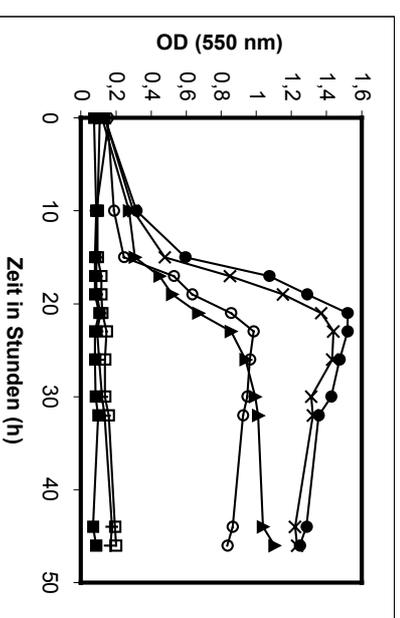


Abb. A 32.4: Einfluß des pH- Wertes auf das Wachstum der aus Biofall gewonnenen Batch-Kultur

Abb. A 33: Einfluß der **NaCl-Konzentration** auf das Wachstum der Batch-Kulturen (aerobe Inkubation im Mineralsalzmedium bei 30 °C und pH 7) folgenden NaCl-Konzentrationen: ● 0 %; ○ 0,1 %; x...2 %

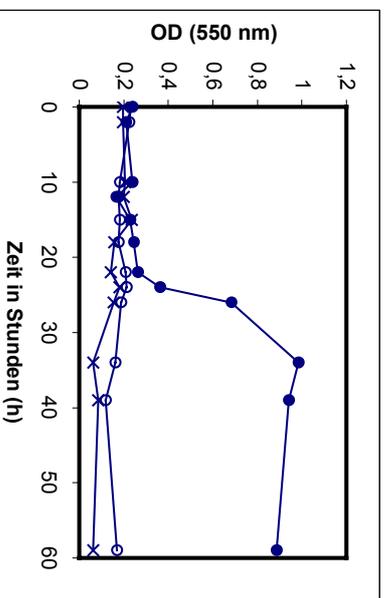


Abb. A 33.1: Einfluß der NaCl-Konzentration auf das Wachstum der aus Fichtenzapfen,-nadeln und -rinde gewonnenen Batch-Kultur

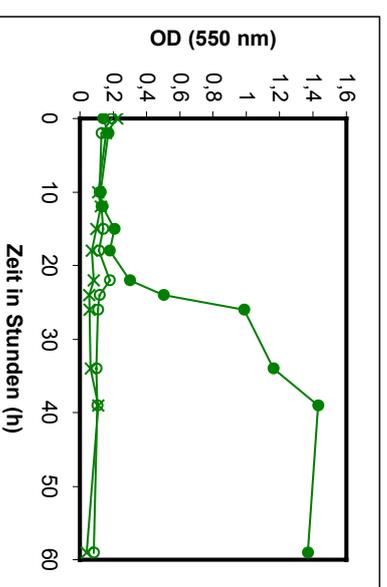


Abb. A 33.2: Einfluß der NaCl-Konzentration auf das Wachstum der aus Nadelwaldboden gewonnenen Batch-Kultur

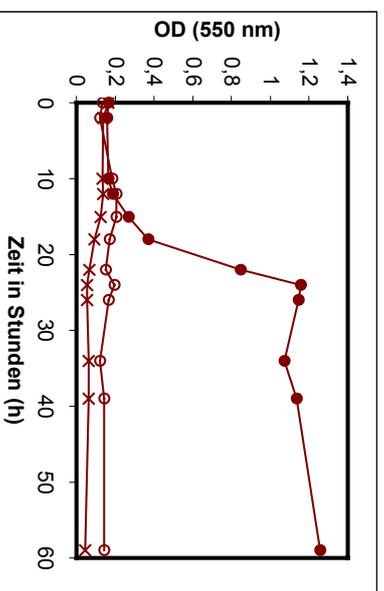


Abb. A 33.3: Einfluß der NaCl-Konzentration auf das Wachstum der aus Schalen von Zitrusfrüchten gewonnenen Batch-Kultur

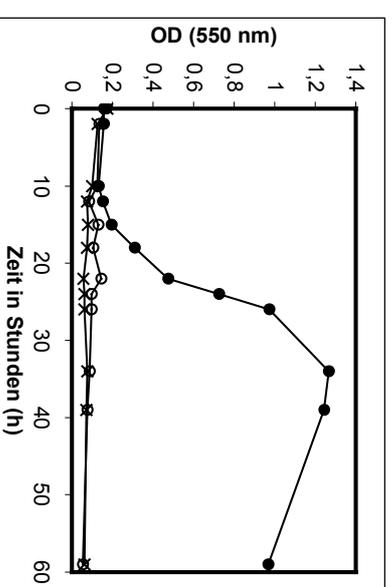


Abb. A 33.4: Einfluß der NaCl-Konzentration auf das Wachstum der aus Bioabfall gewonnenen Batch-Kultur

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. med. vet. habil. A. Bergmann** für das interessante Dissertationsthema und die freundliche Unterstützung bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Als Betreuer meiner Arbeit stand mir Prof. Dr. A. Bergmann zu jeder Zeit als Ansprechpartner zur Verfügung.

Herrn **Dr. R. Kliche** und Frau **R. Kisslinger** danke ich für die intensive Zusammenarbeit und sehr hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der gaschromatographischen Analytik.

Herr **Dr. F. Eismann** gab mir wertvolle Anregungen und Hinweise zur Durchführung der Untersuchungen. Ich danke ihm besonders für das mir weitervermittelte Wissen und die stets hilfreichen Ratschläge.

Herrn **Dr. H. Scholz** danke ich für die Einführung in die molekularbiologischen Versuchsmethoden und die laufende Betreuung während dieser Versuche. Bei der Auswertung und Diskussion dieser Ergebnisse waren mir seine Hinweise sehr hilfreich.

Bei Herrn **Dipl.-Ing. R. Willig** bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Organisation der Biofilterversuche und beim Aufbau der Modellbiofilter-Versuchsanlagen.

Frau **MTA E. Brumme** und Frau **MTA D. Rüster** danke ich besonders für die stetige Bereitschaft und praktische Hilfe bei Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau **MTA I. Klein** aus der Sektion Umweltmikrobiologie des UFZ Leipzig-Halle, die mich bei der Arbeit mit dem MikroLog System sowie bei der Auswertung der Ergebnisse sehr unterstützte und mir hilfreiche Ratschläge gab.

Allen meinen nicht namentlich genannten **Kollegen** am Institut danke ich für die freundliche Unterstützung und kooperative Zusammenarbeit.

Die vorliegende Dissertation wurde durch ein Stipendium der **H. Wilhelm Schaumann Stiftung** gefördert. Für die finanzielle Unterstützung danke ich sehr herzlich.

Ganz besonders danke ich meinem Sohn Georg, der mich mit seinem Lachen und seinen Fragen in der ganzen Zeit immer wieder zu dieser Arbeit ermutigte.

Bei meiner Mutter bedanke ich mich sehr herzlich für ihre stetige Anteilnahme und Unterstützung. Sie ermöglichte mir überhaupt erst das Studium der Veterinärmedizin und die anschließende Dissertation.