Abschlussbericht

an die

Willy-Hager-Stiftung

zum Projekt

„Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen - Einflussfaktoren auf Teilprozesse und Entwicklung von Mess-Steuer- und Regelungsstrategien zur Schließung der Verfahrenskette“

Laufzeit: 01.01.2018 – 31.03.2022

Prof. Dr.-Ing. Heidrun Steinmetz

Thomas Uhrig M.Sc

Julia Zimmer M.Sc.

Technische Universität Kaiserslautern

Fachgebiet Ressourceneffiziente Abwasserbehandlung

Mai 2022

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 8

1.1 Ziele des Projekts und Vorgehensweise 9

2 Theoretischer Hintergrund 11

2.1 Verfahrenskette 11

2.2 Versäuerung 14

2.3 Selektion 15

2.4 Biopolymeranreicherung 17

2.5 Zusammenfassung zum gegenwärtigen Kenntnisstand und offene Forschungsfragen 18

3 Material und Methoden 19

3.1 Versäuerung 19

3.1.1 Ziele 19

3.1.2 Versuchsbeschreibung 19

3.2 Selektion 23

3.2.1 Ziele 23

3.2.2 Versuchsbeschreibung 23

3.3 PHA-Produktion 25

3.3.1 Ziele 25

3.3.2 Versuchsbeschreibung 25

3.4 Kopplung der Verfahrensstufen 26

3.4.1 Ziele 26

3.4.2 Versuchsbeschreibung 26

3.5 Analytik 27

3.5.1 Probenvorbereitung zur Analyse von gelösten Parametern 27

3.5.2 Chemischer Sauerstoffbedarf 27

3.5.3 Organischer Stickstoff 27

3.5.4 Ammonium 27

3.5.5 Phosphat 27

3.5.6 Trockenrückstand und organischer Trockenrückstand 28

3.5.7 Abfiltrierbare Stoffe und Glühverlust der abfiltrierbaren Stoffe 28

3.5.8 Organische Säuren 28

3.5.9 PHA 28

3.5.10 DNA 30

3.6 Berechnungen 31

3.6.1 VFA-Ausbeute 31

3.6.2 PHA-Gehalt 31
3.6.3 DNA 31
3.6.4 Zusammensetzung PHA und VFA 32
3.6.5 Statistische Auswertungen 32
4 Ergebnisse und Diskussion 33
4.1 Versäuerung 33
4.1.1 Substratscreening 33
4.1.2 Zwischenfazit 40
4.2 Selektion 41
4.2.1 Einfluss des Inokulums und der Selektionsdauer 41
4.2.2 Zwischenfazit 62
4.3 PHA-Produktion 62
4.3.1 Einfluss der VFA-Zusammensetzung und Konzentration 62
4.3.2 Zwischenfazit 68
4.4 Kopplung der Verfahrensstufen 69
4.4.1 Variation der Raumbelastung 69
4.4.2 Betrieb mit realem Abwasser 70
4.4.3 Biologische Analysen 75
4.4.4 Zwischenfazit 83
5 Zusammenfassung 84
6 Literaturverzeichnis 86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion (Pittmann 2015b). 11
Abbildung 2: Glasreaktor zum Ausfaulen des Inokulums vor dem Substratscreening 20
Abbildung 3: Versuchsaufbau des Substratscreenings 21
Abbildung 4: Tagesablauf des Selektionsbetriebs 24
Abbildung 5: Versuchsaufbau zur Selektion und PHA-Akkumulation 25
Abbildung 6: Verlauf der VFA-Konzentration im Substratscreening 34
Abbildung 7: VFA-Zusammensetzung am Tag der höchsten Ausbeute 36
Abbildung 8: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Substratscreening-Versuche 37
Abbildung 9:Taxonomische Zusammensetzung der Bakterienmischkulturen innerhalb der Substratscreening-Versuche 38
Abbildung 10: Diversität und Reichtum der Bakterien innerhalb der Voruntersuchung. 41
Abbildung 11:Relative Abundanzen der Bakterienordnungen innerhalb der Voruntersuchung 42
Abbildung 12: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Ordnungssebene 42
Abbildung 13: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb der Voruntersuchung 43
Abbildung 14: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene. 43
Abbildung 15: Verlauf der Feststoffkonzentration über die drei Selektionsversuche 45
Abbildung 16: Verlauf des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des ersten Selektionsversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus allen drei Selektionsreaktoren. 46
Abbildung 17: PHA-Gehalt in Abhängigkeit des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des ersten Selektionsversuches. 47
Abbildung 18: Verlauf des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des zweiten Selektionsversuches . 47
Abbildung 19: PHA-Gehalt in Abhängigkeit des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des zweiten Selektionsversuches. 48
Abbildung 20:Verlauf des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des dritten Selektionsversuches 49
Abbildung 21: PHA-Gehalt in Abhängigkeit des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des dritten Selektionsversuches. 49
Abbildung 22: Verlauf des PHA-Gehaltes über die Versuchsdauer während des ersten Selektionsversuches. 50
Abbildung 23: Verlauf des PHA-Gehaltes über die Versuchsdauer während des zweiten Selektionsversuches. 51
Abbildung 24: Verlauf des PHA-Gehaltes über die Versuchsdauer während des dritten Selektionsversuches. 52
Abbildung 25: Vergleich der mittleren PHA-Gehalte aller drei Selektionsversuche über die Versuchsdauer. 53
Abbildung 26: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des ersten Selektionsversuches 54
Abbildung 27: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während des ersten Selektionsversuches. 55
Abbildung 28: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des zweiten Selektionsversuches 56
Abbildung 29: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während des zweiten Selektionsversuches. 57
Abbildung 30: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des dritten Selektionsversuches. 58
Abbildung 31: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während des dritten Selektionsversuches. 59

Abbildung 32: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Inokula. 60
Abbildung 33: Zusammenhang des PHA-Gehaltes mit der relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten während der Selektionsversuche 61
Abbildung 34: PHA-Gehalte der Akkumulationen mit unterschiedlichen Substraten innerhalb des zweiten Selektionsversuches..... 63
Abbildung 35: PHA-Gehalte der Akkumulationen mit unterschiedlichen Substraten innerhalb des dritten Selektionsversuches. 64
Abbildung 36: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während des ersten Selektionsversuches. 65
Abbildung 37: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während des zweiten Selektionsversuches. 65
Abbildung 38: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während des dritten Selektionsversuches. 66
Abbildung 39: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während der Zusatzakkumulationen des zweiten Selektionsversuches. 67
Abbildung 40: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während der Zusatzakkumulationen des dritten Selektionsversuches. 67
Abbildung 41: Verlauf der PHA-Gehalte über die Versuchsdauer bei verschiedenen VFA-Raumbelastungen a) 2 g/(L d), b) 1 (L d), c) 0,5 (L d), d) PHA-Gehalte aus den Versuchen mit verschiedenen Inokula (s. Kapitel 4.2.1.2) 69
Abbildung 42: Feststoffgehalte beim Betrieb mit realem versäuertem Brauereiabwasser 71
Abbildung 43: Raumbelastung der Selektionsdurchläufe mit und ohne Nährstoffe 71
Abbildung 44: CSB-Fraktionierung des Substrats a) Durchlauf mit Nährstoffen, b) ohne Nährstoffe.. 72
Abbildung 45: VFA-Zusammensetzung a) mit Nährstoffen b) ohne Nährstoffe 72
Abbildung 46: PHA-Gehalte der wöchentlichen Akkumulationen über die Versuchsdauer mit realem versäuertem Brauereiabwasser a) mit Nährstoffzugabe während der Selektion b) ohne Nährstoffzugabe während der Selektion 73
Abbildung 47: Akkumulation beim Selektionsdurchlauf mit Nährstoffen a) VFA-Zusammensetzung des Substrats für die Akkumulationen; b) Vergleich der Polymerzusammensetzung zu Beginn und Ende der Akkumulationen mit der theoretisch berechneten Zusammensetzung 74
Abbildung 48: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit einer Raumbelastung von 2 g/(L d) 75
Abbildung 49: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit einer Raumbelastung von 1 g/(L d) 76
Abbildung 50: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit einer Raumbelastung von 0,5 g/(L d) 77
Abbildung 51: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während der Versuche mit unterschiedlichen VFA-Raumbelastungen a) 2 g/(L d), b) 1g/(L d), c) 0,5 g/(L d) 78
Abbildung 52: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit realem Substrat und Nährstoffzugabe 79
Abbildung 53: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit realem Substrat mit Verzicht auf Nährstoffzugabe 80
Abbildung 54: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während der Versuche a) mit Nährstoffzugabe, b) ohne Nährstoffzugabe 81
Abbildung 55: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Substrateigenschaften..... 82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versäuerungsgrad und VFA-Zusammensetzung verschiedener Abwässer mit den jeweiligen verwendeten Prozessparametern. 15
Tabelle 2:Zusammenfassung der Versuchsparameter des Substratscreenings 22
Tabelle 3: PHA-Messungen verschiedener Probenaufbereitungsmethoden. GT = Gefriertrocknung.. 29
Tabelle 4: Zusammensetzung der im Substratscreening untersuchten Rohabwässer 33
Tabelle 5: VFA-Ausbeuten im Substratscreening 35

1 Einleitung

Konventionelle Kunststoffe werden heute noch überwiegend aus Rohölen hergestellt, deren Verfügbarkeit begrenzt und deren Förderung nicht nachhaltig ist. In Europa und Deutschland führt das Fehlen nennenswerter eigener Ressourcen zu erheblichen politischen Abhängigkeiten. Es bedarf daher dringend der Entwicklung von alternativen Ausgangsstoffen zur Produktion von Kunststoffen.

Neben der Endlichkeit, der Klimaschädlichkeit und der umweltverschmutzenden Förderung des Rohstoffs Erdöl stellt auch die hohe Beständigkeit der Kunststoffe gegenüber natürlichen Zersetzungsprozessen (chemisch/physikalischer oder biologischer Abbau) ein erhebliches Umweltproblem dar und sorgt für eine zunehmende Anreicherung von weggeworfenem Kunststoffmaterialien in der Umwelt.

Um die genannten Probleme zu mindern, müssen die Abhängigkeit von der Ressource Erdöl drastisch reduziert und das Recycling von Rohstoffen zum weltweiten Standard werden. Dazu ist im Sinne einer nachhaltigen Bewirtschaftung die Entwicklung neuer umwelt- und ressourcenschonenden Herstellungsverfahren erforderlich, die Erdöl durch nachhaltig gewonnene Rohstoffe substituieren.

In geringen Mengen werden derzeit bereits Biokunststoffe produziert (ca. 1 % der weltweiten Kunststoffproduktion von 368 Millionen Tonnen pro Jahr (European Bioplastics e.V. 2020)), wobei sowohl das Rohmaterial als auch die Herstellungsart variieren und den Synonymen „Bioplastik, Biopolymer oder Biokunststoff“ keine eindeutige Definition zuzuordnen ist. Erstrebenswert ist die Produktion von Biokunststoffen, die biologisch abbaubar sind und deren Rohmaterial aus nachwachsenden Rohstoffen bzw. Reststoffen stammen.

Bislang werden Biokunststoffe überwiegend auf pflanzlicher Basis (z.B. Stärke-basiert) und/oder mittels bakterieller Reinkulturen (z.B. bei der Polymilchsäureproduktion) hergestellt (European Bioplastics e.V. 2020). Für den Produktionsprozess mit Reinkulturen ist steriles Arbeiten eine zwingende Voraussetzung, was die Abläufe teuer und störanfällig macht. Pflanzliche Ausgangsstoffe stehen zudem in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion. In der Annahme, dass vorhandene Agrarflächen zunehmend für die Ernährung der Weltbevölkerung benötigt werden, ist aus nachhaltigen Gesichtspunkten eine Produktion von Kunststoffen aus Reststoffen demgegenüber vorteilhaft.

Neben den bereits genannten Biokunststoffen stellen Polyhydroxyalkanoate (PHA) eine vielversprechende Alternative zu konventionellen Kunststoffen dar. PHAs gehören zu der Gruppe der Polyester, können von zahlreichen Mikroorganismen hergestellt werden (Lee 1996; Dias et al. 2006) und wurden in vielen Bakterien im Belebschlamm kommunaler und industrieller Kläranlagen nachgewiesen (Chen 2010). Sie werden von den Bakterien dabei als Energie- und Kohlenstoffspeicher genutzt (Chanprateep 2010). Je nach Länge der Seitenkettengruppe werden die PHAs in kurz- oder mittelkettige Polymere unterteilt (Endres und Siebert-Raths 2009). Die meisten Materialeigenschaften der kurzkettigen PHAs ähneln denen von Polypropylen (PP), so dass das größte Substitutionspotenzial der PHAs im Ersatz von PP gesehen wird (Chen und Wu 2005; Marciniak und Możejko-Ciesielska 2021).

Voraussetzung für die PHA Produktion ist die Verfügbarkeit von organischen Kohlenstoffverbindungen. Eine kommerzielle PHA-Produktion findet bisher in nur geringem Maßstab und unter Einsatz von Bakterienreinkulturen und teurer Substrate statt (Kourmentza et al. 2017; Khatami et al. 2021). Kommunale und einige industrielle Abwässer und Klärschlämme weisen allerdings hohe Frachten an organischen Verbindungen auf, die derzeit unter Energieeinsatz mineralisiert oder im besten Falle teilweise energetisch genutzt werden. Eine stoffliche Verwertung findet auf Kläranlagen bislang nicht statt. Daher wäre eine PHA-Herstellung mittels bakterieller Mischkulturen und unter Verwendung von

Abwasserströmen als Substrat dem gegenüber vorteilhaft. Um so Stoffkreisläufe zu schließen, gilt es, neue Verfahren zu entwickeln, die eine gezielte stoffliche Verwertung des im Abwasser bzw. Klärschlamm enthaltenen Kohlenstoffs ermöglichen.

Verschiedene Forschungsgruppen haben sich in der Vergangenheit bereits mit der Entwicklung eines Verfahrens zur PHA-Herstellung mithilfe von Bakterienmischkulturen und Abwasserströmen beschäftigt (Dionisi et al. 2005; Pittmann und Steinmetz 2013a; Bengtsson et al. 2010; Albuquerque et al. 2011 u.a.). Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Produktion von PHA über einen zweistufigen Prozess möglich ist. In der anaeroben, ersten Stufe werden dabei durch Mikroorganismen leichtflüchtige, organische Säuren (VFA, engl. „volatile fatty acids“) produziert welche in der zweiten Stufe als Substrat für PHA-akkumulierende Bakterien genutzt werden. Trotz der Forschung verschiedener Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet gibt es noch einige offene Fragen, deren Klärung für ein Upscaling des Prozesses und somit für eine Produktion dieses nachhaltigen Rohstoffes zur Kunststoffgewinnung im industriellen Maßstab erforderlich ist. Einige wenige Autoren befassten sich bisher zwar mit industriellen Abwasserströmen als Substratquelle für die PHA-Produktion, jedoch wurden alle Substrate unter unterschiedlichen Prozessbedingungen untersucht (s. Tabelle 1) und es ist bislang unklar, ob die VFA-Ausbeute und -Zusammensetzung vornehmlich von dem Substrat selbst, von den Betriebsparametern oder von der anaeroben Biozönose abhängig sind. Erkenntnisse hierzu sind nötig, da sich die VFA-Eigenschaften auf die Eigenschaften des produzierten PHAs auswirken (s. Kapitel 2.2.). Zudem gibt es bislang kaum Studien zum Einfluss der polymerproduzierenden Bakterienmischbiozönose auf die PHA-Produktion und wie diese in Zusammenhang mit den verwendeten Prozessparametern steht. Hier sind die Daten aus der Literatur ebenfalls schwer vergleichbar, da jeweils unterschiedliche Impfschlämme und Randbedingungen verwendet wurden. Zur Optimierung und der Möglichkeit zur Steuerung sowie für ein Upscaling des Prozesses ist ein Verständnis der zugrundeliegenden Biozönose jedoch eine wichtige Grundlage (s. Kapitel 2.3). Auch ob die PHA-Zusammensetzung am Ende des Prozesses allein von der Substratzusammensetzung abhängt, oder ob die Biozönose hierauf ebenfalls einen Einfluss hat, ist bislang nicht geklärt (s. Kapitel 2.4). Neben den offenen Forschungsfragen zu den einzelnen Prozessschritten fehlt bisher als Grundlage für eine großtechnische Umsetzung und ein Schließen der Verfahrenskette außerdem eine Abstimmung der einzelnen Prozessschritte aufeinander. Aufgrund dieser Punkte ergeben sich die folgenden Ziele für dieses Projekt.

1.1 Ziele des Projekts und Vorgehensweise

Das übergeordnete Projektziel war die Weiterentwicklung einer Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen. Dafür sollte die Prozesskette sukzessive geschlossen werden, um Auswirkungen unterschiedlicher Rahmenbedingungen und Betriebseinstellungen auf die Biopolymerausbeute und -zusammensetzung bewerten zu können.

Dabei sollte im ersten Prozessschritt zunächst der Einfluss der Nährstoff- und Substratzusammensetzung sowie –Konzentration auf die VFA-Ausbeute und –Zusammensetzung untersucht werden. Hierzu wurde erstmalig eine standardisierte Methode zum Vergleich verschiedener Industrieabwässer unter festgelegten Randbedingungen entwickelt und angewendet. Weiterhin sollte eine Betrachtung des Einflusses der unterschiedlichen Substrate und deren Eigenschaften auf die Entwicklung der Biozönose im ersten Verfahrensschritt und deren Zusammenhang mit der VFA-Ausbeute und –Zusammensetzung stattfinden.

Aufgrund der lückenhaften Kenntnis über den Einfluss der Biozönose im zweiten Proessschritt auf die PHA-Produktionsperformance wurde zudem erstmals der Einfluss unterschiedlicher Impfschlämme auf die PHA-Produktion untersucht. Auch sollte die Bedeutung der Selektionsphase auf die Entwicklung der Biozönose und deren damit zusammenhängenden Einfluss auf die PHA-Produktionsperformance

untersucht werden. Aufgrund der anzunehmenden hohen Bedeutung der Mischbiozönose auf die Prozessperformance wurde hierauf ein Hauptfokus gelegt. Da sich widersprüchliche Literaturangaben zur Selektionsdauer ergaben, wurde hierauf ebenfalls ein Fokus gelegt. Zum Zeitpunkt der Versuchsplanung gab es aufgrund eigener Voruntersuchungen und aus der Literatur Hinweise auf eine Dauer von bis zu 50 Tagen bis zum Einstellen einer stabilen PHA-Produktionskapazität, was eine längere Versuchsdauer zur Folge hatte als angenommen. Aufgrund der Verschiebung des Schwerpunktes und der längeren Versuchsdauer konnte daher der Einfluss der Zyklusdauer in der Selektionsphase nicht wie geplant untersucht werden.

Innerhalb des anschließenden Verfahrensschrittes der Polymerproduktion erfolgte eine Untersuchung der Beeinflussbarkeit der PHA-Zusammensetzung und –Ausbeute durch die VFA-Zusammensetzung und –Konzentration. Ziel war eine Steigerung der PHA-Ausbeute durch eine Optimierung der Prozessbedingungen und eine kontinuierliche PHA-Produktion unter schwankenden Rahmenbedingungen. Hierbei sollte ebenfalls ein Kriterium zum Abbruch der Akkumulation untersucht werden. Der Verlauf der Sauerstoffkonzentration als Abbruchkriterium stellte sich jedoch als nicht sinnvoller Parameter heraus, da aufgrund eines ständigen Wachstums eines Biofilms auf den Sonden („fouling“) keine durchgehenden Sauerstoffverläufe aufgezeichnet werden konnten. Aus diesem Grund, dem bereits erwähnten Versetzen des Schwerpunktes und den unten erwähnten Verzögerungen wurde kein Fokus auf die Untersuchung eines Abbruchkriteriums der PHA-Akkumulation gelegt.

Nach Untersuchung der einzelnen Verfahrensschritte erfolgte eine Kopplung sowie Abstimmung dieser aufeinander. Mittels Ansätzen von MSR- bzw. Betriebsstrategien sollten Grundlagen geschaffen werden, um auch bei schwankenden Abwasserzusammensetzung einen dauerhaft stabilen Betrieb zu ermöglichen. Ein ausführlicher Langzeitversuch zur Untersuchung der Prozessstabilität konnte nicht planmäßig durchgeführt werden, da es innerhalb der Projektlaufzeit zu einige unvorhergesehenen Verzögerungen kam. Zunächst mussten Im März 2020 aufgrund der Covid-19-Pandemie und der daran anschließenden Einschränkung des Universitätsbetriebes alle Reaktoren für einige Monate außer Betrieb genommen werden. Der Wiederaufbau der Anlage und die Wiederaufnahme des Betriebs erfolgten ab Mai 2020, jedoch war ab diesem Zeitpunkt nur ein eingeschränkter Universitäts- und Laborbetrieb bei gleichzeitig erhöhtem Aufwand durch die Beachtung der verschärften Hygiene- und Sicherheitsregelungen möglich. Aufgrund dieses eingeschränkten Betriebes der Universität gab es außerdem einige Verzögerungen in der Modifikation der Versuchsanlage und der nötigen Anpassung der Anlagenprogrammierung sowie in der Analytik in anderen Abteilungen der Universität. Daher mussten innerhalb des eigenen Labors die Möglichkeiten einer eigenen PHA-Analytik geschaffen und die Methode zunächst etabliert werden. Die aufwendige DNA-Analytik der Biozönose war zudem nur in einer anderen Abteilung der Universität möglich, welche ebenfalls den Corona-Restriktionen unterlag. Daher konnten DNA-Analysen nicht immer zeitnah durchgeführt werden. Auch die Sequenzierung der aufbereiteten DNA-Proben durch externe Firmen verzögerte sich, da die Kapazitäten pandemiebedingt anderweitig genutzt werden mussten oder eingeschränkt waren. Durch die beschriebenen Verzögerungen konnten jedoch freigewordene Kapazitäten für eine Methodenentwicklung zur PHA- und DNA-Analytik sowie zur Probenvorbereitung genutzt werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Verfahrenskette

Die Herstellung von Polymeren aus Abwasserströmen mittels Belebtschlamm basiert auf einem zwei bzw. dreistufigen Prozess. Dabei werden aus organischen Verbindungen unter anaeroben Bedingungen (Reaktor 1 in Abbildung 1) zunächst kurzkettige, leicht flüchtige Fettsäuren (VFA, engl. „volatile fatty acids“) produziert, die in einer zweiten aeroben Stufe von unterschiedlichen Bakterienarten zum Aufbau von polymeren Speicherstoffen genutzt werden können. Das grundlegende Verfahrensschema zur Produktion von Biopolymeren ist in Abbildung 1 dargestellt.

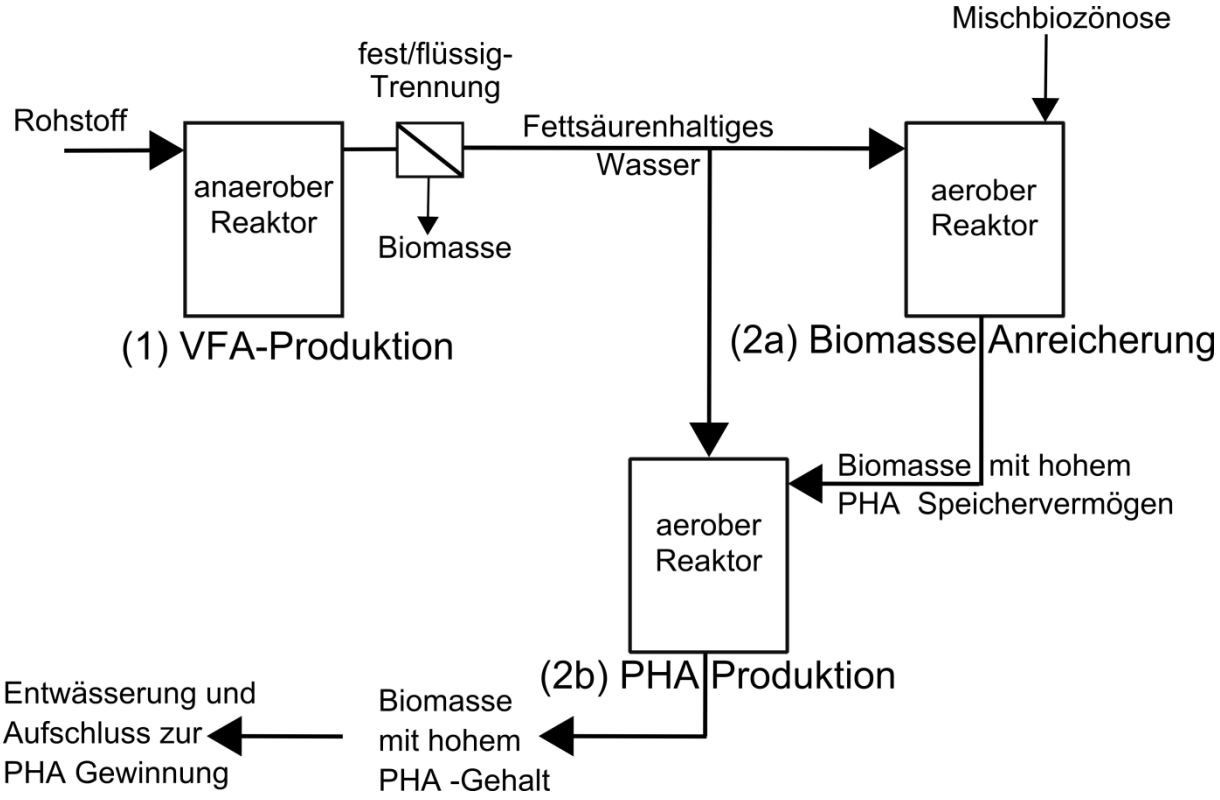


Abbildung 1: Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion (Pittmann 2015b).

In vielen Klärschlämmen sind zwar Mikroorganismen vorhanden, welche zur Herstellung der Biopolymere fähig sind, jedoch machen sie nur einen geringen oder unbestimmten Anteil der Biozönose aus. Daher müssen diese PHA-akkumulierenden Bakterien aus der Mischbiozönose des Belebtschlamms zunächst angereichert werden. Eine Anreicherung dieser Bakterien kann durch einen Wechsel der Milieubedingungen erreicht werden, indem einem aeroben Reaktor (Reaktor 2a in Abbildung 1) zyklisch Fettsäuren als leicht abbaubares Substrat zugegeben werden. In der Phase der Substratverfügbarkeit (feast-Phase) sollen die Bakterien gute Wachstumsbedingungen vorfinden, so dass essenzielle Nährstoffe wie Stickstoff und Phosphor in ausreichender Menge zur Verfügung stehen müssen. Alle im Belebtschlamm vorkommenden heterotrophen Bakterien nutzen in dieser Phase das Substrat zur Zellatmung und zum Biomasseaufbau, einige sind außerdem in der Lage das Substrat zum Aufbau interner Kohlenstoffspeicher in Form von Polymeren zu verwenden. Wenn das Substrat verbraucht ist, sind die Bakterien einem Substratmangel ausgesetzt (famine-Phase). In dieser Phase können die PHA-akkumulierenden Bakterien die zellinternen Kohlenstoffspeicher als Energie- und Kohlenstoff-Quelle nutzen, was ihnen Wachstumsvorteile verschafft, sodass bei mehrfacher

Wiederholung der Zyklen mit feast- und famine-Phasen eine Anreicherung der polymerspeichernden Bakterien stattfindet (Majone et al. 1996; Nguyenhuynh et al. 2021). Bis heute ist allerdings unklar, unter welchen Bedingungen sich welche Organismen durchsetzen, um auch bei schwankender Abwasserzusammensetzung einen stabilen Betrieb zu ermöglichen.

Nach erfolgter Selektion polymerherstellender Bakterien kann die Biomasse mit hohem PHA-Speichervermögen für die eigentliche Polymerproduktion genutzt werden. Dazu wird ein zweiter Reaktor benötigt (Reaktor 2b in Abbildung 1). Dieser wird im batch-Modus mit stoßweiser Substratzugabe betrieben und belüftet. Um allerdings einen Abbau der organischen Kohlenstoffverbindungen zum Zellwachstum weitgehend zu unterdrücken und stattdessen die Einlagerung von PHA als Speichersubstanz zu fördern, werden die Bakterien einem Stickstoff- und Phosphormangel ausgesetzt. Ist das externe Substrat weitgehend verbraucht, steigt der Sauerstoffgehalt an. Dies ist der Zeitpunkt, an dem die Bakterien den annähernd höchsten Anteil an Polymeren in den Zellen enthalten, sodass die Biomasse dem Reaktor entnommen und entwässert werden muss (Pittmann 2015a).

In verschiedenen Forschungsgruppen wurde in den letzten Jahren die Nutzung von kommunalen oder industriellen Abwasserströmen zur Herstellung von PHA über einen mehrstufigen Prozess untersucht. Dabei konnten in den genannten Studien jeweils unter unterschiedlichen Betriebsbedingungen die folgenden PHA-Gehalte erzielt werden.

Bengtsson et al. (2010) untersuchten die PHA-Produktionsfähigkeit einer Mischkultur, welche unter Verwendung von fermentierter Zuckerrohrmelasse und mithilfe eines Wechsels an aeroben und anaeroben Phasen hin zu einem hohen Anteil Glycogen-akkumulierender Organismen selektiert wurde. Dabei konnten sie 31,6 % PHA der Zelltrockenmasse produzieren und feststellen, dass bei hohen Acetat- und Valerat-Gehalten eine höhere Polymerproduktion erreicht werden kann als bei höheren Propionat- und Butyratanteilen. Albuquerque et al. (2010) untersuchten die Einflüsse der Selektionsbedingungen (feast/famine-Zyklus, Nährstoff- und Substratkonzentration) unter Verwendung einer Mischkultur und fermentierter Zuckerrohrmelasse als Substrat und erreichten damit einen PHA-Gehalt von 74,6 %. Carvalho et al. (2018) hingegen untersuchten die Auswirkungen verschiedener realer Substrate auf dieselbe Bakterienmischkultur und deren PHA-Produktionsperformance. Sie beobachteten eine Veränderung in der Zusammensetzung der Mischkultur infolge des Substratwechsels, allerdings blieb die PHA-Produktionskapazität weiterhin stabil. Sie erzielten unter Verwendung von fermentierter Melasse dabei einen maximalen PHA-Gehalt von 23 % und bei Nutzung von fermentierter Käsemolke 25 %. Yan et al. (2006) beobachteten, dass die Kombination aus dem verwendeten Belebtschlamm (kommunale Kläranlage, Papier- und Zellstofffabrik, Stärkeproduktion, Milchverarbeitung) und der Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen (Acetat, Glukose, Papier- und Zellstoffabwasser, Stärkeabwasser, Abwasser aus der Käseherstellung) großen Einfluss auf die PHA Produktion hat. Mit der Kombination aus Belebtschlamm einer Papierabwasserkläranlage und Acetat als Substrat, konnte der höchste PHA-Gehalt mit 43 % erzielt werden (Yan et al. 2006). Die beste Kombination unter Verwendung von realem Abwasser konnte mit Papierabwasser und Belebtschlamm aus einer Papierabwasserkläranlage mit ca. 18 % PHA der Zelltrockenmasse erreicht werden. Dionisi et al. (2005b) untersuchten den Einfluss von unterschiedlichen Vorbehandlungsmöglichkeiten der Versäuerung. Durch eine vorherige Zentrifugation des Olivenölmühlenabwassers, konnten sowohl die VFA-Ausbeute als auch die VFA-Zusammensetzung beeinflusst werden. Durch die Zentrifugation stieg zudem der Anteil an Propionat

und Valerat (Dionisi et al. 2005a). Im Projektbericht Phario wurde beschrieben, dass durch Ersetzen der Selektionsphase durch eine verkürzte Akklimatisationsphase an das Substrat, bereits PHA-Gehalte von ca. 37 % bei der Verwendung von kommunalen Überschussschlamm erreicht werden können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die PHA-Zusammensetzung durch Variation der Substratzusammensetzung beeinflusst werden kann (STOWA 2017a). Sowohl Ben et al. (2016) als auch Tamang et al. (2019) verwendeten für ihre Versuche Brauereiabwasser. Ben et al. (2016) setzen den Untersuchungsschwerpunkt jedoch auf den Einfluss verschiedener Substratkonzentrationen, Temperaturen und pH-Werte auf die Polymerproduktion, wohingegen Tamang et al. (2019) zwei unterschiedliche Methoden zur Substratvorbereitung verwendeten. Mit Erhöhung der Substratkonzentration konnte bei der Untersuchung von Ben et al. (2016) die PHA-Ausbeute gesteigert werden. Der pH-Wert und die Temperatur hatten jedoch keinen Einfluss auf die PHA-Speicherung (Ben et al. 2016). Dabei konnte ein maximaler PHA-Gehalt von 39 % bzw. 39-45 % erreicht werden (Ben et al. 2016; Tamang et al. 2019).

Obwohl somit viele einzelne Aspekte untersucht wurden, lassen sich die jeweiligen Erkenntnisse nur schwer zusammenführen, da alle Untersuchungen unter unterschiedlichen Randbedingungen stattfanden, verschiedene Untersuchungsschwerpunkte gesetzt wurden und die Versuche häufig in sehr kleinem Maßstab (Schüttelkolben) durchgeführt wurden. Damit ist eine Übertragung für ein Up-Scaling und ein Schließen der gesamten Verfahrenskette bisher nicht ohne weitere Untersuchungen möglich, die die Schnittpunkte der Prozessschritte besser abdecken.

Eigene Studien (Pittmann und Steinmetz 2013; Pittmann und Steinmetz 2014) im Rahmen eines von der Willy-Hager Stiftung geförderten Projektes, belegten ebenfalls, dass die beschriebenen Verfahrensstufen geeignet sind, um aus Abwasserströmen PHA in Bakterien aus Belebtschlamm anzureichern. Der Untersuchungsschwerpunkt lag bei den Versuchen von Pittmann und Steinmetz auf der Auswahl geeigneter Randbedingungen, mit denen eine möglichst hohe Polymerproduktion erreicht werden kann. Durch Variation der Prozessparameter Temperatur, pH-Wert, Aufenthaltszeit, Entnahmemenge und Reaktorbetriebsweise konnte eine maximale VFA-Raumproduktion von 1.913 mg_{VFA}/(L d) bei einer VFA-Konzentration von 7.653 mg/L erzielt werden. Dabei konnten bis zu 39 % des Primärschlamm-CSBs in Fettsäuren umgewandelt werden (Pittmann und Steinmetz 2013). Die produzierten VFAs wurden zunächst zur Selektion PHA-produzierender Mikroorganismen aus dem Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage nach oben beschriebener Verfahrensweise eingesetzt. Die derart angereicherte Biomasse wurde dann zur Produktion von PHAs genutzt. Dabei konnten durch Variationen der Prozessparameter Substratkonzentration, Temperatur, pH-Wert und Zyklusdauer, PHA-Gehalte bis zu 28,4 % bezogen auf die Zelltrockenmasse erzielt werden (Pittmann und Steinmetz 2014). Allerdings wurden die Prozesse nacheinander betrieben und es fand keine direkte Kopplung statt.

Obwohl somit mehrfach die prinzipielle Eignung des Prozesses unter Verwendung von Abwasserströmen gezeigt werden konnte, wurden in vorherigen Studien oftmals nur einzelne Aspekte untersucht. Zudem lassen sich die jeweiligen Erkenntnisse aus der Literatur nur schwer zusammenführen, da alle Untersuchungen unter unterschiedlichen Randbedingungen stattfanden. Dies gilt insbesondere auch für die Zusammensetzung der Impfschlämme und der Entwicklung der Biozönose über die Zeit. Damit eine Übertragung für ein Up-Scaling und ein Schließen der gesamten Verfahrenskette möglich ist, bedarf es weiterer Untersuchungen und Erkenntnisse.

Die einzelnen Prozessschritte werden im Folgenden näher erläutert.

2.2 Versäuerung

Die Versäuerung ist Teil des anaeroben Abbaus, bei dem organische Stoffe in vier Schritten (Hydrolyse, Versäuerung, Acetogenese, Methanogenese) hauptsächlich zu CO_2 und CH_4 umgewandelt werden. Da die VFA, die zur Produktion von PHA nötig sind, während der Versäuerung gebildet werden, wird der anaerobe Abbau nach der Versäuerung durch Einstellen des pH-Wertes oder mithilfe der Aufenthaltszeit gestoppt (Pittmann 2015a). Im Hinblick auf die spätere PHA-Produktion sind die wichtigsten Zielgrößen der Versäuerung die VFA-Ausbeute und -Zusammensetzung (Pittmann 2015a). Eine hohe VFA-Ausbeute erhöht das Potenzial für eine PHA-Produktion. Zudem hat die VFA-Zusammensetzung Einfluss auf die PHA-Produkteigenschaften, wie bereits in verschiedenen Untersuchungen beobachtet werden konnte (Hao et al. 2017; Huang et al. 2020; STOWA 2017a). Dabei zeigte sich in diesen Untersuchungen, dass die Bildung von PHV durch einen hohen VFA-Anteil mit ungerader Anzahl an C-Atomen (Propionsäure (HPro) und Valeriansäure (HVal)) begünstigt wird. Die PHA-Produkteigenschaften hängen vor allem vom Verhältnis der Monomere 3-Hydroxyvalerat und 3-Hydroxybutyrat (HV und HB) im produzierten Biokunststoff ab. Eine erhöhter HV-Anteil führt dazu, dass der Kunststoff weniger spröde ist (Wang et al. 2013). In Abhängigkeit des späteren Einsatzzweckes kann durch die gezielte Beeinflussung der PHA-Produkteigenschaften das Anwendungsspektrum erweitert werden. Wenn die Produktion dieser beiden Säuren gegenüber Essigsäure (HAc) und Buttersäure (HBu) dominiert und durch Wahl geeigneter Randbedingungen festgelegt werden könnte, können möglicherweise bereits durch in der Versäuerungsstufe die PHA-Produkteigenschaften beeinflusst werden. Dies verdeutlicht die Abhängigkeiten zwischen den beiden Prozessstufen und die Erfordernisse diese aufeinander abzustimmen. Für die praktische Umsetzung ist neben einem verbesserten Prozessverständnis zum Schließen der Verfahrenskette die Entwicklung von MSR-Strategien hilfreich.

Die wesentlichen Einflussparameter auf die Versäuerung sind Temperatur, pH-Wert, Aufenthaltszeit, C:N-Verhältnis, Substratkonzentration sowie die Zusammensetzung des Substrats (Rosenwinkel et al. 2015). Der erzielbare Versäuerungsgrad (VG) und die VFA-Zusammensetzung sind bereits bei verschiedenen Abwasserströmen untersucht worden (siehe Tabelle 1). Ein Vergleich der Ergebnisse ist allerdings schwierig, da unterschiedliche Substrate mit jeweils unterschiedlichen Prozessparametern zur Anwendung kamen. Die Frage, ob das jeweilige Substrat, oder allein die Prozessparameter die VFA-Zusammensetzung beeinflussen oder ob die Zusammensetzung der Biozönose ebenfalls einen Einfluss hat, ist derzeit nicht geklärt. Eine allgemeingültige Aussage mit welchen Substraten, unter welchen Bedingungen ein/e bestimmte/r VG bzw. VFA-Zusammensetzung erreicht werden kann, lässt sich bisher nicht treffen. Für ein Schließen der Verfahrenskette sind diese Kenntnisse jedoch notwendig, um bei schwankenden Rahmenbedingungen einen stabilen Prozess und damit gleichbleibende PHA-Produkteigenschaften zu gewährleisten.

Tabelle 1: Versäuerungsgrad und VFA-Zusammensetzung verschiedener Abwässer mit den jeweiligen verwendeten Prozessparametern.

Substrat	pH	T in°C	RT in d	VG in %	VFA-Zusammensetzung in %Ac:%Pro:%Bu:%Va	Quelle
Olivenöl	5-6	25	-	25	54:15:27:4	(Dionisi et al. 2005a)
Papierabwasser	6	37	11	59	9:6:78:7	(Bengtsson et al. 2008a)
Papierabwasser	6	30	0,66	74	35:40:19:6	(Bengtsson et al. 2008b)
Zellstoff	6	37	17	82	40:24:35:1	(Bengtsson et al. 2008a)
Zuckerrohrmelasse	6	37	3	-	28:35:20:13	(Carvalho et al. 2018)
Käsemolke	6	37	3	-	60:9:14:6	(Carvalho et al. 2018)
Käsemolke	6	37	8	60	43:15:42:0	(Bengtsson et al. 2008a)
Käsemolke	6	30	3	-	52:9:15:4,5	(Oliveira et al. 2017)
Brauereiabwasser	6,2	37	15	60	69:14:9:8	(Ben et al. 2016)
Primärschlamm	6	30	4	15	49:38:13:0	(Pittmann und Steinmetz 2017)
Süßigkeiten-Prozessabwasser	5,5-6	37	7-10	-	-	(STOWA 2017a)

2.3 Selektion

Bei der Biopolymerherstellung mittels bakterieller Mischkulturen aus Belebtschlamm wird oftmals eine Selektionsphase vor der eigentlichen Polymerproduktion durchgeführt, bei der Bakterien angereichert werden sollen, welche die Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzen. Dabei gehen verschiedene Autoren davon aus, dass diese vorgeschaltete Selektionsphase für eine gute PHA-Ausbeute nötig ist (Pittmann 2015a; Huang et al. 2018), wobei jedoch auch andere Erkenntnisse hierzu vorliegen. So wurde in dem Projekt Phario auf eine Selektion von Mikroorganismen als Zwischenstufe verzichtet und trotzdem konnte eine ähnliche Polymerkonzentrationen von 37 % bezogen auf die Trockenmasse in den Zellen erzielt werden (STOWA 2017a) wie in anderen Studien, welche sich mit der PHA-Produktion aus Abwasserströmen beschäftigten (Tamang et al. 2019; Ben et al. 2016). Warum dies in manchen Fällen funktioniert, in manchen aber eine längere Selektion erforderlich ist, ist bislang unklar. Möglich Gründe können in der Zusammensetzung der Impfschlämme liegen. Valentino et al. (2012) untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Längen der Selektionsphase und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine längere Selektion der Biomasse nicht vorteilhaft ist, da auch mit einer kurz akklimatisierten Mischkultur (3-7 Tage) ähnlich hohe PHA-Ausbeuten erzielt werden konnten wie mit einer über eine Dauer von 150 Tagen angereicherten Biomasse. Bei einer Studie von Huang et al. (2018) stellte sich jedoch erst nach einer Dauer von 50 Tagen eine stabile PHA-Produktion ein. Bislang gibt es

allerdings wenige gezielte Untersuchungen, ob die Selektion bei gleichem Substrat, gleichem Impfschlamm und gleichen Betriebsbedingungen zu einer Verbesserung der PHA-Ausbeute führt oder nicht. Aufgrund dieser Widersprüche bedarf es weiterer systematischer Untersuchungen zur Bedeutung und Dauer der Selektionsphase.

Die Selektion kann durch Anpassung der Selektionsdauer, der Substratkonzentration, der Zykluslänge und der Anzahl der feast/famine Zyklen beeinflusst werden (Valentino et al. 2017; Nguyenhuynh et al. 2021). Die Nutzung einer mittleren Raumbelastung bzw. Substratkonzentration kann beispielsweise zu einer verbesserten PHA-Produktionsrate der Mischkultur führen, wobei eine weitere Erhöhung zu einer Verschlechterung der Produktionsperformance führen kann. Dies steht in Zusammenhang mit dem dadurch, während der famine-Phase abnehmenden Selektionsdruck auf die nicht-PHA-Produzenten (Nguyenhuynh et al. 2021; Chen et al. 2017). Zudem bewirkt der Substratmangel während der famine-Phase eine intrazelluläre enzymatische Limitation des Zellwachstums und induziert die PHA-Produktion bei den dazu fähigen Organismen. Dies wird insbesondere bei einer höheren Substratkonzentration ohne Verlängerung der Zyklusdauer problematisch, da dies die famine-Phase verkürzt, wodurch auch die PHA-Produzenten eher zum Zellwachstum als zur PHA-Produktion angeregt werden (Nguyenhuynh et al. 2021). Einen ähnlichen Effekt hat auch ein Stickstoffmangel. Da dieser zum Wachstum benötigt wird, wird bei dessen Vorhandensein das Zellwachstum gegenüber einer PHA-Speicherung bevorzugt. Aus diesem Grund wird die an die Selektion anschließende PHA-Akkumulation zumeist auch unter Stickstoffmangelbedingungen durchgeführt. Jedoch wird zu einer hohen Produktivität des Systems auch eine hohe Biomassekonzentration benötigt, da bei niedriger Konzentration größerere Anlagen bemessen und finanziert werden müssten (Nguyenhuynh et al. 2021). Es gilt daher die beste Option der Selektion für ein gleichzeitig hohes Biomassewachstum und eine hohe PHA-Produktion zu finden. Das Schlammalter spielt bei der Stabilität der Selektionsphase ebenfalls eine Rolle. So konnten Chen et al. (2017) zeigen, dass ein kürzeres Schlammalter von 5 Tagen im Vergleich zu 10 Tagen vorteilhaft für das Einstellen einer stabilen Mischkultur mit hohem PHA-Produktionspotential ist. Auch Moretto et al. (2020) konnten beim Vergleich verschiedener Schlammalter- (1 und 2 d) und Zyklusdauer- (6 und 12 h) Kombinationen feststellen, dass die Biomasse unter Einstellen des kürzesten untersuchten Schlammalters von einem Tag in Verbindung mit der kürzesten Zyklusdauer von 6 h die beste PHA-Produktionsperformance aufwies (Moretto et al. 2020). Wie sich diese unterschiedlichen Betriebsweisen der Selektion jedoch auf die Bakterienmischkultur selbst auswirken, ist bislang nur wenig aufgeklärt. Diesen Zusammenhang zu verstehen ist wichtig, da sich die Zusammensetzung der Biozönose auf die PHA-Produktionsperformance und auf die PHA-Zusammensetzung auswirken könnten (Khatami et al. 2021). Die Zusammensetzung des in der Selektion eingesetzten Substrates beeinflusst die Zusammensetzung der Biozönose, da unterschiedliche Organismen, verschiedene Substratpräferenzen besitzen (Albuquerque et al. 2013; Huang et al. 2020). Carvalho et al. (2018) konnten zeigen, dass der Wechsel von Zuckerrohrmelasse zu Käsemolke innerhalb des gleichen Reaktors zur Veränderung der Mikroorganismenzusammensetzung führte. So dominierte bei einer Zugabe von Zuckerrohrmelasse das Taxon *Actinobacteria*, während unter Zugabe von Käsemolke *Firmicutes* dominierte. Nach dem Einstellen der Kultur auf den Substratwechsel, erreichte diese jedoch eine ähnliche PHA-Produktivität wie zuvor (Carvalho et al. 2018).

In welchem Ausmaß die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose die PHA-Speicherungsfähigkeit bzw. -Ausbeute beeinflusst und wie sich verschiedene Betriebsbedingungen, insbesondere in der

Selektion, auf die Diversität und relative Abundanz von PHA-akkumulierenden Bakterien auswirken, ist bisher noch nicht geklärt. Bisher befassen sich erst einige wenige Autoren wie beispielsweise Huang et al. (2018) vertieft mit der Analyse der Bakterienmischkultur, dem Einfluss von Betriebsbedingungen auf diese und den Zusammenhang mit der Prozessperformance (Sabapathy et al. 2020). Zudem sind Daten zu diesem Thema aus der Literatur oft schwer oder überhaupt nicht vergleichbar, da unterschiedliche Substrate und Bedingungen verwendet wurden (Morgan-Sagastume 2016). Weiterhin gab es bisher noch keine gezielten Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Inokula mit den jeweiligen zugrundeliegenden Biozönosen auf die Prozessperformance. Um allerdings den Prozess und die PHA-Produktionsfähigkeit optimieren und steuern zu können, ist es wichtig, die zugrundeliegende Biozönose, insbesondere Einflussfaktoren auf die Abundanz und die Diversität der PHA-produzierenden Bakterien, zu verstehen (Sabapathy et al. 2020; Morgan-Sagastume 2016). Daher ist die Untersuchung dieser Biozönose ein wichtiger Schritt, um Erkenntnisse für die Verbesserung und das Upscaling des Prozesses zu erlangen. Manche Autoren empfehlen zudem, die Selektion, statt in Richtung eines maximierten PHA-Zellgehaltes, in Richtung einer homogenen Population mit einem hohen und stabilen PHA-Speicherungs-Vermögen anzupassen (Queirós et al. 2014; Serafim et al. 2008). Um dies zu erreichen, müssen allerdings zunächst die Faktoren besser verstanden werden, die deren Zusammensetzung beeinflussen. Dies ist gerade in Hinblick auf einen stabilen Langzeitbetrieb unter schwankenden Rahmenbedingungen von großer Bedeutung.

2.4 Biopolymeranreicherung

Bisherige Studien zur Biopolymeranreicherung zeigen, dass verschiedene Prozesseinstellungen wie beispielsweise das Nährstoffverhältnis, die Temperatur und der pH-Wert maßgeblichen Einfluss auf die PHA-Produktion haben können (Khatami et al. 2021; Kourmentza et al. 2017). Die Art der Substratdosierung wirkt sich vornehmlich auf die PHA-Ausbeute aus, wohingegen die Eigenschaften des Substrates sowohl die Ausbeute als auch die Zusammensetzung des Biopolymers beeinflussen können (Huang et al. 2020). Villano et al. (2010) konnten zeigen, dass durch eine pH-Wert-Kontrolle die PHA-Zusammensetzung unabhängig von der VFA-Zusammensetzung beeinflusst werden kann. Das C/N-Verhältnis kann ebenfalls einen Einfluss auf die Polymerzusammensetzung haben (Khatami et al. 2021). Zudem kann eine Entkopplung von Kohlenstoff und Stickstoff im Substrat zu einer erhöhten PHA-Produktion führen (Lorini et al. 2020). Außerdem konnten Lorini et al. (2020) zeigen, dass die Raumbelastung die Polymerzusammensetzung beeinflussen kann.

Ob die Biomasse einen Einfluss auf die PHA-Zusammensetzung hat oder ob diese überwiegend von der VFA-Zusammensetzung abhängt, muss noch systematisch untersucht werden, da hierzu bisher Forschungslücken und Widersprüche in Ergebnissen bestehen. So konnten beispielsweise STOWA (2017b) diesen Zusammenhang in ihren Untersuchungen nicht feststellen. (Janarthanan et al. 2016) untersuchten erstmals den Zusammenhang zwischen der Veränderung der Biozönose während der Akkumulation und der Zusammensetzung der produzierten PHA und konnten feststellen, dass der HV-Anteil mehr von der Zusammensetzung der VFAs und der Strategie der Substratzugabe abhing als von der Biomassezusammensetzung. Allerdings zeigen andere Studien, dass die Biozönose die Art der produzierten PHAs beeinflussen kann, was als Folge unterschiedlicher Stoffwechselprozesse und somit durch verschiedene Substratverwertungsmechanismen unterschiedlicher Organismen zustande kommen kann (Morgan-Sagastume 2016). So konnten beispielweise Carvalho et al. (2014) feststellen, dass eine höhere Abundanz der Gattung *Thauera* mit einem höheren HV-Anteil im produzierten

Polymer korrelierte, während eine höhere Abundanz der Gattung *Paracoccus* mit einem geringeren HV-Anteil korrelierte. Wang et al. (2020) konnten erstmals zeigen, dass die Abundanz bestimmter Mikroorganismen in Verbindung mit der Konkurrenz in der Substrataufnahme bestimmter VFAs steht, was zu einer PHA-Zusammensetzung führte, welche sich der theoretischen vorhergesagten Zusammensetzung annäherte. Hao et al. (2017) sowie Huang et al. (2020) konnten bei Versuchen mit künstlichen Substrat feststellen, dass durch eine verstärkte Zugabe von VFA mit ungerader Anzahl an C-Atomen (HPro und HVal), eine Biozönose angereichert werden kann, die vermehrt PHV produziert. Um diesen Widerspruch aufzuklären, bedarf es gezielter Untersuchungen unter sonst vergleichbaren Randbedingungen.

2.5 Zusammenfassung zum gegenwärtigen Kenntnisstand und offene Forschungsfragen

Die Möglichkeit der Produktion von PHA aus verschiedenen Substraten wurde vielfach aufgezeigt. Dabei wurde in vielen Studien künstliches Substrat eingesetzt, oder die Prozessbedingungen waren in den einzelnen Studien sehr verschieden, so dass ein Vergleich und damit eine klare Zuordnung der Relevanz unterschiedlicher Prozessparameter nicht gegeben sind. Bislang ist daher nicht geklärt welchen Einfluss die Substrateigenschaften und welchen die Versuchsbedingungen haben. Weiterhin ist unklar, ob oder unter welchen Rahmenbedingungen eine Selektion erforderlich ist bzw. ob dadurch deutlich höhere Ausbeuten erzielt werden können. Falls ja, muss untersucht werden, welche Randbedingungen die Selektion positiv beeinflussen. Einerseits wurde von einigen Autoren nachgewiesen, dass eine Selektion von Mikroorganismen mit hohen PHA-Bildungspotenzial die PHA-Ausbeute steigert, andererseits zeigen die Untersuchungen im Projekt Phario, dass eine vereinfachte Akklimatisation der Mischbiozönosen an das Substrat ausreicht, wodurch mehr VFAs für die PHA-Produktion zur Verfügung stehen (STOWA 2017a). Es wurden zudem bisher kaum Untersuchungen der zugrundeliegenden Biozönose und deren Einflüsse auf die Versäuerung sowie die Biopolymerherstellung durchgeführt. Dieser Zusammenhang sollte durch Experimente mit ansonsten vergleichbaren Randbedingungen untersucht werden. Es erfolgten zudem bisher noch keine Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Inokula mit den jeweiligen zugrundeliegenden Biozönosen auf den Prozess. Zusätzlich wurden bisher die einzelnen Prozessschritte meist separat betrachtet. Ein annäherndes Schließen der Verfahrenskette hat bisher nur im Projekt Phario stattgefunden, jedoch unter häufigem Wechsel des verwendeten Substrats, wodurch ein Langzeitbetrieb unter Verwendung eines realen Abwassers nicht abgebildet wurde.

Randbedingungen auf Abwasseranlagen unterliegen in der Regel starken Schwankungen, z.B. durch Veränderungen im industriellen Produktionsprozess. Für die Gewinnung eines Rohstoffes ist allerdings eine möglichst konstante Ausbeute und Zusammensetzung der in den Bakterien angereicherten Polymere bedeutsam. Daher bedarf es der Ermittlung der Relevanz der jeweiligen Betriebsparameter unter sonst vergleichbaren Randbedingungen sowie für einen langfristigen Dauerbetrieb der Entwicklung von MSR-Strategien. Die Grundlagen sollen in diesem Projekt geschaffen werden und bilden die Voraussetzung für ein Up-Scaling.

3 Material und Methoden

In den folgenden Unterkapiteln werden für jeden Arbeitsschritt die Ziele und Versuchsbeschreibung erläutert und im Anschluss für alle Schritte die analytischen Methoden beschrieben.

3.1 Versäuerung

3.1.1 Ziele

Im ersten Arbeitsschritt, der Versäuerung wurden geeignete Abwässer aus der Industrie als Rohstoff für die PHA-Produktion ermittelt. Bei der Auswahl potenzieller Abwässer wurde sich auf die Lebensmittelindustrie beschränkt, da diese prinzipiell gut für einen anaeroben Abbau geeignet sind und davon auszugehen ist, dass keine toxischen Inhaltsstoffe enthalten sind, die die folgenden Prozessschritte stören oder aber auch das Produkt negativ beeinflussen könnten.

In der Literatur wurden bereits die Versäuerungseigenschaften von zahlreichen Abwässern beschrieben, allerdings unterscheiden sich die Randbedingungen der Studien so stark voneinander, dass ein Vergleich der bisherigen Erkenntnisse nicht oder nur stark eingeschränkt möglich ist und nicht eindeutig dargelegt werden kann, ob die Ergebnisse vorrangig von den Abwassereigenschaften oder den gewählten Prozessbedingungen abhängen. Aus diesem Grund wurde eine möglichst standardisierte Methode zur Durchführung von Versäuerungsmethoden in Anlehnung an VDI 4630 und DIN 38414-8 entwickelt.

Bei den Versuchen wurden verschiedene CSB-Startkonzentrationen und Abwässer mit erwarteten unterschiedlichen Kohlenhydrat- und Eiweiß-/Fettgehalten untersucht. Die wichtigsten Zielparameter waren die VFA-Ausbeute und die VFA-Zusammensetzung. Außerdem wurde die Nährstoffzusammensetzung der Abwässer zu Beginn analysiert. Die untersuchten Abwässer waren:

Erwartet kohlenhydratreiche Abwasserquellen:

- Kartoffelchips-Produktion
- Brauerei (inkl. Produktion von Biermischgetränken)

Erwartet fett-/eiweißreiche Abwasserquellen:

- Molkerei (Fokus auf Kondensmilch)
- Tiefkühlpizza-Produktion

3.1.2 Versuchsbeschreibung

Um beim Substratscreening einen sofortigen Versäuerungsbeginn und gleiche Startbedingungen zu gewährleisten, wurde als Inokulum Faulschlamm aus dem Faulturm der Kläranlage Kaiserslautern für alle untersuchten Abwässer verwendet. Der Faulschlamm wurde in Anlehnung an VDI 4630 vor Versuchsbeginn in einem 10 L Glasreaktor ausgefault (s. Abbildung 2). Der Faulschlamm wurde dazu für eine Woche über den Doppelmantel des Glasreaktors und einem Umwälzthermostat (ME-12, Fa. Julabo) bei ca. 37 °C gelagert und dauerhaft mit einem Überkopfrührer (RZR 1, Fa. Heidolph) durchmischt. Um den Einfluss des Inokulums möglichst gering zu halten, wurden die Versuche unmittelbar hintereinander über einen Zeitraum von 3 Monaten durchgeführt, um eventuelle jahreszeitliche Schwankungen im Betrieb des Faulturms der Kläranlage weitestgehend zu vermeiden. Weiterhin wurde eine konstante Schlammbelastung ($B_{CSB,hom,Abwasser/oTR,Faulschlamm}$) zu Beginn des Versuchs von 3 g/g eingestellt.

Abbildung 2: Glasreaktor zum Ausfaulen des Inokulums vor dem Substratscreening.

Zur Untersuchung der in Abschnitt 3.1.1 genannten Ziele (Einfluss der Startkonzentration und Einfluss der Abwasserzusammensetzung) wurden pro Abwasser zwei Verdünnungen angesetzt. Bei der ersten Verdünnung sollte die CSB-Startkonzentration unter Einhaltung der vorgegebenen Schlammbelastung so hoch wie möglich sein. Bei der zweiten Verdünnung musste der Start-CSB bei allen Abwässern zu Beginn gleich hoch sein, um einen Vergleich der Abwasserzusammensetzung zu ermöglichen. Daher wurde einerseits anhand von Voruntersuchungen und andererseits durch Befragung des Betriebspersonal der verschiedenen Firmen versucht eine Mindestkonzentration festzulegen, die erfahrungsgemäß bei allen Abwässern nicht unterschritten wird. Andererseits sollte der CSB so hoch sein, dass bei den aus der Literatur zu erwartenden VFA-Ausbeuten, die VFA-Konzentration am Ende der Versuche hoch genug ist, um die folgenden Stufen der PHA-Produktion sinnvoll betreiben zu können. Unter Beachtung dieser Randbedingungen wurde ein CSB von 2 g/L gewählt. Beim letzten Versuchsdurchlauf, der mit Abwasser aus einer Pizzaproduktion durchgeführt wurde, war der CSB allerdings mit 1,1 g/L deutlich niedriger als erwartet. Laut Betriebspersonal liegt die CSB-Konzentration im Ablauf der Produktion in der Regel bei etwa 4-6 g/L. Als möglicher Grund wurde vom Betriebspersonal eine Verzögerung des Produktionsstarts am Tag der Abholung genannt. Aus zeitlichen Gründen wurde der Versuch dennoch mit diesem Abwasser durchgeführt, allerdings mit nur einem Verdünnungsansatz.

Der Versuchsaufbau des Substratscreenings (dargestellt in Abbildung 3) bestand aus 6 Reaktoren mit einem Reaktionsvolumen von 2 L (GLS 80® Rührreaktor, Fa. Schott). Beide Verdünnungsansätze eines Abwassers wurden gleichzeitig untersucht und jeweils dreifach angesetzt. Zur kontinuierlichen Durchmischung wurde ein magnetischer Ankerrührer (Zubehör für GLS 80® Rührreaktor, Fa. Schott) in Kombination mit einer Magnetrührplatte (RH basic 2, Fa. IKA) verwendet. Die Temperierung der Reaktoren erfolgte über ein beheiztes Wasserbad, in das die Reaktoren eingetaucht waren. Das Wasser wurde mit einem Einhängethermostat (ECO Silver, Fa. Lauda) erhitzt. Über einen mit dem Einhängethermostat verbundenen Pt-100 Temperaturfühler, der in einem der Reaktoren eingebracht war, wurde die Reaktionstemperatur auf 37 °C geregelt. Zur Vermeidung einer Methanproduktion wurde der pH-Wert zu Beginn auf einen Wert <6 eingestellt. In jedem Reaktor war eine pH-Sonde (EasyFerm Bio HB Arc 225, Fa. Hamilton) eingebracht und die Werte wurden zur Kontrolle online mit einem Datenerfassungssystem (BlueVIS, Fa. BlueSens) aufgezeichnet. Bei Bedarf wurde während des Versuchs der pH-Wert händisch nachjustiert, um einen Wert von <6 zu gewährleisten. Für eine bessere Vergleichbarkeit wäre eine online-Regelung auf einen konstanten pH-Wert wünschenswert gewesen. Bei Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass durch die teilweise stark einsetzende VFA-Produktion ein

sehr hoher Laugenverbrauch nötig gewesen wäre, der wiederum eine nicht zu vernachlässigende Verdünnung in den Reaktoren verursacht hätte.

Da auch bei den ersten Stufen des anaeroben Abbaus CO_2 entsteht, wurde ein Gasablass am Reaktor angebracht. In der Gasleitung wurden online die CO_2- und CH_4-Konzentration gemessen (BCP-CO_2 und BCP-CH_4, Fa. Bluesens), um überprüfen zu können, ob eine unerwünschte Methanproduktion einsetzte. Zur Bilanzierung des Kohlenstoffs wurde der Gasvolumenstrom mit MilliGascountern (Fa. Ritter) online erfasst. Durch vereinzelt auftretende, nicht vermeidbare Undichtigkeiten im System lieferten die Messungen jedoch keine zuverlässigen Daten, weshalb auf eine Bilanzierung verzichtet wurde. Die Daten aller online-Messungen wurden über das Datenerfassungssystem BlueVIS (Fa. Bluesens) aufgezeichnet.

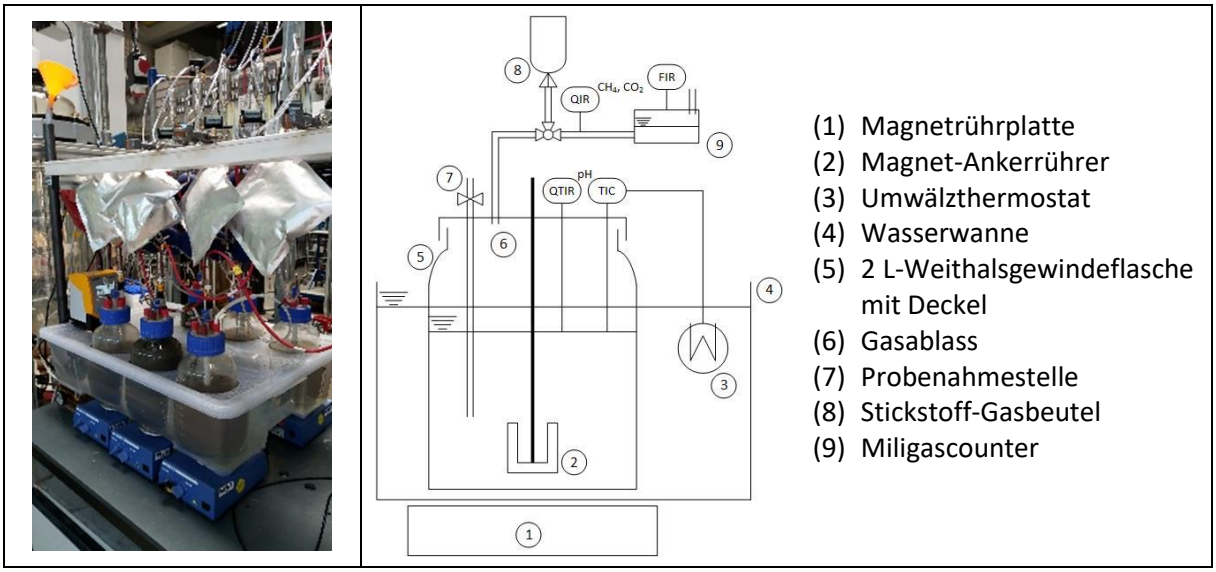


Abbildung 3: Versuchsaufbau des Substratscreenings.

Wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, sollten gezielt die Einflüsse der Startkonzentration und der Zusammensetzung der Makronährstoffe untersucht werden. Unterschiedliche C : N : P-Verhältnisse würden einen Vergleichbarkeit erschweren und bei einem eventuellen Nährstoffmangel könnte das Versäuerungspotential nur unzureichend untersucht werden. In Anlehnung an DIN 38414-8 wurde als C : N : P-Verhältnis 100 : 6 : 1 gewählt. Da eine Messung des Kohlenstoffs als TOC (gesamter organischer Kohlenstoff) nicht möglich war, wurde stattdessen der CSB gewählt. Da anzunehmen ist, dass der CSB höher ist als der TOC, wurde davon ausgegangen, dass bei dieser Vorgehensweise ein Mangel an Nährstoffen sicher ausgeschlossen werden kann. Ausgehend von den NH_4- und PO_4-Analysen des Inokulums und der Abwässer, wurden die fehlenden Nährstoffe durch Zugabe von NH_4Cl und K_2HPO_4 in Anlehnung an DIN 38414-8 ergänzt. Nach Fertigstellung der Versuchsansätze wurde der Reaktor mit Stickstoff durch die Probenahmestelle gespült (s. Abbildung 3), um vorhanden Sauerstoff zu verdrängen. Zusätzlich konnte damit ein Dichtigkeitstest durchgeführt werden.

Die Versuchsdauer betrug 16 Tage. Im Hinblick auf einen späteren realen Betrieb wäre eine kürzere Aufenthaltszeit (6-7 Tage) erstrebenswert, um Reaktionsvolumen einzusparen und eine mögliche Methanproduktion sicher verhindern zu können. Es sollte aber vermieden werden bei einer eventuell auftretenden lag-Phase des Inokulums und durch eine zu kurz gewählte Versuchsdauer das Versäuerungspotenzial der Abwässer nur unzureichend zu erfassen.

Während des Versuchs wurden montags, mittwochs und freitags Proben zur Untersuchung der VFA aus der Probenahmestelle genommen (s. Abbildung 3). Zum Spülen des Probenahmerohrs wurden ca. 20 mL des Reaktorinhalts mit einer Spritze entnommen. Anschließend wurden mit einer weiteren

Spritze weitere 20 mL Probenvolumen zur Analyse entnommen. Durch die Entnahme von Proben aus den Reaktoren entsteht ein Unterdruck. Um zu verhindern, dass die Sperrflüssigkeit aus den MiligasCountern oder Luft durch eventuelle Undichtigkeiten in die Reaktoren eingesaugt wurden, wurde ein mit Stickstoff gefüllter Gasbeutel an die Gasleitung angeschlossen. Während der Probenahme wurde die Gasleitung in Richtung der Gassensoren und der MiligasCounter über ein Drei-Wege-Ventil geschlossen und in Richtung der Gasbeutel geöffnet. Somit wurde bei der Probenahme lediglich Stickstoff in die Reaktoren eingesaugt. Am Ende der Probenahme wurde das Spülvolumen aus der ersten Spritze in den Reaktor zurückgegeben.

Alle vorherig erläuterten Versuchsparameter sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Versuchsparameter des Substratscreenings.

Schlammbelastung $CSB_{hom,0}$/$oTR_{Faulschlamm}$	3 g/g
Start-CSB Verdünnungsansatz 1	So hoch wie möglich
Start-CSB Verdünnungsansatz 2	2 g/L
Temperatur	37 °C
pH-Wert	< 6
Nährstoffverhältnis CSB:NH_4-N:PO_4-P	100 : 6 : 1 (massenbezogen)
Versuchsdauer	16 d

3.2 Selektion

3.2.1 Ziele

Eine wichtige Fragestellung in der PHA-Forschung ist die Klärung welche Belebtschlämme prinzipiell zur PHA-Produktion geeignet sind. Ziele der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen waren daher zum einen Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob eine prinzipielle Eignung zur PHA-Produktion besteht, und zum anderen wie lange die jeweiligen Schlämme einer Selektion unterzogen werden müssen, um hohe PHA-Erträge liefern zu können. Weiterhin wurde gezielt die Entwicklung der Bakterienpopulation untersucht, was Erkenntnisse darüber liefern soll, ob sich bestimmte Bakteriengruppen zu verschiedenen Zeitpunkten etablieren und wie dies mit der PHA-Produktivität zusammenhängt. Außerdem können hierbei Informationen über wichtige PHA-produzierende Bakteriengruppen gewonnen werden, welche möglicherweise in verschiedenen Belebtschlämmen vorhanden sind. Die Ergebnisse könnten dazu verwendet werden einen geeigneten Impfschlamm auszuwählen bzw. die Selektionsstrategien an den jeweiligen Impfschlamm anzupassen.

3.2.2 Versuchsbeschreibung

Zur Bearbeitung der o.g. Fragestellungen wurden Überschussschlämme von drei Kläranlagen mit unterschiedlichen Reinigungsverfahren als Inokula für die Selektion ausgewählt. Im ersten Versuchsblock wurde Überschussschlamm der kommunalen Kläranlage Kaiserslautern verwendet. Die Kläranlage Kaiserslautern verfügt über drei Belebungsstraßen, in denen einzelne Kammern zur Stickstoffelimination wahlweise alternierend und intermittierend belüftet werden. Die Phosphorelemination findet als Simultanfällung in der Belebung statt. Der Überschussschlamm für den zweiten Versuchsblock stammte aus der kommunalen Kläranlage Buchholz in Bruchmülbach-Miesau. Die Anlage wird als simultane aerobe Schlammstabilisierung ohne Vorklärung betrieben und verfügt über eine biologische Phosphorelimination. Der dritte Überschussschlamm stammte aus einer Brauerei, die ihr Abwasser zunächst anaerob vorbehandelt und anschließend nach einer aeroben Nachbehandlung in einem SBR direkt einleitet. Somit konnten drei Überschussschlämme, die aus Anlagen mit verschiedenen Verfahrensweisen stammten, miteinander verglichen werden.

Das Probenahmeprotokoll sah vor, die Bakterienpopulation wöchentlich zu untersuchen und dazugehörig jeweils eine PHA-Akkumulation durchzuführen, um die Entwicklung in der Population mit den PHA-Gehalten nach der Akkumulation korrelieren zu können. Weiterhin wurden Proben zur Ammonium-, Phosphat- und VFA-Bestimmung zu bestimmten Zeiten entnommen. Die Versuche fanden für jeden Schlamm in einem Dreifachansatz satt, was bedeutet, dass auch die wöchentlichen Akkumulationen ebenfalls dreifach stattfinden. Jeder Ansatz wurde über eine Dauer von 50 Tagen betrieben.

Der Ablauf eines Tages in der Selektion ist in Abbildung 4 dargestellt. Für den Betrieb wurde eine Zyklusdauer von 12 h in Kombination mit einer Schlammaufenthaltszeit von 4 Tagen gewählt. Der Begriff Zyklusdauer bezieht sich darauf, dass alle 12 h ein neuer Feed stattfindet. Einmal täglich wurde eine Sedimentationsphase vor den Abpumpprozess geschaltet, um ein Auswaschen der Biomasse zu verhindern und das Schlammalter konstant zu halten. Bei dem ersten Versuchsblock kam es jedoch aufgrund eines Programmfehlers bei der Regelung der Sedimentationsphase zu einem Auswaschen der Biomasse. Nach einer einwöchigen Bilanzierungsphase der Feststoffe konnte festgestellt werden, dass sich das Schlammalter gegen Ende des Versuches auf ca. 2 Tage verringert hatte. Daraufhin wurde die Sedimentationsphase von ursprünglich 30 min auf 45 min erhöht und es wurden verschiedene Anpassungen an den Reaktoren durchgeführt, um ein Auswaschen der Biomasse möglichst zu vermeiden.

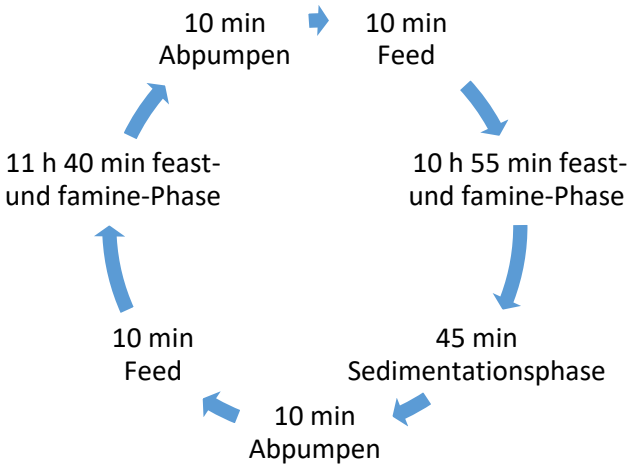
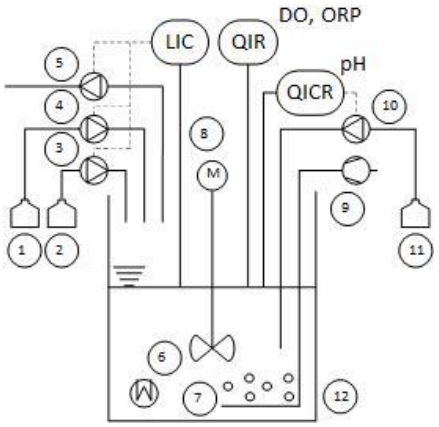


Abbildung 4: Tagesablauf des Selektionsbetriebs.

Um so gezielt wie möglich den Einfluss der Herkunft des Überschlussschlamms untersuchen zu können, wurden möglichst viele Einflussfaktoren geregelt bzw. aktiv eingestellt. Alle Überschussschlämme wurden zu Beginn der Versuche auf einen gleichen Feststoffgehalt von ca. 0,5 % verdünnt. Der pH-Wert wurde auf einen Wert von 7 und die Temperatur auf ca. 21 °C geregelt. Das Substrat bestand bei allen drei Versuchsblöcken aus einer Mischung von Essig- und Propionsäure im molaren Verhältnis von 1:1 sowie einem definierten C : N : P-Verhältnis von 100 : 5 : 1 durch Zugabe von NH_4Cl und K_2HPO_4. Außerdem wurden Mikronährstoffe in Konzentrationen nach Smolders et al. (1994) zugegeben. Die Mikronährstofflösung bestand pro L aus 1,5 g $FeCl_3$*$6H_2O$, 0,15 g H_3BO_3, 0,03 g $CuSO_4$*$5H_2O$, 0,018 g KI, 0,12 g MnC_{12} *$4H_2O$, 0,06 g Na_2MoO_4 * $2H_2O$, 0,12 g $ZnSO_4$*$7H_2O$, 0,15 g CoC_{12}*$6H_2O$ und 10 g EDTA. Der Feed wurde nach dem Ansetzten auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

Abbildung 5 zeigt den Versuchsaufbau, der für die Selektions- und Akkumulationsversuche verwendet wurde. Die Anlage bestand aus 6 Reaktoren von denen 3 für Parallelansätze der Selektion dienten und mit einem Reaktionsvolumen von 10 L betrieben wurden. Die weiteren 3 Reaktoren wurden für die jeweils dazugehörenden PHA-Akkumulationen verwendet. Die Entnahme und Neubeschickung in der Selektion wurde über die Messung des Füllstands (AquaBar (II) Druck-Einhängesonde, Fa. Nivus) vorgenommen. Am Ende des Zyklus wurde das Volumen auf 7,5 L abgepumpt und anschließend zunächst der VFA-Feed aus eine Stammlösung dosiert und bis zum Erreichen des Endfüllstands (entsprechend 10 L) Verdünnungswasser ergänzt. Die Steuerung der in Abbildung 5 dargestellten Pumpen (OEM-Schlauchpumpe M500, Fa. Verder) erfolgte über ein LabView-basiertes Prozessleitsystem. Für die Akkumulation waren keine Pumpen für das Verdünnungswasser oder zum Abpumpen nötig, der Feed wurde nur über eine Pumpe zugegeben.

Einmal pro Woche wurde der abgepumpte Überschussschlamm für eine Akkumulation verwendet. Durch Verdunstungsverluste und das Probenvolumen, dass zur Analytik nötig war, lag das Startvolumen der Akkumulation bei 1,5-2 L.



(1) VFA-Substrat
(2) Verdünnungswasser
(3) Substratdosierpumpe
(4) Verdünnungswasser-pumpe
(5) Abpumppumpe
(6) Heizstab
(7) Belüfterstein
(8) Überkopfrührer
(9) Hausdruckluft
(10) Säuredosierpumpe
(11) HCl, 1 M
(12) Kunststoffeimer

Abbildung 5: Versuchsaufbau zur Selektion und PHA-Akkumulation.

In allen Reaktoren waren pH- (SL 82-120 pHT VP, Fa. Xylem) und Sauerstoffsonden (MF39VP; Fa. Xylem) installiert. Weiterhin gab es eine einzelne Redox-Sonde (SL 89-120 Pt, Fa. Xylem), die wahlweise bei der Selektion oder der Akkumulation zum Einsatz kam. Alle Sonden waren zum Schutz in Taucharmaturen (UTVA324, Fa. Xylem) montiert. Über das Prozessleitsystem wurden alle Messdaten online aufgezeichnet, sowie die pH-Wert geregelt.

Zur Sauerstoffversorgung wurde ein Hausdruckluftanschluss verwendet, von dem die Luft über ein Ringsystem zu den Reaktoren weitergeleitet wurde. Der Vordruck in der Ringleitung lag bei etwa 1 bar und an den Reaktoren bei 0,1 bar. Als Diffusoren wurden Edelstahl-Würzebelüftersteine verwendet, die 1-mal pro Woche gereinigt wurden. Da eine Durchmischung durch die Belüfter nicht ausreichte, fand zusätzlich eine kontinuierliche Durchmischung durch einen Überkopfrührer (RZR 1, Fa. Heidolph) statt.

3.3 PHA-Produktion

3.3.1 Ziele

Ziel dieser Versuche war es, den Einfluss der VFA-Zusammensetzung und der Raumbelastung in der Akkumulation auf die PHA-Produktion und -Zusammensetzung zu untersuchen.

3.3.2 Versuchsbeschreibung

Für diese Versuche wurden mit dem Überschussschlamm aus den laufenden Versuchen zur Selektion zusätzliche Akkumulationen mit verschiedenen VFA-Zusammensetzungen durchgeführt. Das Substrat wurde zunächst synthetisch ohne Nährstoffzugabe hergestellt. Um die Ergebnisse aus den Versäuerungsuntersuchungen mit den weiteren Prozessstufen zusammenzuführen und damit weitere Schritte hin zum Schließen der Verfahrenskette zu gehen, wurden die VFA-Zusammensetzungen anhand der Ergebnisse des Substratscreenings ausgewählt. Die Abwässer aus der Kartoffelverarbeitung und der Brauerei wiesen im Screening die höchsten VFA-Ausbeuten auf (55 % und 67 %) und wurden daher ausgewählt. Da das Brauereiabwasser die höchste VFA-Ausbeute zeigte, wurde hierbei ein weiterer Schritt in Richtung Schließen der Verfahrenskette gegangen. Für die zusätzlichen Akkumulationen wurde erneut Brauereiabwasser versäuert, um damit die Akkumulationen sowohl mit realen als auch mit synthetischem Substrat durchführen zu können. Damit ist es möglich neben dem Einfluss der VFA-Zusammensetzung zusätzlich den Einfluss der weiteren Inhaltstoffe des realen Abwassers auf die PHA-Produktion untersuchen zu können. Alle Versuche wurden mit zwei verschiedenen Raumbelastungen während der PHA-Akkumulationen durchgeführt.

3.4 Kopplung der Verfahrensstufen

3.4.1 Ziele

Für einen realen Betrieb des PHA-Produktionsprozesses ist es wichtig, dass auch bei Schwankungen des Kohlenstoffgehalts der Abwasserströme und unter Nährstoffmangel eine stabile Selektion und PHA-Akkumulation möglich sind und bei Bedarf Strategien zum Erhalt der Prozessstabilität anzuwenden. Der Kohlenstoffgehalt beeinflusst dabei die erzielbare VFA-Konzentration in der Versäuerung und damit den Bereich der möglichen VFA-Raumbelastung in der Selektionsstufe. In diesem Versuchsblock wurden zunächst mit synthetischen VFA verschiedene Raumbelastungen getestet, um den möglichen Schwankungsbereich der Raumbelastung einzugrenzen. In einem letzten Schritt zur Schließung der Prozesskette wurde reales Abwasser versäuert und sowohl für die Selektion als auch für die Akkumulation verwendet. Hierbei wurde untersucht, ob der Selektionsbetrieb auch unter Nährstoffmangel möglich ist bei gleichzeitiger Schwankung der Raumbelastung.

3.4.2 Versuchsbeschreibung

Ausgehend von den Ergebnissen der vorgehenden Versuchsblöcke wurde für diese Versuche Brauereiabwasser als interessantestes Abwasser ausgewählt. Im ersten Teil der Versuche wurde die Schwankungsbreite der Raumbelastung mit synthetischem Substrat untersucht. Die VFA-Zusammensetzung war dieselbe wie für die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Versuche. Die Versäuerungen aus Vorversuchen, Abschnitt 3.1 und 3.3, erzielten VFA-Konzentrationen lagen im Bereich von 1-4 g/L. Mit einer festgelegten hydraulischen Verweildauer von 2 d ergibt sich daraus ein Bereich der VFA-Raumbelastung von 0,5-2 g/(L d). Für diesen Versuchsteil wurden daher drei Selektionsdurchläufe mit 0,5 g/(L d), 1 g/(L d)und 2 g/(L d) und wöchentlichen Akkumulationen durchgeführt. Der Ablauf entspricht prinzipiell der Vorgehensweis beschrieben in den Abschnitten 3.1 und 3.3. Die Selektionsdauer wurde allerdings auf 2 Wochen verkürzt, da sich in den vorhergehenden Versuchen herausstellte, dass bereits nach dieser Zeit ein Plateau im PHA-Gehalt erreicht wurde.

Im zweiten Teil dieses Versuchsblocks wurde versäuertes Brauereiabwasser zur Selektion und Akkumulation verwendet. Abweichend von den bisherigen Versuchen wurde dabei nicht die Raumbelastung konstant gewählt, sondern das zugeführte Volumen. Dadurch wurde ein realer Betrieb angenähert bei dem durch wechselnde Kohlenstoffgehalte im Abwasser Schwankungen der VFA-Konzentration zu erwarten sind und dabei keine größeren Misch- und Ausgleichskapazitäten für die VFA vorhanden sind. Ebenfalls wurde keine pH-Regelung verwendet, um zu überprüfen, ob in einem realen Betrieb die Prozesskosten dafür eingespart werden können und trotzdem eine PHA-Produktion möglich ist.
Das verwendete Brauereiabwasser wies im Vergleich zu den bisher verwendeten Nährstoffverhältnissen deutliche Mängel für N und P auf was sich negativ auf das Biomassewachstum auswirken könnte. Eine externe Nährstoffzugabe würde dagegen mehr Kosten bedeuten. Daher wurde in einem Selektionsdurchlauf auf die Zugabe von Nährstoffen verzichtet und in einem weiteren Durchlauf Nährstoffe zugegeben, um eine Gegenüberstellung der beiden Varianten zu ermöglichen. Die Nährstoffzugabe erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben.

3.5 Analytik

Im Folgenden werden die Analysenmethoden aller Parameter beschrieben. Für das Substratscreening im Arbeitsschritt 2 war es zunächst wichtig die bisher unbekannten Abwässer eingehend zu analysieren. Daher kamen in diesem Schritt vor allem DIN-Methoden zur Anwendung. In den Arbeitsschritten 3 und 4 richtete sich der Fokus vor allem auf die PHA-Produktion, daher wurden zur Vereinfachung die Messungen für einige Parameter mit Hach-Küvettentests durchgeführt. Fortlaufende institutsinterne Qualitätskontrollen bestätigen, dass eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden gegeben ist.

3.5.1 Probenvorbereitung zur Analyse von gelösten Parametern

Zur Probenvorbereitung aller gelösten Parameter fand eine dreistufige Feststoffabtrennung statt. Im ersten Schritt wurden die Proben bei 3.500-4.000 g für 10 min zentrifugiert (Varifuge 3.0, Fa. Heraeus, oder Sorvall LYNX 6000, Fa. Thermo Fischer). Im zweiten Schritt wurde der Überstand nach der Zentrifugation mit einem Faltenfilter vorfiltriert (595 ½, D = 185 mm, Fa. Whatman). Im dritten Schritt wurde das Filtrat durch Spritzenvorsatzfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm final filtriert (Minisart, regenerierte Cellulose, D = 25 mm, Fa. Sartorius).

Sofern nicht anders in den folgenden Unterkapiteln beschrieben, wurden die Analysen direkt im Anschluss an die Probenvorbereitung durchgeführt.

3.5.2 Chemischer Sauerstoffbedarf

Der homogenisierte chemische Sauerstoffbedarf (CSB_{hom}) diente im Substratscreening des Arbeitsschritts 2, als Bezugsgröße zur Berechnung der VFA-Ausbeute, daher wurde er in diesem Schritt nach DIN 38409 -Teil 41-1 ermittelt. Bei den Versäuerungsversuchen, die zur Substratproduktion für die Arbeitsschritte 4 und 5 dienten, wurde der CSB_{hom} mit Hach-Küvettentests durchgeführt (LCK 514 oder 014). Der gelöste CSB (CSB_{gel}) wurde in allen Arbeitsschritten mit den genannten Küvettentests bestimmt.

3.5.3 Organischer Stickstoff

Zu einer ersten Charakterisierung der untersuchten Abwässer und zur Abschätzung des Eiweißgehalts im Substratscreening, wurde der organische Stickstoff (N_{org}) in Anlehnung an DIN EN 25663 bestimmt. Die genannte Norm beschreibt zwar die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, also die Summe aus organischem Stickstoff und Ammoniumstickstoff, aber durch ein vorheriges Austreiben des Ammoniums aus den Proben, kann damit gezielt N_{org} gemessen werden.

3.5.4 Ammonium

Zur Einschätzung des biologisch verfügbaren Stickstoffs in den verschiedenen Prozessstufen wurde der Ammonium-Stickstoff (NH_4-N) ermittelt. Für das Substratscreening erfolgte die Bestimmung nach DIN 38406 E5-1, für die weiteren Arbeitsschritte wurden Hach-Küvettentests (LCK 303 oder 304) verwendet.

3.5.5 Phosphat

Analog zur NH_4-N-Bestimmung diente die Ermittlung des Phosphat-Phosphors (PO_4-P) zur Einschätzung des biologisch verfügbaren Phosphors. Im Substratscreening fand die Norm DIN EN 6878 Anwendung. Für die weiteren Arbeitsschritte wurden Hach-Küvettentests (LCK 349 oder 350) verwendet.

3.5.6 Trockenrückstand und organischer Trockenrückstand

Der Trockenrückstand (TR) wurde nach DIN EN 15934 und der Glühverlust (GV) des Trockenrückstands nach DIN EN 15935 bestimmt. Aus Formel Formel (3-1) berechnet sich der organische Trockenrückstand (oTR).

Formel (3-1) $oTR = GV \cdot TR$

3.5.7 Abfiltrierbare Stoffe und Glühverlust der abfiltrierbaren Stoffe

Die abfiltrierbaren Stoffe und der Glühverlust der abfiltrierbaren Stoffe wurden in den Arbeitsschritten 3 und 4 in den Selektions- und Akkumulationsreaktoren mindestens wöchentlich bestimmt, um die Entwicklung des Biomassegehalts in den Reaktoren beurteilen können. Zusätzlich wurden die beiden Parameter im Arbeitsschritt 5, am Anfang und am Ende jeder Akkumulation ermittelt, um eine Bilanzierung der PHA-Produktion durchführen zu können. Die Bestimmung der abfiltrierbaren Stoffe und des Glühverlusts der abfiltrierbaren Stoffe erfolgten nach DIN 38 409- H 2-2 (Bestimmung mittels Papierfilter). Als Filterpapier wurden Schwarzbandfilter (589/1, D = 100 mm) der Firma Whatman verwendet.

3.5.8 Organische Säuren

Die organischen Säuren (VFA) wurden mittels Ionenchromatographie bestimmt (930 Compact IC Flex mit Kationenaustauschsäule Metrosep Organic Acids – 250/7.8, Fa. Metrohm). Die Proben wurden auf Ameisen-, Milch-, Essig-, Propion-, Butter-, iso-Butter, Valerian-, iso-Valerian- und Capronsäure hin untersucht. Zur Ermittlung des Gesamtsäurenkonzentration wurde die Konzentration der Einzelsäuren in CSB umgerechnet und aufsummiert.

3.5.9 PHA

3.5.9.1 Methodenentwicklung

Zur Untersuchung des Gehaltes des in den Arbeitsschritten 3 und 4 produzierten Polymers und der Polymerzusammensetzung musste zunächst das Probenahme- und Analytikprotokoll ausgearbeitet werden, da eine Messung dieser Parameter nicht, wie zu Beginn angenommen, extern durchgeführt werden konnte und sich zudem bei der Probenaufbereitung anfangs zunächst einige Schwierigkeiten ergaben. Bei Trocknung der Biomasse im Trockenschrank bei einer Temperatur von 105 °C wurde diese zu einer sehr festen Substanz, mit der keine PHA-Extraktion oder Analyse durchgeführt werden konnte. Daher wurden verschiedene weitere Trocknungstemperaturen (50 °C, 60 °C, 70 °C) getestet, doch das Ergebnis war bei allen ähnlich. Die feste Biomasse konnte ebenfalls mithilfe einer Kugelmühle nicht ausreichend zerkleinert werden. Allerdings resultierte das Mahlen der Proben von Hand mit einem Mörser in einem Pulver, das fein genug für die Analyse war. Hierbei zeigten sich Unterschiede in den Mahl-Eigenschaften der Proben, die bei verschiedenen Temperaturen getrocknet wurden. So waren die bei niedrigeren Temperaturen getrockneten Proben poröser und ließen sich besser zerkleinern. Jedoch ergaben externe Tests der Zerkleinerung mit einer Cryo-Mühle, dass eine verbesserte Extraktion und Analyse möglich sind, je feiner das Material ist. Aufgrund der beschriebenen Probleme mit der Konsistenz der getrockneten Biomasseproben, mit denen eine PHA-Extraktion und -Analyse in dieser Form nur schwer möglich war, erfolgten Tests verschiedener Aufbereitungsmöglichkeiten. Hierfür wurden Biomasseproben bei 80°C, 105 °C und mittels Gefriertrocknung getrocknet. Die bei Hitze getrockneten Proben hatten eine sehr feste, klumpige Konsistenz und wurden zur Analyse per Mörser von Hand klein gemahlen. Nach Trocknung in der Gefriertrocknungsanlage war die Struktur der Biomasseproben ohne Zerkleinerung ein feines Pulver, welches direkt analysiert werden konnte. Die Analysen zeigten außerdem, dass in den gefriergetrockneten Proben ein höherer PHA-Gehalt gemessen werden konnte (Tabelle 3). Dies könnte das Resultat einer verbesserten Extraktion sein, da

die gefriergetrockneten Proben homogener und feiner waren und somit möglicherweise eine größere Extraktionsoberfläche hatten. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Proben für die PHA-Analytik nach der Entnahme aus dem Reaktor angesäuert, mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

Tabelle 3: PHA-Messungen verschiedener Probenaufbereitungsmethoden. GT = Gefriertrocknung.

Datum	Trocknung	Probe	PHA in % TR
19.05.2020	105 °C	1	3,00
		2	3,40
	GT	1	8,30
		2	5,70
26.05.2020	105 °C	1	19,80
		2	19,40
	GT	1	25,20
		2	23,60
03.06.2020	80 °C	1	16,43
	105 °C	1	14,53
		2	13,00
		3	13,00
	GT	1	34,29
		2	33,70
		3	38,10

Da keine dauerhafte Möglichkeit zur externen Messung der PHA-Proben gefunden werden konnte, wurde die Analytik im eigenen Labor an der Universität aufgebaut. Hierfür musste zunächst ein Gaschromatograph beschafft werden. Dabei kam es situationsbedingt zu Lieferverzögerungen und zu einer erheblichen Wartezeit auf einen Termin zum Aufbau und zur Inbetriebnahme des Gerätes. Nach Abschluss der Inbetriebnahme konnte die Entwicklung der Messmethode begonnen werden. Hierfür erfolgten zunächst einige Tests zur Eignung verschiedener Säulen und Temperatur- bzw. Messprogramme für die Messung der zu analysierenden Proben und der in der Analytik verwendeten Chemikalien. Daraufhin wurde mit der Messung von Standards und Vergleichsproben begonnen, um die gesamte Probenvorbereitung und analytische Methode zu validieren. Vor einer gaschromatographischen Messung müssen die getrockneten Biomasse-Proben zunächst chemisch aufgeschlossen und das in den Zellen enthaltene PHA in seine Monomere aufgespalten werden. An den Aufschluss anschließend werden die Monomere zu Estern umgesetzt und anschließend mittels eines Lösemittels von den Biomasseresten abgetrennt. Für diese Methode wurde das Protokoll nach (Braunegg et al. 1978) verwendet. Bei der Aufbereitung von PHA-Standards und Vergleichsproben nach diesem Prinzip mit anschließender Messung, zeigte sich, dass mit dem verwendeten Protokoll nur ca. 54 % der PHA-Menge der Standards und 53-64 % des zu erwartenden PHA-Gehaltes von extern analysierten Vergleichsproben wiedergefunden wurden. Daher wurden Anpassungen an dem Aufbereitungsprotokoll vorgenommen und getestet, um den Verlust des PHAs zu minimieren. So wurden zunächst unterschiedliche Probe- und Lösemittelmengen verwendet und anschließend auf 5 mg Probe und 1 ml Lösemittel festgelegt. Außerdem wurde die Reaktionszeit des Aufschlusses von 4 auf 6 Stunden verlängert. Zudem wurde zur Verbesserung der Phasentrennung bei der Aufbereitung statt Wasser, eine 1 molare Salzlösung verwendet, um zu vermeiden, dass Teile des Polymers in die wässrige Phase übergehen. Mithilfe dieser Anpassungen konnten zwischen 56 und 100 % des PHAs aus den Vergleichsproben gemessen werden. Jedoch wurde bei den PHA-Standards nur maximal 53 % des Polymers wiedergefunden. Eine weitere Verlängerung der Reaktionszeit auf 10 h führte wiederum zu niedrigeren Ergebnissen von ca. 46-58 % des erwarteten PHA-Wertes in den Vergleichsproben und 35 % in der Standard-Probe. Des Weiteren wurde eine Kalibrierung mittels eines internen Standards

durchgeführt. Dieser wird in der Standardreihe jeder Probe hinzugegeben und die Kalibrierung erfolgt anhand des Signalverhältnisses beider Stoffe. Mithilfe dieser Methode ist es möglich systematische Fehler und Verluste durch eine vorherige Probenaufbereitung auszugleichen. Allen zu analysierenden Proben wird der interne Standard zur Ermittlung der Analytkonzentration ebenfalls hinzugegeben. Den vorherigen gemessenen Proben wurde dieser interne Standard zur Überprüfung der Stabilität der Messung, ebenfalls bereits hinzugegeben, sodass eine rückwirkende Berechnung mithilfe dieser Methode möglich war. Dies führte zu besseren Ergebnissen und es konnten maximal 75 % des PHAs in den Standardproben ermittelt werden. Bei einer darauffolgenden erneuten Testmessung konnten mit dieser Methode 67 % des Standards gemessen werden. Abschließend wurde eine Kalibrierung mittels eines PHB-PHV-Polymerstandards unter Zugabe von Benzoesäure als internem Standard vorgenommen. Hierdurch können systematische Fehler innerhalb der Aufbereitung währen der Kalibrierung mitberücksichtigt werden. Mithilfe des angepassten Protokolls und der durchgeführten Kalibriermethode konnten bei Messungen des Standards und der Vergleichsproben die erwarteten Werte von 90 bis 100 % erzielt werden.

3.5.9.2 Messprotokoll

Die PHA-Gehalte sowie die Polymerzusammensetzung in den Arbeitspaketen 3 und 4 wurden nach einem angepassten Protokoll in Anlehnung an die Methode nach Braunegg et al. (1978) bestimmt (s. 3.5.9.1). Zunächst wurden alle Proben vor der PHA-Analytik nach der Entnahme aus dem Reaktor mit Schwefelsäure (95-97 %, EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), angesäuert, mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet (VaCo 5, ZIRBUS technology GmbH, Bad Grund, Deutschland). Daraufhin wurden jeweils ca. 5 mg der gefriergetrockneten Proben eingewogen und mit 1 ml einer Methanol-Lösung (LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 5% Schwefelsäure, 0,8 ml Chloroform (>99 %, Fisher Scientific, Loughborough, England, UK) und 0,2 ml eines Benzöesäurestandards (99,5 %, Acros Organics, Geel, Belgien) in Chloroform (5 mg/ml) versetzt. Die Analytik erfolgte jeweils in einem Doppelansatz. Anschließend wurden die Proben in einem Heiz-Thermoschüttler (MHR 23, Fa. Hettich) 6 h bei 100 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 450 rpm aufgeschlossen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde jeweils 1 ml 1%-ige NaCl-Lösung (>99,5 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; in Reinstwasser) hinzugegeben und die Proben wurden zur Förderung einer Phasentrennung zunächst geschüttelt und anschließend bei 4500 g für 5 min (SORWALL LYNX 600 380/400 V, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) zentrifugiert. Daraufhin erfolgte eine Extraktion der unteren Lösemittelphase mittels 1 ml-Spritze. Diese wurde abschließend über einen Gaschromatographen gemessen. Hierfür wurde ein GC-FID-Gerät der Ausführung Agilent 8860 (Agilent Technologies™, Santa Clara, Kalifornien, USA) mit einer HP 5-Säule (30 m x 0,32 mm, 0,25 µm) bei einer Flow-Rate von 20 ml/min Helium, einem Injektionsvolumen von 0,5 µl, einem Split-Verhältnis von 1:50 und einer Detektortemperatur von 250 °C mit einer Aufheizrate von 10 °C/min nach einer anfänglichen Temperaturhaltephase von 60 °C über 4 min verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibrierung mittels PHBV-Standard (Poly(3-hydroxybutyric aicd-co-3-hydroxyvaleric acid), 8 % PHV-Gehalt, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) und internem Benzoesäurestandard (s.o.).

3.5.10 DNA

Zur Validierung der molekularen Methode der DNA-Analytik wurden in einem Vorversuch über einen Zeitraum von vier Wochen einmal wöchentlich jeweils drei Proben aus zwei Selektionsreaktoren entnommen und zur Konservierung der DNA umgehend und ohne Vorbehandlung bei -20 °C eingefroren. Diese Voruntersuchung wurde aufgrund der Komplexität der Probenmatrix zunächst durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine weitere Aufbereitung und Konservierung der Proben nötig sind, sich das gewählt Kit zur Extraktion der DNA eignet und ob hiermit eine ausreichende Menge und Qualität der DNA für eine erfolgreiche Sequenzierung gewährleistet werden kann. Zunächst wurden

die Proben aufgetaut, zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Daraufhin erfolge eine Extraktion der DNA aus den Proben mittels DNeasy Power Soil Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Hierzu wurde statt der vom Hersteller angegebenen 0,25 g jeweils 1 ml der Biomasse in die Extraktionsgefäße eingesetzt und anschließend das Herstellerprotokoll ohne weitere Änderungen verfolgt. Nach Überprüfen der Qualität und Menge der extrahierten DNA mittels Nanodropmessung (Nanodrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) wurde eine PCR-Amplifizierung der V3-V4-Region der bakteriellen 16S rDNA mithilfe der Primer 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') und 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al. 2011) durchgeführt. Der PCR-Ansatz bestand aus 10 µl GC-Puffer, 2 µl BSA, 1 µl DNTPs, 0,5 µl Phusion (New England Biolabs® GMbH, Frankfurt am Main, Deutschland), jeweils 1 µl Forward- und Reverse-Primer, 34 µl sterilem Reinstwasser (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) und 0,5 µl DNA pro Probe. Die Programmeinstellungen zur Amplifizierung waren wie folgt: 98 °C für 30 s zur Aktivierung der Polymerase, gefolgt von 27 Zyklen mit 98 °C für 10 s, 62 °C für 30 s, 72 °C für 30 s, und einer abschließenden 5-minütigen Phase bei 72 °C. Die ordnungsgemäße und selektive Amplifizierung der richtigen DNA-Region wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Die amplifizierten Sequenzen wurden anschließend zur Sequenzierung via Illumina MiSeq Plattform (Illumina, Inc., San Diego, Kalifornien, USA) in ein externes Labor eingeschickt. Die beschriebene eigens durchgeführte PCR-Amplifizierung in Labor einer Biologie-Abteilung an der Universität wurde lediglich für die Proben zur Voruntersuchung durchgeführt. Alle weiteren Proben wurden wie oben beschrieben vorbereitet und extrahiert und direkt nach der DNA-Extraktion und Qualitätskontrolle an das qualifizierte externe Labor versendet, welches in diesem Fall sowohl die PCR als auch die Sequenzierung der Proben übernahm. Nach erfolgter Qualitätskontrolle der Rohsequenzen und bioinformatischer Auswertung über den DADA2-Workflow (Callahan et al. 2016) erfolgte eine taxonomische Zuordnung der ASVs („amplicon sequence variants") anhand der Greengenes-Datenbank (DeSantis et al. 2006).

3.6 Berechnungen

3.6.1 VFA-Ausbeute

Im Rahmen des Projekts wurde der Fokus auf die erzielbare Versäuerbarkeit der verschiedenen Abwässer in Abhängigkeit ihrer Zusammensetzung und nicht in Abhängigkeit verschiedener Prozessvarianten untersucht. Bei der Berechnung der VFA-Ausbeute (Y_{VFA}) wurde die erzielte VFA-Konzentration am Ende der Versuche in CSB umgerechnet ($CSB_{VFA,End}$) und durch den CSB_{hom} des jeweiligen Abwassers beim Start ($CSB_{hom,0}$) der Versuche dividiert (s. Formel (3-2)). Manche Abwässer wiesen bereits direkt nach der Abholung bei den Firmen VFA auf. Durch die substratspezifische Betrachtungsweise wurden die bereits vorhandenen VFA mit in die Berechnung einbezogen.

Formel (3-2) $Y_{VFA} = CSB_{VFA,End}/CSB_{hom,0}$

3.6.2 PHA-Gehalt

Ein weiterer Fokus des Projektes lag auf der möglichen PHA-Produktion, welche zur Prozessbeurteilung betrachtet wurde. Der Gehalt an PHA in der Biomasse nach den Prozessschritten der Selektion und der Akkumulation wurde daher ermittelt, indem die mittels GC gemessene Masse an PHA in den Proben prozentual auf die eingewogene Masse an Biomasse bezogen wurde bzw. unter Berücksichtigung des Glühverlusts auf die organische Trockenmasse.

3.6.3 DNA

Die relativen Abundanzen wurden aus der Anzahl der sequenzierten DNA-Sequenzen („reads") für das jeweilige taxonomisch zugeordnete ASV in Relation zur gesamten read-Anzahl berechnet. Des Weiteren wurde eine Literaturrecherche zu allen bekannten PHA-produzierenden Organismen durchgeführt und hiermit eine Liste zum weiteren Abgleich der in den Versuchen gefundenen Taxa

erstellt. Hieraus konnte der Anteil an Sequenzen von PHA- und nicht-PHA-Produzenten an der Sequenz-Anzahl der betrachteten taxonomischen Gruppe ermittelt werden. Eine taxonomische Zuordnung der ASVs konnte nicht in jedem Fall bis auf die betrachtete Ebene (z.B. Gattung) durchgeführt werden, daher erfolgt in diesen Fällen eine Angabe der letzten möglichen zuordenbaren Ebene mit der vorangehenden Bezeichnung „unassigned“. Bei den Ergebnissen der Taxonomie wurde sich für eine bessere Übersichtlichkeit auf eine Darstellung der über alle betrachteten Proben 40 abundantesten Taxa beschränkt. Alle weiteren Taxa wurden in den Abbildungen als „other prokaryotes“ zusammengefasst.

3.6.4 Zusammensetzung PHA und VFA

Zur Beurteilung der molaren Zusammensetzung der verwendeten Substrate und des produzierten Polymers in Arbeitsschritt 4 wurden zunächst die Stoffmengen der einzelnen organischen Säuren sowie der Monomere berechnet. Anschließend wurden diese durch Multiplikation mit der Anzahl an Kohlenstoffatomen in der jeweiligen Säure oder dem Monomer in eine Kohlenstoff-Stoffmenge umgerechnet. Abschließend wurde der C-molare Anteil der Einzelsäuren bzw. der Monomere an den gesamten organischen Säuren oder dem Polymer ermittelt.

3.6.5 Statistische Auswertungen

Bei der Betrachtung von Zusammenhängen zwischen dem PHA-Gehalt mit der Länge der feast-Phase bzw. der relativen Abundanz an Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion erfolgten Analysen mittels Spearman-Rank-Korrelation über das Programm RStudio (Version 4.1.0, RStudio Team, Boston, Massachusetts, USA). Die Berechnung der alpha-Diversität (Artenreichtum, Diversitätsindices) sowie ein multivariates statistisches Auswertungsverfahren, NMDS (nichtmetrische multidimensionale Skalierung), bei der Analyse der biologischen Daten wurden ebenfalls über das Programm RStudio durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Versäuerung

4.1.1 Substratscreening

4.1.1.1 Abwassercharakterisierung

Tabelle 4 fasst die Analyseergebnisse der Rohabwässer nach Abholung aus den Firmen für eine erste Einschätzung zur Eignung der Abwässer zusammen. Es sei einleitend darauf hingewiesen, dass es sich jeweils nur um Stichproben handelt. Der Probenahmezeitpunkt wurde, soweit es möglich war, mit dem Betriebspersonal abgestimmt, so dass eine weitgehend repräsentative Probe genommen werden konnte. Durch Änderungen im Produktionsablauf waren allerdings kurzfristig auftretende Schwankungen nicht auszuschließen. Lediglich die Brauerei verfügte über einen Misch- und Ausgleichsbehälter, weshalb hierbei von einer relativ gleichbleibenden Abwasserzusammensetzung auszugehen ist. Aus den möglichen Schwankungen der CSB-Konzentrationen folgt, dass es zu Schwankungen der VFA-Konzentrationen kommt. Daraus ergibt sich der Untersuchungsschwerpunkt welche Schwankungsbreite der VFA-Raumbelastung für die Selektionsstufe geeignet ist. Dieser Punkt ist Teil des Arbeitspakets 5 „Kopplung der Verfahrensstufen“.

Für das Arbeitspaket 5 wurden VFA-Raumbelastungen in der Selektionsstufe von (0,5-2) g/(L d) gewählt. Bei einer hydraulischen Aufenthaltszeit von 2 Tagen liegt die Mindestkonzentration des VFA-Substrats damit bei 1 g/L. Der CSB_{hom} der Abwässer aus der Kartoffelverarbeitung, der Brauerei und der Molkerei war hoch genug, dass bereits bei einer VFA-Ausbeute von 10 % (Kartoffelverarbeitung) bis 26 % (Molkerei) die Mindestkonzentration erreicht werden kann. Das Abwasser aus der Pizzaproduktion wies mit einem CSB_{hom} von 1,2 g/L eine vergleichsweise niedrige Konzentration auf. Bei diesem Abwasser würde die Mindestkonzentration erst bei einer VFA-Ausbeute von 85 % erreicht. Da direkt nach der Abholung bereits 27 % des CSB_{hom} als VFA vorlagen und damit am meisten im Vergleich zu den anderen Abwässern, ist eine prinzipielle Eignung zur PHA-Produktion jedoch nicht ausgeschlossen.

*Tabelle 4: Zusammensetzung der im Substratscreening untersuchten Rohabwässer (*massenbezogen).*

	Kartoffel	Brauerei	Molkerei	Pizza
CSB_{hom} in mg/L	10.202	4.960	3.917	1.171
CSB_{gel} in mg/L	2.504	4.246	2.746	673
VFA_{Start} in mg/L	336	871	73	314
N_{org} in mg/L	232	100	93	39
NH_4-N in mg/L	11,9	<0,05	0,4	1,6
PO_4-P in mg/L	13,4	5,6	9,1	5,6
CSB_{hom} : NH_4-N : PO_4-P*	100 : 0,1 : 0,1	100 : 0 : 0,1	100 : 0 : 0,2	100 : 0,1 : 0,5
TR in g/L	5,2	2,6	5,0	1,3
GV in %	66	59	41	54

Für den Betrieb der Selektionsstufe ist es wichtig, dass ausreichend biologisch verfügbare Nährstoffe im Substrat vorliegen, um ein Biomassewachstum zu ermöglichen. Beim Blick auf das C : N : P-Verhältnis in Tabelle 4 fällt auf, dass bei allen Abwässern ein Mangel an biologisch verfügbaren N und P herrscht. Somit kann bereits vor der Versäuerung gefolgert werden, dass die Nährstoffverfügbarkeit bei Selektionsversuchen mit realen Abwässern untersucht werden muss. Dieser Punkt ist ebenfalls Teil des Arbeitspakets 5 „Kopplung der Verfahrensstufen“.

Der Feststoffgehalt lag in einem Bereich von (1,3-5,2) g/L und damit im Vergleich zu Primärschlamm um etwa den Faktor 10 niedriger. Die Feststoffe bestanden ausgehend von einer subjektiven

Beurteilung vorwiegend aus feinen Partikeln. Grobe oder faserige Stoffe konnten nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung kann erste Hinweise auf eine eventuell nötige fest-/flüssig-Trennung nach der Versäuerung zur Substrataufbereitung liefern. Bei einem sehr geringen Feststoffgehalt könnte eine fest-/flüssig-Trennung möglicherweise komplett entfallen, was den apparativen Aufwand in der PHA-Produktionskette vereinfachen würde.

4.1.1.2 Einfluss des Start-CSB

Beim Verlauf der VFA-Konzentrationen in Abbildung 6 ist zu beachten, dass bereits am Start des Versuchs an Tag 0 VFA nachgewiesen wurden. Beim Brauereiabwasser ist dies vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Abwasser aus einem Misch- und Ausgleichbehälter entnommen wurde. Die Aufenthaltszeit ist unbekannt und schwankt sehr stark je nach aktuellem Produktionsplan. Da die Abwasserproben immer einen Tag vor dem Versuchsstart bei den Firmen abgeholt wurden und über Nacht bei etwa 4 °C im Kühlschrank gelagert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Versäuerung bereits begonnen hatte. Die VFA-Konzentration aus dem Inokulum waren nach einer Woche ausfaulen bei 37°C zu vernachlässigen. Abbildung 6 zeigt, dass die Versäuerung der erwartet kohlenhydratreichen Abwässer aus der Brauerei und der Kartoffelverarbeitung in beiden Verdünnungsansätzen schnell startete. Innerhalb von 2 bis 7 Tagen wurde eine Plateau-Phase der VFA-Konzentration erreicht mit einer abgeschwächten Steigung bis zum Versuchsende. Beide Abwässer konnten mit beiden Verdünnungsansätzen die Mindest-VFA-Konzentration von 1 g/L erreichen. Im Gegensatz dazu ist der Anstieg des fetthaltigen Abwassers aus der Molkerei deutlich geringer. In beiden Konzentrationsansätzen erreichte die VFA-Konzentration mit 0,5 g/L und 0,4 g/L nicht die Mindestkonzentration. Ein Sonderfall bildet der Ansatz des Pizzaabwassers. Wie bereits erwähnt, war die CSB-Konzentration des Abwassers am Abholtag mit etwa 1,1 g/L vergleichsweise niedrig. Während der Versuchslaufzeit konnte trotz der regelmäßigen Einstellung des pH-Werts auf kleiner 6 eine Methanbildung nicht verhindert werden, sodass es zu keiner Anreicherung von VFA kam, sondern zu einem fast vollständigen Abbau der Organik bis zum Versuchsende. Dies schließt die prinzipielle Eignung dieses Abwassers als Rohstoff zur VFA-Produktion nicht aus, vielmehr kann hiermit eine Mindestkonzentration angenähert werden, die neben einer pH-Wert-Absenkung nötig ist, um eine Methanbildung zuverlässig zu unterbinden. Dies kann für spätere Anwendungsfälle von Nutzen sein.

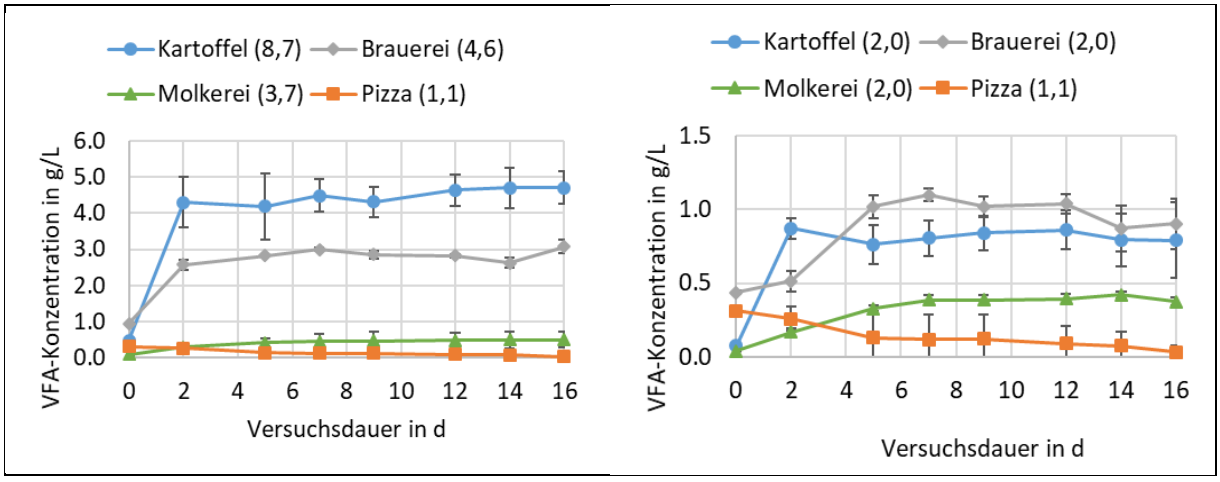


Abbildung 6: Verlauf der VFA-Konzentration im Substratscreening.

Die maximalen VFA-Ausbeuten für alle Versuchsansätze sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Sowohl beim Abwasser aus der Kartoffelverarbeitung als auch aus der Brauerei wurden bei den Verdünnungsansätzen mit höherer CSB-Konzentration höhere VFA-Ausbeuten (CSB_{VFA} in % der Ausgangs-CSB-Konzentration) erzielt. Bei der Molkerei wiese dagegen die niedrigere Konzentration eine höhere VFA-Ausbeute auf. Die Werte von maximal 14 bzw. 21 % sind deutlich niedriger als die

maximalen Ausbeuten von 54 % und 67 % bei der Kartoffelverarbeitung und der Brauerei und lieferten damit in diesem Versuch eine zu niedrige VFA-Konzentration. Aus Voruntersuchungen mit Abwasser aus diesem Betrieb wurden jedoch CSB-Konzentration von ca. 14 g/L gemessen, womit auch bei den o.g. Ausbeuten ausreichend VFA produziert werden könnten. Für eine weitere Prozessentwicklung wäre es unabhängig vom Abwasser notwendig den Ablauf der Produktionsstätten systematisch zu beproben, um damit den Verlauf CSB-Konzentration ermitteln zu können. Daraus ableitend wäre zu überlegen, ob durch einen Misch- und Ausgleichsbehälter vor der Versäuerung nötig ist oder ob durch entsprechende Dimensionierung der Versäuerungsstufe ein Ausgleichen der Konzentration möglich wäre.

Tabelle 5: VFA-Ausbeuten im Substratscreening.

Abwasser	**Kartoffel (8,7)**	**Kartoffel (2,0)**	**Brauerei (4,6)**	**Brauerei (2,0)**	**Molkerei (3,7)**	**Molkerei (2,0)**	**Pizza (1,1)**
VFA-Ausbeute in %	54 ± 5	44 ± 4	67 ± 4	55 ± 2	14 ± 6	21 ± 1	27 ± 0

Besonders hervorzuheben ist dabei der Versuchsansatz von Kartoffelabwasser mit einem Start-CSB von 8710 mg/L. Bei diesem Ansatz war nach zwei Tagen der VFA-Anteil am gelösten CSB mit 90 % am höchsten. Der Anteil nahm im weiteren Verlauf bei in etwa gleichbleibender VFA-Ausbeute ab, was auf eine fortlaufende Hydrolyse der enthaltenen Feststoffe schließen lässt. Die gebildeten Zwischenprodukte wurden allerdings nicht bis zu kurzkettigen organischen Säuren verstoffwechselt. Neben einer möglichst hohen VFA-Ausbeute kann es zusätzlich von Interesse sein, dass der Anteil der Organik, die nicht als VFA vorliegt, möglichst gering ist. Eine hoher „Nicht-VFA“-Anteil könnte zu einem verminderten Selektionsdruck in der Selektionsstufe führen. Das mögliche Wachstum einer Nebenpopulation, die kein PHA anreichert, kann die Produktivität des Gesamtprozesses beeinflussen. Weiterhin ist ein erhöhter Sauerstoffbedarf durch den Stoffwechsel von Nebenpopulationen nicht auszuschließen. Um die PHA-Produktionskosten möglichst gering zu halten, sollten auch diese Effekte im weiteren Verlauf des Projekts berücksichtigt werden.

In Abbildung 7 ist die molare VFA-Zusammensetzung der Einzelsäuren dargestellt. Die Abkürzungen stehen in der angegebenen Reihenfolge für Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, iso- und n-Buttersäure, iso- und n-Valeriansäure und Capronsäure.

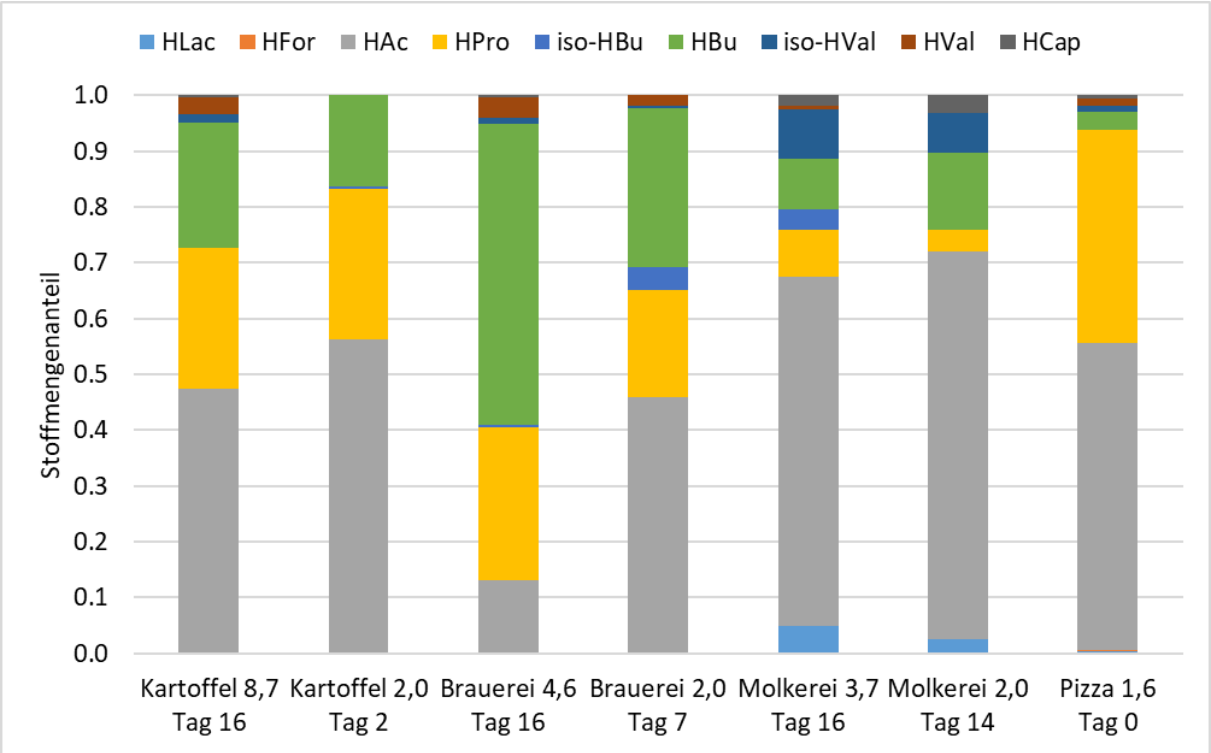


Abbildung 7: VFA-Zusammensetzung am Tag der höchsten Ausbeute.

Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, weisen beide Ansätze aus der Kartoffelverarbeitung unabhängig ihrer Startkonzentration ähnliche VFA-Verhältnisse auf. Bei der Brauerei hingegen wurde bei der höheren Startkonzentration deutlich mehr Buttersäure produziert. Das fetthaltige Abwasser aus der Molkerei wies im Gegensatz zu den kohlenhydratreichen Abwässern deutlich mehr Essig- und Valeriansäure auf. Damit lässt sich aus diesem Vergleich der Schluss ziehen, dass die VFA-Zusammensetzung nicht nur von der Zusammensetzung des Abwassers, sondern auch von der Startkonzentration abhängt.

Generell ist beim Blick auf die VFA-Zusammensetzung vor allem die Summe von Essig- und Buttersäure sowie von Propion- und Valeriansäure wichtig, um Voraussagen für die erwartete PHA Zusammensetzung zu treffen. Je höher der Essig- und Buttersäureanteil ist, desto höher ist der zu erwartende PHB-Anteil. Mit zunehmendem Anteil von Propion- und Valeriansäure wird voraussichtlich vermehrt PHV produziert. Valeriansäure war in allen Ansätzen nur geringer Konzentration nachweisbar. Der Propionsäure-Anteil lag beim Kartoffel- und beim Brauereiabwasser etwa bei bis zu 1/3 der Gesamtsäuren. Der größte Anteil lag bei allen Ansätzen bei Essig- und Buttersäure mit 67-85 %. Mit den Ergebnissen aus Abbildung 7 ist demnach zu erwarten, dass bei den untersuchten Abwässern mit einem PHB/PHV-Mischpolymer mit erhöhtem PHB-Anteil zu rechnen ist. Somit können diese Ergebnisse in Abhängigkeit möglicher Verwendungsmöglichkeiten der Polymere als Grundlage zur Auswahl in Frage kommender Abwasserströme dienen.

4.1.1.3 Mikrobielle Zusammensetzung

Im Folgenden ist die Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung innerhalb der Versäuerungsversuche mit unterschiedlichen Abwasserzusammensetzungen und -konzentrationen dargestellt.

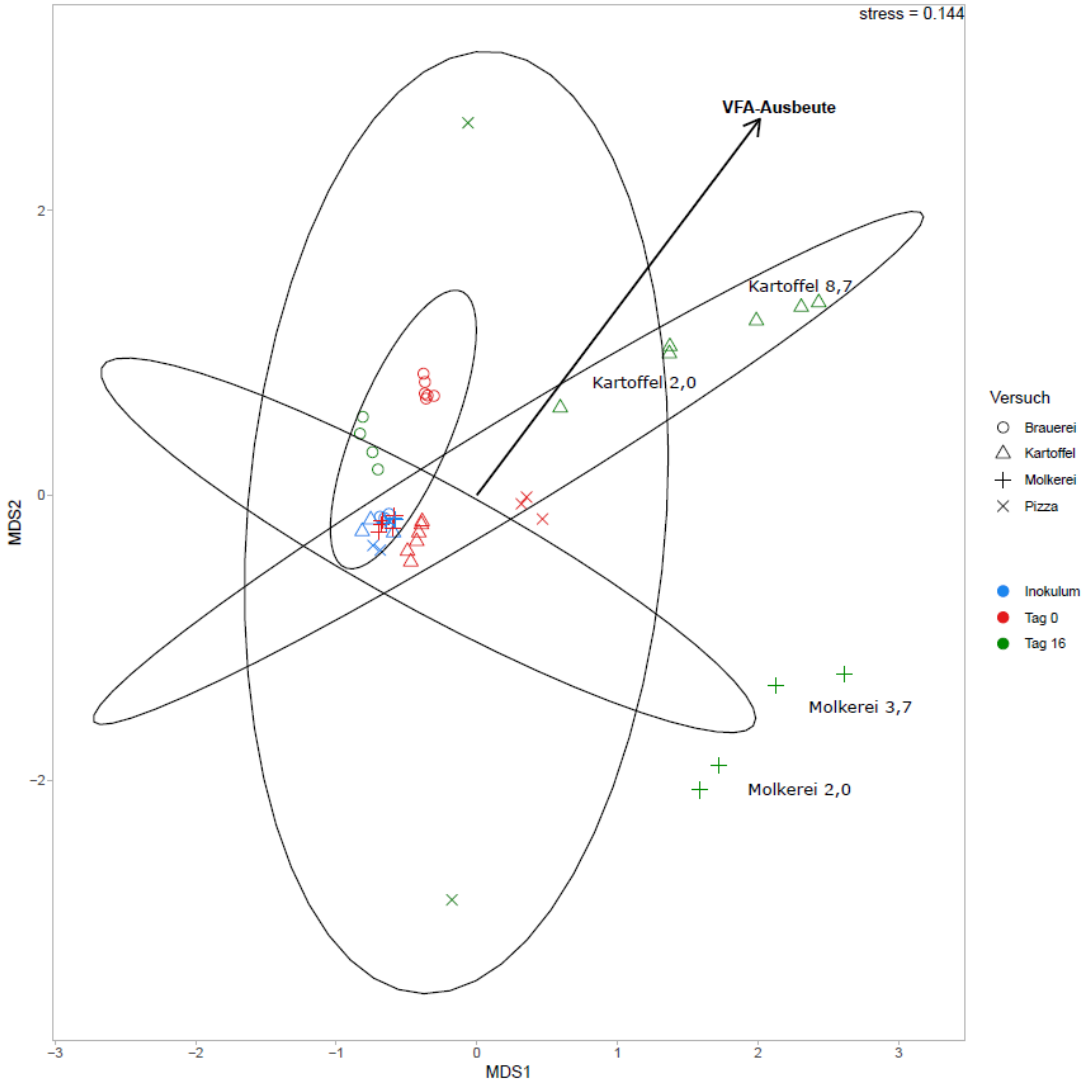


Abbildung 8: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Substratscreening-Versuche.

Abbildung 8 zeigt eine nichtmetrische dimensionale Skalierung der Zusammensetzung der Bakterienmischkultur, welche zur Versäuerung der unterschiedlichen Abwässer verwendet wurde. Die Darstellung zeigt die Unterschiede in der Zusammensetzung innerhalb der einzelnen Reaktoren (Punkte), wobei die Distanz der einzelnen Punkte, die Ähnlichkeit dieser zueinander widerspiegelt. Je näher diese zusammenliegen, desto ähnlicher waren sich die Mischkulturen in ihrer Zusammensetzung innerhalb der Reaktoren zum Untersuchungszeitpunkt. Es ist deutlich erkennbar, dass das verwendete Inokulum für alle Versuche in seiner Zusammensetzung sehr ähnlich war. Ebenso glichen die Biozönosen innerhalb des Versuches mit Kartoffel- und Molkereiabwasser an Tag 0 dem Inokulum, wohingegen die des Brauerei- und Pizzaversuches schon zu Beginn eine abweichende Zusammensetzung zum Inokulum aufwiesen. Dies ist vermutlich auf einen Eintrag von anderen Mikroorganismen aus dem Abwasser selbst in die Reaktoren zurückzuführen, da die Proben an Tag 0 aus der Mischung von Inokulum und Abwasser genommen wurden. Über den zeitlichen Verlauf bis zu Tag 16 entwickelten sich alle Biozönosen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung in unterschiedliche

Richtungen, was an der Verteilung und Distanz der Punkte sowie an der Clusterbildung, dargestellt durch Ellipsen, in der Abbildung zu erkennen ist. Ebenfalls zu erkennen ist, dass die einzelnen Reaktoren der zwei verwendeten Konzentrationen innerhalb eines Substrates für die Versuche mit Kartoffel- und Molkereiabwasser zusammen clustern und sich somit unterschiedlich entwickelten. Der Vektor der VFA-Ausbeute zeigt entlang der Richtung der Verteilung der Punkte des Kartoffel- und Brauereiversuches, was darauf schließen lässt, dass die Veränderung der Biozönose in diesen Versuchen in einem signifikanten Zusammenhang ($p > 0,5$) mit der VFA-Ausbeute steht. Die Verteilung der Punkte für den Versuch mit Molkerei- und Pizzaabwasser verlaufen nicht entlang dieser Achse, daher steht die Veränderung der Biozönose in diesen Versuchen in keinem relevanten Zusammenhang mit der VFA-Ausbeute. Zudem entwickelten sich die Bakterienkulturen an Tag 16 in dem Versuch mit Pizzaabwasser in unterschiedliche Richtungen, obwohl die gleiche Substratkonzentration zu Beginn des Versuches verwendet wurde.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sich die zu Beginn verwendete gleiche Bakterienmischkultur unter Verwendung unterschiedlicher Substrate in ihrer mikrobiellen Zusammensetzung über den zeitlichen Verlauf der Versäuerung hinweg unterschiedlich entwickelt. Dies steht zudem in Zusammenhang mit der erzielten VFA-Ausbeute. Auch die verwendete Substratkonzentration kann einen Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung haben, was anhand der Ergebnisse für die Versuche mit Kartoffel- und Molkereiabwasser deutlich zu erkennen ist. Diese Beobachtungen werden ebenfalls durch die Ergebnisse der taxonomischen Untersuchung verdeutlicht, welche im Folgenden dargestellt ist.

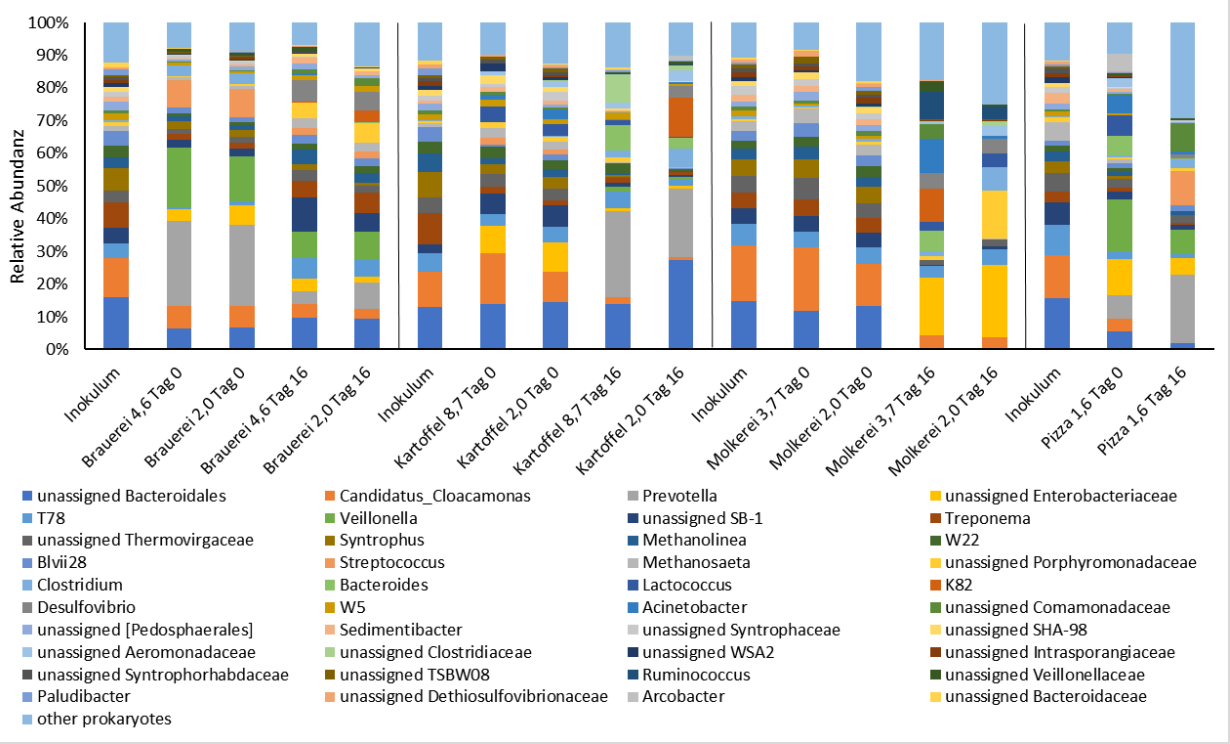


Abbildung 9: Taxonomische Zusammensetzung der Bakterienmischkulturen innerhalb der Substratscreening-Versuche.

Aus Abbildung 9 ist zu entnehmen, dass das Inokulum zu Beginn aller vier Versuche sehr ähnlich in seiner mikrobiellen Zusammensetzung war. Dabei waren die häufigsten Taxa Vertreter der Familie Bacteroidales (15,9 %, 12,8 %, 14,7 %, 15,8 %), *Candidatus Cloacomonas* (11,9 %, 11 %, 17,1 %, 13,2 %) Vertreter der Gruppe SB-1 (4,7 %, 2,6 %, 4,8 %, 6,9 %) sowie die Gattungen *Treponema* (7,8 %, 9,7 %, 4,5 %, 3,7 %), T78 (4,8 %, 5,5 %, 6,7 %, 9,2 %) und *Syntrophus* (7 %, 7,8 %, 5,1 %, 3,6 %). Diese waren ebenfalls die Taxa mit der höchsten relativen Abundanz innerhalb der Proben aus den Reaktoren

beider Substratkonzentrationen an Tag 0 des Versuches mit Molkereiabwasser. In den Proben des Versuches mit Kartoffelabwasser an Tag 0 war eine erhöhte relative Abundanz der Gattung *Candidatus Cloacomonas* (15,6 und 9,3 %) sowie eine verhältnismäßig hohe relative Abundanz der Gruppe Enterobacteriaceae (8,2 und 9%), welche nicht im Inokulum vorhanden war, zu verzeichnen. Diese Organismen wurden sehr wahrscheinlich über das Abwasser selbst in die Reaktoren eingetragen. Die Zusammensetzung an Tag 0 des Versuches mit Brauereiabwassers wich noch stärker von der des Inokulums ab. Hierbei waren die abundantesten Taxa die Gattungen *Prevotella* (25,9 und 25,1 %), *Veillonella* (18,4 und 13,6 %) und *Streptococcus* (8,4 und 8,6 %). Dies war ebenfalls bei dem Versuch mit Pizzaabwasser zu beobachten, wobei die abundantesten Taxa Enterobacteriaceae (11,1 %), *Veillonella* (15,8 %), *Bacteroides* (6 %), *Lactococcus* (6,2 %), *Acinetobacter* (5,6 %) und *Arcobacter* (5,4 %) waren. Auch diese Unterschiede zum Inokulum sind vermutlich auf einen Eintrag von Mikroorganismen aus dem jeweiligen Abwasser in die Reaktoren zurückzuführen. Alle Biozönosen veränderten sich bis zu Tag 16 hin in unterschiedliche Richtungen, wobei sowohl die Mikroorganismen aus dem Abwasser selbst als auch die Anpassung an das unterschiedliche Substrat die entscheidenden Faktoren für diese Veränderung gewesen sein könnten. Bei dem Versuch mit Brauereiabwasser war eine ähnliche Zusammensetzung der Mikroorganismengesellschaft an Tag 16 zwischen beiden unterschiedlichen Substratkonzentrationen zu erkennen, wobei die abundantesten Organismen Vertreter der Gruppe Bacteroidales (9,7 und 9,3 %), SB-1 (10,6 und 5,7 %), *Veillonella* (8,1 und 8,2 %), *Desulfovibrio* (6,8 und 5,7 %) und *Prevotella* (3,9 und 8,3 %) waren. Für die anderen verwendeten Abwässer zeigten sich unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung zwischen den zwei unterschiedlichen verwendeten Substratkonzentrationen. Dabei waren zwar Vertreter der Bacteroidales (13,8 und 27,3 %) und die Gattung *Prevotella* (26,4 und 20,9 %) bei beiden Konzentrationen an Kartoffelabwasser die Gruppen mit der höchsten relativen Abundanz, allerdings wies die Gesellschaft mit der höheren Substratkonzentration eine erhöhte relative Abundanz von *Bacteroides* (7,8 %) und Vertretern der Clostridiaceae (8,6 %) auf, wohingegen die Gesellschaft mit der niedrigeren Konzentration einen höheren Anteil der Gattung K28 (12 %) aufwies. An Tag 16 des Versuches mit Molkereiabwasser in der höheren Konzentration waren Enterobacteriaceae (17,6 %), K28 (10,2 %), *Acinetobacter* (10,4 %) und *Ruminococcus* (8,4 %) die Gruppen mit der höchsten relativen Abundanz, wobei in den Reaktoren mit der niedrigeren Substratkonzentration Vertreter der Familien Enterobacteriaceae (22,2 %) und Porphyromonadaceae (14,7 %) sowie die Gattung *Clostridium* (7,1 %) die abundantesten Taxa waren. Die Gesellschaft zum Ende des Versuches mit Pizzaabwasser wurde von den Gattungen *Prevotella* (20,9 %), *Veillonella* (7,5 %) und *Streptococcus* (10,5 %) sowie Vertretern der Familie Comamonadaceae (8,7 %) dominiert. Diese Veränderung in der Bakterienzusammensetzung zwischen den einzelnen Versuchen mit unterschiedlichen Substraten, sowie unterschiedlichen verwendeten Substratkonzentrationen über die Zeit ist eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der erzielten VFA-Ausbeute sowie -Zusammensetzung (vgl. Abbildung 7 und Tabelle 5). Dies ist vermutlich auf die Unterschiede in den Stoffwechselwegen der jeweils dominanten Taxa zurückzuführen. So fermentiert die Gattung *Veillonella* Lactat und Pyruvat unter Produktion von Essigsäure, Propionsäure CO_2 und H_2 und ist nicht in der Lage Kohlenhydrate zum Wachstum zu nutzen. Die Familie der Enterobacteriaceae hingegen baut Kohlenhydrate ab, wobei einige Vertreter eine gemischte Säuregärung betreiben, bei welcher Lactat, Acetat, CO_2, H_2, Ethanol und Succinat entstehen, und andere die Butandiol-Gärung als Stoffwechselweg nutzen. Die Ordnung Bacteroidales, zu der ebenfalls die Gattungen *Bacteroides* und *Prevotella* sowie die Familie Porphyromonadaceae gehören, umfasst obligat anaerobe Arten, welche Zucker oder Proteine zu Acetat oder Succinat fermentieren. Die meisten Vertreter der Familie Clostridiaceae, zu denen auch die Gattung *Clostridium* zählt, betreiben alkoholische oder gemischte Säuregärung. Zu ihren Hauptstoffwechselprodukten zählen neben Buttersäure auch Essigsäure, Milchsäure, Ethanol, Propanol und Butanol. Die Gattung *Streptococcus* zählt zu den homofermentativen

Milchsäurebakterien, deren Stoffwechselprodukt der Gärung Milchsäure darstellt. Die Stoffwechselprodukte der Gärung von *Rumniococcus* sind unter anderem Acetat, Formiat und Succinat. Organismen der Familie Comamonadaceae sowie die Gattung *Acinetobacter* hingegen besitzen einen aeroben, nichtfermentativen chemoorganotrophen Stoffwechsel (Dworkin et al. 2006). Dies könnte ein Hinweis auf das Eindringen von Sauerstoff in die anaeroben Reaktoren sein, was möglicherweise auch mit der gering ausfallenden VFA-Ausbeute in den Versuchen mit Molkerei- und Pizzaabwasser zusammenhängen könnte.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sich unter Verwendung unterschiedlicher Substrate sowie Substratkonzentrationen die mikrobielle Zusammensetzung über den zeitlichen Verlauf der Versäuerung hinweg unterschiedlich entwickelt. Dabei spielt vermutlich auch der Eintrag von Mikroorganismen über das als Substrat verwendete Abwasser eine Rolle. Zudem ist die unterschiedliche erzielte VFA-Zusammensetzung am Ende der Versäuerung wahrscheinlich nicht nur Folge der anfänglichen Abwassercharakteristika und -konzentration, sondern auch der metabolischen Eigenschaften der Mikroorganismengesellschaft.

4.1.2 Zwischenfazit

Mit der beschriebenen Methode zur Durchführung des Substratscreenings konnte erstmals eine Vorgehensweise entwickelt werden, bei der die Versäuerungseigenschaften von Abwässern verschiedener Herkunft miteinander verglichen werden und bei der alle Randbedingungen, soweit es möglich ist, konstant sind. Durch die detaillierte Beschreibung aller Randbedingungen könnte diese Vorgehensweise als Grundlage für eine künftige Standardisierung bei Potenzialuntersuchungen zur VFA-Produktion dienen, ähnlich wie es bei Biogaspotenzialtest bereits der Fall ist.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Abwasserherkunft als auch die CSB-Startkonzentration (bei gleichem Abwasser) die biologische Zusammensetzung der Bakterienmischkultur in der Versäuerung sowie die damit zusammenhängende VFA-Ausbeute und VFA-Zusammensetzung beeinflussen kann. Daraus lässt sich schließen, dass bei Voruntersuchungen potenzieller Abwässer, ein einfacher stichprobeartiger Versäuerungstest nicht ausreichend ist, um vorhersagen zu können mit welchen VFA-Ausbeuten und VFA-Zusammensetzungen zu rechnen ist. Dies führt zum einen dazu, dass der Abwasserabfluss aus den Produktionsstätten über einen längeren Zeitraum beprobt werden müsste und Versäuerungsversuche zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden sollten. Zum anderen ist es wichtig zu untersuchen, ob eine Selektion und PHA-Akkumulation auch unter schwankenden Zulaufbedingungen erfolgreich möglich sind. Falls das Ziel jedoch nicht erreicht werden kann, müssen bei zukünftigen Entwicklungen in der Großtechnik entsprechende Ausgleichskapazitäten über Mischbehälter oder über die Dimensionierung der Versäuerungstanks geschaffen werden.

Ein weiterer Punkt, der aus den Ergebnissen abzulesen ist, ist, dass alle untersuchten Abwässer einen Nährstoffmangel für ein Biomassewachstum in der Selektion aufwiesen. Hieraus ergibt sich ein zusätzlicher Untersuchungsschwerpunkt für eine zukünftige Weiterentwicklung der Prozesskette. Wenn eine Biozönose dauerhaft in der Selektionsstufe kultiviert werden muss, dann müssen die Folgen des Nährstoffmangels sowie die Identifizierung und Nutzung möglicher nährstoffreicher Nebenströme, die zur Nährstoffversorgung genutzt werden könnten, untersucht werden. Mögliche Varianten wären bspw. nährstoffreiche Nebenströme in der hausinternen Produktion oder auch in der Firmennachbarschaft. Durch die Nutzung neuartiger Sanitärsysteme in den Mitarbeitertoiletten, könnte durch die Abtrennung des Urins ebenfalls ein nährstoffreicher Stoffstrom erzeugt werden.

4.2 Selektion

4.2.1 Einfluss des Inokulums und der Selektionsdauer

4.2.1.1 Voruntersuchung zur Analyse der Biozönose

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Untersuchung der Biozönose des Vorversuchs dargestellt. Die gezeigten Daten für die Probenahmezeitpunkte sind die jeweiligen Einzel- und Mittelwerte aus den beiden Selektionsreaktoren.

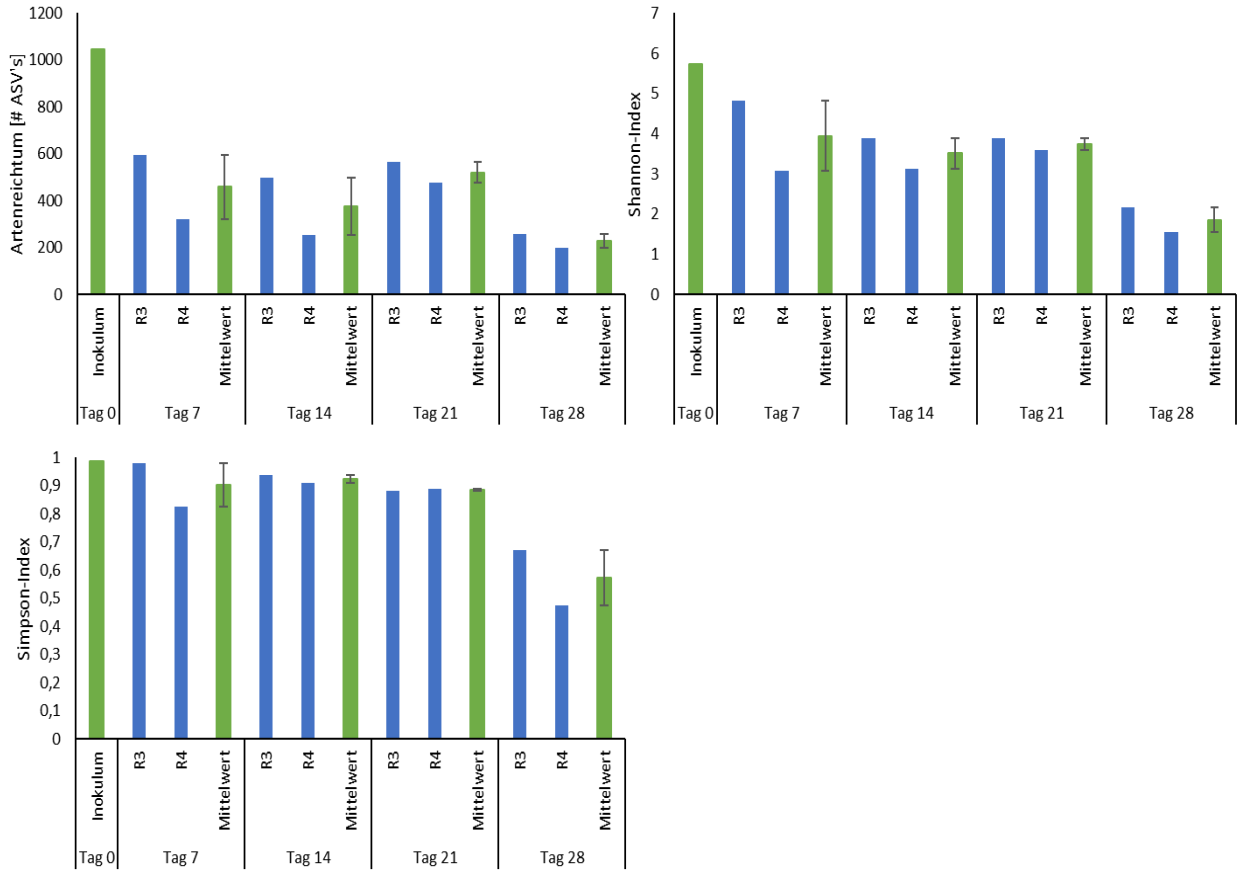


Abbildung 10: Diversität und Reichtum der Bakterien innerhalb der Voruntersuchung.

Aus Abbildung 10 wird erkenntlich, dass während der vierwöchigen Selektion eine Abnahme des Artenreichtums sowie der Diversität, welche anhand des Simpson- und des Shannon-Index dargestellt ist, zu verzeichnen war. Die Selektion führte daher zu einer Verschiebung der diversen Bakterienmischkultur zu einer Kultur mit weniger Taxa. Die folgenden Ergebnisse zeigen weiterhin, dass sich wenige Bakterientaxa in großer Abundanz über den Zeitraum in den Selektionsreaktoren dominant durchsetzen konnten.

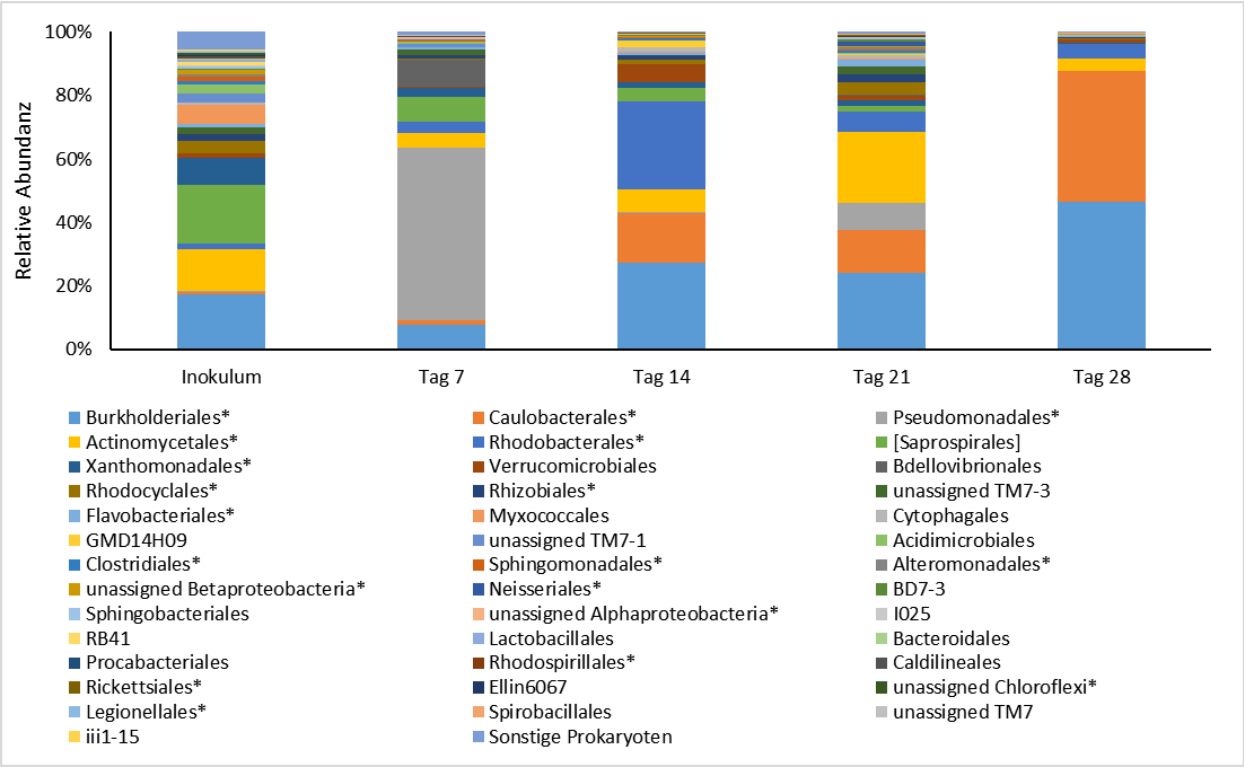


Abbildung 11: Relative Abundanzen der Bakterienordnungen innerhalb der Voruntersuchung; Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

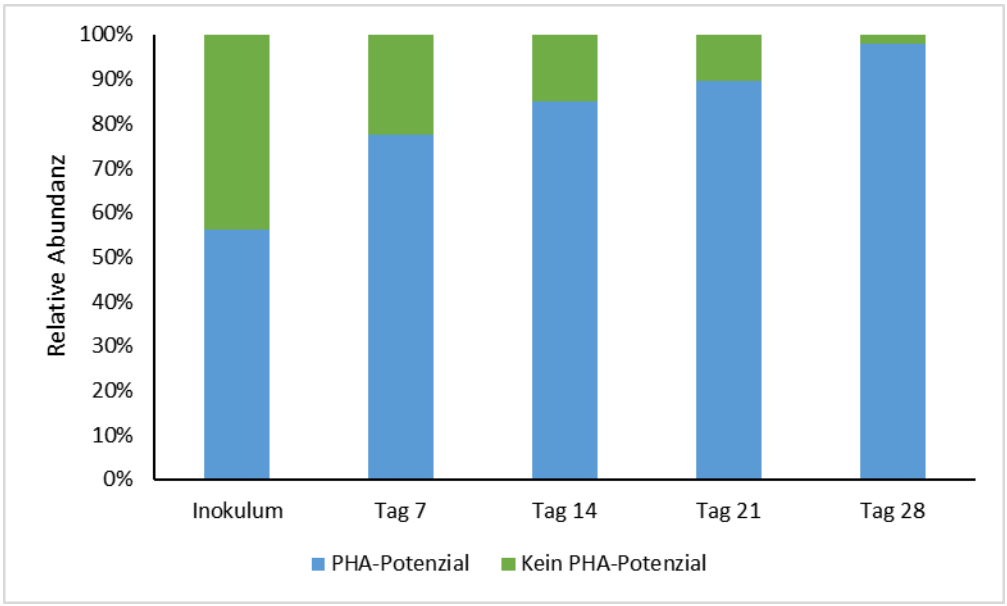


Abbildung 12: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Ordnungssebene.

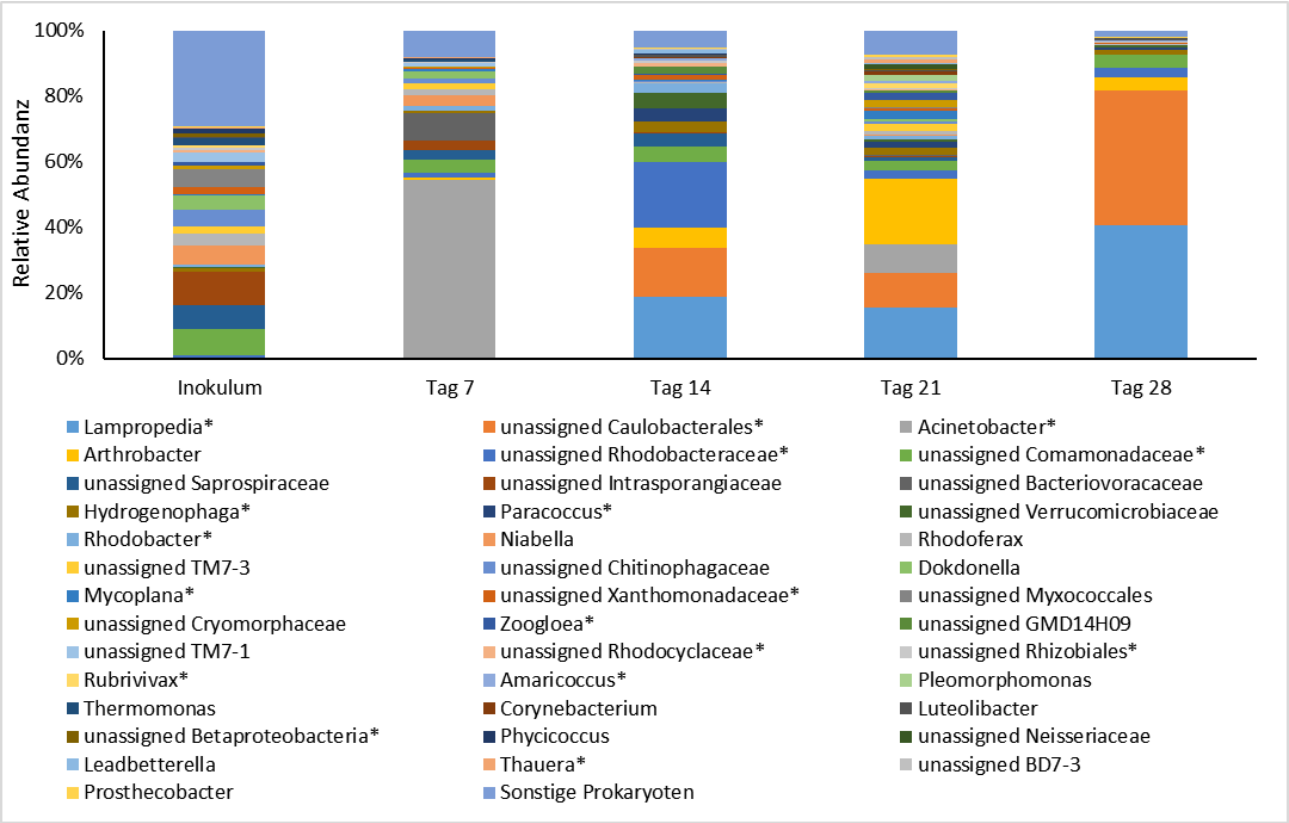


Abbildung 13: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb der Voruntersuchung; Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

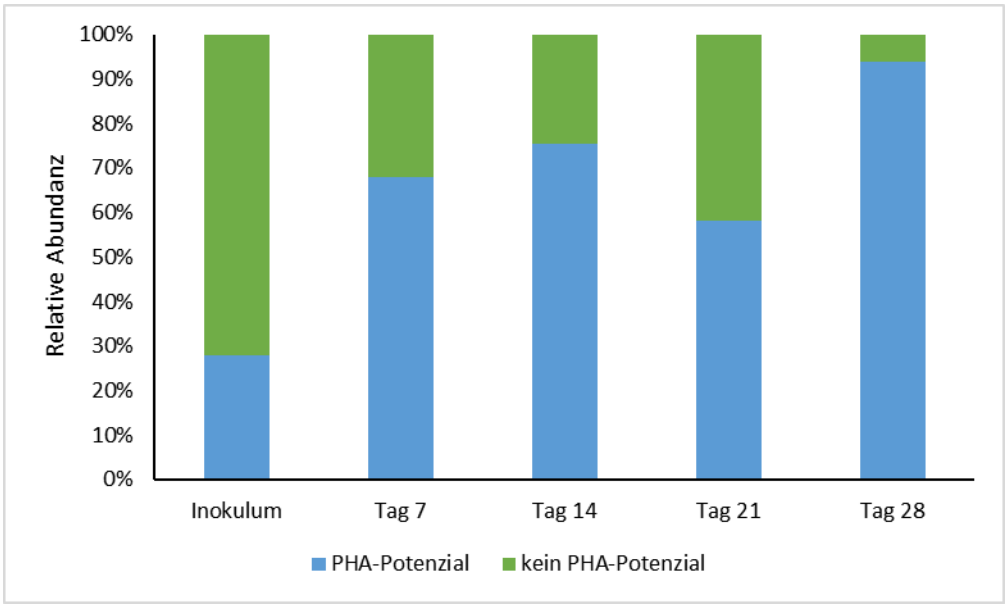


Abbildung 14: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene.

Abbildung 11 und Abbildung 13 zeigen die Verteilungen der Bakterientaxa auf Ordnungs- und auf Gattungsebene mit den jeweiligen relativen Abundanzen. Bereits nach einer Woche der Selektion konnten sich die PHA-produzierenden Bakterientaxa innerhalb des Systems mit einer relativen Abundanz von 77,6 % auf Ordnungs- und 68 % auf Gattungsebene stark durchsetzen, wie ebenfalls aus Abbildung 12 und Abbildung 14 ersichtlich wird. Nach der zweiten und dritten Woche der Selektion fand eine Verschiebung innerhalb der Bakteriengesellschaft statt, allerdings wurden die eine Woche

zuvor dominanten PHA-Produzenten von anderen Taxa mit PHA-Produktionsfähigkeit abgelöst. Dies zeigt sich insbesondere in Abbildung 12, da keine Abnahme in der Abundanz der PHA-fähigen Taxa zu verzeichnen war. Jedoch zeigt sich eine solche in Abbildung 14, was sich dadurch erklären lässt, dass eine Betrachtung auf Gattungsebene einen genaueren Einblick in die Bakteriengesellschaft bietet, gerade in Hinblick auf Stoffwechselprozesse wie die PHA-Produktionsfähigkeit. Die Gattung *Acinetobacter*, welche die Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzt und nach der ersten Woche der Selektion die Gesellschaft dominierte, wurde nach der zweiten Woche der Selektion durch die PHA-produzierenden Gattungen *Lampropedia*, *Hydrogenophaga*, *Paracoccus*, und *Rhodobacter*, sowie nicht näher bestimmbare Vertreter der Ordnung Caulobacterales und der Familien Rhodobacteraceae und Comamonadaceae größtenteils verdrängt (Abbildung 13). Eine weitere Gattung, welche an Abundanz gewinnen konnte, war *Arthrobacter*. Von dieser Gattung ist nicht bekannt, dass sie fähig zur PHA-Produktion ist, allerdings besitzt sie das Enzym PHB-Depolymerase, welches sie zum PHA-Abbau befähigt. Die nach vier Wochen dominanteste Gattung war der PHA-Produzent *Lampropedia* (Abbildung 13). Nach vier Wochen bestand das System nahezu vollständig aus PHA-fähigen Taxa mit 98,1 % Abundanz innerhalb der Ordnungen und 93,8 % innerhalb der Gattungen (Abbildung 12, Abbildung 14). Auch eine Zunahme des PHA-Gehaltes über den Versuchszeitraum konnte verzeichnet werden. So betrug dieser nach einer Woche im Mittel 7 % (± 1,3 %) bezogen auf die Trockenmasse. Nach zwei Wochen lag der PHA-Gehalt bereits bei 24,4 % (± 0,8 %) und nach drei Wochen bei 35,4 % (± 2,0 %) (vgl. Tabelle 3; Mittelwerte der GT-Werte).

Abschließend lässt sich aus den voran gezeigten Ergebnissen schlussfolgern, dass in diesem Versuch eine Selektion zu einer starken Anreicherung an PHA-Produzenten führte und daher sinnvoll für die Produktion von PHA sein könnte. Des Weiteren gab es Hinweise darauf, dass sich nach einer Woche der Selektion noch keine Stabilität innerhalb des Bakteriengesellschaft einstellte. Ob diese nach vier Wochen erreicht war, lässt sich nicht abschließend sagen. Allerdings konnte eine Verschiebung der Dominanz von PHA-produzierenden Taxa zur Dominanz anderer PHA-Produzenten beobachtet werden. Eine ähnliche Beobachtung konnten auch Carvalho et al. (2018) und Huang et al. (20018) machen, wobei der PHA-Gehalt trotz der Verschiebung konstant blieb, was auf eine Stabilität des Systems schließen lässt. Zudem konnte aufgrund der zu dem Zeitpunkt nur sehr eingeschränkt möglichen PHA-Analyse noch keine Korrelation mit dem erreichten PHA-Gehalt durchgeführt werden. Jedoch konnten Hinweise auf eine Steigerung des PHA-Gehaltes mit zunehmender Selektionsdauer festgestellt werden. Diese Voruntersuchung lieferte daher erste wichtige Hinweise zur Notwendigkeit der Selektionsphase.

4.2.1.2 Verlauf des Feststoffgehaltes innerhalb der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Inokula

Eine wichtige Fragestellung in der PHA-Forschung ist die Klärung welche Belebtschlämme prinzipiell zur PHA-Produktion geeignet sind. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Überschussschlämme von drei Kläranlagen mit unterschiedlichen Reinigungsverfahren als Inokulum für den PHA-Prozess ausgewählt. Zur Beurteilung der Selektionsversuche wurden neben dem PHA-Gehalt zunächst weitere Parameter wie die Feststoffkonzentration und die Länge der feast-Phase im Vergleich zur Zykluslänge betrachtet.

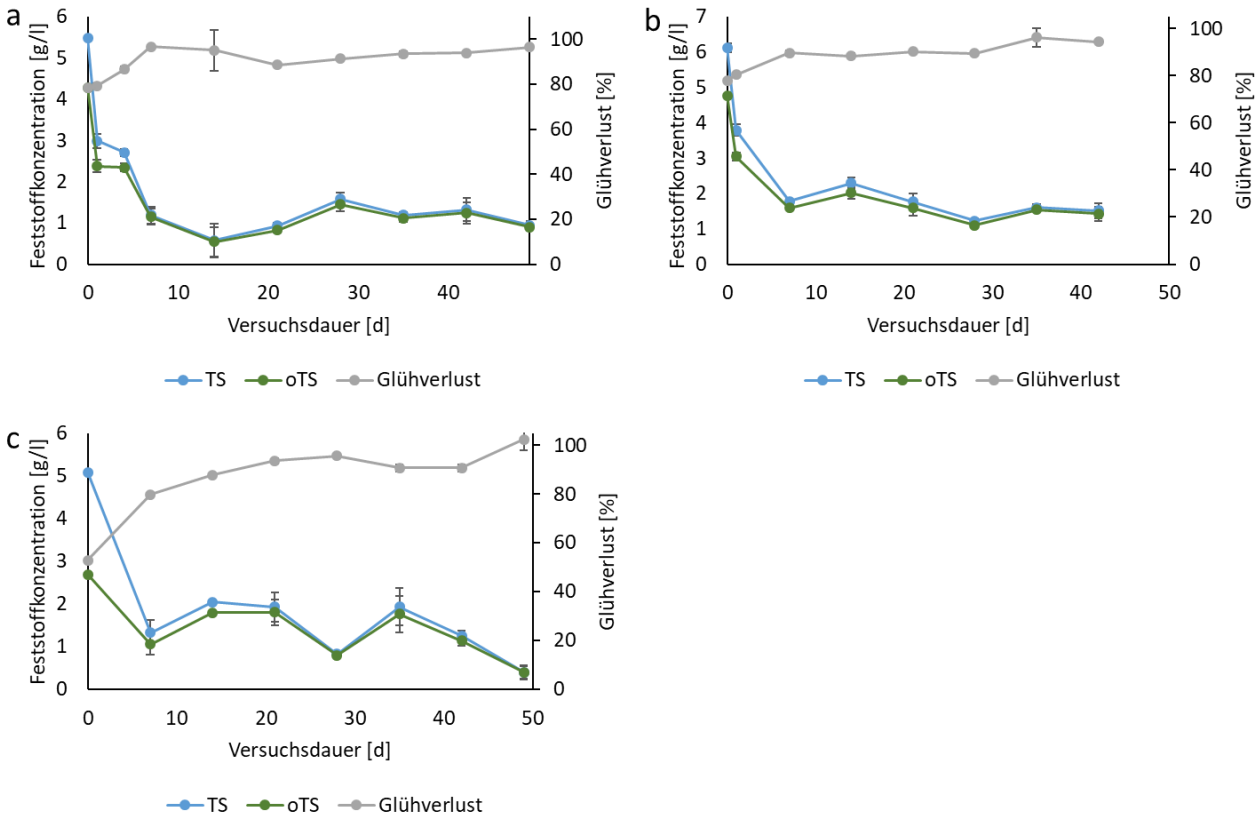


Abbildung 15: Verlauf der Feststoffkonzentration über die drei Selektionsversuche. a) Erster Selektionsversuch, b) Zweiter Selektionsversuch, c) Dritter Selektionsversuch. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus allen drei Selektionsreaktoren. TS = Trockensubstanz, oTS = organische Trockensubstanz.

Über den Verlauf aller drei Versuche konnte eine Abnahme des Feststoffgehalts innerhalb der Reaktoren festgestellt werden (Abbildung 15). Dabei näherte sich der Anteil organischer Trockensubstanz immer weiter der Konzentration an Trockensubstanz an und der Glühverlust stieg auf bis zu 100 % an. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein Ausspülen an anorganischem Material über den Versuchszeitraum stattfand. Zudem konnte in allen drei Versuchen eine Abnahme der Trockensubstanz von zu Beginn zwischen 5 und 6 g/L auf einen Wert von unter 1 g/L festgestellt werden. Lediglich im zweiten Versuch lag der letzte gemessene Wert bei 1,5 g/L, allerdings konnte hierbei für den letzten Versuchstag aufgrund eines Einwaagefehlers kein Wert ermittelt werden. Die Abnahme der Feststoffkonzentration stellt für einen optimalen Betrieb zur PHA-Produktion eine Schwierigkeit dar, da dies eine Abnahme der Produktivität bewirkt und eine Anlagenplanung entsprechend hieran angepasst sein muss. Daher ist eine Selektionsstrategie, welche eine Abnahme der Biomasse vermeidbar macht, von großer Wichtigkeit. Chen et al. (2017) konnten ebenfalls eine Abnahme der Feststoffkonzentration von zu Beginn 3,5 g/L auf ca. 2 g/L nach 20 Tagen beobachten. Allerdings stieg diese nach 20 Tagen wieder an und erreichte nach weiteren 70 Tagen einen stabilen

Wert in Höhe der ursprünglichen Feststoffkonzentration. Sie erklärten dies mit einem möglichen Auswaschen an nicht-PHA-Produzenten und einem anschließenden Anstieg aufgrund einer erfolgreichen Selektion und einer Zunahme an PHA-produzierender Biomasse (Chen et al. 2017). Dies konnte hier nicht festgestellt werden. Dabei könnten jedoch das Schlammalter und die Raumbelastung eine Rolle spielen. Chen et al. (2017) stellten ebenfalls fest, dass sich das System je nach Substratkonzentration bei einem doppelt so hohen Schlammalter von 10 Tagen im Vergleich zu 5 Tagen nicht auf den gleichen Feststoffgehalt einpendelte. Somit kann nicht abgeschätzt werden, ob sich der Feststoffgehalt innerhalb der hier unter anderen Parametern durchgeführten Versuche ebenfalls nach einer bestimmten Zeit auf einem stabilen höheren Wert eingestellt hätte.

4.2.1.3 Verhältnis der Feast-Phase zur Zykluslänge

Ein weiterer wichtiger Parameter, der während der Selektionsphase untersucht wurde, ist das Verhältnis der Feast-Phase zur Zykluslänge. Dieses lässt Rückschlüsse auf den Selektionsdruck während der Selektion zu und bedingt eine erfolgreiche Anreicherung an PHA-Produzenten. Da die Famine-Phase eine interne Wachstumslimitierung innerhalb der PHA-produzierenden Bakterien auslöst und sich ihr Stoffwechsel daraus resultierend hin zu einer vermehrten PHA-Produktion umstellt, wird in der Literatur ein kurzes Verhältnis der Feast-Phase zur Zykluslänge von kleiner 0,3 bis 0,4 als sinnvoll erachtet. Zudem führt eine längere Famine-Phase zu einem höheren Druck auf die nicht-PHA-Produzenten, da für diese mit zunehmender Hungerphase ohne verfügbare Energiespeicher die Wahrscheinlichkeit zu überleben abnimmt (Nguyenhuynh et al. 2021).

Nachfolgend sind die Verläufe des Feast-zu-Zyklus-Verhältnisses für die drei Versuchsblöcke dargestellt.

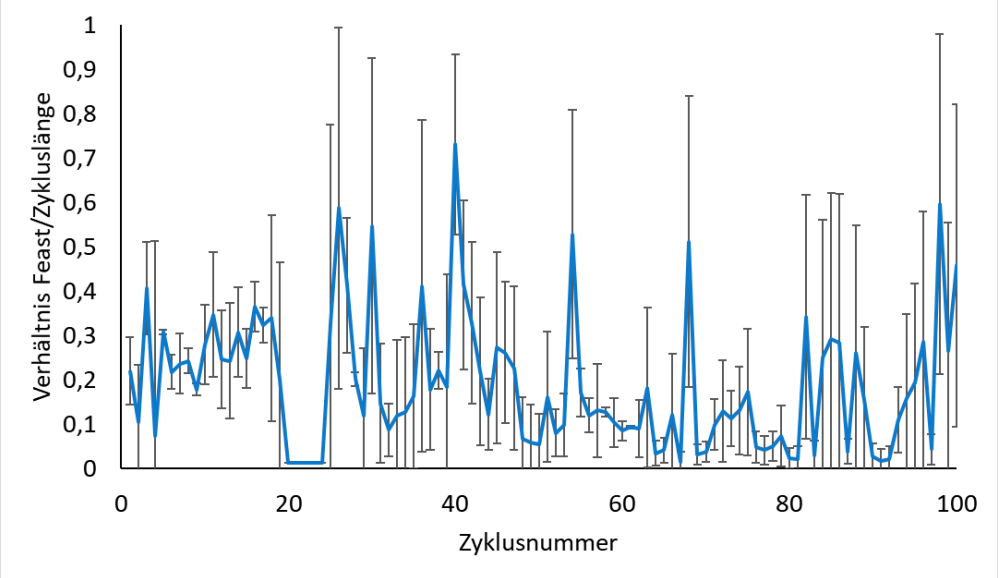


Abbildung 16: Verlauf des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des ersten Selektionsversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus allen drei Selektionsreaktoren.

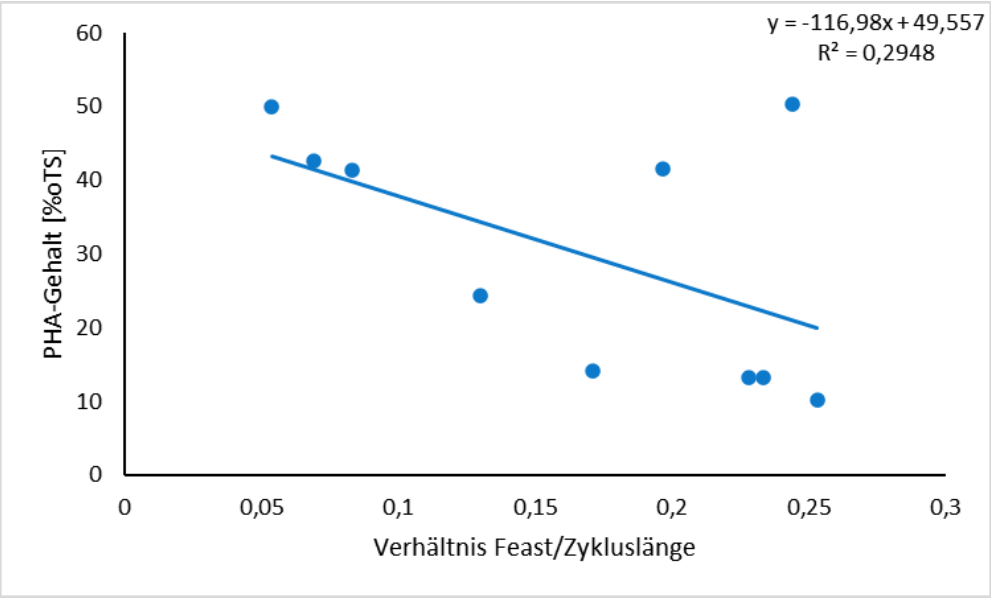


Abbildung 17: PHA-Gehalt in Abhängigkeit des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des ersten Selektionsversuches.

Aus Abbildung 16 lässt sich kein konkretes Bild zur Veränderung der Länge der Feast-Phase über den Versuchszeitraum innerhalb des ersten Selektionsversuchs feststellen. Hieran wird eine im Betrieb häufig vorkommende Problematik deutlich. Dabei handelt es sich um das sogenannte „fouling“, der Biofilmbewuchs der Sauerstoffsonden, welches teilweise eine Aufzeichnung des Sauerstoffverlaufs und eine Berechnung der Phasenlänge unmöglich machte. Trotz regelmäßiger Reinigung der Sonden, konnte dies nicht immer verhindert werden, da dieses Phänomen teilweise bereits nach wenigen Stunden erneut auftrat. Hieraus resultieren auch die großen Standardabweichungen zwischen den einzelnen Reaktoren in Abbildung 16. Aufgrund dieser Problematik konnte ebenfalls kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Feast-Phase zur Zykluslänge und dem PHA-Gehalt festgestellt werden (S = 244; ρ = -0,4787879; p = 0,1661). Es ist jedoch trotzdem eine Tendenz zu einer zunehmenden PHA-Produktion mit abnehmender Länge der Feast-Phase innerhalb des ersten Versuches zu verzeichnen (Abbildung 17).

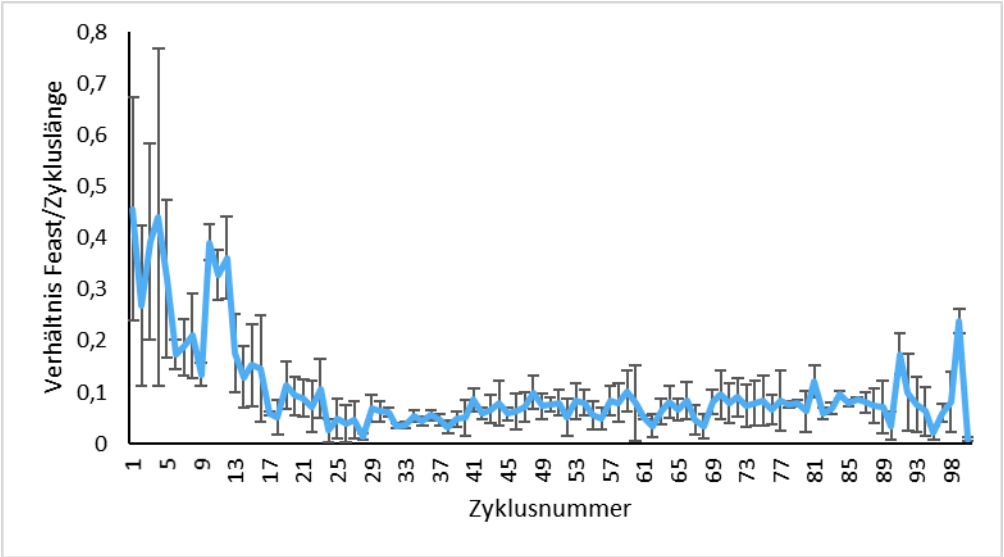


Abbildung 18: Verlauf des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des zweiten Selektionsversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus allen drei Selektionsreaktoren.

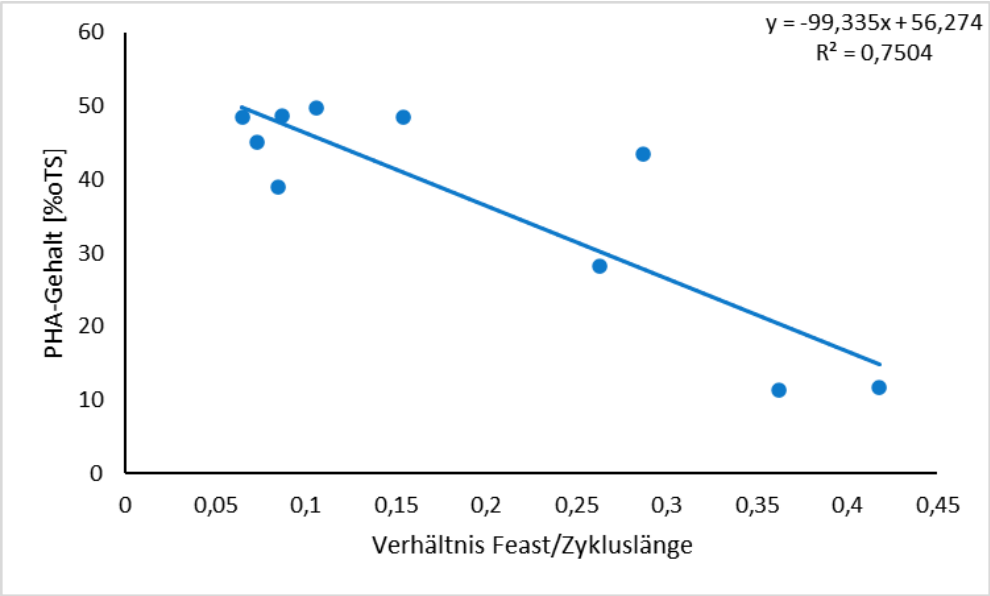


Abbildung 19: PHA-Gehalt in Abhängigkeit des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des zweiten Selektionsversuches.

Auch innerhalb des zweiten Versuchsblockes traten Probleme bei der kontinuierlichen Aufzeichnung des Sauerstoffgehaltes durch ein fouling der Sonden auf. Jedoch war dieses nicht so gehäuft zu verzeichnen, wie im ersten Versuchsblock. An Versuchstagen, an denen es jedoch zu einer gestörten Messung des Sauerstoffgehaltes innerhalb einzelner Reaktoren kam, wurden diese Werte zur Auswertung ausgeschlossen. Insgesamt lässt sich eine deutliche Abnahme des Feast-zu-Zyklusverhältnisses bereits nach ca. 7 Tagen beobachten (Abbildung 18). Mit einem darauffolgend relativ stabilen Wert von unter 0,1 lässt sich ein starker Selektionsdruck innerhalb der Reaktoren annehmen. Zum Ende des Versuches hin, kam es jedoch häufiger zu Messungenauigkeiten des Sauerstoffgehaltes, was sich vermutlich auf eine Veränderung der Struktur der Biomasse von einem flockigen Schlamm zu Beginn des Versuches zu einem schleimigeren Schlamm zum Ende des Versuches hin und damit zu einem häufigeren Bewuchs der Sonden erklären lässt. In diesem Versuchsblock konnte allerdings ein nahezu signifikanter Zusammenhang von 75,04 % zwischen dem Feast-zu-Zyklusverhältnis und dem PHA-Gehalt festgestellt werden ($S = 270$; $\rho = -0{,}6363636$; $p = 0{,}05445$). Dabei führte eine Verringerung der Feast-Länge zu einem Anstieg des PHA-Gehaltes, was wiederum Folge des erhöhten Selektionsdruckes und einer verbesserten Anreicherung PHA-produzierender Taxa sein könnte (Abbildung 19).

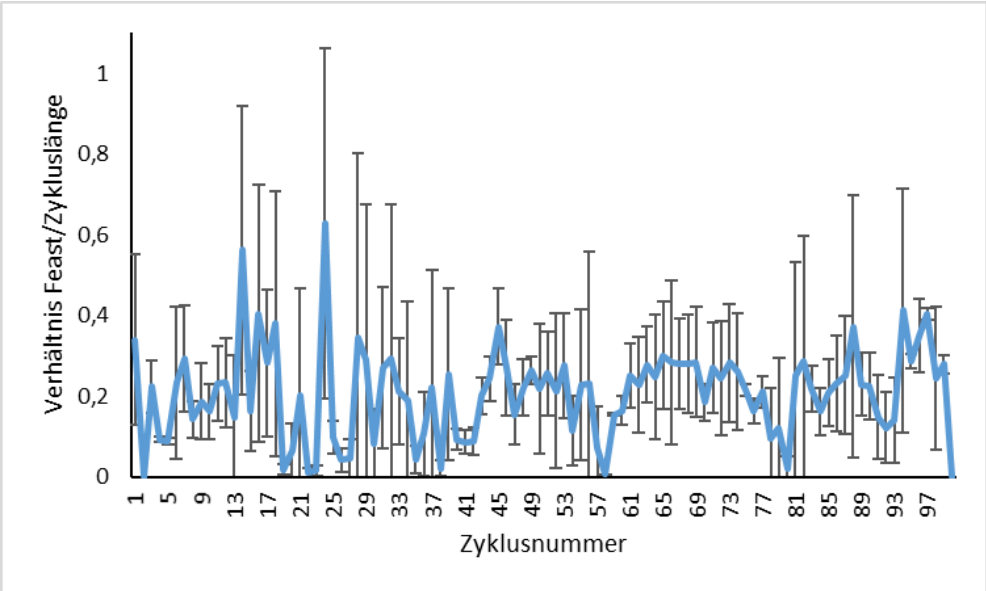


Abbildung 20: Verlauf des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des dritten Selektionsversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus allen drei Selektionsreaktoren.

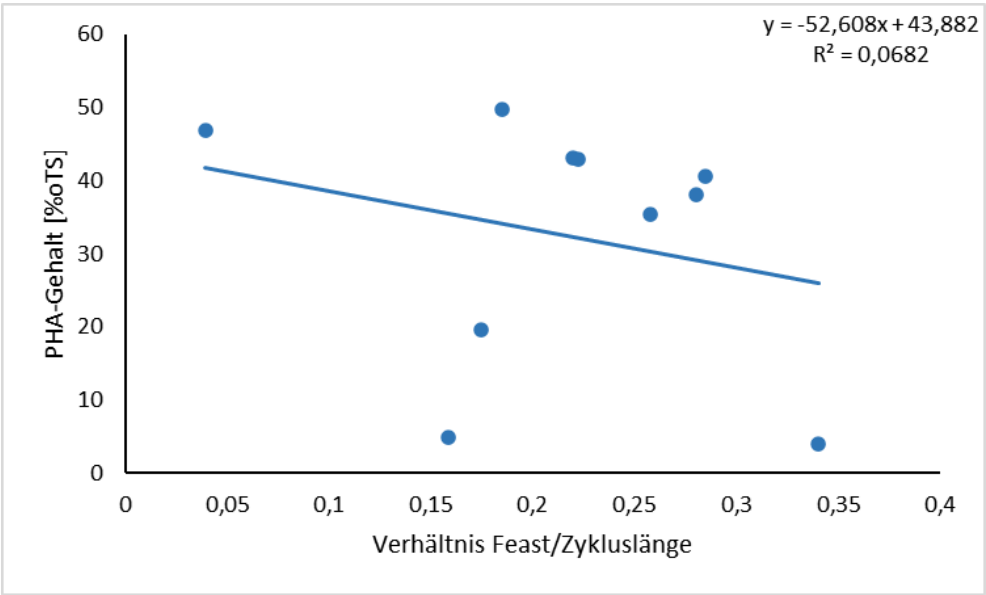


Abbildung 21: PHA-Gehalt in Abhängigkeit des Feast-zu-Zyklusverhältnisses während des dritten Selektionsversuches.

Im letzten Versuchsblock war ebenfalls eine hohe Variation in der Messbarkeit des Sauerstoffverlaufs zu verzeichnen, weshalb keine signifikante Veränderung der Feast-Länge im Vergleich zur Zykluslänge über den Versuchsverlauf zu beobachten war (Abbildung 20). Ebenfalls korrelierte diese nicht signifikant mit dem produzierten PHA-Gehalt ($S = 218$; $\rho = -0{,}3212121$; $p = 0{,}3677$) (Abbildung 21). Allerdings wird durch Abbildung 20 erkenntlich, dass schon zu Beginn eine kurze Dauer der Feast-Phase von zwischen 0,2 und 0,3 gegeben war, welches im in der Literatur empfohlenen Bereich liegt. Dies kann auf einen in dem Versuchsblock kontinuierlich hohen Selektionsdruck hinweisen.

4.2.1.4 Verlauf der PHA-Produktion

An den Tagen der Probennahme zur Bestimmung der Bakterienpopulation wurden ebenfalls Akkumulationen durchgeführt, um die PHA-Gehalte mit der zugehörigen Bakterienpopulation korrelieren und eine Aussage über die Effekte der Selektionsphase auf die PHA-Produktion treffen zu können. Nachfolgend sind die Verläufe der PHA-Produktion der drei Versuchsblöcke mit den unterschiedlichen Inokula dargestellt.

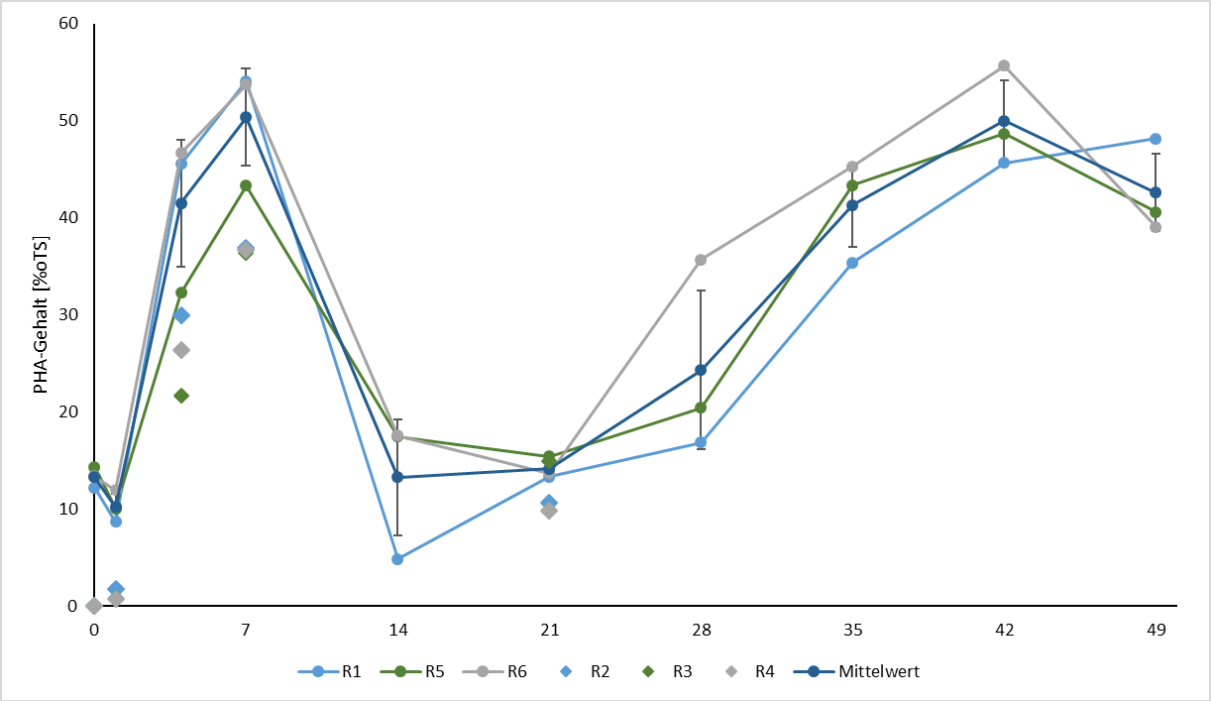


Abbildung 22: Verlauf des PHA-Gehaltes über die Versuchsdauer während des ersten Selektionsversuches.

Innerhalb des ersten Versuchsblockes konnte ein sehr paralleler Verlauf zwischen den drei Versuchsreaktoren festgestellt werden. Zudem konnte bereits nach einer Selektionsdauer von 7 Tagen ein mittlerer PHA-Gehalt von 50 % (± 5 %) erzielt werden (Abbildung 22). Jedoch gab es einen starken Einbruch in der PHA-Produktion nach Tag 7, dieser sank auf 13 % (± 6 %) an Tag 14 ab, stieg jedoch danach wieder kontinuierlich an, bis an Tag 42 erneut ein mittlerer Wert von 50 % (± 4 %) erreicht wurde. Der Einbruch nach Tag 7 war auf einen Betriebsfehler zurückzuführen, bei dem die pH-Regelung ausfiel und der pH-Wert aufgrund des Verbrauchs an Säuren innerhalb des synthetischen Substrates auf 12 anstieg. Das biologische System konnte sich jedoch wieder bis zum Erreichen der maximalen PHA-Produktion zu Beginn erholen, was für eine Stabilität des Prozesses spricht. Die höchsten PHA-Werte wurden an Tag 7 in Reaktor 1 mit 54 % und an Tag 42 in Reaktor 6 mit 56 % erreicht. Zudem wurden an den Tagen 0, 4, 7 und 21 PHA-Proben zu Beginn der Akkumulation analysiert, welches dem Ende der Famine-Phase entspricht. Zu diesem Zeitpunkt bestand die Annahme, dass der PHA-Gehalt Aufgrund des Verbrauchs der internen Speicher durch die Bakterien infolge des fehlenden Substrats minimal ist. Jedoch konnte hierbei festgestellt werden, dass sich die PHA-Gehalte zum Ende der Famine-Phase stark an die Werte nach Ende der Akkumulation annäherten. So betrugen diese am Ende der Famine-Phase beispielsweise an Tag 7 37, 36 und 37 % in den Reaktoren 1, 5 und 6, wobei nach weiteren 24 h der Akkumulation 54, 43 und 54 % erreicht wurden. Dies entspricht im Mittel einer Steigerung des PHA-Wertes um 42 % während der Akkumulationsphase.

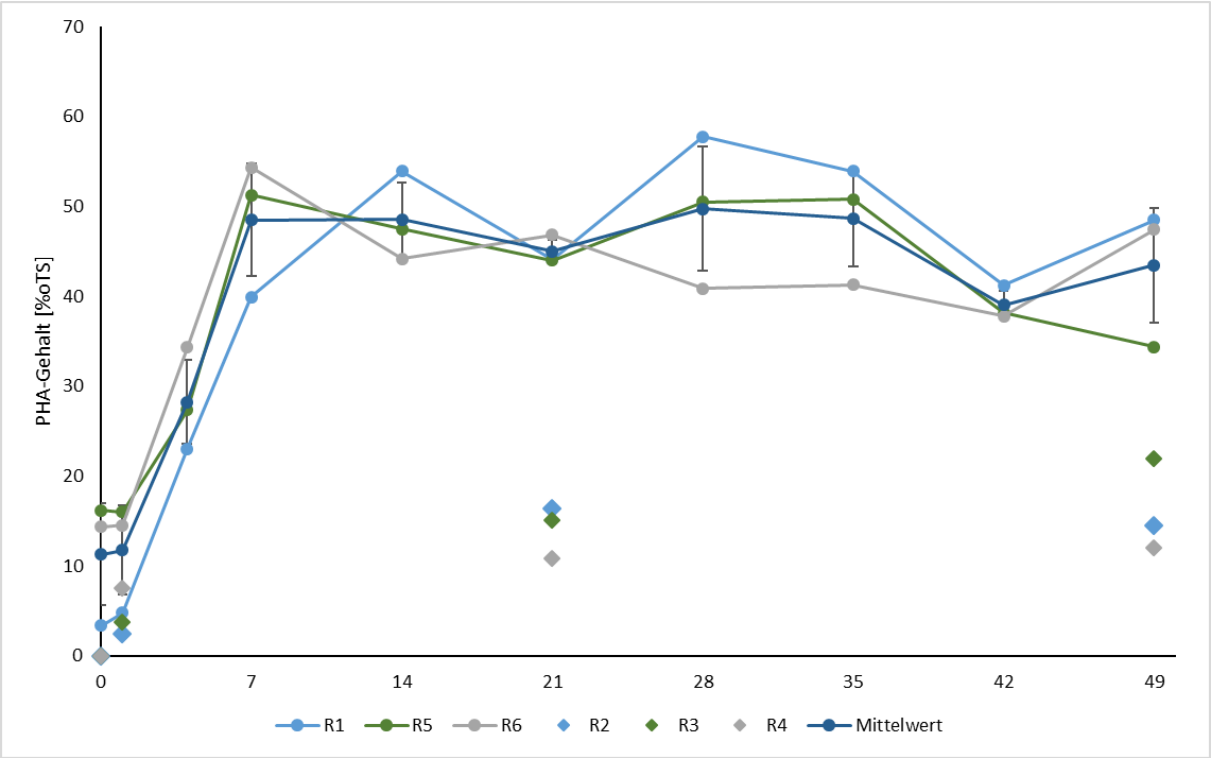


Abbildung 23: Verlauf des PHA-Gehaltes über die Versuchsdauer während des zweiten Selektionsversuches.

Während des zweiten Versuches mit dem Inokulum von der Kläranlage Bruchmühlbach-Miesau (Anlage mit Bio-P) konnte ebenfalls nach einer Selektionsdauer von 7 Tagen annähernd eine Plateau-Phase in der PHA-Produktion erreicht werden (Abbildung 23). Hierbei wurde ein mittlerer Gehalt von 49 % (± 6 %) erreicht. An Tag 28 wurde der insgesamt höchste mittlere Wert von 50 % (± 7 %) erzielt. Der insgesamt höchste PHA-Wert wurde an Tag 28 mit 58 % in Reaktor 1 erreicht. Trotz einiger leichter Schwankungen an den Tagen 21 und 42, an denen der PHA-Gehalt im Mittel auf 45 % (± 1 %) und 39 % (± 2 %) absank, konnte eine insgesamt stabile PHA-Produktion beobachtet werden. Das leichte Absinken des PHA-Gehaltes nach Tag 21 ist möglicherweise auf einen kurzzeitigen Stromausfall an der gesamten Anlage an diesem Tag zurückzuführen. Allerdings wies das System ein gewisses Maß an Stabilität auf, da dieser Einbruch wieder kompensiert werden konnte. An Tag 49 stieg der PHA-Gehalt wieder auf 43 % (± 6 %), was darauf hindeutet, dass sich die Biozönose wieder auf einem Wert im Bereich des maximalen Gehaltes einpendelte. In der Selektion konnte über die Dauer des Versuches ebenfalls ein leichter Anstieg der PHA-Produktion festgestellt werden (Abbildung 23), was ebenfalls auf eine Anreicherung an PHA-Produzenten innerhalb der Selektion hindeutet. Im Gegensatz zum ersten Versuch (Abbildung 22) konnte hierbei jedoch eine stärkere Steigerung der PHA-Produktion mit der Akkumulationsphase erreicht werden. So lag beispielsweise an Tag 21 der PHA-Gehalt am Ende der Famine-Phase im Mittel bei 14 % (± 2 %) und an Tag 49 bei 16 % (± 4). Dies entspricht einer Steigerung des PHA-Gehaltes mittels der Akkumulationsphase um 221 % und 177 %.

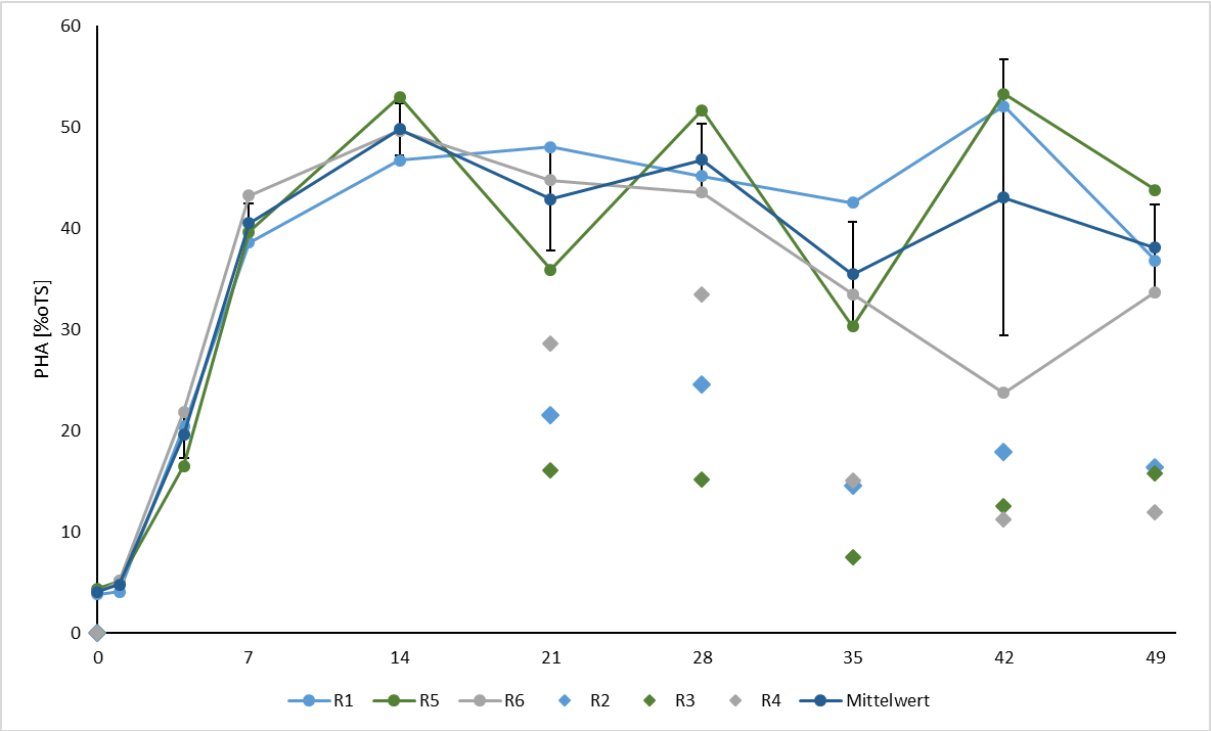


Abbildung 24: Verlauf des PHA-Gehaltes über die Versuchsdauer während des dritten Selektionsversuches.

Innerhalb des Versuches mit Inokulum 3 von der Kläranlage der Brauerei Homburg wurde nach einer Selektionsdauer von 14 Tage ein maximaler mittlerer PHA-Gehalt von 50 % (± 3 %) erreicht (Abbildung 24). Daran anschließend wurde bis zu Tag 28 eine relativ stabile Plateau-Phase der PHA-Produktion beobachtet. Bis zu diesem Zeitpunkt entwickelten sich die Verläufe der drei Reaktoren ebenfalls parallel. Es kam jedoch danach zunächst zu einem Absinken des PHA-Gehaltes in allen drei Reaktoren, was infolge eines kurzen Ausfalls der Anlage an Tag 20 zustande gekommen sein könnte. Jedoch kam es zu weiteren Schwankungen, beispielsweise in Reaktor 5, welche nicht durch Betriebsfehler verursacht wurden. Die Biozönosen in Reaktor 1 und 5 regenerierten sich bis zu Tag 42 wieder und pendelten sich erneut auf einem maximalen PHA-Gehalt von 52 % und 53 % ein. Dies war zugleich, der höchste Wert, der über den gesamten Versuch in Reaktor 1 erreicht wurde. In Reaktor 6 kam es aus nicht definierten Gründen zu einem Absinken der PHA-Produktion bis zu Tag 42. Danach stieg in diesem Reaktor der PHA-Gehalt ebenfalls wieder an. An Tag 49 lag der mittlere PHA-Gehalt bei 38 % (± 4 %). Die Replikate entwickelten sich zu diesem Zeitpunkt wieder zu einem parallelen Verlauf. Insgesamt kam es in diesem Versuchsblock zu einigen Schwankungen innerhalb der PHA-Produktion, allerdings lässt sich aufgrund der Verläufe, insbesondere auch in den anderen beiden Versuchsblöcken, annehmen, dass sich die hier untersuchten Biozönosen ebenfalls auf einem Plateau-Wert der PHA-Produktion einpendeln und es möglicherweise nach Tag 49 wieder zu einem Anstieg des PHA-Gehaltes auf den maximalen Wert gekommen wäre. Ab wann jedoch ein komplett stabiles System ohne große Schwankungen eingestellt werden kann, ist noch nicht abschließend klar. In diesem Versuchsblock konnte durch die Akkumulation ebenfalls eine stärkere Steigerung des PHA-Gehaltes erreicht werden als in Versuch 1. So waren beispielsweise an Tag 21 und 28 am Ende der Famine-Phase mittlere PHA-Werte von 22% (± 5 %) und 24 % (± 7 %) zu beobachten, welches im Vergleich zu den Mittelwerten am Ende der Akkumulation von 43 % (± 5 %) und 47 % (± 4 %) einer Steigerung von 95 % und 92 % entspricht.

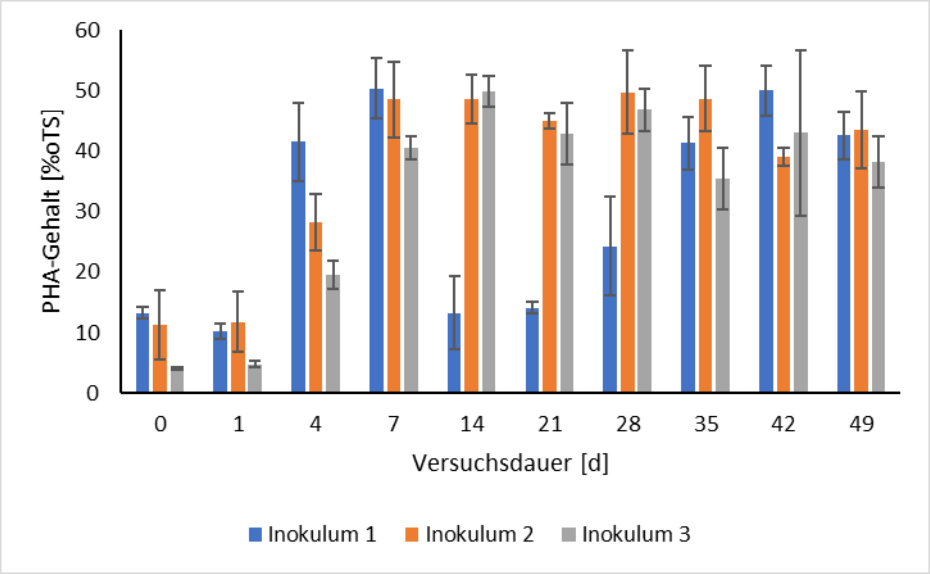


Abbildung 25: Vergleich der mittleren PHA-Gehalte aller drei Selektionsversuche über die Versuchsdauer.

Beim Vergleich der PHA-Gehalte aller drei Inokula zeigt sich, dass nach 7 bzw. 14 Tagen der Selektion, im Fall von Inokulum 3, bereits die höchste PHA-Produktion erreicht werden konnte (Abbildung 25). Zudem konnten mit allen drei Inokula ähnliche PHA-Gehalte erzielt werden. So waren beispielsweise die Maxima der ersten beiden Inokula an Tag 7 mit 50 % (± 5 %) und 49 % (± 5 %) und die Werte der Inokula 2 und 3 an Tag 14 mit 49 % (± 6) und 50 % (± 4 %) vergleichbar. Lediglich Inokulum 1 mit 13 % (± 6 %) an Tag 14 wich stark hiervon ab, was sich allerdings mit dem weiter oben beschriebenen generellen Einbruch der PHA-Produktion bei Versuch 1 nach Tag 7 erklären lässt (Abbildung 22). Nach 49 Tagen der Selektion wiesen alle drei Inokula ebenfalls ähnliche Werte mit 43 % (± 4 %), 43 % (± 6 %) und 38 % (± 4 %) auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass mit unterschiedlichen Inokula ähnliche PHA-Gehalte erzielt werden können, welche bereits nach 7 bis 14 Tagen der Selektion erreichbar sind. Bisher wurde eine längere Selektionsdauer von 30 bis 50 Tagen oder mehreren Monaten bis zum Einstellen eines maximalen PHA-Gehaltes bzw. einer stabilen Kultur angenommen (Huang et al. 2018; Carvalho et al. 2018; Nguyenhuynh et al. 2021). Zudem ließ sich durch die gezeigten Ergebnisse trotz einigen Schwankungen im Verlauf der PHA-Produktion in allen drei Versuchen jeweils eine gewisse Resilienz und Stabilität der Biozönose hinsichtlich der PHA-Produktion beobachten. Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Autoren, welche ebenfalls unter Veränderungen innerhalb der Biozönose stabile PHA-Gehalte verzeichnen konnten (Carvalho et al. 2018; Huang et al. 2018). Ob das System nach längerer Selektionsdauer ein noch höheres Maß an Stabilität mit weniger Schwankungen erreicht, lässt sich allerdings aus den hier durchgeführten Versuchen nicht abschließend beantworten.

4.2.1.5 Bakterienpopulation innerhalb der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Inokula

Zum Ende der Feast-Phase in der Selektion wurden DNA-Proben aus der Biomasse entnommen, welche zum Start der Akkumulationen genutzt wurde. Im Folgenden sind die mikrobielle Zusammensetzung auf Gattungsebene sowie die relative Abundanz an PHA-Produzenten für die drei unterschiedlichen Inokula dargestellt.

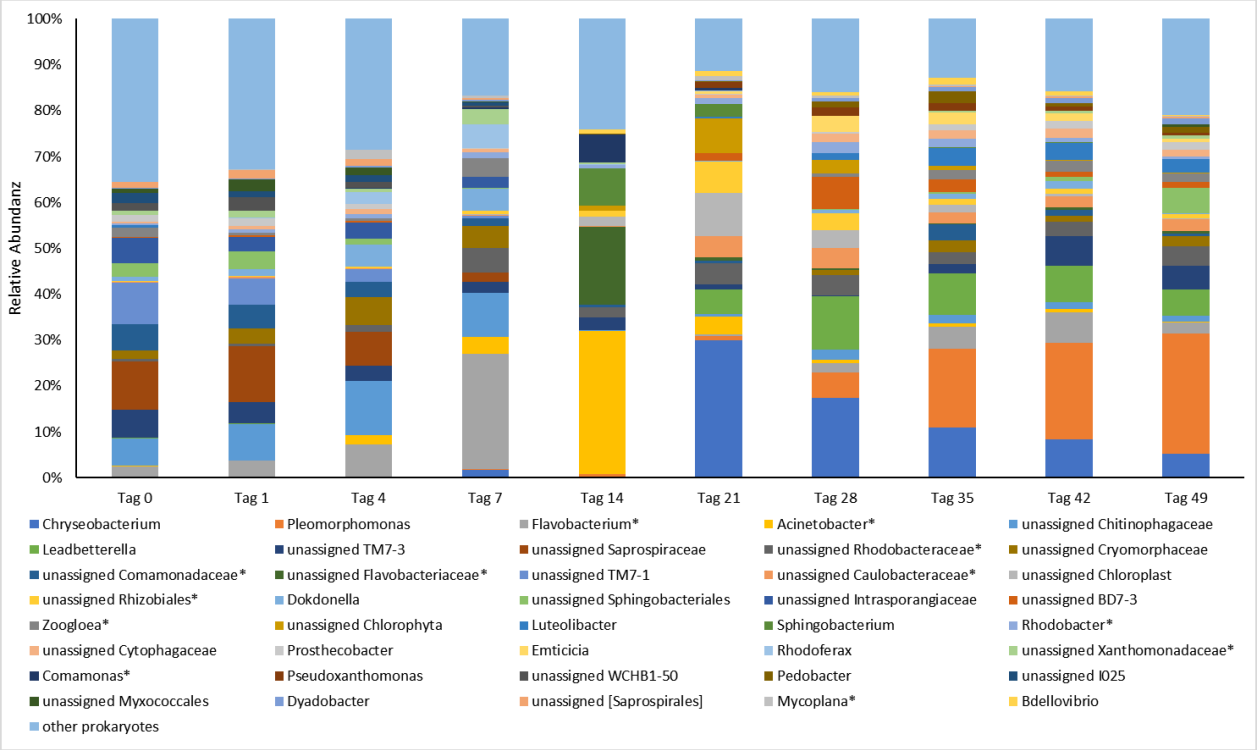


Abbildung 26: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des ersten Selektionsversuches; Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

Aus Abbildung 26 wird ersichtlich, dass es über den Selektionsverlauf von 49 Tagen hinweg drastische Veränderungen innerhalb der Bakteriengesellschaft des ersten Inokulums gab. Zu Beginn des Selektionsversuches waren die abundantesten Organismen Vertreter der Gruppen Saprospiraceae und TM-1 (10,5 und 9,1 %), jedoch nahmen diese bis zu Tag 7 in ihrer Abundanz ab (2,1 und 0,6 %), wobei die Gattung *Flavobacterium* (2,4 auf 25,1 %), ein potenzieller PHA-Produzent, eine starke Zunahme in ihrer relativen Abundanz zu verzeichnen hatte. An Tag 14 allerdings dominierte die Gattung *Acinetobacter* (31,2 %), welche ebenfalls ein möglicher PHA-Produzent ist. Auch Vertreter der Familie Flavobacteriaceae (17 %) waren zu diesem Zeitpunkt abundant, konnten allerdings nicht bis auf die Gattungsebene bestimmt werden. Es ist allerdings möglich, dass es sich dabei ebenfalls bzw. mitunter um die Gattung *Flavobacterium* handelte. An Tag 21 war wiederum ein starker Wechsel innerhalb der Bakteriengesellschaft zu verzeichnen. Die abundanteste Gattung zu diesem Zeitpunkt war *Chryseobacterium* (30 %), welche keine Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzt. Auch andere zu diesem Zeitpunkt häufigere Taxa wie nicht näher bestimmbare Chlorophyta (7,7 %) und Chloroplasten (9,4 %) sind nicht dazu in der Lage. Dieser Einbruch in der Abundanz an möglichen PHA-Produzenten ist ebenfalls in Abbildung 27 zu erkennen und wird im folgenden Abschnitt näher erläutert. Bis zu Tag 49 konnte eine stetige Abnahme der Gattung Chryseobacterium auf 5,2 % zugunsten einer Zunahme der Abundanz der Gattung Pleomorphomonas von 0,9 % an Tag 21 auf 26,2 % an Tag 49 beobachtet werden, welche ebenfalls keine Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzt. Die abundantesten potenziellen PHA-Produzenten zu diesem Zeitpunkt waren *Flavobacterium* (2,3 %), und nicht näher bestimmte Rhodobacteraceae (4,2 %) und Caulobacteraceae (2,5 %). Insgesamt waren mehr unterschiedliche

Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion, dafür allerdings mit einer jeweiligen geringen Abundanz zu verzeichnen, was ebenfalls aus Abbildung 27 hervorgeht. Keine Organismengruppe mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion konnte sich dominant durchsetzen.

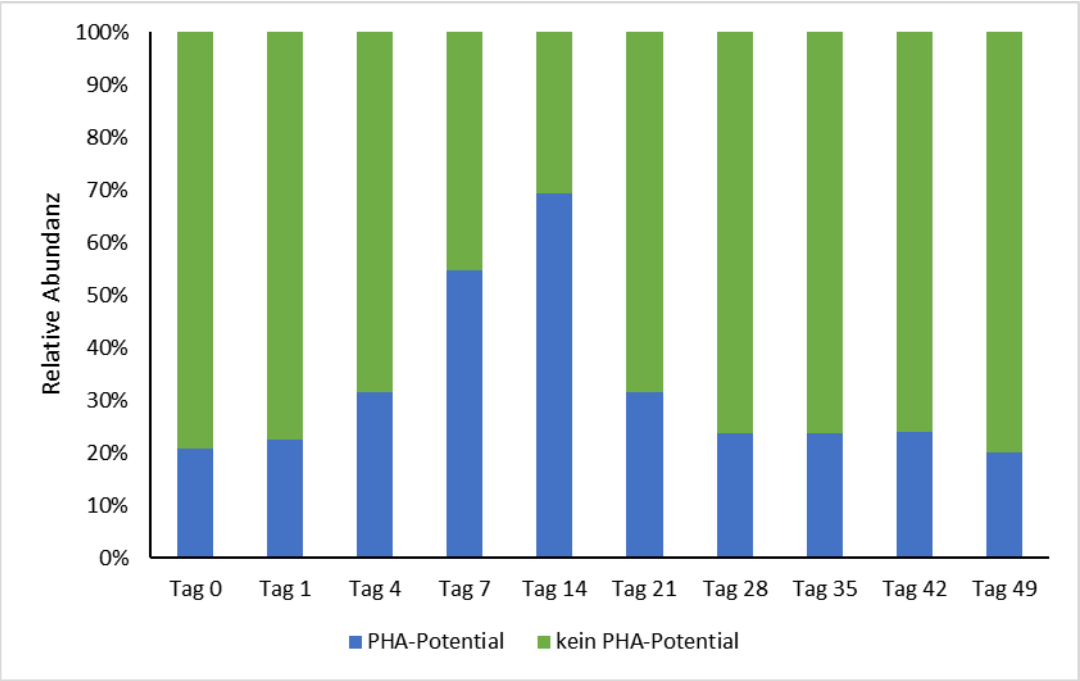


Abbildung 27: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während des ersten Selektionsversuches.

Abbildung 27 zeigt den Verlauf der zusammengefassten relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten über den ersten Selektionsversuch hinweg. Hierbei ist zu erkennen, dass eine starke Zunahme der relativen Abundanz von zu Beginn 20,7 % auf 69,2 % an Tag 14 erfolgte. Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, gab es dabei einen Wechsel von der Gattung *Flavobacterium* zu *Acinetobacter* als dominantesten PHA-Produzenten. Nach Tag 14 war eine starke Abnahme an potenziellen PHA-Produzenten auf 31,4 % zu verzeichnen, die sich bis zum Ende des Versuches nicht mehr erholte und zwischen 19,9 und 23,6 % lag. Neben diesem Einbruch in der relativen Abundanz an möglichen PHA-Produzenten war, wie in Kapitel 4.2.1.4 bereits beschrieben, ein Einbruch in der PHA-Produktion zu erkennen, welcher hiermit in Verbindung stehen könnte. Dabei zeigt jedoch die Bakterienpopulation eine verzögerte Reaktion im Vergleich zur PHA-Produktion, welche bereits an Tag 14 eingebrochen war (s. Abbildung 22). Dieser Einbruch in der Abundanz an PHA-Produzenten war vermutlich auf einen Betriebsfehler zurückzuführen, was eine Veränderung in der PHA-Produktion zur Folge hatte. Obwohl sich die relative Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten nicht mehr erholte und bei um die 20 %, wie zu Beginn des Versuches lag, pendelte sich der PHA-Gehalt wieder bei einem maximalen Wert von etwa 50 % ein. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nicht ausschließlich die Abundanz an PHA-Produzenten, sondern ebenfalls die Effektivität der PHA-Produktion bzw. der verwendete Metabolismus zur PHA-Produktion der jeweiligen Taxa für den erzielten PHA-Gehalt verantwortlich sind (Nguyenhuynh et al. 2021).

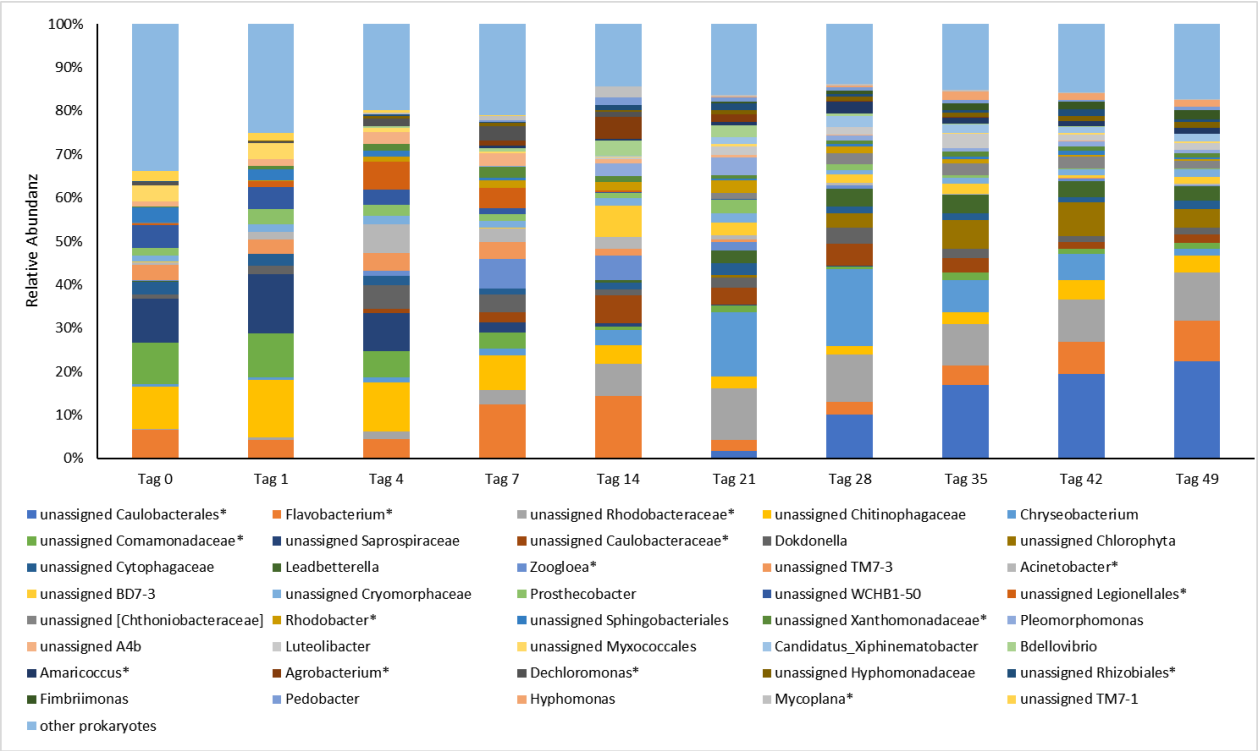


Abbildung 28: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des zweiten Selektionsversuches; Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

Auch im zweiten Selektionsversuch konnte eine stetige Veränderung der Zusammensetzung innerhalb der Bakteriengesellschaft festgestellt werden (Abbildung 28). Die zu Beginn abundantesten Taxa Chitionophagaceae (9,9 %), Comamonadaceae (9,6 %) und Saprospiraceae (10 %) nahmen bis zum Tag 21 stark ab (2,7 %, 1,5 % und 0,3 %) und waren danach in der Bakteriengesellschaft nicht mehr relevant zu beobachten. Dafür nahmen die Gattung *Flavobacterium* (von 6,5 auf 14,2 %) sowie die Familien Caulobacteraceae (von 0 auf 6,4 %) und Rhodobacteraceae (von 0,2 auf 7,5 %) bis zu Tag 14 in ihrer relativen Abundanz zu. Jedoch sank die relative Abundanz für die beiden Taxa *Flavobacterium* und Caulobacteraceae bis zu Tag 21 auf 2,4 und 3,9 % ab. An Tag 21 waren die abundantesten Organismen Vertreter der Familie Rhodobacteraceae (12 %) sowie die Gattung *Chryseobacterium* (14,8 %). Von Tag 21 bis Tag 49 nahm die Gattung *Flavobacterium* wieder in ihrer Abundanz auf 9,3 % zu. Außerdem war eine Zunahme der Ordnung Caulobacterales von diesem Zeitpunkt bis zum Ende des Versuches auf 22,3 % zu beobachten. Die nicht PHA-fähigen Taxa *Chryseobacterium* und Chlorophyta nahmen bis zum Ende des Versuches in ihrer Abundanz ab (1,7 und 4,5 % an Tag 49), sodass zu diesem Zeitpunkt die PHA-fähigen Taxa Cauobacterales (22,3 %), *Flavobacterium* (9,3 %) und Rhodobacteraceae (11,2 %) die Bakteriengesellschaft dominierten. Dies ist ebenfalls in der folgenden Abbildung erkennbar.

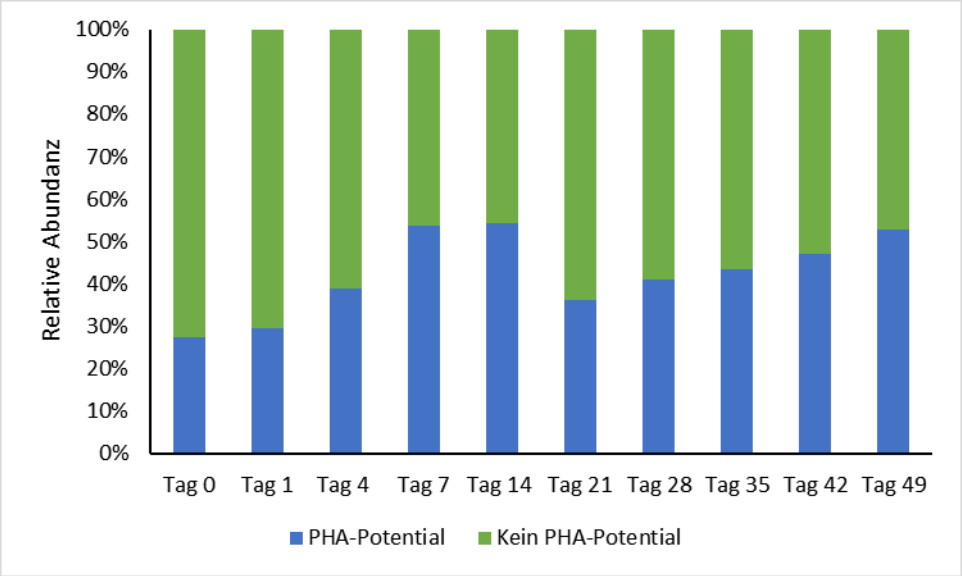


Abbildung 29: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während des zweiten Selektionsversuches.

Im zweiten Selektionsversuch war zunächst eine Zunahme der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten von 27,5 % an Tag 0 auf 54,2 % an Tag 14 zu beobachten (Abbildung 29). Danach kam es zu einer Abnahme der relativen Abundanz auf 36 % an Tag 21, welche sich bis zu Tag 49 wieder auf 52,7 % erholte. Eine leichte Abnahme im erzielten PHA-Gehalt war ebenfalls an Tag 21 zu beobachten, welche sich bis zum Ende des Versuches wieder auf einen annähernd maximalen Gehalt an Tag 49 einpendelte (s. Abbildung 23). Die Veränderung innerhalb der Biozönose, sowie der relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten sowie des PHA-Gehaltes an Tag 21 könnten, wie in Kapitel 4.2.1.4 bereits erwähnt, möglicherweise Folge eines Stromausfalls im Betrieb der Versuchsanlage gewesen sein. Jedoch lässt sich anhand der Ergebnisse eine gewisse Stabilität des Systems annehmen, da sich sowohl die relative Abundanz an möglichen PHA-Produzenten als auch der PHA-Gehalt wieder stabilisierten. Dies war der Fall obwohl, der zunächst abundanteste Organismus *Flavobacterium* infolge der Veränderungen innerhalb der Biozönose durch die Familie der Rhodobacteraceae als dominantester möglicher PHA-Produzent abgelöst wurde. Diese funktionelle Redundanz im PHA-Produktionsprozess konnte ebenfalls in einer Studie von Carvalho et al. (2018) festgestellt werden.

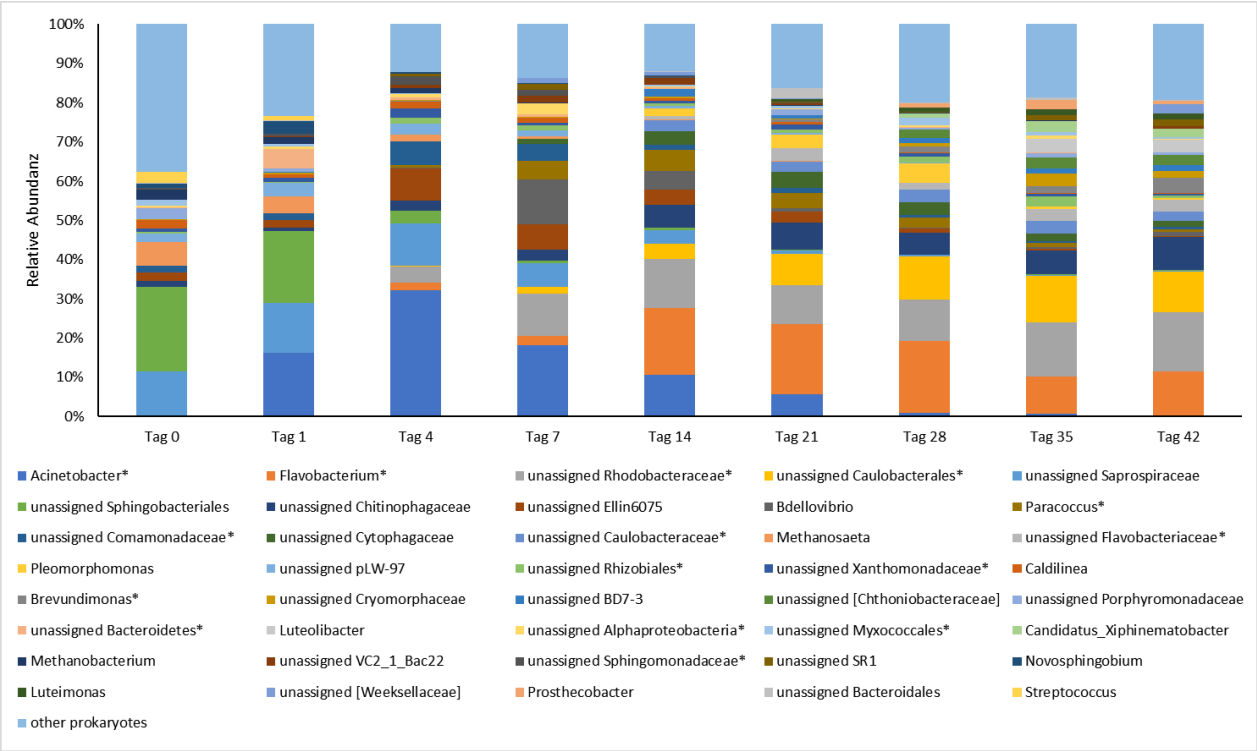


Abbildung 30: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des dritten Selektionsversuches; Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

Zu Beginn des dritten Selektionsversuches waren die Taxa Saprospiraceae (11,5 %), Sphingobacteriales (21,4 %) sowie *Methanosaeta* (6 %) die dominantesten Organismen. Jedoch konnten die PHA-fähige Gattung *Acinetobacter* sowie die Familie Comamonadaceae bis Tag 4 an Abundanz gewinnen (32, 4 und 6,1 %) (Abbildung 30). Diese sanken jedoch beide bis zum Ende des Versuches auf 0,3 und 0,8 % ab. An Tag 7 etablierte sich die Familie der Rhodobateraceae (10,7 %). Ebenfalls nahmen ab Tag 14 die Gattung *Flavobacterium*, die Ordnung Caulobacterales sowie die Familie der Chitinophagaceae in ihrer relativen Abundanz zu (16,8 %, 4 % und 5,8 %) und blieben bis zum Ende des Versuches relativ stabil. Die Gattung *Paracoccus* nahm von Tag 4 an zu und erreichte an Tag 14 eine relative Abundanz von 5,2 %, nahm jedoch bis zum Ende des Versuches wieder stetig ab (0,5 % an Tag 42). Die abundantesten Organismen an Tag 42 waren *Flavobacterium* (11,2 %), die Familie Rhodobacteraceae (15,2 %) und die Ordnung Caulobacterales (10,3 %), welche allesamt die Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzen, sowie die Familie Chitinophagaceae (8,6 %), welche nicht zur PHA-Produktion befähigt ist. Diese Beobachtungen spiegeln sich ebenfalls in der folgenden Abbildung in Form der relativen Abundanz der PHA-fähigen und nicht-PHA-fähigen Organismen wider.

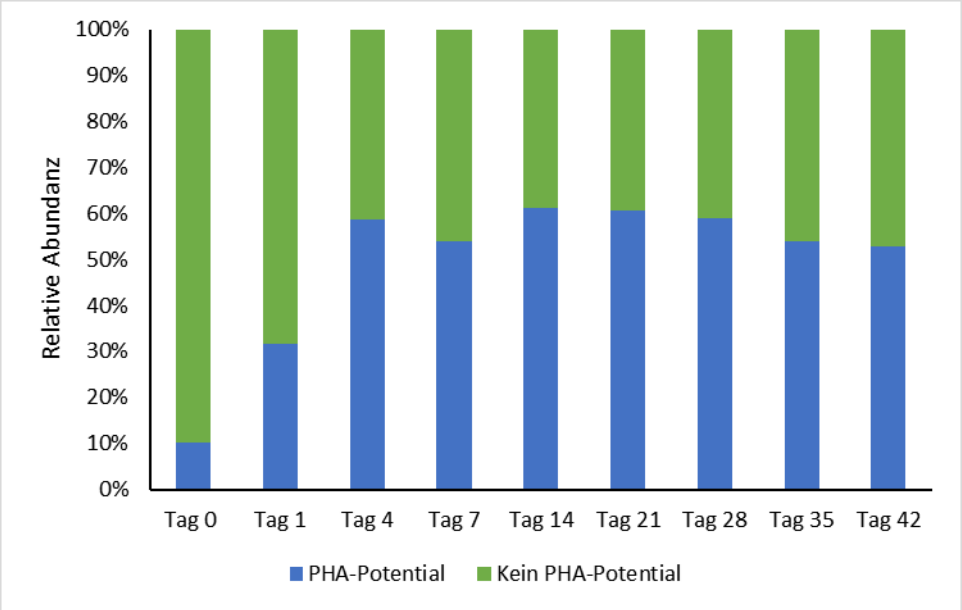


Abbildung 31: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während des dritten Selektionsversuches.

Zu Beginn des Versuches war mit 10,3 % eine im Gegensatz zu den anderen beiden Selektionsversuchen relativ niedrige Abundanz an PHA-fähigen Organismen zu verzeichnen (Abbildung 31). Diese stieg auf 58,8 % an Tag 4 an und verlief ab diesem Zeitpunkt mit leichten Schwankungen auf einem ähnlichen Niveau, wobei ein leichter Abwärtstrend bis zum Ende des Versuches hin auf 52,8 % zu verzeichnen war. Diese Schwankungen mit leichtem Abwärtstrend sind ebenfalls im PHA-Gehalt (s. Abbildung 24) zu erkennen.

Insgesamt konnten in allen drei Versuchen trotz Veränderungen innerhalb der Biozönose und Schwankungen in der relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten vergleichbare PHA-Gehalte erzielt werden und es konnte weiterhin festgestellt werden, dass sich das System auch nach Einbrüchen regenerieren konnte. Die wichtigsten PHA-fähigen Organismen in allen drei Versuchen gehörten zu den Familien der Rhodobacteraceae, der Caulobacteraceae sowie zu der Gattung *Flavobacterium*. Auch ein Wechsel innerhalb der dominanten PHA-Produzenten resultierte durch eine funktionelle Redundanz in vergleichbaren PHA-Gehalten und einer Stabilität des Systems. In allen drei Versuchen konnte zudem gezeigt werden, dass die Selektionsphase eine Anreicherung an PHA-Produzenten sowie eine Steigerung des PHA-Gehaltes zur Folge hat.

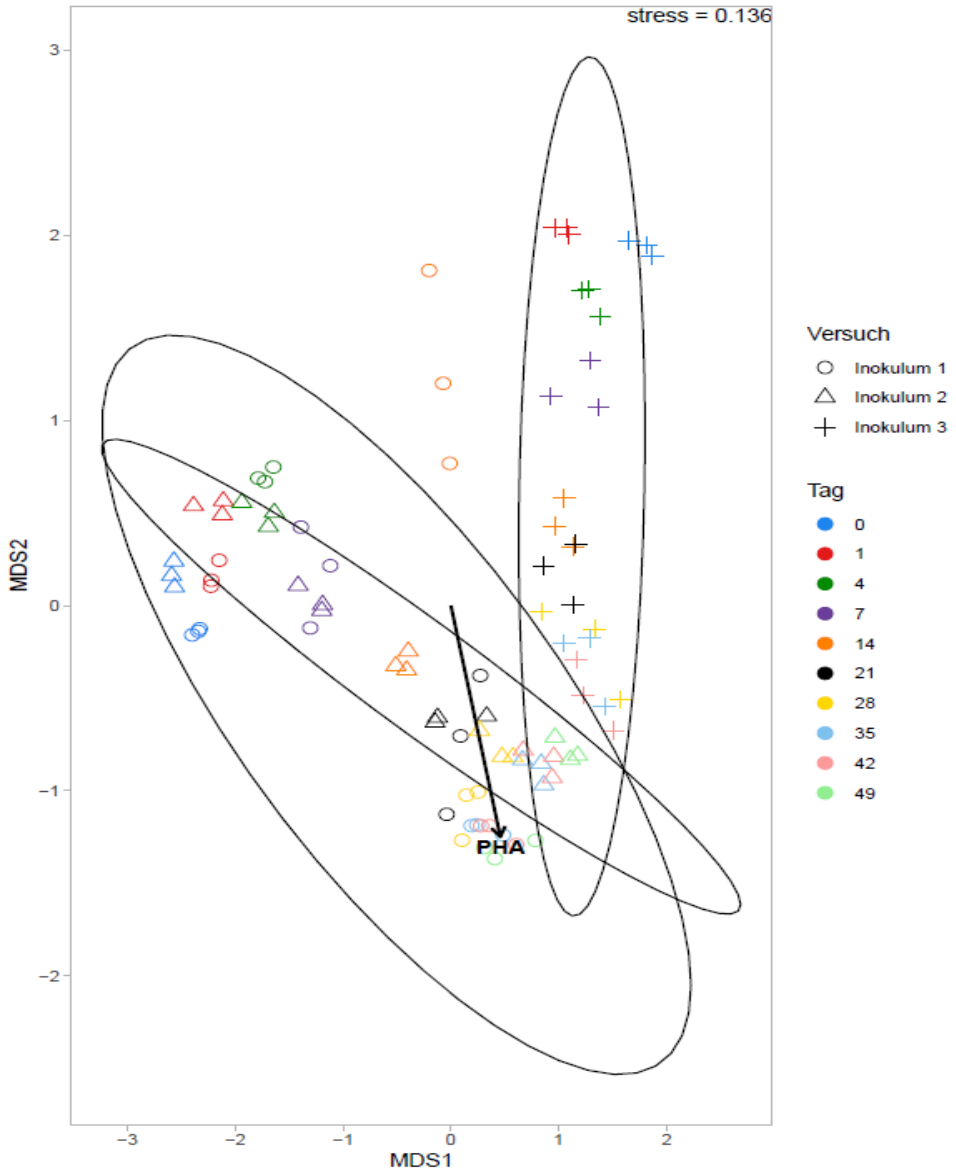


Abbildung 32: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Inokula.

Abbildung 32 zeigt eine nichtmetrische multidimensionale Skalierung aller drei Biozönosen der Selektionsversuche. Es ist zu erkennen, dass sich die Inokula der Versuche 1 und 2 zu Beginn relativ ähnlich waren, ersichtlich an der Nähe der blauen Punkte zu den blauen Dreiecken. Das Inokulum 3 hingegen, wies zu Beginn des Versuches eine sehr unterschiedliche Zusammensetzung zu den anderen beiden Inokula auf. Die Replikate (Versuchsreaktoren) entwickelten sich zumeist ähnlich. Die einzige Ausnahme bilden die Replikate des Versuches 1 an Tag 14 und 21. Diese liegen ebenfalls nicht bzw. nicht gänzlich in dem Cluster dieses Versuches. Allerdings war dies der Zeitpunkt in dem ein Betriebsfehler innerhalb des Versuches zu einer starken Veränderung innerhalb der Biozönose (s. Abbildung 26 und 27) sowie zu einem Einbruch in dem erreichten PHA-Gehalt (s. Abbildung 22) führte. Diese Veränderung wird hier ebenfalls widergespiegelt, allerdings kann auch die Erholung des Systems in dieser Abbildung beobachtet werden. Obwohl alle drei Inokula ihre eigenen Cluster bilden und sich somit zunächst unterschieden, kann aus der Abbildung entnommen werden, dass sie sich bis zu Tag 42 bzw. 49 alle in die gleiche Richtung entwickelten und in ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich wurden. Dieser zeitliche Verlauf, sowie die Veränderung der Biozönose stehen dabei in einem signifikanten Zusammenhang ($p < 0,5$) mit dem erzielten PHA-Gehalt, was an dem Vektor erkennbar ist.

Dieses Ergebnis zeigt, dass unterschiedliche Schlämme, mit unterschiedlicher Startzusammensetzung unter den gleichen Betriebsbedingungen sowie unter Selektion mit dem gleichen Substrat eine ähnliche Entwicklung zeigen, die in einer sehr ähnlichen Zusammensetzung des selektierten Inokulums resultiert und ebenfalls eine vergleichbare PHA-Produktion zur Folge hat.

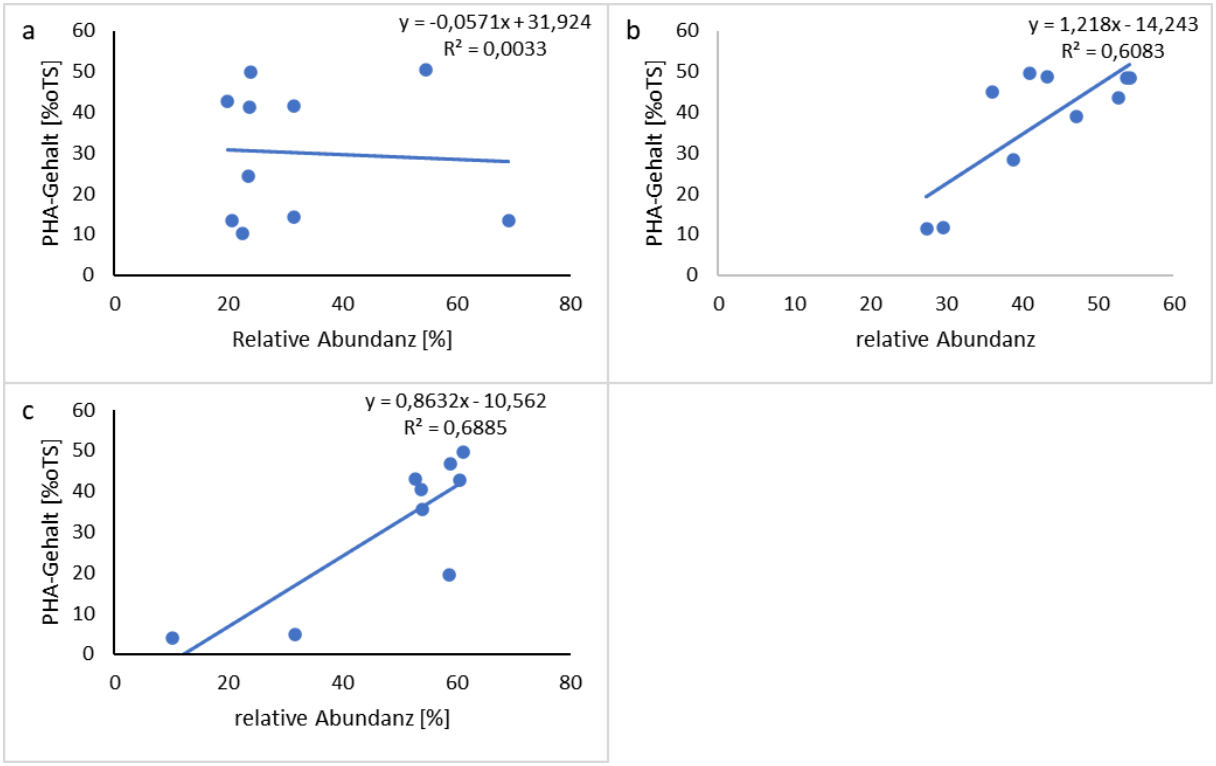


Abbildung 33: Zusammenhang des PHA-Gehaltes mit der relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten während der Selektionsversuche. a) Inokulum 1, b) Inokulum 2, c) Inokulum 3.

Abbildung 33 zeigt Regressionsgeraden des PHA-Gehaltes in Abhängigkeit zur relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten für die drei Selektionsversuche mit unterschiedlichen Inokula. Innerhalb des ersten Versuches (Abbildung 33 a) war kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem PHA-Gehalt und dem Anteil an PHA-Produzenten feststellbar (S = 140, ρ = 0,1515152, p = 0,6818). Dies lässt sich zum einen durch den Betriebsfehler mit daraus resultierendem Einbruch im PHA-Gehalt (s. Abbildung 22) und dem verzögerten Einbruch der relativen Abundanz an PHA-Produzenten (s. Abbildung 27) erklären. Andererseits könnte ein möglicher funktioneller Unterschied verschiedener Mikroorganismen bzw. eine unterschiedliche Effektivität in der PHA-Produktion resultierend aus sich unterscheidenden Metabolismen für die PHA-Produktion eine Ursache hierfür sein. Die beiden anderen Inokula (Abbildung 33 b und c) zeigen eine Zunahme des PHA-Gehaltes in Folge einer zunehmenden Abundanz potenzieller PHA-Produzenten, wobei dieser Zusammenhang für das Inokulum 2 nicht statistisch signifikant ist (S = 70, ρ = 0,5757576, p = 0,08777). Allerdings zeigt sich hier ein Trend mit einem Zusammenhang von 60,8 %. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die beobachteten Schwankungen im PHA-Gehalt und der Abundanz potenzieller PHA-Produzenten infolge eines Betriebsfehlers sein (s. Abbildung 23 und 29). Für das dritte Inokulum ist dieser Zusammenhang statistisch signifikant (S = 32, ρ = 0,7333333, p = 0,03112) und erklärt zu 68,85 % den Verlauf des PHA-Gehaltes.

Die relative Abundanz an möglichen PHA-Produzenten ist daher ein guter Indikator für eine gesteigerte PHA-Produktion, ist aber vermutlich nicht der einzige Grund für diese. Unterschiede im Stoffwechsel verschiedener Organismen sowie Schwankungen und Fehler im Betrieb können ebenfalls Ursachen hierfür sein.

4.2.2 Zwischenfazit

Die Untersuchungen zum Einfluss der Selektion und des Inokulums haben gezeigt, dass eine Selektionsphase zu einer Zunahme der PHA-Produzenten sowie der PHA-Produktion führt. Dies könnte mit einer Verkürzung der Feast-Phase über eine längere Selektionsphase in Zusammenhang stehen, welche einen zunehmenden Selektionsdruck auf die Bakteriengesellschaft ausübt. Es konnte mit zunehmender Selektionslänge ebenfalls ein Absinken der Feststoffkonzentration innerhalb der Reaktoren verzeichnet werden, welcher sich ungünstig auf die Produktivität des Systems auswirkt. Dies könnte möglicherweise Folge der Selektion mit einem Austrag an nicht-PHA-produzierenden Organismen aus dem System sein und sich innerhalb eines längeren Zeitraums durch eine Zunahme an PHA-Produzenten wieder regenerieren. Innerhalb der hier untersuchten Selektionsdauer war dies allerdings nicht zu verzeichnen. Zudem konnten teilweise bereits hohe PHA-Gehalte während der Selektion erreicht werden. Diese Beobachtung bedarf weiterer gezielter Untersuchungen, insbesondere während der Feast-Phase, in welcher der PHA-Gehalt maximal ist, da bei einem Erreichen maximaler PHA-Gehalte während der Selektionsphase möglicherweise auf den Schritt der Akkumulation verzichtet werden könnte. Dies würde zu einer Einsparung an Platz und Substrat führen und wäre daher von Vorteil. Andererseits ist eine intensive Untersuchung der Biozönose, ein Ansatzpunkt, um eine mögliche Verkürzung der Selektionsphase oder einen Verzicht auf diese zu erreichen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass mit unterschiedlichen Inokula durch eine Selektionsphase unter gleichen Randbedingungen eine ähnliche Zusammensetzung der Biozönose erreicht sowie ähnliche PHA-Gehalte erzielt werden können. Zudem war bis zum Erreichen des maximalen PHA-Gehalts mit den unterschiedlichen Biozönosen bereits eine Selektionsdauer von 7 bis 14 Tagen ausreichend. Alle drei Biozönosen wiesen außerdem eine funktionelle Redundanz und Stabilität in der PHA-Produktion über die Versuchsdauer auf. Ob eine höhere Stabilität der PHA-Produktion mit abnehmenden Schwankungen durch eine noch längere Selektionsdauer erreichbar ist, bleibt allerdings eine weitere interessante Fragestellung.

4.3 PHA-Produktion

4.3.1 Einfluss der VFA-Zusammensetzung und Konzentration

Neben den oben genannten Versuchsschwerpunkten wurden ab dem zweiten Versuchsblock weitere Untersuchungen zur PHA-Akkumulation ergänzt. Hierbei wurden verschiedene VFA-Zusammensetzungen und –Konzentration verwendet, um zu untersuchen, wie sich diese auf die PHA-Ausbeute- und Zusammensetzung auswirken. Aufgrund der begrenzten Anzahl von Reaktoren und dem erheblichen Mehraufwand zum Betrieb weiterer Selektionsreaktoren, wurde der selektierte Schlamm aus den oben genannten, laufenden Versuchen für die zusätzlichen Akkumulationen verwendet. Durch das molare Verhältnis von 1:1 von Essig- und Propionsäure im Substratfeed der Selektionsreaktoren, wird angenommen, dass die Bakterien sowohl aus organischen Säuren mit gerader als auch ungerader Anzahl von C-Atomen gleichermaßen PHA produzieren können. Ein Vorteil dadurch ist, dass damit gleichzeitig untersucht werden kann, inwiefern sich die PHA-Ausbeute und -Zusammensetzung ändert, wenn in der Selektion ein anderes Substrat als in der Akkumulation verwendet wird. Diese Betriebsweise könnte in einer künftigen technischen Umsetzung relevant sind, wenn es z.B. produktionsbedingt zu Schwankungen der Abwassercharakteristik kommt, die wiederum zu Schwankungen der produzierten VFA führen kann.

4.3.1.1 Einfluss der VFA-Zusammensetzung und -Konzentration auf den PHA-Gehalt

Im Folgenden wird zunächst betrachtet, wie sich unterschiedliche Substrate und Konzentrationen in Zusatzakkumulationen innerhalb der letzten beiden Versuchsblöcke auswirkten.

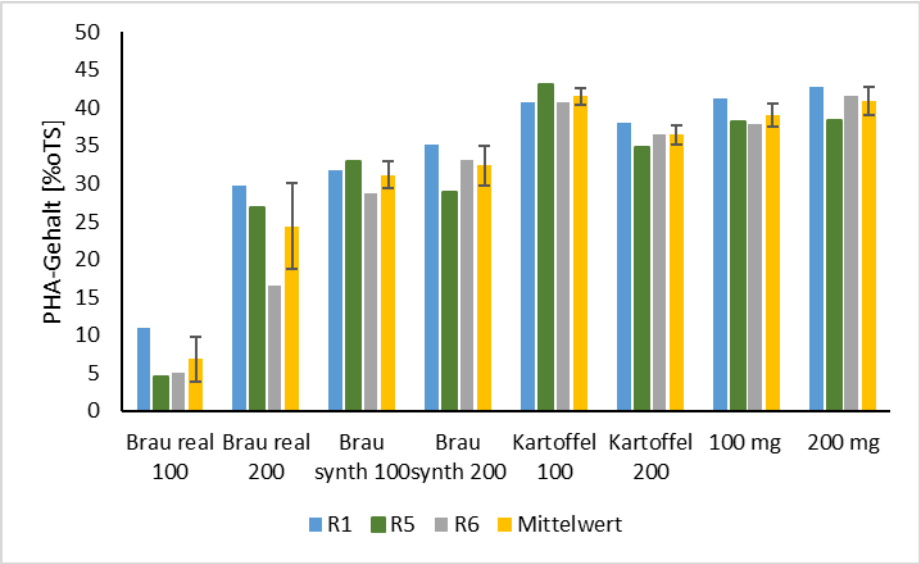


Abbildung 34: PHA-Gehalte der Akkumulationen mit unterschiedlichen Substraten innerhalb des zweiten Selektionsversuches.

Aus Abbildung 34 wird ersichtlich, dass bei Verwendung verschiedener Substrate zur PHA-Akkumulation innerhalb des Versuches 2 die Konzentration des Substrates, bis auf eine Ausnahme, keinen Einfluss auf den PHA-Gehalt hatte. So wurden unter Verwendung eines synthetischen Substrates mit Zusammensetzung eines versäuerten Brauereiabwassers bei einer Konzentration von 100 mg/L im Feed ein PHA-Gehalt von 31 % (± 2 %) und bei einer Konzentration von 200 mg/L ein Gehalt von 32 % (± 3 %) erzielt. Bei Zugabe eines synthetischen versäuerten Kartoffelabwassers zweier unterschiedlicher Konzentrationen von 100 und 200 mg/L wurden PHA-Gehalte von 42 % (± 1 %) und 36 % (± 1 %) erreicht. Die zusätzliche Akkumulation der Konzentration 200 mg/L mit dem synthetischen Substrat, welches für die unter 4.2.1.2 beschriebenen Versuche verwendet wurde, erfolgte an Tag 41, sodass die Standardakkumulation an Tag 42 unter Verwendung der 100 mg/L-Konzentration mit dieser vergleichbar war. In Abbildung 34 ist diese Akkumulation von Tag 42 zum anschaulicheren Vergleich ebenfalls dargestellt und als „100 mg“ bezeichnet. Mit der 100 mg/L-Konzentration wurde ein PHA-Gehalt von 39 % (± 2 %) und mit der 200 mg/L-Konzentration ein PHA-Gehalt von 41 % (± 2 %) erzielt. Lediglich bei Nutzung des realen Brauereiabwassers als Substrat konnten drastische Unterschiede in der PHA-Produktion festgestellt werden (Abbildung 34). Mit der Substratkonzentration von 100 mg/L ergab sich ein PHA-Gehalt von 7 % (± 3 %), wohingegen mit der doppelt so hohen Substratkonzentration 24 % (± 6 %) PHA produziert wurden. Die unterschiedlichen Substrate erzielten zudem ebenfalls keine drastischen Unterschiede im Gehalt an produziertem PHA, diese lagen zwischen etwa 30 und 40 %. Bei Verwendung des realen Substrates wurde jedoch ein geringerer PHA-Gehalt von maximal 24 % (± 6 %) erreicht. Eine Erklärung hierfür und zudem für die Unterschiede im PHA-Gehalt zwischen der Verwendung der beiden realen Substrate unterschiedlicher Konzentration könnte möglicherweise im Anteil an nicht-VFA-CSB im Substrat liegen, der von den PHA-Produzenten weniger effektiv für den Stoffwechsel genutzt werden kann. Die Biozönose war zudem mittels eines synthetischen Substrates selektiert worden und daher nicht an ein komplexeres Medium adaptiert. Eine PHA-Produktion war jedoch trotzdem möglich. Daher wäre eine verbesserte PHA-Ausbeute unter Verwendung eines realen Substrates bereits in der Selektionsphase möglicherweise erreichbar.

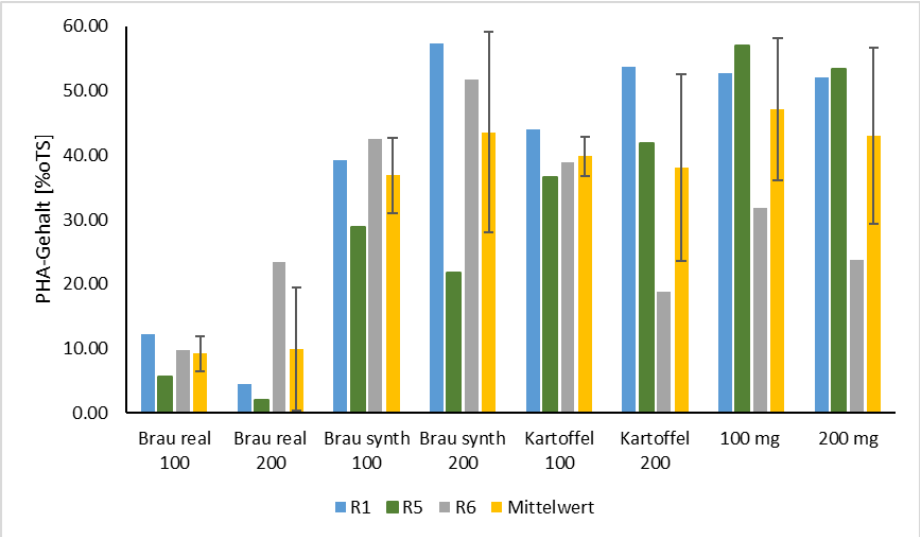


Abbildung 35: PHA-Gehalte der Akkumulationen mit unterschiedlichen Substraten innerhalb des dritten Selektionsversuches.

Die Ergebnisse der Zusatzakkumulationen während des dritten Versuchsblockes waren ähnlich zu denen des zweiten Versuchsblockes (Abbildung 34, Abbildung 35). In diesem Fall konnte jedoch bei keinem Substrat eine Auswirkung der unterschiedlichen Substratkonzentrationen auf den PHA-Gehalt festgestellt werden (Abbildung 35). Unter Zugabe des realen Brauereiabwassers wurden PHA-Gehalte von 9 % (± 3 %) und 10 % (± 10 %) bei den Konzentrationen 100 mg/L und 200 mg/L erreicht, wobei jedoch zu beachten ist, dass bei der höheren Konzentration eine hohe Variation zwischen den Reaktoren festgestellt werden konnte. Mit den beiden Substratkonzentrationen von 100 und 200 mg/L des synthetischen Brauereiabwassers konnten PHA-Werte von 37 % (± 6 %) und 44 (± 16 %) beobachtet werden. Mithilfe des synthetischen Kartoffelabwassers wurden bei 100 mg/L 40 % (± 3 %) und bei 200 mg/L 38 % (± 15 %) PHA festgestellt. Die Zusatzakkumulation für das Standardsubstrat mit 200 mg/L wurde ebenfalls einen Tag vor der standardmäßigen Akkumulation mit 100 mg/L durchgeführt. Bei diesem Substrat konnte bei der niedrigeren Konzentration ein PHA-Gehalt von 43 % (± 11 %) und bei der höheren Konzentration ein PHA-Gehalt von 47 % (± 14 %) gefunden werden. Somit lagen die PHA-Werte in diesem Versuchsblock ebenfalls bei allen synthetischen Substraten in einem Bereich zwischen ca. 35 bis 45 % und sind damit vergleichbar mit den Werten von 30 bis 40 % der Zusatzakkumulationen mit dem zweiten Inokulum, wenngleich sie ein wenig höher sind. Abschließend lässt sich sagen, dass bei Verwendung synthetischer Substrate weder die Konzentration noch die Art des Substrates einen wesentlichen Einfluss auf die Höhe des PHA-Gehaltes hatten. Zudem waren die erreichten PHA-Gehalte zwischen den beiden Inokula ebenfalls in einem vergleichbaren Bereich. Daher lässt sich annehmen, dass eine stabile PHA-Produktion unter Substratschwankungen möglich ist. Lediglich bei der Verwendung des realen Substrates wurden geringere PHA-Gehalte erzielt und diese schwankten ebenfalls zwischen den beiden Konzentrationen und Inokula. Im Rahmen der Versuche zur Kopplung der Verfahrensschritte in Arbeitspaket 5 wird daher untersucht, ob unter Verwendung des gleichen realen Substrates in der Selektions- und in der Akkumulationsphase eine Akklimatisierung der Biozönose an das komplexere Substrat und damit eine höhere PHA-Produktion erreicht werden kann.

4.3.1.2 Einfluss der VFA-Zusammensetzung und -Konzentration auf die PHA-Zusammensetzung

In den oben beschriebenen unterschiedlichen Versuchen zur PHA-Produktion wurde neben dem Gehalt an PHA in der Biomasse ebenfalls dessen Zusammensetzung untersucht. Nachfolgend ist diese in Verbindung mit der Zusammensetzung des Substrates dargestellt.

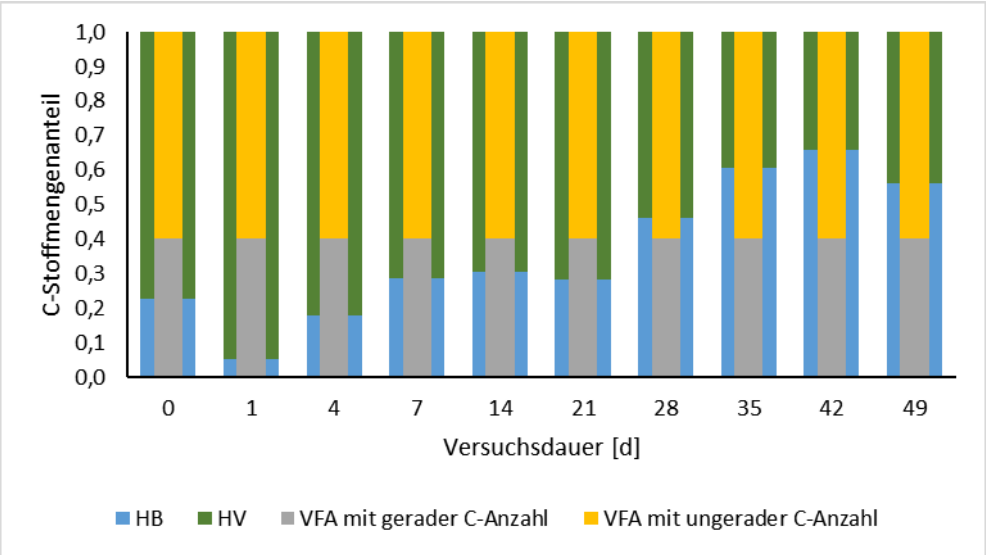


Abbildung 36: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während des ersten Selektionsversuches.

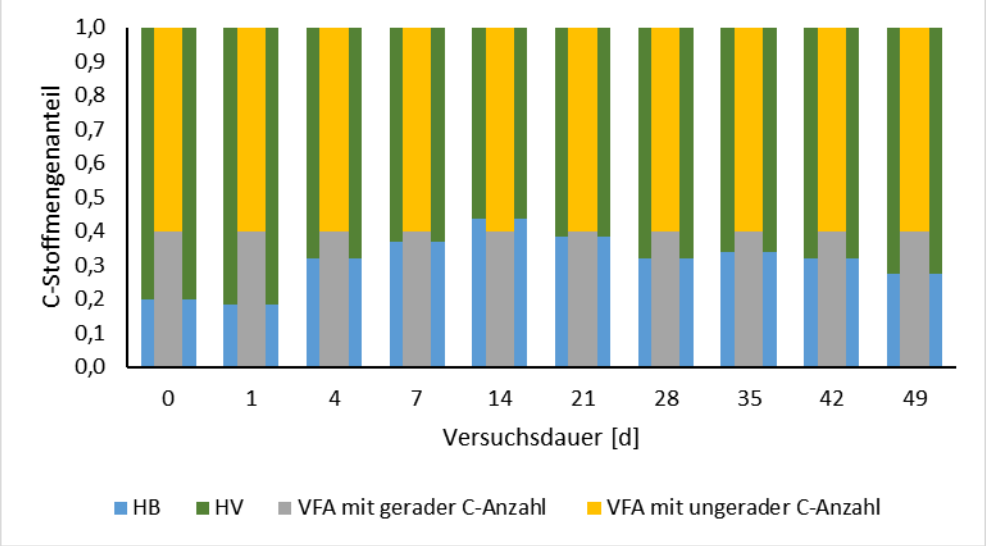


Abbildung 37: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während des zweiten Selektionsversuches.

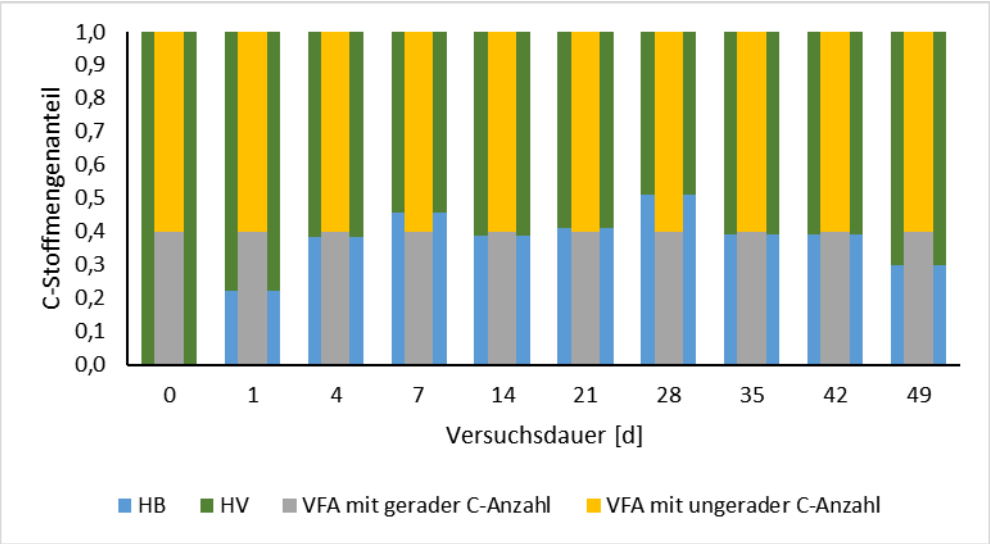


Abbildung 38: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während des dritten Selektionsversuches.

Innerhalb der unter 4.2.1.2 bereits beschriebenen Selektionsversuche konnte festgestellt werden, dass sich die PHA-Zusammensetzung des in den Akkumulationen produzierten PHAs mit zunehmender Selektionsdauer veränderte. So nahm in Versuch 1 der Anteil an HB im Polymer mit zunehmender Selektionsdauer fast durchgehend zu (Abbildung 36). An den Tagen 0, 1 und 4 lag der HV-Anteil mit 0,77, 0,95 und 0,82 noch deutlich über dem HB-Anteil, obwohl das C-molare Verhältnis der Säuren mit ungerader und gerader Anzahl an C-Atomen in dem verwendeten synthetischen Substrat immer bei 0,6 zu 0,4 lag. An den Tagen 35, 42 und 49 dominierte hingegen der HB-Anteil mit 0,61, 0,66 und 0,56 gegenüber dem HV-Anteil. Im zweiten Versuch stieg der Anteil an HB im Polymer zunächst von 0,2 an Tag 0 auf 0,44 an Tag 14 an und sank danach bis Tag 28 wieder leicht auf 0,32 ab, wo sich der Wert relativ stabil einpendelte. Damit überwog in diesem Versuch nach längerer Selektionsdauer der Anteil an HV mit etwa 70 %, obwohl dieser im Substrat nur bei 60 % lag (Abbildung 37). Im dritten Versuch lag der Anteil an HV im Polymer zu Beginn zunächst bei 100 % und sank bis zum vierten Tag auf einen Anteil von 0,61 ab (Abbildung 38). Mit leichten Schwankungen an Tag 7 und 28 stellte sich dieses Verhältnis über den Versuch hinweg ein. Dies entsprach daher zumeist der Zusammensetzung des eingesetzten Substrates. Am letzten Versuchstag überwog allerdings ebenfalls der HV-Anteil mit 0,7 im Gegensatz zu dem Substrat mit 0,6. Es ist daher davon auszugehen, dass nicht allein die Zusammensetzung des Substrates die Zusammensetzung des produzierten Polymers bedingt. Die Art des Inokulums und die Selektionsdauer scheinen ebenfalls Einfluss auf diese zu nehmen. Dies spricht dafür, dass die Zusammensetzung der Biozönose und die Vielfalt an unterschiedlichen Stoffwechselwegen Auswirkungen auf die Zusammensetzung des hergestellten PHAs haben. So ist aus Untersuchungen mit Reinkulturen bekannt, dass es drei hauptsächliche Stoffwechselwege zur Produktion von PHAs in Mikroorganismen gibt, wobei unterschiedlichen Bakterien zur Nutzung unterschiedlicher Wege befähigt sind. Zudem hat das verwendete Substrat Einfluss darauf, welche in den Stoffwechsel involvierten Gene innerhalb der Organismen aktiviert werden, sodass sie sich an die äußeren Bedingungen anpassen können (Nguyenhuynh et al. 2021). Weiterhin besitzen unterschiedliche Bakterien verschiedene Substratpräferenzen (Albuquerque et al. 2013), sodass die Bakterienzusammensetzung und somit ebenfalls die PHA-Zusammensetzung durch diese beeinflusst werden kann.

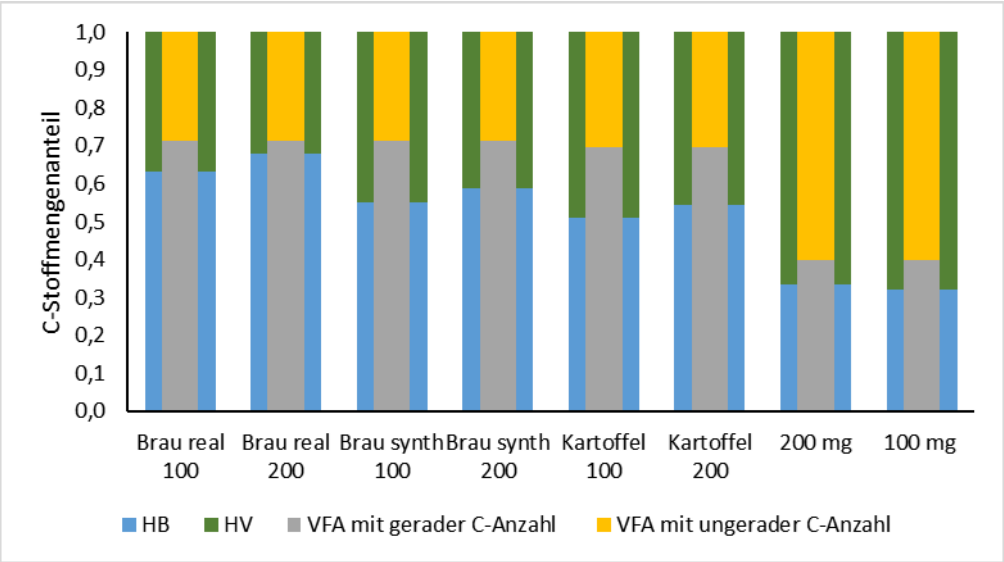


Abbildung 39: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während der Zusatzakkumulationen des zweiten Selektionsversuches.

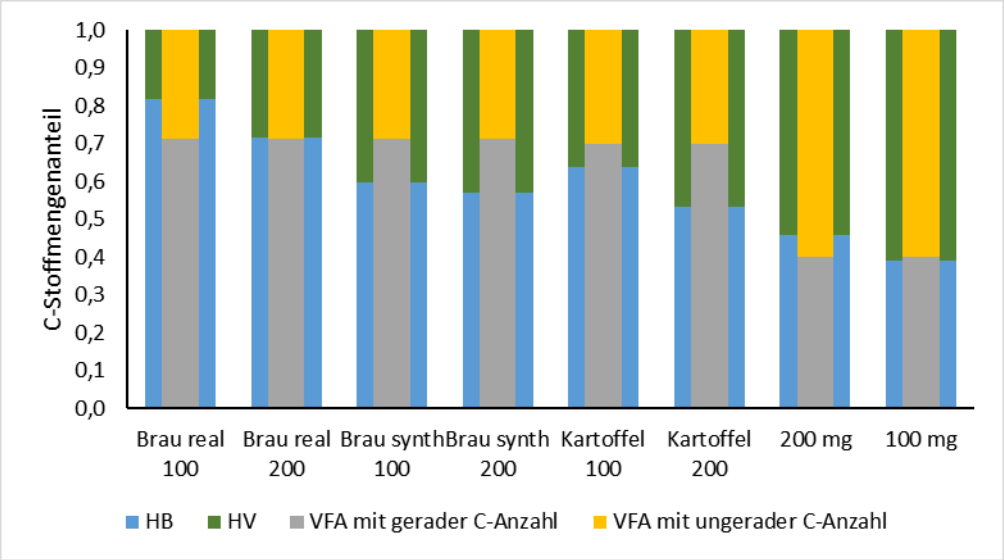


Abbildung 40: Zusammensetzung des Substrates und des produzierten PHAs während der Zusatzakkumulationen des dritten Selektionsversuches.

Die Ergebnisse der PHA-Zusammensetzung aus den PHA-Produktionsversuchen mit unterschiedlichen Substraten und Konzentrationen stützen diese Beobachtung (Abbildung 39, Abbildung 40). Bei Verwendung des Inokulums 2 war bei allen Substraten und Konzentrationen eine Tendenz zu einem höheren HV-Anteil innerhalb des Polymers im Vergleich zum Anteil der hinzugegebenen Säuren mit ungerader Anzahl an C-Atomen zu verzeichnen (Abbildung 39). Zudem gab es eine leichte Tendenz zu einem höheren HV-Anteil bei den niedrigeren Substratkonzentrationen im Vergleich zu den höheren Substratkonzentrationen. Bei Verwendung des realen Brauereiabwassers als Substrat lag der Anteil an HV am produzierten Polymer bei einer Substratkonzentration von 100 mg/L bei 0,37 und bei einer Konzentration von 200 mg/L bei 0,32. Bei Verwendung des synthetischen Brauereiabwassers lagen diese bei 0,45 und 0,41, wobei sowohl bei dem realen als auch bei dem synthetischen Substrat ein C-molarer Anteil von 0,29 der VFA mit ungerader Anzahl an C-Atomen im Substrat verwendet wurde. Bei dem synthetischen Kartoffelabwasser lag dieser Anteil im Substrat bei einem ähnlichen Wert von 0,3. Unter Verwendung dieses Substrates lag der Anteil an HV im produzierten PHA bei einer

Substratkonzentration von 100 mg/L bei 0,49 und bei einer Konzentration von 200 mg/L bei 0,46. Das standardmäßig verwendete synthetische Substrat besaß einen Anteil an ungeraden VFA von 0,6. Allerdings wies das daraus produzierte PHA einen HV-Anteil von 0,68 bei 100 mg/L und 0,67 bei 200 mg/L auf. Im dritten Versuch lag der Anteil an HV im produzierten Polymer mit 0,18 bei 100 mg/L und 0,28 bei 200 mg/L bei Verwendung des realen Brauereiabwassers knapp unter dem Anteil der ungeraden VFA im Substrat (Abbildung 40). Ähnlich wie bei Inokulum 2 lagen die HV-Anteile mit 0,4 und 0,43 und 0,36 und 47 bei 100 bzw. 200 mg/L des synthetischen Brauerei- sowie des Kartoffelabwassers über den Anteilen an ungeraden VFA im Substrat (Abbildung 39). Bei dem Standardsubstrat ergaben sich HV-Anteile von 0,54 für die höhere Substratkonzentration und 0,61 für die niedrigere Substratkonzentration. Insgesamt konnte kein klarer Einfluss der Konzentration auf die Zusammensetzung festgestellt werden. Der höchste HV-Anteil konnte bei beiden Inokula mit Zugabe des synthetischen Standardsubstrates erreicht werden, welches ebenfalls den höchsten Anteil an ungeraden VFA innerhalb des Substrates enthielt. Unter Verwendung des synthetischen Brauereiabwassers konnten ähnlich hohe HV-Anteile erzielt werden wie bei Verwendung des synthetischen Kartoffelabwassers (Abbildung 39, Abbildung 40). Somit lässt sich zusammenfassen, dass sowohl die Art des Substrates als auch die Dauer der Selektionsphase einen Einfluss auf die Polymerzusammensetzung haben können. Allerdings wird diese nicht allein durch das Substrat bestimmt und kann nicht gänzlich mit dessen Zusammensetzung vorausgesagt werden. Dies ist vermutlich Resultat unterschiedlicher Stoffwechselvorgänge innerhalb der Biozönose.

4.3.2 Zwischenfazit

Aus den Versuchen zum Einfluss der VFA-Konzentration und -Zusammensetzung auf die PHA-Produktion lässt sich feststellen, dass weder die Konzentration noch die Art des Substrates einen wesentlichen Einfluss auf die Höhe des PHA-Gehaltes hatten. Außerdem waren die PHA-Gehalte zwischen den beiden Inokula in einem vergleichbaren Bereich. Daher lässt sich annehmen, dass eine stabile PHA-Produktion auch unter Substratschwankungen oder Änderung des Substrates möglich ist. Lediglich bei der Verwendung des realen Substrates wurden geringere PHA-Gehalte erzielt. Aufgrund der Ergebnisse des synthetischen Brauereiabwassers wird allerdings angenommen, dass unter Verwendung des gleichen realen Substrates in der Selektionsphase eine Akklimatisierung der Biozönose an das komplexere Substrat und damit eine höhere PHA-Produktion ermöglicht werden könnte. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Zusammensetzung des produzierten PHAs eine ähnliche Tendenz hat, wie die Zusammensetzung des Substrates, aber nicht nur von dieser abhängt. So hatten sowohl die Selektionsdauer als auch die Art des Substrates Einfluss auf die Polymerzusammensetzung. Ein wichtiger Faktor bei dieser Beobachtung ist vermutlich die Zusammensetzung der Biozönose und die zur PHA-Produktion verwendeten Stoffwechselwege der unterschiedlichen Organismen.

4.4 Kopplung der Verfahrensstufen

4.4.1 Variation der Raumbelastung

Um die Prozesskette schrittweise und beispielhaft mit einem Abwasser zu schließen, wurde für diesen Versuchsteil synthetisches Brauereiabwasser zur Selektion und Akkumulation verwendet. Die VFA-Zusammensetzung des Feeds für die Selektion und Akkumulation wurde ausgehend von der Versäuerungsergebnissen für die Versuche in Abschnitt 4.3 verwendet. Für den Feed in der Akkumulation wurden 100 mg/(L Feed) gewählt.

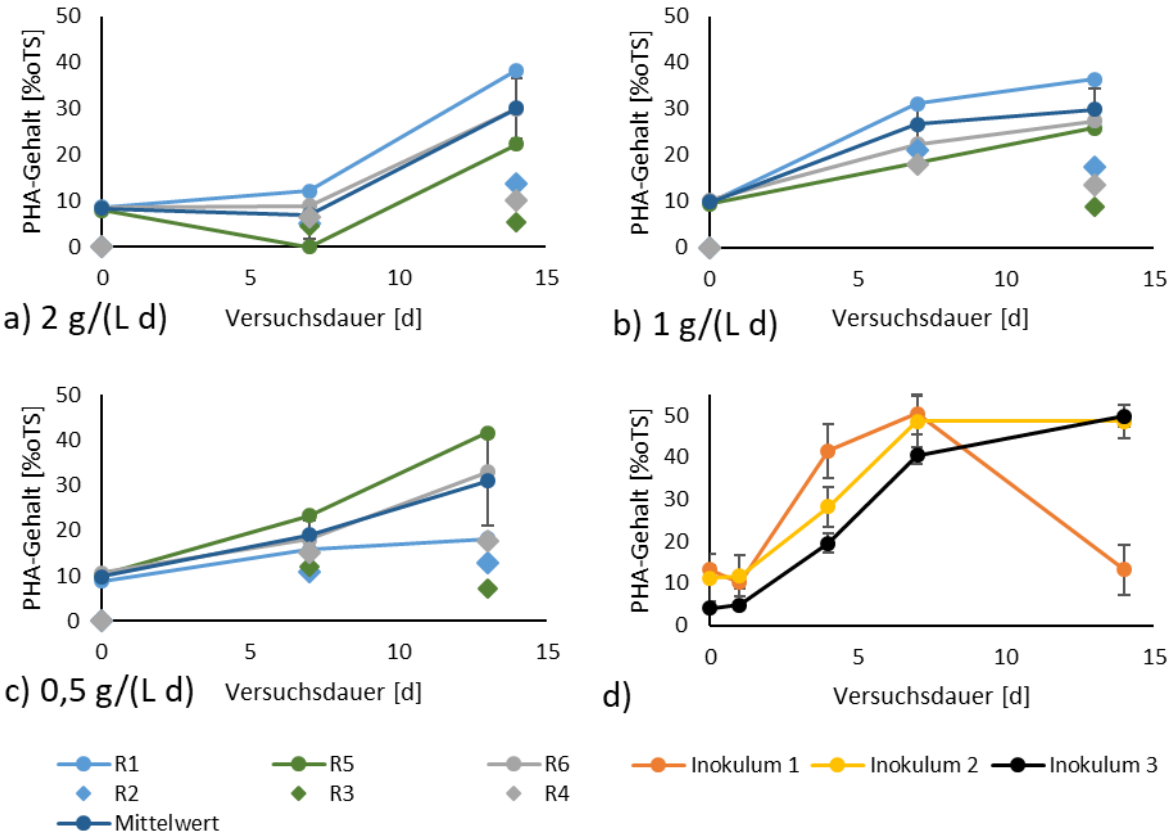


Abbildung 41: Verlauf der PHA-Gehalte über die Versuchsdauer bei verschiedenen VFA-Raumbelastungen a) 2 g/(L d), b) 1 (L d), c) 0,5 (L d), d) PHA-Gehalte aus den Versuchen mit verschiedenen Inokula (s. Kapitel 4.2.1.2).

Abbildung 41 zeigt die PHA-Gehalte der Selektionsversuche bei verschiedenen VFA-Raumbelastungen und zum Vergleich die PHA-Gehalte aus den Versuchen mit verschiedenen Impfschlämmen der ersten 14 Tage (s. Kapitel 4.2.1.2). Wie in den Abbildung 41 a-c zu sehen, zeigten sich starke Unterschiede der PHA-Gehalte nach 7 Tagen (2 g/(L d): 7 ± 5 %; 1 g/(L d): 27 ± 4 %; 0,5 g/(L d): 19 ± 3 %). Diese PHA-Gehalte lagen für den gleichen Zeitraum im Vergleich zu Abbildung 31 d deutlich unter den Ergebnissen bei denen mit Essig- und Propionsäure selektiert und akkumuliert wurde (Inokulum 1: 50 ± 5 %; Inokulum 2: 49 ± 6 %; Inokulum 3: 41 ± 2 %), zusätzlich deutete sich dabei bereits zwischen 7 und 14 Tagen eine Plateauphase an (der Abfall bei Inokulum 1 ist wie in Kapitel 4.2.1.4 beschrieben auf den Ausfall der pH-Regelung zurückzuführen). Zu erwartende Mindest-PHA-Gehalte in einer Plateau-Phase mit synthetischen Brauereiabwasser können mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.3.1.1 angenähert werden. Dort wurde mit Essig- und Propionsäure selektiert und die Akkumulationen mit dem gleichen synthetischen Brauereiabwasser und gleicher Raumbelastung wie bei diesen Versuchen durchgeführt (s. Abbildung 24 und Abbildung 25 Brau synth. 100) womit PHA-Gehalte von 31 ± 2 % bzw. 37 ± 6 % erreicht wurden. Dieser Bereich konnte in diesem Versuchsteil bei allen Raumbelastungen erst nach 14 Tagen erreicht werden (2 g/(L d), : 30 ± 7 %; 1 g/(L d), : 30 ± 5 %; 0,5 g/(L d), : 31 ± 10 %).

Da das Inokulum 3 in Abbildung 41 d demselben Inokulum für die Versuche mit den verschiedenen Raumbelastungen entspricht, kann ein Einfluss der Biozönose zu den Startzeitpunkten ausgeschlossen werden. Es ist davon auszugehen, dass der Unterschied durch das verwendete Substrat verursacht wurde. Die Selektionsversuche aus Kapitel 4.2.1.2, wurden mit einer einfachen VFA-Mischung aus Essig- und Propionsäure beschickt. In diesem Versuch bestand der VFA-Feed zusätzlich aus (iso)-Butter-, (iso)-Valerian- und Capronsäure. Der langsamere Anstieg und das niedrigere Maximum der PHA-Gehalte kann Hinweise darauf geben, dass die komplexere VFA-Zusammensetzung zu einer verlängerten Adaptionsphase der Biozönose und einer verminderten PHA-Akkumulation geführt haben.

Dennoch kann auf Basis dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass die Selektionsstufe mit VFA-Raumbelastungen mindestens in dem untersuchten Bereich von 0,5-2 g/L betrieben werden kann. Es ist lediglich die Frage offen wie lange eine geeignete Selektionsdauer ist, bis erhöhte PHA-Gehalte und ein stabiler Betrieb erreicht werden können.

4.4.2 Betrieb mit realem Abwasser

Im zweiten Teil dieses Versuchsblocks wurde reales versäuertes Brauereiabwasser zur Selektion und Akkumulation verwendet. Die Selektionsdurchläufe in diesem Teil wurden in einem Versuchsblock mit dem vorher beschrieben Versuchsteil durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Erkenntnisse über eine eventuell nötige Anpassung der Selektionsdauer noch nicht bekannt. Daher wurden auch hier 14 Tage als maximale Selektionsdauer gewählt. Abweichend zu den bisherigen Untersuchungen wurde keine pH-Regelung verwendet, um zu überprüfen, ob in einem realen Betrieb die Prozesskosten dafür eingespart werden können und trotzdem eine PHA-Produktion möglich ist.
Das Substrat für diesen Versuchsblock stammte aus 5 Versäuerungsbatches des Brauereiabwassers. Für den Betrieb wurde der Vorlagenbehälter des Substrats 3-mal pro Woche aufgefüllt. Beim Auffüllen wurde das verbleibende Restvolumen in der Vorlage belassen und mit frischem Substrat gemischt. Dadurch ergab sich über den Versuchsbetrieb eine Mischung aus verschiedenen Batches in unterschiedlichen Verhältnissen. Damit wurde wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, abweichend zu den bisherigen Versuchsblöcken eine Schwankung der Raumbelastung in der Selektion zugelassen, um einen realen Betrieb anzunähern. Nach dem Auffüllen wurden Proben für die Analyse der VFA, des CSB_{hom}, CSB_{gel}, NH_4-N und PO_4-P genommen.
Das verwendete Brauereiabwasser wies im Vergleich zu den bisher verwendeten Nährstoffverhältnissen deutliche Mängel für N und P auf. Daher wurde in einem Selektionsdurchlauf auf die Zugabe von Nährstoffen verzichtet und in einem weiteren Durchlauf Nährstoffe zugegeben (vgl. Abschnitt 3.2.2), um eine Gegenüberstellung der beiden Varianten zu ermöglichen. Das Nährstoffverhältnis wurde bei der Berechnung auf die gelösten Parameter CSB_{gel}:NH_4-N:PO_4-P bezogen. Im Selektionsdurchlauf mit Nährstoffzugabe lag das Verhältnis im Substrat bei 100:5:1 und im Durchlauf ohne Nährstoffe bei 100:0,6 ± 0,2 :0. Die naheliegendste Auswirkung dadurch liegt bei einem verminderten Biomassewachstum, was anhand der Feststoffgehalte bestätigt werden konnte (s. Abbildung 42). Nach 7 bzw. 14 Tagen sank der Feststoffgehalt ohne Nährstoffzugabe auf 0,9 ± 0,2 g/L bzw. 0,4 ± 0,4 g/L. Im Gegensatz dazu war der Feststoffgehalt mit Nährstoffzugabe bei 2,0 ± 0,0 g/L bzw. 1,7 ± 0,2 g/L. Demnach kann bereits an dieser Stelle eine Sinnhaftigkeit des Betriebs mit Brauereiabwasser ohne zusätzliche Nährstoffzugabe in Frage gestellt werden. Selbst bei hohen PHA-Gehalten in der organischen Trockenmasse wäre damit eine relativ niedrige PHA-Raumproduktion zu erwarten. Eine Nährstoffzugabe würde zwar Mehrkosten bedeuten, scheint aber in diesem Fall nicht zu vermeiden sein. Zur Bereitstellung günstiger Nährstoffquellen sollte geprüft werden, ob z.B. interne nährstoffreiche Reststoffströme aus dem Produktionsprozess vorhanden sind oder eine Urinabtrennung in den Mitarbeitertoiletten möglich ist.

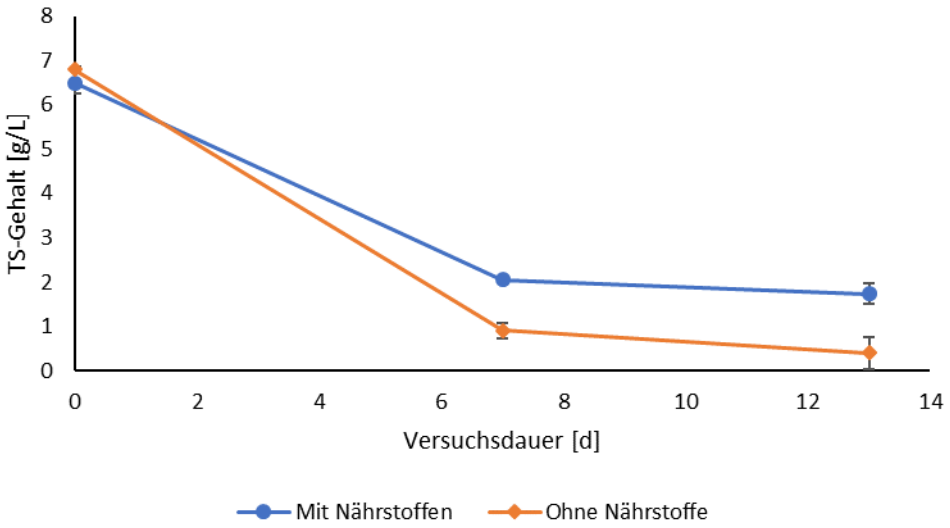


Abbildung 42: Feststoffgehalte beim Betrieb mit realem versäuertem Brauereiabwasser.

Die CSB_{VFA}-Raumbelastung beim Selektionsdurchlauf mit Nährstoffen lag im Bereich von 1,0-1,4 g/(L d) und ohne Nährstoffe bei 0,9-1,1 g/(L d) (s. Abbildung 43) und war damit in dem Bereich, der in Kapitel 4.4.1 untersucht wurde. Hervorzuheben ist der relativ hohe Anteil an nicht-VFA-basierten CSB im Substrat wodurch die CSB_{hom}-Raumbelastungen im Bereich von 1,8-2,7 g/(L d) (mit Nährstoffen) bzw. 1,5-2,6 g/(L d) (ohne Nährstoffe) lagen (s. Abbildung 43). Zur genaueren Betrachtung ist die CSB-Fraktionierung in Abbildung 44 dargestellt.

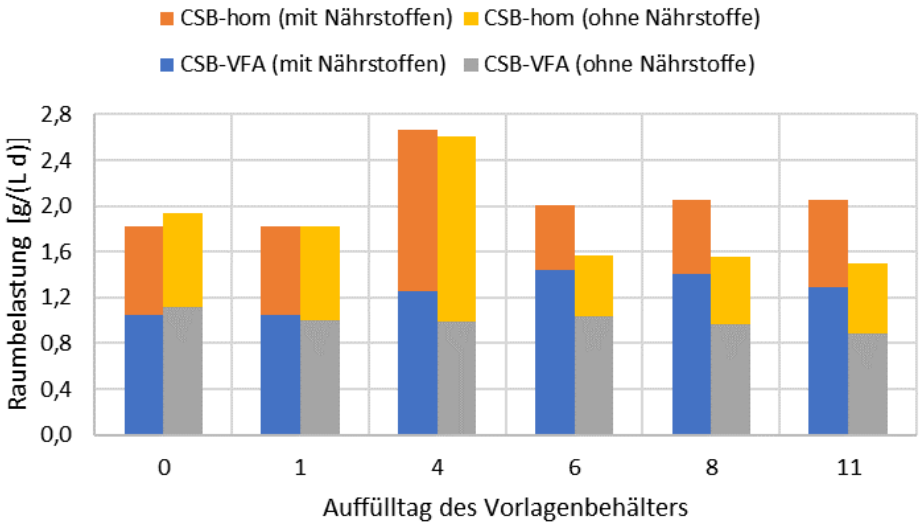


Abbildung 43: Raumbelastung der Selektionsdurchläufe mit und ohne Nährstoffe.

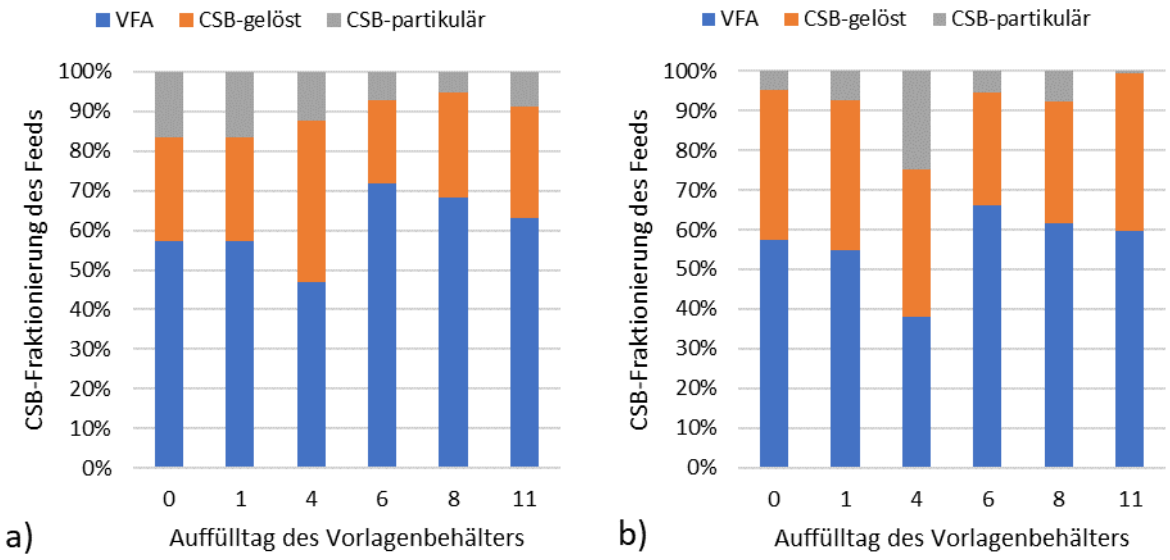


Abbildung 44: CSB-Fraktionierung des Substrats a) Durchlauf mit Nährstoffen, b) ohne Nährstoffe.

Im Durchlauf mit Nährstoffen lag der VFA-Anteil am CSB_{hom} im Bereich von 47-72 % und ohne Nährstoffe bei 38-66 % (s. Abbildung 44). Der restliche CSB kann das Wachstum einer Nebenpopulation begünstigen, die kein PHA-produziert. Es ist daher für den realen Betrieb wichtig einzugrenzen bis zu welchem VFA-Anteil das Substrat für eine gezielte Selektion geeignet ist. Eine Erhöhung in diesen Versuchen wäre durch eine bessere Feststoffabtrennung nach der Versäuerung möglich bspw. durch den Einsatz von Mikro- oder Ultrafiltrationsmodulen, wodurch zumindest der partikuläre CSB abgetrennt werden könnte. Der Anteil des gelösten CSB, der noch nicht in VFA umgewandelt wurde, könnte durch eine Anpassung der Versäuerung verringert werden, sofern es sich nicht um inerten CSB handelt.

Neben der Raumbelastung schwankte durch die veränderliche Abwasserzusammensetzung auch die VFA-Zusammensetzung im Substrat (s. Abbildung 45). Durch die schwankende Zusammensetzung kann die Adaptionszeit der Bakterien an das Substrat beeinflusst werden.

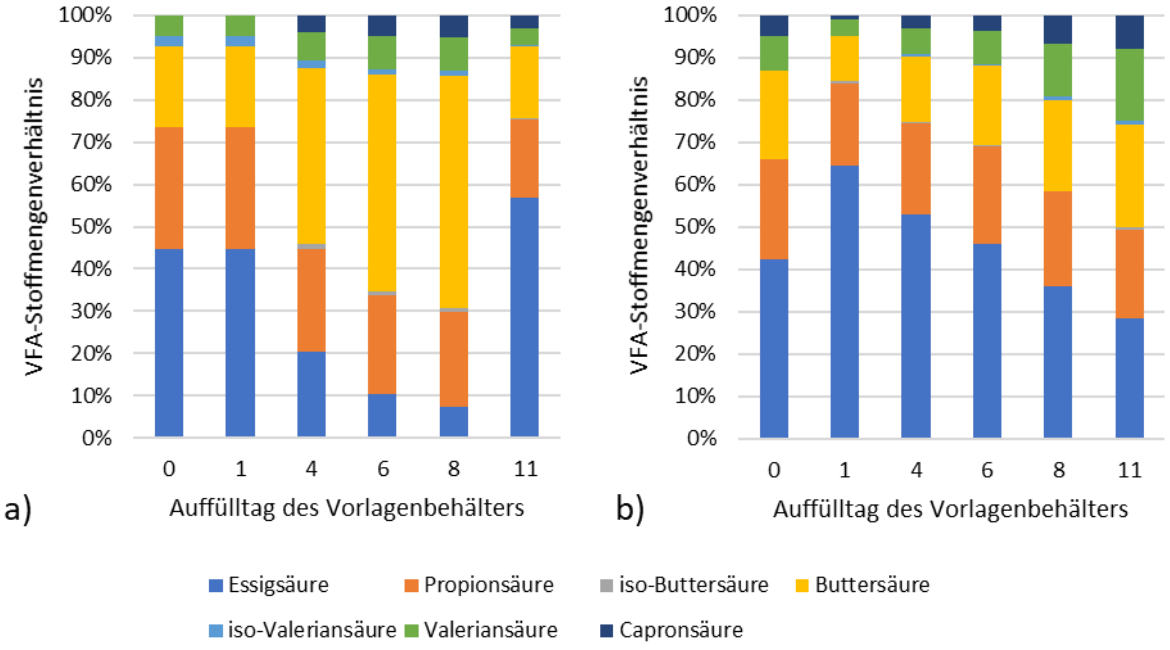


Abbildung 45: VFA-Zusammensetzung a) mit Nährstoffen b) ohne Nährstoffe.

Der Vergleich der PHA-Gehalte nach den wöchentlichen Akkumulationen ist in Abbildung 46 dargestellt. Der PHA-Gehalt ohne Nährstoffe blieb nach 7 und 14 Tagen mit 26 ± 2 % und 26 ± 1 % stabil. Allerdings war der TS-Gehalt sehr niedrig (s. Abbildung 42) weshalb diese PHA-Gehalte nur bedingt aussagekräftig sind. Mit Nährstoffen wurde ein PHA-Gehalt von 40 ± 4 % nach 7 Tagen erreicht, der nach 14 Tagen wieder auf 25 ± 2 % fiel. Zur besseren Vergleichbarkeit sollte die VFA-Beschickung während aller Akkumulationen bei ca. 100 mg $CSB_{VFA}/(L_{Startvolumen}$ Feed) liegen. Da die genaue VFA-Zusammensetzung zur Berechnung des CSB aufgrund des analytischen Aufwands nicht während der Versuche zur Verfügung stand, wurde als Ersatz die Konzentration der Essigsäureäquivalent per Küvettenschnelltest (LCK 365) bestimmt und anhand eines Erfahrungswertes in CSB umgerechnet. Der Nachteil bei dieser Vorgehensweise ist, dass bei stark schwankenden VFA-Zusammensetzungen eine Umrechnung nicht zuverlässig möglich ist. Bei der Akkumulation im Selektionsdurchlauf mit Nährstoffen war die Buttersäurekonzentration im Substrat für die Akkumulation an Tag 7 höher als an Tag 0 und 13, weshalb hier ca. 130 mg $CSB_{VFA}/(L_{Startvolumen}$ Feed) dosiert wurden. An Tag 0 und 13 dagegen 99 bzw. 93 mg $CSB_{VFA}/(L_{Startvolumen}$ Feed). Dieser Unterschied könnte für den höheren PHA-Gehalt nach 7 Tagen im Vergleich zu 13 Tagen verantwortlich sein. Zum einen zeigt dies, dass beim Betrieb der Akkumulation noch Optimierungspotential besteht. Zum anderen verdeutlicht es, dass zur Entwicklung einer geeigneten Regelungsstrategie für stabile Produktionsergebnisse mehr Untersuchungen nötig sind, die unter realen schwankenden Bedingungen stattfinden. Zur Umgehung einer schnellen Regelung der Volumenströme könnte auch ein ausreichend großer Misch- und Ausgleichsbehälter verwendet werden, um alle Schwankungen des Substrats weitestgehend auszugleichen.

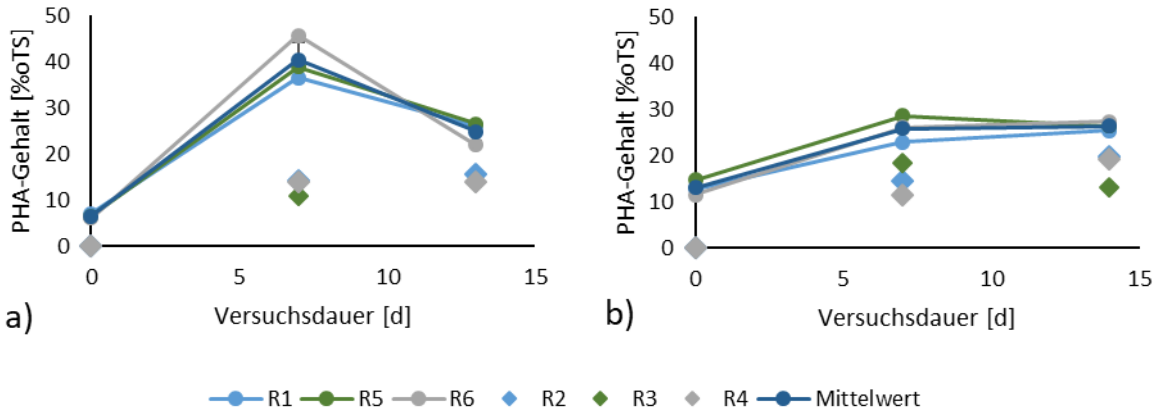


Abbildung 46: PHA-Gehalte der wöchentlichen Akkumulationen über die Versuchsdauer mit realem versäuertem Brauereiabwasser a) mit Nährstoffzugabe während der Selektion b) ohne Nährstoffzugabe während der Selektion.

Zur weiteren Beurteilung der Prozessstabilität beim Betrieb mit realem Abwasser ist in Abbildung 47 die Polymerzusammensetzung am Ende der Akkumulationen, zu Beginn der Akkumulationen und die theoretische Zusammensetzung berechnet aus der VFA-Zusammensetzung dargestellt. Zusätzlich wird die VFA-Zusammensetzung des verwendeten Substrats für die Akkumulationen dargestellt. Aufgrund des niedrigen Feststoffgehalts beim Betrieb ohne Nährstoffe beschränkt sich diese Darstellung nur auf den Durchlauf mit Nährstoffen.

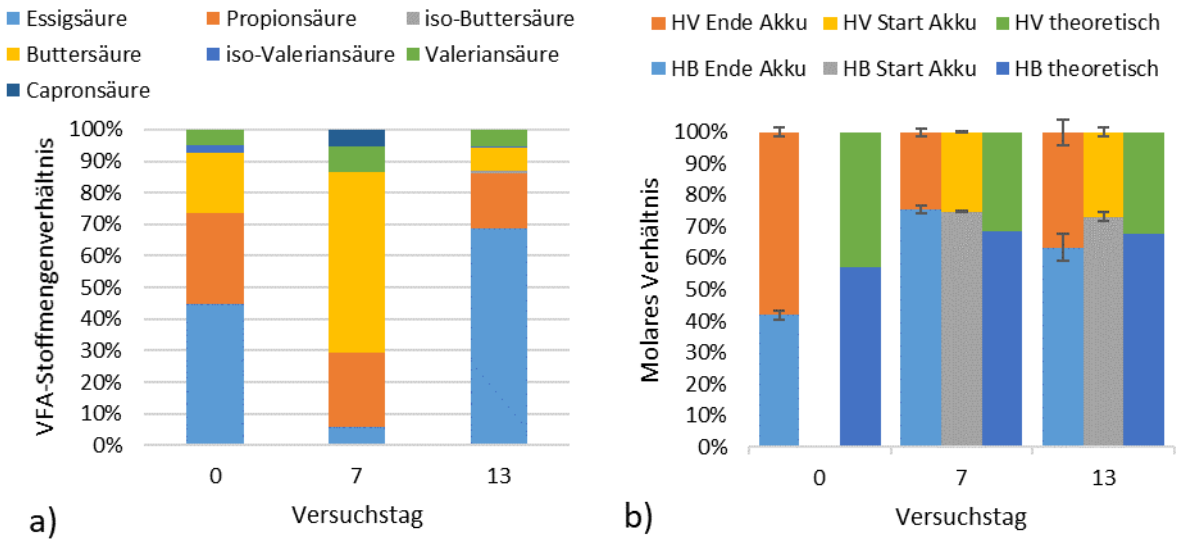


Abbildung 47: Akkumulation beim Selektionsdurchlauf mit Nährstoffen a) VFA-Zusammensetzung des Substrats für die Akkumulationen; b) Vergleich der Polymerzusammensetzung zu Beginn und Ende der Akkumulationen mit der theoretisch berechneten Zusammensetzung.

An Tag 0 war zu Beginn der Akkumulation kein PHA nachweisbar, daher ist dort kein Balken dargestellt. Bei der VFA-Zusammensetzung zeigten sich große Schwankungen, vor allem bei Essig- und Buttersäure (Abbildung 47 a)). Da beide Säuren eine gerade Anzahl an C-Atomen besitzen, werden beide primär zu HB umgewandelt. Dies wurde beim Vergleich der berechneten und der gemessenen Polymerzusammensetzung bestätigt (Abbildung 47 b). Damit zeigt sich, dass die PHA-Zusammensetzung auch bei schwankender VFA-Zusammensetzung stabil bleiben kann, sofern die Summe der Essig- und Buttersäure bzw. Propion- und Valeriansäure konstant bleibt. Dadurch ergeben sich für den Betrieb flexiblere Randbedingungen, wodurch beim Versäuerungsbetrieb nicht zwingend die exakt gleiche VFA-Zusammensetzung erzielt werden muss.

4.4.3 Biologische Analysen

4.4.3.1 Verwendung von synthetischem Substrat unterschiedlicher Raumbelastung

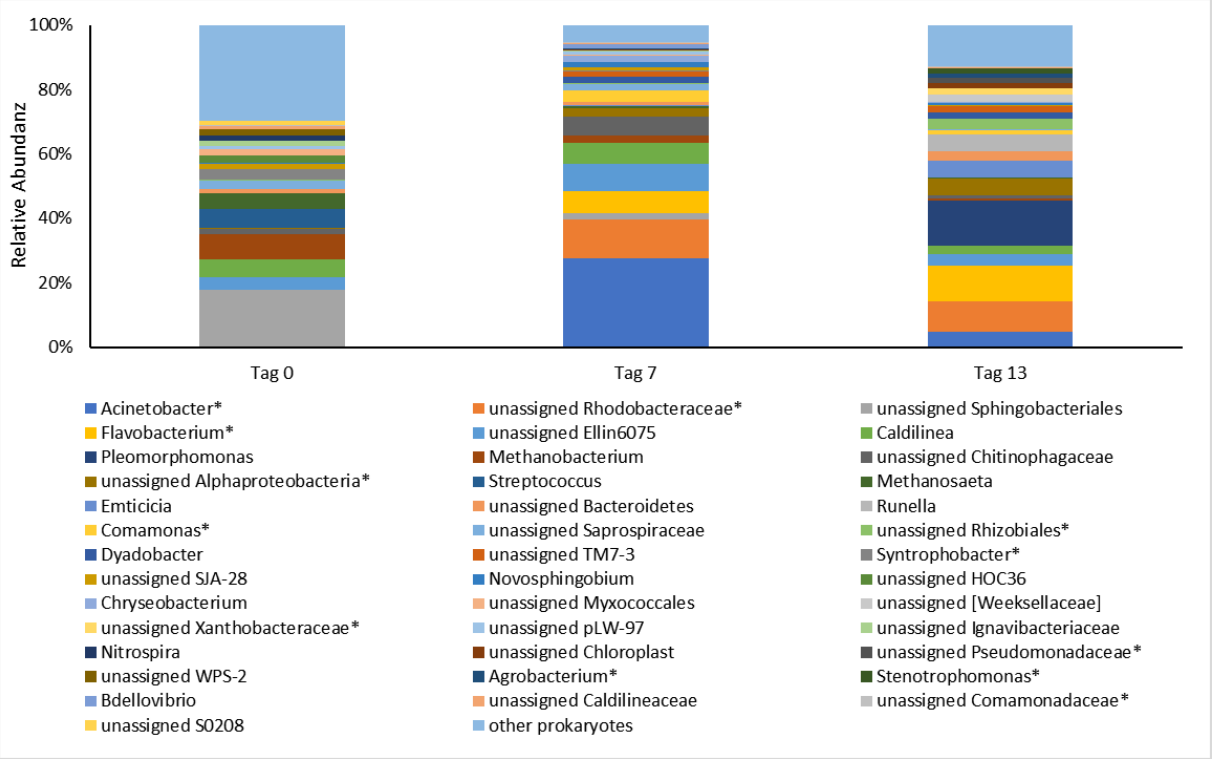


Abbildung 48: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit einer Raumbelastung von 2 g/(L d); Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

Innerhalb des Versuches mit einer Raumbelastung von 2 g/(L d) wurden von Beginn des Versuches bis hin zu Tag 7 und 13 Veränderungen in der Zusammensetzung der Biozönose in der Selektion beobachtet (Abbildung 48). Die Organismen mit der höchsten relativen Abundanz zu Beginn waren Vertreter der Ordnung Sphingobacterales (17,9 %), die Gattungen *Caldilinea* (5,5 %) und Methanobacterium (7,8 %) sowie *Streptococcus* (6 %). Die Gattung *Caldilinea* konnte bis zu Tag 7 ein wenig an relativer Abundanz gewinnen (6,4 %). Alle anderen zu Beginn abundanten Taxa waren zu diesem Zeitpunkt jedoch in keiner relevanten Abundanz mehr vertreten. Die abundantesten Organismen zu diesem Zeitpunkt gehörten zu der Gattung *Acinetobacter* (27,7 %), der Familie der Rhodobacteraceae (12%), der Gattung *Flavobacterium* (7 %), welche die Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzen, der Gruppe Ellin6075 (8,6 %) sowie der Familie der Chitinophagaceae (6,1 %). An Tag 13 jedoch wurde die Bakteriengesellschaft von den Gattungen *Pleomorphomonas* (14 %) und Flavobacterium (10,9 %) und der Familie der Rhodobacteraceae (9,5 %) dominiert, wobei *Pleomorphomonas* nicht für die Fähigkeit zur PHA-Produktion bekannt ist.

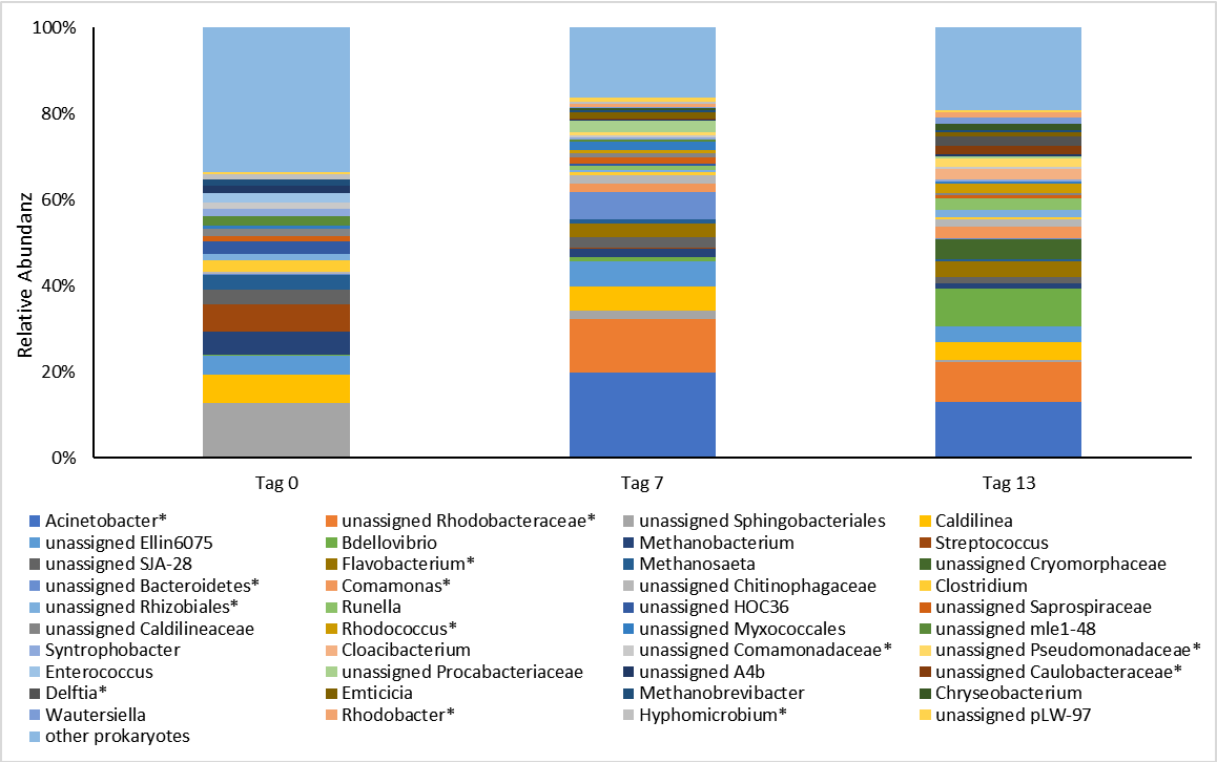


Abbildung 49: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit einer Raumbelastung von 1 g/(L d); Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

Bei dem Selektionsversuch mit einer Raumbelastung von 1 g/(L d) waren die zu Beginn abundantesten Taxa ebenfalls die Ordnung Sphingobacterales (12,9 %), die Gattung *Caldilinea* (6,5 %), die Gruppe Ellin6075 (4,4 %), sowie die Gattungen *Methanobacterium* (5,5 %) und *Streptococcus* (6,2 %) (Abbildung 49). An Tag 7 dominierten die Gattung *Acinetobacter* (19,8 %) sowie Vertreter der Familie Rhodobacteraceae (12,6 %). Der Großteil der Taxa, welche zu Beginn häufig waren, war zu diesem Zeitpunkt nur noch sehr schwach vertreten. Die häufigsten Organismen am 13. Tag der Selektion gehörten ebenfalls zur Gattung *Acinetobacter* (13 %) und zur Familie Rhodobacteraceae (9,2 %), wobei diese ein leichtes Absinken in ihrer Abundanz zeigten, sowie zu der Gattung *Bdellovibrio* (8,7 %). Im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen, ist letztere kein bekannter PHA-Produzent. Die Gattung *Flavobacterium* zeigte zudem eine Zunahme auf 3,3 % an Tag 7 und 3,9 % relativer Abundanz an Tag 13.

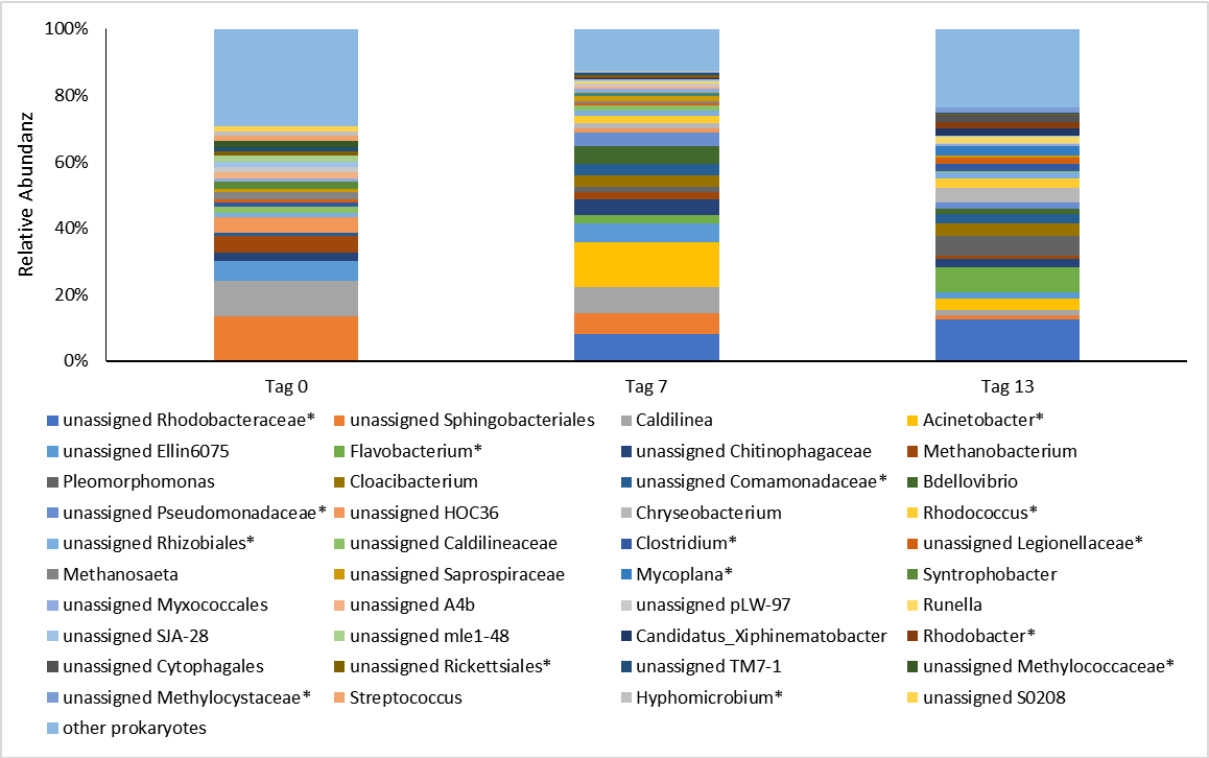


Abbildung 50: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit einer Raumbelastung von 0,5 g/(L d); Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

Aus Abbildung 50 wird erkenntlich, dass, wie in den beiden vorher beschriebenen Versuchen, das Inokulum zu Beginn durch die Taxa Sphingobacterales (13,5 %), *Caldilinea* (10,8 %), Ellin6075 (5,7 %) und *Methanobacterium* (5,1 %) dominiert wurde. Die Gesellschaft veränderte sich zu Tag 7 hin, wobei die Gattung *Acinetobacter* und die Familie der Rhodobacteraceae in ihrer relativen Abundanz anstiegen (13,4 und 8,3 %), während *Caldilinea* (7,8 %), die Ordnung Sphingobacterales (6,3 %), Ellin6075 (5,7 %) und *Methanobacterium* (2,1 %) seltener wurden. Die Gattung *Bdellovibrio* (5,4 %) zeigte eine erhöhte relative Abundanz an diesem Versuchstag. Am Ende des Versuches konnten sich die Familie Rhodobacteraceae (12,6 %) und die Gattung *Flavobacterium* (7,6 %) durchsetzen. Zudem zeigte die Gattung *Pleomorphomonas* (6 %) eine Zunahme in der relativen Abundanz.

Die Zusammensetzung des Inokulums zu Beginn aller drei Versuch war insgesamt vergleichbar. Die Biozönosen aller drei Versuche entwickelten sich unterschiedlich, wobei jedoch in allen drei Gesellschaften die Gattungen *Acinetobacter* und *Flavobacterium* sowie die Familie der Rhodobacteraceae die abundantesten PHA-fähigen Organismen waren.

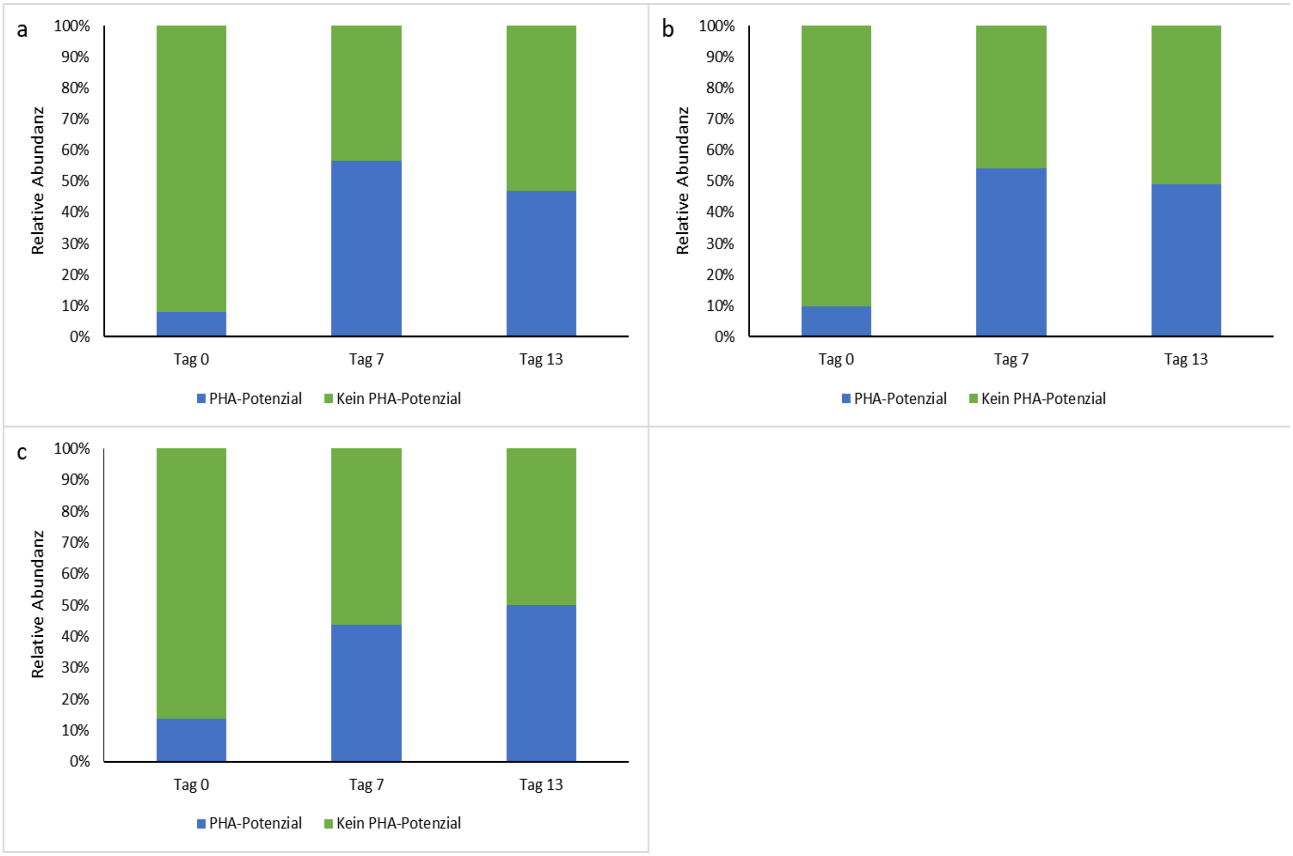


Abbildung 51: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während der Versuche mit unterschiedlichen VFA-Raumbelastungen a) 2 g/(L d), b) 1g/(L d), c) 0,5 g/(L d).

In allen drei Versuchen mit unterschiedlichen VFA-Raumbelastungen konnte eine Zunahme der relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten von Tag 0 bis Tag 7 festgestellt werden (Abbildung 51). Diese stieg bei dem Versuch mit der höchsten Raumbelastung (Abbildung 51 a) von 7,8 auf 56,7 % an. Ein ähnlicher Anstieg von zu Beginn 9,8 auf 54,2 % an Tag 7 war in dem Versuch mit einer Raumbelastung von 1 g/(L d) zu beobachten (Abbildung 51 b). Bei diesen beiden Versuchen sank die relative Abundanz allerdings von Tag 7 bis Tag 13 auf 46,9 bzw. 49,1 % ab. Bei dem Versuchsblock mit einer Raumbelastung von 0,5 g/(L d) stieg sie von Tag 0 bis Tag 7 von 13,5 auf 43,2 % und zum letzten Versuchstag erneut leicht auf 49,7 % (Abbildung 51 c). Das Absinken der Abundanz potenzieller PHA-Produzenten spielgelte sich nicht im PHA-Gehalt wieder (s. Abbildung 41), da in allen Versuchen erst an Tag 14 der maximale PHA-Gehalt verzeichnet werden konnte. Allerdings konnte in Kapitel 4.3 ebenfalls gezeigt werden, dass stabile PHA-Gehalte auch unter Schwankungen in der Bakterienzusammensetzung erreicht werden können. Zudem ist es möglich, dass eine längere Adaptionszeit der Biozönose an das komplexere Substrat benötigt wird, um eine Stabilität innerhalb der Bakterienzusammensetzung und PHA-Produktion zu erreichen.

Insgesamt wiesen alle drei Versuche eine ähnliche relative Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten sowie vergleichbare PHA-Gehalte auf, wodurch sich schlussfolgern lässt, dass mit den untersuchten VFA-Raumbelastungen eine erfolgreiche Selektion sowie PHA-Produktion möglich ist. Lediglich eine längere Selektionsdauer bis zum Einstellen einer stabilen Kultur und PHA-Produktion wäre möglich, wie bereits in Kapitel 4.4.2 erläutert wurde.

4.4.3.2 Verwendung von realem Substrat

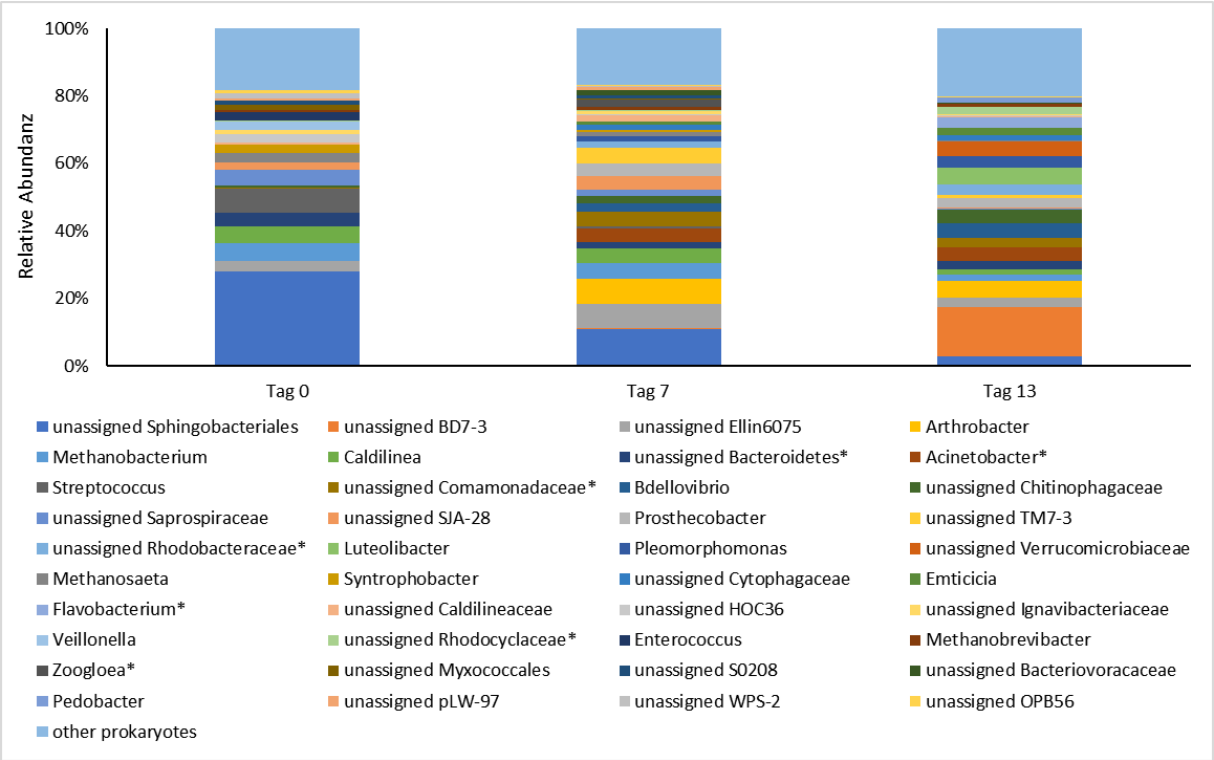


Abbildung 52: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit realem Substrat und Nährstoffzugabe; Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

Bei den Versuchen, in denen versäuertes Brauereiabwasser als Substrat genutzt wurde, fand zunächst eine Betrachtung der mikrobiellen Zusammensetzung innerhalb der Selektion mit Nährstoffzugabe statt (Abbildung 52). Hierbei zeigte sich, dass zu Beginn des Versuches innerhalb des Inokulums eine ähnliche Zusammensetzung, wie in den Versuchen mit künstlichem Brauereiabwasser zu verzeichnen war. Die abundantesten Gruppen zu Versuchsbeginn waren die Ordnung Sphingobacterales (27,9 %), *Methanobacterium* (5,5 %), *Caldilinea* (4,9 %) sowie *Streptococcus* (7 %). Es fand eine Veränderung zu Tag 7 hin statt, an welchem die Gruppen Ellin6075 (7 %), *Arthrobacter* (7,7 %), *Acinetobacter* (4,1 %) und die Familie der Comamonadaceae (4,2 %) an Abundanz gewinnen konnten. Die Ordnung Sphingobacterales (11 %), sowie die Gattungen *Methanobacterium* (4,6 %), *Streptococcus* (6,8 %) und *Caldilinea* (4,2 %) wurden zu diesem Tag hin seltener. An Tag 13 des Versuches waren die häufigsten Organismen unter anderem Vertreter der Gruppe BD7-3 (14,4 %), *Arthrobacter* (5 %), *Acinetobacter* (4,0 %), *Bdellovibrio* (4,4 %), *Luteolibacter* (4,8 %) sowie Vertreter der Familie Verrucomicrobiaceae (4,4 %), wobei unter diesen lediglich *Acinetobacter* für die Fähigkeit zur PHA-Produktion bekannt ist.

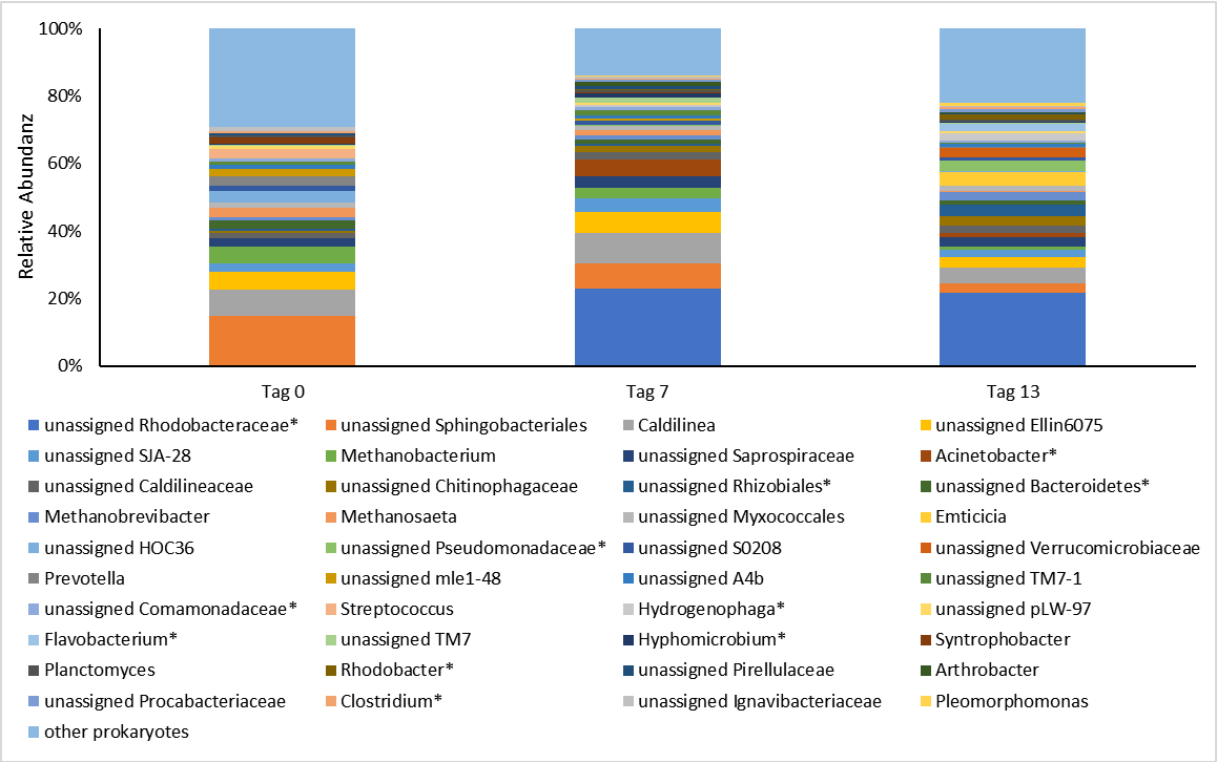


Abbildung 53: Relative Abundanzen der Bakteriengattungen innerhalb des Versuches mit realem Substrat mit Verzicht auf Nährstoffzugabe; Mit Stern markierte Taxa sind bekannte PHA-Produzenten.

Innerhalb des Versuches mit versäuertem Brauereiabwasser und Verzicht auf Nährstoffzugabe waren die zu Beginn häufigsten Taxa ebenfalls die Ordnung Sphingobacterales (14,9 %), die Gattung *Caldilinea* (7,6 %), die Gruppe Ellin6075 (5,2 %) sowie die Gattung *Methanobacterium* (5 %). An Tag 7 dominierten unter anderem Organismen der Familie Rhodobacteracceae (23 %), der Gattungen *Caldilinea* (9 %) und *Acinetobacter* (5,1 %) sowie die Gruppe Ellin6075 (6,2 %) die Bakteriengesellschaft. An Tag 13 des Versuches war die Familie der Rhodobacteraceae (21,6 %) weiterhin die abundanteste Gruppe. Des Weiteren waren viele unterschiedliche Taxa mit relativ geringer und gleicher Verteilung zu verzeichnen.

Insgesamt veränderten sich die beiden Bakteriengesellschaften mit und ohne Nährstoffzugabe unterschiedlich, wobei die abundantesten PHA-Produzenten in beiden Versuchen die Gattung *Acinetobacter* und die Familie Rhodobacteraceae waren. Allerdings unterschieden sie sich hinsichtlich ihrer Abundanz in beiden Versuchen, insbesondere nach zwei Wochen der Selektion. Eine zusammengefasste Darstellung der Abundanz potenzieller PHA-Produzenten für beide Versuch ist in folgender Abbildung dargestellt.

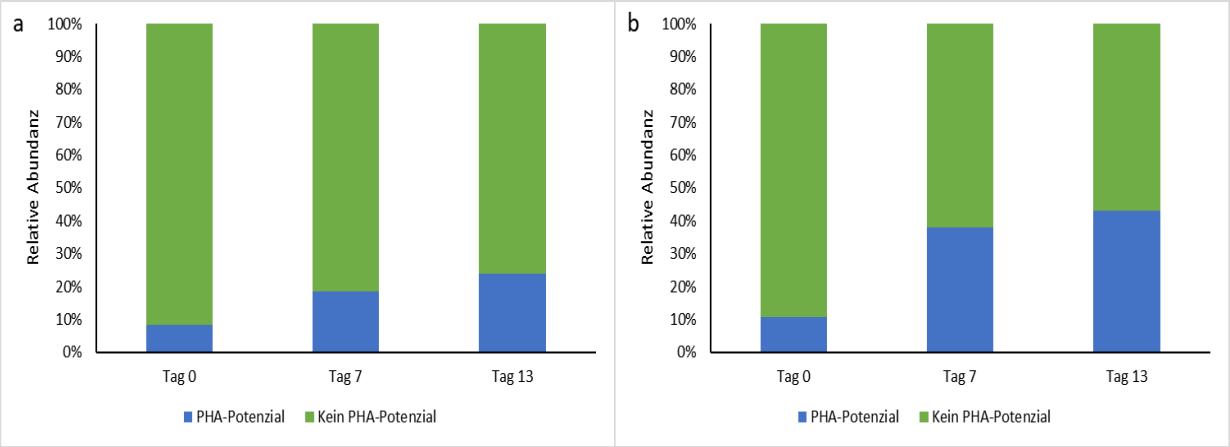


Abbildung 54: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während der Versuche a) mit Nährstoffzugabe, b) ohne Nährstoffzugabe.

Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten innerhalb des Versuches mit Nährstoffzugabe zeigte einen relativ geringen Anstieg von Tag 0 bis Tag 13 von 8,2 auf 22,8 %, wohingegen in dem Versuch ohne Nährstoffzugabe ein Anstieg von zu Beginn 10,6 % auf 43,2 % zu beobachten war (Abbildung 54). Dies gibt nicht den Verlauf des PHA-Gehaltes (s. Abbildung 46) wieder. Trotz der etwa halben relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten wurde in dem Versuch mit Nährstoffen ein deutlich höherer PHA-Gehalt von ca. 40 % im Gegensatz zu dem Versuch ohne Nährstoffe erreicht (ca. 26 %). Dies spricht einerseits für optimalere Wachstums- und Lebensbedingungen bei einer Selektion mit ausreichender Nährstoffverfügbarkeit, was sich ebenfalls im Feststoffgehalt widerspiegelt (s. Abbildung 42). Zum anderen stellt der Nährstoffmangel ebenfalls einen Selektionsdruck auf die nicht-PHA-Produzenten dar, wodurch der höhere Anteil an PHA-Produzenten in dem Versuch ohne Nährstoffe erklärt werden könnte.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Selektion an PHA-Produzenten sowie PHA-Produktion mit realem Substrat möglich sind. Es ist allerdings möglich, dass eine längere Anpassungsphase der Biozönose an das komplexere und reale Substrat, die Verstoffwechselung der VFA zu PHA verbessern könnte. Zudem ist eine ausreichende Nährstoffverfügbarkeit in der Selektionsphase vorteilhaft.

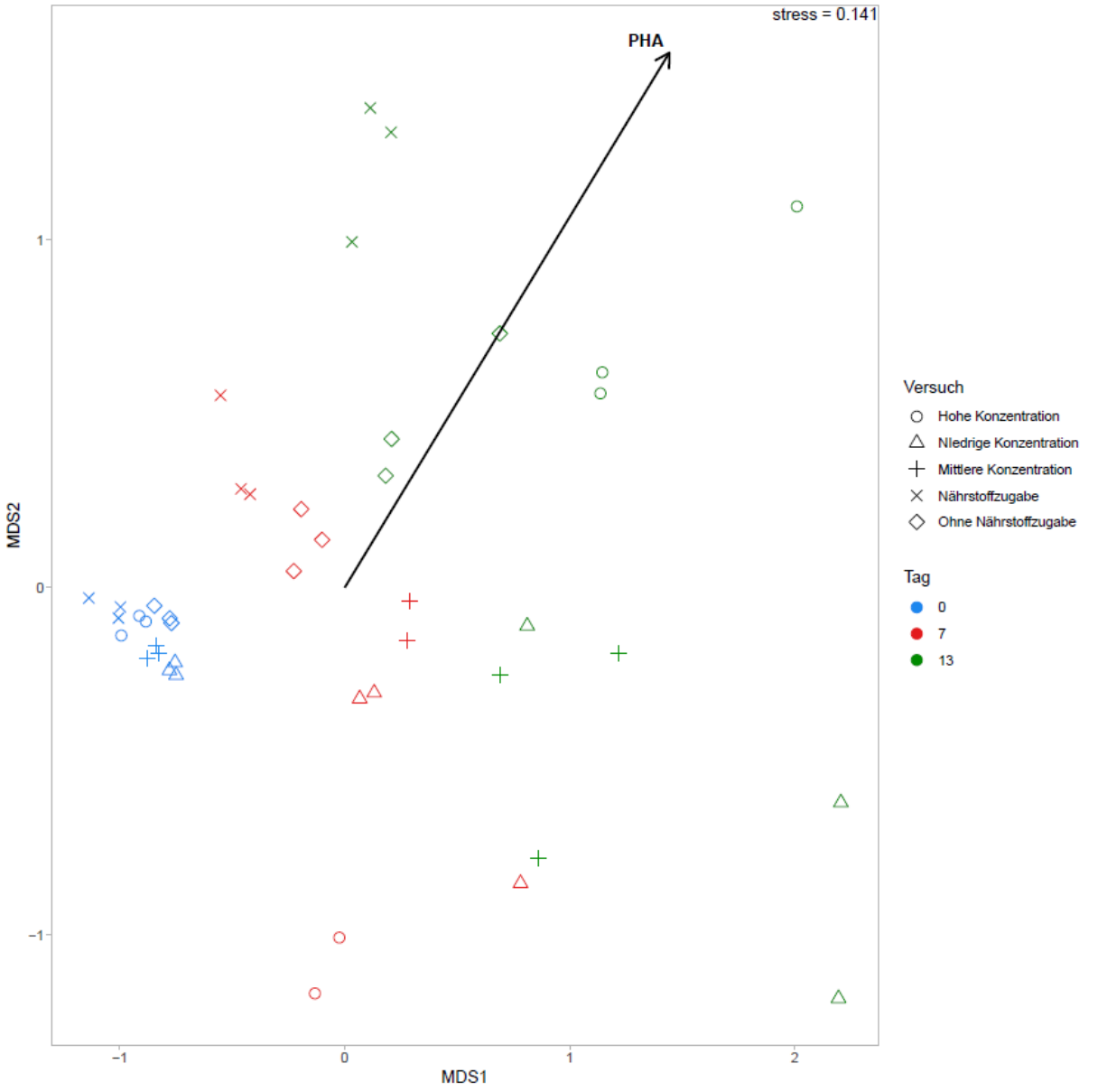


Abbildung 55: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Substrateigenschaften.

Die nichtmetrische multidimensionale Skalierung der Zusammensetzung der Bakteriengesellschaft während aller fünf Versuche zu den unterschiedlichen Substrateigenschaften zeigt zunächst, dass das für alle Versuche verwendete Inokulum in seiner Zusammensetzung sehr ähnlich war (Abbildung 55). Im Verlauf der Zeit und unter Verwendung unterschiedlicher Substrate entwickelten sich alle Biozönosen in unterschiedliche Richtungen, wobei die Diversität zwischen den Bakteriengesellschaften ebenfalls zunahm. Der PHA-Gehalt verläuft hierbei ebenfalls in Richtung der zeitlichen Veränderung, was darauf hindeutet, dass mit zunehmender Selektionsdauer ein höherer PHA-Gehalt erreicht werden kann. Die Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung der Versuche mit den höheren Substratkonzentrationen (Raumbelastung 2g/(L d), reales Substrat mit und ohne Nährstoffzugabe) zeigt zudem einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0,5$) mit dem PHA-Gehalt.

Es lässt sich daher schlussfolgern, dass sich unter Verwendung des gleichen Inokulums unterschiedliche an das jeweilige Substrat angepasste Biozönosen entwickelten, wenn Substrate mit unterschiedlichen Eigenschaften während der Selektion verwendet werden.

4.4.4 Zwischenfazit

Bei den Selektionsdurchläufen mit unterschiedlichen Raumbelastungen zeigte sich, dass bei allen Versuchen eine erfolgreiche Selektion von PHA-Produzenten zur Produktion von PHA-Gehalten von ca. 30 % bezogen auf oTS möglich waren. Damit kann zum einen eine große Bandbreite an VFA-Konzentrationen im versäuertem Abwasser zugelassen werden. Zum anderen konnte damit gezeigt werden, dass auch eine relative niedrige Raumbelastung von 0,5 g/(L d) verwendet werden kann, was zu einer Einsparung von VFA führt, die wiederum für die Akkumulation genutzt werden können und bei der weiteren Prozessentwicklung Potential für eine Steigerung der Ausbeute bietet.

Bei den Versuchen mit realem versäuertem Brauereiabwasser konnte gezeigt werden, dass ein Betrieb ohne den Zusatz von den Nährstoffen nicht sinnvoll erscheint, da ein Absinken des Feststoffgehalt auf bis zu 0,4 ± 0,4 g/L beobachtet wurde. Daher müssen bei diesem Abwasser nach kostengünstigen Nährstoffquellen gesucht werden, z.B. interne nährstoffreiche Reststoffströme aus dem Produktionsprozess oder über eine Urinabtrennung aus den Mitarbeitertoiletten. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass auch bei schwankenden Zusammensetzungen des Substrats eine stabile Polymerzusammensetzung erzielt werden konnte. Lediglich die Frage nach einer geeigneten Selektionsdauer bis stabile Bakteriengesellschaften und PHA-Gehalte erreicht werden, konnte aus den vorliegenden Ergebnissen beider Versuchsblöcke nicht eindeutig beantwortet werden. Sie deuten allerdings darauf hin, dass bei Verwendung komplexerer, insbesondere realer Substrate, eine längere Adaptionszeit der Biozönose vorteilhaft sein könnte. Hierfür sind weitere Untersuchungen über längere Zeiträume nötig.

5 Zusammenfassung

Für die im Arbeitsprogramm des Projektantrags genannten Forschungsschwerpunkte wurden zusammenfassend folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. Versäuerung:
   a. Einfluss der Nährstoff- und Substratzusammensetzung auf VFA-Ausbeute und –Zusammensetzung.
   b. Einfluss von Substrat und Prozessbedingungen auf die Entwicklung der Biozönose.

   Durch die Entwicklung eines weitgehend standardisierten Versuchsprotokolls zur Versäuerung verschiedener Abwässer konnte der Punkt 1a erfolgreich untersucht werden. Es zeigte sich, dass sowohl die Abwasserherkunft als auch die CSB-Startkonzentration (bei gleichem Abwasser) die VFA-Ausbeute und VFA-Zusammensetzung beeinflussen kann. Daraus lassen sich u.a. die in Kapitel 4.1.2 genannten Ansätze zur Entwicklung von Betriebsstrategien ableiten.
   Zu Punkt 1b lässt sich aus den Ergebnissen in Kapitel 4.1.1.3 schlussfolgern, dass sich die zu Beginn verwendete gleiche Bakterienmischkultur unter Verwendung unterschiedlicher Substrate in ihrer mikrobiellen Zusammensetzung über den zeitlichen Verlauf der Versäuerung hinweg unterschiedlich entwickelt. Dies steht zudem in Zusammenhang mit der erzielten VFA-Ausbeute. Auch die verwendete Substratkonzentration kann einen Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung haben, was anhand der Ergebnisse für die Versuche mit Kartoffel- und Molkereiabwasser zu erkennen ist.

2. Bedeutung der Selektion auf die PHA-Produktion:

   Es konnte eindeutig aufgezeigt werden, dass bereits durch eine 7-14 Tage dauernden Selektionsphase unter Verwendung von synthetischem Substrat eine Anreicherung von PHA-Produzenten und eine Steigerung der PHA-Produktion möglich ist. Es zeigte sich jedoch auch deutlich, dass der Feststoffgehalt in der Selektion instabil bzw. sehr niedrig war, was die PHA-Raumproduktivität negativ beeinflusst. Für einen stabilen Dauerbetrieb sind weitergehende Untersuchungen nötig. Durch die Beobachtung, dass auch am Ende der Famine-Phase noch hohe PHA-Gehalte zu beobachten waren, ergeben sich zusätzliche Möglichkeiten zur Entwicklung von Betriebsstrategien.
   Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Schlämme, mit unterschiedlicher Startzusammensetzung unter den gleichen Betriebsbedingungen sowie unter Selektion mit dem gleichen Substrat eine ähnliche Entwicklung zeigen, die in einer sehr ähnlichen Zusammensetzung des selektierten Inokulums resultiert und ebenfalls eine vergleichbare PHA-Produktion zur Folge hat. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass sich das System auch nach Einbrüchen regenerieren konnte. Auch ein Wechsel innerhalb der dominanten PHA-Produzenten resultierte durch eine funktionelle Redundanz in vergleichbaren PHA-Gehalten und einer Stabilität des Systems.

3. Akkumulation:
   a. Steigerung der PHA-Ausbeute durch Optimierung der Prozessbedingungen.
   b. Kontinuierliche PHA-Produktion unter schwankenden Rahmenbedingungen.
   c. Beeinflussbarkeit des PHV/PHB-Verhältnisses durch die VFA-Zusammensetzung.

Bei den Punkten 3a und c zeigte sich mit synthetischen Substraten, dass weder die Konzentration noch die Art des Substrates einen wesentlichen Einfluss auf die Höhe des PHA-Gehaltes hatten. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Zusammensetzung des produzierten PHAs eine ähnliche Tendenz hat, wie die Zusammensetzung des Substrates, aber nicht nur von dieser abhängt und die Biozönose womöglich ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf diese hat. Lediglich bei der Verwendung des realen Substrates wurden geringere PHA-Gehalte erzielt. Aufgrund der Ergebnisse des synthetischen Brauereiabwassers und des letzten Versuchsblocks (Kopplung der Verfahrensstufen) wurde gezeigt, dass unter Verwendung des gleichen realen Substrates in der Selektionsphase eine Akklimatisierung der Biozönose an das komplexere Substrat und damit eine höhere PHA-Produktion ermöglicht wurde. Dass eine Selektion PHA-produzierender Organismen und eine PHA-Produktion in vergleichbarem Ausmaß (Punkt 3b) auch unter unterschiedlichen Substratbedingungen möglich ist, konnte zudem unter dem Versuchsblocks „Kopplung der Verfahrensstufen“ gezeigt werden.

4. Kopplung der Verfahrensstufen und Entwicklung von MSR-Strategien

Bei der Kopplung der Verfahrensstufen wurde ein breiter Bereich an möglichen Raumbelastungen für die Selektionsstufe aufgezeigt, was einen Betrieb auch mit unterschiedlichen VFA-Konzentrationen möglich macht. Durch die Anwendung von niedrigen Raumbelastungen wird dadurch eine Einsparung des versäuerten Substrats für die Akkumulation ermöglicht.
Die Entwicklung von MSR- bzw. Betriebsstrategien wurde fortlaufend bei der Bearbeitung aller Arbeitspakete betrachtet. So wurde bspw. für die Entwicklung eines kontinuierlichen Betriebs in einem ersten Ansatz herausgefunden, dass auch bei schwankenden Raumbelastungen des VFA-Feeds eine PHA-produzierende Bakterienkultur selektiert und hohe PHA-Ausbeuten erzielt werden können. Falls dies jedoch nicht möglich sein sollte, wurden mögliche Strategien unter Punkt 1 genannt. Weiterhin kann durch die Beobachtung, dass die PHA-Gehalte am Ende der Famine-Phase noch sehr hoch waren, entweder die Raumbelastung in der Selektion in Abhängigkeit des PHA-Abbaus in der Famine-Phase geregelt werden, um einen höheren Selektionsdruck zu erzielen oder es könnte bei der gewählten Raumbelastung künftig auf eine separate Akkumulationsstufe verzichtet werden.

Kaiserslautern, den 16.05.22

6 Literaturverzeichnis

Albuquerque, M. G. E.; Carvalho, G.; Kragelund, C.; Silva, A. F.; Barreto Crespo, M. T.; Reis, M. A. M.; Nielsen, P. H. (2013): Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community. In: *The ISME journal* 7 (1), S. 1–12. DOI: 10.1038/ismej.2012.74.

Albuquerque, M. G. E.; Torres, C. A. V.; Reis, M. A. M. (2010): Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection. In: *Water research* 44 (11), S. 3419–3433. DOI: 10.1016/j.watres.2010.03.021.

Ben, Marta; Kennes, Christian; Veiga, Maria C. (2016): Optimization of polyhydroxyalkanoate storage using mixed cultures and brewery wastewater. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (11), S. 2817–2826. DOI: 10.1002/jctb.4891.

Bengtsson, Simon; Hallquist, Jakob; Werker, Alan; Welander, Thomas (2008a): Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. In: *Biochemical Engineering Journal* 40 (3), S. 492–499. DOI: 10.1016/j.bej.2008.02.004.

Bengtsson, Simon; Werker, Alan; Christensson, Magnus; Welander, Thomas (2008b): Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. In: *Bioresource technology* 99 (3), S. 509–516. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.020.

Braunegg, G.; Sonnleitner, B.; Lafferty, R. M. (1978): A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-?-hydroxybutyric acid in microbial biomass. In: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6 (1), S. 29–37. DOI: 10.1007/BF00500854.

Callahan, Benjamin J.; McMurdie, Paul J.; Rosen, Michael J.; Han, Andrew W.; Johnson, Amy Jo A.; Holmes, Susan P. (2016): DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. In: *Nature methods* 13 (7), S. 581–583. DOI: 10.1038/nmeth.3869.

Carvalho, G.; Oehmen, A.; Albuquerque, M. G. E.; Reis, M. A. M. (2014): The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. In: *New biotechnology* 31 (4), S. 257–263. DOI: 10.1016/j.nbt.2013.08.010.

Carvalho, G.; Pedras, I.; Karst, S. M.; Oliveira, C. S. S.; Duque, A. F.; Nielsen, P. H.; Reis, M. A. M. (2018): Functional redundancy ensures performance robustness in 3-stage PHA-producing mixed cultures under variable feed operation. In: *New biotechnology* 40 (Pt B), S. 207–217. DOI: 10.1016/j.nbt.2017.08.007.

Chanprateep, Suchada (2010): Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. In: *Journal of bioscience and bioengineering* 110 (6), S. 621–632. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.07.014.

Chen, George Guo-Qiang (2010): Plastics from bacteria. Natural functions and applications. Berlin: Springer (Microbiology monographs, 14).

Chen, Guo-Qiang; Wu, Qiong (2005): The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. In: *Biomaterials* 26 (33), S. 6565–6578. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036.

Chen, Z.; Huang, L.; Wen, Q.; Zhang, H.; Guo, Z. (2017): Effects of sludge retention time, carbon and initial biomass concentrations on selection process: From activated sludge to polyhydroxyalkanoate accumulating cultures. In: *Journal of Environmental Sciences* 52, S. 76–84. DOI: 10.1016/j.jes.2016.03.014.

DeSantis, T. Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E. L.; Keller, K. et al. (2006): Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. In: *Applied and environmental microbiology* 72 (7), S. 5069–5072. DOI: 10.1128/AEM.03006-05.

Dias, João M. L.; Lemos, Paulo C.; Serafim, Luísa S.; Oliveira, Cristina; Eiroa, Marta; Albuquerque, Maria G. E. et al. (2006): Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. In: *Macromolecular bioscience* 6 (11), S. 885–906. DOI: 10.1002/mabi.200600112.

DIN 38406-5:1983-10, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Kationen (Gruppe_E); Bestimmung des Ammonium-Stickstoffs_(E_5).

DIN 38409-41:1980-12, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe_H); Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs_(CSB) im Bereich über 15_mg/l_(H_41).

DIN 38414-8:1985-06, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Schlamm und Sedimente (Gruppe_S); Bestimmung des Faulverhaltens (S_8).

DIN EN 15935:2012-11, Schlamm, behandelter Bioabfall, Boden und Abfall_- Berechnung des Trockenmassenanteils nach Bestimmung des Trockenrückstands oder des Wassergehalts; Deutsche Fassung EN_15934:2012.

DIN EN 25663:1993-11, Wasserbeschaffenheit; Bestimmung des Kjeldahl-Stickstoffs; Verfahren nach Aufschluß mit Selen (ISO_5663:1984); Deutsche Fassung EN_25663:1993.

DIN EN ISO 6878:2004-09, Wasserbeschaffenheit_- Bestimmung von Phosphor_- Photometrisches Verfahren mittels Ammoniummolybdat (ISO_6878:2004); Deutsche Fassung EN_ISO_6878:2004.

Dionisi, D.; Carucci, G.; Papini, M. Petrangeli; Riccardi, C.; Majone, M.; Carrasco, F. (2005a): Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. In: *Water research* 39 (10), S. 2076–2084. DOI: 10.1016/j.watres.2005.03.011.

Dionisi, Davide; Carucci, G.; Papini, Marco Petrangeli; Riccardi, C.; Majone, Mauro; Carrasco, F. (2005b): Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. In: *Water research*, 2005 (39), S. 2076–2084. Online verfügbar unter http://hdl.handle.net/11573/231198.

Dworkin, Martin; Falkow, Stanley; Rosenberg, Eugene; Schleifer, Karl-Heinz; Stackebrandt, Erko (2006): The Prokaryotes. New York, NY: Springer US.

Endres, Hans-Josef; Siebert-Raths, Andrea (2009): Technische Biopolymere. Rahmenbedingungen, Marktsituation, Herstellung, Aufbau und Eigenschaften. München: Hanser.

European Bioplastics e.V. (2020): Bioplastics. Online verfügbar unter http://www.european-bioplastics.org/bioplastics/, zuletzt geprüft am 01.10.21.

Hao, Jiuxiao; Wang, Xiujin; Wang, Hui (2017): Investigation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis from mixed culture enriched by valerate-dominant hydrolysate. In: *Front. Environ. Sci. Eng.* 11 (1). DOI: 10.1007/s11783-017-0896-8.

Herlemann, Daniel Pr; Labrenz, Matthias; Jürgens, Klaus; Bertilsson, Stefan; Waniek, Joanna J.; Andersson, Anders F. (2011): Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. In: *The ISME journal* 5 (10), S. 1571–1579. DOI: 10.1038/ismej.2011.41.

Huang, L.; Chen, Z.; Wen, Q.; Ji, Y.; Wu, Z.; Lee, D.-J. (2020): Toward flexible regulation of polyhydroxyalkanoate composition based on substrate feeding strategy: Insights into microbial

community and metabolic features. In: *Bioresource technology* 296, S. 122369. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122369.

Huang, L.; Chen, Z.; Wen, Q.; Zhao, L.; Lee, D.-J.; Yang, L.; Wang, Y. (2018): Insights into Feast-Famine polyhydroxyalkanoate (PHA)-producer selection: Microbial community succession, relationships with system function and underlying driving forces. In: *Water research* 131, S. 167–176. DOI: 10.1016/j.watres.2017.12.033.

Janarthanan, O. M.; Laycock, B.; Montano-Herrera, L.; Lu, Y.; Arcos-Hernandez, M. V.; Werker, A.; Pratt, S. (2016): Fluxes in PHA-storing microbial communities during enrichment and biopolymer accumulation processes. In: *New biotechnology* 33 (1), S. 61–72. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.07.007.

Khatami, K.; Perez-Zabaleta, M.; Owusu-Agyeman, I.; Cetecioglu, Z. (2021): Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? In: *Waste management (New York, N.Y.)* 119, S. 374–388. DOI: 10.1016/j.wasman.2020.10.008.

Kourmentza, Constantina; Plácido, Jersson; Venetsaneas, Nikolaos; Burniol-Figols, Anna; Varrone, Cristiano; Gavala, Hariklia N.; Reis, Maria A. M. (2017): Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. In: *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 4 (2). DOI: 10.3390/bioengineering4020055.

Lee, Sang Yup (1996): Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. In: *Trends in Biotechnology* 14 (11), S. 431–438. DOI: 10.1016/0167-7799(96)10061-5.

Lorini, L.; Di Re, F.; Majone, M.; Valentino, F. (2020): High rate selection of PHA accumulating mixed cultures in sequencing batch reactors with uncoupled carbon and nitrogen feeding. In: *New biotechnology* 56, S. 140–148. DOI: 10.1016/j.nbt.2020.01.006.

Majone, M.; Massanisso, P.; Carucci, A.; Lindrea, K.; Tandoi, V. (1996): Influence of storage on kinetic selection to control aerobic filamentous bulking. In: *Water Science and Technology* 34 (5-6). DOI: 10.1016/0273-1223(96)00649-X.

Marciniak, P.; Możejko-Ciesielska, J. (2021): What Is New in the Field of Industrial Wastes Conversion into Polyhydroxyalkanoates by Bacteria? In: *Polymers* 13 (11), S. 1731. DOI: 10.3390/polym13111731.

Moretto, Giulia; Lorini, Laura; Pavan, Paolo; Crognale, Simona; Tonanzi, Barbara; Rossetti, Simona et al. (2020): Biopolymers from Urban Organic Waste: Influence of the Solid Retention Time to Cycle Length Ratio in the Enrichment of a Mixed Microbial Culture (MMC). In: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8 (38), S. 14531–14539. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c04980.

Morgan-Sagastume, F. (2016): Characterisation of open, mixed microbial cultures for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. In: *Rev Environ Sci Biotechnol* 15 (4), S. 593–625. DOI: 10.1007/s11157-016-9411-0.

Nguyenhuynh, T.; Yoon, L. W.; Chow, Y. H.; Chua, A. S. M. (2021): An insight into enrichment strategies for mixed culture in polyhydroxyalkanoate production: feedstocks, operating conditions and inherent challenges. In: *Chemical Engineering Journal* 420, S. 130488. DOI: 10.1016/j.cej.2021.130488.

Oliveira, C. S. S.; Silva, C. E.; Carvalho, G.; Reis, M. A. (2017): Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. In: *New biotechnology* 37 (Pt A), S. 69–79. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.10.008.

Pittmann, T. (2015a): Herstellung von Biokunststoffen aus Stoffströmen einer kommunalen Kläranlage. Dissertation. München: Universität Stuttgart.

Pittmann, T.; Steinmetz, H. (2014): Polyhydroxyalkanoate production as a side stream process on a municipal waste water treatment plant. In: *Bioresource technology* 167, S. 297–302. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.06.037.

Pittmann, Timo (2015b): Herstellung von Biokunststoffen aus Stoffströmen einer kommunalen Kläranlage. Univ., Diss.--Stuttgart, 2014, München.

Pittmann, Timo; Steinmetz, Heidrun (2013): Influence of operating conditions for volatile fatty acids enrichment as a first step for polyhydroxyalkanoate production on a municipal waste water treatment plant. In: *Bioresource technology* 148, S. 270–276. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.148.

Pittmann, Timo; Steinmetz, Heidrun (2017): Polyhydroxyalkanoate Production on Waste Water Treatment Plants: Process Scheme, Operating Conditions and Potential Analysis for German and European Municipal Waste Water Treatment Plants. In: *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 4 (2). DOI: 10.3390/bioengineering4020054.

Queirós, D.; Rossetti, S.; Serafim, L. S. (2014): PHA production by mixed cultures: a way to valorize wastes from pulp industry. In: *Bioresource technology* 157, S. 197–205. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.099.

Rosenwinkel, Karl-Heinz; Kroiss, Helmut; Dichtl, Norbert; Seyfried, Carl-Franz; Weiland, Peter (2015): Anaerobtechnik. Abwasser-, Schlamm- und Reststoffbehandlung, Biogasgewinnung. 3., neu bearb. Aufl. Berlin: Springer Vieweg.

Sabapathy, P. C.; Devaraj, S.; Meixner, K.; Anburajan, P.; Kathirvel, P.; Ravikumar, Y. et al. (2020): Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production - A review. In: *Bioresource technology* 306, S. 123132. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123132.

Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Albuquerque, M. G. E.; Reis, M. A. M. (2008): Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. In: *Applied microbiology and biotechnology* 81 (4), S. 615–628. DOI: 10.1007/s00253-008-1757-y.

STOWA (2017a): PHARIO. Stepping stone to a sustainable value chain for PHA bioplastic using municipal activated sludge. Amersfoort, Niederlande.

Tamang, Pravesh; Banerjee, Rintu; Köster, Stephan; Nogueira, Regina (2019): Comparative study of polyhydroxyalkanoates production from acidified and anaerobically treated brewery wastewater using enriched mixed microbial culture. In: *Journal of Environmental Sciences* 78, S. 137–146. DOI: 10.1016/j.jes.2018.09.001.

Valentino, F.; Brusca, A. A.; Beccari, M.; Nuzzo, A.; Zanaroli, G.; Majone, M. (2012): Start up of biological sequencing batch reactor (SBR) and short-term biomass acclimation for polyhydroxyalkanoates production. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88 (2), S. 261–270. DOI: 10.1002/jctb.3824.

Valentino, F.; Morgan-Sagastume, F.; Campanari, S.; Villano, M.; Werker, A.; Majone, M. (2017): Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. In: *New biotechnology* 37 (Pt A), S. 9–23. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.05.007.

VDI 4630:2016-11 Vergärung organischer Stoffe - Substratcharakterisierung, Probenahme, Stoffdatenerhebung, Gärversuche.

Villano, Marianna; Beccari, Mario; Dionisi, Davide; Lampis, Silvia; Miccheli, Alfredo; Vallini, Giovanni; Majone, Mauro (2010): Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. In: *Process Biochemistry* 45 (5), S. 714–723. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.01.008.

Wang, X.; Oehmen, A.; Carvalho, G.; Reis, M. A. M. (2020): Community profile governs substrate competition in polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing mixed cultures. In: *New biotechnology* 58, S. 32–37. DOI: 10.1016/j.nbt.2020.03.003.

Wang, Yuanpeng; Chen, Ronghui; Cai, JiYuan; Liu, Zhenggui; Zheng, Yanmei; Wang, Haitao et al. (2013): Biosynthesis and thermal properties of PHBV produced from levulinic acid by Ralstonia eutropha. In: *PloS one* 8 (4), e60318. DOI: 10.1371/journal.pone.0060318.

Yan, S.; Tyagi, R. D.; Surampalli, R. Y. (2006): Polyhydroxyalkanoates (PHA) production using wastewater as carbon source and activated sludge as microorganisms. In: *Water Science and Technology* 53 (6), S. 175–180. DOI: 10.2166/wst.2006.193.