

Kurzbericht
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.....	5
1.1	Ziele des Projekts und Vorgehensweise	6
2	Verfahrenskette.....	7
3	Ergebnisse und Diskussion	8
3.1	Versäuerung	8
3.1.1	Abwassercharakterisierung	8
3.1.2	Einfluss des Start-CSB	9
3.1.3	Mikrobielle Zusammensetzung	12
3.2	Selektion	13
3.2.1	Verlauf der PHA-Produktion	13
3.2.2	Bakterienpopulation innerhalb der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Inokula 14	
3.3	PHA-Produktion	16
3.4	Kopplung der Verfahrensstufen	18
3.4.1	Variation der Raumbelastung.....	18
3.4.2	Betrieb mit realem Abwasser	20
3.4.3	Mikrobielle Zusammensetzung	22
4	Zusammenfassung.....	23
5	Literaturverzeichnis.....	25

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion (Pittmann 2015).	7
Abbildung 2: Verlauf der VFA-Konzentration im Substratscreening.	10
Abbildung 3: VFA-Zusammensetzung am Tag der höchsten Ausbeute.	11
Abbildung 4: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Substratscreening-Versuche.	12
Abbildung 5: Vergleich der mittleren PHA-Gehalte aller drei Selektionsversuche über die Versuchsdauer.	13
Abbildung 6: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während der Selektionsversuche mit der unterschiedlichen Inokula.	14
Abbildung 7: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Inokula.	16
Abbildung 8: PHA-Gehalte der Akkumulationen mit unterschiedlichen Substraten innerhalb des zweiten Selektionsversuches.	17
Abbildung 9: PHA-Gehalte der Akkumulationen mit unterschiedlichen Substraten innerhalb des dritten Selektionsversuches.	17
Abbildung 10: Verlauf der PHA-Gehalte über die Versuchsdauer bei verschiedenen VFA-Raubelastungen a) 2 g/(L d), b) 1 (L d), c) 0,5 (L d), d) PHA-Gehalte aus den Versuchen mit verschiedenen Inokula.	19
Abbildung 11: Feststoffgehalte beim Betrieb mit realem versäuertem Brauereiabwasser.	20
Abbildung 12: PHA-Gehalte der wöchentlichen Akkumulationen über die Versuchsdauer mit realem versäuertem Brauereiabwasser a) mit Nährstoffzugabe während der Selektion b) ohne Nährstoffzugabe während der Selektion.	21
Abbildung 13: 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.	22
Abbildung 14: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Substrateigenschaften.	23

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der im Substratscreening untersuchten Rohabwässer	9
Tabelle 2: VFA-Ausbeuten im Substratscreening.	10

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 Belebtschlamm 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 Mozejko-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 2013; 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 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. 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. 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 Prozessschritt auf die PHA-Produktionsperformance wurde zudem erstmals der Einfluss unterschiedlicher Impfschlämme auf die PHA-Produktion untersucht. Auch sollten die Bedeutung der Selektionsphase und –länge auf die Entwicklung der Biozönose und deren damit zusammenhängenden Einfluss auf die PHA-Produktionsperformance 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.

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. Um eine Schwankungsbreite im Substrat darzustellen und die Möglichkeit einer PHA-Produktion unter diesen Bedingungen zu untersuchen, wurden unterschiedliche VFA-Raubelastungen in der Selektionsphase genutzt sowie daran anschließend PHA-Akkumulationen durchgeführt. Zudem wurde zum Schließen der Verfahrenskette in zwei Versuchen mit und ohne künstliche Nährstoffzugabe die Selektion PHA-produzierender Bakterien sowie eine PHA-Produktion unter Verwendung eines versäuerten Industrieabwassers als Substrat untersucht.

2 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 kurzkettenige, 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.

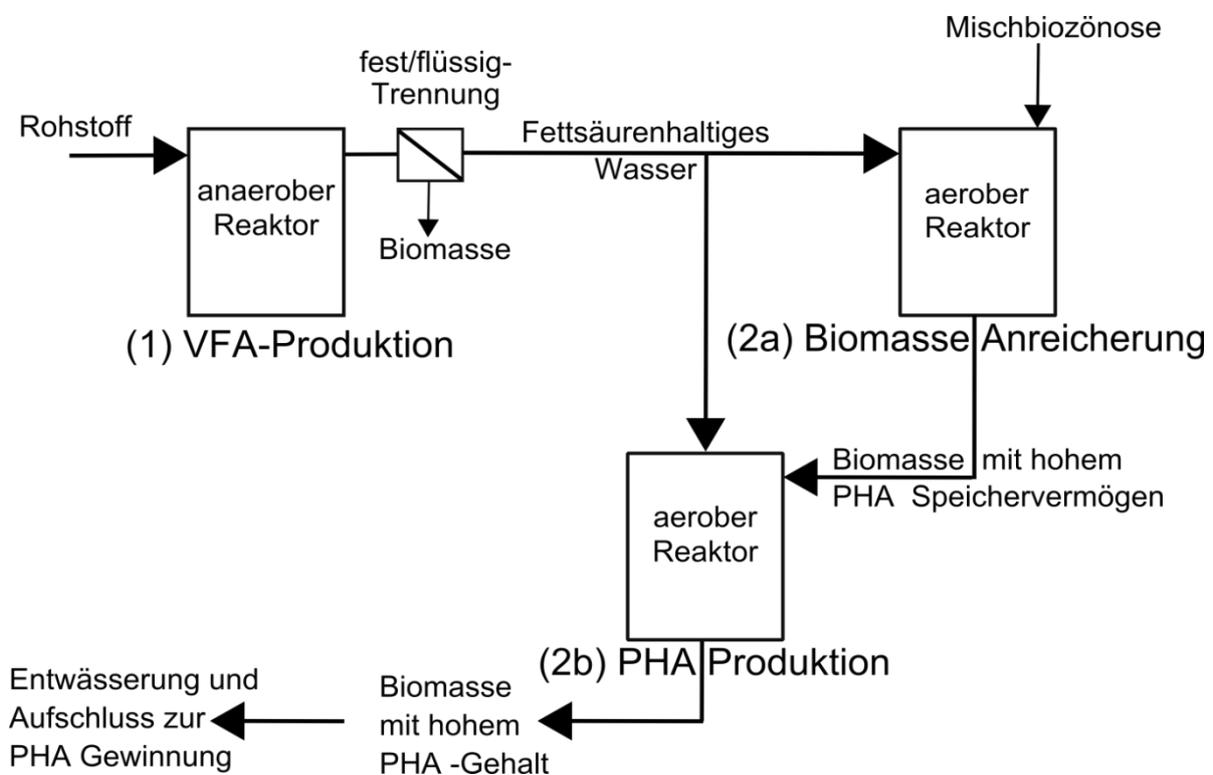


Abbildung 1: Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion (Pittmann 2015).

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 Belebtschlammes 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 2015).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Versäuerung

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 auch das Produkt negativ beeinflussen könnten. Vier verschiedene Abwässer wurden untersucht, wobei jeweils zwei Verdünnungsansätze betrachtet wurden, die höchstmögliche CSB-Konzentration sowie eine vergleichbare Konzentration von 2g/L.

3.1.1 Abwassercharakterisierung

Tabelle 1 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. 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_{nom} 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. Ein zweiter Verdünnungsansatz war daher bei diesem Abwasser nicht möglich. 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 1: 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
$NH_4\text{-N}$ in mg/L	11,9	<0,05	0,4	1,6
$PO_4\text{-P}$ in mg/L	13,4	5,6	9,1	5,6
$CSB_{\text{hom}} : NH_4\text{-N} : PO_4\text{-P}^*$	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 1 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“.

3.1.2 Einfluss des Start-CSB

Abbildung 2 zeigt, dass die Versäuerung der erwartbar kohlenhydratreichen Abwässer aus der Brauerei und der Kartoffelverarbeitung in beiden untersuchten 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.

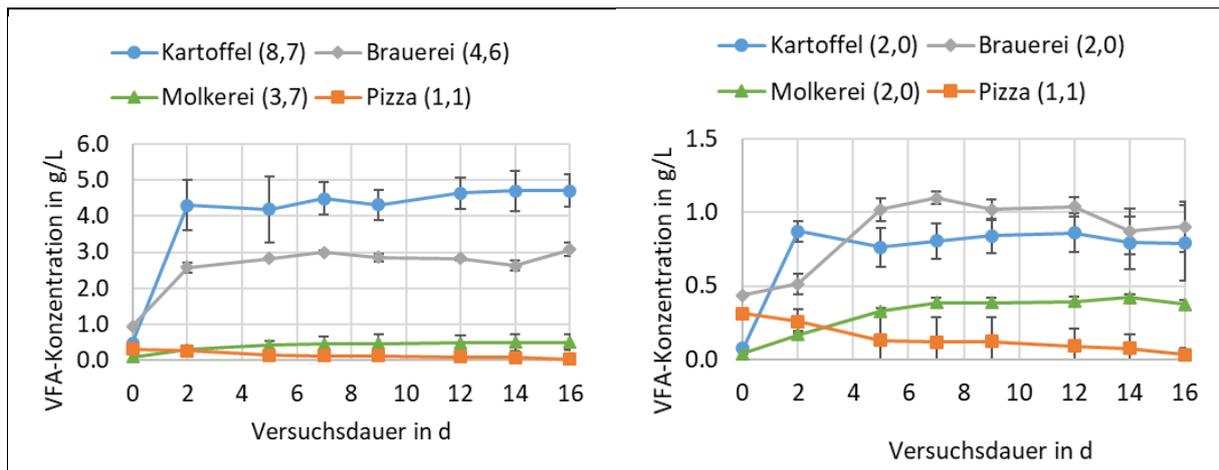


Abbildung 2: Verlauf der VFA-Konzentration im Substratscreening.

Die maximalen VFA-Ausbeuten für alle Versuchsansätze sind in Tabelle 2 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 wies 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 2: 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

In Abbildung 3 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.

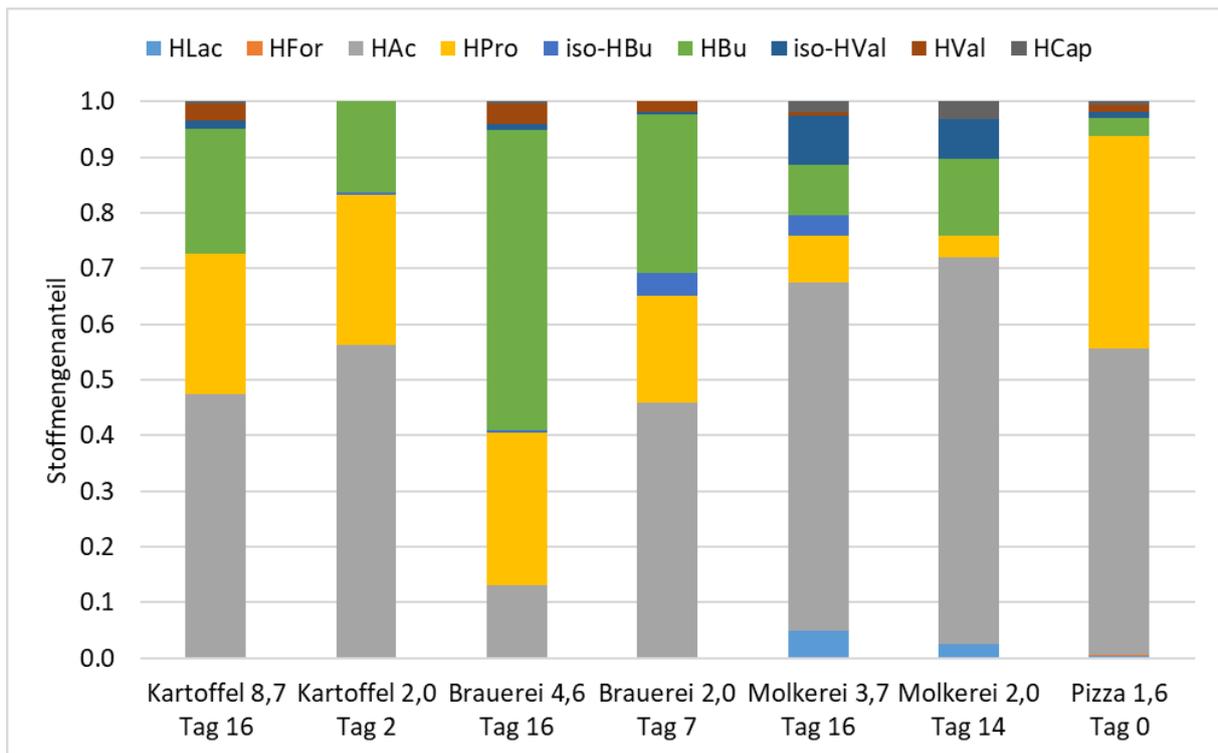


Abbildung 3: VFA-Zusammensetzung am Tag der höchsten Ausbeute.

Wie in Abbildung 3 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 3 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.

3.1.3 Mikrobielle Zusammensetzung

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

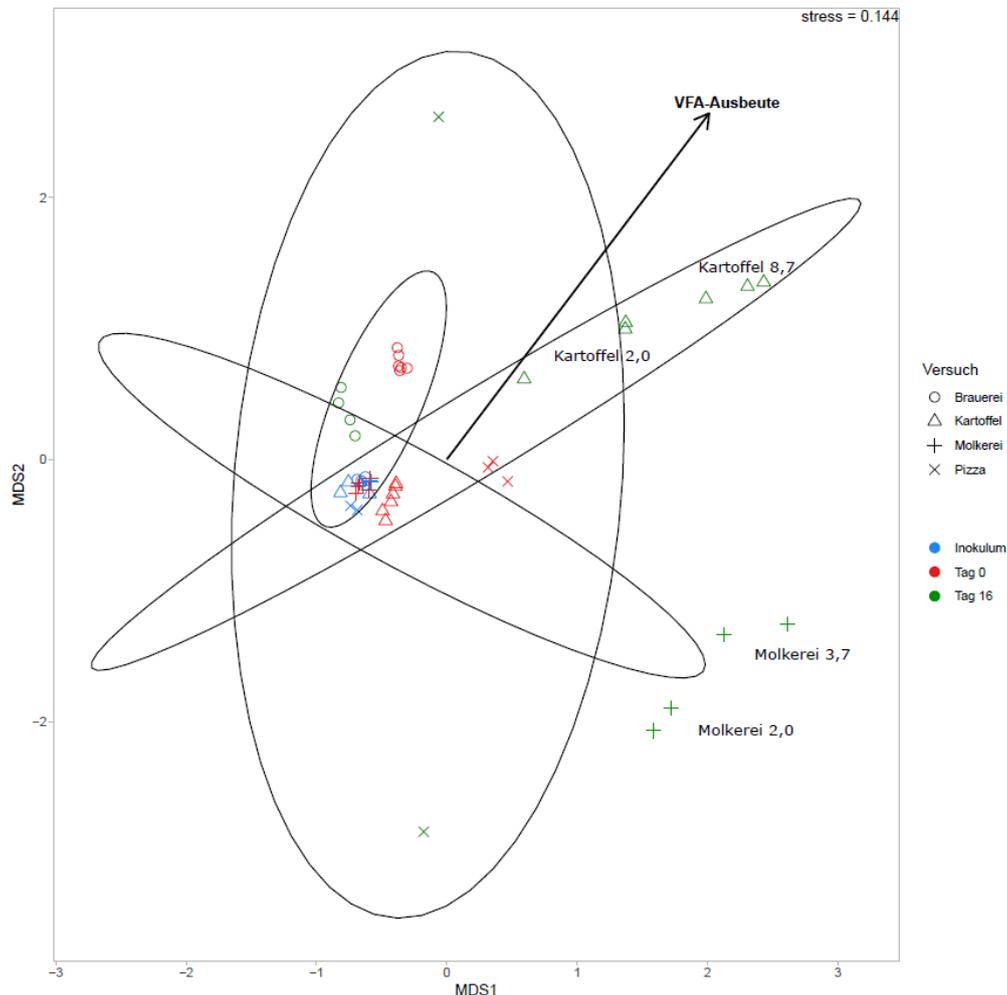


Abbildung 4: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Substratscreening-Versuche.

Aus Abbildung 4 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. 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.

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. 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. 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.

3.2 Selektion

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.

3.2.1 Verlauf der PHA-Produktion

Nachfolgend sind die Verläufe der PHA-Produktion der drei Versuchsblöcke mit den unterschiedlichen Inokula dargestellt.

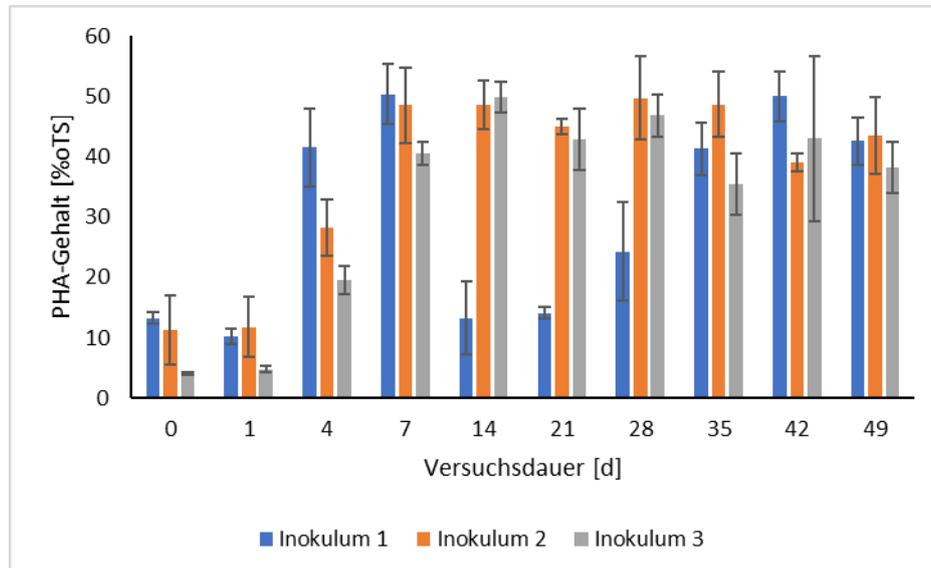


Abbildung 5: Vergleich der mittleren PHA-Gehalte aller drei Selektionsversuche über die Versuchsdauer.

Beim Vergleich der PHA-Gehalte aller drei Inokula zeigt sich, dass nach 7 bzw. 14 Tagen der Selektion, im Fall von Inokulum 3, bereits eine maximale PHA-Produktion erreicht werden konnte (Abbildung 5). 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 einem Betriebsfehler an Tag 7, bei dem

ein Ausfall der pH-Regelung zu verzeichnen war, erklären lässt. 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 maximale 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, ist allerdings aus den hier durchgeführten Versuchen offen.

3.2.2 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 ist die relative Abundanz an PHA-Produzenten für die drei unterschiedlichen Inokula dargestellt.

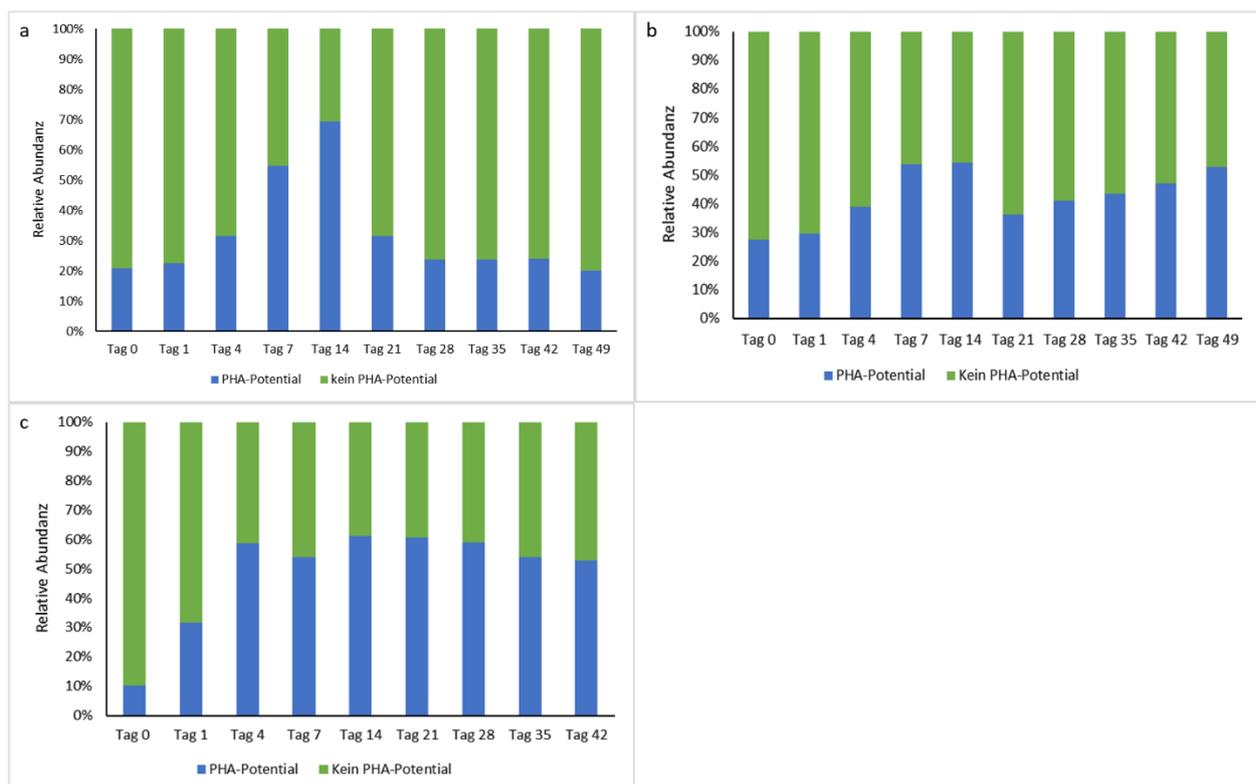


Abbildung 6: Relative Abundanz der PHA- und Nicht-PHA-Produzenten auf Gattungsebene während der Selektionsversuche mit der unterschiedlichen Inokula.

Aus Abbildung 6 a wird ersichtlich, dass innerhalb des ersten Selektionsversuches eine starke Zunahme der relativen Abundanz von zu Beginn 20,7 % auf 69,2 % an Tag 14 erfolgte. 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 vorher bereits beschrieben, ein Einbruch in der PHA-Produktion zu erkennen, welcher Folge einer Betriebsstörung war. Dabei zeigt jedoch die

Bakterienpopulation eine verzögerte Reaktion im Vergleich zur PHA-Produktion, welche bereits an Tag 14 eingebrochen war. 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). 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 6 b). 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 5). Zu Beginn des dritten Versuches war mit 10,3 % eine im Gegensatz zu den anderen beiden Selektionsversuchen relativ niedrige Abundanz an PHA-fähigen Organismen zu verzeichnen (Abbildung 6 c). 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 (Abbildung 5) 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. 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.

Aus Abbildung 7 ist zu erkennen, dass sich die Inokula der Versuche 1 und 2 zu Beginn relativ ähnlich waren. Das Inokulum 3 hingegen, wies zu Beginn des Versuches eine sehr unterschiedliche Zusammensetzung zu den anderen beiden Inokula auf. Die Versuchsreaktoren entwickelten sich zumeist ähnlich. Die einzige Ausnahme bilden die Replikate des Versuches 1 an Tag 14 und 21. Allerdings war dies der Zeitpunkt in dem ein Betriebsfehler innerhalb des Versuches zu einer starken Veränderung innerhalb der Biozönose (s. Abbildung 6) sowie zu einem Einbruch in dem erreichten PHA-Gehalt (s. Abbildung 5) führte. 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.

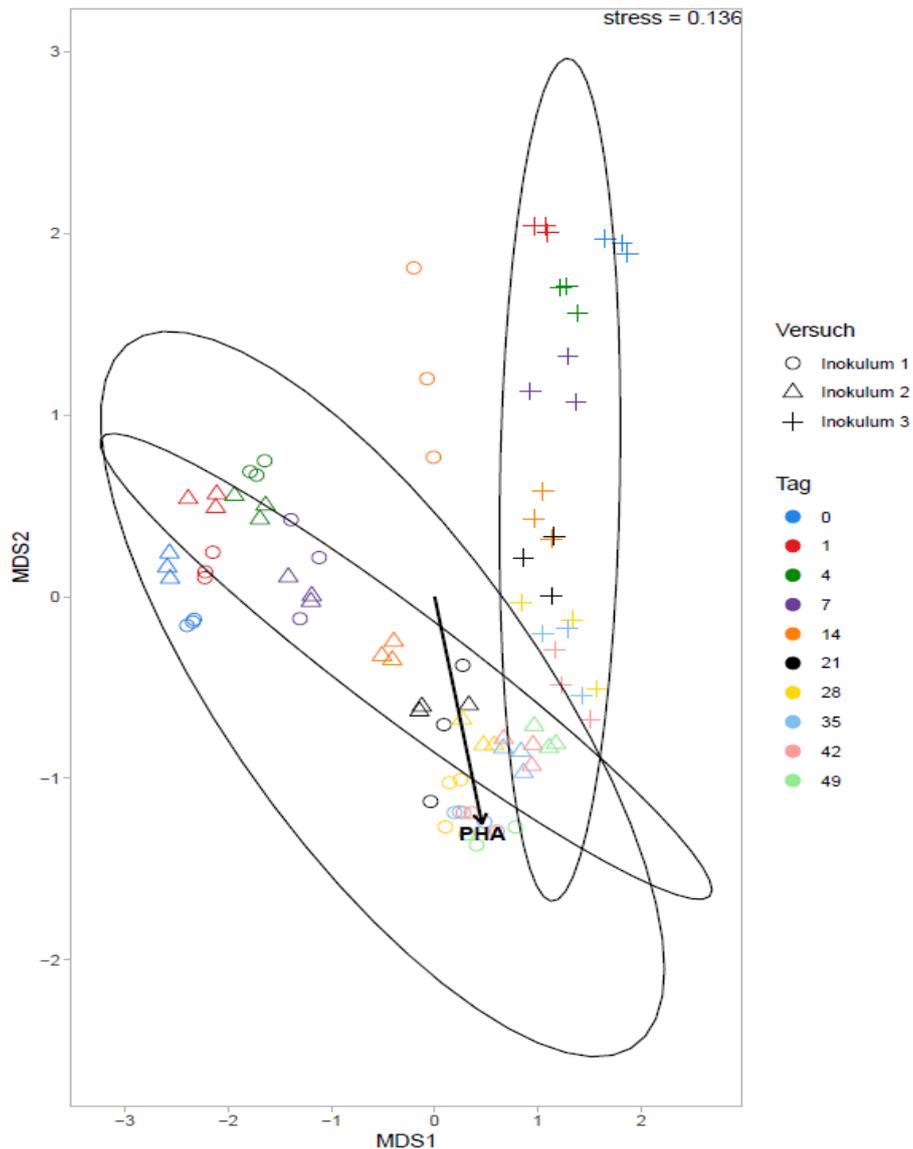


Abbildung 7: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Inokula.

3.3 PHA-Produktion

Ziel dieser Versuche war es, den Einfluss der VFA-Zusammensetzung und der Raumbelastung in der Akkumulation auf die PHA-Produktion und -Zusammensetzung zu untersuchen. Dazu wurde zusätzliche Akkumulationen innerhalb der letzten beiden Selektionsversuche durchgeführt.

Aus Abbildung 8 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. Mit der 100 mg/L-Konzentration des synthetischen Substrates aus Essig- und Propionsäure, welches ebenfalls für die Selektionsversuche verwendet wurde, 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. 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.

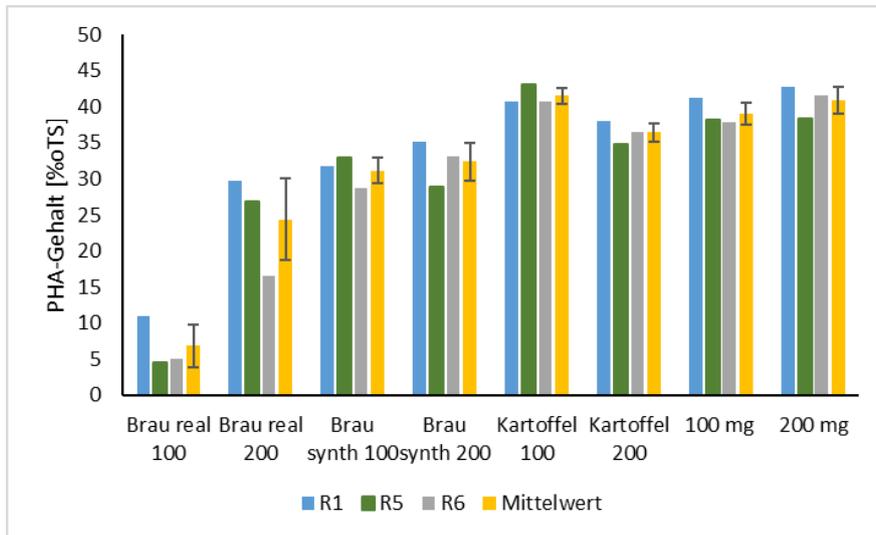


Abbildung 8: PHA-Gehalte der Akkumulationen mit unterschiedlichen Substraten innerhalb des zweiten Selektionsversuches.

Die Ergebnisse der Zusatzakkumulationen während des dritten Versuchsblockes waren ähnlich zu denen des zweiten Versuchsblockes (Abbildung 9). In diesem Fall konnte jedoch bei keinem Substrat eine Auswirkung der unterschiedlichen Substratkonzentrationen auf den PHA-Gehalt festgestellt werden. 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. 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.. Bei Verwendung des Standardsubstrates 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.

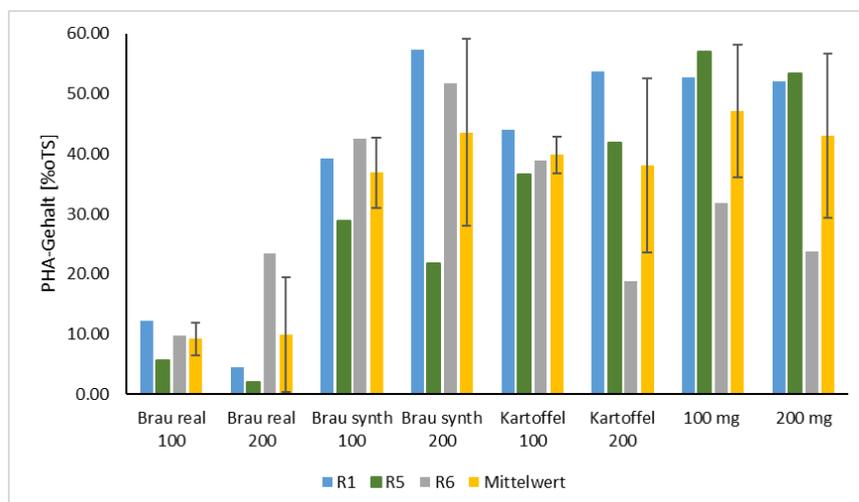


Abbildung 9: PHA-Gehalte der Akkumulationen mit unterschiedlichen Substraten innerhalb des dritten Selektionsversuches.

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. Eine Erklärung hierfür könnte möglicherweise im Anteil an nicht-VFA-CSB im Substrat liegen, der von den PHA-Produzenten nicht so effektiv für den Stoffwechsel genutzt werden kann. Die Biozönose war zudem mittels eines synthetischen Substrates selektiert worden und daher nicht an ein komplexeres Medium akklimatisiert. Eine PHA-Produktion war jedoch trotzdem möglich. Daher wäre eine verbesserte PHA-Ausbeute unter Verwendung eines realen Substrates bereits in der Selektionsphase möglicherweise erreichbar. 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. Es konnte zudem bei der Analyse der Zusammensetzung an produziertem PHA festgestellt werden, dass die Zusammensetzung des 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 hierbei ist vermutlich die Zusammensetzung der Biozönose und die zur PHA-Produktion verwendeten Stoffwechselwege der unterschiedlichen Organismen.

3.4 Kopplung der Verfahrensstufen

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.

3.4.1 Variation der Raumbelastung

Um die Prozesskette schrittweise und beispielhaft mit einem Abwasser zu schließen, wurde für diesen Versuchsteil synthetisches Brauereiabwasser verwendet. Die VFA-Zusammensetzung des Feeds für die Selektion und Akkumulation wurde ausgehend von der Versäuerungsergebnissen für die Versuche in Abschnitt 3.3 verwendet. Für den Feed in der Akkumulation wurden 100 mg/(L Feed) gewählt.

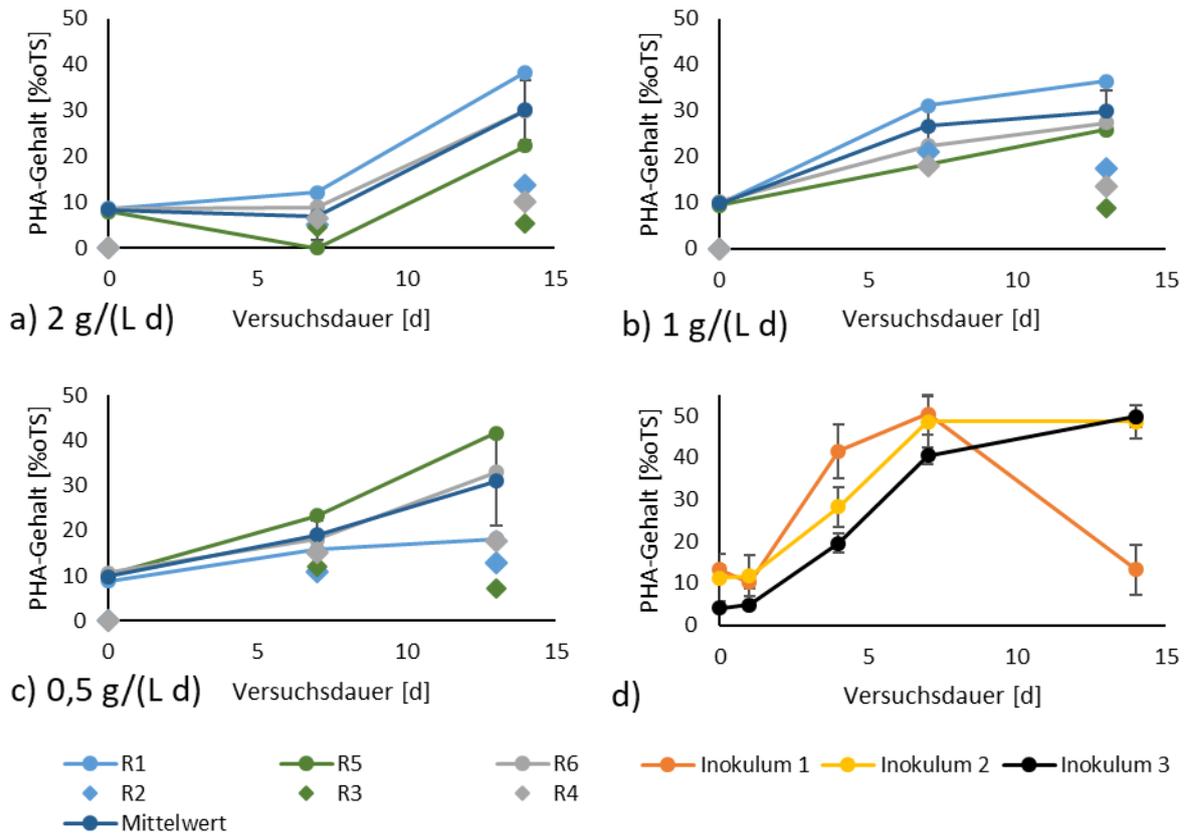


Abbildung 10: Verlauf der PHA-Gehalte über die Versuchsdauer bei verschiedenen VFA-Raubelastungen a) 2 g/(L d), b) 1 (L d), c) 0,5 (L d), d) PHA-Gehalte aus den Versuchen mit verschiedenen Inokula.

Abbildung 10 zeigt die PHA-Gehalte der Selektionsversuche bei verschiedenen VFA-Raubelastungen und zum Vergleich die PHA-Gehalte aus den Versuchen mit verschiedenen Impfschlämmen der ersten 14 Tage (s. Kapitel 3.2). Wie in den Abbildung 10 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 %) und diese 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 3.3 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. Bei diesen Versuchen wurden PHA-Gehalte von 31 ± 2 % bzw. 37 ± 6 % erreicht (s. Kapitel 3.3). 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 10 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, beschrieben in Kapitel 3.2, 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 Adaptionphase der Biozönose und einer verminderten PHA-Akkumulation führen.

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. 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.

3.4.2 Betrieb mit realem Abwasser

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 abweichend zu den bisherigen Versuchsblöcken eine Schwankung der Raumbelastung in der Selektion zugelassen, um einen realen Betrieb anzunähern.

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, um eine Gegenüberstellung der beiden Varianten zu ermöglichen. 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 in einem verminderten Biomassewachstum. Dies konnte anhand der Feststoffgehalte bestätigt werden (s. Abbildung 11). 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.

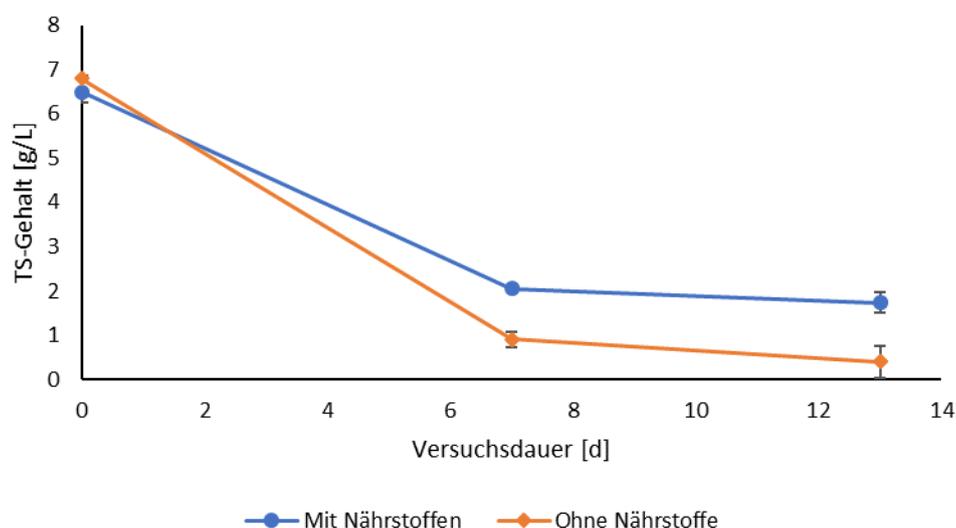


Abbildung 11: Feststoffgehalte beim Betrieb mit realem versäuertem Brauereiabwasser.

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

Der Vergleich der PHA-Gehalte nach den wöchentlichen Akkumulationen ist in Abbildung 12 dargestellt. Der PHA-Gehalt ohne Nährstoffe blieb nach 7 und 14 Tagen mit $26 \pm 2 \%$ und $26 \pm 1 \%$ stabil. Allerdings war der TS-Gehalt sehr niedrig (s. Abbildung 11) weshalb diese PHA-Gehalte nur bedingt aussagekräftig sind. Mit Nährstoffen wurde ein PHA-Gehalt von $40 \pm 4 \%$ nach 7 Tagen erreicht, der nach 14 Tagen wieder auf $25 \pm 2 \%$ fiel. Zur besseren Vergleichbarkeit sollte die VFA-Beschickung während aller Akkumulationen bei ca. $100 \text{ mg } CSB_{VFA}/(L_{\text{Startvolumen}} \text{ Feed})$ 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. $130 \text{ mg } CSB_{VFA}/(L_{\text{Startvolumen}} \text{ Feed})$ dosiert wurden. An Tag 0 und 13 dagegen 99 bzw. 93 $\text{mg } CSB_{VFA}/(L_{\text{Startvolumen}} \text{ Feed})$. 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.

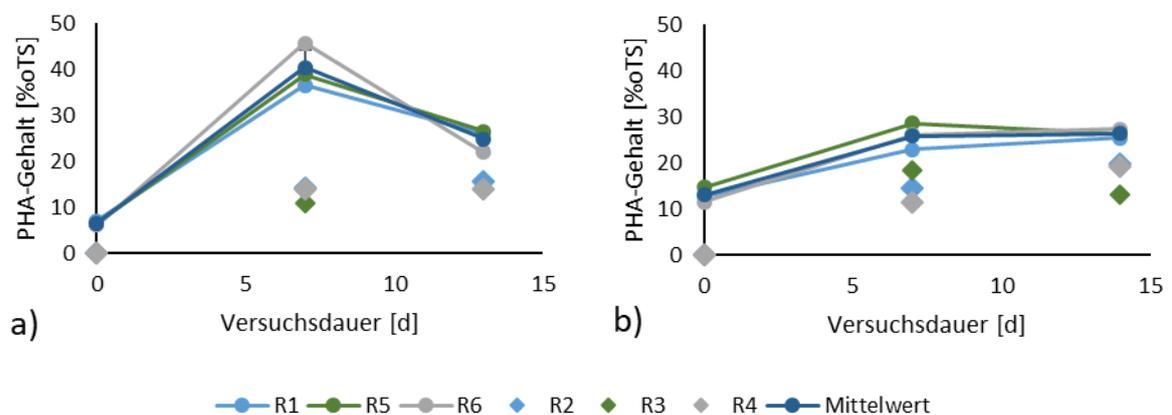


Abbildung 12: PHA-Gehalte der wöchentlichen Akkumulationen über die Versuchsdauer mit realem versäuertem Brauereiabwasser a) mit Nährstoffzugabe während der Selektion b) ohne Nährstoffzugabe während der Selektion.

Zur weiteren Beurteilung der Prozessstabilität beim Betrieb mit realem Abwasser ist in Abbildung 13 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.

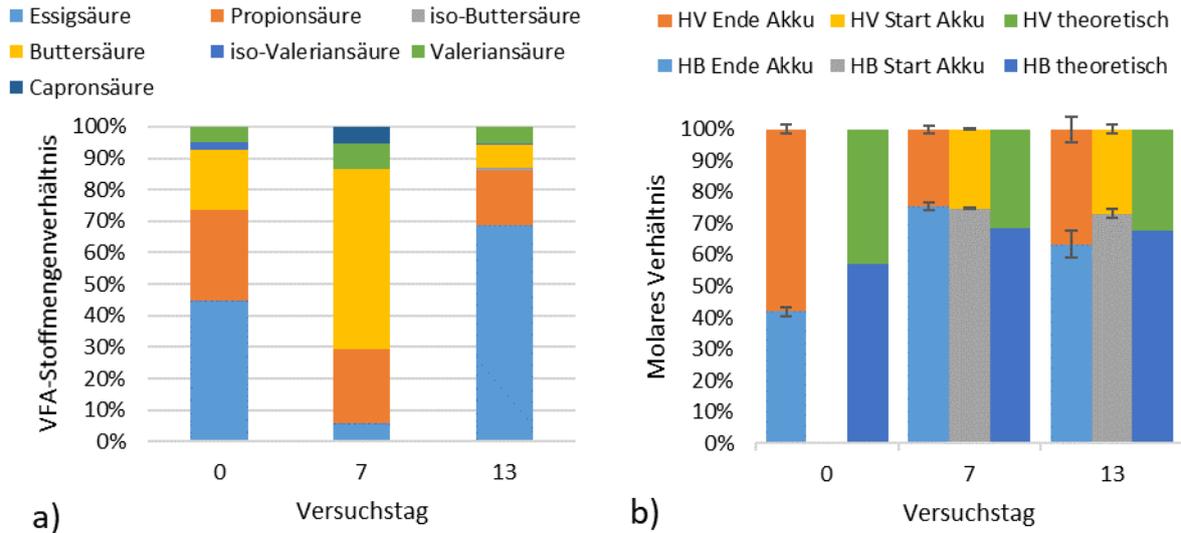


Abbildung 13: Akkumulation beim Selektionsdurchlauf mit Nährstoffen a) VFA-Zusammensetzung des Substrats für die Akkumulationen; b) Vergleich der Polymerzusammensetzung zu Beginn und Ende der Akkumulationen mit der theoretisch berechneten Zusammensetzung.

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 13 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 13 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.

3.4.3 Mikrobielle Zusammensetzung

Abbildung 14 zeigt zunächst, dass das für alle Versuche verwendete Inokulum in seiner Zusammensetzung sehr ähnlich war. 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.

Die vorangehenden Ergebnisse zeigen, dass eine erfolgreiche Selektion an PHA-Produzenten sowie eine PHA-Produktion mit realem Substrat möglich sind. Es ist allerdings möglich, dass eine längere Anpassungsphase der Biozönose an das komplexere und reale Substrat, die Verstoffwechslung der VFA zu PHA verbessern könnte. Zudem ist eine ausreichende Nährstoffverfügbarkeit in der Selektionsphase vorteilhaft.

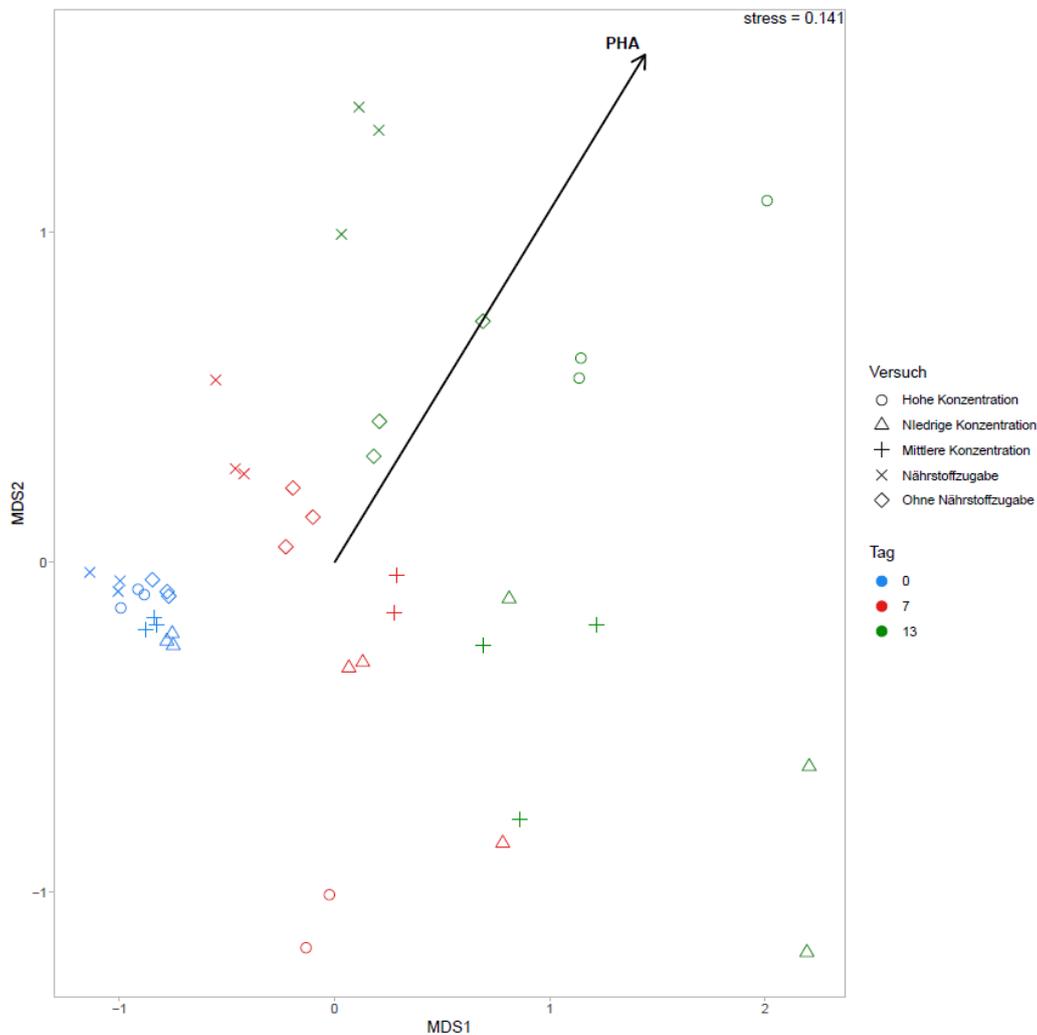


Abbildung 14: NMDS der mikrobiellen Zusammensetzung während der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Substrateigenschaften.

4 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 3.1 genannten Ansätze zur Entwicklung von Betriebsstrategien ableiten. Zu Punkt 1b lässt sich aus den Ergebnissen in Kapitel 3.1.3 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 gezeigt 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. Weiterhin konnte festgestellt 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.

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 ein Aufsparen 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.

5 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.
- 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.
- 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.
- 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>.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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.

Pittmann, Timo (2015): 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.