

Abschlussbericht
an die
Willy-Hager-Stiftung
zum Projekt

**„Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen Teil II -
Anpassung von Prozessbedingungen und Adaption der Biozönose
zur Beeinflussung der Polymerzusammensetzung“**

Laufzeit: 01.04.2022 – 30.06.2024

Julia Zimmer M.Sc.

Prof. Dr.-Ing. Heidrun Steinmetz

Rheinland-Pfälzisch Technische Universität Kaiserslautern-Landau

Fachgebiet Ressourceneffiziente Abwasserbehandlung

Juni 2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Ziel des Projekts.....	3
2 Theoretischer Hintergrund	4
2.1 Verfahrenskette.....	4
2.2 Versäuerung	10
2.3 Selektion	12
2.4 Biopolymeranreicherung	15
2.5 Zusammenfassung zum gegenwärtigen Kenntnisstand und offene Forschungsfragen.....	17
3 Material und Methoden	19
3.1 Versäuerung	19
3.1.1 Versuchsaufbau	19
3.1.2 Versuchsbeschreibung.....	20
3.2 Selektion	24
3.2.1 Versuchsaufbau	25
3.2.2 Versuchsbeschreibung.....	26
3.3 Akkumulation	28
3.3.1 Versuchsaufbau	28
3.3.2 Versuchsbeschreibung.....	29
3.4 Analytik	30
3.4.1 Trockensubstanz und Glühverlust	30
3.4.2 VFA und Nährstoffe	30
3.4.3 PHA	30
3.4.4 Biologische Analysen	31
4 Ergebnisse.....	33
4.1 Vorbereitende Versuche - Substratzusammensetzung	33
4.1.1 Selektionsversuche	33
4.1.2 Langzeitversuch	34

4.1.3	Akkumulationsversuche.....	36
4.2	Selektion	37
4.2.1	Schlammalter.....	38
4.2.2	Zwischenfazit.....	43
4.2.3	Zyklusdauer	44
4.2.4	Zwischenfazit.....	49
4.2.5	Raumbelastung.....	49
4.2.6	Zwischenfazit.....	54
4.2.7	Mikrobielle Zusammensetzung innerhalb der Selektionsversuche.....	54
4.3	Langzeitversuch.....	58
4.3.1	Zwischenfazit.....	66
4.4	Akkumulationsversuche.....	67
4.4.1	Zwischenfazit.....	73
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis.....	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion, modifiziert nach Uhrig (2023).	4
Abbildung 2: Versuchsaufbau zur Versäuerung.	20
Abbildung 3: Versuchsaufbau zur Selektion.	26
Abbildung 4: Verlauf zweier Zyklen während der Selektionsversuche (Steinmetz et al. 2022).	26
Abbildung 5: Versuchsaufbau zur PHA-Produktion.	29
Abbildung 6: Zusammensetzung der Substrate für die Selektion und Akkumulation der Versuchsböcke des Arbeitsschrittes 1.	34
Abbildung 7: Zusammensetzung der Substrate für den Langzeitversuch aus dem Arbeitsschritt 3.	36
Abbildung 8: Zusammensetzung der Substrate, welche in den Akkumulationsversuchen in Arbeitsschritt 2 eingesetzt wurden.	37
Abbildung 9: Gehalt an organischen Feststoff in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	38
Abbildung 10: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Schlammaltern. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	40
Abbildung 11: Mikrobielle Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zu PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.	42
Abbildung 12: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	43
Abbildung 13: Gehalt an organischem Feststoff in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	45
Abbildung 14: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	46
Abbildung 15: Mikrobielle Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zu PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.	48
Abbildung 16: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	49
Abbildung 17: Gehalt an organischem Feststoff in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	50

Abbildung 18: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	51
Abbildung 19: Mikrobielle Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zu PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.....	53
Abbildung 20: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	54
Abbildung 21: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung der Bakterienzusammensetzung innerhalb der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern. Punkte stellen Proben aus den drei Reaktoren zum Probenahmezeitpunkt dar. Ellipsen zeigen 95%-Konfidenzintervalle an. Der Parameter (PHA-Gehalt) mit einem signifikanten Zusammenhang zu dem Muster ($p < 0,05$) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.	56
Abbildung 22: Feststoffgehalt und organischer Feststoffgehalt in der Selektion während des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	59
Abbildung 23: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus der Selektion des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	60
Abbildung 24: Mikrobielle Zusammensetzung innerhalb des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.....	65
Abbildung 25: Anteil potenzieller PHA- und Nicht-PHA-Produzenten innerhalb des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung...	66
Abbildung 26: PHA-Gehalt innerhalb der Akkumulationsversuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung. Ac: Essigsäure, Pro: Propionsäure, FW: Fruchtsaftabwasser, vv Brau: vorversäuertes Brauereiabwasser.....	70
Abbildung 27: Mikrobielle Zusammensetzung innerhalb der Akkumulationsversuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.....	72
Abbildung 28: Anteil potenzieller PHA- und Nicht-PHA-Produzenten innerhalb der Versuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Substrate, deren Konzentration und Zusammensetzung während der Selektionsversuche.	21
Tabelle 2: Verwendete Substrate, deren Konzentration und Zusammensetzung während des Langzeitversuches.....	22
Tabelle 3: Verwendete Substrate, deren Konzentration und Zusammensetzung während der Akkumulationsversuche.	23
Tabelle 4: Übersicht über die Akkumulationsversuche des Arbeitsschrittes 2.	29
Tabelle 5: Charakteristika der Substrate für die Selektion und Akkumulation der Versuchsböcke des Arbeitsschrittes 1.....	33
Tabelle 6: Charakteristika der Substrate für den Langzeitversuch und Akkumulationsversuche aus Arbeitsschritt 3 und 2.....	35
Tabelle 7: PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung...41	41
Tabelle 8: PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung...47	47
Tabelle 9: PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung52	52
Tabelle 10: PHA-Zusammensetzung während des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.	62
Tabelle 11: PHA-Zusammensetzung innerhalb der Akkumulationsversuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung. Ac: Essigsäure, Pro: Propionsäure, FW: Fruchtsaftabwasser, vv Brau: vorversäuertes Brauereiabwasser.	70

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Kunststoffe finden weltweit große Anwendung und sind ubiquitär verbreitet. Auch in unserer Umwelt sind sie überall zu finden, was sich durch eine große Plastikverschmutzung in natürlichen Lebensräumen an Land und in Wasser äußert. Da sie zumeist beständig gegen natürliche Zersetzungsprozesse sind, ist dies ein immer weiter zunehmendes Problem. Zudem ist die Verwendung des endlichen und fossilen Rohstoffs Erdöl nicht nachhaltig. Es bedarf daher dringend der Entwicklung von alternativen Ausgangsstoffen und Prozessen zur Produktion von biologisch abbaubaren Kunststoffen (Khatami et al. 2021).

In geringen Mengen werden bereits „Biokunststoffe“ produziert (ca. 0,5 % der weltweiten Kunststoffproduktion von 400 Millionen Tonnen pro Jahr (European Bioplastics e.V. 2023), wobei sowohl das Rohmaterial als auch die Herstellungsart variieren und den Synonymen „Bioplastik, Biopolymer oder Biokunststoff“ keine eindeutige Definition zuzuordnen ist. Laut European Bioplastics e. V. muss Biokunststoff entweder zu einem Teil aus nachwachsenden Rohstoffen bestehen und/oder durch natürliche Zersetzungsprozesse biologisch abbaubar sein (European Bioplastics e.V. 2023). Pittmann und Steinmetz (2013b) haben eine engere Definition entworfen, nach der „Biokunststoffe aus nachwachsenden Rohstoffen und/oder biologisch abbaubaren Reststoffen (z. B. Abwasser, Klärschlamm, Bioabfall) hergestellt werden und durch in der Natur vorkommende Mikroorganismen vollständig abbaubar sind“.

Bislang werden „Biokunststoffe“ überwiegend auf pflanzlicher Basis und/oder mittels bakterieller Reinkulturen hergestellt (European Bioplastics e.V. 2023; Sabapathy et al. 2020; Nguyenhuynh et al. 2021). Für den Produktionsprozess mit Reinkulturen ist steriles Arbeiten eine zwingende Voraussetzung und es werden reine Medien, wie beispielsweise Glukose, als Substrate verwendet, was die Abläufe teuer und störanfällig macht (Sabapathy et al. 2020; Nguyenhuynh et al. 2021). Zur Verringerung der Produktionskosten, ist eine Produktion von Kunststoffen aus Abwasser und Reststoffen demgegenüber vorteilhaft.

Eine solche Kunststoffproduktion beruht auf der biologischen Synthese von Polyhydroxyalkanoaten (PHA). PHAs gehören zu der Gruppe der Polyester und können von über 300 Mikroorganismen als Energie- und Kohlenstoffspeicher hergestellt werden (Steinbüchel 1991). Einige der hierzu zählenden Organismen kommen im Belebtschlamm kommunaler Kläranlagen vor (Wu et al. 2019). Je nach Länge

der Seitenkettengruppe werden die PHAs in kurz- oder mittelkettige Polymere unterteilt (Anderson und Dawes 1990). Die meisten Materialeigenschaften der kurzkettigen PHAs ähneln denen von Polypropylen (PP), sodass das größte Substitutionspotenzial der PHAs im Ersatz von PP gesehen wird (Marciniak und Mozejko-Ciesielska 2021).

Voraussetzung für die PHA-Produktion ist die Verfügbarkeit von organischen Kohlenstoffverbindungen als Substrat für die Bakterien. Zahlreiche industrielle Abwässer und kommunale Klärschlämme weisen hohe Konzentrationen und 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. In der Forschung wird der Ansatz, Biopolymere aus diesen Stoffströmen zu gewinnen seit einigen Jahren verfolgt (Marciniak und Mozejko-Ciesielska 2021). Forschungsergebnisse verschiedener Forschungsgruppen (z.B. von Pittmann und Steinmetz 2017; Morgan-Sagastume et al. 2015; STOWA 2017; Carvalho et al. 2018; Huang et al. 2020) und eigene Ergebnisse aus dem vorangegangenen, von der Willy-Hager-Stiftung geförderten Projekt „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen - Einflussfaktoren auf Teilprozesse und Entwicklung von Mess-Steuer- und Regelungsstrategien zur Schließung der Verfahrenskette“ (Steinmetz et al. 2022) demonstrierten, dass die Produktion von PHA aus Abwasserströmen über einen zwei- bzw. dreistufigen Prozess möglich ist. In der anaeroben, ersten Stufe werden dabei leichtflüchtige, organische Säuren produziert, welche in der zweiten und dritten Stufe als Substrat für PHA-akkumulierende Bakterien aus Belebtschlamm genutzt werden.

Trotz der vielen Vorteile einer PHA-Biopolymerproduktion, findet diese bisher mit ca. 4,8 % der weltweiten Bioplastikherstellung von 2,18 Mio. Tonnen pro Jahr (European Bioplastics e.V. 2023) nur in geringem Umfang statt. Eine kommerzielle PHA-Produktion wird nur von wenigen Firmen durchgeführt und erfolgt zumeist mittels bakterieller Reinkulturen und teurer Substrate, was sich in einem hohen Marktpreis (ca. 6-fach so hoch wie bei Erdölbasierten Kunststoffen) und einer geringeren Konkurrenzfähigkeit des Produktes auf dem Markt widerspiegelt (Kourmentza et al. 2017; Khatami et al. 2021). Die PHA-Herstellung mittels Bakterienmischkulturen und Abwasserströmen als nachhaltige und günstige Rohstoffquelle im industriellen Maßstab könnte dieses Problem lösen und zu einer Produktion eines höheren Anteils an umweltfreundlichem Plastik beitragen. Trotz erfolgreicher Forschung verschiedener Forschungsgruppen und eigener Untersuchungen auf diesem Gebiet mit dem Ziel der Ermöglichung der großtechnischen Umsetzung dieses Verfahrens (Albuquerque et al. 2010; Pittmann und Steinmetz 2013a; Pittmann und Steinmetz 2013b; Pittmann und Steinmetz 2014;

Pittmann und Steinmetz 2017; Steinmetz et al. 2022; STOWA 2017; Carvalho et al. 2018; Morgan-Sagastume et al. 2019) gibt es noch einige Hindernisse, die vor einer industriellen Produktion überwunden werden müssen. Dies wird in Kapitel 2 näher erläutert. Khatami et al. (2021) sehen das derzeit größte Problem bei der PHA-Herstellung mithilfe von Bakterienmischkulturen in den schwankenden Eigenschaften der so gewonnenen Biopolymere. Zur Erfüllung der Marktanforderungen werden konstante, beeinflussbare Produkteigenschaften und eine hohe Qualität des Biopolymers benötigt. Da sich die bisherige Forschung hauptsächlich auf die Maximierung der Ausbeute in diesem Prozess fokussiert, sehen sie großen Forschungsbedarf bei der Beeinflussung des Prozesses zur Gewinnung eines Polymers mit konstanter Qualität und Zusammensetzung (Khatami et al. 2021). Hierzu bedarf es vertiefter Kenntnisse zur Beeinflussbarkeit der PHA-Produktion in Menge und Zusammensetzung durch die Wahl geeigneter Betriebsbedingungen innerhalb der Prozessschritte und eines stabilen Langzeitbetriebs zur Produktion eines Polymers konstanter Zusammensetzung. Zudem ist bisher nicht klar, inwiefern die PHA-produzierende Bakterienmischbiozönose die Polymerzusammensetzung beeinflusst, und es gibt zurzeit noch einige offene Fragen zur Entwicklung der Biozönose unter unterschiedlichen Betriebsbedingungen (Sabapathy et al. 2020; Nguyenhuynh et al. 2021). Diese näher zu untersuchen, um Aussagen über die hergestellte Menge und Zusammensetzung des PHAs sowie die Stabilität der PHA-Produktion treffen zu können, ist daher unerlässlich.

1.2 Ziel des Projekts

Dieses Projekt soll als Anknüpfung an das vorangegangene Projekt „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen - Einflussfaktoren auf Teilprozesse und Entwicklung von Mess-Steuer- und Regelungsstrategien zur Schließung der Verfahrenskette“ (Laufzeit bis 03/2022) dienen. Dies soll zu einem tiefergehenden Verständnis und zu einer Weiterentwicklung der Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen beitragen, um eine Alternative zur Herstellung von Kunststoffen aus Erdöl zu ermöglichen. Dabei soll der Hauptfokus auf dem Einfluss verschiedener Betriebsbedingungen in der Selektionsphase auf die Biozönose und damit zusammenhängend auf die PHA-Zusammensetzung liegen. Zudem soll die Möglichkeit einer stabilen Langzeit-PHA-Produktion unter schwankenden Prozessbedingungen untersucht werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Projektes dargestellt und diskutiert. Die im Rahmen der im Projekt durchgeführten Versuche gewonnenen Ergebnisse werden ebenfalls als Bestandteil einer an der RPTU durchgeführten Dissertation von Julia Zimmer genutzt und auf dem KLUEDO-Dokumentenserver der Universität veröffentlicht werden.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Verfahrenskette

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

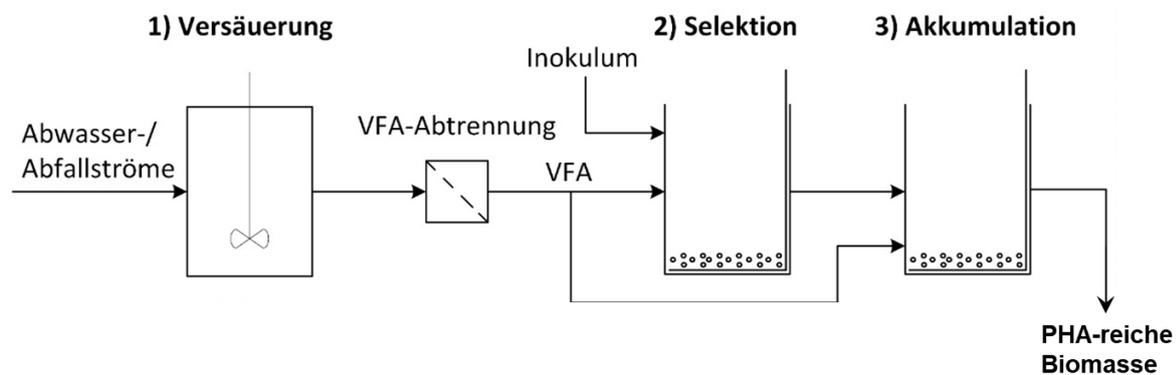


Abbildung 1: Verfahrenskette zur Biopolymerproduktion, modifiziert nach Uhrig (2023).

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 (Selektion, s. Abbildung 1) (Dias et al. 2006). Eine Anreicherung dieser Bakterien kann durch einen Wechsel der Milieubedingungen erreicht werden, indem einem aeroben Reaktor zyklisch Fettsäuren als leicht abbaubares Substrat zugegeben werden (Majone et al. 1996). 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 (Nguyenhuynh et al. 2021). 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 (PHA) zu verwenden (Majone et al. 1996). Wenn das Substrat verbraucht ist, sind die Bakterien bis zur nächsten VFA-Zugabe 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). 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 (Akkumulation, s. Abbildung 1). Dieser wird im Batch-Modus mit stoßweiser Substratzugabe über einen festen Zeitraum mit festgelegten Intervallen oder anhand einer Steuerung über den Sauerstoffverbrauch (Feed-on-demand) betrieben und belüftet (Serafim et al. 2004). 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 Nährstoffmangel ausgesetzt (Khatami et al. 2021).

In verschiedenen Forschungsgruppen wurde in den letzten Jahren die Nutzung von kommunalen oder industriellen Abfällen und Abwasserströmen zur Herstellung von PHA über einen mehrstufigen Prozess untersucht. In diesen Studien wurden neben unterschiedlichen Betriebsparametern ebenfalls unterschiedliche Untersuchungsschwerpunkte gesetzt. So befassten sich Matos et al. (2021b) mit dem Einfluss zweier unterschiedlicher Schlammalter auf die PHA-Produktion und das Biomassewachstum im halbtechnischen Pilotmaßstab unter Verwendung von fermentierten Obstabfällen und einer entkoppelten Nährstoffzugabe. Die Substratkonzentration wurde während der Selektion über 40 Tage stufenweise erhöht und es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Akkumulationsversuche durchgeführt. Dabei beobachteten sie eine höhere Wachstumsrate in Kombination mit einer verminderten PHA-Produktion bei der Biozönose mit einem Schlammalter von 2 d und erreichten mit dieser bei einer Raumbelastung von $12,3 \text{ g CSB}/(\text{L} \cdot \text{d})$ 49,2 % PHA bezogen auf die organische Trockensubstanz im Vergleich zu der Biomasse mit einem Schlammalter von 4 d und einer Raumbelastung von $14,5 \text{ g CSB}/(\text{L} \cdot \text{d})$ mit 69 % PHA. Sie fanden zudem einen Zusammenhang der PHA-Ausbeute mit der Abundanz mutmaßlicher PHA-Produzenten (Matos et al. 2021b). In einer Studie der gleichen Forschergruppe mit den gleichen Randbedingungen, mit Ausnahme leicht abweichender Substratkonzentrationen bei der schrittweisen Erhöhung und einem festen Schlammalter von 4 Tagen, lag der Untersuchungsschwerpunkt auf der Optimierung der VFA-Produktion und der Demonstration

der PHA-Produktion mit dem so gewonnenen Substrat. Hierbei konnte bei einer Raumbelastung von 8,7 g CSB/(L*d) ein maximaler PHA-Gehalt von 80,5 % bezogen auf die organische Trockensubstanz erzielt werden (Matos et al. 2021a). In einer Studie von Guarda et al. (2024) wurden ebenfalls Untersuchungen zu den Schlammaltern von 2 und 4 Tagen unter Verwendung unterschiedlicher Raumbelastungen von 45 und 60 Cmmol_{VFA}/(L*d) mit fermentiertem Biertreber als Substrat durchgeführt. Hierbei wurde eine maximale PHA-Produktivität mit einem PHA-Gehalt von 45,4 % bezogen auf die Zelltrockenmasse bei der höheren Raumbelastung (60 Cmmol_{VFA}/(L*d)) und dem höheren Schlammalter (4 d) erzielt (Guarda et al. 2024). Carvalho et al. (2018) hingegen untersuchten die Auswirkungen verschiedener realer Substrate auf eine Bakterienmischkultur und deren PHA-Produktionsperformance. Zunächst konnten sie unter Verwendung von Melasse als Substrat in der Selektion einen maximalen PHA-Gehalt von 23 % bezogen auf die organische Trockensubstanz erreichen. Nach einem Substratwechsel zu fermentierter Käsemolke in der Selektionsphase erzielten sie einen maximalen PHA-Gehalt von 25 % (Carvalho et al. 2018). Sie beobachteten eine Veränderung in der Zusammensetzung der Mischkultur infolge des Substratwechsels, allerdings blieb die PHA-Produktionskapazität weiterhin stabil. Jedoch wurde hierbei lediglich die Veränderung der Biozönose infolge des Substratwechsels untersucht, wodurch keine klaren Aussagen zum Einfluss des Inokulums getroffen werden können. Oliveira et al. (2017) legten ihren Fokus auf die Entkopplung der Stickstoff- von der Kohlenstoffzugabe während der famine-Phase, um einen stärkeren Selektionsdruck auf die nicht-PHA-Produzenten und einen weiteren Wachstumsvorteil für die PHA-Produzenten zu schaffen. Dabei stellten sie eine verbesserte PHA-Produktionsperformance der Biozönose, welche unter entkoppelter Substratzugabe selektiert wurde, fest. Sie erreichten bei Zugabe von Kohlenstoff und Stickstoff zusammen in der Selektion einen maximalen PHA-Gehalt von 17 % bezogen auf die organische Trockensubstanz, wohingegen sie bei entkoppelter Stickstoffzugabe 27 % erzielen konnten (Oliveira et al. 2017). 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. Letztere beobachteten unter Verwendung beider Substrate eine vergleichbare Performance von maximal 43,7 und 44,8 % PHA bezogen auf die Zelltrockenmasse und schlussfolgerten, dass sich Brauereiabwasser als Substrat im PHA-Produktionsprozess eignet (Tamang et al. 2019). Ben et al. (2016) fanden keine Verbesserung der PHA-Produktionsperformance durch eine Änderung der Temperatur oder des pH-Wertes, allerdings konnte diese durch eine Erhöhung der Substratkonzentration von 57 auf 79 C-mmol/L erhöht werden, wobei eine weitere Erhöhung der

Konzentration auf 109 C-mmol/L zu einer Verschlechterung der Performance führte. Sie erreichten einen maximalen PHA-Gehalt von 39 % bezogen auf die organische Trockensubstanz (Ben et al. 2016). Die Versuche von Moretto et al. (2020) fokussierten sich auf die Auswirkungen unterschiedlicher Verhältnisse des Schlammalters zur Zykluslänge im halbtechnischen Pilotmaßstab unter Verwendung einer fermentierten Mischung von organischem Abfall und kommunalem Belebtschlamm. Die besten Ergebnisse von 59 % PHA bezogen auf die organische Trockensubstanz erzielten sie mit einem Schlammalter von einem Tag und einer Zykluslänge von 0,5 Tagen und dem damit geringsten untersuchten Verhältnis von Schlammalter zu Zykluslänge von 2 (Moretto et al. 2020). Eine Studie von Chen et al. (2017) befasste sich hingegen mit dem Einfluss verschiedener Kombinationen der Substratkonzentration, des Schlammalters und der Biomassekonzentration auf die PHA-Produktion. Die besten Ergebnisse erzielten sie mit einem Schlammalter von 5 Tagen, einer anfänglichen Substratkonzentration von 2,52 g CSB/L und einer Biomassekonzentration von 3,65 g/L, womit sie einen maximalen PHA-Gehalt von 61% erreichten. Sie konnten jedoch keinen Effekt der Substrat- oder der Biomassekonzentration auf die PHA-Produktionsperformance feststellen. Nur das Schlammalter wirkte sich durch Veränderung des feast/famine-Verhältnisses aus, wobei ein kürzeres Schlammalter von 5 Tagen im Vergleich zu 10 Tagen vorteilhaft war (Chen et al. 2017). In dem Projekt PHARIO lag der Fokus auf der Demonstration der Eignung des Verfahrens zur Polymerproduktion unter Verwendung von Abwasserströmen im größeren Maßstab und nicht auf den Auswirkungen verschiedener Betriebsbedingungen oder Substrate auf diesen Prozess. Dabei erreichten sie unter Verzicht auf eine Selektionsphase im Mittel (52 Batch-Akkumulationen mit unterschiedlichen Substraten) einen PHA-Gehalt von 41 % bezogen auf die organische Trockensubstanz (STOWA 2017).

Die oben beschriebenen Studien befassten sich jeweils entweder nur mit einzelnen Aspekten oder sie verwendeten verschiedene Betriebsparameter, sodass sich unterschiedliche Resultate ergaben. Weiterhin fand in den wenigsten der Studien eine Untersuchung der verwendeten Parameter auf die PHA-Zusammensetzung statt. Lediglich in den Untersuchungen von Matos et al. (2021a, 2021b) und dem Projekt PHARIO (STOWA 2017) wurde die Polymerzusammensetzung untersucht und eine Verbindung zu der Substratzusammensetzung festgestellt, bei der die Zusammensetzung des produzierten PHA mit der durch die Zusammensetzung des Substrates theoretischen übereinstimmte. Oliveira et al. (2017) und Guarda et al. (2024) betrachteten ebenfalls die Polymerzusammensetzung, untersuchten jedoch keine gezielten Einflüsse auf diese. Sie konnten zudem keinen Unterschied in der Zusammensetzung zwischen den unterschiedlichen Selektionsstrategien feststellen. Weiterhin fanden keine gezielten Untersuchungen zu einer Langzeitstabilität einer Selektion in Zusammenhang mit der

PHA-Produktion und -Zusammensetzung statt, da die meisten Versuche über einen relativ kurzen Zeitraum durchgeführt wurden. Mit Ausnahme der Studie von Ben et al. (2016) mit einer Versuchsdauer von 400 Tagen und Guarda et al. (2024), welche die Selektion über 6 Monate betrieben, fanden alle Selektionsversuche über einen Zeitraum von 28 bis 92 Tagen statt. Für die meisten Untersuchungen ist zudem unklar, welcher Impfschlamm verwendet wurde bzw. wie die Biozönose zusammengesetzt war. Lediglich Oliveira et al. (2017), Carvalho et al. (2018), Matos et al. (2021a, 2021b) und Guarda et al. (2024) untersuchten die Zusammensetzung der Biozönose. Allerdings ging aus den Studien von Carvalho et al. (2018), Matos et al. (2021a, 2021b) und Guarda et al. (2024) nicht klar hervor, wie diese sich unter den gleichen Randbedingungen verändert und welchen Einfluss das Inokulum bzw. definierte Selektionsbedingungen auf dieses haben, da die Substratkonzentration bzw. die Selektionsbedingungen im laufenden Prozess geändert wurden. Außerdem gab es in diesen Studien keine Untersuchungen des Einflusses der Veränderungen in der Biozönose auf die PHA-Produktionsperformance bzw. die Polymerzusammensetzung. Eine tiefere Kenntnis über die Biozönose könnte allerdings dazu beitragen, die großen Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Studien bezüglich des maximalen erreichten PHA-Gehaltes von 17 bis 80,5 % unter Verwendung realer Substrate besser zu erklären und könnte eine Stellschraube zur Beeinflussung des Prozesses in Richtung einer gewünschten PHA-Ausbeute und -Zusammensetzung darstellen. Auch könnte diese erklären, wieso unterschiedliche verwendete Parameter zu ähnlichen PHA-Gehalten führen können, wie dies beispielsweise anhand der Studie von Ben et al. (2016) mit einem erreichten PHA-Gehalt von 39 % und dem Projekt PHARIO (STOWA 2017) mit einem PHA-Gehalt von 41 % zu erkennen ist, obwohl in dem Projekt PHARIO im Gegensatz zu der Studie von Ben et al. (2016) auf eine Selektionsphase verzichtet wurde. Zudem gab es in Studien des gleichen Autors unter gleichen Randbedingungen drastische Unterschiede in der Raumbelastung, bei welcher die beste PHA-Produktionsperformance erreicht werden konnte und dem dabei erzielten PHA-Gehalt (Matos et al. 2021a, 2021b). Weiterhin verwendeten die Studien, welche im Gegensatz zu den anderen genannten Untersuchungen (Reaktionsvolumen 0,8-4 L) in größerem Maßstab operierten (Reaktorvolumen in der Selektion 100 L), kommunalen oder industriellen Abfall und kein Industrieabwasser als Substrat für den Prozess (Moretto et al. 2020; Matos et al. 2021a, 2021b). Nur das Projekt PHARIO befasste sich mit dem Upscaling des Prozesses (Maßstab 500 L) unter Verwendung von kommunalen und industriellen Abwasserströmen, jedoch fand dort kein gezieltes Abstimmen der einzelnen Prozessschritte aufeinander statt (STOWA 2017). Bisher fehlen daher immer noch Erkenntnisse dazu, wie sich unter den gleichen Randbedingungen unterschiedliche Prozessparameter auf die PHA-produzierende Biozönose, deren Performance und die Polymerzusammensetzung auswirken, sodass alle

Prozessschritte zur gezielten Beeinflussung dieser aufeinander abgestimmt werden können und die Kenntnisse daraus für ein Upscaling verwendet werden können.

Auch eigene Studien (Pittmann und Steinmetz 2013b; Pittmann und Steinmetz 2014; Steinmetz et al. 2022) belegten, dass die beschriebenen Verfahrensstufen geeignet sind, um aus Primärschlamm und Industrieabwässern PHA in Bakterien aus Belebtschlamm anzureichern. Dabei lag bei den Versuchen von (Pittmann und Steinmetz 2013b; Pittmann und Steinmetz 2014) der Untersuchungsschwerpunkt auf der Auswahl geeigneter Randbedingungen, mit denen eine möglichst hohe Polymerproduktion erreicht werden kann. Durch Variationen der Prozessparameter Substratkonzentration, Temperatur, pH-Wert und Zyklusdauer, PHA-Gehalte konnten 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.

In den eigenen Untersuchungen des vorherigen von der Willy-Hager-Stiftung geförderten Projekts „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen - Einflussfaktoren auf Teilprozesse und Entwicklung von Mess-Steuer- und Regelungsstrategien zur Schließung der Verfahrenskette“ wurden unterschiedliche Industrieabwässer auf ihre Eignung als Substrat zur PHA-Herstellung untersucht. Dabei konnten bei der Verwendung von Brauereiabwasser im ersten Prozessschritt Versäuerungsgrade von 67-69,5 %, bei Kartoffelabwasser 54 % und bei Molkereiabwasser 21 % erzielt werden. Zudem konnten bei Versuchen zur PHA-Produktion mit kommunalem Belebtschlamm unter Verwendung eines synthetischen Substrates PHA-Gehalte von bis zu 38 % bezogen auf den Trockenrückstand erreicht werden. Dabei wurde ebenfalls ein positiver Einfluss der Selektionsphase auf die Anreicherung an PHA-produzierenden Mikroorganismen sowie auf die PHA-Produktion festgestellt. DNA-Untersuchungen innerhalb dieses Versuches zeigten bei einer Selektionsdauer von 4 Wochen eine Veränderung in der Bakterienzusammensetzung und -abundanz, wobei die relative Häufigkeit PHA-produzierender Bakterien von zu Beginn 18,7 % auf 89,6 % nach 4 Wochen anstieg (Steinmetz et al. 2022). Eine ähnlich systematische Untersuchung zum Einfluss der Selektionsdauer auf die Bakterienzusammensetzung wurde bisher nur durch (Huang et al. 2018) durchgeführt, welche ebenfalls eine Zunahme an einzelnen PHA-produzierenden Taxa mit fortschreitender Selektionsdauer bis zum Einstellen eines pseudo-steady-states feststellen konnten. Bei Versuchen zu diesem Einfluss der Selektionsdauer und der Zusammensetzung und Herkunft des Inokulums konnten unter Verwendung eines Belebtschlammes einer Brauerei und eines synthetischen Substrates PHA-Gehalte von bis zu 51,2 % bezogen auf die organische Trockensubstanz erzielt werden. Es konnte jedoch

außerdem festgestellt werden, dass bei Nutzung des gleichen synthetischen Substrates und gleicher Randbedingungen zwar eine ähnliche Biomassezusammensetzung, aber eine unterschiedliche PHA-Zusammensetzung erreicht wurde. Bei Nutzung eines versäuerten Brauereiabwassers als reales Substrat und eines Belebtschlammes aus einer Anlage mit biologischer Phosphorelimination konnte ein maximaler PHA-Gehalt von 28,9 % erreicht werden (Steinmetz et al. 2022).

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. Hierzu gab es bisher kaum gezielte Untersuchungen anderer Forschungsgruppen. Welchen Einfluss die Bakterienbiozönose auf die Polymerzusammensetzung und -ausbeute hat ist bisher ebenfalls noch nicht geklärt (Kapitel 2.3 und 2.4). Die Kenntnis hierüber ist jedoch für eine gezielte Steuerung und Optimierung des Prozesses sowie eine stabile Langzeitproduktion von großer Bedeutung. Zudem bleibt eine Langzeituntersuchung der Stabilität des Prozesses, insbesondere der Selektion, mit einer damit verbundenen Polymerzusammensetzung bisher offen. Damit eine Übertragung für ein Up-Scaling und ein Schließen der gesamten Verfahrenskette möglich ist, bedarf es daher noch weiterer Untersuchungen. So sind immer noch zahlreiche weitere grundlegende Fragen ungeklärt, die zu einer gezielten Beeinflussung der Polymerzusammensetzung und zu einer Erhöhung des Polymergehaltes in den Mikroorganismen unter schwankenden Rahmenbedingungen des Abwasserstroms führen. Dazu zählen die Auswirkungen definierter Betriebsparameter wie beispielsweise des Schlammalters, der Substratkonzentration und der Zyklusdauer in der Selektion (vgl. Kapitel 2.3) und der Substratwahl in der Selektion und Akkumulation (vgl. Kapitel 2.4) auf die Biozönose und dem damit einhergehenden Einfluss dieser auf die Polymerzusammensetzung und Stabilität der PHA-Produktion. Details zu den einzelnen Prozessschritten, dem bisherigen Forschungsstand und den noch offenen Fragestellungen werden in den Kapiteln 2.2 bis 2.5 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 organischen Säuren (VFA), die zur Produktion von PHA nötig sind, während der Versäuerung

gebildet werden, wird der anaerobe Abbau nach der Versäuerung durch Einstellung des pH-Wertes oder mithilfe der Aufenthaltszeit gestoppt (Pittmann 2015). Im Hinblick auf die spätere PHA-Produktion sind die wichtigsten Zielgrößen der Versäuerung die VFA-Ausbeute und -Zusammensetzung. 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; STOWA 2017; Albuquerque et al. 2007; Lemos et al. 2006). Dabei zeigte sich in diesen Untersuchungen, dass die Bildung von PHV (Polyhydroxyvalerat) durch einen hohen VFA-Anteil mit ungerader Anzahl an C-Atomen (Propionsäure (HPro) und Valeriansäure (HVal)) begünstigt wird. Eigene Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Polymerzusammensetzung nicht allein von der Substratzusammensetzung abhängt und möglicherweise auch durch die Bakterienzusammensetzung beeinflusst wird (Steinmetz et al. 2022). 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.

Ein Fokus des vorherigen Projektes lag auf der gezielten Untersuchung der Versäuerungsstufe, daher hat diese in diesem Projekt nicht mehr im Mittelpunkt der Untersuchungen gestanden. Die Ergebnisse des vorangegangenen Projektes zeigten, dass die Art des Abwassers sowie ebenfalls die Start-CSB-Konzentration einen Einfluss auf sowohl die VFA-Ausbeute als auch auf die VFA-Zusammensetzung haben (Steinmetz et al. 2022). Unter Verwendung von Brauereiabwasser zur VFA-Herstellung konnte ein hoher Versäuerungsgrad von 67 % erreicht werden konnte. Zudem konnte hierbei im Vergleich zu anderen untersuchten Abwässern weiterer und eigener Studien ein höherer Anteil an Propionsäure und Valeriansäure erzielt werden (Steinmetz et al. 2022), welcher einen begünstigenden Einfluss auf die Polymerzusammensetzung haben könnte. Ebenfalls konnten sowohl ein höherer Versäuerungsgrad als auch ein höherer Anteil an Propion- und Valeriansäure im Vergleich zu der Studie von Ben et al. (2016) erzielt werden, in der ebenfalls Brauereiabwasser auf seine Versäuerungseigenschaften und Eignung als Substrat für die PHA-Produktion untersucht wurde. Mit diesem Rohstoff können daher VFA-Konzentrationen erreicht werden, welche für die bisher in eigenen Versuchen verwendeten Substratkonzentrationen in der Selektion (0,5 bis 2 g/(L*d)) ausreichend sind (Steinmetz et al. 2022). Aus diesem Grund wurde dieses Abwasser im nachfolgend beschriebenen Projekt als reales Substrat für die weiteren Versuche ausgewählt.

2.3 Selektion

Bei der Biopolymerherstellung mittels bakterieller Mischkulturen aus Belebtschlamm wird oftmals eine Selektionsphase vor der eigentlichen PHA-Produktion durchgeführt, bei der Bakterien angereichert werden sollen, welche die Fähigkeit zur PHA-Synthese besitzen. Dabei gehen verschiedene Autoren davon aus, dass diese vorgeschaltete Selektionsphase für eine gute PHA-Ausbeute nötig ist (Albuquerque et al. 2010; Huang et al. 2018; Nguyenhuynh et al. 2021; Khatami et al. 2021), wobei jedoch auch andere Erkenntnisse hierzu vorliegen. So wurde in dem Projekt PHARIO (STOWA 2017) auf eine Selektion von Mikroorganismen als Zwischenstufe verzichtet und trotzdem konnte eine ähnliche Polymerkonzentrationen von im Mittel 41 % bezogen auf die Trockenmasse in den Zellen erzielt werden wie auch in anderen Studien, welche sich mit der PHA-Produktion aus Abwasserströmen beschäftigten (Tamang et al. 2019; Ben et al. 2016). Für die Akkumulationstests wurde Belebtschlamm verwendet, welcher lediglich einer kurzen Akklimatisierungsphase von einigen Stunden an das jeweilige Substrat ausgesetzt wurde (STOWA 2017). Warum dies in manchen Fällen funktioniert, in manchen aber eine längere Selektion erforderlich ist, ist bislang unklar. Mögliche Gründe könnten 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 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 noch keine gezielten Untersuchungen anderer Forschungsgruppen, ob die Selektion bei gleichem Substrat, gleichem Impfschlamm und gleichen Betriebsbedingungen zu einer Verbesserung der PHA-Ausbeute führt oder nicht. Die Ergebnisse des eigenen, von der Willy-Hager-Stiftung geförderten, Projektes deuten allerdings darauf hin, dass eine Selektionsphase zu einer Anreicherung an PHA-Produzenten sowie zu einer Steigerung der PHA-Ausbeute führt. Bei verschiedenen Impfschlämmen stellten sich dabei bereits nach Zeitspannen von 7 bis 14 Tagen hohe PHA-Gehalte ein. Jedoch waren diese nicht in jedem Fall über den Betriebszeitraum stabil und es kam teilweise zu Einbrüchen oder Schwankungen des PHA-Gehaltes über die Zeit (Steinmetz et al. 2022). Daher kann zwar aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass nach bereits kurzer Selektionsdauer hohe PHA-Gehalte erreicht werden können, jedoch ist noch nicht abschließend geklärt, ob durch diese auch eine stabile Polymeranreichernde Bakterienkultur selektiert werden kann, welche unter konstanter Produktionskapazität Polymere gleicher Zusammensetzung herstellt, oder ob zum Einstellen eines stabilen Systems eine längere Dauer notwendig ist. Aufgrund dieser Widersprüche und der Ergebnisse

der vorherigen eigenen Forschung bedarf es weiterer systematischer Untersuchungen zur Bedeutung und Dauer der Selektionsphase unter sonst möglichst konstanten und vergleichbaren Randbedingungen.

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 Einstellung einer mittleren Raumbelastung bzw. Substratkonzentration kann so 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 zu einem Zellwachstum als zur PHA-Produktion angeregt werden. Es wird daher in der Literatur zu einem Verhältnis von der feast-Phase zur Zykluslänge von weniger als 0,3-0,4 geraten (Nguyenhuynh et al. 2021). Einen ähnlichen Effekt hat auch ein Stickstoffmangel. Da Stickstoff zum Wachstum benötigt wird, wird bei dessen Vorhandensein das Zellwachstum gegenüber einer PHA-Speicherung bevorzugt. Aus diesem Grund erfolgt die an die Selektion anschließende PHA-Akkumulation zumeist unter Stickstoffmangelbedingungen. Jedoch wird zu einer hohen Produktivität des Systems auch eine hohe Biomassekonzentration benötigt, da bei niedriger Konzentration größere Anlagen bemessen und finanziert werden müssten. Es gilt daher die beste Option der Nährstoffzugabe für ein gleichzeitig hohes Biomassewachstum und eine hohe PHA-Produktion zu finden (Nguyenhuynh et al. 2021). Das Schlammalter spielt bei der Stabilität der Selektionsphase ebenfalls eine Rolle. So konnten Chen et al. (2017) zeigen, dass ein kürzeres Schlammalter von 5 im Vergleich zu 10 Tagen vorteilhaft für das Einstellen einer stabilen Mischkultur mit hohem PHA-Produktionspotential ist. Auch Moretto et al. (2020) konnten 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. Allerdings zeigten die Untersuchungen von Matos et al. (2021b) und Guarda et al. (2024), dass ein Schlammalter von 4 Tagen im Vergleich zu 2 Tagen zu einer Verbesserung der PHA-Produktionsperformance führt. Wie sich unterschiedliche 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 Käseolke innerhalb des gleichen Reaktors zur Veränderung der Mikroorganismenzusammensetzung führte. So dominierte bei einer Zugabe von Zuckerrohrmelasse das Taxon *Actinobacteria*, während unter Zugabe von Käseolke das Taxon *Firmicutes* dominierte. Nach dem Einstellen der Kultur auf den Substratwechsel, erreichte diese jedoch eine ähnliche PHA-Produktivität wie zuvor.

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 (Nguyenhuynh et al. 2021). Bisher befassen sich erst einige wenige Autoren 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. 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 ein Upscaling des Prozesses zu erlangen. Manche Autoren empfehlen zudem, die Selektion, anstatt 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 (Kourmentza et al. 2017; Khatami et al. 2021). Die Art der Substratdosierung wirkt sich hauptsächlich 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 konnte die Forschungsgruppe des Projektes PHARIO beispielsweise diesen Zusammenhang in ihren Untersuchungen nicht feststellen (STOWA 2017). In eigenen Untersuchungen im Rahmen des Projektes „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen - Einflussfaktoren auf Teilprozesse und Entwicklung von Mess-Steuer- und Regelungsstrategien zur Schließung der Verfahrenskette“ gab es jedoch Hinweise darauf, dass die Polymerzusammensetzung nicht allein von der Substratzusammensetzung abhängt (Steinmetz et al. 2022). Janarthanan et al. (2016) untersuchten erstmals den Zusammenhang zwischen der Veränderung der Biozönose während der Akkumulation und der Zusammensetzung des produzierten Polymers 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 Folge unterschiedlicher Stoffwechselprozesse sein kann und somit durch verschiedene Substratverwertungsmechanismen unterschiedlicher Organismen zustande kommen kann (Morgan-Sagastume 2016; Koller et al. 2017). So konnten beispielweise Carvalho et al. (2014) feststellen, dass eine höhere Abundanz der Gattung *Thaurea* 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 künstlichem 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. Zudem fanden die meisten Untersuchungen dieser Art hauptsächlich unter Verwendung künstlicher Substrate statt. Es gibt bisher ebenfalls nur wenige Studien, die sich auf die Auswirkungen unterschiedlicher Reaktorbetriebsweisen, sowie der Bakterienmischkultur, insbesondere in Kombination dieser beiden Faktoren, auf die PHA-Zusammensetzung fokussieren. Dies gilt insbesondere für die Auswirkungen der Selektionsbedingungen auf diese beiden Faktoren. Hier besteht Forschungsbedarf zur Klärung der Zusammenhänge.

Janarthanan et al. (2016) stellten fest, dass eine veränderte VFA-Zusammensetzung in Kombination mit einer Nährstoffverfügbarkeit in der Akkumulation zu einer Veränderung der Biomassenzusammensetzung im Vergleich zur Selektion führte. Wie die Biozönose auf Veränderungen in der Substratzusammensetzung zwischen der Selektion und der Akkumulation reagiert und wie sich dies auf die PHA-Produktion und -Zusammensetzung auswirkt, ist eine weiterhin nicht geklärte Fragestellung.

Bisher fokussiert sich der Großteil der Forschung auf die PHA-Ausbeute. Zur Etablierung von Kunststoffprodukten aus PHA aus Mischkulturen auf dem Markt, ist jedoch ein weiterer wichtiger Fokus die Produktion eines Biopolymers, das konstant in seiner Zusammensetzung ist (Khatami et al. 2021). Weitere Studien zur PHA-akkumulierenden Bakteriengesellschaft sind nötig, um, mithilfe einer Anpassung der ersten Prozessstufe, durch gezielten Einsatz bestimmter VFA in den Prozess, Biopolymere mit gewünschter Zusammensetzung herstellen zu können (Wang et al. 2020). Zudem besteht weiterhin Forschungsbedarf zum Zusammenhang der mikrobiellen Zusammensetzung mit der PHA-Zusammensetzung infolge der vorhandenen Stoffwechselwege sowie zum Einfluss der Nährstoffverfügbarkeit auf die PHA-Produktionsperformance (Nguyenhuynh et al. 2021).

Untersuchungen zu PHA-produzierenden Mischkulturen innerhalb des Akkumulationsprozesses sind im Vergleich zum Selektionsprozess bisher nur selten durchgeführt worden (Cavaillé et al. 2013; Janarthanan et al. 2016; Morgan-Sagastume 2016; Morgan-Sagastume et al. 2019). In diesen Studien wurden Veränderungen innerhalb der Biozönose im Laufe des Akkumulationsprozesses im Vergleich zu der selektierten Biomasse zu Beginn der Akkumulation beobachtet. Als möglicher Grund für diese

Beobachtung werden die unterschiedliche Substratzusammensetzung, Nährstoffverfügbarkeit und die Methode der Substratzugabe zwischen dem Selektions- und dem Akkumulationsprozess, welche sich in allen Studien zwischen den beiden Prozessstufen unterschieden, angenommen (Morgan-Sagastume 2016). Es gab jedoch hierzu nach aktuellem Erkenntnisstand noch keine gezielten Untersuchungen. Da jedoch auch noch nicht abschließend geklärt ist, inwiefern die Zusammensetzung der Biozönose Einfluss auf die PHA-Zusammensetzung und den PHA-Gehalt sowie auf die Robustheit und Stabilität der PHA-Produktionsfähigkeit nimmt, sind weiterhin gezielte Untersuchungen zu den PHA-Eigenschaften in Verbindung mit der Akkumulationsperformance und der Bakteriengesellschaft sowohl in der Selektion als auch in der Akkumulation nötig.

2.5 Zusammenfassung zum gegenwärtigen Kenntnisstand und offene Forschungsfragen

Bei der PHA-Produktion aus Abwasserströmen mithilfe von bakteriellen Mischkulturen wurden bisher kaum Untersuchungen der zugrundeliegenden Biozönose und deren Einflüsse auf den Prozess sowie auf die Biopolymerzusammensetzung vorgenommen. Zudem erfolgten die meisten Studien unter unterschiedlichen Randbedingungen und sind nur sehr schwer vergleichbar. Auch Studien des gleichen Autors liefern teilweise unterschiedliche Ergebnisse (Matos et al. 2021a, 2021b). Es ist weiterhin noch nicht geklärt, ob eine Selektion erforderlich ist, bzw. ob dadurch deutlich höhere Ausbeuten erzielt werden können. Eigene Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine Selektion zu einer erhöhten PHA-Ausbeute führen kann, jedoch bereits eine relative kurze Selektionsdauer hierfür ausreichend sein könnte (Steinmetz et al. 2022). Zudem sind die notwendigen Selektionsbedingungen für eine Mischkultur mit einem hohen Anteil an PHA-Produzenten sowie deren jeweilige Einflüsse auf die Polymerzusammensetzung bisher unklar. Zum besseren Verständnis und zur Optimierung sowie zur Steuerung des Prozesses sind diese Erkenntnisse allerdings von großer Wichtigkeit. Daher soll in diesem Projekt durch eine genauere Betrachtung der PHA-produzierenden Bakteriengesellschaft und deren Einfluss auf die PHA-Zusammensetzung eine Grundlage für ein besseres Prozessverständnis geschaffen werden und aus den gewonnenen Erkenntnissen sollen Empfehlungen für Parameter und Bedingungen für einen stabilen Prozessbetrieb abgeleitet werden.

Randbedingungen auf industriellen Kläranlagen unterliegen in der Regel zudem starken Schwankungen, z.B. durch Veränderungen im industriellen Produktionsprozess. Für die Gewinnung eines Rohstoffes ist allerdings eine möglichst konstante Zusammensetzung und Ausbeute der in den Bakterien angereicherten Polymere bedeutsam. Daher sind ein tiefgehendes Verständnis des

Einflusses der Substratzusammensetzung auf die Polymerzusammensetzung und -menge sowie der langfristigen Betrachtung der Biozönose für einen stabilen Betrieb ebenfalls von großer Bedeutung. Dies führt außerdem zu einer besseren möglichen Beurteilung, welche Polymerzusammensetzung im laufenden Prozess unter schwankenden Rahmenbedingungen zu erwarten ist. Dies ist wesentliche Voraussetzung für den anschließenden Vermarktungsschritt des Biopolymers als Rohstoff für die Herstellung von Kunststoffprodukten.

3 Material und Methoden

Zum Erreichen der genannten Forschungsziele wurden Versuche zur Selektion und Akkumulation an der bereits installierten Anlage aus dem vorangegangenen Projekt durchgeführt. Die Methodik wurde ebenfalls in Anlehnung an das vorige Projekt durchgeführt (Steinmetz et al. 2022).

3.1 Versäuerung

Aufgrund der Erkenntnisse aus dem vorangegangenen Projekt wurde Brauereiabwasser als Rohstoff für die Substratproduktion für die Selektions- und Akkumulationsversuche ausgewählt. Die Versäuerung dieses Reststroms fand unter den im vorigen Projekt verwendeten Betriebsbedingungen statt (Steinmetz et al. 2022).

Um vergleichbare Randbedingungen innerhalb der Selektionsversuche (Arbeitsschritt 1) zu gewährleisten, wurde eine möglichst gleichbleibende Zusammensetzung des verwendeten Substrates benötigt. Daher wurde für jeden Versuchsblock eine große Menge Substrat vorproduziert und gemischt. Innerhalb des Langzeitversuches (Arbeitsschritt 3) wurden insgesamt 5 unterschiedliche Chargen an Brauereiabwasser versäuert und genutzt. Innerhalb des Arbeitsschrittes 2, in dem Versuche zum Einfluss unterschiedlicher Substrate in der Akkumulation durchgeführt werden sollten, wurden neben dem ersten versäuerten Brauereiabwasser-Batch aus dem Langzeitversuch ebenfalls zwei synthetische Substrate (Essigsäure und Propionsäure im Mischverhältnis 30/70 und 70/30 %) und zwei weitere Industrieabwässer verwendet (Tabelle 1). Vor Zugabe der synthetischen Substrate zur Biomasse wurde deren pH-Wert auf einen Wert von 7 mit 1 M Natriumhydroxid (>99 %, PanReac AppliChem) eingestellt. Bei den beiden Industrieabwässern handelte es sich um ein Abwasser aus der Fruchtsaftherstellung, welches, wie im Folgenden beschrieben, analog zu dem Brauereiabwasser versäuert wurde und um ein vorversäuertes Brauereiabwasser, welches aus der Anaerob-Behandlung der Brauereikläranlage stammte und nicht weiter behandelt wurde. Um die Substratdosierung bzw.-Konzentration sowie die benötigte Menge an Nährstoffen, welche innerhalb der Selektion zugegeben werden mussten, ermitteln zu können, wurden Analysen des produzierten Substrates durchgeführt.

3.1.1 Versuchsaufbau

Die Versäuerung fand jeweils in einem IBC-Container mit einem Reaktionsvolumen von 1000 L statt, wobei 100 L anaerober Schlamm von der hauseigenen Kläranlage der Brauerei sowie 900 L Brauereiabwasser hinzugegeben wurden (Abbildung 2). Der Prozess wurde bei einer Temperatur von 35,5 °C durchgeführt, welche durch einen Heizmantel (Sonderanfertigung, PiT GmbH) mit daran

angeschlossenem Temperaturfühler (RT ES11H+, PiT GmbH) eingestellt wurde. Dabei fand eine konstante Durchmischung im Reaktor mithilfe von zwei Aquariumpumpen (Turbelle® Nanostream® 6045, Tunze®) statt.

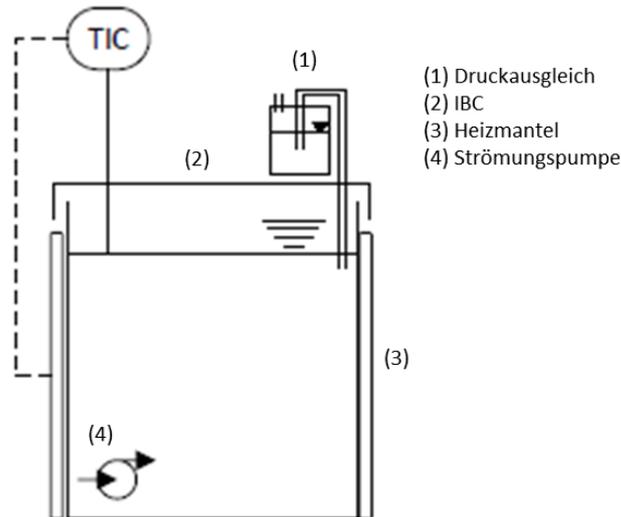


Abbildung 2: Versuchsaufbau zur Versäuerung.

3.1.2 Versuchsbeschreibung

Zu Beginn der Versäuerung wurde der pH-Wert mit 25 %-iger Salzsäure (> 99 %, Carl Roth®) auf einen Wert von 5 eingestellt, um eine Methanbildung zu verhindern. Der pH-Wert wurde weiterhin täglich überprüft und bei Bedarf eingestellt. Nach einer Aufenthaltszeit von 6 Tagen fand eine Fest-Flüssig-Trennung des geernteten Substrates mithilfe einer Korbzentrifuge (ZS21 EUR, 3,5 L 2070 g, Eurotec Innovation) statt. Anschließend wurde dieses in 30 L-Kanister abgefüllt und bei - 18 bzw. 4 °C bis zur weiteren Nutzung gelagert. Es erfolgte zudem eine Charakterisierung des versäuerten Brauereiabwassers, welche in Kapitel 3.4.2 beschrieben wird.

Die Zusammensetzung des Substrates wies in allen Chargen einen Nährstoffmangel auf (s. Kapitel 4.1). Um ein optimales Wachstum während der Selektion zu gewährleisten, wurde daher ein Nährstoffverhältnis von 100:5:1 (Pittmann und Steinmetz 2017) $CSB_{gel}:N:P$ durch Zugabe von Ammoniumchlorid (>99%, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™) und Kaliumdihydrogenphosphat (99%, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™) eingestellt. Zudem wurden 2ml/L Substrat einer Mikronährstofflösung nach bestehend aus 1,5 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,15 g H_3BO_3 , 0,03 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,

0,018 g KI, 0,12 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 10 g EDTA (Smolders et al. 1994) zudosiert.

Die durch die Versäuerungen erzielten Substrateigenschaften sind in Kapitel 4.1 als Vorergebnisse dargestellt. Aus den Substrateigenschaften, die ausgehend von den Eigenschaften des Rohabwassers durch die Versäuerungsprozesse erreicht wurden (s. Kapitel 4.1), ergaben sich z.T. unterschiedliche Substratkonzentrationen in den Versuchen. Eine Übersicht über die in den jeweiligen Versuchen verwendeten Substrate, deren Zusammensetzungen und die Substratkonzentrationen ist im Folgenden aufgeführt.

Arbeitsschritt 1 - Selektionsparameter

Die Selektionsversuche des Arbeitsschrittes 1 umfassten drei Blöcke mit jeweils zwei Parametervariationen. Innerhalb jedes der drei Versuchsblöcke wurde eine Substratcharge verwendet. Eine Übersicht ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Verwendete Substrate, deren Konzentration und Zusammensetzung während der Selektionsversuche.

Versuchsblock	Versuch	Substrat	Raumbelastung		Feed-Konzentration Akkumulation [mgCSB _{gel} /L] [mgCSB _{VFA} /L]	Zusammensetzung C _{gerade} zu C _{ungerade} [%]
			Selektion [mgCSB _{gel} /L]	[mgCSB _{VFA} /L]		
Schlammalter	2 d	Brauereiabwasser Batch 1.1	0,69		100,0	73,3:26,7
	4 d	Brauereiabwasser Batch 1.1	0,46		66,2	73,3:26,7
Zyklusdauer	24 h	Brauereiabwasser Batch 1.2	1,29		100,0	74,7:25,3
	6 h	Brauereiabwasser Batch 1.2	0,98		76,1	74,7:25,3
Raumbelastung	10 g/(L*d)	Brauereiabwasser Batch 1.3	10,0		100,0	71,6:28,4
	6 g/(L*d)	Brauereiabwasser Batch 1.3	6,0		79,2	71,6:28,4

Die Substratdosierung in der Selektion und in der Akkumulation sowie die Nährstoffzugabe in der Selektion wurden in den Versuchen anhand des CSB_{gel} berechnet, da zu dem Zeitpunkt des Versuchsbeginns die Messergebnisse zur VFA-Konzentration noch nicht vorlagen. Die tatsächliche Konzentration an VFA-CSB wurde im Nachhinein berechnet und ist in Tabelle 1 mit aufgeführt. In allen Akkumulationen dieses Arbeitsschrittes wurde eine Substratkonzentration von 100 mgCSB_{gel}/L pro Feed und Biomasse-Startvolumen eingestellt. Auf eine Nährstoffzugabe wurde in den Akkumulationen

verzichtet, da ein Biomassewachstum während der Akkumulation aufgrund einer dadurch verminderten PHA-Produktion vermieden werden sollte.

Arbeitsschritt 3 - Zusammenführender bzw. Langzeitversuch

Der im Anschluss an die Selektionsversuche des Arbeitsschrittes 1 durchgeführte zusammenführende Versuch, welcher als Langzeitselektion fortgeführt wurde (Arbeitsschritt 3), diente zwei Untersuchungszwecken. Zum einen wurden innerhalb der ersten drei Wochen zusätzliche Akkumulationsversuche zur Erforschung des Einflusses unterschiedlicher Substrateigenschaften zwischen Selektion und Akkumulation durchgeführt, zum anderen wurde der Einfluss von Schwankungen im verwendeten Substrat auf die Biomasse in der Selektion über einen längeren Zeitraum und deren Akkumulationsperformance untersucht. Hierfür wurden, wie bereits oben erwähnt, fünf Chargen mit je 1000 L Brauereiabwasser versäuert. Die Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Substratchargen während des Langzeitversuches sind in Tabelle 2 dargestellt. Den Substraten wurden vor Zugabe zu den Selektionsreaktoren ebenfalls, wie oben beschrieben, Nährstoffe zudosiert. In den Akkumulationen wurde auf eine Zugabe von Nährstoffen verzichtet.

Tabelle 2: Verwendete Substrate, deren Konzentration und Zusammensetzung während des Langzeitversuches.

Versuchsblock	Substrat	Raumbelastung	Feed-	Zusammensetzung
		Selektion [gCSB _{gel} /(L*d)] [gCSB _{VFA} /(L*d)]	Konzentration Akkumulation [mgCSB _{gel} /L] [mgCSB _{VFA} /L]	C _{gerade} zu C _{ungerade} [%]
Phase 1 (Tag 0-61)	Brauereiabwasser	1,30	100,0	70,6:29,4
	Batch 2.1	1,21	93,2	
Phase 2 (Tag 61-116)	Brauereiabwasser	0,62	100,0	83,8:16,2
	Batch 2.2	0,45	73,0	
Phase 3 (Tag 116-154)	Brauereiabwasser	1,00	100,0	70,0:30,0
	Batch 2.3	0,86	85,1	
Phase 4 Tag (154-232)	Brauereiabwasser	2,20	100,0	70,0:30,0
	Batch 2.4	1,70	75,3	
Phase 5 Tag (232-266)	Brauereiabwasser	1,40	100,0	64,1:35,9
	Batch 2.5	1,10	77,6	

Für die wöchentlichen bzw. monatlichen Akkumulationen während des zusammenführenden bzw. Langzeitversuches wurde ebenfalls eine Substratkonzentration von 100 mgCSB_{gel}/L Startvolumen pro Feed eingestellt, was einer VFA-Konzentration von 93,2 mgCSB_{VFA}/L (Batch 1) bzw. 73 mgCSB_{VFA}/L (Batch 2), 85,1 mgCSB_{VFA}/L (Batch 3), 75,3 mgCSB_{VFA}/L (Batch 4), 77,6 mgCSB_{VFA}/L bezogen auf 0,5 L Biomasse entsprach (Tabelle 2). Das erste produzierte Substrat (Batch 1) wurde in den ersten beiden Monaten des zusammenführenden/Langzeitversuchs sowie in den Akkumulationsversuchen des

Arbeitsschritt 2 verwendet. Danach wurde das Substrat auf den zweiten Batch umgestellt (ab 18.09.23; vor Probenahmetag 63). Der nächste Substratwechsel auf Batch 3 erfolgte am 02.11.23 (vor Probenahmetag 119). Am 21.12. erfolgte die nächste Umstellung auf Substratbatch 4 (vor Probenahmetag 175) und die letzte erfolgte am 08.03.24 (vor Probenahmetag 266).

Arbeitsschritt 2 – Akkumulationsversuche

In den zu den wöchentlichen bzw. monatliche Akkumulationen des Langzeitversuches durchgeführten, zusätzlichen Akkumulationsversuchen wurde der Einfluss unterschiedlicher Substrateigenschaften zwischen Selektion und Akkumulation auf die Biozönose, die PHA-Produktion sowie dessen Zusammensetzung untersucht. Hierzu wurden zehn verschiedene Versuche mit der selektierten Biomasse aus den ersten drei Wochen der Selektion des Langzeitversuches durchgeführt (Tabelle 4). Neben dem hier genutzten ersten versäuerten Batch an Brauereiabwasser, wurden ein Abwasser aus der Fruchtsaftindustrie, ein vorversäuertes Abwasser aus der Brauerei sowie zwei synthetische Substrate verwendet. Die Konzentration und Zusammensetzung des in den jeweiligen Versuchen genutzten Substrates sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Verwendete Substrate, deren Konzentration und Zusammensetzung während der Akkumulationsversuche.

Versuchsblock	Versuch	Substrat	Feed-Konzentration Akkumulation [mgCSB _{gel} /L] [mgCSB _{VFA} /L]	Zusammensetzung C _{gerade} zu C _{ungerade} [%]	
Substrat-zusammensetzung	Synthetisches Substrat 1	Essig- und Propionsäure	100,0	30,0:70,0	
	Synthetisches Substrat 2	Essig- und Propionsäure	100,0	70,0:30,0	
	Industrieabwasser 1	Fruchtsaftabwasser	100,0 61,9	84,0:16,0	
	Industrieabwasser 2	Vorversäuertes Brauereiabwasser	100,0 71,0	40,0:60,0	
	Substrat-konzentration	Substrat-konzentration 1	Brauereiabwasser Batch 2.1	50,0 46,6	70,6:29,4
		Substrat-konzentration 2	Brauereiabwasser Batch 2.1	200,0 186,4	70,6:29,4
Substrat-konzentration 3		Brauereiabwasser Batch 2.1	300,0 279,5	70,6:29,4	
Nährstoff-verfügbarkeit	Stickstoffzugabe	Brauereiabwasser Batch 2.1	100,0 93,2	70,6:29,4	
	Phosphorzugabe	Brauereiabwasser Batch 2.1	100,0 93,2	70,6:29,4	
	Stickstoff- und Phosphorzugabe	Brauereiabwasser Batch 2.1	100,0 93,2	70,6:29,4	
		Brauereiabwasser Batch 2.1	100,0 93,2	70,6:29,4	

In den Versuchen mit synthetischem Substrat wurde, wie in allen zuvor beschriebenen Versuchen, eine Konzentration von 100 mgCSB_{gel}/L pro Feed eingestellt, welche in beiden Fällen mit der Konzentration an VFA-CSB übereinstimmte. Für die Akkumulationen mit den beiden Industrieabwässern wurde ebenfalls eine Konzentration von 100 mgCSB_{gel}/L eingestellt, was einer VFA-Konzentration von 61,9 mgCSB_{VFA}/L (Fruchtabwasser) und 71,0 mgCSB_{VFA}/L (vorversäuertes Brauereiabwasser) entsprach (Tabelle 3). In den darauffolgenden Akkumulationsversuchen wurden unterschiedliche Feedkonzentrationen von 50, 200 und 300 mgCSB_{gel}/L verglichen. Hierfür wurden angepasste Feedvolumina des versäuerten Brauereiabwasser verwendet, welches ebenfalls in dem Langzeitversuch mit den dazugehörigen Akkumulationen genutzt wurde (Tabelle 2). Die resultierenden VFA-Konzentrationen für diese drei Akkumulationsversuche mit einem jeweiligen Startvolumen von 0,5 L Biomasse waren 46,6 mgCSB_{VFA}/L, 186,4 mgCSB_{VFA}/L und 279,5 mgCSB_{VFA}/L. In den letzten drei Akkumulationsversuchen zu Arbeitsschritt 2, in welchem unterschiedliche Nährstoffzugaben im PHA-Produktionsschritt untersucht werden sollten, wurde ebenfalls dieses Brauereiabwasser als Substrat verwendet. Die Substratkonzentration lag dabei in allen drei Versuchen bei 100 mgCSB_{gel}/L und entsprach damit der Konzentration der Akkumulationen innerhalb des Langzeitversuchs. Jedoch erfolgte hierbei eine Nährstoffzugabe von Ammoniumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat oder beiden Stoffen analog zur Selektion, sodass das erste Substrat ein Verhältnis von C:N von 100:5, das zweite Substrat ein Verhältnis von C:P von 100:1 und das letzte Substrat ein C:N:P-Verhältnis von 100:5:1 enthielt. Alle zuvor beschriebenen zusätzlichen Akkumulationsversuche wurden in den Tagen 5 bis 22 der Selektion des Langzeitversuches durchgeführt, wobei die wöchentlichen Akkumulationen zum Langzeitversuch weiterhin stattfanden und als Kontrolle zu den Zusatzakkumulationen herangezogen werden konnten.

3.2 Selektion

In Arbeitsschritt 1 sollten Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung der Biozönose und deren Adaption über die Zeit während der Selektionsphase analysiert werden. Hierzu wurden unter möglichst vergleichbaren Randbedingungen unterschiedliche Selektionsstrategien angewandt, die auf eine stabile Biozönose abzielen sollen, welche dann auch unter schwankenden Randbedingungen zu einer stabilen Biopolymerproduktion (Arbeitsschritt 3) fähig ist. Dabei sollte gezielt untersucht werden, wie sich die unterschiedlichen Selektionsbedingungen auf die Zusammensetzung des produzierten Polymers auswirken (Arbeitsschritt 2).

Der erste Versuchsblock zur Selektion sollte einer Untersuchung des Einflusses zweier unterschiedlicher Schlammalter auf die Entwicklung der mikrobiellen Gesellschaft und der damit zusammenhängenden PHA-Produktionsfähigkeit sowie dessen Zusammensetzung dienen. Im zweiten Versuchsblock zur Selektion wurde der Einfluss zweier weiterer Zyklusdauern und im dritten der Einfluss unterschiedlicher Raumbelastungen auf die genannten Parameter untersucht. Mit den aus diesen Versuchen gewonnenen Erkenntnissen wurde in einem zusammenführenden Versuch eine Selektion mit der besten Parameterkombination durchgeführt werden, um eine Biomasse mit hohem PHA-Speicherungspotenzial für die Akkumulationsversuche in Arbeitsschritt 2 zu erhalten. Dieser zusammenführende Selektionsversuch wurde mit dem Versuch zur Langzeitselektion zusammengelegt, indem die Selektionsphase der Biomasse aus dem zusammenführenden Versuch weitergeführt wurde.

3.2.1 Versuchsaufbau

Die Selektion fand in drei Reaktoren mit einem jeweiligen Reaktionsvolumen von 10 L (R2,3 und 4) statt (Abbildung 3). In allen Reaktoren erfolgte eine Sauerstoffversorgung über die Druckluftleitung des Labors und Edelstahl-Belüftersteine, welches in einem Druck von 0,1 bar und einem Sauerstoffgehalt von ca. 8 mg/L innerhalb der Reaktoren resultierte. Zudem sorgten Überkopfrührer (RZR 1, Heidolph) für eine konstante Durchmischung und Heizstäbe für eine Temperaturregelung (Nano ThermoCompact 25 W, Dennerle) auf ca. 21-23 °C in den Reaktoren. Der pH-Wert wurde, neben dem Sauerstoffgehalt, konstant gemessen (SL 82-120 pHT und MF39VP, Xylem), aber nicht kontrolliert. Die Dosierung und der Biomasseabzug erfolgten über Peristaltikpumpen (OEM-Peristaltik-Pumpen M500, Verder), welche über Drucksonden (AquaBar (II) Drucksonden, Nivus) in Verbindung mit einem Labview-basierten Programm gesteuert wurden.

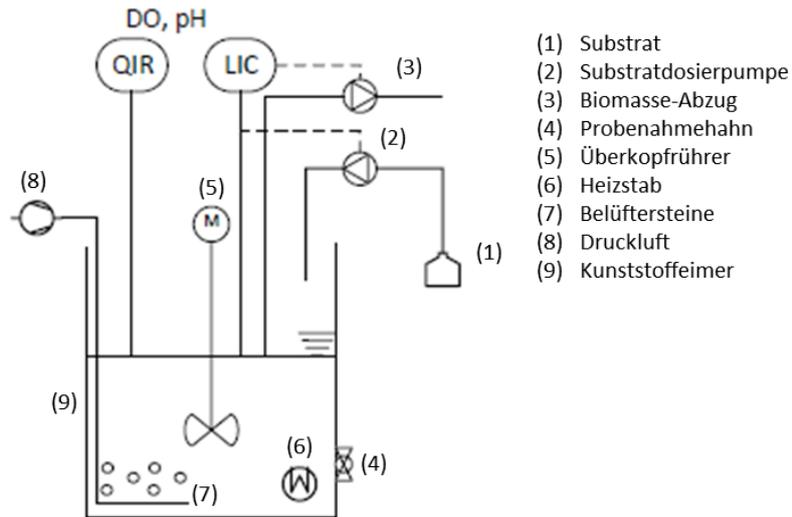


Abbildung 3: Versuchsaufbau zur Selektion.

3.2.2 Versuchsbeschreibung

Arbeitsschritt 1 – Selektionsparameter

Schlammalter

Im ersten Teil dieses Versuchsblocks wurden ein Schlammalter von 2 d sowie eine Zyklusdauer von 12 h eingestellt. Hierzu wurden alle 12 Stunden 5 L des Reaktorvolumens abgezogen, wobei abwechselnd nur das Restsubstrat oder das durchmischte Reaktorvolumen abgepumpt wurde. Vor dem Abzug wurde nach jedem zweiten Zyklus hierzu eine Sedimentationsphase von 45 min eingestellt, wobei Belüftung und Durchmischung über diese Zeit ausgeschaltet wurden. Nach jedem Abzug erfolgte die Zugabe von 5 L L frischem Substrat. Der Verlauf dieser beiden Zyklen ist in Abbildung 4 dargestellt.

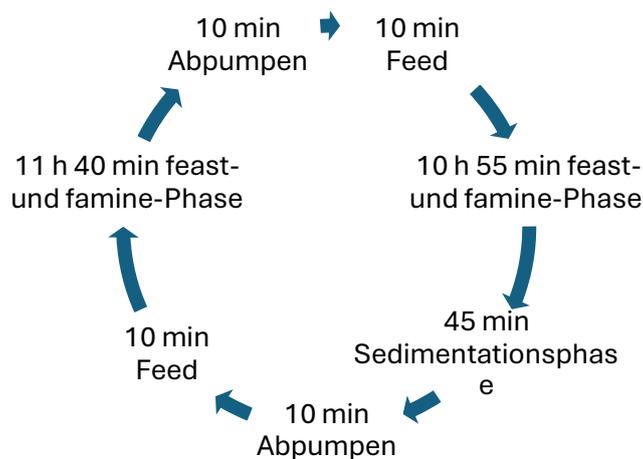


Abbildung 4: Verlauf zweier Zyklen während der Selektionsversuche (Steinmetz et al. 2022).

Im zweiten Teil des Versuchsblocks wurden ein Schlammalter von 4 d und eine Zyklusdauer von 12 h eingestellt. Hierzu wurden alle 12 Stunden 2,5 L des Reaktorvolumens abgezogen, wobei ebenfalls bei jedem zweiten Zyklus eine Sedimentationsphase eingestellt wurde (Abbildung 4). Der Versuch wurde jeweils über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt. Um zudem die Raumbelastung bei den beiden Versuchen mit einer Schlammalter von 2 und 4 Tagen gleich zu halten, wurden bei jeder Substratzugabe im ersten Versuchsteil neben 2,5 L Substrat zusätzlich 2,5 L Verdünnungswasser zudosiert.

Zyklusdauer

Für den zweiten Versuchsblock wurden ein Schlammalter von 4 Tagen sowie Zyklusdauern von 6 und 24 h ausgewählt. Der Zyklus wurde wie oben beschrieben durchgeführt, wobei die Dauer des Feeds und Abpumpens gleichblieb. Lediglich die Dauer zwischen den Feeds wurde angepasst. In beiden Selektionsversuchen fand ebenfalls nach jedem zweiten Zyklus eine Sedimentationsphase von 45 min statt. Es wurde zunächst für eine Versuchsdauer von 28 Tagen eine Selektion mit einer Zyklusdauer von 6 h durchgeführt, wozu alle 6 Stunden 1,25 L Reaktorvolumen abgezogen und durch frisches Substrat ersetzt wurden. Danach wurde 28 Tage lang eine Selektion mit einer Zyklusdauer von 24 h durchgeführt, in der alle 24 h 5 L Reaktorvolumen abgezogen und durch frisches Substrat ersetzt wurden.

Raumbelastung

Aufbauend auf den Ergebnissen des ersten und zweiten Versuchsblocks, wurde für den dritten Versuchsblock ein Schlammalter von 4 Tagen sowie eine Zyklusdauer von 6 h ausgewählt. Zudem wurde die Versuchsdauer auf jeweils 14 Tage verkürzt, da die Ergebnisse der vorherigen Versuche sowie ebenfalls Versuche aus dem vorangegangenen Projekt (Steinmetz et al. 2022) auf einen maximalen Gehalt an PHA bzw. das Einstellen einer Sättigung nach 14 Tagen hindeuteten. Im Gegensatz zu den ersten beiden Selektionsversuchsblöcken, in denen eine Raumbelastung von 0,7-1,3 g/(L*d) genutzt wurde (s. Tabelle 1), wurden in diesem Versuchsblock zwei Raumbelastungen von 6 und 10 g/(L*d) verwendet. Alle weiteren Prozesseinstellungen waren wie im zweiten Versuchsblock mit den gleichen Parametern.

Arbeitsschritt 2 und 3 – Akkumulationen und Langzeitversuch

Zusammenführender/ Langzeitversuch

Für die Akkumulationsversuche aus Arbeitsschritt 2 (s. Kapitel 3.3) wurde selektierte Biomasse benötigt. Hierzu wurde, wie bereits erwähnt, eine Selektion mit der besten Parameterkombination aus

den oben beschriebenen Versuchen durchgeführt. Dieser Versuch wurde allerdings aufgrund des Zeitverlustes zu Beginn des Projektes und der nicht vorhandenen Notwendigkeit einen Neustart eines Versuches mit dieser Parameterkombination durchzuführen in den Langzeitversuch aus Arbeitsschritt 3 überführt. Nach einer Woche der Selektion und innerhalb von 2 Wochen wurden die Akkumulationsversuche des Arbeitsschrittes 2 durchgeführt, da die Ergebnisse bisheriger Versuche auf diesen als geeignetsten Zeitraum zur PHA-Produktion hindeuteten. Wöchentliche Akkumulationen sowie Probenahmen fanden über 3 Monate statt, danach (ab November 2023) monatlich (s. Kapitel 3.3). Der beschriebene Selektionsversuch wurde über einen Zeitraum von insgesamt fast 9 Monaten durchgeführt. Da sich als beste Parameterkombination ein Schlammalter von 4 Tagen, eine Zyklusdauer von 6 h und eine unveränderte Raumbelastung des Brauereiabwassers (ca. $0,7-1,3 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$), s. Kapitel 3.1.2; (Steinmetz et al. 2022)) ergaben, wurden diese Einstellungen für den zusammenführenden Versuch gewählt. Um allerdings betriebsbedingte Schwankungen innerhalb eines Langzeitversuches abbilden zu können, wurden Schwankungen im Substrat aufgrund von Variationen im Produktionsprozess zugelassen.

3.3 Akkumulation

3.3.1 Versuchsaufbau

Die Akkumulation fand in drei Reaktoren mit einem Volumen von 5 L (R1,5 und 6) statt (Abbildung 5). Alle weiteren Betriebsinstallationen waren exakt wie in den Reaktoren zur Selektion (s. Kapitel 3.2.1) mit der Ausnahme, dass kein separater Biomasseabzug vorhanden war, da die Akkumulationen im Batch-Modus durchgeführt wurden.

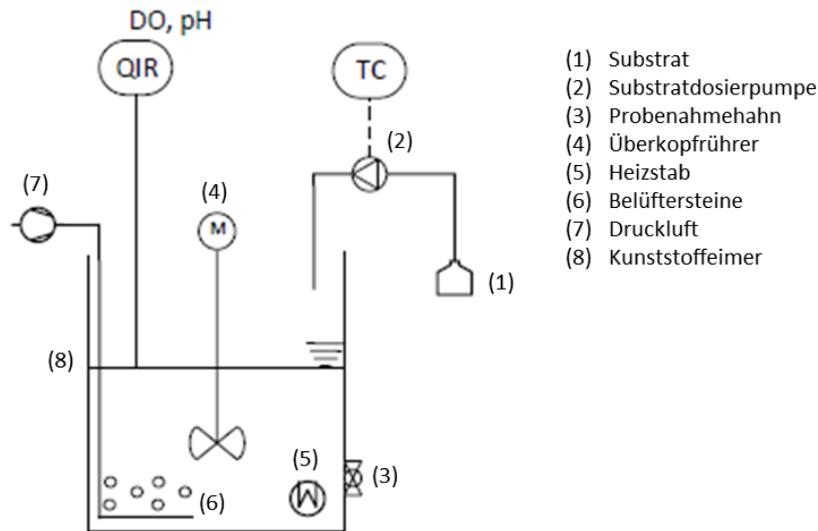


Abbildung 5: Versuchsaufbau zur PHA-Produktion.

3.3.2 Versuchsbeschreibung

Mit der gemischten, abgezogenen Biomasse aus den zuvor beschriebenen Selektionsversuchen wurden jeweils wöchentliche (Arbeitsschritt 1 und 3) bzw. monatliche (Arbeitsschritt 3) Akkumulationsversuche durchgeführt. Zusätzlich wurden im Rahmen des Arbeitsschrittes 2 in den ersten drei Wochen des zusammenführenden bzw. Langzeitversuches 10 Akkumulationen mit unterschiedlichen Substrateigenschaften vorgenommen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht über die Akkumulationsversuche des Arbeitsschrittes 2.

Versuchsblock	Versuch	Versuchstag	Spezifikation
Substratzusammensetzung	Synthetisches Substrat 1	5	Ac/Pro 30/70
	Synthetisches Substrat 2	8	Ac/Pro 30/70
	Industrieabwasser 1	9	Fruchtsaftabwasser
	Industrieabwasser 2	12	Vorversäuertes Brauereiabwasser
Substratkonzentration	Substratkonzentration 1	13	50 mgCSB _{gel} /Feed
	Substratkonzentration 2	15	200 mgCSB _{gel} /Feed
	Substratkonzentration 3	16	300 mgCSB _{gel} /Feed
Nährstoffverfügbarkeit	Stickstoffzugabe	19	C:N 100:5
	Phosphorzugabe	20	C:P 100:1
	Stickstoff- und	21	C:N:P 100:5:1
	Phosphorzugabe		

Ac: Essigsäure, Pro: Propionsäure

Die Akkumulationsversuche wurden jeweils im Batch-Betrieb durchgeführt, wobei über eine Dauer von 24 Stunden eine Substratzugabe alle 30 min erfolgte. Die Zusammensetzungen und Konzentrationen der verwendeten Substrate sind in Tabelle 3 dargestellt. Hierfür wurde zudem jeweils 1 bzw. 0,5 L der

abgezogenen Biomasse als Startvolumen für die Akkumulationsversuche genutzt, das restliche Volumen wurde für die nachfolgend beschriebenen Analysen verwendet.

3.4 Analytik

Die Bestimmung verschiedener Parameter der aus den Versuchen entnommenen Proben ist im Folgenden erläutert.

3.4.1 Trockensubstanz und Glühverlust

Die Bestimmung der organischen Trockensubstanz und von deren Glühverlust erfolgte bei jeder Probenahme zu Beginn und Ende der Akkumulation, um einen Überblick über den Verlauf des Biomassegehaltes in den Reaktoren und eine Bezugsgröße zur PHA-Produktion zu erhalten. Die Bestimmung wurde nach DIN 38 409- H 2-2 mit Schwarzbandfiltern (589/1, D = 100 mm, Whatman) durchgeführt.

3.4.2 VFA und Nährstoffe

Zur Charakterisierung des produzierten Substrates sowie zu Beginn jeder Akkumulation, um einen möglichen Eintrag von Substrat und Nährstoffen aus der Selektion zum Ende der famine-Phase in die Akkumulation überprüfen zu können, wurden Proben zur Bestimmung der VFA-Konzentration sowie des Stickstoff- und Phosphorgehaltes genommen. Am Ende der Akkumulationen wurde zudem ebenfalls die VFA-Konzentration im Reaktor gemessen, um einen Verbrauch des zugegebenen Substrates ermitteln zu können. Die Analyse der Nährstoffe erfolgte mittels photometrischen Küvetten-Schnelltests (LCK 514 für alle CSB-Parameter, LCK 303 oder 304 für $\text{NH}_4\text{-N}$, LCK350 für $\text{PO}_4\text{-P}$, Hach Lange GmbH). Eine Bestimmung der VFA-Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Säuren wurde mittels Ionenchromatographie (930 Compact IC Flex mit Kationenaustauschsäule Metrosep Organic Acids - 250/7.8, Metrohm) durchgeführt. Vor der Analyse wurde die Proben zur CSB-, VFA- und Nährstoffbestimmung für 10 min bei 4500 g zentrifugiert (SORWALL LYNX 600 380/400 V, Thermo Fisher Scientific™) und anschließend zweifach filtriert (Faltenfilter 595½, D = 185 mm; Whatman und Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm, Minisart, regenerierte Zellulose, D = 25 mm, Sartorius). Weiterhin wurden die Proben zur VFA-Bestimmung mit Schwefelsäure auf einen pH-Wert von kleiner 2 angesäuert (95-97 %, EMSURE®, Merck KGaA) und bis zur Messung bei -20 °C eingefroren.

3.4.3 PHA

Eine Entnahme von Proben zur PHA-Analyse erfolgte zu Beginn der Akkumulation, um einerseits zu überprüfen, ob zum Ende der famine-Phase in der Selektion noch PHA vorhanden ist, und andererseits

um eventuell vorhandenes PHA quantifizieren und von dem produzierten PHA aus der Selektion subtrahieren zu können. Zum Ende der Akkumulation wurden ebenfalls Proben zur PHA-Analyse genommen. Zur Bestimmung der PHA-Gehalte und -Zusammensetzung wurden die Proben unmittelbar nach der Entnahme aus dem Reaktor mit Schwefelsäure (95-97 %, EMSURE®, Merck KGaA) auf einen pH-Wert kleiner 2 angesäuert, mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet (VaCo 5, ZIRBUS technology GmbH). Daraufhin wurden jeweils ca. 5 mg der gefriergetrockneten Proben eingewogen und mit 1 ml einer Methanol-Lösung (LiChrosolv®, Merck KGaA) mit 5% Schwefelsäure, 0,8 ml Chloroform (>99 %, Thermo Fisher Scientific™) und 0,2 ml eines Benzoesäurestandards (99,5 %, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™) in Chloroform (5 mg/ml) versetzt. Die Analytik erfolgte jeweils in einem Doppelansatz. Anschließend wurden die Proben in einem Heiz-Thermoschüttler (MHR 23, 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; 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™) zentrifugiert. Daraufhin erfolgte eine Extraktion der unteren Lösemittelphase mittels 1 ml-Spritze mit anschließender Filtration über einen Spritzenvorsatzfilter (CHROMAFIL® Xtra PTFE-45/13, 0,45 µm, D = 13 mm, Chromafil). Diese wurde abschließend über einen Gaschromatographen gemessen. Hierfür wurde ein GC-FID-Gerät der Ausführung Agilent 8860 (Agilent Technologies™) 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 acid-co-3-hydroxyvaleric acid), 8 % PHV-Gehalt, Sigma-Aldrich Co.) und internem Benzoesäurestandard (s.o.).

3.4.4 Biologische Analysen

Zur Charakterisierung der mikrobiellen Gesellschaft wurden zum Ende der famine-Phase (Beginn Akkumulation) und in den Versuchen der Arbeitsschritte 2 und 3 zusätzlich zum Ende der Akkumulation Biomasseproben zur DNA-Analyse genommen. Nach erfolgter Probenahme aus den Selektions- (und Akkumulations-) Reaktoren wurden die unbehandelten Proben bis zur weiteren Bearbeitung unmittelbar bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen der Proben wurden diese zunächst für 10 min bei 4500 g zentrifugiert (SORWALL LYNX 600 380/400 V, Thermo Fisher Scientific™) und der Überstand wurde verworfen. Daraufhin wurde eine Extraktion der DNA mittels DNeasy PowerSoil Pro Kit

(QIAGEN) durchgeführt, wobei das Protokoll des Herstellers mit Ausnahme der einzusetzenden Probemenge (1 ml anstatt 0,25 g) befolgt wurde. Die Qualität und Konzentration der extrahierten DNA wurde anschließend mittels Nanodrop (Nanodrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific™) gemessen. Im Anschluss wurden die Extrakte zu einer externen Firma (StarSEQ® GmbH, Mainz) zur PCR-Amplifizierung und Illumina-Sequenzierung (Illumina Miseq, Illumina Inc.) der V3-V4-Region der bakteriellen 16S rDNA versendet (Primer 341F-805R (Herlemann et al. 2011)). Die Rohsequenzen wurden nach erfolgreicher Qualitätskontrolle über den DADA2-Workflow (Callahan et al. 2016) bioinformatisch ausgewertet und taxonomisch zugeordnet, wobei ein Abgleich mit der Greengenes-Datenbank stattfand (DeSantis et al. 2006). Biostatistische Auswertungen erfolgten mit RStudio (Version 4.3.3, RStudio Team). Nur die 40 abundantesten Taxa wurden in Taxonomie-Diagrammen dargestellt. ASVs, welches nicht bis auf Gattungsebene bestimmt werden konnten, wurden auf der nächsthöheren möglichen Taxonomieebene zugeordnet. Der Anteil potenzieller PHA-Produzenten wurde ermittelt, indem die relative Abundanz der auf die letzte mögliche Taxonomieebene bestimmten Taxa, welche Organismen mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion beinhalten, zusammengerechnet wurde. Zu den letzten drei Probenahmen in den letzten Monaten des Langzeitversuches konnten keine Daten zu der mikrobiellen Zusammensetzung erhoben werden, da aufgrund der Dauer der externen Amplifizierung und Sequenzierung mit einer vorherigen Probenvorbereitung und anschließend nötigen bioinformatischen und biostatistischen Auswertung die Zeit bis zum Ende des Projektes nicht ausreichend war.

4 Ergebnisse

4.1 Vorbereitende Versuche - Substratzusammensetzung

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben wurde, erfolgte die Substratherstellung für alle weiteren Versuche durch Versäuerung von Brauereiabwasser. Im Folgenden sind die Eigenschaften der produzierten Substratbatches dargestellt.

4.1.1 Selektionsversuche

Für die Selektionsversuche aus Arbeitsschritt 1, welche in drei Blöcke unterteilt wurden (Schlammalter, Zyklusdauer und Raumbelastung), wurde jeweils eine große Menge Substrat produziert und gemischt, damit die Vergleichbarkeit innerhalb jedes Versuchsblockes gegeben war. Die Analyseergebnisse der drei produzierten Substratbatches sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 5: Charakteristika der Substrate für die Selektion und Akkumulation der Versuchsböcke des Arbeitsschrittes 1.

Parameter	Batch 1.1	Batch 1.2	Batch 1.3
CSB _{hom} [mg/L]	1550 ± 2	3316 ± 120	2354 ± 10
CSB _{gel} [mg/L]	1388 ± 8	2587 ± 19	1654 ± 8
CSB _{VFA} [mg/L]	919,2 ± 17,0	1968,1 ± 0,6	1309,9 ± 7,9
NH ₄ -N [mg/L]	25,5 ± 0,4	21,9 ± 0,5	35,1 ± 1,5
PO ₄ -P [mg/L]	7,3 ± 0,0	12,7 ± 0,0	11,4 ± 0,1
CSB _{gel} : NH ₄ -N : PO ₄ -P	100 : 1,8 : 0,5	100 : 0,8 : 0,5	100 : 2,1 : 0,7
CSB _{VFA} : NH ₄ -N : PO ₄ -P	100 : 2,8 : 0,8	100 : 1,1 : 0,7	100 : 2,7 : 0,9
VFA-Ausbeute [CSB _{VFA} , Ende/CSB _{hom} , Beginn]	0,40	0,30	0,43
CSB _{VFA} /CSB _{hom}	0,59	0,59	0,56
CSB _{VFA} /CSB _{gel}	0,66	0,76	0,79
CSB _{gel} /CSB _{hom}	0,90	0,78	0,70

Aus Tabelle 5 ist zu entnehmen, dass es zwar eine große Variation der CSB-Parameter zwischen den drei Substraten am Ende der Versäuerung gab, der Anteil des VFA-CSB am CSB_{hom} jedoch vergleichbar war. Die VFA-Konzentration zwischen den drei Batches war mit Werten von 919,2 mg/L, 1968,1 mg/L sowie 1309,9 mg/L insgesamt aber ebenfalls sehr unterschiedlich. Damit liegt diese in einem eher niedrigen Bereich, mit dem eine Raumbelastung von 2 g/(L*d) in der Selektion, wie teilweise in den bisherigen Versuchen genutzt (Steinmetz et al. 2022), nicht erreicht werden konnte. In den vorangegangenen Untersuchungen konnte jedoch unter Verwendung von synthetischem Substrat gezeigt werden, dass eine Raumbelastung von 0,5 und 1 g/(L*d) ebenfalls für eine Selektion einer PHA-produzierenden Biomasse ausreichend sein kann (Steinmetz et al. 2022).

Anhand der Konzentration des Substrates ergab sich für den ersten Selektionsversuch eine Raumbelastung von 0,69 gCSB_{gel}/(L*d) (0,46 gCSB_{VFA}/(L*d)) und für den zweiten Versuch eine etwa

doppelt so hohe Raumbelastung von $1,29 \text{ gCSB}_{\text{gel}}/(\text{L} \cdot \text{d})$, was einer VFA-Belastung von $0,98 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ entsprach (vgl. Tabelle 1). Da die Raumbelastung im dritten Selektionsversuch gezielt untersucht werden sollte, wurde das Substrat hierzu durch Zugabe von VFA in gleicher Zusammensetzung wie das versäuerte Brauereiabwasser auf eine CSB_{VFA} -Konzentration von 20.691 mg/L bzw. 11.708 mg/L eingestellt, was in einer Raumbelastung von etwa $10 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ sowie $6 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ resultierte (Tabelle 1, Kapitel 3.1.2).

Aus Abbildung 6 ist ersichtlich, dass in allen drei Versäuerungs-Batches eine vergleichbare VFA-Zusammensetzung erzielt werden konnte, wobei Essig- und Buttersäure den Hauptanteil an der Zusammensetzung ausmachten. Die Anteile an C_{gerade} und C_{ungerade} im produzierten Substrat lagen bei 73,3 und 26,7 % im ersten, 74,7 und 25,3 % im zweiten und 71,6 und 28,4 % im dritten Batch (Tabelle 1), wodurch in allen Versuchen mit einem erhöhten Anteil an PHB im Vergleich zu PHV im in der Akkumulation erzeugten Copolymer zu rechnen ist.

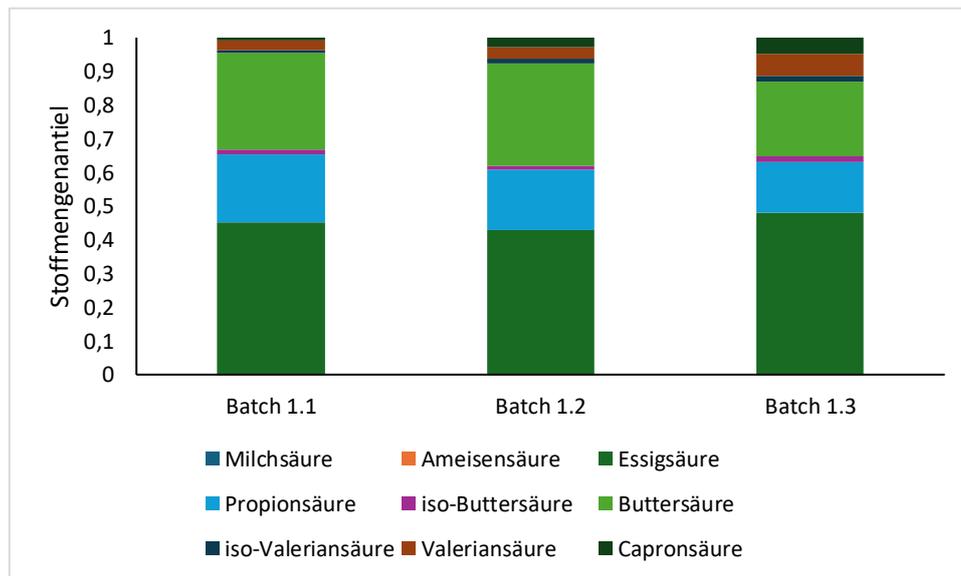


Abbildung 6: Zusammensetzung der Substrate für die Selektion und Akkumulation der Versuchsböcke des Arbeitsschrittes 1.

4.1.2 Langzeitversuch

Für den zusammenführenden bzw. Langzeitversuch (Arbeitsschritt 3) sowie die Akkumulationsversuche aus Arbeitsschritt 2 wurden ebenfalls jeweils 1000 L Substrat vorproduziert, welche für eine Dauer von ca. 2 Monaten als Substratvorlage ausreichend waren. Daher wurden mehrere Substrat-Batches produziert, deren Charakteristika in Tabelle 3 dargestellt sind.

Tabelle 6: Charakteristika der Substrate für den Langzeitversuch und Akkumulationsversuche aus Arbeitsschritt 3 und 2.

Parameter	Batch 2.1	Batch 2.2	Batch 2.3	Batch 2.4	Batch 2.5
CSB_{hom, Beginn} [mg/L]	5590 ± 190	3815 ± 435	7775 ± 5	10170 ± 470	5825 ± 155
CSB_{hom} [mg/L]	3394 ± 22	1902 ± 34	2714 ± 14	5704 ± 132	3650 ± 6
CSB_{gel} [mg/L]	2598 ± 4	1240 ± 24	2018 ± 10	4436 ± 60	2794 ± 6
CSB_{VFA} [mg/L]	2420,7 ± 22,9	904,7 ± 0,9	1716,7 ± 5,5	3341,7 ± 18,9	2168,3 ± 11,3
NH₄-N [mg/L]	80,2 ± 1,4	17,9 ± 0,1	27,9 ± 0,47	70,54 ± 2,28	49,79 ± 0,93
PO₄-P [mg/L]	15,9	5,8 ± 0,09	12,06 ± 0,03	19,65 ± 0,07	11,53 ± 0,09
CSB_{gel}:NH₄-N:PO₄-P	100:3,1:0,6	100:1,4:0,5	100:1,4:0,6	100:1,6:0,4	100:1,8:0,4
CSB_{VFA}:NH₄-N:PO₄-P	100:3,3:0,7	100:2,0:0,6	100:1,6:0,7	100:2,1:0,6	100:2,3:0,5
VFA-Ausbeute	0,43	0,23	0,22	0,33	0,37
[CSB_{VFA, Ende}/CSB_{hom, Beginn}]					
CSB_{VFA}/CSB_{hom}	0,71	0,48	0,63	0,59	0,59
CSB_{VFA}/CSB_{gel}	0,93	0,73	0,85	0,75	0,78
CSB_{gel}/CSB_{hom}	0,77	0,65	0,74	0,78	0,77

Bei den Versäuerungen zur Substratproduktion für den Langzeitversuch war zumeist ein erhöhter Wert der CSB-Parameter im Vergleich zu den Parametern der Versäuerungen für die Selektionsversuche zu beobachten (Tabelle 6, vgl. Tabelle 5), aber es gab ebenfalls eine hohe Spanne der CSB-Parameter zwischen den fünf Substratchargen (Tabelle 6). So lag die CSB_{hom}-Konzentration zu Beginn der Versäuerung der zweiten Charge mit 3815 ± 435 mg/L bereits sehr viel niedriger als bei dem Brauereiabwasser, welches für den ersten Batch verwendet wurde (5590 ± 190 mg/L), dabei war die VFA-Ausbeute ebenfalls nur etwa halb so hoch (Tabelle 6). Daraus ergab sich eine deutlich niedrigere CSB_{VFA}-Konzentration im zweiten Substrat von 904,7 ± 0,9 mg/L in Verbindung mit einer geringeren Raumbelastung von 0,62 gCSB_{gel}/(L*d) (0,45 gCSB_{VFA}/(L*d)) in der Selektion im Vergleich zum ersten Substrat mit einer CSB_{VFA}-Konzentration von 2420,7 ± 22,9 mg/L und einer Raumbelastung von 1,30 gCSB_{gel}/(L*d) (1,21 gCSB_{VFA}/(L*d)) (Tabelle 6, vgl. Tabelle 2). Das dritte Substrat besaß aufgrund einer sehr viel höheren Konzentration zu Beginn der Versäuerung (7775 ± 5 mg/L) wieder eine höhere VFA-Konzentration mit 1716,7 ± 5,5 mg/L bei ungefähr gleicher VFA-Ausbeute (Tabelle 6). Daraus ergab sich eine Raumbelastung von 1 gCSB_{gel}/(L*d) (0,86 gCSB_{VFA}/(L*d)). Die höchste Raumbelastung in der Selektion konnte mit 2,2 gCSB_{gel}/(L*d) (1,7 gCSB_{VFA}/(L*d)) mit dem vierten Substrat erreicht werden (Tabelle 2). Die höchste VFA-Ausbeute in der Versäuerung konnte mit einem Wert von 37 % mit dem letzten produzierten Substrat erzielt werden. Hieraus ergab sich eine Raumbelastung von 1,4 gCSB_{gel}/(L*d) (1,1 gCSB_{VFA}/(L*d)) (Tabelle 6, Tabelle 2). Auch hier lag in allen Substraten ein Nährstoffmangel vor, weshalb Nährstoffe in der Selektion zudosiert wurden (vgl. Kapitel 3.1.2).

Im ersten und letzten Batch der Versäuerung für den Langzeitversuch konnte eine vergleichbare VFA-Zusammensetzung wie in den drei vorangegangenen Versäuerungen zu Arbeitsschritt 1 (Abbildung 7,

vgl. Abbildung 6) erzielt werden. Hier machten ebenfalls Essigsäure und Buttersäure, gefolgt von Propionsäure, die hauptsächlichen Anteile an der Zusammensetzung aus und die Anteile an C_{gerade} und $C_{ungerade}$ im produzierten Substrat lagen bei 70,6 und 29,4 % im ersten und 64,1 und 35,9 % im letzten Substrat. Beim zweiten Versäuerungsbatch wurde überwiegend Essigsäure produziert, was sich wiederum in C_{gerade} - und $C_{ungerade}$ -Anteilen von 83,8 und 16,2 % widerspiegelte. Auch in dem dritten und vierten Versäuerungsbatch wurde größtenteils Essigsäure, jedoch ein wenig mehr Propionsäure, produziert. Die C_{gerade} - und $C_{ungerade}$ -Anteile lagen hier bei beiden Substraten bei 70,0 und 30,0 % (Abbildung 7, Tabelle 2).

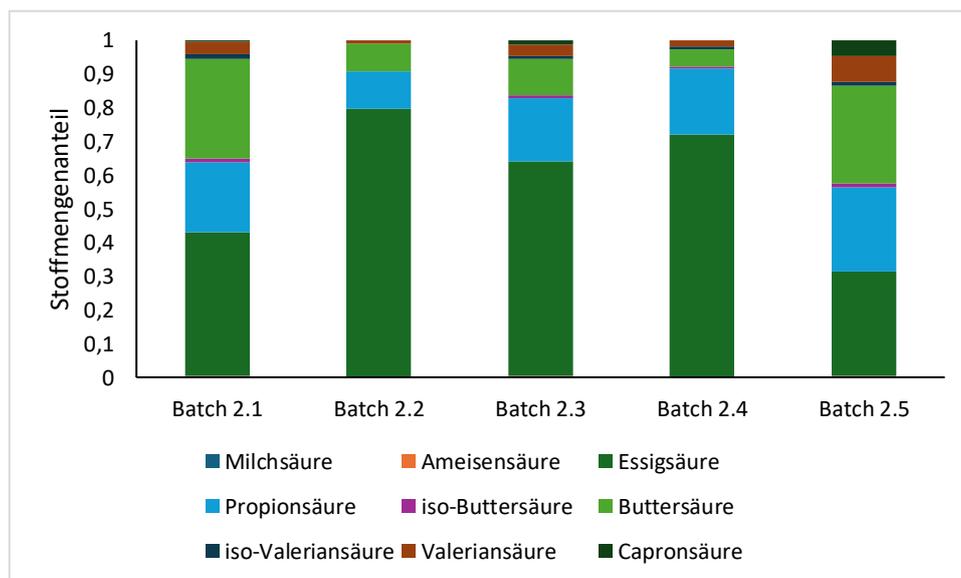


Abbildung 7: Zusammensetzung der Substrate für den Langzeitversuch aus dem Arbeitsschritt 3.

4.1.3 Akkumulationsversuche

In den Akkumulationsversuchen des Arbeitsschrittes 2 wurden verschiedene Substratzusammensetzungen und -konzentrationen untersucht (Tabelle 4, Kapitel 3.3.2). Zunächst wurden zwei synthetische Substrate verwendet, welche eine Stoffmengenzusammensetzung von 30 % Essigsäure und 70 % Propionsäure sowie 70 % Essigsäure und 30 % Propionsäure besaßen. Im Anschluss daran wurden zwei Industrieabwässer als Substrat in der Akkumulation untersucht, zunächst ein Reststrom aus der Fruchtsaftherstellung, welcher wie das Brauereiabwasser versäuert wurde, und daraufhin ein Reststrom aus der Brauerei, welcher bereits auf der Brauerei-Kläranlage zur bessere Abbaubarkeit anaerob vorversäuert wurde. Die restlichen Akkumulationsversuche wurden mit dem gleichen Brauereiabwasser Batch 2.1 durchgeführt, welches in den ersten Wochen des

Langzeitversuches genutzt wurde (Kapitel 4.1.2). Die Zusammensetzungen dieser Substrate sind in Abbildung 8 dargestellt.

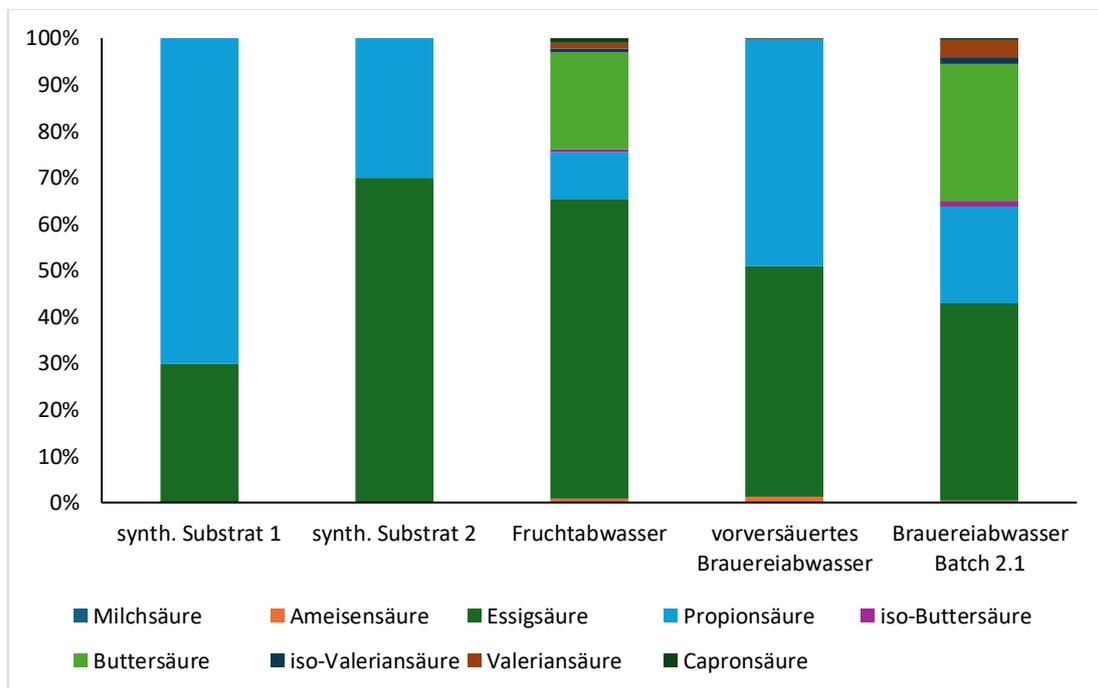


Abbildung 8: Zusammensetzung der Substrate, welche in den Akkumulationsversuchen in Arbeitsschritt 2 eingesetzt wurden.

Der Anteil an C_{gerade} und $C_{ungerade}$ im Substrat aus Fruchtsaftabwasser lag bei 84 und 16 % und der des vorversäuerten Brauereiabwassers bei 40 und 60 %, welches stark von der Zusammensetzung des Brauereiabwassers Batch 2.1 abweicht (ca. 70 und 30 %, Abbildung 8, vgl. Tabelle 3). Auch bestand das vorversäuerte Brauereiabwasser im Gegensatz zu dem Brauereiabwassers aus Batch 2.1 fast ausschließlich aus Essig- und Propionsäure (Abbildung 8, vgl. Abbildung 7).

4.2 Selektion

Die nachfolgend beschriebenen Versuche sollten zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Betriebsparameter in der Selektion auf die Entwicklung der Mischbiozönose und damit verbunden auf die PHA-Produktionsperformance und die erreichte PHA-Zusammensetzung dienen. Diese waren in drei Blöcke gegliedert, in denen jeweils zwei Parameter verglichen wurden. Zunächst wurden zwei verschiedene Schlammalter, dann zwei unterschiedliche Zyklusdauern und zuletzt zwei Raumbelastungen verglichen (vgl. Kapitel 3.2).

4.2.1 Schlammalter

Der Verlauf des organischen Feststoffgehaltes in den Selektionsreaktoren während der beiden Versuche zum Einfluss des Schlammalters ist in Abbildung 9 dargestellt. Hierbei wird erkenntlich, dass es im Laufe des ersten Selektionsversuches bei beiden getesteten Schlammaltern von 2 und 4 d zu einem raschen Abfall des Gehaltes an organischem Feststoff in den Reaktoren kam (Abbildung 9). Dies ist für den Gesamtprozess problematisch, da ein geringer Feststoffgehalt mit einer geringen PHA- und Biomasse-Raumproduktion einhergeht und daher auch trotz möglicher hoher PHA-Gehalte insgesamt nur eine geringe PHA-Produktion stattfinden kann. Mögliche Gründe hierfür könnten in der geringen Raumbelastung von $0,46 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L}\cdot\text{d})$, in einem suboptimalen $\text{CSB}_{\text{VFA}}/\text{CSB}_{\text{gel}}$ -Verhältnis und einem damit nicht ausreichenden Biomassewachstum sowie in Problemen beim Überschussschlammabzug und der Sedimentationsphase liegen. In Versuchen des vorangegangenen Projektes konnte zwar gezeigt werden, dass auch mit einer Raumbelastung von $0,5$ und $1 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ eine Selektion und PHA-Produktion möglich ist (Steinmetz et al. 2022), allerdings wurde hierbei synthetisches Substrat verwendet. Da in den oben beschriebenen Versuchen reales Substrat verwendet wurde, besteht die Möglichkeit, dass unter Verwendung solch eines komplexen Substrates eine höhere Raumbelastung für ein effektives Biomassewachstum benötigt wird.

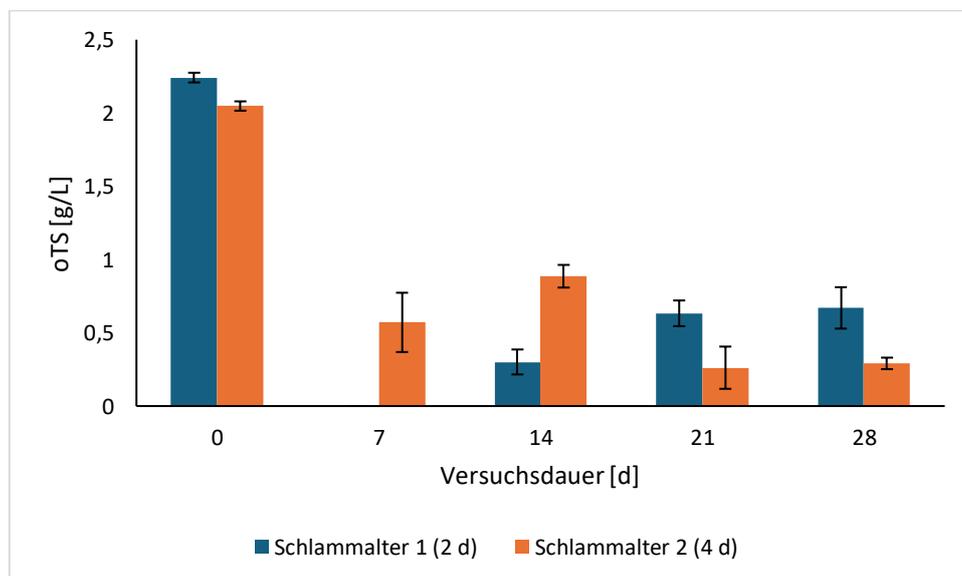


Abbildung 9: Gehalt an organischen Feststoff in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Während der beiden Selektionsversuche mit unterschiedlichem Schlammalter wurden wöchentliche Akkumulationen mit der aus den Selektionsreaktoren abgezogenen Biomasse durchgeführt, um die

PHA-Produktionsperformance der Biomasse zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen und zwischen den Selektionsparametern vergleichen zu können. Die erzielten PHA-Gehalte sind in Abbildung 10 dargestellt. Im ersten Teilversuch mit einem Schlammalter von 2 d wurde ein maximaler mittlerer PHA-Gehalt von 28,4 ($\pm 1,1$) %PHA/oTS bereits nach 7 Tagen erreicht. Danach sank dieser bis zum Versuchsende nahezu kontinuierlich. Lediglich in Reaktor 6 stieg der PHA-Gehalt noch bis zu Tag 21 auf einen maximalen Gehalt von 32,4 %PHA/oTS an und sank dann ebenfalls ab.

Im zweiten Teilversuch mit einem Schlammalter von 4 d war ebenfalls ein instabiler PHA-Verlauf über die Versuchsdauer zu verzeichnen (Abbildung 9). Dabei stieg dieser bis zu Tag 7 auf einen mittleren Wert von 17,5 ($\pm 13,6$) %PHA/oTS an, sank danach ab und erreichte an Tag 21 sein Maximum mit 19,1 ($\pm 11,9$) %PHA/oTS. Jedoch war bis zum Versuchsende auch hier eine erneute Abnahme des PHA-Gehaltes zu verzeichnen (Abbildung 10). Die höchsten in diesem Versuchsteil erzielten PHA-Gehalte lagen bei 35,3 %PHA/oTS in Reaktor 6 an Tag 7 und 35 %PHA/oTS in Reaktor 1 an Tag 21. In beiden Versuchen war, mit Ausnahme von Tag 7 im ersten Versuchsteil, in den Selektionsreaktoren (R 2,3 und 4) zum Zeitpunkt der Probenahme (Ende der famine-Phase) nahezu kein PHA zu verzeichnen. Matos et al. (2021b) konnten zeigen, dass ein Schlammalter von 2 d im Vergleich zu einem Schlammalter von 4 d zwar zu einem vermehrten Biomassewachstum in der Selektion führte, sie verzeichneten jedoch eine höhere PHA-Produktivität im System mit einem Schlammalter von 4 d. Auch Guarda et al. (2024) verzeichneten eine verbesserte PHA-Produktionsperformance mit einer Biomasse, die mit einem Schlammalter von 4 d im Vergleich zu einer, die mit einem Schlammalter von 2 d selektiert wurde. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen kein klares Bild. Es gab zwar auch hier eine Tendenz der bei einem Schlammalter von 2 d selektierten Biomasse zu einem höheren Wachstum als bei 4 d, allerdings war in beiden Versuchen insgesamt ein geringes Wachstum bzw. ein geringer Feststoffgehalt in den Reaktoren zu verzeichnen (Abbildung 9). Weiterhin konnte auch mit der bei 2 d selektierten Biomasse im Mittel mehr PHA produziert werden (Abbildung 10), aber zum einen sank der Wert auch hier im Verlauf des Versuches ab und zum anderen konnte der insgesamt höchste Einzelwert an produziertem PHA in dem Versuch mit 4 d Schlammalter erzielt werden. In letzterem Versuch war der PHA-Verlauf sehr instabil und war nach 14 Tagen aus unbekanntem Gründen kaum messbar vorhanden, nach 21 Tagen war er allerdings wieder auf einem vergleichbaren Wert mit Tag 7 und mit dem PHA-Gehalt aus dem Versuch mit einem Schlammalter von 2 d (Abbildung 10). Auch zwischen den einzelnen Versuchsansätzen (jeweils drei Reaktoren) gab es große Variation im erzielten PHA-Gehalt, was an der teilweise hohen Standardabweichung in Abbildung 10 zu erkennen ist. Der hohe Verlust an Biomasse

bzw. ebenfalls die geringe Raumbelastung in den beiden Selektionsversuchen könnten mögliche Gründe für den instabilen Verlauf der PHA-Produktion sein.

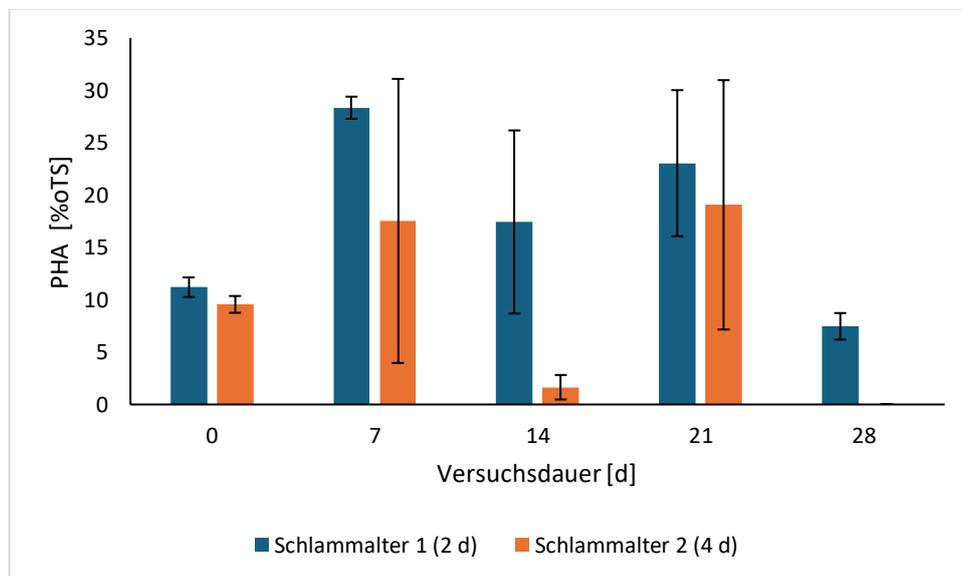


Abbildung 10: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Schlammaltern. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Tabelle 7 zeigt die mittleren PHA-Zusammensetzungen aus den beiden Teilversuchen. Dabei wird ersichtlich, dass in beiden Versuchen ein höherer Anteil HB im Vergleich zu HV hergestellt wurde. Zudem zeigte sich in beiden Versuchen eine Zunahme des HB-Anteils bis hin zu Tag 14 und danach wieder eine leichte Abnahme. In dem Versuch mit einem Schlammalter von 4 d lag der HB-Anteil meist ein wenig höher als bei dem Versuch mit einem Schlammalter von 2 d. In beiden Versuchen und über den jeweils gesamten Versuchszeitraum wurde das gleiche Substrat verwendet, dessen Zusammensetzung ebenfalls in Tabelle 7 aufgeführt ist. Die Zusammensetzung des produzierten PHA tendierte lediglich in die gleiche Richtung wie die durch das Substrat anzunehmende, theoretische Zusammensetzung (C_{gerade} und $C_{ungerade}$ 73,3 und 26,7 %), war jedoch nicht exakt gleich zu dieser. Zudem variierte die PHA-Zusammensetzung stark über die Zeit. Dies deutet darauf hin, dass es neben der Substratzusammensetzung noch andere Faktoren geben muss, die die PHA-Zusammensetzung bestimmen. Einer dieser Faktoren könnte die Zusammensetzung der bakteriellen Mischkultur sein.

Tabelle 7: PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Tag	Schlammalter 1 (2 d)		Schlammalter 2 (4 d)		Theoretische Zusammensetzung
	HB [%PHA]	HV [%PHA]	HB [%PHA]	HV [%PHA]	HB:HV
0	58,6 ± 1,1	41,4 ± 1,1	65,9 ± 1,2	34,1 ± 1,2	73,3:26,7
7	85,6 ± 0,3	14,4 ± 0,3	84,7 ± 10,9	15,3 ± 10,9	
14	93,1 ± 4,9	6,9 ± 4,9	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	
21	79,7 ± 1,3	20,3 ± 1,3	86,0 ± 10,0	14,0 ± 10,0	
28	84,6 ± 5,0	15,4 ± 5,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	

Die mikrobielle Zusammensetzung im Inokulum unterschied sich in beiden Versuchen leicht, wobei Mitglieder der Gruppe Sphingobacteriales (19,7 %) im Versuch mit einem Schlammalter von 2 d zu Beginn am abundantesten waren, wohingegen *Streptococcus* (15,5 %) die höchste relative Abundanz zum Start des Versuches mit einem Schlammalter von 4 d besaß (Abbildung 11). Beide Taxa sind nicht dafür bekannt, die Fähigkeit zur PHA-Produktion zu besitzen und wurden über die jeweilige Versuchsdauer von 28 Tagen in den beiden Systemen verdrängt. Zu den insgesamt abundantesten Organismen im ersten Selektionsversuch mit einem Schlammalter von 2 d zählten *Pseudomonas* (14,5 ± 10,1 %), nicht näher bestimmte Vertreter der Gruppen Bacteroidetes (6,2 ± 2,4 %) und Comamonadaceae (4,5 ± 2,1) sowie die Gattung *Flavobacterium* (3,1 ± 1,7 %), welche alle potenzielle PHA-Produzenten beinhalten. Die Gattung *Acinetobacter*, welche ebenfalls zur PHA-Produktion in der Lage ist, nahm zudem von 0,015 % an Tag 0 bis zu Tag 28 auf einen Wert von 8,2 % zu. Eine weitere Gattung, welche für ihre Fähigkeit zur PHA-Produktion bekannt ist, *Zoogloea*, nahm zudem vom Versuchsstart bis zu Tag 7 von 0,01 auf 7,6 % zu. Jedoch sank die relative Abundanz dieser bis zum Ende des Versuches wieder auf 2,2 % ab. Im zweiten Selektionsversuch mit einem Schlammalter von 4 d zählten ebenfalls *Pseudomonas* (7,4 ± 3,8 %), *Acinetobacter* (3,5 ± 2,8 %) und die Gruppe Comamonadaceae (2,8 ± 1,7 %) zu den abundantesten Vertretern, allerdings war *Caldilinea* (5,5 ± 2,4 %), eine Gattung ohne die Fähigkeit zur PHA-Produktion, hier ebenfalls häufig vertreten. Zudem war die Gattung *Paracoccus*, ein weiterer potenzieller PHA-Produzent, relativ abundant (3,0 ± 4,0 %) und vernahm an Tag 28 zusammen mit *Flavobacterium* einen Anstieg in der relativen Abundanz (10,7 % und 3,6 %). Die Gattung *Zoogloea* war in diesem Versuchsteil allerdings nicht sehr häufig vertreten (0,8 ± 0,5 %) (Abbildung 11).

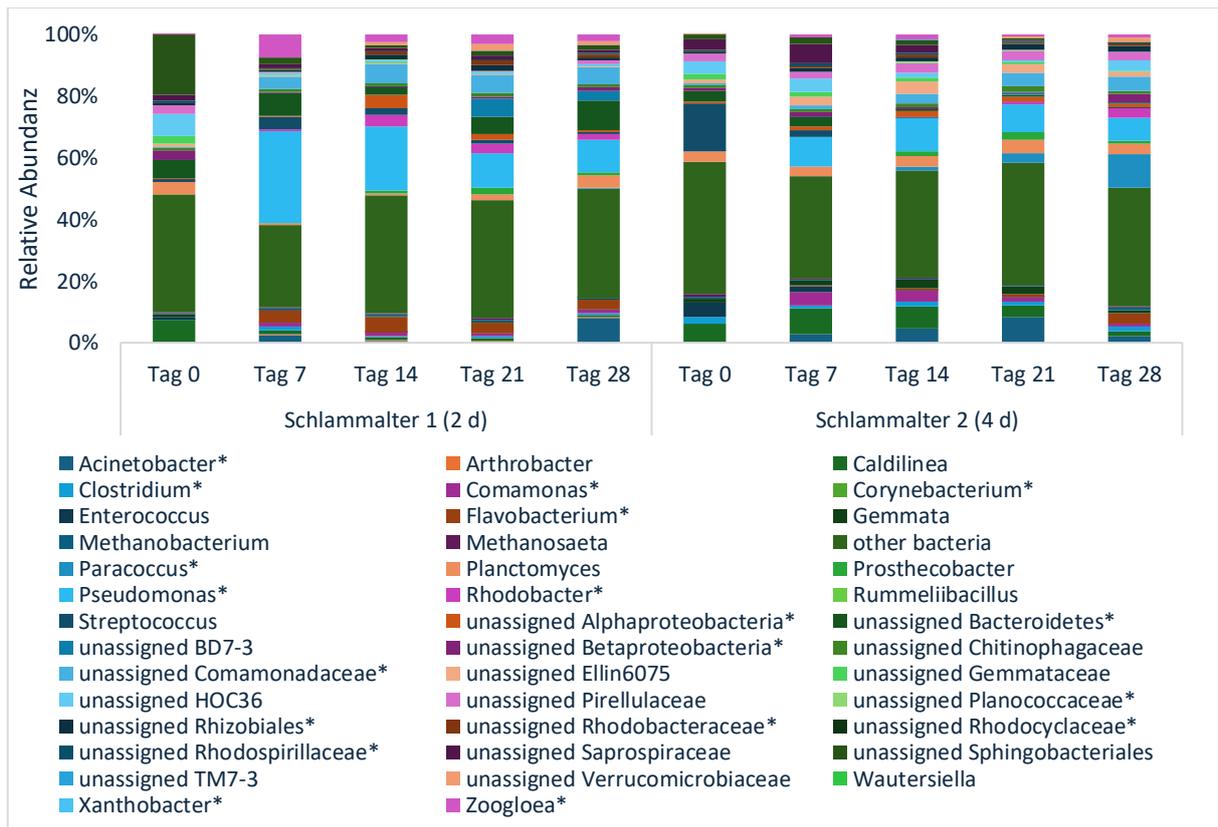


Abbildung 11: Mikrobielle Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zu PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.¹

Insgesamt war in beiden Versuchen eine Zunahme der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten bis hin zu Tag 7 zu verzeichnen, worauf eine leichte Abnahme bis Tag 21 und eine erneute leichte Zunahme an Tag 28 folgte (Abbildung 12). Die maximale relative Abundanz im Versuch mit einem Schlammalter von 2 d wurde an Tag 7 mit einem Wert von 71,7 % erreicht. Im Versuch mit einem Schlammalter von 4 d lag diese an Tag 7 bei 50 % und erreichte den maximalen Wert an Tag 28 mit 58,6 %. In beiden Versuchen war damit nach 7 Tagen bereits eine hohe relative Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten im Vergleich zum Versuchsstart mit Werten unter 20 % zu beobachten, welche zwar gewissen Schwankungen unterlag, allerdings konnte immer ein Wert von über 50 % in

¹ Die detaillierten Einzelergebnisse der biologischen Analysen können auf Nachfrage von den Autorinnen zur Verfügung gestellt werden.

beiden Systemen über den Versuchsverlauf gehalten werden. Dies zeigt, dass die Selektion erfolgreich war. Die Schwankungen in der relativen Abundanz könnte, wie beim PHA-Gehalt, möglicherweise mit dem Verlust an Biomasse im System und der geringen Raumbelastung in Zusammenhang stehen. In dem Versuch mit niedrigerem Schlammalter (2 d) wurden insgesamt höhere relative Abundanzen an potenziellen PHA-Produzenten verzeichnet, was darauf hindeuten könnte, dass diese durch das kürzere Schlammalter einen Wachstumsvorteil gegenüber nicht-PHA-Produzenten besitzen. Ein klarer Zusammenhang zwischen PHA-Gehalt und Abundanz potenzieller PHA-Produzenten ist dabei nicht zu erkennen, da zwar ebenfalls eine Zunahme bis zu Tag 7 erkennbar war, aber bei dem PHA-Gehalt bereits an Tag 14 eine Abnahme erkennbar war. Zudem war an Tag 28 in beiden Versuchen ein Verlust der PHA-Produktionsperformance erkennbar, obwohl zu diesem Zeitpunkt wieder eine leicht höhere Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten zu verzeichnen war (Abbildung 10, Abbildung 12). Dies lässt darauf schließen, dass nicht allein die Anwesenheit von PHA-Produzenten zu einer höheren PHA-Produktion führt und es noch weitere Faktoren für die tatsächliche Produktion von PHA benötigt bzw. diese durch bestimmte Faktoren inhibiert sein kann.

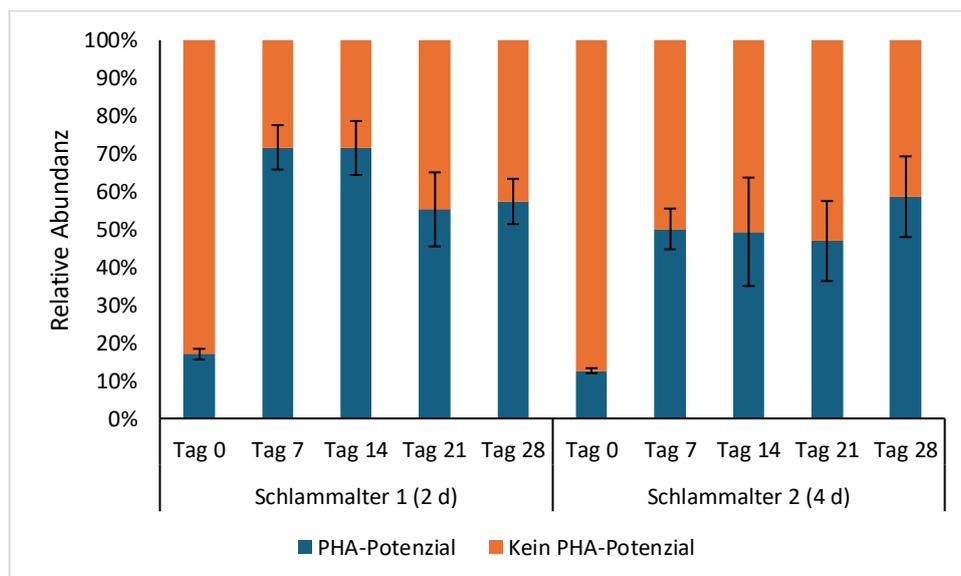


Abbildung 12: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

4.2.2 Zwischenfazit

In beiden Versuchsansätzen mit einem Schlammalter von 2 und 4 d war insgesamt ein Absinken des Feststoffgehaltes und ein instabiler Verlauf der PHA-Produktion über die jeweilige Versuchsdauer

hinweg zu verzeichnen. Beim Vergleich der beiden Versuche war nicht klar festzustellen, welches System in der PHA-Produktion besser performte. Ein möglicher Grund für diese Beobachtungen könnte die geringe Raumbelastung in den Reaktoren gewesen sein, welche zu einem insuffizienten Biomassewachstum sowie einer suboptimalen PHA-Produktion führte. Obwohl das gleiche Substrat für beide Versuche verwendet wurde, variierte zudem die PHA-Zusammensetzung zwischen den Versuchen und über den Versuchszeitraum hinweg. Eine Anreicherung an potenziellen PHA-Produzenten war bereits nach 7 Tagen in beiden Versuchsansätzen zu verzeichnen und trotz Schwankungen blieb die relative Abundanz dieser in beiden Versuchen ab diesem Zeitpunkt hoch. Dies lässt auf eine erfolgreiche Selektion schließen. Die Anwesenheit potenzieller PHA-Produzenten führte jedoch nicht unbedingt zu einer hohen PHA-Produktion, sodass andere Faktoren hierbei ebenfalls eine Rolle spielen müssen.

4.2.3 Zyklusdauer

Trotz des höheren erzielten mittleren PHA-Gehaltes und dem höheren Anteil an potenziellen PHA-Produzenten in dem Versuch mit einem Schlammalter von 2 d (Abbildung 10, Abbildung 12), wurde aufgrund der Vergleichbarkeit zu den im vorangegangenen Projekt durchgeführten Versuchen (Steinmetz et al. 2022), den Ergebnissen aus der Literatur (Matos et al. 2021b; Guarda et al. 2024) und den etwas höheren erzielten Einzel-PHA-Gehalten in dem Versuch mit einem Schlammalter von 4 d, letzteres als Schlammalter für die weiteren Versuche ausgewählt. Im Gegensatz zu der in dem vorangegangenen Versuchsblock verwendeten Zyklusdauer von 12 h, wurden in diesem Versuchsblock 24 h und 6 h als Zyklusdauern ausgewählt und verglichen.

Auch in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Zyklusdauern war zunächst ein Abfall des organischen Feststoffgehaltes bis an Tag 14 zu verzeichnen (Abbildung 13). Dieser stieg danach in beiden Fällen jedoch wieder leicht an. In dem Versuchsteil mit einer Zyklusdauer von 24 h lag der Gehalt an organischem Feststoff bis Tag 21 insgesamt etwas höher im Vergleich zu dem Versuch mit einer Zyklusdauer mit 6 h, was möglicherweise auf einen höheren Grad an Auswaschung von Schlamm aus dem System mit häufigerem Abzug hindeuten könnte. An Tag 28 jedoch, lag der organische Feststoffgehalt in dem Versuch mit kürzerer Zyklusdauer etwas höher. Der hier erreichte organische Feststoffgehalt war in beiden Versuchen zum Versuchsende hin mit um die 1,5 g/L höher als in den ersten beiden Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Schlammalter und einem Wert von unter 1 g/L (vgl. Abbildung 9). Dies steht möglicherweise in Zusammenhang mit der höheren Raumbelastung

von $1,21 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L}\cdot\text{d})$, welche aufgrund der höheren VFA-Konzentration im Substrat aus dem zweiten Versäuerungsbatch in diesem Versuchsblock erreicht werden konnte.

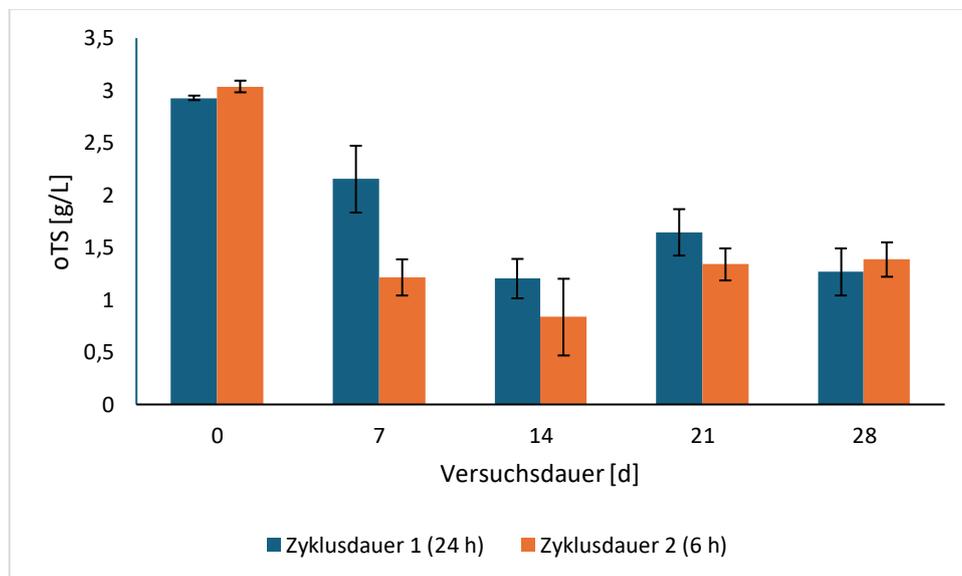


Abbildung 13: Gehalt an organischem Feststoff in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

In dem Selektionsversuch mit einer Zyklusdauer von 6 h konnten insgesamt sehr viel höhere PHA-Gehalte erzielt werden als in dem Versuch mit einer Zyklusdauer von 24 h (Abbildung 14). So lag der maximale PHA-Gehalt mit einem Wert von $40,8 (\pm 4,9) \% \text{PHA}/\text{oTS}$ an Tag 7 um mehr als doppelt so hoch wie der maximale PHA-Gehalt des Versuches mit der höheren Zyklusdauer mit $17,5 (\pm 3,9) \% \text{PHA}/\text{oTS}$ an Tag 14. Zudem lag er damit ebenfalls etwa doppelt so hoch wie die maximalen mittleren PHA-Gehalte aus den ersten beiden Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter (vgl. Abbildung 10), welche mit einer Zyklusdauer von 12 h durchgeführt wurden. In beiden Zyklusdauer-Versuchen sank der PHA-Gehalt jedoch nach diesem Zeitpunkt des Maximums bis an Tag 28 auf $24,6 (\pm 7,1) \% \text{PHA}/\text{oTS}$ (6 h Zyklusdauer) und $2,3 (\pm 3,2) \% \text{PHA}/\text{oTS}$ (24 h Zyklusdauer) ab (Abbildung 14). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von (Moralejo-Gárate et al. 2013), welche in ihren Ergebnissen eine vermehrte PHB-Produktion bei einer Zyklusdauer von 24 h im Vergleich zu 6 h beobachten konnten. Bei einer Zyklusdauer von 6 h wurde in ihren Versuchen eine Produktion von Polyglucose bevorzugt, allerdings nutzten sie ein reines Substrat aus Glycerol, welches ein möglicher Grund hierfür sein könnte. Auch die Ergebnisse von (Moretto et al. 2020) wiesen darauf hin, dass eine längere Zyklusdauer von 12 h im Vergleich zu 6 h in Kombination mit einem geringeren Schlammalter von 1 d im Vergleich zu 2 d zu einer verbesserten PHA-Produktionsperformance steht. Dies steht im

Gegensatz zu den Ergebnissen, die in diesem Projekt gewonnen werden konnten. Die Autoren begründeten ihre Ergebnisse mit einem erhöhten Selektionsdruck aufgrund der verlängerten famine-Phase bzw. einer geringeren Substratverfügbarkeit. Allerdings konnte bei den Messungen der VFA-Konzentrationen am Ende der famine-Phase in diesen Versuchen festgestellt werden, dass ein kompletter Verbrauch des Substrates während eines Zyklus erfolgte.

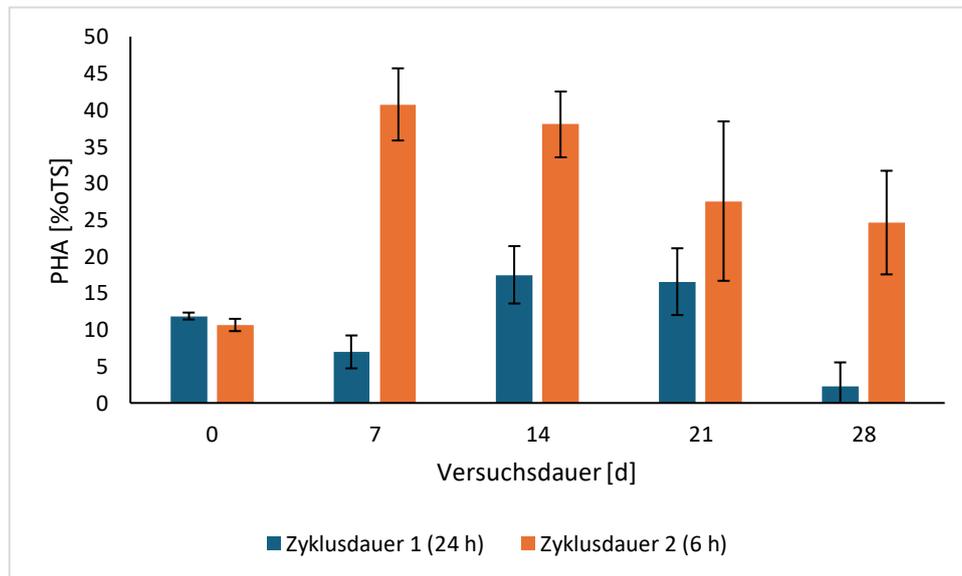


Abbildung 14: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Das hergestellte PHA war zu Beginn der beiden Zyklusdauer-Versuche, ähnlich wie in den vorherigen Versuchen (vgl. Tabelle 7), aus ca. 60 % HB und 40 % HV zusammengesetzt (Tabelle 8). Über die Zeit veränderte sich die Zusammensetzung ebenfalls, wobei der HB-Anteil anstieg. Dies spricht für eine metabolische Anpassung der Mikroorganismen im System an das Substrat im Laufe der Selektion. Mit Ausnahme der Tage 7 und 28 im Versuch mit einer Zyklusdauer von 24 h, in denen der HB-Anteil über 80 % lag, war die Zusammensetzung des PHA sehr ähnlich zu der theoretisch zu erwartenden Zusammensetzung aufgrund des verwendeten Substrates (C_{gerade} und $C_{ungerade}$ 74,7 und 25,3 %). Diese beiden Tage waren die Tage mit dem niedrigsten PHA-Gehalt in diesem Versuch (Abbildung 14).

Table 8: PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Tag	Zyklusdauer 1 (24 h)		Zyklusdauer 2 (6 h)		Theoretische Zusammensetzung
	HB [%PHA]	HV [%PHA]	HB [%PHA]	HV [%PHA]	HB:HV
0	61,4 ± 0,4	38,6 ± 0,4	63,5 ± 2,5	36,5 ± 2,5	74,7:25,3
7	85,3 ± 3,4	14,7 ± 3,4	74,9 ± 1,2	25,1 ± 1,2	
14	77,6 ± 1,4	22,4 ± 1,4	75,4 ± 1,8	24,6 ± 1,8	
21	73,7 ± 0,7	26,3 ± 0,7	76,1 ± 2,4	23,9 ± 2,4	
28	81,3 ± 0,0	18,7 ± 0,0	77,3 ± 1,3	22,7 ± 1,3	

Die Organismen mit der durchschnittlichen höchsten relativen Abundanz im Versuch mit einer Zyklusdauer von 24 h waren *Pseudomonas* (6,3 ± 6,6 %), *Paracoccus* (7,3 ± 4,9 %), *Comamonas* (4,9 ± 0,9 %) und nicht näher bestimmte Vertreter der Familie Chitinophagaceae (4,5 ± 3 %), wobei letztere keine bekannten PHA-Produzenten beinhaltet. Diese nahmen bis zu Tag 14 von 0,6 auf 9,8 % in ihrer relativen Abundanz zu, danach jedoch wieder auf einen Wert von 3,4 % an Tag 28 ab (Abbildung 15). Die Gattungen *Pseudomonas* (18,8 % an Tag 0, 2,8 % an Tag 6) und *Paracoccus* (9,8 % an Tag 0, 0,06 an Tag 6) verzeichneten beide eine Abnahme bis zu Tag 6. *Pseudomonas* nahm in seiner relativen Abundanz bis zu Tag 14 hin wieder zu (7,5 %) und zum Versuchsende ab (1 %). *Paracoccus* wurde zum Versuchsende hin mit einem Wert von 14,9 % wieder abundanter. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit der leichten Abnahme in der relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten insgesamt bis Tag 14 und einem darauffolgenden erneuten Anstieg bis zum Versuchsende in Abbildung 16. Zu den abundantesten Organismen im Versuch mit einer Zyklusdauer von 6 h zählten *Paracoccus* (7,8 ± 4,4 %), *Acinetobacter* (2,9 ± 2,6 %) und nicht näher bestimmte Vertreter der Taxa Rhodocyclaceae (10,5 ± 9,2 %) und Comamonadaceae (3,7 ± 1,1 %), welche potenzielle PHA-Produzenten beinhalten, sowie der Gruppen Chitinophagaceae (3,1 ± 2,5 %) und BD7-3 (8,3 ± 7,0 %), welche nicht für eine mögliche PHA-Produktion bekannt sind. Die Gattung *Paracoccus* welche von Tag 0 bis Tag 14 eine Zunahme von 11,6 auf 14 % zeigte, verlor mit einem Wert von 2,9 % an Präsenz bis zum Versuchsende hin. Dafür verzeichnete das Taxon BD7-3 bis zu Tag 14 (13,9 %) und 21 (18,6 %) eine starke Zunahme und danach eine Abnahme (6,9 %). Ab Tag 21 war die Gruppe Rhodocyclaceae stark vertreten (22,3 %).

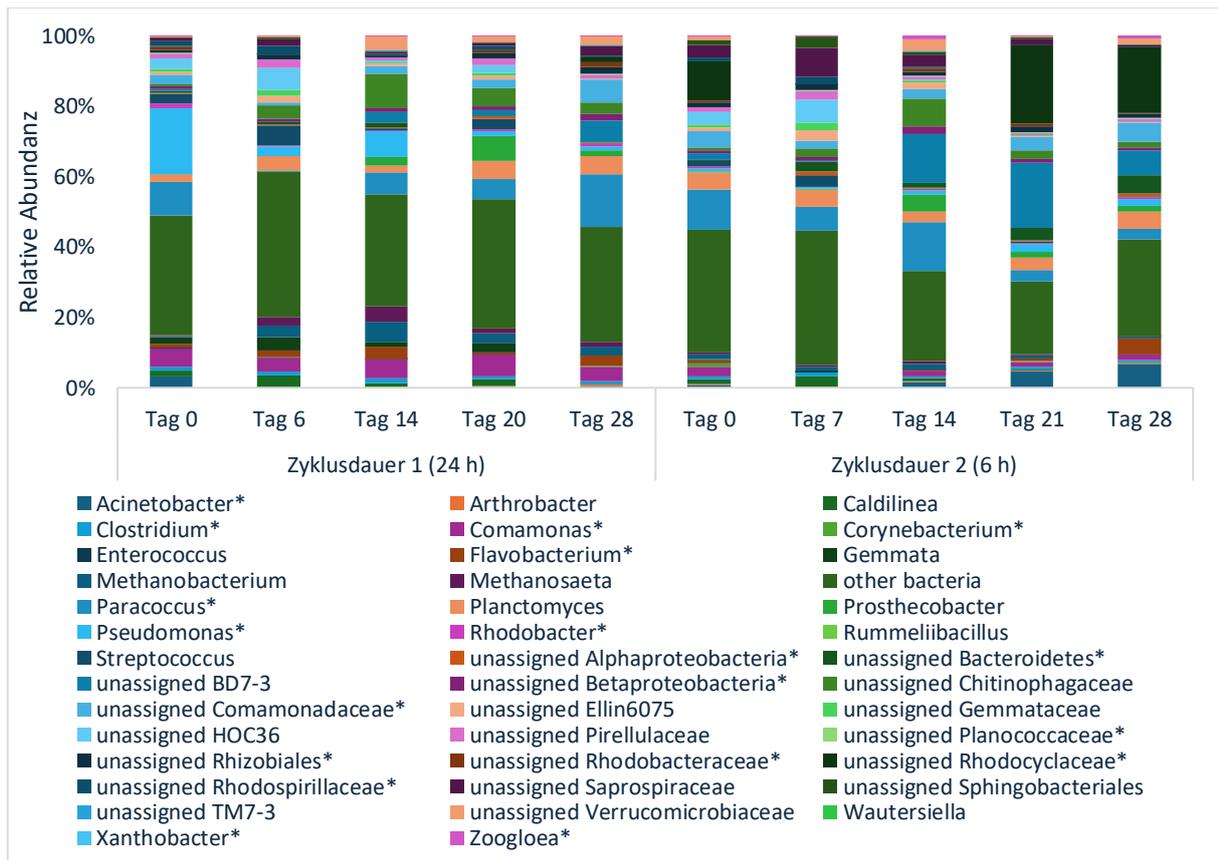


Abbildung 15: Mikrobielle Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zu PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.

Insgesamt war in beiden Versuchen eine Zunahme in der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten über die Selektionsdauer zu verzeichnen (Abbildung 16). Im Versuch mit der Zyklusdauer von 24 h stieg diese von 21,7 auf 60,5 % von Tag 0 bis Tag 28 an, wobei ein kurzer Einbruch an Tag 14 mit einem Wert von 39,2 % beobachtet werden konnte. In dem Versuch mit der kürzeren Zyklusdauer stieg die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten von 20,6 % an Tag 0 auf einen maximalen Wert von 57,3 % an Tag 21 und sank bis Tag 28 leicht auf einen Wert von 55,7 % ab.

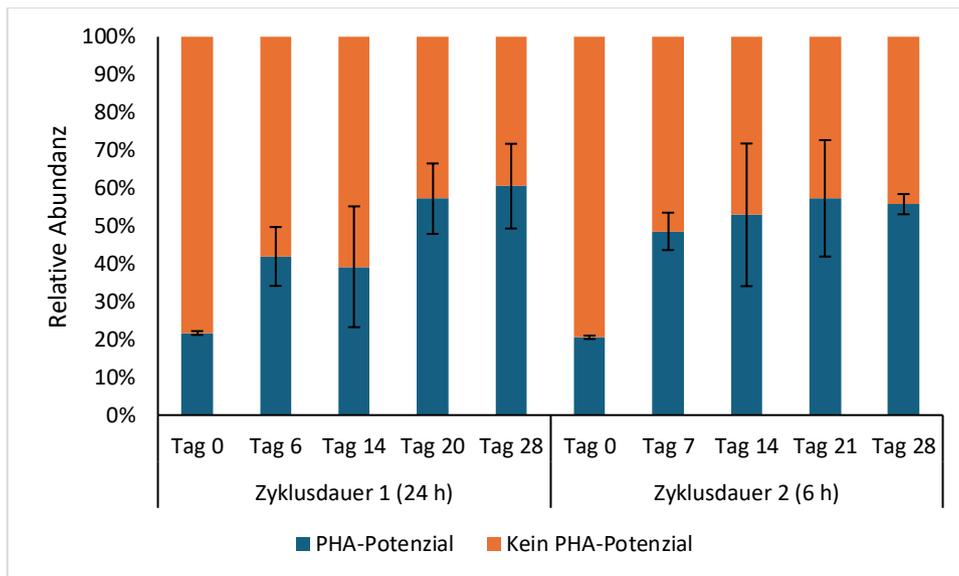


Abbildung 16: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

4.2.4 Zwischenfazit

In den beiden Versuchsansätzen mit unterschiedlicher Zyklusdauer in der Selektion konnte insgesamt ein höherer Gehalt an organischem Feststoff in den Reaktoren festgestellt werden als in den Versuchen zum Schlammalter, was durch die höhere, in diesen Versuchen verwendete, Raumbelastung erklärt werden könnte. Mit der kürzeren Zyklusdauer von 6 h konnten sehr viel höhere PHA-Gehalte erzielt werden als mit einer Zyklusdauer von 24 h. Diese waren zudem auch höher als die erzielten PHA-Gehalte in den Versuchen zum Schlammalter, in denen eine Zyklusdauer von 12 h verwendet wurde. Der maximale PHA-Gehalt im Versuch mit einer Zyklusdauer von 6 h wurde zudem bereits nach 7 Tagen erreicht. Auch die relative Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten verdoppelte sich von Tag 0 bis Tag 7 in beiden Versuchen und stieg danach nahezu konstant bis zum Ende der Versuche weiter an, was sich jedoch nicht in der PHA-Produktion widerspiegelte. Die PHA-Zusammensetzung unterschied sich zu Beginn der beiden Versuche und zwischenzeitig, an Tagen mit geringem PHA-Gehalt, von der theoretisch zu erwartenden, war ansonsten jedoch ähnlich zu dieser.

4.2.5 Raumbelastung

Aufgrund des deutlich höheren erzielten PHA-Gehaltes mit einer Zyklusdauer von 6 h in der Selektion wurden die Versuche mit unterschiedlicher Raumbelastung mit dieser Einstellung durchgeführt (Kapitel 4.2.3). Zudem wurde der Versuch auf eine Dauer von 14 Tagen verkürzt, da die

vorangegangenen Versuche und die Versuche aus dem vorigen Projekt (Steinmetz et al. 2022) auf eine maximale PHA-Produktion zwischen Tag 7 und 14 hindeuteten. Es wurden zwei Raumbelastungen verglichen, die mit 6 und 10 g/(L*d) um ein vielfaches höher lagen, als die bisher verwendeten Raumbelastungen von 0,5-2 g/(L*d) (Kapitel 4.2.1 und 4.2.3; (Steinmetz et al. 2022)).

Der organische Feststoffgehalt im Versuch mit der höchsten verwendeten Raumbelastung von 10 g/(L*d) sank von 2,4 (± 0,0) g/L an Tag 0 bis zu 0,5 (± 0,0) g/L an Tag 7 und letztendlich auf einen Wert von 0,3 (± 0,2) g/L an Tag 14 sehr stark ab. Im Versuch mit einer Raumbelastung von 6 g/(L*d) konnte zunächst eine Steigerung des Gehaltes an organischem Feststoff von 1,9 (± 0,0) auf 2,3(± 0,1) g/L an Tag 7 beobachtet werden, jedoch sank dieser bis an Tag 14 ebenfalls auf einen Wert von 1,2 (± 0,2) g/L ab, lag damit jedoch trotzdem weit über dem Wert des Versuches mit höherer Raumbelastung (Abbildung 17).

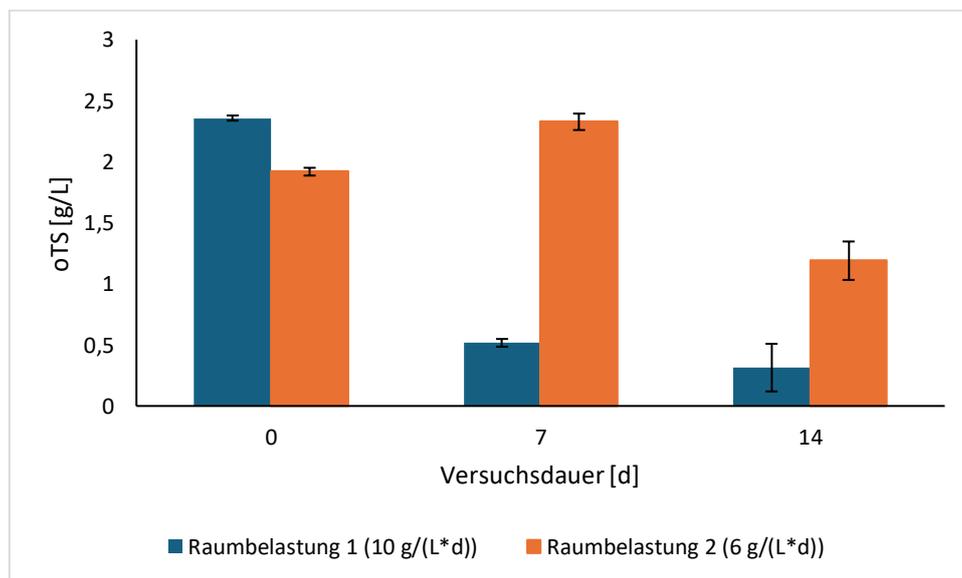


Abbildung 17: Gehalt an organischem Feststoff in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Bei den Ergebnissen zum PHA-Gehalt war im Versuch mit einer Raumbelastung von 6 g/(L*d) das gleiche Muster zu beobachten (Abbildung 18). Dieser stieg von Tag 0 mit einem Wert von 5,5 (± 3,9) % PHA/oTS auf 9,4 (± 3,5) %PHA/oTS an Tag 7 und sank wieder auf 5,8 (±3,0) %PHA/oTS an Tag 14 ab. Bei dem Versuch mit höherer Raumbelastung war keine relevante Steigerung des PHA-Gehaltes über die Selektionsdauer zu verzeichnen. Diese lag an den Versuchstagen 0 und 7 bei einem Wert von 6 (± 3,9) und 6,5 (± 3,5) %PHA/oTS (Abbildung 18). An Tag 14 war ein leichter Anstieg auf 8,3 (± 3,0) %PHA/oTS

zu beobachten. Insgesamt lagen die PHA-Gehalte damit um einiges niedriger als in den Versuchen zuvor (Kapitel 4.2.1 und 4.2.3). Diese Ergebnisse deuten auf eine Substratinhibierung durch einen Überschuss im Versuch mit einer Raumbelastung von 10 g/(L*d) hin, da weder ein Biomassewachstum noch eine PHA-Produktion stattfand. Auch andere Studien zeigen, dass eine zu hohe Raumbelastung zu einer Verschlechterung der PHA-Produktionsperformance führen kann, da diese zu einer Abnahme des Selektionsdrucks in der famine-Phase führen kann (Nguyenhuynh et al. 2021; Chen et al. 2017).

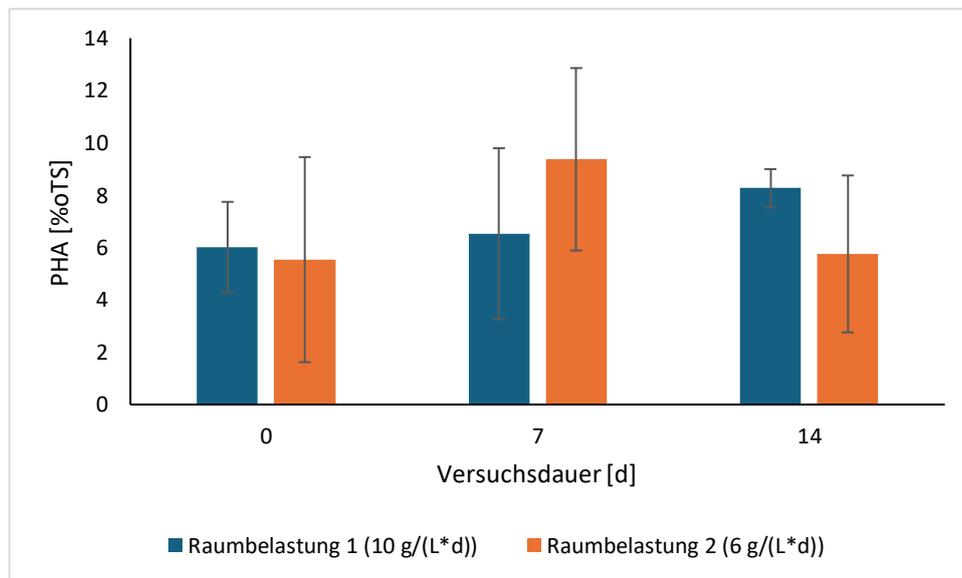


Abbildung 18: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Die Zusammensetzung des PHA war in beiden Versuchen zu Beginn sehr unterschiedlich (Tabelle 9). Im Versuch mit der höheren Raumbelastung bestand das produzierte PHA zu ca. zwei Drittel aus HV und einem Drittel aus HB, wohingegen dies bei dem Versuch mit niedrigerer Raumbelastung genau umgekehrt war. In den Versuchstagen danach bestand das produzierte PHA in beiden Versuchen fast bzw. ausschließlich aus HB und entsprach nicht der theoretisch erwarteten Zusammensetzung (71,6 und 28,4 %). Dies stimmt mit den Beobachtungen aus den beiden vorherigen Versuchsreihen überein, dass die PHA-Zusammensetzung nicht immer durch die Substratzusammensetzung vorhersagbar ist. Dies spricht für einen Einfluss des Metabolismus der Bakterienmischkultur bzw. der einzelnen Bakterienspezies auf die PHA-Zusammensetzung.

Tabelle 9: PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung

Tag	Raumbelastung 1 (10 g/(L*d))		Raumbelastung 2 (6 g/(L*d))		Theoretische Zusammensetzung
	HB [%PHA]	HV [%PHA]	HB [%PHA]	HV [%PHA]	HB:HV
0	33,4 ± 23,6	66,6 ± 23,6	61,0 ± 2,2	39,0 ± 2,2	71,6:28,4
7	95,8 ± 5,9	4,2 ± 5,9	87,1 ± 5,5	12,9 ± 5,5	
14	100,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	93,5 ± 9,3	6,5 ± 9,3	

Zu Beginn des Versuches mit der höheren Raumbelastung (10 g/(L*d)) waren Vertreter der Sphingobacterales (10,1 %) die abundanteste Gruppe, während zum Start des Versuches mit niedrigerer Raumbelastung (6 g/(L*d)) *Streptococcus* mit 12,2 % den größten Anteil an der relativen Abundanz hatte (Abbildung 19). Beide Bakteriengemeinschaften entwickelten sich im Verlauf der Versuchsdauer sehr unterschiedlich. Zu den insgesamt abundantesten Organismen im Versuch mit einer Raumbelastung von 10 g/(L*d) zählten unter anderem *Acinetobacter* (3,8 ± 3,4 %), *Arthrobacter* (4,2 ± 3,0 %), *Corynebacterium* (8,5 ± 10,2 %), *Rummeliibacillus* (9,5 ± 8,6 %), *Wautersiella* (5,8 ± 6,1 %), wohingegen im Versuch mit der niedrigeren Raumbelastung von 6 g/(L*d) *Streptococcus* (4,2 ± 5,7 %), Vertreter der Gruppe TM7-3 (5,2 ± 3,8 %) und *Xanthobacter* (7,7 ± 6,8 %) dazu zählten. Im Versuch mit 10 g/(L*d) waren die abundantesten Organismen an Tag 7 *Wautersiella* (14,3 %), *Rummelilibacillus* (20,9 %), *Arthrobacter* (5,9 %), *Acinetobacter* (8,2 %) und *Comamonas* (4,1 %), wobei nur die letzten beiden Gattungen eine Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzen. Dies spiegelt sich ebenfalls in der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten insgesamt wider, da an Tag 7 dieses Versuches die relative Abundanz dieser lediglich bei 24,4 % lag (Abbildung 20). Die Abundanz potenzieller PHA-Produzenten stieg an Tag 14 auf 49,2 %, was auch anhand der taxonomischen Zusammensetzung ersichtlich wird (Abbildung 20, Abbildung 19). Zu diesem Zeitpunkt waren *Corynebacterium* (22,8 %) und nicht näher bestimmte Vertreter der Familie Planococcaceae (6,9 %) die abundantesten Taxa, während beispielsweise nicht-PHA-produzierende Taxa wie *Rummelilibacillus* (7,7 %) und *Wautersiella* (3,1 %) im Vergleich zu Tag 7 in ihrer relativen Abundanz abnahmen. Im Versuch mit der niedrigeren Raumbelastung (6 g/(L*d)) war eine stärkere Zunahme von Tag 0 bis Tag 7 der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten von 15,3 auf 60,8 % zu verzeichnen (Abbildung 20). Bis Tag 14 war eine erneute Zunahme auf 67,1 % zu beobachten. Bei Betrachtung der taxonomischen Zusammensetzung dieses Selektionsversuches (Abbildung 19) wird ersichtlich, dass an Tag 7 neben nicht-PHA-Produzenten wie Vertretern der Gruppen TM7-3 (7,0 %) und Chitinophagaceae (3,3 %) hauptsächlich Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion wie *Xanthobacter* (6,7 %), Vertreter der Rhodobacteraceae

(5,1 %), *Pseudomonas* (3,6 %) und *Flavobacterium* (6,3 %) häufig vertreten waren. Die häufigsten Organismen an Tag 14 dieses Versuches waren *Xanthobacter* (16,5 %), *Corynebacterium* (6,5 %) und Vertreter der Planococcaceae (6,7 %) und der Gruppe TM7-3 (8,8 %), worunter nur letztere keine Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzen. Die Zunahme der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten (Abbildung 20) in beiden Versuchen über die Zeit, zeigt sich nicht im Verlauf des PHA-Gehaltes (Abbildung 18), was ebenfalls verdeutlicht, dass ein Vorhandensein von Organismen mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion nicht unbedingt zu einer PHA-Produktion führt. Der Substratüberschuss in beiden Versuchen könnte aufgrund einer fehlenden Notwendigkeit zur Speicherung von Energiereserven ein möglicher Grund hierfür sein.

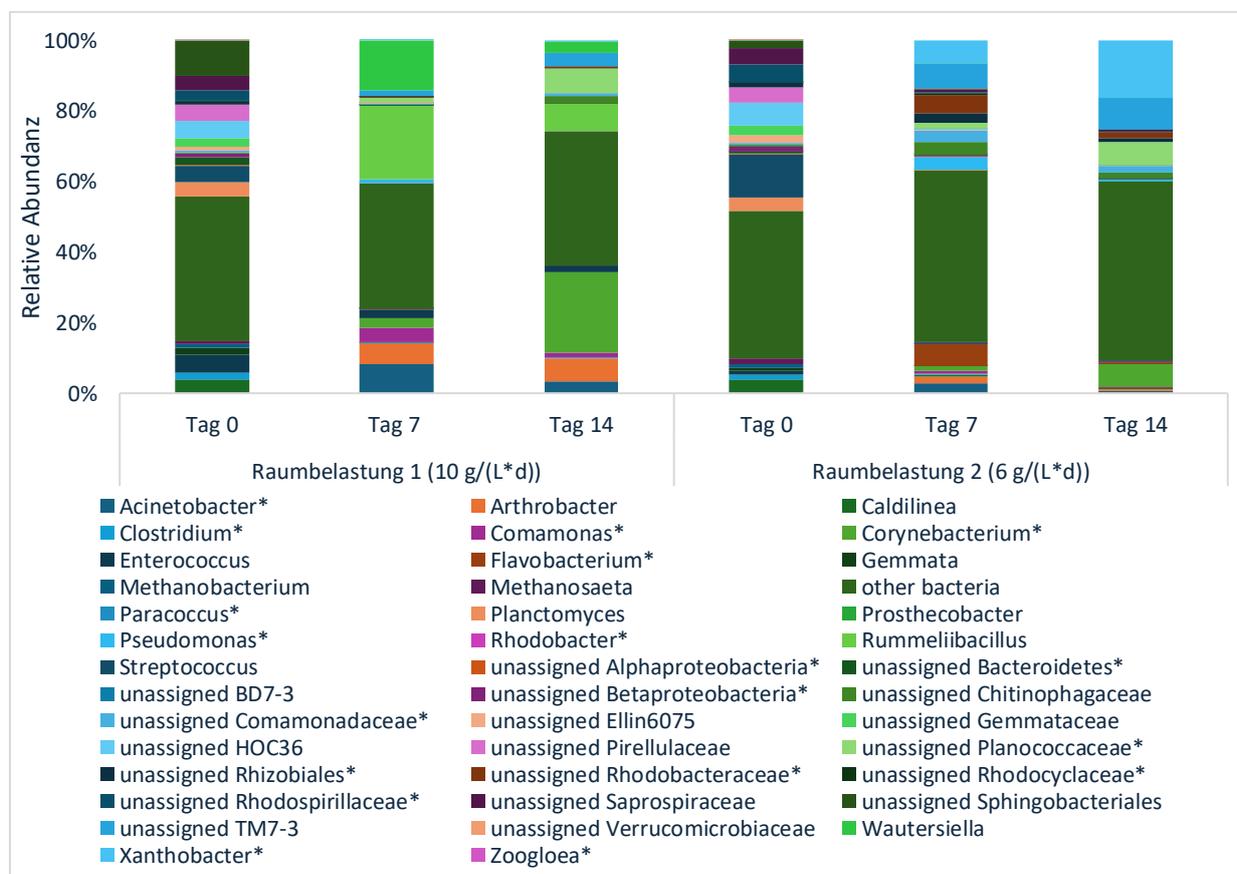


Abbildung 19: Mikrobielle Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zu PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.

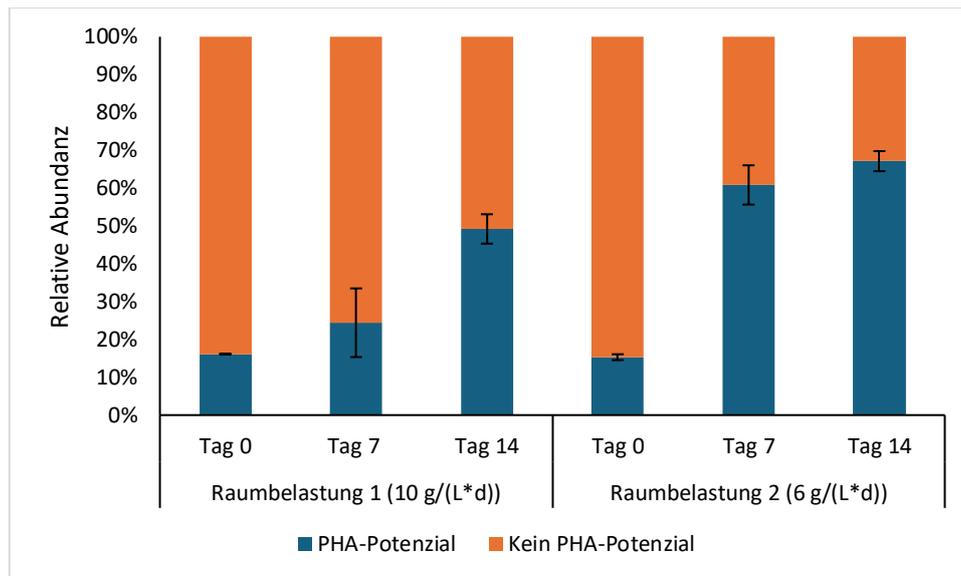


Abbildung 20: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

4.2.6 Zwischenfazit

Der Gehalt an organischem Feststoff lag in dem Versuch mit einer niedrigeren Raumbelastung (6 g/(L*d)) sehr viel höher als in dem Versuch mit höherer Raumbelastung (10 g/(L*d)). Auch der erzielte PHA-Gehalt war an den Tagen 0 und 7 bei dem Versuch mit niedrigerer Raumbelastung höher, allerdings lag dieser in beiden Versuchen insgesamt in einem geringen Bereich und war sehr viel niedriger als in den vorherigen Versuchen mit Raumbelastungen von 0,69 und 1,29 gCSB_{gel}/(L*d). Die PHA-Zusammensetzung variierte stark über den Versuchszeitraum und war zwischen beiden Versuchsansätzen ebenfalls unterschiedlich. Sie war damit nicht durch die aufgrund der durch die Substratzusammensetzung anzunehmenden theoretischen PHA-Zusammensetzung vorhersagbar. Die biologische Zusammensetzung entwickelte sich ebenfalls unterschiedliche zwischen beiden Versuchsansätzen. Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten stieg zwar in beiden Versuchen über die Versuchsdauer kontinuierlich an, was sich jedoch nicht in der PHA-Produktion widerspiegelte. Die Ergebnisse sprechen für eine Inhibierung des Wachstums und der PHA-Produktion durch einen Substratüberschuss.

4.2.7 Mikrobielle Zusammensetzung innerhalb der Selektionsversuche

Eine zusammenfassende und vergleichende Darstellung der Entwicklung der Bakteriengesellschaften aus allen drei Versuchsblöcken mit den jeweiligen beiden Parametervariationen ist in folgender Abbildung aufgeführt (Abbildung 21). Es handelt sich dabei um eine nicht-metrische multidimensionale

Skalierung (NMDS), ein statistisches Auswertungsverfahren, welche die Unterschiede in der Zusammensetzung (basierend auf dem Vorhandensein und der Abundanz der einzelnen Organismen) innerhalb der einzelnen Reaktoren (Punkte) zeigt. 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 erkennbar, dass das Inokulum zu Beginn aller Versuche eine ähnliche Zusammensetzung aufwies, da die Punkte sehr nah beieinander liegen. Dies zeigt, dass der für alle Versuche als Inokulum verwendete Belebtschlamm von der Bauerei-Kläranlage in seiner Zusammensetzung sehr stabil und vergleichbar war. Zudem wird ersichtlich, dass sich die Bakterienkulturen über den Verlauf der Versuchsdauern veränderten, wobei sich die Gesellschaften der beiden Versuchsblöcke zum Einfluss des Schlammalters und der Zyklusdauer in eine ähnliche Richtung entwickelten (Abbildung 21). Dies ist auch in den 95%-Konfidenzintervallen erkennbar, welche als Ellipsen dargestellt sind, und die einzelnen Versuchsblöcke gruppieren, da sich die Ellipsen dieser vier Versuche überschneiden. Weiterhin steht diese Veränderung der Bakterienzusammensetzungen über die Zeit in einem signifikanten Zusammenhang mit dem PHA-Gehalt ($p < 0,05$), was durch den Pfeil und dessen Ausrichtung in der Abbildung erkennbar ist. Eine Überschneidung der Ellipsen der beiden Versuche zu den beiden unterschiedlichen Raumbelastungen mit den restlichen vier Versuchen lässt sich nur zu Beginn der Versuche mit dem Inokulum erkennen. Die Bakteriengesellschaften dieser beiden Versuche entwickelten sich sehr unterschiedlich zu denen der restlichen Selektionsversuche und ebenfalls zueinander.

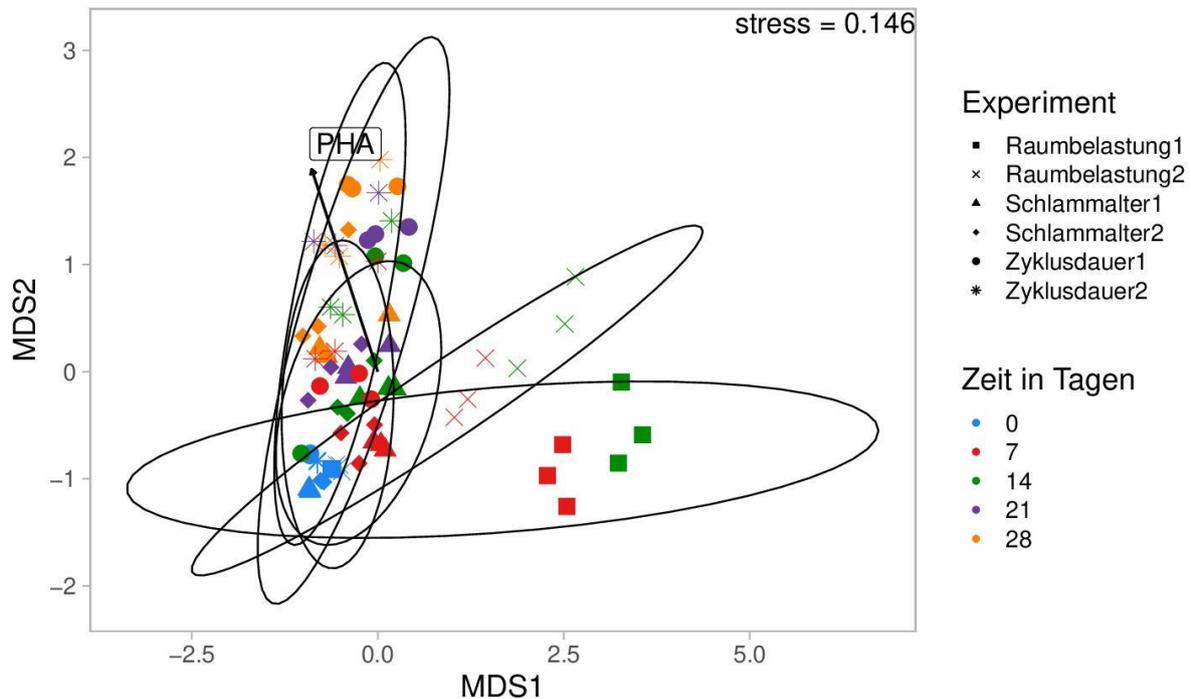


Abbildung 21: Nicht-metrische multidimensionale Skalierung der Bakterienzusammensetzung innerhalb der Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern. Punkte stellen Proben aus den drei Reaktoren zum Probenahmezeitpunkt dar. Ellipsen zeigen 95%-Konfidenzintervalle an. Der Parameter (PHA-Gehalt) mit einem signifikanten Zusammenhang zu dem Muster ($p < 0,05$) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die insgesamt wichtigsten Organismen mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion in den Selektionsversuchen waren *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Comamonas* bzw. Vertreter der Comamonadaceae und die Gattung *Flavobacterium*. Die Gattung *Pseudomonas* umfasst gram-negative, stäbchenförmige ($0,5-1,0\mu\text{m} \times 1,5-5,0\mu\text{m}$), motile, strikt aerobe, chemoorganotrophe Organismen, die teilweise auch Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen können. Zudem ist bekannt, dass sie anstelle von PHB präferiert PHA-Monomere mit höherer Anzahl an C-Atomen (> 4) bzw. mcl-PHA (engl. „medium-chain-length“) produzieren (Dueholm et al. 2023; Koller et al. 2017). *Acinetobacter* umfasst 73 Arten, wobei die Organismen stäbchenförmig ($0,9-1,6 \times 1,5-2,5 \mu\text{m}$) sind, paarweise vorkommen, nicht-motil, strikt aerob, gram-negativ und mesophil sind. Sie bilden mucoide Kapseln aus und wachsen bevorzugt auf definierten C-Quellen wie beispielsweise Acetat (Whitman 2015). Eine konstante Substratzusammensetzung könnte daher für sie von Vorteil sein. Sie werden mit hohen PHA-Ausbeuten in Verbindung gebracht (Liu et al. 2013) und wurden als PHA-Produzent vorgeschlagen (Clagnan und Adani 2023). *Paracoccus* ist eine Gattung gram-negativer, sphärischer oder stäbchenförmiger ($0,5-0,9 \times 1,1-1,3 \mu\text{m}$), einzeln- oder in kleinen Clustern vorkommender, aerober, chemoorgano- oder chemoautolithotropher, teilweise denitrifizierender Organismen (Dueholm et al.

2023; Whitman 2015). Die Fähigkeit zur PHA-Produktion dieser Gattung wurde oft gezeigt. Dabei konnte festgestellt werden, dass sie eine Substratpräferenz für Butyrat, Valerat und Propionat gegenüber Acetat besitzen und dass sie einen höheren Anteil an HB produzieren (Albuquerque et al. 2013; Wang et al. 2020). Die Organismen der Gattung *Comamonas* sind stäbchen- oder spirillenförmig (0,3-0,8 x 1,1-4,4 µm), kommen einzeln oder in Paaren vor, sind gram-negativ und mit Ausnahme einer Spezies motil. Die meisten sind chemoorganotroph, manche können Nitrat oder Eisen-III-Ionen als Elektronenakzeptor nutzen und die wenigsten besitzen die Fähigkeit zu Denitrifikation. Sie wachsen vornehmlich auf organischen Säuren und Aminosäuren und weniger auf Zuckerhaltigen Substratquellen (Whitman 2015; Dueholm et al. 2023). Zudem wurde ihre Fähigkeit zur PHA-Produktion mehrfach gezeigt (Fra-Vázquez et al. 2019; Dionisi et al. 2006), wobei die Spezies *Comamonas acidovorans* unter Verwendung von 1,4-Butandiol oder 4-Hydroxybuttersäure als Substrat Copolymere aus 3HB und 4HB herstellte (Saito und Doi 1994). *Flavobacterium* wird oft in PHA-Systemen und in Zusammenhang mit einer PHA-Produktion gefunden, aber wird oftmals in der Literatur nicht als potenzieller PHA-Produzent angesehen (Clagnan und Adani 2023; Wang et al. 2017), da die Fähigkeit erst einmal gezeigt wurde (Steinbüchel 1991; Tezuka 1969). Sie kommen als einzelne Stäbchen (0,3-0,5 x 2-5 µm), manchmal filamentös (10-40 µm), non-motil bzw. gleitend vor und die meisten Vertreter sind obligat aerob, eine Spezies besitzt die Fähigkeit zur Denitrifikation. Die optimale Wachstumstemperatur liegt in einem Bereich zwischen 20-30 °C (bzw. 15-20 °C) und sie weisen eine stark proteolytisch Tätigkeit auf (Whitman 2015).

Die Entwicklung der relativen Abundanz einzelner Organismen mit der Entwicklung der PHA-Zusammensetzung in Verbindung zu bringen ist schwierig, da die Interaktionen der Organismen untereinander und deren Anpassungen an Substratverhältnisse ebenfalls eine Rolle spielen (Wang et al. 2020). Auch in den vorangegangenen Ergebnissen lässt sich hierbei kein klares Bild erkennen. Jedoch scheint eine metabolische Anpassung der Organismen an das Substrat stattzufinden, da sich die PHA-Zusammensetzung zu Beginn jedes Versuches ähnelt und jeweils über die Versuchsdauer hinaus verändert. Auch die Raumbelastung scheint dabei eine Rolle zu spielen, da die PHA-Zusammensetzung in den Versuchen mit niedriger Raumbelastung (0,46 gCSB_{VFA}/(L*d); Schlammalter 2 und 4 d) und hoher Raumbelastung (6 und 10 g/(L*d)) stärker von der Substratzusammensetzung abwich als die des PHAs aus den Versuchen zum Einfluss der Zyklusdauer.

4.3 Langzeitversuch

Auf Grundlage der in Arbeitsschritt 1 (Kapitel 4.2) ermittelten Selektionsparameter wurde eine Langzeit-Selektionsphase mit wöchentlichen bzw. monatlichen Akkumulationen durchgeführt, um die Stabilität der PHA-Produktion sowie der Biozönose zu untersuchen.

Während der ersten Wochen des Langzeitversuches war ebenfalls ein Absinken des organischen Feststoffgehaltes von zu Beginn $2,6 (\pm 0,1) \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$ auf einen Wert von $1 (\pm 0,0) \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$ an Tag 12 zu verzeichnen (Abbildung 22). Bis Tag 14 stieg der Gehalt an organischem Feststoff leicht auf einen Wert von $1,1 (\pm 0,4) \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$ an und sank danach weiter, bis er an Tag 22 einen Wert von $0,7 (\pm 0,3) \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$ erreichte. Jedoch kam es zu einem erneuten Anstieg an Tag 42, an dem der organische Feststoffgehalt bei $1,6 (\pm 0,5) \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$ lag. Danach sank dieser jedoch bis zu Tag 91 kontinuierlich ab, wobei zu diesem Zeitpunkt kein messbarer Wert ermittelt werden konnte. Vor der Probenahme an Tag 35 gab es einen Stromausfall, der zu einem Stillstand der Anlage für ca. 1-2 Tage führte. Dieser hatte augenscheinlich keinen negativen Einfluss auf den Feststoffgehalt, da der Gehalt an oTS von Tag 35 zu Tag 42 sogar anstieg und danach wieder einen Wert in einem ähnlichen Bereich annahm, wie in den Wochen zuvor. (Tag 49 $0,8 \pm 0,2 \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$). Von Tag 63 bis 91 wurde eine Umstellung des Substrates auf den zweiten Batch vorgenommen (Kapitel 4.1), wobei eine nur noch etwa halb so hohe Raumbelastung in den Selektionsreaktoren ($0,62 \text{ gCSB}_{\text{gel}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ bzw. $0,45 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L} \cdot \text{d})$) erreicht werden konnte. Dies könnte das starke Absinken des Gehaltes an organischem Feststoff in diesem Zeitraum erklären, da möglicherweise nicht ausreichend Substrat für ein gutes Biomassewachstum vorhanden war. Warum jedoch das Absinken des organischen Feststoffgehaltes schon an Tag 56 beobachtet werden konnte, ist unklar. Nach Nutzung der nächsten beiden Substratchargen, welche in Raumbelastungen von 1 bzw. $1,4 \text{ gCSB}_{\text{gel}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ resultierten, war ein erneuter Anstieg des organischen Feststoffgehaltes auf $1,6 (\pm 0,5) \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$ an Tag 147 und $2,4 (\pm 0,4) \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$ an Tag 175 festzustellen. Drei Wochen vor der Probenahme an Tag 175 führte ein Systemabsturz zu einem Stillstand der Versuchsanlage für etwa 2 Wochen, jedoch konnte ein Anstieg im Gehalt an organischem Feststoff von Tag 147 bis zu Tag 175 beobachtet werden. Dies weist auf eine gewisse Stabilität und Resilienz des Systems hin, da sich die Biomasse regenerieren und weiter wachsen konnte. Nach der gleichen Betriebsstörung vor der Probenahme an Tag 266 konnte dies allerdings nicht beobachtet werden. Mögliche Gründe hierfür könnten zum einen sein, dass der Systemausfall unmittelbar vor der Probenahme stattfand und nicht, wie in dem zuvor beschriebenen Fall, eine Woche zur Regeneration der Biomasse dazwischen lagen. Zum anderen könnte dies auch darauf hinweisen, dass mehrere größere Störungen des Systems hintereinander dieses zum Kollabieren bringen könnten. Allerdings wurde auch vor dem zweiten

Systemabsturz bereits ein kontinuierliches Absinken des Gehaltes an organischem Feststoff von Tag 147 bis auf einen Wert von $0,6 (\pm 0,8)$ goTS/L an Tag 238 verzeichnet (Abbildung 22).

Aufzeichnungen in der Literatur über einen Verlauf des Feststoffgehaltes während der Selektionsphase sind kaum auffindbar. Lediglich (Chen et al. 2017), welche fermentiertes Zuckerrohrabwasser als Substrat und ein Schlammalter von 5 bzw. 10 Tagen verwendeten, beschrieben ebenfalls eine Abnahme des Feststoffgehaltes während der Selektion in ihrer Studie, welcher allerdings nach 70 Tagen wieder auf seinen ursprünglichen Wert anstieg und danach stabil blieb. Dies konnte in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Es konnten zwar zwischenzeitliche Anstiege des Feststoffgehaltes beobachtet werden, allerdings blieb dieser nicht auf einem stabilen Wert. Die Schwankungen in der Substratzusammensetzung bzw. in der Raumbelastung sowie die Betriebsstörungen könnten allerdings mögliche Gründe hierfür sein. Dennoch lassen sich aus den aufgetretenen Betriebsstörungen wichtige Erkenntnisse bezüglich der Robustheit des Systems gewinnen, auf die im Folgenden in Zusammenhang mit der PHA-Produktion eingegangen wird.

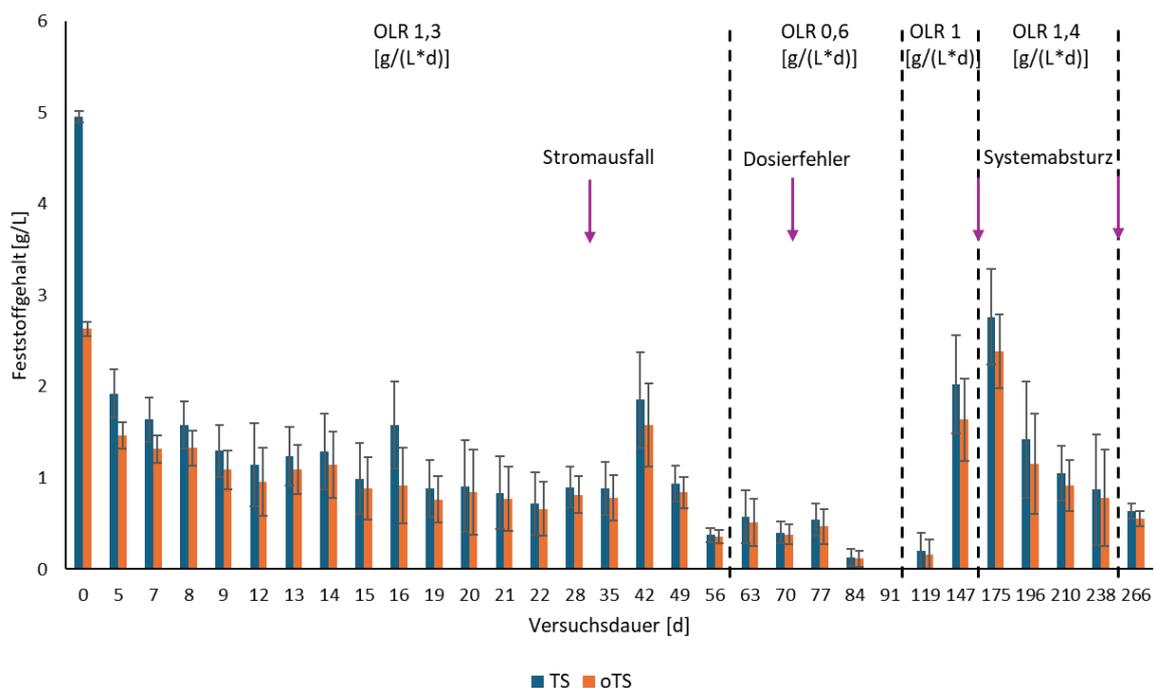


Abbildung 22: Feststoffgehalt und organischer Feststoffgehalt in der Selektion während des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Bei Betrachtung des PHA-Gehaltes über den Langzeitversuch, zeigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen den Substratwechseln und der PHA-Produktion (Abbildung 23). Zunächst erfolgte eine

Zunahme von $8,1 (\pm 0,9)$ %PHA/oTS zu Beginn des Versuches auf $24,8 (\pm 2,1)$ %PHA/oTS an Tag 7, wo sich der Gehalt bis Tag 22 in etwa einpendelte bzw. nur sehr leicht anstieg. Nach Tag 22 war ein starker Anstieg zu verzeichnen, der in einem PHA-Gehalt von $48,3 (\pm 8,1)$ %PHA/oTS an Tag 56 resultierte. Wie zuvor schon für den Feststoffgehalt beobachtet, hatte der kurzzeitige Stromausfall vor der Probenahme an Tag 35 hierbei keinen großen Einfluss auf die Produktivität des Systems. Nach dem Substratwechsel vor Tag 63 mit einer etwa nur noch halb so hohen Raumbelastung von $0,6$ statt $1,3$ $\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ war ein Abfall des produzierten PHA-Gehaltes auf $23,1 (\pm 12,3)$ %PHA/oTS zu beobachten. Nach einem Dosierfehler vor der Probenahme an Tag 77 (keine Substratdosierung im Zyklus vor der Probenahme) wurde ein geringerer PHA-Gehalt von $13,9 (6,3)$ %PHA/oTS produziert. Dieser erholte sich jedoch danach wieder und stieg auf einen Wert von $35,4 (\pm 5,1)$ %PHA/oTS an Tag 84 bzw. $31,0 (\pm 10,0)$ %PHA/oTS an Tag 91. Bei dem nächsten Substratwechsel zeigte sich trotz höherer Raumbelastung von 1 $\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ eine leichte Abnahme auf einen Wert von $25,5 (\pm 9,0)$ %PHA/oTS. Nach dem oben bereits erwähnten zweiwöchigen Systemabsturz zwischen Tag 147 und Tag 175 konnte nur noch ein PHA-Gehalt von $6,7 (\pm 3,4)$ %PHA/oTS gemessen werden. Jedoch zeigte sich auch hier die Regeneration des Systems, da an Tag 210 erneut ein Wert von $27,3 (\pm 19,8)$ %PHA/oTS erzielt werden konnte. Danach jedoch, und insbesondere nach dem nächsten zweiwöchigen Systemabsturz, sank der PHA-Gehalt wieder ab und lag bei der letzten Probenahme an Tag 266 bei $6,1 (\pm 4,9)$ %PHA/oTS.

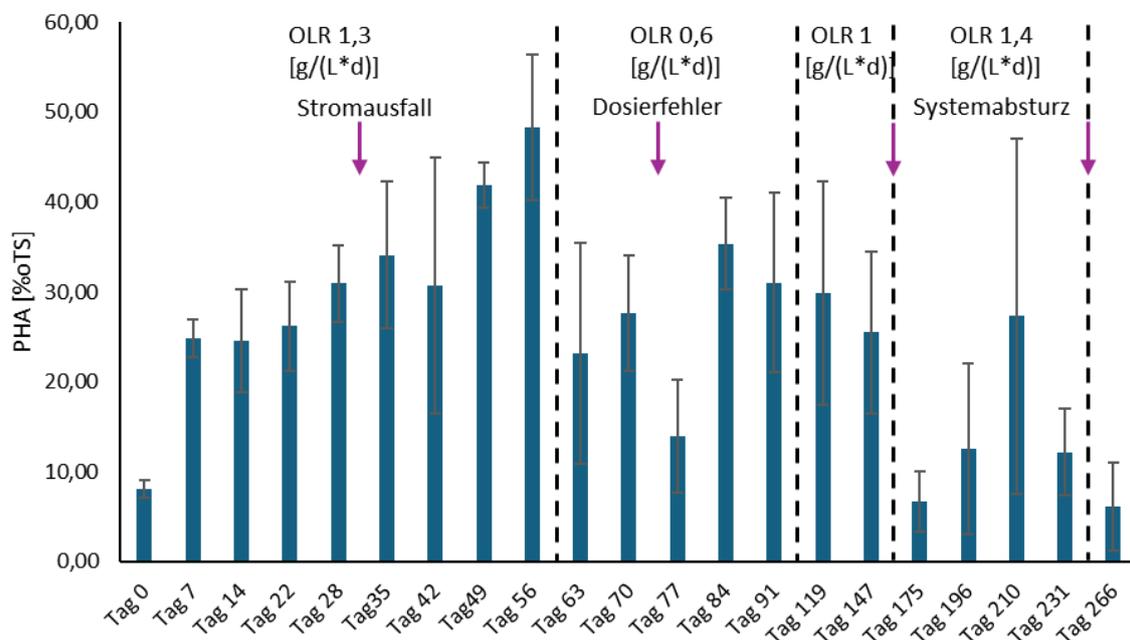


Abbildung 23: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus der Selektion des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Die Zusammensetzung des produzierten PHA war zunächst, wie auch in den vorangegangenen Versuchen zumeist beobachtet, mit um die 60 % HB zu 40 % HV an Tag 0 abweichend von der Zusammensetzung, die aufgrund des verwendeten Substrates zu erwarten war (Tabelle 10). Ein möglicher Grund hierfür könnte die noch nicht erfolgte Selektion und damit auch eine fehlende Adaption der Bakterien an das Substrat sein. Über die ersten drei Wochen des Versuches näherte sich die Zusammensetzung des hergestellten PHA immer mehr der aufgrund des verwendeten Substrates zu erwartenden Zusammensetzung an und verblieb bis zu Tag 56 in diesem Bereich. Danach wird jedoch auch hier der Einfluss der Substratwechsel sichtbar. Das zweite verwendete Substrat, welches vor Tag 63 gewechselt wurde, hatte eine etwas andere Zusammensetzung von 83,8 zu 16,2 des Anteils von C_{gerade} zu C_{ungerade} im Vergleich zu dem ersten Substrat mit einem Verhältnis von 70,6 zu 29,4 (Tabelle 10). Die Zusammensetzung des PHAs blieb jedoch zunächst in einem Bereich von ca. 70 zu 30 % HB-zu-HV-Verhältnis, näherte sich jedoch über die Zeit der aufgrund des Anteils der organischen Säuren mit gerader bzw. ungerader Anzahl an C-Atomen im Substrat erwartbaren PHA-Zusammensetzung mit ca. 75 zu 25 % HB-zu-HV-Verhältnis etwas an, wich aber trotzdem deutlich von der theoretischen Zusammensetzung ab. Das dritte und vierte verwendete Substrat hatte jeweils einen Anteil von C_{gerade} zu C_{ungerade} von 70 zu 30. Die Zusammensetzung des produzierten PHA jedoch, veränderte sich nach dem Substratwechsel von der zweiten auf die dritte Charge in Richtung eines höheren HV-Anteils mit einem Verhältnis von HB zu HV von ca. 60 zu 40, welches auch nach dem nächsten Substratwechsel sowie dem ersten Systemabsturz ungefähr in diesem Bereich verblieb. Nach dem zweiten Systemabsturz veränderte sich die PHA-Zusammensetzung stark und lag am letzten Probenahmetag bei einem Verhältnis von ca. 90 zu 10 % HB zu HV, obwohl der theoretische Wert nach der Verwendung des fünften Substrates bei einem Verhältnis von etwa 64 zu 36 % HB zu HV zu erwarten gewesen wäre.

Tabelle 10: PHA-Zusammensetzung während des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Probe	HB [%PHA]	HV [%PHA]	Theoretische Zusammensetzung
Tag 0	57,8 ± 9,3	42,2 ± 9,3	70,6:29,4
Tag 7	79,2 ± 1,0	20,8 ± 1,0	
Tag 14	74,1 ± 1,5	25,9 ± 1,5	
Tag 22	70,8 ± 5,3	29,2 ± 5,3	
Tag 28	72,7 ± 1,9	27,3 ± 1,9	
Tag 35	72,0 ± 1,6	28,0 ± 1,6	
Tag 42	70,8 ± 2,6	29,2 ± 2,6	
Tag 49	69,8 ± 1,7	30,2 ± 1,7	
Tag 56	68,27 ± 4,19	31,73 ± 4,19	
Tag 63	69,79 ± 5,36	30,21 ± 5,36	83,8:16,2
Tag 70	76,12 ± 1,28	23,88 ± 1,28	
Tag 77	76,51 ± 2,60	23,49 ± 2,60	
Tag 84	75,14 ± 1,32	24,86 ± 1,32	
Tag 91	75,17 ± 3,03	24,83 ± 3,03	
Tag 119	61,52 ± 3,23	38,48 ± 3,23	70,0:30,0
Tag 147	58,27 ± 1,31	41,73 ± 1,31	
Tag 175	62,02 ± 1,43	37,98 ± 1,43	70,0:30,0
Tag 196	56,92 ± 0,34	43,08 ± 0,34	
Tag 210	60,77 ± 9,38	39,23 ± 9,38	
Tag 231	64,00 ± 4,43	36,00 ± 4,43	
Tag 266	90,36 ± 13,64	9,64 ± 13,64	64,1:35,9

Über den Verlauf des Langzeitversuches wurden nicht nur Proben zur Analyse der Bakterienzusammensetzung am Ende der famine-Phase bzw. zum Start der Akkumulation genommen, sondern auch am Ende der Akkumulationen. Es zeigte sich, dass in den meisten Fällen keine nennenswerte Veränderung der Bakterienzusammensetzung während der Akkumulationsphase zu erkennen war (Abbildung 24). Die relativen Abundanzen einzelner Organismen verschoben sich nur leicht. Allerdings wurden während der ersten Akkumulation am ersten Tag der Selektionsphase und nach Substratwechseln oder Störfällen ausgeprägtere Veränderungen beobachtet. So wies zum Beispiel die Gattung *Acinetobacter* jeweils eine Steigerung der relativen Abundanz an Tag 0 (von 0 auf 25,4 %), an Tag 70 (von 4,1 auf 24%), an Tag 84 (von 4,6 auf 23,2 %) und an Tag 91 (von 4,1 auf 43,7 %) während der 24-stündigen Akkumulationsphase auf. Im Inokulum an Tag 0 zu Beginn der Akkumulation war keine messbare Abundanz von *Acinetobacter* feststellbar, was entweder durch ein Einbringen dieses Organismus durch das Substrat oder durch unter einem Messwert liegenden Bereich des Vorkommens dieses Bakteriums erklärt werden könnte. Insgesamt konnte während der Selektion über

mehrere Monate eine stetige Veränderung in der mikrobiellen Zusammensetzung beobachtet werden (Abbildung 24). An Tag 0 zählten zu den abundantesten Organismen im Inokulum zu Beginn der Akkumulation (Ende famine-Phase der Selektion) unter anderem nicht näher bestimmte Vertreter der Gruppen Sphingobacteriales (14,5 %), SJA-28 (5 %), Pirellulaceae (4,8 %), *Streptococcus* (7,2 %) und *Caldilinea* (5,2 %), worunter kein Taxon Organismen mit der Fähigkeit zu PHA-Produktion enthält. Bereits nach einer Woche der Selektion nahmen die Gattungen *Zoogloea* (23,9 %), *Hydrogenophaga* (5,5 %) und nicht weiter bestimmbar Organismen der Familie Comamonadaceae (6,4 %) in ihrer relativen Abundanz zu, wohingegen die zuvor abundanten Taxa aus dem Inokulum immer weiter abnahmen. An Tag 14 konnten *Thiotrix* (6,2 %) und *Rhodobacter* (2,7 %) eine Zunahme sowie die Familie der Comamonadaceae (10,7 %) eine weitere Steigerung der Abundanz verzeichnen, darunter alle potenziellen PHA-Produzenten. Auch Nicht-PHA-Produzenten wie die Gruppen BD7-3 (5,5 %) und die Familie Verrucomicrobiaceae (4,1 %) wurden etwas häufiger. Die beiden letztgenannten (6,4 und 5,4 %) sowie ein weiterer nicht-PHA-Produzent, C39 (9,5 %), gehörten an Tag 22 unter anderem zu den häufigsten Organismen. Die prominentesten PHA-Produzenten zu diesem Zeitpunkt waren unter anderem weiterhin die Familie der Comamonadaceae (14 %) und die Gattung *Acinetobacter* (5,3 %). Ab Tag 28 konnte zudem die Gattung *Thiotrix* (16,1 %) und ab Tag 35 die Gattungen *Azospirillum* (2,7 %) und *Flavobacterium* (6,1 %) sowie die nicht zur PHA-Produktion befähigten Organismen der Gattung *Planctomyces* (5,8 %) an Abundanz gewinnen. Diese blieben unter den häufigsten Organismen bis zu Tag 49, an welchem *Rhodobacter* (2,3 %) und *Paracoccus* (6,5 %) ebenfalls an Häufigkeit gewannen, wobei beispielsweise *Flavobacterium* ein wenig an Häufigkeit verlor (3,6 %). Nicht-PHA-produzierende Organismen wie die Familie der Verrucomicrobiaceae (0,5 % an Tag 49), die Gattung *Planctomyces* (2,5 % an Tag 49) und C39 (1 % an Tag 49) wurden immer mehr verdrängt. Die Familie der potenziellen PHA-Produzenten Rhodocyclaceae (9,2 % an Tag 63) und die Gattung *Comamonas* (8,2 % an Tag 70) konnten insbesondere nach dem ersten Substratwechsel vor Tag 63 immer mehr an Einfluss gewinnen. Diese nahmen bis zu Tag 91 in ihrer relativen Abundanz wieder ab (4,2 und 1,5 %), bleiben aber neben *Acinetobacter* (4,1 %), *Planctomyces* (7,8 %), *Thiotrix* (6,5 %) sowie den Familien Comamonadaceae (4,1 %) und Rhodocyclaceae (4,2 %) unter den häufigsten Organismen über die Selektionsphase mit Verwendung dieses Substrates. Nach dem nächsten Substratwechsel vor Tag 119 veränderte sich die Bakterienzusammensetzung in der Selektionsphase. Nun konnte C39 (17,3 %) eine starke Zunahme verzeichnen. Daneben waren die Gattungen *Planctomyces* (2,9 %) und *Flavobacterium* (5,3 %) sowie nicht näher bestimmte Chitinophagaceae (3,1 %) und Rhodocyclaceae (5,8 %) unter den abundantesten Organismen. Zudem konnte hier eine starke Veränderung in der Zusammensetzung während der Akkumulationsphase festgestellt werden, da die Gattungen *Acinetobacter* (von 0,3 auf

46,7 %) und *Pseudomonas* (von 0,08 auf 15 %) stark in ihrer relativen Abundanz zunahmen. An Tag 147 konnte diese Veränderung während der Akkumulationsphase nicht festgestellt werden, allerdings unterschied sich die Zusammensetzung zum Ende der famine-Phase in der Selektion im Vergleich zu Tag 119. An Tag 147 waren die Familien der Rhodocyclaceae (20,9 %) und Crymorphaceae (6,9 %) am abundantesten und andere Organismen wie beispielsweise C39 (0,002 %) und *Planctomyces* (2,3 %) wurden seltener. Nach dem nächsten Substratwechsel sowie dem Systemabsturz zwischen Tag 147 und Tag 175 konnte erneut eine starke Veränderung der Bakterienzusammensetzung in der Selektion, aber nicht während der Akkumulation, festgestellt werden. Die Familie der Rhodocyclaceae (10,4 %) zählte zwar mitunter immer noch zu den abundantesten Taxa, nahm allerdings in der Häufigkeit im Vergleich zu Tag 147 ab. Die häufigsten Organismen zu diesem Zeitpunkt waren unter anderem *Acinetobacter* (10,5 %), *Arcobacter* (14,1 %), *Comamonas* (5,5 %) und *Pseudomonas* (2,5 %) (Abbildung 24).

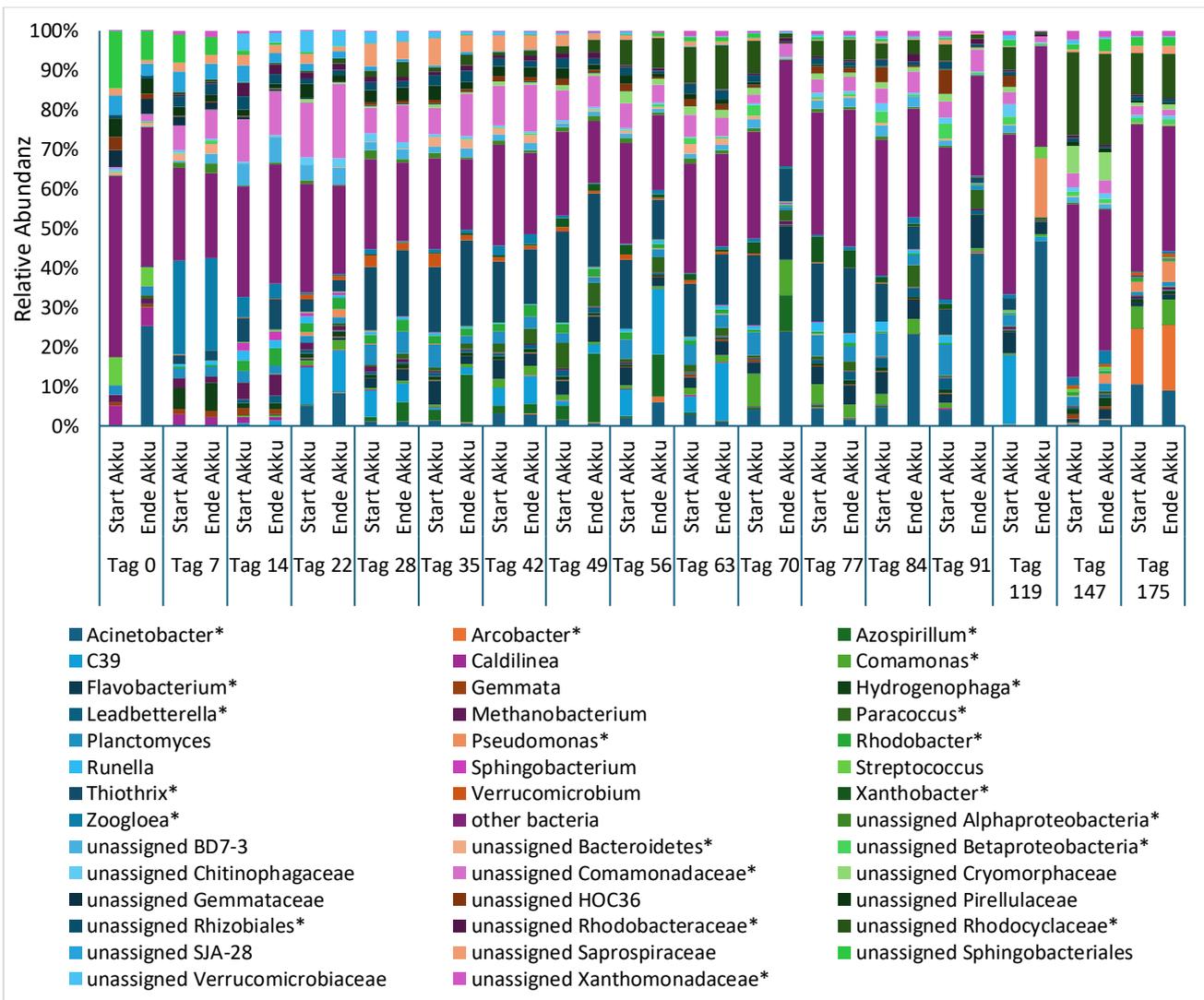


Abbildung 24: Mikrobielle Zusammensetzung innerhalb des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.

Auch bei Betrachtung der zusammengefassten relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten während des Langzeitversuches wird deutlich, dass es während der Akkumulationsphase in der Regel keine oder nur eine leichte Veränderung innerhalb der Bakterienzusammensetzung in Form einer Zunahme vom Start bis zum Ende der Akkumulation gab (Abbildung 25). Nur zu Beginn des Versuches bei der ersten Akkumulation unter Verwendung des Inokulums (von $9,7 \pm 0,45\%$ auf $36,8 \pm 13\%$) und teilweise nach den Substratwechslern oder Betriebsstörungen (z.B. von $39,1 \pm 13,5$ auf $73,3 \pm 4,3\%$ an Tag 119) war diese Beobachtung ausgeprägter. Eine starke Zunahme in der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten war zudem nach der ersten Woche der Selektion zu erkennen (von $9,7 \pm 0,45\%$ an Tag 0 auf $52,5 \pm 4,6\%$ an Tag 7). Diese nahm bis zu Tag 49 weiter leicht zu ($69 \pm 10,8\%$), lag

dann an Tag 56 ($55,7 \pm 4 \%$) und 63 ($58,8 \pm 5,5 \%$) auf einem niedrigeren Wert und nahm daraufhin wieder leicht zu ($69 \pm 5,6 \%$ an Tag 70). Bis an Tag 119 sank die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten dann jedoch ab ($39,1 \pm 13,5 \%$) und stieg bis Tag 175 ($62,3 \pm 6,5 \%$) erneut an. Dieser Verlauf der potenziellen PHA-Produzenten stimmt nicht gänzlich mit dem Verlauf der PHA-Produktion überein, welche bis Tag 56 zunahm, danach erst absank und an Tag 77 eine erneute Abnahme zeigte (Abbildung 23). Der PHA-Gehalt sank jedoch ebenso wie die Abundanz potenzieller PHA-Produzenten von Tag 84 bis Tag 119 ab, allerdings sank die PHA-Produktion trotz der Zunahme potenzieller PHA-Produzenten in ihrer Abundanz von diesem Zeitpunkt bis Tag 175 weiter ab (Abbildung 23, Abbildung 25).

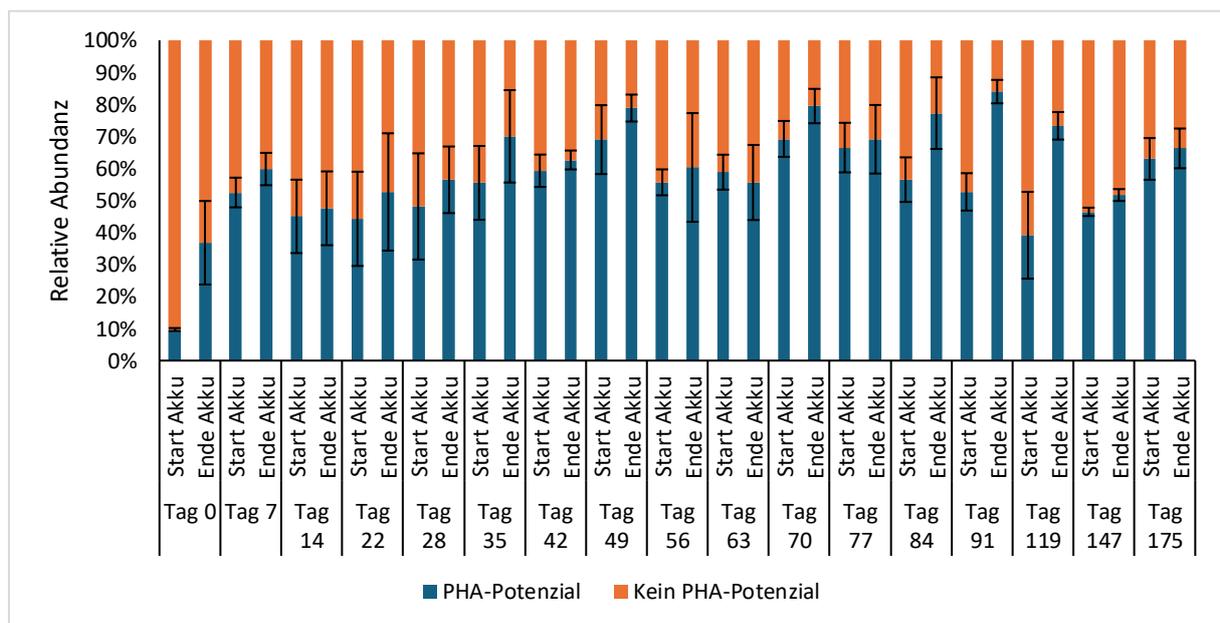


Abbildung 25: Anteil potenzieller PHA- und Nicht-PHA-Produzenten innerhalb des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

4.3.1 Zwischenfazit

Während der Langzeitselektion waren Schwankungen im Verlauf des organischen Feststoffgehaltes zu verzeichnen. Dieser steigt zwar immer wieder im Verlauf des Versuches an, aber konnte sich nicht stabilisieren. Dies scheint jedoch hauptsächlich mit Substratschwankungen und den daraus resultierenden Schwankungen in der Raumbelastung in Verbindung zu stehen. Bei Betrachtung des PHA-Gehaltes, welcher in den Akkumulationsversuchen erzielt werden konnte, über den Verlauf der Langzeitselektion, zeigte sich ebenfalls ein klarer Zusammenhang zwischen den Substratwechseln und der PHA-Produktion. Geringere Raumbelastungen resultierten auch hier in Einbrüchen in der PHA-Produktion. Nach Betriebsstörungen konnte sich das System immer wieder regenerieren mit

Ausnahme der letzten Betriebsstörung, welche auf eine vorherige Störung folgte. Die Zusammensetzung des produzierten PHA wich, wie schon bereits in den anderen Selektionsversuchen zuvor beobachtet, zu Beginn des Versuches von der theoretisch zu erwartenden Zusammensetzung ab. Auch nach den Substratwechslern wich diese jeweils von der theoretischen Zusammensetzung ab, entwickelte sich jedoch immer wieder mit einer längeren Selektionsdauer mit gleichem Substrat mehr und mehr in die Richtung des durch das Substrat theoretisch zu erwartenden PHA-Zusammensetzung. Dies zeigt, dass eine metabolische Anpassung der mikrobiellen Gemeinschaft an das Substrat eine Rolle in der Zusammensetzung des produzierten PHA spielt. Auch hierbei hatten die Betriebsstörungen teilweise einen Einfluss. Während der 24-stündigen Akkumulationsphasen konnte zumeist keine Veränderung in der Bakterienzusammensetzung festgestellt werden, allerdings war diese ebenfalls am ersten Tag der Selektionsphase und nach Substratwechslern oder Störfällen zu beobachten. Dies zeigte sich auch in der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten insgesamt. Innerhalb der monatelangen Selektionsphase konnte eine stetige Änderung in der Bakterienzusammensetzung gezeigt werden. Zudem konnte, wie auch schon in den Versuchen zuvor beobachtet, eine sehr starke Zunahme der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten nach 7 Tagen der Selektion festgestellt werden. Auch hier stimmte die relative Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten nicht immer mit dem Verlauf des tatsächlich produzierten PHAs überein. Obwohl auch hier Schwankungen in der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten über den Verlauf des Selektionsversuches zu verzeichnen waren, blieb diese nach der ersten Woche der Selektion immer bei einem Wert über 30 %.

4.4 Akkumulationsversuche

Während der ersten drei Wochen des Langzeitversuches wurden, neben den regulären wöchentlichen Akkumulationen, mit der selektierten Biomasse aus den Reaktoren zusätzliche Akkumulationsversuche zur Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Substrateigenschaften in der Phase der Biopolymeranreicherung auf die Biozönose und insbesondere die PHA-Produktion und -Zusammensetzung durchgeführt (s. Tabelle 4, Kapitel 3.3).

Mit den beiden zunächst verwendeten synthetischen Substraten bestehend aus Essig- und Propionsäure in den molaren Verhältnissen von 30 zu 70 sowie 70 zu 30 % wurden bereits in der ersten Selektionswoche mit 33,0 (\pm 2,5) %PHA/oTS (30 % Essig- und 70 % Propionsäure) und 50,8 (\pm 1,1) %PHA/oTS (70 % Essig- und 30 % Propionsäure) höhere PHA-Gehalte erzielt als bei der wöchentlichen Akkumulation mit Brauereiabwasser an Tag 7 (24,8 \pm 2,1 %PHA/oTS) (Abbildung 26). In dem Versuch mit dem höheren Essigsäureanteil wurde zudem der bislang höchste PHA-Gehalt (50,8 \pm 1,1

%PHA/oTS) innerhalb des Projektes erreicht. Eine höhere PHA-Produktion bei Verwendung synthetischer im Vergleich zu realen Substraten wurde bereits im vorangegangenen Projekt beobachtet (Steinmetz et al. 2022) und ist vermutlich auf die weniger komplexe Zusammensetzung des Substrates und die damit einhergehende einfachere Zugänglichkeit und Verstoffwechslung durch die PHA-produzierenden Bakterien zurückzuführen. Zudem sind in einem realen Substrat mit komplexer Zusammensetzung möglicherweise weitere Kohlenstoffquellen enthalten, die von nicht-PHA-Produzenten zum Wachstum genutzt werden können. Dass ein sehr viel höherer PHA-Gehalt mit dem synthetischen Substrat mit einem Essigsäureanteil von 70 % erreicht werden konnte, liegt womöglich an der ähnlichen Zusammensetzung dieses Substrates zu dem in der Selektion verwendeten realen Substrat (C_{gerade} und $C_{ungerade}$ 70,6 und 29,4 %) und der bereits erfolgten Adaption der Biozönose an ein Substrat dieser Zusammensetzung. Die Zusammensetzung des produzierten PHA im ersten Versuch mit synthetischem Substrat lag, nicht ganz wie erwartet, bei einem HB-HV-Verhältnis von ca. 20 und 80 %, was jedoch in eine ähnliche Richtung wie das Substrat mit einem Verhältnis von C_{gerade} und $C_{ungerade}$ von 30 und 70 % ging. Bei dem synthetischen Substrat mit der umgekehrten Zusammensetzung allerdings, lag das Verhältnis HB zu HV mit 55 und 45 % nicht in einem zu erwartenden Bereich (Tabelle 11).

Unter Verwendung zweier weiterer Industrieabwässer in den zusätzlichen Akkumulationsversuchen in der ersten bzw. zweiten Woche der Selektion wurden mit Fruchtsaftabwasser mit einem Wert von 16,6 ($\pm 1,3$) %PHA/oTS und einem vorversäuerten Brauereiabwasser mit einem Wert von 30,5 ($\pm 1,8$) %PHA/oTS ein niedrigerer bzw. höherer PHA-Gehalt erzielt als in den wöchentlichen Akkumulationen an Tag 7 und 14 mit Werten von 24,8 ($\pm 2,1$) %PHA/oTS und 24,6 ($\pm 5,8$) %PHA/oTS (Abbildung 26). Auch hier ist ein wahrscheinlicher Grund eine bessere bereits erfolgte Anpassung der Biozönose an das Substrat aus einem Brauerei-Reststrom in der Selektion bzw. eine noch nicht erfolgte Anpassung an einen Reststrom aus der Fruchtsaftindustrie. Dabei lagen die Zusammensetzungen des produzierten PHA in beiden Fällen in einem Bereich, der dem verwendeten Substrat ähnlich war. Der Anteil an C_{gerade} und $C_{ungerade}$ im Substrat aus Fruchtsaftabwasser lag bei 84 und 16 % und des daraus produzierten PHA ebenfalls bei ca. 84 % HB und 16 % HV. Der Anteil an C_{gerade} und $C_{ungerade}$ des vorversäuerten Brauereiabwassers lag bei 40 und 60 % und der daraus resultierende HB-HV-Anteil lag bei ca. 33 zu 67 % (Tabelle 11). Da für alle weiteren zusätzlichen Akkumulationsversuche zum Einfluss der Substratkonzentration und der Nährstoffverfügbarkeit das gleiche Substrat aus Brauereiabwasser wie in der Selektion und den wöchentlichen Akkumulationen verwendet wurde, war hier ebenfalls mit

einer PHA-Zusammensetzung von ca. 70 % HB und 30 % HV zu rechnen. Dies konnte in diesen Akkumulationsversuchen tatsächlich annähernd beobachtet werden (Tabelle 11).

In der zweiten Selektionswoche wurden neben den Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichen Industrieabwässern auch Versuche mit dem in der Selektion verwendeten Brauereiabwasser in unterschiedlicher Feed-Konzentration durchgeführt. Eine halb so hohe Konzentration von 50 mg CSB_{gel} pro Feed im Vergleich zu der in den wöchentlichen Akkumulationen verwendeten 100 mg resultierte in einem niedrigeren PHA-Gehalt von 17,2 (± 7,6) %PHA/oTS im Vergleich zu 24,6 (± 5,8) %PHA/oTS an Tag 14 (Abbildung 26). Eine doppelt so hohe Konzentration jedoch führte zu einem höheren PHA-Gehalt von 35,6 (± 6,4) %PHA/oTS, wohingegen eine noch höhere Konzentration von 300 mg CSB_{gel} mit 30,0 (± 5,6) %PHA/oTS zu keiner weiteren Steigerung des PHA-Gehaltes führte (Abbildung 26). Dass eine Erhöhung der Substratkonzentration nicht immer zu einer verbesserten Performance, oder unter Umständen durch Substratinhibierung sogar zu einer Verschlechterung führen kann, stimmt ebenfalls mit Beobachtungen aus der Literatur (vgl. Kapitel 2) und mit den Ergebnissen zu den Selektionsversuchen aus Kapitel 4.2 sowie aus dem vorherigen Projekt (Steinmetz et al. 2022) überein.

Die Zugabe von Nährstoffen zum Substrat in den Akkumulationsversuchen in der dritten Selektionswoche führte in den beiden Fällen, in denen nur Stickstoff oder nur Phosphor zugegeben wurde, mit 29,7 (± 3,6) %PHA/oTS und 29,3 (± 4,0) %PHA/oTS zu keiner merklichen Veränderung der PHA-Produktion im Vergleich zu der wöchentlichen Akkumulation mit 26,2 (± 4,9) %PHA/oTS an Tag 22, in der keine Nährstoffe im Substrat enthalten waren. Lediglich die Zugabe beider Nährstoffe resultierte mit einem Wert von 20,3 (± 6,2) %PHA/oTS in einer Verringerung des produzierten PHA-Gehaltes (Abbildung 26). Bei Vorhandensein von Nährstoffen in der Akkumulation wird ein Wachstum der Bakterien auf Kosten der PHA-Produktion durch die Substratnutzung begünstigt (Nguyenhuynh et al. 2021). Jedoch weist dieses Ergebnis darauf hin, dass ein alleiniges Vorhandensein von Stickstoff oder Phosphor nicht ausreichend für ein vermehrtes Biomassewachstum ist und womöglich keinen negativen Einfluss auf die PHA-Produktion in der Akkumulation hat.

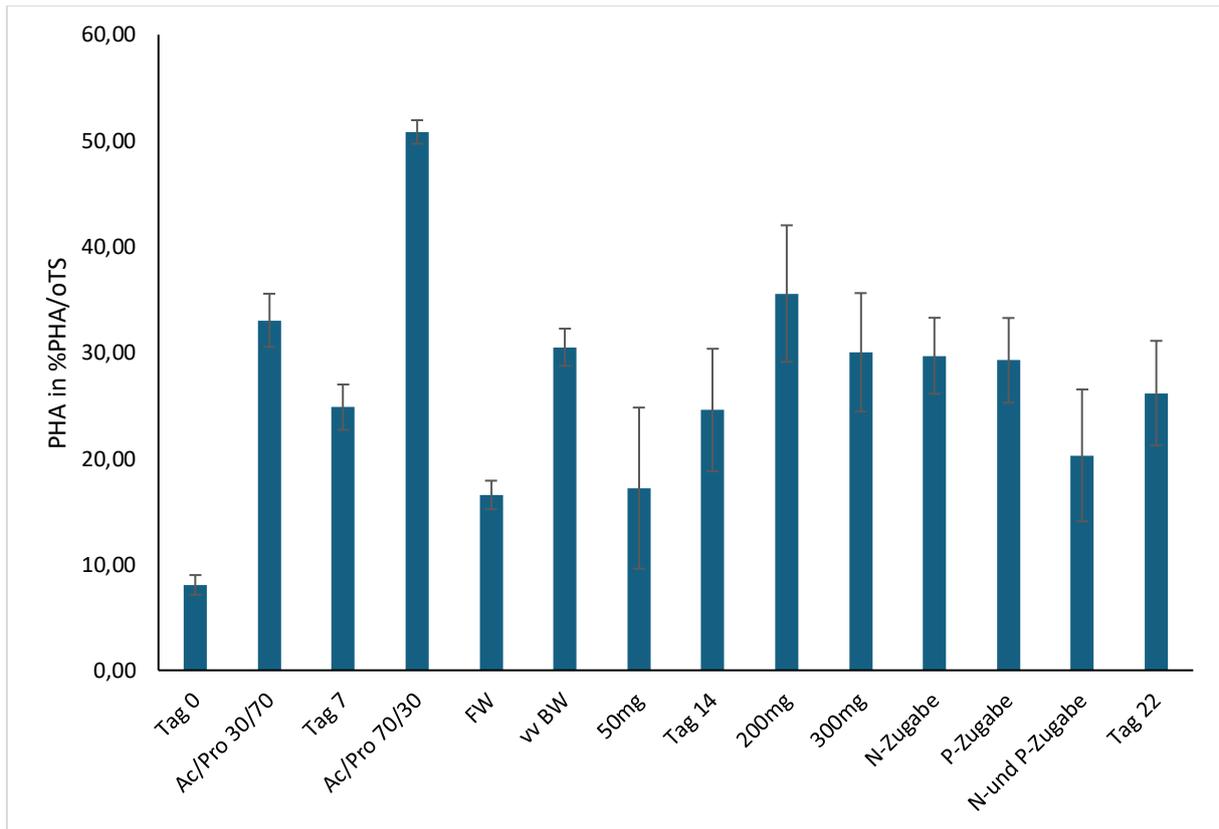


Abbildung 26: PHA-Gehalt innerhalb der Akkumulationsversuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung. Ac: Essigsäure, Pro: Propionsäure, FW: Fruchtsaftabwasser, vv Brau: vorversäuertes Brauereiabwasser.

Tabelle 11: PHA-Zusammensetzung innerhalb der Akkumulationsversuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung. Ac: Essigsäure, Pro: Propionsäure, FW: Fruchtsaftabwasser, vv Brau: vorversäuertes Brauereiabwasser.

Probe	HB [%PHA]	HV [%PHA]	Theoretische Zusammensetzung
Ac/Pro 30/70	20,3 ± 1,5	79,7 ± 1,5	30:70
Ac/Pro 70/30	55,5 ± 6,0	44,5 ± 6,0	70:30
Fruchtabwasser (FW)	83,6 ± 0,5	16,4 ± 0,5	84:16
vorversäuertes Brauabwasser (vv BW)	32,7 ± 3,8	67,3 ± 3,8	40:60
50mg	74,6 ± 1,6	25,4 ± 1,6	70,6:29,4
200mg	74,7 ± 2,4	25,3 ± 2,4	
300mg	73,3 ± 2,7	26,7 ± 2,7	
N-Zugabe	71,0 ± 4,2	29,0 ± 4,2	
P-Zugabe	70,2 ± 6,5	29,8 ± 6,5	
N-und P-Zugabe	69,4 ± 7,5	30,6 ± 7,5	

Bei Betrachtung der mikrobiellen Zusammensetzung zwischen Start und Ende jedes Akkumulationsversuches wird, wie bereits zuvor während der regulären Akkumulationsversuche des Langzeitversuches beschrieben (Abbildung 24, Kapitel 4.3), erkenntlich, dass es keine bzw. nur kaum eine Veränderung innerhalb der Zusammensetzung der Biozönose gab (Abbildung 27). Nur der Versuch mit vorversäuertem Brauereiabwasser bildete hier eine Ausnahme, wobei der Grund hierfür unklar ist. Es zeigte sich somit grundsätzlich kein Einfluss der verwendeten unterschiedlichen Substratcharakteristika in den Akkumulationsversuchen auf die Zusammensetzung der Biozönose. Die Veränderung der Zusammensetzung zwischen den Versuchen war nur in den Proben aus der Selektion zu Beginn der Akkumulation (Ende famine-Phase in der Selektion) erkennbar und folgte dem Verlauf der Veränderung der Biozönose über die Zeit in der Selektion des Langzeitversuches (s. Abbildung 24). So waren beispielsweise die abundantesten Organismen im ersten Akkumulationsversuch mit dem verwendeten synthetischen Substrat (Ac/Pro 30/70), welcher an Tag 5 des Langzeitversuches durchgeführt wurde, nicht näher bestimmte Organismen der Gruppen Sphingobacteriales (11 %), SJA-28 (6,2 %), Comamonadaceae (5,5 %) und Bacteroidetes (5,0 %) sowie die Gattung *Calidinea* (4,8 %), was mehr zu der Zusammensetzung des Inokulums des Langzeitversuches passte (vgl. Abbildung 27, Abbildung 24). Im zweiten Akkumulationsversuch jedoch (Tag 8 des Langzeitversuches), nahmen die Gruppe der Comamonadaceae (8,5 %) und die Gattung *Zoogloea* (21,9 %) an relativer Abundanz zu, während beispielsweise *Calidinea* (2,9 %) und die Gruppe der Sphingobacteriales (5,6 %) abnahmen (Abbildung 27), ganz so wie in der Probe des Versuchstages 7 der Langzeitselektion (Abbildung 24). Die Zusammensetzung zum dritten Akkumulationsversuch mit Fruchtsaftabwasser (Tag 9) wies eine sehr ähnliche Zusammensetzung in der Bakterienmischkultur auf (Abbildung 27). Die Akkumulationsversuche mit vorversäuertem Brauereiabwasser und den drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (Akkumulationsversuche 50, 200 und 300 mg) wurden an den Tagen 12, 13, 15 und 16 in der zweiten Woche der Selektion des Langzeitversuches durchgeführt und wiesen eine ähnliche Zusammensetzung der Biozönose auf wie die Zusammensetzung des Versuchstages 14 des Langzeitversuches (Abbildung 24, Abbildung 27). Es konnte, ebenso wie an Tag 14, eine Zunahme der Gattungen *Thiotrix* (von 1 auf 5,5 %) und *Rhodobacter* (von 0,05 auf 2,4 zur sechsten Akkumulation und dann auf 1,3 %) und der nicht-PHA-Produzenten BD7-3 (von 0,03 auf 9,3 %) und Vertreter der Verrucomicrobiaceae (von 0,002 auf 6,8 %) von der ersten bis zur siebten Akkumulation (300 mg) verzeichnet werden. Zudem konnte eine Steigerung der relativen Abundanz der Gattungen *Acinetobacter* (auf 3,6 % bei der letzten Akkumulation) und C39 (12,3 % bei der letzten Akkumulation) über die Versuche zur Nährstoffzugabe in der Akkumulation beobachtet werden, welche an den Tagen 19, 20 und 21 in der dritten Woche des Langzeitversuches durchgeführt wurden (Abbildung 27). Diese

Zusammensetzung ist ebenfalls sehr ähnlich zu der des Probenahmetages 22 während des Langzeitversuches (Abbildung 24).

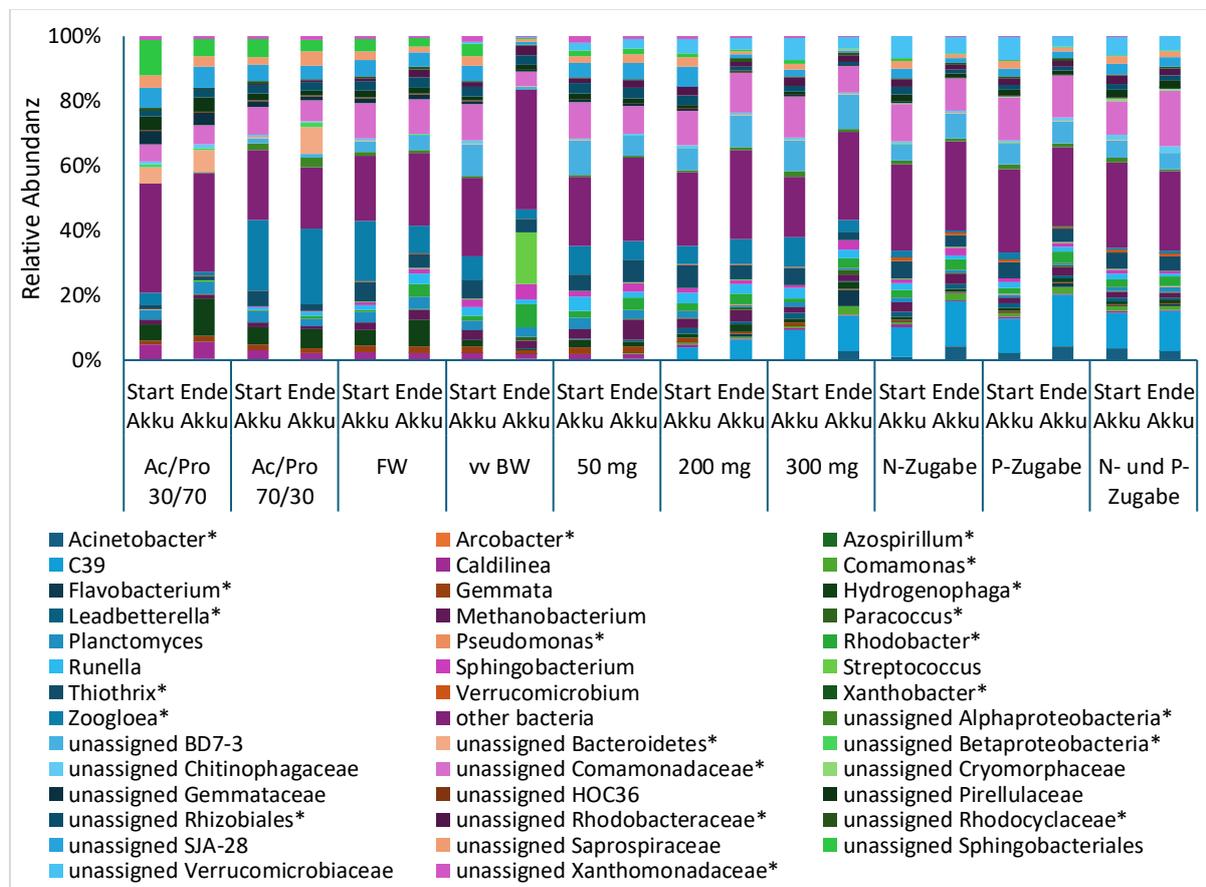


Abbildung 27: Mikrobielle Zusammensetzung innerhalb der Akkumulationsversuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren. Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion sind mit einem Stern markiert.

In der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten insgesamt zeigte sich ebenfalls, wie schon im Langzeitversuch (Kapitel 4.3), und wie in Abbildung 27 ersichtlich, dass es zwischen Beginn und Ende der Akkumulationsphase keinen oder nur einen sehr geringen Unterschied in der Mikroorganismenzusammensetzung gab (Abbildung 28). Lediglich in den ersten beiden Akkumulationsversuchen mit synthetischem Substrat (Ac/Pro 30/70, Ac/Pro 70/30), welche in der ersten Woche der Selektion des Langzeitversuches durchgeführt wurden, konnte eine leichte Zunahme der relativen Abundanz an potenziellen PHA-Produzenten von 33,7 ($\pm 3,2$) % auf 40,7 ($\pm 3,3$) % und von 54,6 ($\pm 7,6$) % auf 62,5 ($\pm 7,1$) % während der Akkumulation festgestellt werden. Dies stimmt ebenfalls gut mit den Ergebnissen zum Langzeitversuch selbst überein, indem eine starke Zunahme in der

relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten während der 24-stündigen Akkumulationsphase hauptsächlich am Anfang der Selektion in der ersten Woche beobachtet wurde (Abbildung 25). In allen Versuchen konnte eine relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten von über 30 % im System gehalten werden.

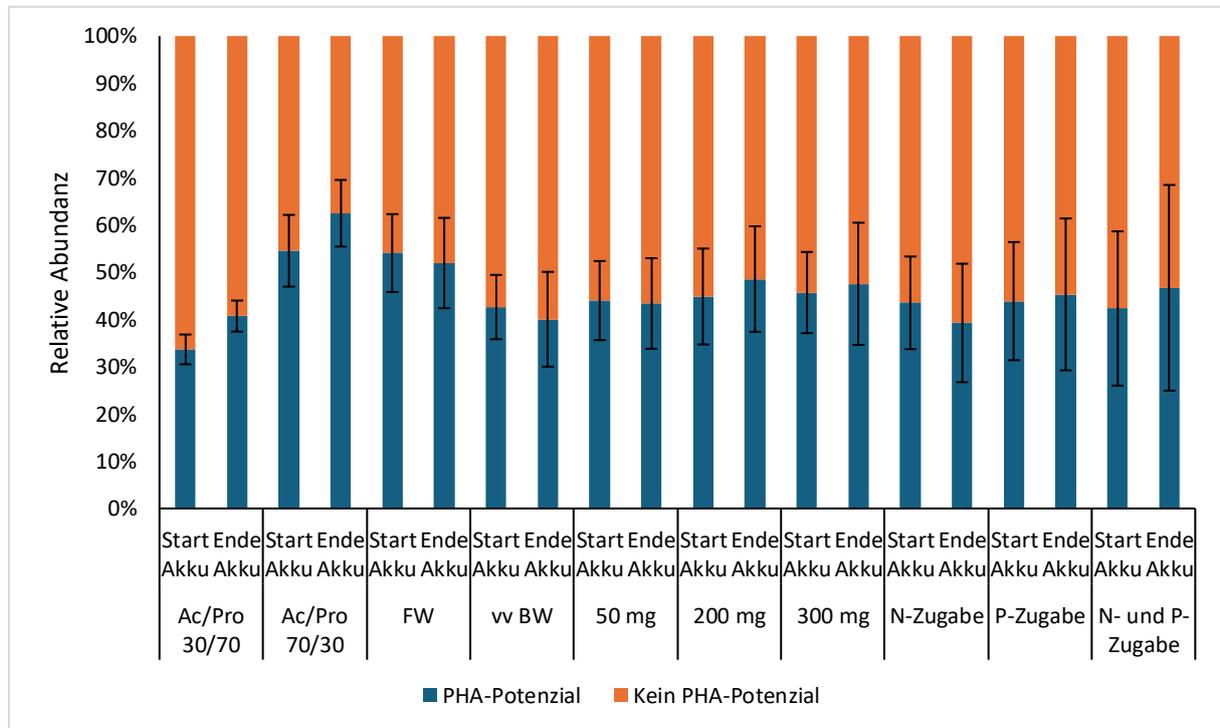


Abbildung 28: Anteil potenzieller PHA- und Nicht-PHA-Produzenten innerhalb der Versuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

4.4.1 Zwischenfazit

In den zusätzlichen Akkumulationsversuchen zum Einfluss des Substrates während der Akkumulation auf die Bakterienzusammensetzung und PHA-Produktion zeigte sich zum Einen, dass mit synthetischem Substrat höhere PHA-Gehalte erzielt werden konnten, als mit den verwendeten Industrieabwässern, zum Anderen konnten höhere PHA-Gehalte mit Substraten erzielt werden, welche ähnlich zu dem Substrat waren, welches zur Selektion der verwendeten Biomasse verwendet wurde. In diesem Fall tendierte auch die PHA-Zusammensetzung eher in Richtung der theoretisch zu erwartenden Zusammensetzung, was für eine nötige Adaption der Biomasse an das Substrat spricht. Eine Erhöhung der Substratkonzentration führte zudem nur zu einem gewissen Grad zu einer Erhöhung der PHA-Produktion, wobei eine noch weitere Erhöhung keinen Einfluss mehr hatte. Die alleinige Zugabe von Stickstoff oder Phosphor in der Akkumulation hatte keinen Einfluss auf den produzierten

PHA-Gehalt, wobei die Zugabe beider zu einer Verschlechterung der PHA-Produktionsperformance führte, sodass vermutlich beide Nährstoffe in Kombination für ein bevorzugtes Wachstum der Biomasse benötigt werden. Weder die Änderung der Substratkonzentration noch die Zugabe von Nährstoffen hatte einen Einfluss auf die Zusammensetzung des produzierten PHAs. Die mikrobielle Zusammensetzung zeigte, wie auch schon für den Langzeitversuch beobachtet, während der 24-stündigen Akkumulationsphasen in der Regel keine Veränderung. Das in der Akkumulation verwendete Substrat hatte somit keinen Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung, diese folgte eher dem Verlauf der stetigen Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung über die Selektionszeit hinweg. Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten änderte sich, wie ebenfalls im Kapitel zum Langzeitversuch bereits erläutert (Kapitel 4.3), nur in der ersten Woche der Selektion stark und blieb danach in allen Versuchen auf einem Wert über 30 %. Diese änderte sich ebenfalls nicht während der 24 Stunden der Akkumulationsphase.

5 Zusammenfassung

Im hier beschriebenen Projekt wurden zunächst im ersten Arbeitsschritt der Einfluss der Selektionsbedingungen auf die Biozönose und deren Entwicklung über die Zeit sowie deren Einfluss auf die PHA-Produktion und -Zusammensetzung untersucht werden. Zudem sollte anhand der Ergebnisse eine Auswahl geeigneter Selektionsparameter für eine gute PHA-Produktionsperformance sowie eine Charakterisierung wichtiger PHA-Produzenten erfolgen. Die Beeinflussung der PHA-Zusammensetzung durch die Substratzusammensetzung und -konzentration und die Biozönose wurden weiterhin in Arbeitsschritt 2 detailliert betrachtet. Im dritten Arbeitsschritt wurde die Robustheit des Prozesses unter schwankenden Randbedingungen und unter Verwendung der zuvor ermittelten geeigneten Parameterkombination untersucht und daraus Empfehlungen für einen realen Betrieb abgeleitet. Im Folgenden sind die daraus gewonnen Erkenntnisse zusammengestellt.

Arbeitsschritt 1 – Selektion

Der Feststoffgehalt in den Reaktoren sank in allen Selektionsversuchen über die Versuchsdauer ab. Allerdings konnte hauptsächlich in den Versuchen mit der niedrigsten ($0,46 \text{ g}_{\text{VFA}}/(\text{L}\cdot\text{d})$) und höchsten Raumbelastung ($10 \text{ g}_{\text{VFA}}/(\text{L}\cdot\text{d})$) ein starker Biomasseverlust festgestellt werden ($< 0,5 \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$), in den restlichen Selektionsversuchen wurde ein Wert zwischen ca. 1 und $2,5 \text{ g}_{\text{OTS}}/\text{L}$ erreicht. Dies zeigte sich ebenfalls in der PHA-Produktion. In den Versuchen zum Einfluss des Schlammalters mit niedriger Raumbelastung ($0,46 \text{ g}_{\text{VFA}}/(\text{L}\cdot\text{d})$) konnte insgesamt ein sehr instabiler PHA-Verlauf festgestellt werden. Auch mit hoher Raumbelastung von 6 und $10 \text{ g}_{\text{VFA}}/(\text{L}\cdot\text{d})$ wurden nur geringe PHA-Gehalte zwischen 6 und $10 \text{ \%PHA}/\text{oTS}$ erzielt. Dies deutet darauf hin, dass es einen geeigneten Bereich an verwendeter Raumbelastung zu geben scheint, über dem und unter dem die Systemperformance schlechter ist. Im betrachteten System und unter Verwendung von realem Substrat scheint dieser bei einer Raumbelastung von $1\text{-}2 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ zu liegen, wobei Belastungen zwischen $0,46$ und 1 sowie zwischen $2,2$ und $6 \text{ g}/(\text{L}\cdot\text{d})$ nicht untersucht wurden und ggf. in Folgeuntersuchungen überprüft werden sollten. Als beste Parameterkombination stellte sich ein Schlammalter von 4 d , eine Zyklusdauer von 6 h und eine Raumbelastung von ca. $1 \text{ g}_{\text{VFA}}/(\text{L}\cdot\text{d})$ heraus, mit welcher ein maximaler mittlerer PHA-Gehalt von $40,8 (\pm 4,9) \text{ \%PHA}/\text{oTS}$ erzielt werden konnte. Zudem konnte beobachtet werden, dass sich die produzierte Menge an PHA nicht immer durch die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten voraussagen ließ. Jedoch zeigten die Ergebnisse, dass bereits nach 7 Tagen der Selektion hohe relative Abundanzen an potenziellen PHA-Produzenten sowie teilweise bereits maximale PHA-Gehalte erreicht werden konnten, was für eine Effektivität der Selektionsphase und eine relativ kurze nötige Selektionsdauer

spricht. Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten unterlag zwar je nach Versuch, wie der PHA-Gehalt, Schwankungen, war jedoch stabiler als dieser und blieb nach einwöchiger Selektion immer auf einem Wert über 30 %. Auch die PHA-Zusammensetzung konnte nicht in jedem Fall allein durch die Substratzusammensetzung vorhergesagt werden. Insbesondere zu Versuchsbeginn oder bei instabilem Verlauf z.B. durch Betriebsstörungen oder durch Substratwechsel sowie bei geringem PHA-Gehalt wich die PHA-Zusammensetzung von dem theoretisch durch die Substratzusammensetzung anzunehmenden Wert zum Teil deutlich ab. Dies deutet auf einen Einfluss der Mikroorganismen auf die PHA-Zusammensetzung hin. Unterschiedliche Bakterien besitzen verschiedene Substratpräferenzen, die ebenfalls von den anderen im System befindlichen Bakterien durch Konkurrenz beeinflusst werden können (Janarthanan et al. 2016; Wang et al. 2020). Auch besitzen unterschiedliche Mikroorganismen verschiedene Stoffwechselwege und Enzyme zur PHA-Herstellung, was in einer variierender Monomerherstellung unterschiedlicher Bakterien resultiert (Lu et al. 2009; Khatami et al. 2021; Koller et al. 2017; Vicente et al. 2023; Tan et al. 2014). Zwischen den ersten vier Selektionsversuchen zum Einfluss des Schlammalters und der Zyklusdauer konnte eine ähnliche Bakterienzusammensetzung durch die Selektionsphase erreicht werden. Nur in den beiden Versuchen mit höherer Raumbelastung stellte sich eine deutlich unterschiedliche Zusammensetzung in der Mischbiozönose ein. Die wichtigsten potenziellen PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen waren *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Comamonas* bzw. Vertreter der Comamonadaceae und die Gattung *Flavobacterium*. Die Raumbelastung stellte sich somit in den Selektionsversuchen sowohl als wichtigster Einflussfaktor auf die Biomasseproduktion und -Zusammensetzung als auch auf die PHA-Produktion und -Zusammensetzung heraus.

Arbeitsschritt 2 – PHA-Produktion

Während der stabilen Phase der Selektion innerhalb des Langzeitversuches wurden Akkumulationsversuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die zuvor geschehene metabolische Adaption der Biozönose an das in der Selektion verwendete Substrat, die Substratkonzentration und das Vorhandensein von Nährstoffen die PHA-Produktivität beeinflussen. Bei Substrat mit ähnlicher Zusammensetzung wie das, an welches die Bakterien in der Selektion bereits angepasst waren, konnten höhere PHA-Gehalte erzielt und voraussagbare PHA-Zusammensetzungen erzielt werden. Eine höhere Substratkonzentration führte bis zu einem gewissen Grad zu einer Steigerung des PHA-Gehaltes, aber nicht in jedem Fall. Eine Zugabe von Stickstoff oder Phosphor in der Akkumulation allein, hatte keinen Einfluss, wobei beide

Nährstoffe zu einer schlechteren PHA-Produktionsperformance führten. Die Zusammensetzung des in den Akkumulationsversuchen produzierten PHA tendierte zumeist in die Richtung des verwendeten Substrates, war jedoch auch nicht immer exakt durch dieses vorhersagbar. Es konnten zudem keine starken Abweichungen in der Bakterienzusammensetzung zwischen Kontrollen (wöchentliche Akkumulationen während des Langzeitversuches) und Akkumulationsversuchen sowie während der Akkumulationsphasen beobachtet werden. Die Zusammensetzung der Biozönose war daher mehr von der Selektionsdauer als vom verwendeten Substrat und die PHA-Zusammensetzung von der Adaption der Biozönose an das verwendete Substrat als alleine von der Substratzusammensetzung abhängig.

Arbeitsschritt 3 – Langzeitversuch

Die zuvor genannten, in den Selektionsversuchen des Arbeitsschrittes 1 ermittelten, Prozesseinstellungen wurden für einen zusammenführenden bzw. Langzeitversuch genutzt. Auch hier konnte eine Abnahme des Feststoffgehaltes beobachtet werden. Eine Stabilität, wie durch Chen et al. (2017) bei einer Langzeits Selektion beobachtet, stellte sich hierbei nicht ein. Allerdings kam es zu einigen Betriebsstörungen während der Laufzeit, die je nach Dauer einen Einfluss auf die Performance des Systems genommen haben. Zudem führten Schwankungen in der Substratkonzentration ebenfalls zu gewissen Schwankungen im System. Im Zuge des Langzeitversuches konnte eine kontinuierliche Steigerung des PHA-Gehaltes bis zu Tag 56 mit einem maximalen Wert von 48,3 (\pm 8,1) %PHA/oTS erzielt werden. Jedoch konnte ein klarer Zusammenhang zwischen einer danach niedrigeren verwendeten Raumbelastung, aufgrund einer niedrigeren VFA-Konzentration im Substrat, sowie Störfällen im Betrieb mit einer verminderten PHA-Produktion festgestellt werden. Nach den Störfällen und Substratwechseln entwickelten sich die Biozönosen und Zielparameter in den Reaktoren zunehmend anders. Dies war sowohl im Feststoffgehalt, im PHA-Gehalt und in der PHA-Zusammensetzung als auch in der mikrobiellen Zusammensetzung zu beobachten. Die PHA-Zusammensetzung benötigte außerdem zunächst eine Anpassung des Stoffwechsels der Biozönose, wie schon in den Versuchen zu den anderen beiden Arbeitsschritten beobachtet werden konnte. Nach einer Anpassung und insbesondere bei einem stabilen Betrieb war diese allerdings mehr von der Substratzusammensetzung abhängig. Eine kleinere Betriebsstörung wie ein Stromausfall von 1-2 Tagen oder ein Dosierfehler hatten keinen großen Einfluss auf das System. Außerdem zeigte das System sogar nach einem längeren Systemabsturz von 2 Wochen eine gewisse Resilienz. Sowohl der PHA-Gehalt als auch die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten veränderten sich, wie auch teilweise in Arbeitsschritt 1 beobachtet, am stärksten in den ersten 7 Tagen der Selektion. Die Zusammensetzung

der Bakterienmischkultur veränderte sich über die gesamte Selektion hinweg leicht, aber kontinuierlich. Innerhalb der 24-stündigen Akkumulationsphasen war allerdings keine große Veränderung der Bakterienzusammensetzung feststellbar. Die wichtigsten PHA-Produzenten wechselten über den Verlauf der Langzeitselektion etwas. Insgesamt zählten zu ihnen unter anderem *Hydrogenophaga*, *Zoogloea*, Vertreter der Familien Comamonadaceae und Rhodocyclaceae, *Comamonas*, *Rhodobacter*, *Thiotrix*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Paracoccus* und *Azospirillum*. Darunter einige Organismen, die ebenfalls in den Selektionsversuchen des Arbeitsschrittes 1 als wichtige bzw. abundante potenzielle PHA-Produzenten identifiziert werden konnten.

Es konnte insgesamt eine gewisse Robustheit und Resilienz des Systems festgestellt werden. Sowohl die Zusammensetzung der Biozönose als auch der produzierte PHA-Gehalt waren stark von der Substratkonzentration abhängig. Leichte Änderungen in der Biozönose konnten in den Selektionsphasen beobachtet werden, diese hatten allerdings keinen großen Einfluss auf relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten insgesamt oder die PHA-Produktion. Eine voraussagbare PHA-Zusammensetzung kann mit einer stabilen und adaptierten Biozönose erzielt werden. Aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse, dass die Substratkonzentration einer der stärksten Einflussfaktoren auf die Systemperformance ist und Schwankungen der Substratkonzentration während eines laufenden Betriebs zu Änderungen in der Biomasseproduktion und -Zusammensetzung sowie in der PHA-Produktion und -Zusammensetzung führen, sollte dies für einen realen und stabilen Betrieb berücksichtigt werden. So kann eine Vergleichmäßigung des Substrates beispielsweise durch gezielte Mischung von Substraten oder durch Lagerung in Ausgleichsbehältern erreicht werden, um produktionsbedingte Schwankungen aufzufangen.

Kaiserslautern, 26.06.24

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.; Eiroa, M.; Torres, C.; Nunes, B. R.; Reis, M. A. M. (2007): Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. In: *Journal of biotechnology* 130 (4), S. 411–421. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.011.
- 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.
- Anderson, A. J.; Dawes, E. A. (1990): Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. In: *Microbiol Rev* 54 (4), S. 450–472. DOI: 10.1128/mr.54.4.450-472.1990.
- Ben, M.; Kennes, C.; Veiga, M. 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.
- Callahan, B. J.; McMurdie, P. J.; Rosen, M. J.; Han, A. W.; Johnson, A. J. A.; Holmes, S. 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.
- Cavaillé, L.; Grousseau, E.; Pocquet, M.; Lepeuple, A.-S.; Uribelarrea, J.-L.; Hernandez-Raquet, G.; Paul, E. (2013): Polyhydroxybutyrate production by direct use of waste activated sludge in phosphorus-limited fed-batch culture. In: *Bioresource technology* 149, S. 301–309. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.09.044.
- 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.
- Clagnan, E.; Adani, F. (2023): Influence of feedstock source on the development of polyhydroxyalkanoates-producing mixed microbial cultures in continuously stirred tank reactors. In: *New biotechnology* 76, S. 90–97. DOI: 10.1016/j.nbt.2023.05.005.

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 38409-1:1987-01, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe_H); Bestimmung des Gesamttrockenrückstandes, des Filtratrockenrückstandes und des Glührückstandes_(H_1).

Dionisi, D.; Majone, M.; Vallini, G.; Di Gregorio, S.; Beccari, M. (2006): Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. In: *Biotechnology and bioengineering* 93 (1), S. 76–88. DOI: 10.1002/bit.20683.

Dueholm, M. K. D.; Andersen, K. S.; Petersen, A.-K. C.; Rudkjøbing, V.; Alves, M.; Bajón-Fernández, Y. et al. (2023): MiDAS 5: Global diversity of bacteria and archaea in anaerobic digesters.

European Bioplastics e.V. (2023): Bioplastics. Online verfügbar unter <http://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>, zuletzt geprüft am 29.05.24.

Fra-Vázquez, A.; Santorio, S.; Palmeiro-Sánchez, T.; Del Val Río, Á.; Mosquera-Corral, A. (2019): PHA accumulation of a mixed microbial culture co-exists with ammonia partial nitrification. In: *Chemical Engineering Journal* 360, S. 1255–1261. DOI: 10.1016/j.cej.2018.10.207.

Guarda, E. C.; Amorim, C. L.; Pasculli, G.; Castro, P. M.L.; Galinha, C. F.; Duque, A. F.; Reis, M. A.M. (2024): Polyhydroxyalkanoates production from a waste-derived feedstock driven by the reactor operating conditions: The role of biomass microbiome and its reactivation capacity. In: *Journal of Cleaner Production* 451, S. 141810. DOI: 10.1016/j.jclepro.2024.141810.

Hao, J.; Wang, X.; Wang, H. (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, D. P.; Labrenz, M.; Jürgens, K.; Bertilsson, S.; Waniek, J. J.; Andersson, A. 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: *Bioresour. Technol.* 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.

Koller, M.; Maršálek, L.; Sousa Dias, M. M. de; Brauneegg, G. (2017): Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. In: *New biotechnology* 37 (Pt A), S. 24–38. DOI: 10.1016/j.nbt.2016.05.001.

Kourmentza, C.; Plácido, J.; Venetsaneas, N.; Burniol-Figols, A.; Varrone, C.; Gavala, H. N.; Reis, M. A. M. (2017): Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. In: *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 4 (2). DOI: 10.3390/bioengineering4020055.

Lemos, P. C.; Serafim, L. S.; Reis, M. A. M. (2006): Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. In: *Journal of biotechnology* 122 (2), S. 226–238. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.09.006.

Liu, C.; Wang, H.; Xing, W.; Wei, L. (2013): Composition diversity and nutrition conditions for accumulation of polyhydroxyalkanoate (PHA) in a bacterial community from activated sludge. In: *Applied microbiology and biotechnology* 97 (21), S. 9377–9387. DOI: 10.1007/s00253-013-5165-6.

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.

Lu, J.; Tappel, R. C.; Nomura, C. T. (2009): Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). In: *Polymer Reviews* 49 (3), S. 226–248. DOI: 10.1080/15583720903048243.

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.; Mozejko-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.

Matos, M.; Cruz, R. A. P.; Cardoso, P.; Silva, F.; Freitas, E. B.; Carvalho, G.; Reis, M. A. M. (2021a): Combined Strategies to Boost Polyhydroxyalkanoate Production from Fruit Waste in a Three-Stage Pilot Plant. In: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 9 (24), S. 8270–8279. DOI: 10.1021/acssuschemeng.1c02432.

Matos, M.; Cruz, R. A. P.; Cardoso, P.; Silva, F.; Freitas, E. B.; Carvalho, G.; Reis, M. A. M. (2021b): Sludge retention time impacts on polyhydroxyalkanoate productivity in uncoupled storage/growth processes. In: *The Science of the total environment* 799, S. 149363. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149363.

Moralejo-Gárate, H.; Palmeiro-Sánchez, T.; Kleerebezem, R.; Mosquera-Corral, A.; Campos, J. L.; van Loosdrecht, M. C. M. (2013): Influence of the cycle length on the production of PHA and polyglucose from glycerol by bacterial enrichments in sequencing batch reactors. In: *Biotechnology and bioengineering* 110 (12), S. 3148–3155. DOI: 10.1002/bit.24991.

- Moretto, G.; Lorini, L.; Pavan, P.; Crognale, S.; Tonanzi, B.; Rossetti, S. 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.
- Morgan-Sagastume, F.; Hjort, M.; Cirne, D.; Gérardin, F.; Lacroix, S.; Gaval, G. et al. (2015): Integrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale. In: *Bioresource technology* 181, S. 78–89. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.01.046.
- Morgan-Sagastume, F.; Valentino, F.; Hjort, M.; Zanaroli, G.; Majone, M.; Werker, A. (2019): Acclimation Process for Enhancing Polyhydroxyalkanoate Accumulation in Activated-Sludge Biomass. In: *Waste Biomass Valor* 10 (4), S. 1065–1082. DOI: 10.1007/s12649-017-0122-8.
- 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. (2015): Herstellung von Biokunststoffen aus Stoffströmen einer kommunalen Kläranlage. Dissertation. München: Universität Stuttgart.
- Pittmann, T.; Steinmetz, H. (2013a): Produktion von Bioplastik auf kommunalen Kläranlagen. In: *Wasser und Abfall* (05/13), S. 37–41.
- 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; Steinmetz, Heidrun (2013b): 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.

- 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.
- Saito, Y.; Doi, Y. (1994): Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. In: *International journal of biological macromolecules* 16 (2), S. 99–104. DOI: 10.1016/0141-8130(94)90022-1.
- 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.
- Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Oliveira, R.; Reis, M. A. M. (2004): Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. In: *Biotechnology and bioengineering* 87 (2), S. 145–160. DOI: 10.1002/bit.20085.
- Smolders, G. J.; van der Meij, J.; van Loosdrecht, M. C.; Heijnen, J. J. (1994): Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. In: *Biotechnology and bioengineering* 43 (6), S. 461–470. DOI: 10.1002/bit.260430605.
- Steinbüchel, A. (1991): Polyhydroxyalkanoic acids. In: David Byrom (Hg.): *Biomaterials*. London: Palgrave Macmillan UK, S. 123–213.
- Steinmetz, H.; Uhrig, T.; Zimmer, J. (2022): 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“. Unveröffentlichter Zwischenbericht. Technische Universität Kaiserslautern. Kaiserslautern.
- STOWA (2017): PHARIO. Stepping stone to a sustainable value chain for PHA bioplastic using municipal activated sludge. Amersfoort, Niederlande.
- Tamang, P.; Banerjee, R.; Köster, S.; Nogueira, R. (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.
- Tan, G.-Y.; Chen, C.-L.; Li, L.; Ge, L.; Wang, L.; Razaad, I. et al. (2014): Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. In: *Polymers* 6 (3), S. 706–754. DOI: 10.3390/polym6030706.
- Tezuka, Y. (1969): Cation-dependent flocculation in a *Flavobacterium* species predominant in activated sludge. In: *Applied microbiology* 17 (2), S. 222–226. DOI: 10.1128/am.17.2.222-226.1969.
- Uhrig, T. (2023): Eignung von kommunalen und industriellen Abwasserströmen für die PHA-Produktion und Ansätze zum Up-Scaling des Prozesses. Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau.
- Valentino, F.; Brusca, A. A.; Beccari, M.; Nuzzo, A.; Zanolli, 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.
- Vicente, D.; Proença, D. N.; Morais, P. V. (2023): The Role of Bacterial Polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. In: *International journal of environmental research and public health* 20 (4). DOI: 10.3390/ijerph20042959.
- Villano, M.; Beccari, M.; Dionisi, D.; Lampis, S.; Miccheli, A.; Vallini, G.; Majone, M. (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, X.; Oehmen, A.; Freitas, E. B.; Carvalho, G.; Reis, M. A. M. (2017): The link of feast-phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production. In: *Water research* 112, S. 269–278. DOI: 10.1016/j.watres.2017.01.064.
- Wang, Y.; Chen, R.; Cai, J.; Liu, Z.; Zheng, Y.; Wang, H. 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.
- Whitman, W. B. (2015): *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*: Wiley.
- Wu, L.; Ning, D.; Zhang, B.; Li, Y.; Zhang, P.; Shan, X. et al. (2019): Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. In: *Nat Microbiol* 4 (7), S. 1183–1195. DOI: 10.1038/s41564-019-0426-5.