

Kurzbericht
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	II
Tabellenverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Ziel des Projekts.....	2
2 Methodik	3
2.1 Arbeitsschritt 1 - Selektionsparameter	3
2.2 Arbeitsschritt 3 - Zusammenführender bzw. Langzeitversuch.....	4
2.3 Arbeitsschritt 2 – Akkumulationsversuche	5
3 Ergebnisse.....	6
3.1 Selektion	6
3.1.1 Schlammalter.....	6
3.1.2 Zyklusdauer	9
3.1.3 Raumbelastung.....	12
3.2 Langzeitversuch.....	14
3.3 Akkumulationsversuche.....	17
4 Zusammenfassung.....	20
5 Literaturverzeichnis.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Schlammaltern. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	7
Abbildung 2: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	9
Abbildung 3: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	10
Abbildung 4: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	11
Abbildung 5: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	12
Abbildung 6: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	14
Abbildung 7: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus der Selektion des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	15
Abbildung 8: Anteil potenzieller PHA- und Nicht-PHA-Produzenten innerhalb des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung...17	17
Abbildung 9: 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.....	18
Abbildung 10: Anteil potenzieller PHA- und Nicht-PHA-Produzenten innerhalb der Versuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	19

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Substrate, deren Konzentration und Zusammensetzung während der Selektionsversuche.....	4
Tabelle 2: Verwendete Substrate, deren Konzentration und Zusammensetzung während des Langzeitversuches.....	5
Tabelle 3: Verwendete Substrate, deren Konzentration und Zusammensetzung während der Akkumulationsversuche.....	6
Tabelle 4: PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	8
Tabelle 5: PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung...	11
Tabelle 6: PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	13
Tabelle 7: PHA-Zusammensetzung während des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.....	16
Tabelle 8: 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.....	19

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. Eine solche Biokunststoffproduktion 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). 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).

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. Das Verfahren hierzu

besteht aus einem zwei- bzw. dreistufigen Prozess. 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. Im zweiten Schritt werden Bakterien mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion durch zyklische Substratzugabe und Hungerphasen (feast- und famine-Regime) gezielt selektiert und angereichert und im dritten Schritt wird mit dieser Biomasse unter kontinuierlicher Substratzugabe PHA produziert (Majone et al. 1996; Serafim et al. 2004).

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. 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. Außerdem soll der Einfluss unterschiedlicher Substrate in der Akkumulationsphase auf die Biozönose und damit zusammenhängend auf die PHA-Produktion und -Zusammensetzung untersucht werden. Zudem soll die Möglichkeit einer stabilen Langzeit-PHA-Produktion unter schwankenden Prozessbedingungen untersucht werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Projektes dargestellt und diskutiert. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse ist in der Langversion dieses Berichtes zu finden. 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 Methodik

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). Aufgrund der Erkenntnisse aus dem vorangegangenen Projekt wurde Brauereiabwasser als Rohstoff für die Substratproduktion für die Selektions- und Akkumulationsversuche ausgewählt. Eine kurze Übersicht über die durchgeführten Versuche und die genutzten Substrate ist im Folgenden aufgeführt. Für eine detaillierte Versuchs- und Materialbeschreibung wird auf die ausführliche Version des Projektberichtes verwiesen.

2.1 Arbeitsschritt 1 - Selektionsparameter

In Arbeitsschritt 1 sollten Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung der Biozönose und deren Adaption über die Zeit während der Selektionsphase analysiert werden. Eine Übersicht über die Versuche ist in Tabelle 1 gegeben. Der erste Versuchsblock zur Selektion sollte einer Untersuchung des Einflusses zweier unterschiedlicher Schlammalter (2 und 4 d bei einer Zyklusdauer von 12 h) 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 (6 und 24 h) und im dritten der Einfluss unterschiedlicher Raumbelastungen (6 und 10 g/(L*d)) 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 als Langzeitselektion durchgeführt.

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

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

2.2 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 (Arbeitsschritt 2), zum anderen wurde der Einfluss von Schwankungen im verwendeten Substrat auf die Biomasse in der Selektion über einen längeren Zeitraum und deren Akkumulationsperformance untersucht. Wöchentliche Akkumulationen sowie Probenahmen fanden über 3 Monate statt, danach monatlich. 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 g/(L*d)) 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. Eine Übersicht über die verwendeten Substrate und deren Konzentrationen in diesem Versuch ist in Tabelle 2 gegeben.

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

Versuchsblock	Substrat	Raumbelastung		Feed-Konzentration Akkumulation	Zusammensetzung C _{gerade} zu C _{ungerade} [%]
		Selektion [gCSB _{gel} /(L*d)]	[gCSB _{VFA} /(L*d)]		
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	

2.3 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 (Arbeitsschritt 2). Hierzu wurden zehn verschiedene Versuche mit der selektierten Biomasse aus den ersten drei Wochen der Selektion des Langzeitversuches durchgeführt. Neben dem hier genutzten ersten versäuerten Batch an Brauereiabwasser des Langzeitversuches, 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

3 Ergebnisse

3.1 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.

3.1.1 Schlammalter

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 1 dargestellt. In beiden Versuchsansätzen mit einem Schlammalter von 2 und 4 d war bereits nach 7 Tagen ein mittlerer PHA-Gehalt von 28,4 ($\pm 1,1$) %PHA/oTS bzw. 17,5 ($\pm 13,6$) %PHA/oTS erreicht, jedoch war insgesamt ein instabiler Verlauf der PHA-Produktion über die jeweilige Versuchsdauer hinweg zu verzeichnen. Die höchsten in diesem Versuchsteil erzielten Einzel-PHA-Gehalte lagen bei 35,3 %PHA/oTS in Reaktor 6 an Tag 7 und 35 %PHA/oTS in Reaktor 1 an Tag 21 bei dem Versuch mit 4 d Schlammalter. Matos et al. (2021) 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. Beim Vergleich der beiden hier durchgeführten 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.

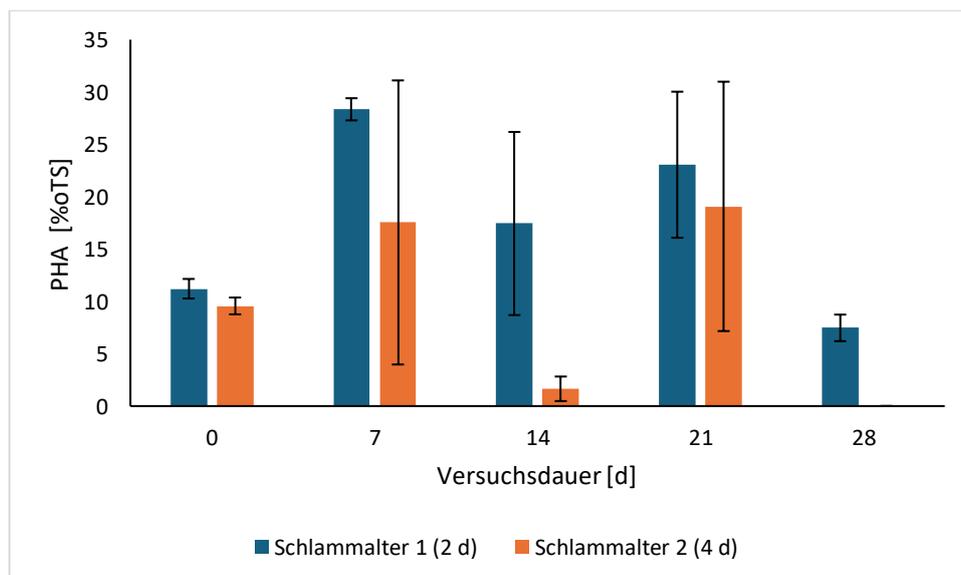


Abbildung 1: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Schlammaltern. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Tabelle 4 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 4 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 4: 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	
7	85,6 ± 0,3	14,4 ± 0,3	84,7 ± 10,9	15,3 ± 10,9	73,3:26,7
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	

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 (über 50 % im Vergleich zu unter 20 % zu Beginn des Versuches) (Abbildung 2). Die Schwankungen in der relativen Abundanz könnten, 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 1, Abbildung 2). 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.

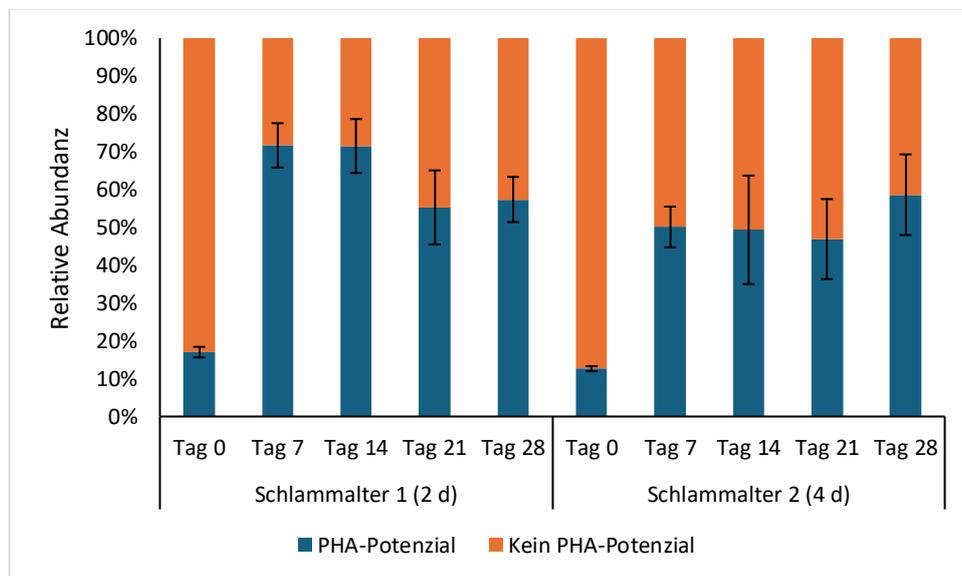


Abbildung 2: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

3.1.2 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 1, Abbildung 2), wurde aufgrund der Vergleichbarkeit zu den im vorangegangenen Projekt durchgeführten Versuchen (Steinmetz et al. 2022), den Ergebnissen aus der Literatur (Matos et al. 2021; 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.

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 3). So lag der maximale PHA-Gehalt mit einem Wert von 40,8 (\pm 4,9) %PHA/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) %PHA/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 1), welche mit einer Zyklusdauer von 12 h durchgeführt wurden. In diesem Versuchsblock wurde allerdings außerdem eine höhere Raumbelastung genutzt. 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. 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.

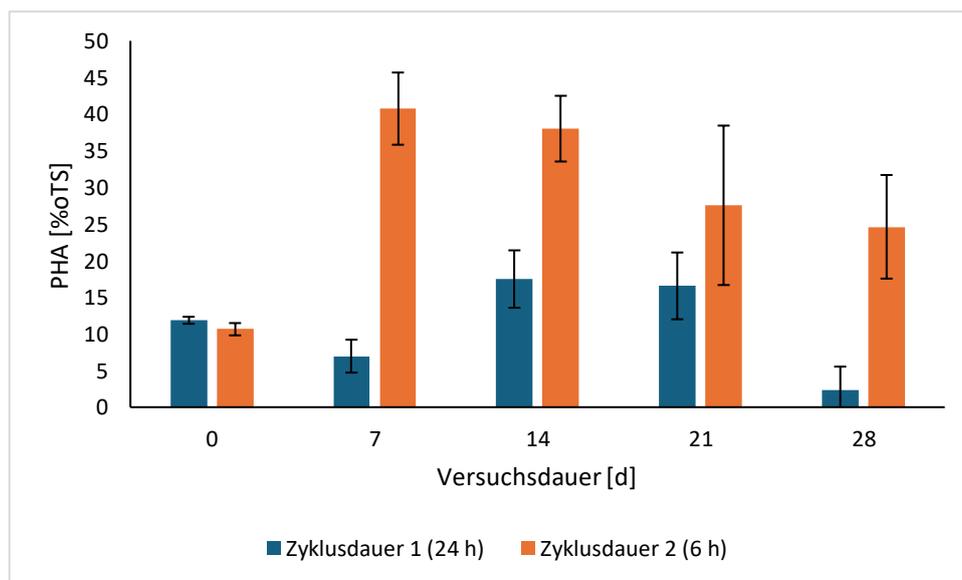


Abbildung 3: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Das hergestellte PHA war zu Beginn der beiden Zyklusdauer-Versuche, ähnlich wie in den vorherigen Versuchen (vgl. Tabelle 4), aus ca. 60 % HB und 40 % HV zusammengesetzt (Tabelle 5). 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 3).

Tabelle 5: 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:HV
	HB [%PHA]	HV [%PHA]	HB [%PHA]	HV [%PHA]	
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	

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 (Abbildung 4), was sich jedoch nicht in der PHA-Produktion widerspiegelte.

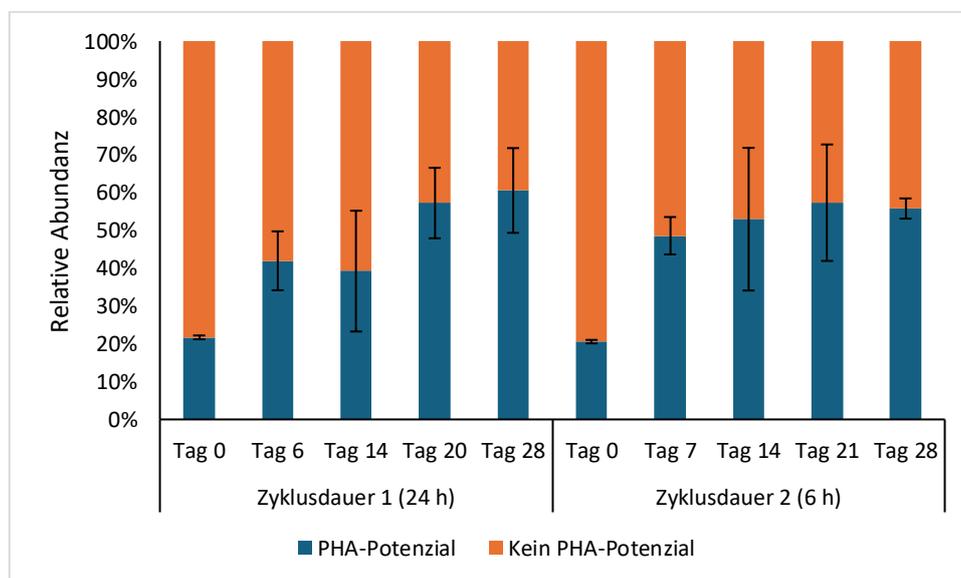


Abbildung 4: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

3.1.3 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. 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).

Der maximale PHA-Gehalt wurde an Tag 7 bei dem Versuch mit niedrigerer Raumbelastung (6 g/(L*d)) mit $9,4 (\pm 3,5)$ %PHA/oTS erreicht und war damit höher als bei dem Versuch mit hoher Raumbelastung (10 g/(L*d)), allerdings lag dieser in beiden Versuchen insgesamt in einem geringen Bereich und war sehr viel niedriger als in den vorherigen Versuchen (Schlammalter und Zyklusdauer) mit Raumbelastungen von 0,69 und 1,29 gCSB_{gel}/(L*d). 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).

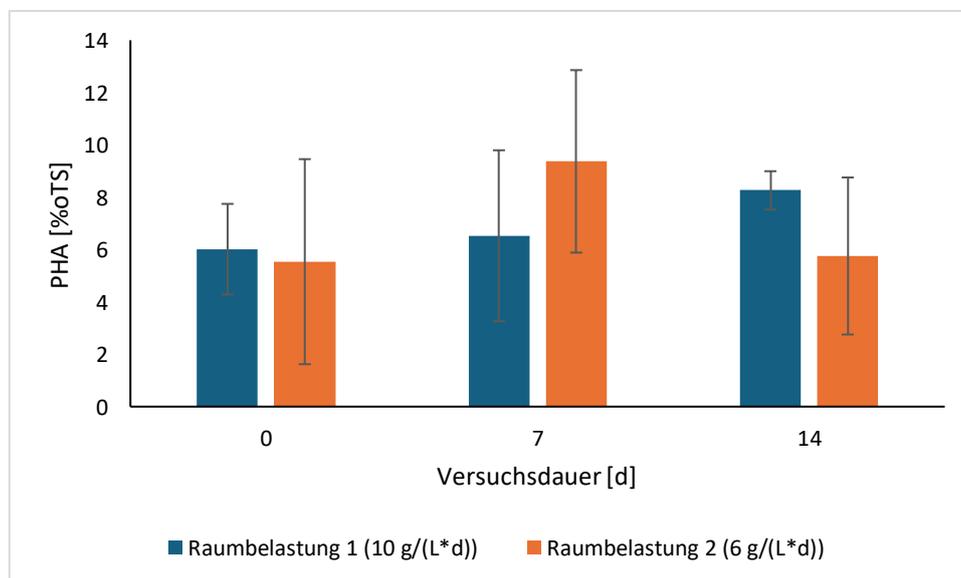


Abbildung 5: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Die Zusammensetzung des PHA war in beiden Versuchen zu Beginn sehr unterschiedlich (Tabelle 6). 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 6: 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	

Die biologische Zusammensetzung entwickelte sich ebenfalls unterschiedlich zwischen beiden Versuchsansätzen (s. Langversion des Berichtes). Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten stieg zwar in beiden Versuchen über die Versuchsdauer kontinuierlich an (Abbildung 6), was sich jedoch nicht in der PHA-Produktion widerspiegelte. Die Ergebnisse sprechen für eine Inhibierung des Wachstums und der PHA-Produktion durch einen Substratüberschuss.

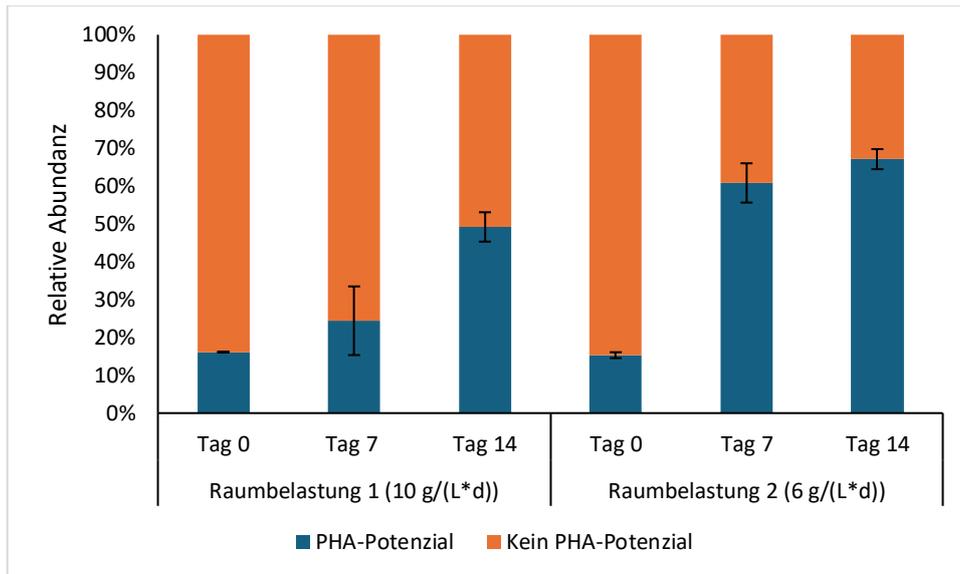


Abbildung 6: Anteil potenzieller PHA- und nicht-PHA-Produzenten in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

3.2 Langzeitversuch

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

Bei Betrachtung des PHA-Gehaltes über den Langzeitversuch, zeigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen den Substratwechseln und der PHA-Produktion (Abbildung 7). Geringere Raumbelastungen resultierten in Einbrüchen in der PHA-Produktion. Der maximale PHA-Gehalt wurde an Tag 56 mit 48,3 ($\pm 8,1$) %PHA/oTS bei einer Raumbelastung von 1,3 gCSB_{gel}/(L*d) erreicht. Nach Betriebsstörungen konnte sich das System immer wieder regenerieren mit Ausnahme der letzten Betriebsstörung, welche auf eine vorherige Störung folgte.

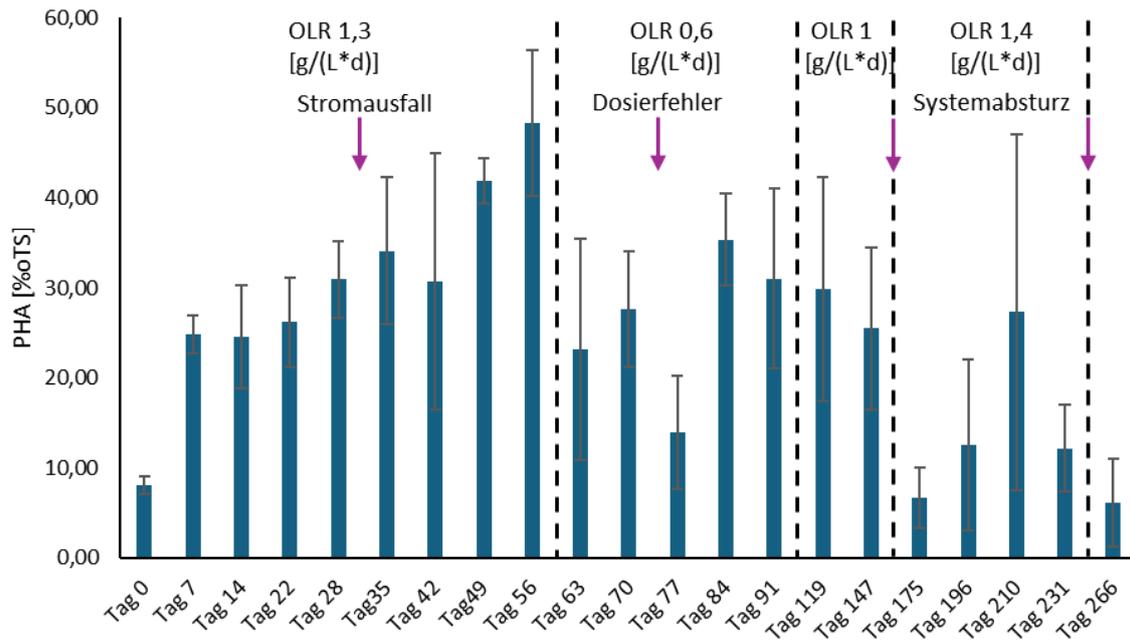


Abbildung 7: PHA-Gehalt am Ende von Akkumulationsversuchen mit Schlamm aus der Selektion des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

Die Zusammensetzung des produzierten PHA wich, wie schon bereits in den anderen Selektionsversuchen zuvor beobachtet, zu Beginn des Versuches von der theoretisch zu erwartenden Zusammensetzung ab (Tabelle 7). 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 der 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, da diese z.T. nach den Störungen von der theoretischen Zusammensetzung abwich.

Tabelle 7: 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

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 Substratwechseln oder Störfällen zu beobachten (Ergebnis in der Langversion des Berichtes). Dies zeigte sich auch in der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten insgesamt (Abbildung 8). 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 %.

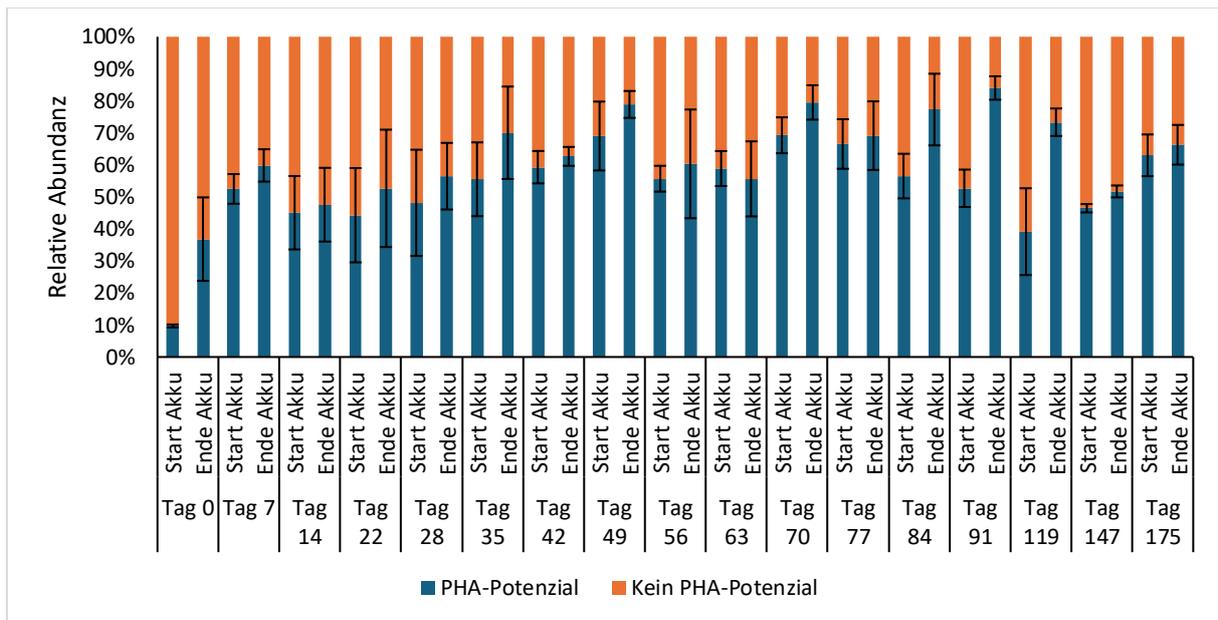


Abbildung 8: Anteil potenzieller PHA- und Nicht-PHA-Produzenten innerhalb des Langzeitversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

3.3 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.

In diesen Versuchen 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 (max. 50,8 ($\pm 1,1$) %PHA/oTS mit Ac/Pro 70/30 %) (Abbildung 9). In diesem Fall tendierte auch die PHA-Zusammensetzung eher in Richtung der theoretisch zu erwartenden Zusammensetzung (Tabelle 8), 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 (Abbildung 9). 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 (Abbildung 9). Weder die Änderung der Substratkonzentration noch die Zugabe von Nährstoffen hatte einen Einfluss auf die Zusammensetzung des produzierten PHAs (Tabelle 8).

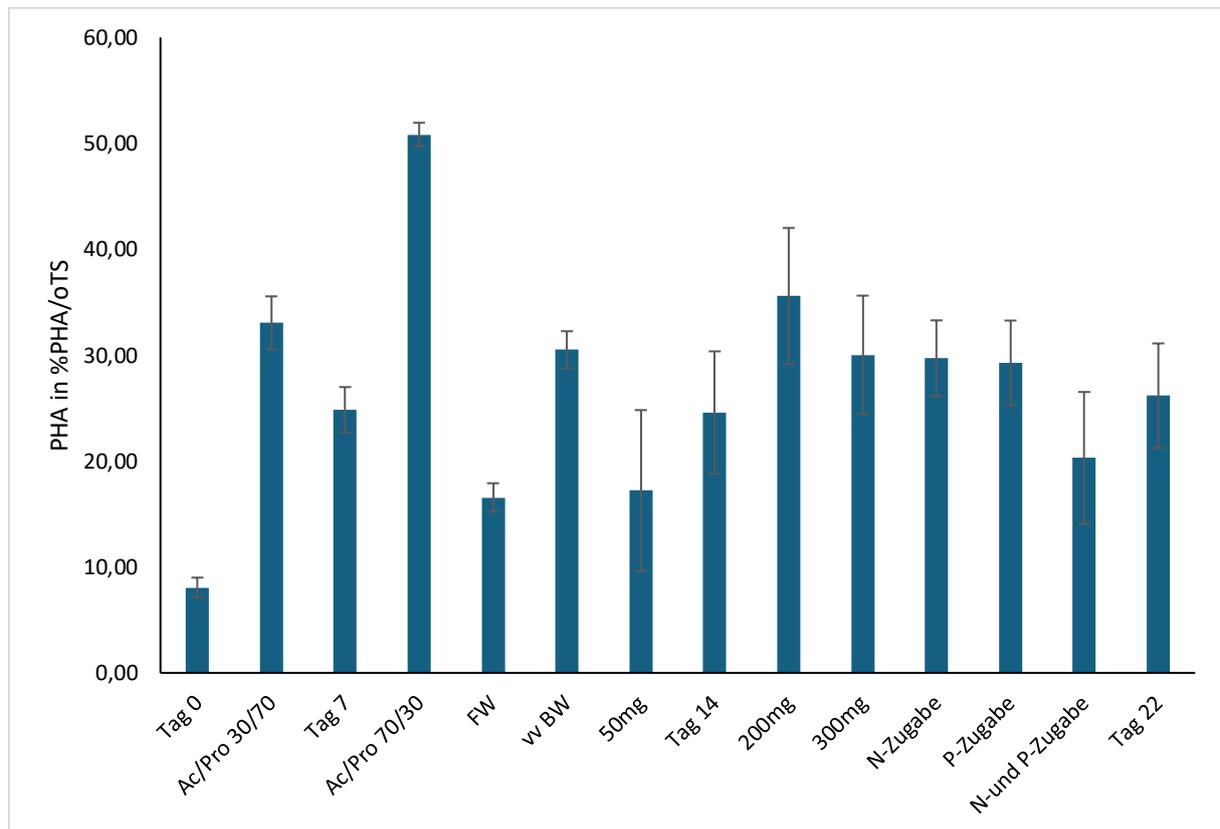


Abbildung 9: PHA-Gehalt innerhalb der Akkumulationsversuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung. Ac: Essigsäure, Pro: Propionsäure, FW: Fruchtsaftabwasser, vv Brau: vorversäuertes Brauereiabwasser.

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 (Ergebnis in der Langversion des Berichtes). Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten änderte sich, wie ebenfalls im Kapitel zum Langzeitversuch bereits erläutert, 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 (Abbildung 10).

Tabelle 8: 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	

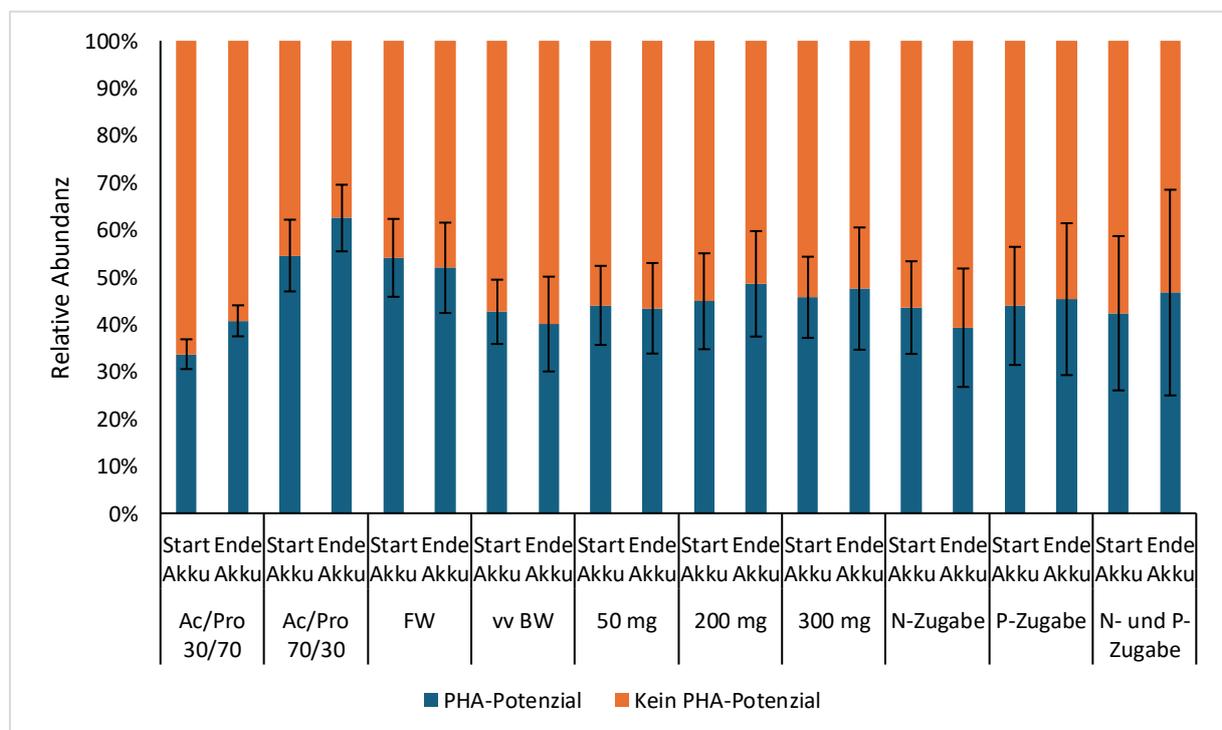


Abbildung 10: Anteil potenzieller PHA- und Nicht-PHA-Produzenten innerhalb der Versuche mit unterschiedlichen Substratcharakteristika. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung.

4 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

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 %PHA/oTS erzielt. Dies deutet darauf hin, dass es einen geeigneten Bereich an verwendeter Raumbelastung zu geben scheint. Als beste Parameterkombination stellte sich ein Schlammalter von 4 d, eine Zyklusdauer von 6 h und eine Raumbelastung von ca. $1 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ heraus, mit welcher ein maximaler mittlerer PHA-Gehalt von $40,8 (\pm 4,9) \text{ \%PHA/oTS}$ 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 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. 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 Substratwechselln entwickelten sich die Biozöosen und Zielparmeter in den Reaktoren zunehmend anders. Dies war sowohl 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.

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. Eine voraussagbare PHA-Zusammensetzung kann mit einer stabilen und adaptierten Biozönose erzielt werden. Aufgrund der hier gewonnen 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.

5 Literaturverzeichnis

- 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.
- 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.
- 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.
- European Bioplastics e.V. (2023): Bioplastics. Online verfügbar unter <http://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>, zuletzt geprüft am 29.05.24.
- Guarda, Eliana C.; Amorim, Catarina L.; Pasculli, Gabriele; Castro, Paula M.L.; Galinha, Claudia F.; Duque, Anouk F.; Reis, Maria 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.
- 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, Martin; Maršálek, Lukáš; Sousa Dias, Miguel Miranda de; Braunegg, Gerhart (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, Constantina; Plácido, Jersson; Venetsaneas, Nikolaos; Burniol-Figols, Anna; Varrone, Cristiano; Gavala, Hariklia N.; Reis, Maria A. M. (2017): Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. In: *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 4 (2). DOI: 10.3390/bioengineering4020055.
- Lu, Jingnan; Tappel, Ryan C.; Nomura, Christopher 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.; Możejko-Ciesielska, J. (2021): What Is New in the Field of Industrial Wastes Conversion into Polyhydroxyalkanoates by Bacteria? In: *Polymers* 13 (11), S. 1731. DOI: 10.3390/polym13111731.
- Matos, Mariana; Cruz, Rafaela A. P.; Cardoso, Pedro; Silva, Fernando; Freitas, Elisabete B.; Carvalho, Gilda; Reis, Maria A. M. (2021): 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, Helena; Palmeiro-Sánchez, Tania; Kleerebezem, Robbert; Mosquera-Corral, Anuska; Campos, José Luis; van Loosdrecht, Mark 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, Giulia; Lorini, Laura; Pavan, Paolo; Crognale, Simona; Tonanzi, Barbara; Rossetti, Simona et al. (2020): Biopolymers from Urban Organic Waste: Influence of the Solid Retention Time to Cycle Length Ratio in the Enrichment of a Mixed Microbial Culture (MMC). In: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8 (38), S. 14531–14539. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c04980.
- Morgan-Sagastume, Fernando; Valentino, Francesco; Hjort, Markus; Zanolli, Giulio; Majone, Mauro; Werker, Alan (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.
- 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.
- Sabapathy, P. C.; Devaraj, S.; Meixner, K.; Anburajan, P.; Kathirvel, P.; Ravikumar, Y. et al. (2020): Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production - A review. In: *Bioresource technology* 306, S. 123132. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123132.

Serafim, Luísa S.; Lemos, Paulo C.; Oliveira, Rui; Reis, Maria 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.

Steinbüchel, Alexander (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.

Tan, Giin-Yu; Chen, Chia-Lung; Li, Ling; Ge, Liya; Wang, Lin; Razaad, Indah et al. (2014): Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. In: *Polymers* 6 (3), S. 706–754. DOI: 10.3390/polym6030706.

Vicente, Diogo; Proença, Diogo Neves; Morais, Paula V. (2023): The Role of Bacterial Polyhydroxyalkanoate (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.

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

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

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.