

RP

TU Rheinland-Pfälzische
Technische Universität
Kaiserslautern
Landau

**Dynamik der mikrobiellen Mischbiozönose und der PHA-
Produktion aus Restströmen unter variierenden
Betriebsstrategien**

vom Fachbereich Biologie

der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau
zur Verleihung des akademischen Grades Dr. rer. nat. genehmigte

Dissertation

von

Julia Zimmer, M.Sc., geb. in Saarbrücken

Mündliche Prüfung: 28.08.2025

Dekan:

Prof. Dr. Stefan Kins

Promotionskommissionsvorsitzender:

Prof. Dr. Stefan Kins

Berichterstattende:

Prof. Dr. Thorsten Stoeck

Prof. Dr.-Ing. Heidrun Steinmetz

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
Abstract.....	XII
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund und Motivation	1
1.2 Eigenschaften und Biosynthese von PHA	2
1.3 PHA-Herstellung mit mikrobiellen Mischkulturen	7
1.3.1 Substratproduktion.....	10
1.3.2 Selektion	12
1.3.3 PHA-Akkumulation.....	17
1.4 Charakterisierung PHA-produzierender Mikroorganismen	19
1.5 Zusammenfassung zum gegenwärtigen Kenntnisstand und offene Forschungsfragen.....	21
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	25
1.7 Überblick über den Aufbau der Arbeit	27
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Substratherstellung.....	29
2.1.1 Aufbau und Durchführung der Versäuerung	29
2.1.2 Substratvorbereitung für die einzelnen Versuchsblöcke	30
2.2 Selektion.....	35
2.2.1 Versuchsaufbau	36
2.2.2 Versuchsbeschreibung	37
2.3 PHA-Akkumulation	42
2.3.1 Versuchsaufbau	42
2.3.2 Versuchsbeschreibung	43
2.4 Analytik.....	45
2.4.1 Organische Trockensubstanz.....	45
2.4.2 Substratparameter	46
2.4.3 Bestimmung des PHA-Gehaltes und der PHA-Zusammensetzung.....	46
2.5 Molekularbiologische Methodik	49
2.5.1 DNA-Extraktion.....	49
2.5.2 Bioinformatische Auswertung	49

2.6	Statistische Auswertung.....	50
3	Ergebnisse	56
3.1	Selektion.....	56
3.1.1	Inokulum	56
3.1.2	Schlammalter	75
3.1.3	Zyklusdauer.....	83
3.1.4	Raumbelastung	91
3.1.5	Zusammenfassende Analyse der Versuche mit realem Substrat.....	97
3.2	Langzeit-Selektion.....	108
3.3	PHA-Akkumulation	119
4	Diskussion.....	130
4.1	Selektion.....	130
4.1.1	Betriebsparameter in der Selektion.....	130
4.1.2	Kernorganismen	140
4.1.3	Effektivität und Dauer der Selektionsphase.....	144
4.2	Langzeitstabilität	146
4.2.1	Verlauf der PHA-Produktion und -zusammensetzung.....	146
4.2.2	Dynamik der mikrobiellen Mischbiozönose.....	147
4.3	PHA-Akkumulation	153
4.3.1	PHA-Produktion und -Zusammensetzung bei variierenden Substraten.....	153
4.3.2	Dynamik der selektierten Biozönose in der Akkumulationsphase	155
5	Fazit und Ausblick.....	158
6	Literaturverzeichnis.....	161
7	Anhang.....	183
7.1	Selektion.....	183
7.2	Langzeit-Selektion.....	203
7.3	PHA-Akkumulation	206
7.4	Digitaler Anhang.....	208
Danksagung.....		210
Darlegung des Eigenanteils.....		211
Darlegung aller benutzten Hilfsmittel und Hilfestellungen		212
Erklärungen entsprechend § 6 der Promotionsordnung des FB Biologie		213
Lebenslauf		214

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln von Polyhydroxyalkanoaten.....	3
Abbildung 2: Gene und Enzyme der PHA-Synthese.....	5
Abbildung 3: Biosynthese-Wege zur Herstellung von PHA.....	6
Abbildung 4: Verfahrensschema zur PHA-Produktion mit mikrobiellen Mischbiozöosen.	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Selektions- und Akkumulationsphase im Prozess zur PHA-Produktion mit mikrobiellen Mischbiozöosen.....	9
Abbildung 6: Übersicht über den Aufbau der Arbeit.....	28
Abbildung 7: Aufbau des Reaktors zur Versäuerung von Brauereiabwasser als Substrat für Selektions- sowie Akkumulationsversuche.....	30
Abbildung 8: Aufbau eines Reaktors zur Selektion PHA-produzierender Mikroorganismen aus einer Mischkultur.....	37
Abbildung 9: Verlauf zweier 12h-Zyklen während der Selektionsversuche.....	38
Abbildung 10: Aufbau eines Reaktors zur PHA-Akkumulation mithilfe einer selektierten Biomasse aus einer Mischkultur.....	42
Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum.....	58
Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum.....	59
Abbildung 13: Alpha-Diversitätsindizes in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum.....	61
Abbildung 14: Taxonomische Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum.....	63
Abbildung 15: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum im Vergleich zum Versuchsstart.....	66
Abbildung 16: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlichem Inokulum.....	71
Abbildung 17: Netzwerke mikrobieller Biozöosen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Inokula.....	74
Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter.....	76
Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter.....	77

Abbildung 20: Taxonomische Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter.	78
Abbildung 21: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter im Vergleich zum Versuchsstart.	80
Abbildung 22: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlichem Schlammalter.	82
Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer.	84
Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer.	85
Abbildung 25: Taxonomische Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer.	86
Abbildung 26: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer im Vergleich zum Versuchsstart.	89
Abbildung 27: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer.	90
Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung.	92
Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung.	93
Abbildung 30: Taxonomische Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung.	94
Abbildung 31: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung im Vergleich zum Versuchsstart.	96
Abbildung 32: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung.	97
Abbildung 33: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlichen Parametern.	98
Abbildung 34: Taxonomische Unterschiede zwischen Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Parametern.	101
Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in einem Langzeit-Selektionsversuch.	109
Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in einem Langzeit-Selektionsversuch.	110

Abbildung 37: Alpha-Diversitätsindizes der Mischbiozönose während eines Langzeit-Selektionsversuches.	112
Abbildung 38: Taxonomische Zusammensetzung der Mischbiozönose während der Selektion innerhalb eines Langzeitversuches mit Substratwechseln.	113
Abbildung 39: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa während der Selektion innerhalb eines Langzeitversuches mit Substratwechseln im Vergleich zum Versuchsstart.....	115
Abbildung 40: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase innerhalb eines Langzeitversuches unter Verwendung zweier unterschiedlicher Substrate.....	117
Abbildung 41: LEfSe-Analyse der mikrobiellen Mischbiozönose zu unterschiedlichen Zeitpunkten während eines Langzeit-Selektionsversuches.....	118
Abbildung 42: PHA-Produktion während Akkumulationsversuchen unter Verwendung unterschiedlicher Substrate und gleicher Biozönose aus einem Langzeitselektionsversuch.....	120
Abbildung 43: PHA-Zusammensetzung des produzierten PHA aus Akkumulationsversuchen unter Verwendung unterschiedlicher Substrate und gleicher Biozönose aus einem Langzeitselektionsversuch.	122
Abbildung 44: Anteil potenzieller PHA-Produzenten in der mikrobiellen Mischbiozönose zu Beginn und Ende der Akkumulation in Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat.....	123
Abbildung 45: Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose zu Beginn und Ende der Akkumulation in Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat.....	124
Abbildung 46: Taxa mit signifikanter Änderung zwischen Beginn und Ende der Akkumulationsphase in Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat.....	127
Abbildung 47: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung der Mischbiozönose zu Beginn und Ende der Akkumulation in Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat.....	129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung der Mikronährstofflösung.	31
Tabelle 2:	Substratcharakteristika des versäuerten Brauereiabwassers für die Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern.	32
Tabelle 3:	Zugabe an VFA zum Substrat in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung.	33
Tabelle 4:	Substratcharakteristika der Chargen an versäuertem Brauereiabwasser für einen Langzeit-Selektionsversuch.	34
Tabelle 5:	Charakteristika der aus Restströmen gewonnenen Substrate für Akkumulationsversuche zum Einfluss verschiedener Substrateigenschaften.	35
Tabelle 6:	Übersicht über Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern und einen Langzeitversuch.	38
Tabelle 7:	Übersicht über die Akkumulationen in Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern und einem Langzeitversuch.	44
Tabelle 8:	Übersicht über Akkumulationsversuche mit variierendem Substrat und einer selektierten Biozönose aus einem Langzeit-Selektionsversuch.	45
Tabelle 9:	Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests der Alpha-Diversitätsindizes zwischen verschiedenen Zeitpunkten über drei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum.	62
Tabelle 10:	Indikatororganismen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Inokula mit signifikanter Zuordnung zu einzelnen Versuchen.	68
Tabelle 11:	Indikatororganismen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Inokula ohne signifikante Zuordnung zu einzelnen Versuchen.	69
Tabelle 12:	Netzwerkcharakteristika mikrobieller Biozönosen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Inokula.	72
Tabelle 13:	Indikatororganismen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern mit signifikanter Zuordnung zu einzelnen Versuchen.	103
Tabelle 14:	Indikatororganismen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern ohne signifikante Zuordnung zu einzelnen Versuchen.	106
Tabelle 15:	Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests der Alpha-Diversitätsindizes zwischen verschiedenen Zeitpunkten über einen Langzeit-Selektionsversuch.	111

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Essigsäure
ANCOVA	Kovarianzanalyse
ANOVA	Varianzanalyse
ASV	Amplicon Sequenz Variante
bh	Benjamin-Hochberg-Korrektur
Bio-P	Biologische Phosphoreliminierung
Brau	Brauereiabwasser
Bu	Buttersäure
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cap	Capronsäure
CoCl ₂	Cobalt(II)-Chlorid
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
CuSO ₄	Kupfersulfat
D	Simpson-Index
DADA2	Divisive Amplicon Denoising Algorithm
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DF	Freiheitsgrade
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
DO	Gelöster Sauerstoff („dissolved oxygen“)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
F	ANOVA-Teststatistik
FeCl ₃	Eisen(III)-Chlorid
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
For	Ameisensäure
gel	gelöst
H	Säure
H'	Shannon-Index
H ₂ O	Wasser
H ₃ Bo ₃	Borsäure
HB	(3-)Hydroxybutyrat
HCl	Salzsäure
hom	homogenisiert
HV	(3-)Hydroxyvalerat
IBC	Tankcontainer

KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Kaliumiodid
Konz.	Konzentration
LCA	Letzter gemeinsamer Vorfahre
LCL	Langkettige PHA
LDA	Lineare Diskriminanten Analyse
LEfSe	Lineare Diskriminanten Analyse der Effektgröße
LIC	Füllstandsregler
LM	Lineares Modell
Maaslin2	Microbiom multivariate association with linear models
MCL	Mittelkettige PHA
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MnCl ₂	Manganchlorid
n	Stichprobengröße
Na ₂ MoO ₄	Natriummolybdat
NaOH	Natronlauge
NGS	Next-Generation-Sequencing
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NH ₄ -N	Ammonium-Stickstoff
NMDS	Nicht-metrische multidimensionale Skalierung
oTS	Organische Trockensubstanz
p	Signifikanzwert
PBS	Polybutylensuccinat
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PERMANOVA	Permutationale multivariate Varianzanalyse
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PLA	Polylactide
PO ₄ -P	Phosphat-Phosphor
PP	Polypropylen
Pro	Propionsäure
q	Korrigierter Signifikanzwert der Maaslin2-Analyse
QIR	Durchflussmessgerät
qPCR	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
R ²	Bestimmtheitsmaß
RB	Raumbelastung
SA	Schlammalter

SBR	Sequencing Batch Reactor
SCL	Kurzkettige PHA
SVI	Sludge volume Index
SS	Summe der Quadrate
synth.	synthetisch
TC	Zeitsteuerung
TIC	Temperaturregler
T-RFLP	Terminaler Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus
unass.	nicht zugeordnet („unassigned“)
Val	Valeriansäure
VFA	Flüchtige Fettsäuren („volatile fatty acids“)
Z	Teststatistik Dunn-Test
ZD	Zyklusdauer
ZnSO ₄	Zinksulfat
χ^2	Kruskal-Wallis-Teststatistik

Zusammenfassung

Die globale Plastikverschmutzung stellt ein zunehmendes Problem dar, das unsere Umwelt und unsere Gesundheit gefährdet. Daher wäre der Ersatz von konventionellem Plastik durch Bioplastik ein wichtiger Schritt zur Minimierung der Folgen. Ein biologisch abbaubares Plastik ist PHA (Polyhydroxyalkanoat), welches durch verschiedene Mikroorganismen als Speicherstoff hergestellt werden kann. Die bisherige kommerzielle Herstellung dieses Polymers erfolgt unter sterilen Arbeitsbedingungen mithilfe von Reinkulturen und teuren Substraten, wodurch das Plastik teuer und wenig konkurrenzfähig auf dem Markt ist. Zur Verbesserung der Konkurrenzfähigkeit und Senkung des Preises, kann eine Herstellung mittels Bakterienmischkulturen und Restströmen über ein mehrstufiges Verfahren eingesetzt werden. Allerdings gibt es zurzeit noch einige Hindernisse zu überwinden, um das Verfahren im industriellen Maßstab umsetzen zu können. Probleme dabei stellen beispielsweise die schwankende Quantität und Qualität des produzierten Polymers unter realen Betriebsbedingungen mit schwankenden Reststromeigenschaften dar. Zum Überwinden dieser Problematik ist ein besseres Verständnis der PHA-produzierenden Bakterienmischbiozönose und deren Reaktion auf bestimmte Betriebsweisen notwendig. Daher sollten in dieser Arbeit i) der Einfluss unterschiedlicher Betriebsparameter in der Selektion auf die Mischbiozönose und die PHA-Produktion untersucht werden und die Identifizierung von Kernorganismen stattfinden, ii) mit einer Auswahl der Betriebsparameter eine Langzeit-Selektion durchgeführt und die Stabilität der PHA-Produktion und Zusammensetzung der Biozönose untersucht werden, iii) der Einfluss unterschiedlicher Substrate in der Akkumulationsphase auf die PHA-Produktion in Verbindung mit der Zusammensetzung der Biozönose analysiert werden. Hierzu wurde ein aufeinander aufbauendes Versuchsdesign entwickelt, in welchem zunächst verschiedene Betriebsparameter in der Selektion miteinander verglichen wurden und die beste Variation für den nächsten Versuch ausgewählt wurde. Mit der Auswahl der am besten geeigneten Parameterkombination, erfolgte eine Langzeit-Selektion, in welcher zudem ein Substratwechsel stattfand. In den Selektionsversuchen wurden regelmäßige Akkumulationen zur Evaluierung der PHA-Produktionsperformance und dessen Eigenschaften durchgeführt und Proben zur Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung genommen. Die Analyse erfolgte mittels Amplifizierung und Illumina-Sequenzierung der V3-V4-Region der bakteriellen 16S rDNA. Mit der selektierten Biomasse des Langzeitversuches wurden zusätzliche Akkumulationen mit variierendem Substrat durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass unter Verwendung der gleichen Betriebsweise eine Selektion unterschiedlicher Inokula zu ähnlich zusammengesetzten Biozönosen mit vergleichbarer PHA-Produktionsperformance führt. Die Selektionsphase führte zudem zu

einer effektiven Anreicherung potenzieller PHA-Produzenten und zur Steigerung der PHA-Produktion. Dabei wurden größtenteils bereits nach 7 bis 14 Tagen hohe PHA-Gehalte und Anteile potenzieller PHA-Produzenten erreicht. Eine weitere Steigerung war jedoch in der Langzeit-Selektion bis Tag 56 erkennbar. Unter Nutzung eines Belebtschlammes einer Brauerei, eines Schlammalters von 4 d, einer Zyklusdauer von 6 h und einer Raumbelastung von ca. $1 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L}\cdot\text{d})$ konnte mit versäuertem Brauereiabwasser als Substrat ein maximaler PHA-Gehalt von ca. 48 %oTS erzielt werden. Das gleiche Inokulum entwickelte sich unter Nutzung unterschiedlicher Betriebsparameter in der Selektion teils unterschiedlich, allerdings waren Überschneidungen in den dominantesten Organismen erkennbar. Zu den wichtigsten potenziellen PHA-Produzenten zählten die Gattungen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Comamonas*, *Flavobacterium*, *Zoogloea*, *Rhodobacter*, *Leadbetterella* und *Hydrogenophaga*. Die Nutzung hoher Raumbelastungen (6 und $10 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L}\cdot\text{d})$) führte jedoch zu großen Unterschieden in der mikrobiellen Zusammensetzung und zu einer schlechten PHA-Produktionsperformance. Während der Langzeit-Selektion konnten kontinuierliche Veränderungen der Biozönose über die Zeit und zwischen dem Substratwechsel festgestellt werden, wobei der PHA-Gehalt jedoch vergleichbar blieb. In den anderen Selektionsversuchen konnten ebenfalls Wechsel der dominanten Organismen über die Zeit mit teils unveränderter PHA-Produktion festgestellt werden. Dies spricht für eine funktionelle Redundanz und Stabilität des Systems trotz des Einflusses stochastischer Prozesse auf die Biozönose. Die PHA-Zusammensetzung entwickelte sich zumeist über die Zeit in eine ähnliche Richtung der, durch die Substratzusammensetzung zu erwartenden, theoretischen, Zusammensetzung. Dies deutet auf eine metabolische Anpassung der Biozönose hin. Während der Akkumulationsversuche mit unterschiedlichem Substrat konnten Unterschiede im Gehalt und der Zusammensetzung an produziertem PHA, aber nicht in der bakteriellen Zusammensetzung festgestellt werden. Substrate mit Eigenschaften ähnlich denen, des in der Selektion verwendeten, führten zu höheren PHA-Gehalten oder vorhersagbareren PHA-Zusammensetzungen. Daher hängen die PHA-Produktionseigenschaften offenbar mit der metabolischen Adaption der Mischbiozönose in der Selektionsphase zusammen. Eine Erhöhung der Substratkonzentration führte zudem nur bis zu einem gewissen Grad zur Erhöhung der PHA-Produktion und eine Nährstoffzugabe hatte keinen Einfluss auf diese, es sei denn Stickstoff und Phosphor wurden zusammen zugegeben. Die Ergebnisse liefern Implikationen für weitere Untersuchungen wichtiger PHA-Produzenten zur Entwicklung von Monitoring-Strategien und zur Anpassung der Betriebsstrategien in der Selektion. Zudem liefern sie Einblicke in den Einfluss von Substratschwankungen im Verfahren und zu den Vor- und Nachteilen einer Langzeit- oder Kurzzeitselektion.

Abstract

Global plastic pollution is an increasing problem, which threatens our environment and health. Replacing conventional plastic with bioplastics would be an important step in minimizing the effects of this pollution. PHA (Polyhydroxyalkanoate) is a biodegradable polymer which can be produced by a variety of microorganisms for energy storage. The commercial PHA production is executed with the use of pure cultures and expensive feed stocks under sterile conditions. This results in a high market price of PHA and leads to lower competitiveness compared to conventional plastic. The production of PHA with mixed microbial cultures and residual streams in a multi-stage process can be used to reduce the price and to improve the competitiveness on the market. However, there are still some obstacles to overcome before the process can be implemented on an industrial scale. Problems include the fluctuating quantity and quality of the polymer produced under real operating conditions with varying residual stream properties. To overcome this, a better understanding of the PHA-producing microbial community and the reaction of the community to varying process parameters is needed. Therefore, in this work i) the influence of different operating parameters in the selection on the mixed microbial culture and the PHA production should be investigated and core organisms should be identified, ii) with the chosen operating parameters, a long-term selection should be performed and the stability of the PHA production and composition of the microbial culture should be investigated, iii) the influence of different substrates in the accumulation phase on the PHA production and the composition of the mixed microbial culture should be analyzed. A consecutive test design was developed in which different operating parameters in the selection phase were compared and the best variation was chosen for the next experiment. Once the most suitable combination of parameters had been selected, a long-term selection was performed, in which a substrate change was realized. During the selection experiments, regular accumulations were conducted to evaluate the PHA production performance and its properties. Samples for microbial composition analysis were regularly taken. For this analysis, the V3-V4 region of the bacterial 16S rDNA was amplified and sequenced via Illumina-Sequencing. Additional accumulation experiments using different substrates were conducted with the selected biomass from the long-term selection. Results showed that, using the same operating conditions, a similarly composed mixed microbial culture with a comparable PHA production capacity can be selected with inocula of different origin. The selection phase also led to an effective enrichment of potential PHA producers and to an increase in PHA production. High PHA contents and relative abundances of potential PHA producers were frequently achieved after 7 to 14 days. However, a further increase could be recognized in the long-term selection up to day 56. A maximum PHA content of

approximately 48 %VSS could be achieved with activated sludge taken from a brewery, a sludge retention time of 4 d, a cycle length of 6 h and an organic loading rate of ca. 1 gCOD_{VFA}/(L*d) using a fermented brewery residual stream. Partially, the same inoculum developed differently under the use of different operating parameters in the selection phase although intersections between the dominant organisms could be observed. The genera *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Comamonas*, *Flavobacterium*, *Zoogloea*, *Rhodobacter*, *Leadbetterella* und *Hydrogenophaga* were among the most important potential PHA producers. However, the use of high organic loading rates (6 and 10 gCOD_{VFA}/(L*d)) resulted in more pronounced differences in microbial composition and in deteriorated PHA production performances. During long-term selection, continuous variations in mixed microbial composition could be observed over time and between substrates used. Nevertheless, the PHA production remained comparable. In the selection experiments on different operating conditions, changes in the dominant organisms over time with oftentimes unchanged PHA production were also observed. This indicates a functional redundancy and stability of the system despite the influence of stochastic processes on the microbial culture. The PHA composition usually developed in a similar direction to the theoretical composition to be expected from the substrate composition over time. This indicates a metabolic adaptation of the mixed microbial culture. During the accumulation experiments with different substrates, differences in the content and composition of PHA produced were observed, but not in the bacterial composition. Substrates with properties similar to those used in the selection resulted in higher PHA contents or more predictable PHA compositions. Therefore, PHA production characteristics may be related to the metabolic adaptation of the mixed microbial culture during selection. Furthermore, increasing the substrate concentration only led to an increase in PHA production to a certain extent and adding nutrients had no effect on this, unless nitrogen and phosphorus were added together. The results provide implications for further investigations on important PHA producers for the development of monitoring strategies and for the adaptation of operating strategies in the selection phase. They also provide insights into the influence of substrate fluctuations on the process and into the advantages and disadvantages of a long-term or short-term selection phase.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Motivation

Die globale Plastikverschmutzung stellt eine immer größer werdende Problematik dar, welche sowohl gravierende Schäden in unserer Umwelt anrichtet als auch unsere Gesundheit bedroht. Plastik ist überall in der Umwelt zu finden, von terrestrischen über aquatische Ökosysteme, sowie in einer Vielzahl von Lebewesen, darunter in allen Organismen der aquatischen Nahrungskette, in Vögeln, in Säugetieren und auch im Menschen (Bucci et al. 2020; Stoett et al. 2024). Dabei kann Plastik Lebewesen sowohl physikalisch schaden als auch chemisch wirken, da toxische Additive enthalten sein können und Verunreinigungen aus der Umwelt im Kunststoff gebunden sein können (Bucci et al. 2020). Obwohl eine Massenproduktion nur in den letzten 70 Jahren stattfand, beläuft sich die in diesem Zeitraum produzierte Menge an Plastik schätzungsweise auf 920 Millionen Tonnen (Mt), von denen 690 Mt bisher als Plastikmüll angefallen sind (Geyer 2020). Des Weiteren 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).

Aus diesem Grund gibt es seit einigen Jahren Bemühungen konventionelles Plastik durch die Herstellung von Biokunststoffen zu ersetzen. Dabei ist der Begriff „Biokunststoff“ jedoch nicht eindeutig definiert, da dieser lediglich zu einem Teil aus nachwachsenden Rohstoffen bestehen und/oder durch natürliche Zersetzungsprozesse biologisch abbaubar sein muss, jedoch nicht beides. Zu den Kunststoffen, welche beide Kriterien erfüllen, zählen unter anderem PLA (Polylactide), PHA (Polyhydroxyalkanoate), PBS (Polybutylensuccinat) und stärkebasiertes Plastik (European Bioplastics e.V. 2024). Diese werden bisher größtenteils auf pflanzlicher Basis (PLA, PBS, stärkebasierter Kunststoff) und/oder mittels bakterieller Reinkulturen (PHA) hergestellt (Sabapathy et al. 2020; Nguyenhuynh et al. 2021; European Bioplastics e.V. 2024). Die Produktion auf pflanzlicher Basis hat zum Nachteil, dass für den Anbau der Pflanzen große Flächen benötigt werden, welche andere nachteilige Konsequenzen für die Umwelt, wie beispielsweise Abholzung, mit sich bringen und unter Umständen in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion stehen können. Für den Produktionsprozess mit Reinkulturen ist eine sterile Arbeitsweise notwendig und es werden zudem nur reine Medien als Substrate verwendet, wodurch die Abläufe teuer und störanfällig werden (Sabapathy et al. 2020; Nguyenhuynh et al. 2021). Dies spiegelt sich in einem hohen Marktpreis und einer geringeren Konkurrenzfähigkeit des Produktes auf dem Markt wider, so ist kommerzielles PHA beispielsweise ca. 6-mal teurer als erdölbasiertes Plastik (Kourmentza et al. 2017; Khatami et al. 2021). Daher machen Biokunststoffe zurzeit

nur ca. 0,6 % und PHA nur ca. 0,025 % der weltweiten Kunststoffproduktion von 414 Mt pro Jahr aus (European Bioplastics e.V. 2024). Zur Verringerung der Produktionskosten und damit einhergehend zur Erhöhung der Konkurrenzfähigkeit von Bioplastik gegenüber konventionellem Plastik auf dem Markt, gibt es seit einigen Jahren Forschungsansätze zur Produktion von PHA-Biopolymeren aus Restströmen und mittels mikrobieller Mischkulturen (Marciniak und Możejko-Ciesielska 2021).

PHA 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 unter anderem im Belebtschlamm kommunaler Kläranlagen vor (Steinbüchel 1991; Majone et al. 1996; Huang et al. 2012; Inoue et al. 2016). Durch einen mehrstufigen Prozess können die Bakterien mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion, unter Verwendung von Restströmen oder Abfällen als Kohlenstoffquelle, selektiert und im Anschluss daran kann mit dieser Biomasse PHA hergestellt werden (Morgan-Sagastume et al. 2015; Pittmann und Steinmetz 2017; Carvalho et al. 2018; Huang et al. 2020).

Die kommerzielle PHA-Herstellung mittels Bakterienmischkulturen und Restströmen im industriellen Maßstab steht zurzeit jedoch noch vor einigen Hindernissen. Eines der größten Probleme hierbei besteht in den schwankenden Eigenschaften der so gewonnenen Biopolymere (Khatami et al. 2021; Guo et al. 2024). 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, besteht 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 Bakterienmischbiozönose und deren Einfluss auf die PHA-Produktion, um diese durch die Wahl geeigneter Betriebsbedingungen steuern und einen stabilen Langzeitbetrieb zur Produktion eines Polymers konstanter Quantität und Qualität gewährleisten zu können (Sabapathy et al. 2020; Nguyenhuynh et al. 2021).

1.2 Eigenschaften und Biosynthese von PHA

Mehr als 150 verschiedene Typen von Polyhydroxyalkanoaten konnten mithilfe von Mikroorganismen hergestellt werden (Chen 2009). Je nach Länge der Seitenkettengruppe werden die PHAs in kurz-, mittelkettige oder langkettige Polymere unterteilt (Anderson und Dawes 1990) (Abbildung 1). Zu den kurzkettigen PHA (SCL, „short-chain-length“) zählen Monomere mit 3-5 Kohlenstoffatomen, dazu gehören beispielsweise 3-Hydroxybutyrat (HB)

und 3-Hydroxyvalerat (HV). Monomere mit 6-14 Kohlenstoffatomen zählen zu den mittelkettigen PHA (MCL, „mid-chain-length“), darunter u.a. 3-Hydroxyhexanoat (HH) und 3-Hydroxyoctanoat (HO). Zu den langkettigen (LCL, „long-chain-length“) PHA zählen alle Monomere mit mehr als 14 Kohlenstoffatomen (Anderson und Dawes 1990; Reddy et al. 2003).

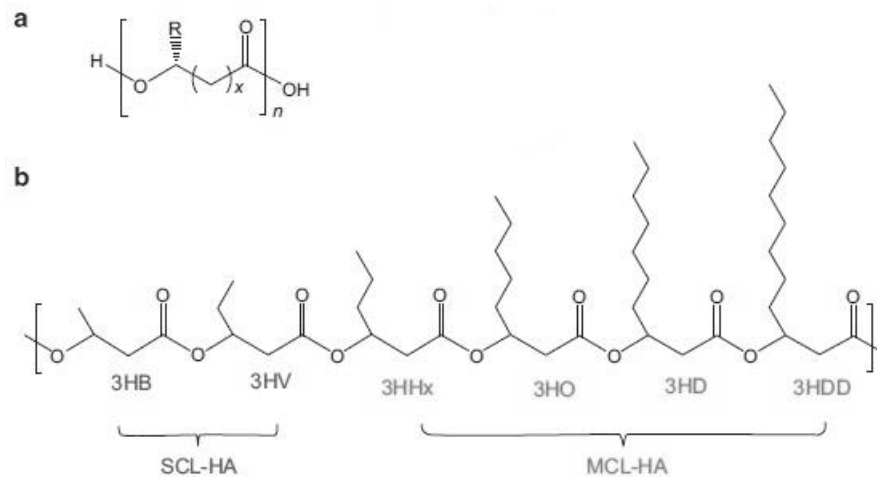


Abbildung 1: Strukturformeln von Polyhydroxyalkanoaten. a) Allgemeine Formel. b) Strukturformeln einiger kurzkettiger (SCL-HA) und mittelkettiger (MCL-HA) PHA-Monomere. SCL: „short-chain-length“, MCL: „mid-chain-length“, HA: Hydroxyalkanoat, HB: Hydroxybutyrat, HV: Hydroxyvalerat, HH: Hydroxyhexanoat, HO: Hydroxyoctanoat, HD: Hydroxydecanoat, HDD: Hydroxydodecanoat. Modifiziert nach Li et al. (2016).

Die Monomere sind in Einheiten von 100 bis 30.000 als Polymer-Ketten verknüpft (Muneer et al. 2020) und das Molekulargewicht der Polymere liegt zwischen 50 und 100 kDa, dabei variieren diese Eigenschaften je nach PHA-Produzent (Reddy et al. 2003). Zumeist werden von Mikroorganismen kurz- und mittelkettige PHA produziert, langkettige PHA sind sehr selten in der Natur zu finden (Anderson und Dawes 1990; Muneer et al. 2020). Die Polymere können in Form von Homopolymeren, bestehend aus einer Aneinanderreihung des gleichen Monomers, oder aus Copolymeren bestehen, welche aus unterschiedlichen Monomeren zusammengesetzt sind. Neben dem Homopolymer Poly(3-Hydroxybutyrat) (PHB) ist das Copolymer Poly(3-Hydroxybutyrat-co-3-Hydroxyvalerat) (PHBV) ein typisches mikrobiell produziertes PHA (Nguyenhuynh et al. 2021; Vicente et al. 2023). PHB ist der bestuntersuchte Typ von PHA und seine Eigenschaften ähneln denen von Polypropylen (PP) (Vicente et al. 2023). Die Eigenschaften des produzierten Polymers hängen von der Zusammensetzung der Monomere und der Kettenlänge ab. Das Copolymer PHBV besitzt andere mechanische und physiochemische Eigenschaften verglichen mit dem Homopolymer PHB. Ein erhöhter Anteil an HV führt zu einer höheren Stärke, Robustheit, Flexibilität, Glasübergangstemperatur sowie einer höheren Schmelztemperatur, ohne jedoch die Abbautemperatur anzuheben (Wang et al. 2013;

Nguyenhuynh et al. 2021). Mittelkettige PHA besitzen zudem andere Eigenschaften als kurzkettige PHA, MCL-PHA sind elastisch, während SCL-PHA spröde sind (Reddy et al. 2003). Die unterschiedlichen Produkteigenschaften bieten ein breites Anwendungsgebiet von PHA, beispielsweise in der Medizin, in der Landwirtschaft oder als Verpackungsmaterial in der Industrie (Chen 2009; Raza et al. 2019; Vicente et al. 2023). Die Zusammensetzung und Struktur sowie der Zusatz von Additiven beeinflussen, neben der möglichen Anwendung, zudem die Abbaubarkeit in der Natur (Emadian et al. 2017; Dilkes-Hoffman et al. 2019). Diese variiert zwischen 14 und 49 Tagen im Meer und 60 bis 300 Tagen im Boden, was jedoch ebenfalls abhängig von Umweltfaktoren wie Temperatur, Feuchtigkeit und pH-Wert ist (Emadian et al. 2017). Einer Berechnung von Dilkes-Hoffman et al. (2019) nach benötigt eine Plastikflasche aus PHA 1,5-3,5 Jahre, um im Meer vollständig abgebaut zu werden.

Die Art des produzierten PHA hängt von dem produzierenden Organismus und der Art des Substrates ab (Serafim et al. 2008; Muneer et al. 2020; Vicente et al. 2023). PHA wird intrazellulär in Form von 0,2-0,5 µm großen, hydrophoben Granula hergestellt (Sudesh et al. 2000; Jendrossek 2009; Muneer et al. 2020) (Abbildung 2 A). Eine Phospholipidschicht bildet die Außenhülle der Granula, an der die am PHA-Produktionsprozess beteiligten Enzyme gebunden sind (Sudesh et al. 2000; Vicente et al. 2023). Daran beteiligt sind verschiedene Enzyme, darunter Strukturproteine zur Stabilisierung der Granula (PhaP, PhaI, PhaF u.a.), Regulatorproteine (PhaR, PhaQ) sowie Enzyme zur Aktivierung der PHA-Produktion (PhaM) und zum Abbau des Polymers (PhaY, PhaZ) (Jendrossek 2009; Choi et al. 2020; Muneer et al. 2020). Das wichtigste Enzym ist die PHA-Synthase (PhaC), welche (R)-3-Hydroxyacyl-CoA bzw. (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA zu PHA polymerisiert (Chek et al. 2019). PhaA, PhaB, PhaC und PhaE sind teilweise ebenfalls an der Synthese des Polymers beteiligt (Jendrossek 2009; Muneer et al. 2020).

Es sind verschiedene Gen-Cluster zur Expression der Enzyme bekannt, welche je nach Organismus unterschiedlich sind (Abbildung 2 B). Das am besten untersuchte Cluster ist das *phaCAB*-Gencluster des Bakterienstammes *Ralstonia eutropha* (heute *Cupriavidus necator*) H16 (Rehm und Steinbüchel 1999; Muneer et al. 2020). Vier unterschiedliche Klassen der PHA-Synthase sind bekannt, sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität und im Aufbau der Untereinheiten. Sie besitzen eine hohe Homologie zueinander und beinhalten einige konservierte Regionen (Amara und Moawad 2011; Mezzolla et al. 2018). Die Klassen I und III der PHA-Synthase stellen SCL-PHA her, während die Klasse II MCL-PHA synthetisiert. PHA-Synthasen der Klassen I und II besitzen nur eine Untereinheit mit 60-70 kDa und sind unter anderem in *Cupriavidus necator* und

Pseudomonas putida zu finden (Rehm und Steinbüchel 1999; Amara und Moawad 2011). Synthasen der Klassen III und IV finden sich in *Allochrocatium vinosum* und *Bacillus megaterium*, wobei die Klasse IV bisher nur in der Gattung *Bacillus* gefunden wurde. Diese beiden Klassen von Synthasen besitzen jeweils zwei Untereinheiten von 40 und 20-40 kDa, PhaC/PhaE in Klasse III und PhaC/PhaR in Klasse IV (Jendrossek 2009; Tsuge et al. 2015; Mezzolla et al. 2018). Die PHA-Synthasen aus der Klasse IV bevorzugen ebenfalls SCL-Monomere zur Polymerisierung (Tsuge et al. 2015; Mezzolla et al. 2018).

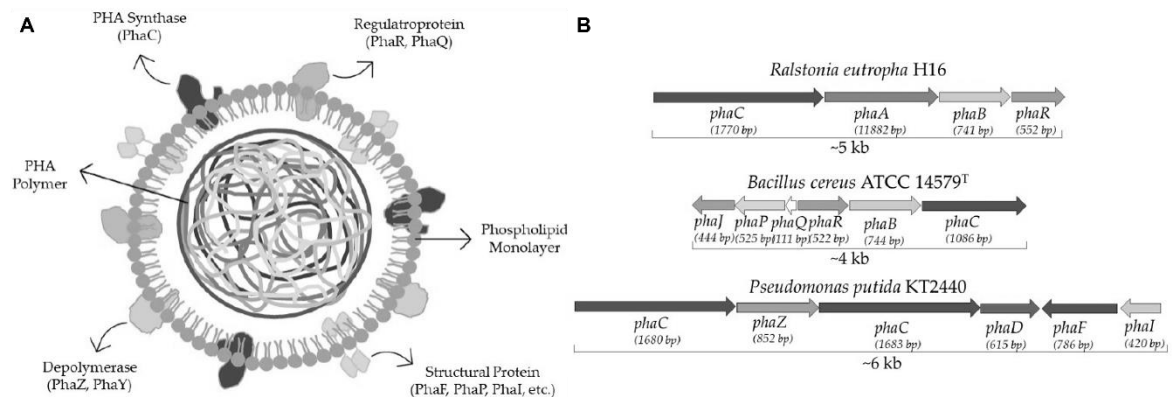


Abbildung 2: Gene und Enzyme der PHA-Synthese. A) Schematischer Aufbau eines PHA-Granulums mit daran gebundenen Enzymen. B) Beispiele für Gen-Cluster zur Expression an der PHA-Synthese beteiligter Enzyme: *phaCAB*-Cluster von *Ralstonia eutropha* H16, Gen-Cluster von *Bacillus cereus* zur SCL-PHA-Synthese und *phaC1ZC2D*-Cluster von *Pseudomonas putida* zur MCL-PHA-Synthese. Modifiziert nach Vicente et al. (2023).

Die Synthese von PHA verläuft in zwei hauptsächlichen Schritten, zum einen in der Gewinnung von (R)-3-Hydroxyacyl-CoA bzw. (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA und zum anderen in der Polymerisierung dieser Einheiten durch die PHA-Synthase (Choi et al. 2020). Die Gewinnung von (R)-3-Hydroxyacyl-CoA und (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA erfolgt über drei Stoffwechselwege, abhängig von dem vorhandenen Substrat und dem PHA-produzierenden Organismus (Serafim et al. 2008; Chen et al. 2015a; Nguyenhuynh et al. 2021) (Abbildung 3). Bei Verwendung von Zucker als Substrat erfolgt die PHA-Synthese über die Acetoacetyl-CoA-Synthase nach Abbau über die Glykolyse oder über die β -Oxidation. Dies wird beispielsweise durch *Cupriavidus necator* durchgeführt. Dabei katalysieren die Enzyme PhaA, PhaB und PhaC die Umwandlung von Acetyl-CoA zu (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA über Acetoacetyl-CoA (Serafim et al. 2008; Chen et al. 2015a; Nguyenhuynh et al. 2021). Aus Acetat als Substrat wird, unter Kondensierung zu zwei Molekülen Acetyl-CoA, PHB aus (R)-3-Hydroxybutyryl-CoA hergestellt. Propionat kann zu Acetyl-CoA und zu Propionyl-CoA abgebaut werden, wodurch sowohl PHB als auch PHV hergestellt werden können. Butyrat kann analog für die Gewinnung von PHB und PHV genutzt werden, aber auch über die β -Oxidation verstoffwechselt werden (Serafim et al.

2008). Die β -Oxidation wird vor allem bei dem Vorhandensein von Fettsäuren als Substrat genutzt. Über diesen Weg werden hauptsächlich MCL-PHA synthetisiert, wenngleich auch durch Umwandlung von Enoyl-CoA-Zwischenprodukten zu (R)-3-Hydroxyacyl-CoA durch das Enzym (R)-Enoyl-CoA-Hydratase (PhaJ) die Möglichkeit der Synthese von SCL-PHA besteht (Sudesh et al. 2000; Tsuge et al. 2003; Serafim et al. 2008). Über die de novo Fettsäuresynthese, welche Fettsäuren, Aminosäuren und Zucker als Substrat nutzt, werden ebenfalls MCL-PHA hergestellt. Das Kernenzym hierbei ist PhaG, welches (R)-3-Hydroxyacyl-ACP zu (R)-3-Hydroxyacyl-CoA umwandelt. Die Letzten beiden Stoffwechselwege werden beispielsweise von einigen *Pseudomonas*-Arten (*P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. oleovorans*) zur Herstellung von MCL-PHA genutzt (Serafim et al. 2008; Nguyenhuynh et al. 2021).

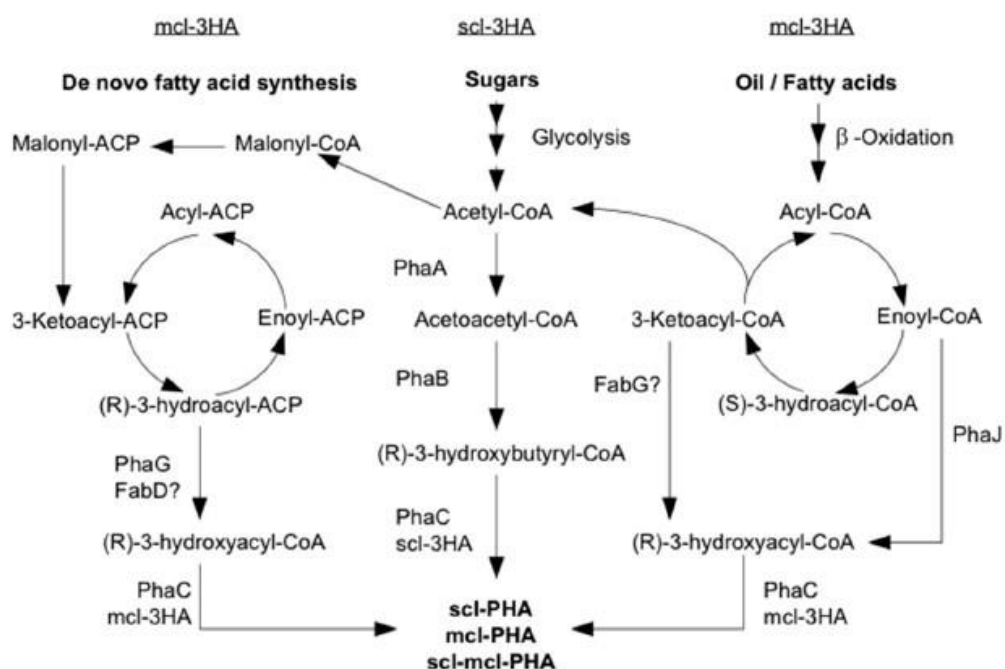


Abbildung 3: Biosynthese-Wege zur Herstellung von PHA. Aus den unterschiedlichen Ausgangsstoffen folgen verschiedene Stoffwechselwege zur PHA-Herstellung, wobei Zucker über die Glykolyse und Fettsäuren über die de novo Fettsäuresynthese oder die β -Oxidation metabolisiert werden. PhaA: β -Ketothiolase, PhaB: NADPH-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase, PhaC: PHA-Synthase, PhaG: 3-Hydroxyacyl-ACP-Co-Transferase, PhaJ: (R)-Enoyl-CoA-Hydratase, FabD: Malonyl-CoA-ACP-Transacylase, FabG: 3-Ketoacyl-CoA-Reduktase, scl: kurzkettige PHA, mcl: mittelkettige PHA, 3HA: 3-Hydroxyalkanoate. Nach Dalton et al. (2022) (Original von Yu 2007).

Die Expression der entsprechenden Gene zur Nutzung des jeweiligen Stoffwechselweges wird, entsprechend des im jeweiligen Organismus vorhandenen Gen-Repertoires, anhand des vorhandenen Substrates angepasst (Nguyenhuynh et al. 2021). Die Stoffwechselwege zur PHA-Produktion sind hauptsächlich in Reinkulturen untersucht, aber eine ähnliche Funktionsweise in Mischkulturen wird angenommen (Serafim et al. 2008). Die Produktion

von PHA wird über spezifische Regulatoren im *pha*-Gen-Cluster induziert, wenn bestimmte Stressfaktoren, wie beispielsweise ein Nährstoff- oder Substratmangel, vorliegen (Anderson und Dawes 1990; Sudesh et al. 2000; Nguyenhuynh et al. 2021; Manoli et al. 2022). Dabei produzieren die meisten Bakterien das Polymer während der stationären Wachstumsphase (Ciobotă et al. 2010; Vicente et al. 2023).

1.3 PHA-Herstellung mit mikrobiellen Mischkulturen

Die Herstellung von PHA aus Restströmen mittels mikrobieller Mischkulturen erfolgt in einem mehrstufigen Prozess, der je nach Variation meist zwei bis drei Stufen enthält (Serafim et al. 2008; Valentino et al. 2017; Nguyenhuynh et al. 2021). In der Regel besteht das Verfahren aus einem Schritt zur Herstellung eines Substrates, welches im zweiten Schritt zur Selektion einer Bakterienbiozönose mit erhöhtem PHA-Produktionspotenzial und im dritten Schritt zur Produktion des Polymers mit der selektieren Biozönose verwendet wird (Dionisi et al. 2005b; Albuquerque et al. 2007; Pittmann und Steinmetz 2017; Khatami et al. 2021; Nguyenhuynh et al. 2021) (Abbildung 4).

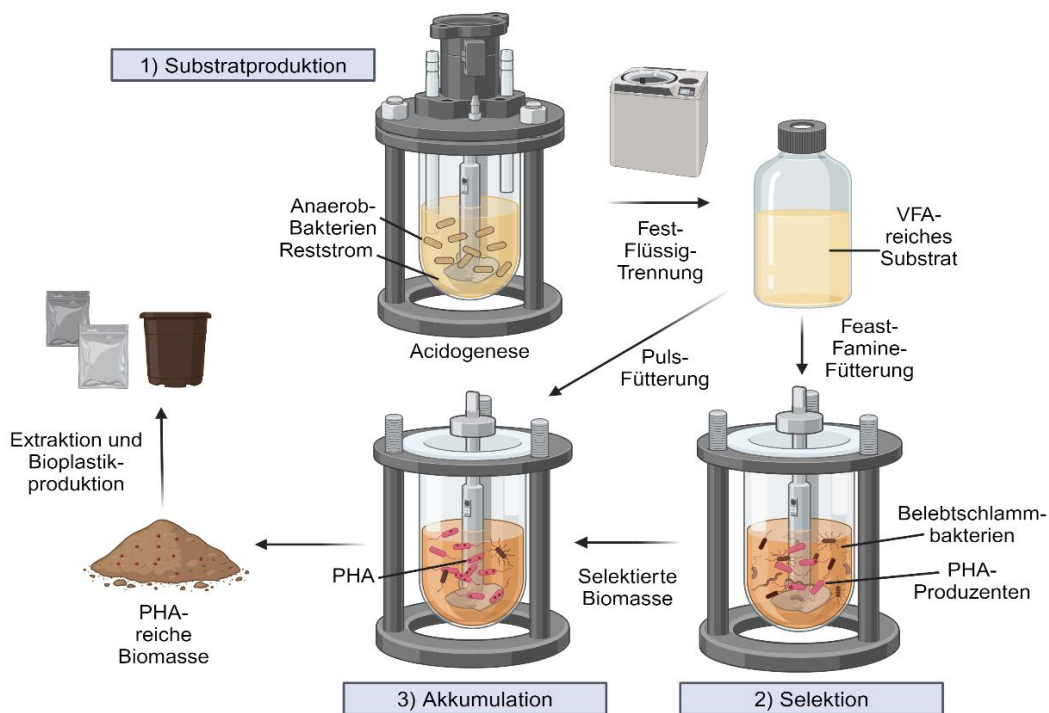


Abbildung 4: Verfahrensschema zur PHA-Produktion mit mikrobiellen Mischbiozönosen. Erstellt mit BioRender.com

Je nach verwendetem Substrat, beispielsweise unter Nutzung von synthetischem Substrat (Serafim et al. 2004; Lemos et al. 2006), Glycerol (Moralejo-Gárate et al. 2013;

Nguyenhuynh et al. 2021) oder Überschussschlamm (Guo et al. 2024), kann auf den ersten Schritt der Substratherstellung verzichtet werden, sodass der Prozess nur aus zwei Stufen besteht. Zudem gibt es Ansätze zum Verzicht auf den Selektionsschritt, um Kosten in Form eines verringerten Substrat- und Energieverbrauchs einsparen zu können (Valentino et al. 2012; Valentino et al. 2017; Morgan-Sagastume et al. 2019). Allerdings besteht der Vorteil im Selektionsprozess darin, dass PHA-produzierende Mikroorganismen angereichert und damit die PHA-Ausbeute erhöht werden können (Majone et al. 1996; Dias et al. 2006). Mit Mischbiozönosen unter Verwendung dieses mehrstufigen Verfahrens konnten bisher mit bis zu 89 %¹ mit synthetischem (Johnson et al. 2009) und 80,5 % mit einem Substrat aus Fruchtabfall (Matos et al. 2021a) PHA-Gehalte erzielt werden, die vergleichbar mit den durch Reinkulturen erzeugten PHA-Gehalten sind (80-90 % (Dias et al. 2006)). Der Bereich an hergestelltem PHA-Gehalt bezogen auf die Biomasse mit Mischbiozönosen liegt im Allgemeinen bei 20-80 % (Valentino et al. 2017; Nguyenhuynh et al. 2021). Ein mit einem aus Restströmen gewonnenen VFA-reichen Substrat erzielbarer Bereich der PHA-Produktion liegt laut Schätzung von Valentino et al. (2017) zwischen 45 und 55 %.

Ein häufig in diesem Verfahren genutztes Substrat stellen leichtflüchtige Fettsäuren (VFA „volatile fatty acids“), dar, da sie einfach aus Fermentation von Restströmen oder -stoffen gewonnen werden können, somit günstig sind, und weil sie eine direkte Vorstufe zur Herstellung von PHA bilden (Serafim et al. 2008; Chen et al. 2015a; Valentino et al. 2017). Die Substratproduktion erfolgt durch Umsetzung Kohlenstoffreicher Verbindungen in Restströmen zu Fettsäuren durch anaeroben Abbau einer Bakteriengesellschaft aus Klärschlamm. Anschließend wird der Anerobschlamm durch eine Fest-Flüssig-Trennung von dem Substrat abgetrennt (Abbildung 4, Substratproduktion) (Valentino et al. 2017). Dieses Substrat wird in der nächsten Prozessstufe in einem bestimmten Selektionsverfahren an eine Bakterienmischbiozönose aus Belebtschlamm verfüttert (Abbildung 4, Selektion) (Serafim et al. 2008; Valentino et al. 2017). In Belebtschlämmen sind zwar Mikroorganismen vorhanden, welche zur Herstellung von PHA fähig sind, jedoch machen sie nur einen geringen oder unbestimmten Anteil der Biozönose aus. Daher werden diese PHA-akkumulierenden Bakterien aus der Mischbiozönose des Belebtschlammes zunächst selektiert und angereichert (Majone et al. 1996; Dias et al. 2006). Eine Selektion dieser Bakterien kann durch einen Wechsel der Substratverfügbarkeit erreicht werden, indem einem aeroben Reaktor zyklisch VFA zugegeben werden (Majone et al. 1996) (Abbildung 5 A). In der Phase der Substratverfügbarkeit (feast-Phase) müssen, neben der

¹ Gewichtsprozent, oft in g/oTS oder g/TS. Im Folgenden verkürzt als % geschrieben.

Kohlenstoffquelle in Form von VFA, essenzielle Nährstoffe wie Stickstoff und Phosphor in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, sodass ein Wachstum stattfinden kann (Reis et al. 2011; Oliveira et al. 2017). Alle im Belebtschlamm vorkommenden heterotrophen Bakterien nutzen in dieser Phase das Substrat zur Zellatmung und zum Biomasseaufbau, einige sind außerdem in der Lage das Substrat zum Aufbau interner Kohlenstoffspeicher in Form von Polymeren zu verwenden (Majone et al. 1996; Valentino et al. 2017). Nach Aufbrauchen des Substrates, sind die Bakterien bis zur nächsten VFA-Zugabe einem Substratmangel ausgesetzt (famine-Phase). In dieser Phase können die PHA-akkumulierenden Bakterien die zellinternen Polymerspeicher als Energie- und Kohlenstoff-Quelle nutzen und wachsen, während Bakterien ohne die Fähigkeit zur PHA-Speicherung verdrängt werden. Bei mehrfacher Wiederholung der Zyklen mit feast- und famine-Phasen kommt es durch diesen Selektionsvorteil zur Anreicherung der polymerspeichernden Bakterien (Majone et al. 1996; Valentino et al. 2017). Anhand einer Sauerstoffmessung in den Reaktoren, können die feast- und famine-Phasen verfolgt werden, da nach Substratzugabe infolge der Zellatmung der Sauerstoffgehalt absinkt, bis das Substrat verbraucht ist, und dann wieder beginnt anzusteigen (Abbildung 5 A). Die Dauer der feast-Phase verringert sich nach einer Anpassungsphase in der Selektion. Das Verhältnis der beiden Phasen kann daraufhin als Indikator für den Erfolg der Selektionsphase verwendet werden, da es Aufschluss über den Selektionsdruck auf die nicht PHA-produzierenden Organismen gibt. Ein Verhältnis von unter 0,2-0,4 wird als effektiv angesehen (Albuquerque et al. 2010; Reis et al. 2011; Oliveira et al. 2017). Beide Phasen zusammen bzw. die Zeit zwischen den Substratzugaben wird als Zyklus bezeichnet.

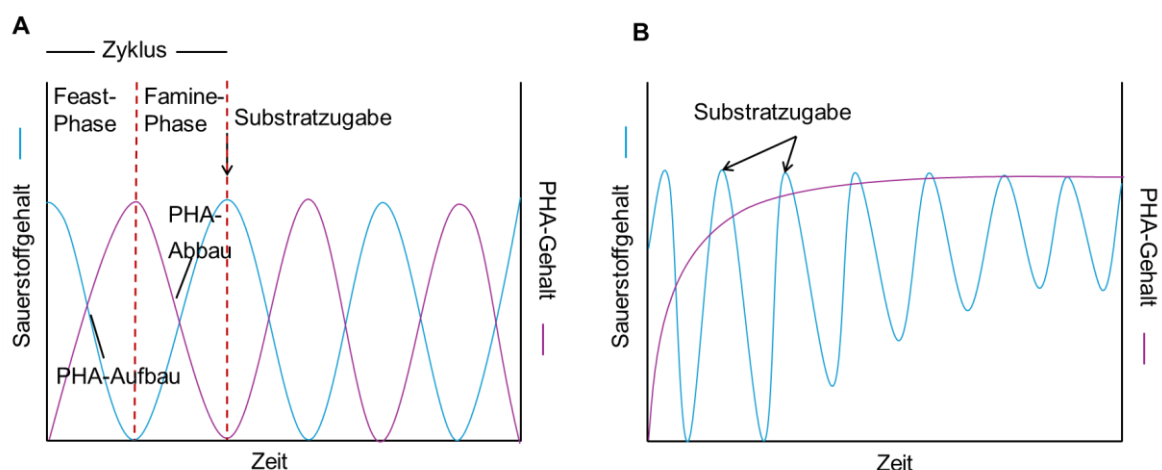


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Selektions- und Akkumulationsphase im Prozess zur PHA-Produktion mit mikrobiellen Mischbiozönosen. Dargestellt ist der Verlauf des Sauerstoffgehaltes sowie der PHA-Produktion in A) Der Selektionsphase unter Verwendung des Feast- und Famine-Fütterungsregimes zur Selektion PHA-produzierender Bakterien, B) Der Akkumulationsphase im mehrstufigen Prozess zur Biopolymerherstellung aus Restströmen.

Die selektierte Biozönose mit einem erhöhten Anteil PHA-produzierender Bakterien kann anschließend zur Polymerproduktion genutzt werden (Albuquerque et al. 2007; Valentino et al. 2017) (Abbildung 4, Akkumulation). Diese erfolgt im Batchmodus unter aeroben Bedingungen und stoßweiser Substratzugabe über einen festen Zeitraum mit festgelegten Intervallen oder anhand einer Steuerung über den Sauerstoffverbrauch (Feed-on-demand) (Serafim et al. 2004; Coats et al. 2016; Valentino et al. 2017; Oliveira et al. 2018; Tu et al. 2019) (Abbildung 5 B). Da in diesem Prozessschritt die Nutzung des Substrates durch die Bakterien zum Wachstum unterdrückt werden soll und sie dieses hauptsächlich zur PHA-Produktion verwenden sollen, werden die Bakterien einem Nährstoffmangel ausgesetzt (Serafim et al. 2004; Cavaillé et al. 2013; Valentino et al. 2017). Auch hier kann nach jeder Substratzugabe ein Sauerstoffverbrauch gemessen werden, welcher über die Dauer der Akkumulationsphase jedoch immer geringer wird, da es zu einer Sättigung der Substratnutzung sowie der PHA-Produktion kommt. Bei Eintreten der Sättigung oder nach Ende des festgelegten Zeitraums ist die Akkumulationsphase beendet und die Biomasse kann geerntet werden (Oliveira et al. 2018; Moretto et al. 2020). Im Anschluss kann eine Extraktion und Weiterverarbeitung des produzierten Polymers stattfinden.

1.3.1 Substratproduktion

Bisher wurden einige verschiedene Restströme und -stoffe als Grundlage für die Substratproduktion bzw. als Substrat für die PHA-Produktion mit mikrobiellen Mischbiozönosen genutzt. Dazu zählten unter anderem kommunale Abwässer, Schlämme und Feststoffabfälle, Industrieabwässer aus der Papier-, Süßigkeiten-, Olivenöl-, Fruchtsaft sowie Käseproduktion und aus der Brauerei (Dionisi et al. 2005b; Bengtsson et al. 2008b; Bengtsson et al. 2008a; Pittmann und Steinmetz 2014; Ben et al. 2016; Oliveira et al. 2017; Carvalho et al. 2018; Moretto et al. 2020; Matos et al. 2021b, 2021a; Laumeyer et al. 2025; Moronkola et al. 2025). Zumeist erfolgt die Substratherstellung durch Versäuerung des Reststroms oder -stoffes zur Gewinnung von VFA, in manchen Fällen, wie beispielsweise bei Verwendung von Glycerol, kann der Reststrom allerdings auch ohne weitere Vorbehandlung verwendet werden (Moralejo-Gárate et al. 2013; Nguyenhuynh et al. 2021).

Die Versäuerung ist Teil des anaeroben Stoffwechsels von Mikroorganismen zur Methanogenese, bei dem organische Verbindungen in vier Schritten zu Kohlenstoffdioxid und Methan abgebaut werden (Atasoy et al. 2018; Richard et al. 2019). Zunächst erfolgen die Hydrolyse und der Abbau von Zuckern, Proteinen und Lipiden zu Aminosäuren, Kohlenhydraten und Fettsäuren (Noike et al. 1985; Mir et al. 2016). Diese werden im Anschluss über unterschiedliche Gärungswege zu VFA, Alkoholen und weiteren

niedermolekularen Verbindungen abgebaut (Acidogenese bzw. Versäuerung) (Zhou et al. 2018). Syntrophe, acetogene Bakterien stellen hieraus Acetat (Acetogenese) als Ausgangsstoff für die Methanbildung durch methanogene Bakterien und Archaeen her (Methanogenese) (Mir et al. 2016; Amha et al. 2018). Zu den VFA zählen unter anderem Acetat, Propionat, iso- und n-Butyrat, iso- und n-Valerat und Capronat (Agnihotri et al. 2022). Eine VFA-Herstellung aus Restströmen wird oftmals mithilfe einer Mikroorganismengesellschaft aus Klärschlamm unter anaeroben Bedingungen und kontrollierten Prozessvariablen durchgeführt (Lee et al. 2014; Atasoy et al. 2018). Der Stoffwechselprozess der Biozönose wird zur VFA-Gewinnung nach der Versäuerung durch Einstellung des pH-Wertes oder mithilfe der Aufenthaltszeit gestoppt, um eine weitere Metabolisierung der organischen Verbindungen zu Methan zu verhindern (Beccari et al. 2009; Reis et al. 2011; Valentino et al. 2017; Atasoy et al. 2018).

Bei der VFA-Herstellung sind dabei, unter Berücksichtigung der späteren PHA-Produktion, die wichtigsten Zielgrößen die VFA-Ausbeute bzw. der Versäuerungsgrad und die VFA-Zusammensetzung, da diese Einfluss auf die PHA-Ausbeute und -Zusammensetzung haben (Lemos et al. 2006; Albuquerque et al. 2007; Hao et al. 2017; Vázquez-Fernández et al. 2022; Moronkola et al. 2025). Die Menge an Kohlenstoffverbindungen sowie VFA im Rohstoff und im Substrat wird meistens als Summenparameter CSB angegeben, dem chemischen Sauerstoffbedarf. Ein hoher Versäuerungsgrad, der Anteil produzierter VFA im Substrat an den Kohlenstoffverbindungen in Form der CSB-Konzentration im eingesetzten Rohstoff (Atasoy et al. 2018; Vázquez-Fernández et al. 2022), führt demnach zu einer erhöhten VFA-Konzentration im Substrat und einer höheren möglichen PHA-Produktion im weiteren Prozess (Moronkola et al. 2025). Mit den bereits erwähnten Restströmen konnten beispielsweise Versäuerungsgrade zwischen 25 und 82 % erreicht werden (Dionisi et al. 2005b; Bengtsson et al. 2008a). Der Anteil an VFA am löslichen CSB im Substrat ist ebenso ein wichtiger Faktor, da ein hoher nicht-VFA-Anteil das Wachstum anderer Mikroorganismen durch einen verminderten Selektionsdruck während der famine-Phase begünstigen kann (Bengtsson et al. 2008b; Jia et al. 2014; Valentino et al. 2017). Die VFA-Zusammensetzung beeinflusst die PHA-Zusammensetzung insofern, dass die Bildung von PHV durch einen hohen VFA-Anteil mit ungerader Anzahl an Kohlenstoff-Atomen (Propionsäure (HPro) und Valeriansäure (HVal)) begünstigt wird, wohingegen PHB eher bei Vorhandensein von VFA mit gerader Anzahl an Kohlenstoff-Atomen (Essigsäure (HAc), Buttersäure (HBu) und Capronsäure (HCap)) synthetisiert wird (Lemos et al. 2006; Jiang et al. 2011a; Hao et al. 2017). Da ein erhöhter HV-Anteil im Polymer zu verbesserten Produkteigenschaften wie einer erhöhten Elastizität führt (Wang et al. 2013), wird die

Beeinflussung der PHA-Zusammensetzung in diese Richtung oftmals angestrebt (Nguyenhuynh et al. 2021).

Die Variablen, die in der Versäuerungsstufe eine wichtige Rolle spielen, sind unter anderem die Aufenthaltszeit (Lee et al. 2014; Valentino et al. 2017; Atasoy et al. 2018), die Zusammensetzung und Konzentration des eingesetzten Stoffes (Garcia-Aguirre et al. 2017; Shen et al. 2017; Atasoy et al. 2018), die Eigenschaften der Biozönose (Wang et al. 2014; Huang et al. 2018b; Atasoy et al. 2019), der pH-Wert (Jiang et al. 2013; Chen et al. 2017; Garcia-Aguirre et al. 2017; Huang et al. 2018b) sowie die Temperatur (Jiang et al. 2013; Garcia-Aguirre et al. 2017; Atasoy et al. 2018). Ein geeigneter Rahmen für die VFA-Produktion liegt bei einem pH-Wert von über 8 oder unter 5,5, abhängig vom Rohstoff, (Reis et al. 2011; Jiang et al. 2013; Kuruti et al. 2017; Pittmann und Steinmetz 2017; Atasoy et al. 2018; Vázquez-Fernández et al. 2022), einer mesophilen Temperatur (Jiang et al. 2013; Garcia-Aguirre et al. 2017; Pittmann und Steinmetz 2017), einer Aufenthaltszeit von 6 Tagen (Ujang et al. 2007; Chen et al. 2017) oder, je nach Rohstoff, bis zu 20 Tagen (Wang et al. 2014; Atasoy et al. 2018). Unter Verwendung von Brauereiabwasser, einer Aufenthaltszeit von 6 Tagen, einem pH-Wert von 5,5 und einer mesophilen Temperatur zur VFA-Herstellung konnte in eigenen Untersuchungen ein Versäuerungsgrad von 67 % erreicht werden. 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. Auch die Versuche von Ben et al. (2016) und Tamang et al. (2019) demonstrierten eine gute Eignung von Brauereiabwasser als Grundlage für die PHA-Produktion. Aus diesem Grund wurde dieses Abwasser in den Versuchen dieser Arbeit als Substratgrundlage ausgewählt. Da der Fokus dieser Arbeit in der Untersuchung der PHA-produzierenden Bakteriengemeinschaft liegt, wird auf eine detaillierte Betrachtung dieses Prozessschrittes im Weiteren verzichtet.

1.3.2 Selektion

Die Selektionsphase soll durch Anreicherung von Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion in der Mischbiozönose aus Belebtschlamm zu einer verbesserten PHA-Produktion in der Akkumulation dienen. Dabei gehen verschiedene Autoren davon aus, dass diese vorgeschaltete Selektionsphase für eine gute PHA-Ausbeute nötig ist (Majone et al. 1996; Dias et al. 2006; Albuquerque et al. 2010; Huang et al. 2018a; Khatami et al. 2021; Nguyenhuynh et al. 2021), wohingegen andere Forschungsgruppen auf eine Selektionsphase verzichten oder nur eine kurze Akklimatisierungsphase nutzen (Valentino

et al. 2012; Werker et al. 2018; Morgan-Sagastume et al. 2019; Pei et al. 2022). Valentino et al. (2012) beispielsweise untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Längen der Selektionsphase und kamen zu dem Ergebnis, dass eine längere Selektion der Biomasse nicht vorteilhaft ist, da auch mit einer kurz akklimatisierten Mischkultur von 3-7 Tagen mit 48 % ein ähnlich hoher PHA-Gehalt erzielt werden konnten wie mit einer über eine Dauer von 146-153 Tagen angereicherten Biomasse (50,3 %). Der PHA-Gehalt stieg dabei sowohl in den kurzen Versuchen als auch in dem Langzeitversuch in den ersten 7 Tagen an, sank danach allerdings ab (Valentino et al. 2012). Bei einer Studie von Huang et al. (2018) wurde zwar auch nach einer Woche der Selektion bereits ein hoher PHA-Gehalt erreicht, dieser sank jedoch ebenfalls zunächst und es stellte sich erst nach einer Dauer von 50 Tagen eine stabile PHA-Produktion mit einem Wert von ca. 60 % ein. Weitere Forschungsgruppen gehen ebenfalls von einer Dauer zwischen 30-50 Tagen bis zum Einstellen einer Prozessstabilität aus (Villano et al. 2010; Valentino et al. 2014; Carvalho et al. 2018; Matos et al. 2021a, 2021b; Clagnan und Adani 2023).

Die Selektion kann, neben der Anpassung der Selektionsdauer, unter anderem durch die Substratkonzentration, das Schlammalter, die Nährstoffverfügbarkeit und die Zyklusdauer beeinflusst werden (Valentino et al. 2017; Nguyenhuynh et al. 2021). Die Einstellung einer hohen Substratkonzentration bzw. Raumbelastung, der Zulaufkonzentration pro Tag im Reaktor, kann bis zu einem gewissen Punkt zu einer verbesserten PHA-Produktionsrate führen, wobei jedoch eine zu hohe Konzentration zu einer Verschlechterung der Produktionsperformance führen kann (Dionisi et al. 2006; Albuquerque et al. 2010; Ben et al. 2016; Crognale et al. 2022). Crognale et al. (2022) verglichen Raumbelastungen von 4,25, 8,5, 12,75 und 18 gCSB/(L*d) bei einem Schlammalter von 1 d und einer Zyklusdauer von 12 h, wobei die Raumbelastung von 12,75 gCSB/(L*d) die besten Ergebnisse lieferte. Bei den Raumbelastungen von 4,25-12,75 gCSB/(L*d) war, im Gegensatz zu 18 gCSB/(L*d), zudem ein hoher Anteil potenzieller PHA-Produzenten im System festzustellen, wobei *Thauera*, *Paracoccus* und *Rhodobacter* die dominantesten Gattungen waren. Diese zeigten außerdem Unterschiede in der Abundanz zwischen den Raumbelastungen. Dionisi et al. (2006) konnten bei einer Erhöhung der Raumbelastung von 8,5 auf 31,25 gCSB/(L*d) eine erhöhte Biomasseproduktion in Kombination mit einer verminderten PHA-Produktion beobachten und sie erreichten die höchste PHA-Produktionsperformance mit einer mittleren Raumbelastung von 20 gCSB/(L*d). Teils nutzte zudem die gleiche Forschungsgruppe unterschiedliche Raumbelastungen, was in einer Variation des damit erzielten PHA-Gehaltes resultierte. Trotz der niedrigeren Raumbelastung von 8,7 im Vergleich zu 12,3 gCSB/(L*d) wurden unter Verwendung der gleichen Zyklusdauer von 12 h und des gleichen Schlammalters von 4 d 80,5 % im

Vergleich zu 69 % PHA erzielt (Matos et al. 2021a, 2021b). Die abnehmende PHA-Produktivität bei zunehmender Substratkonzentration steht in Zusammenhang mit dem durch eine hohe Substratverfügbarkeit während der famine-Phase abnehmenden Selektionsdruck auf die nicht-PHA-Produzenten (Chen et al. 2017; Nguyenhuynh et al. 2021; Guo et al. 2024). Zudem bewirkt der Substratmangel während der famine-Phase eine intrazelluläre enzymatische Limitation des Zellwachstums und induziert die PHA-Produktion bei den dazu fähigen Organismen (Nguyenhuynh et al. 2021). Bei einer zu hohen Substratkonzentration ohne Verlängerung der Zyklusdauer verlängert sich die feast-Phase, wodurch auch die PHA-Produzenten eher zu einem Zellwachstum als zur PHA-Produktion angeregt werden (Nguyenhuynh et al. 2021). Es kann zudem bei zu hoher Substratkonzentration zu einer Substratinhibierung kommen, was die Aktivität der Bakterienkultur insgesamt beeinträchtigt (Chen et al. 2015b; Li et al. 2024). In der Literatur genutzte Raumbelastungen mit einer Mischkultur, einem Schlammalter von 2-4 d und einer Zyklusdauer von 12 h liegen häufig im Bereich von 0,36-8,5 gCSB/(L*d) (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. Bei einem Mangel wird das Zellwachstum eingeschränkt und es kommt zu einem erhöhten Selektionsdruck auf die nicht-PHA-Produzenten in der Mischbiozönose und zu einer erhöhten PHA-Produktion (Serafim et al. 2004; Johnson et al. 2010a; Koller et al. 2017; Silva et al. 2017). Aus diesem Grund erfolgt die an die Selektion anschließende PHA-Akkumulation zumeist unter Stickstoffmangelbedingungen (Serafim et al. 2004; Reis et al. 2011). Jedoch wird zu einer hohen Produktivität des Systems auch eine hohe Biomassekonzentration und somit eine ausreichende Nährstoffverfügbarkeit in der Selektion benötigt. Ein Nährstoffverhältnis von 100:5:1 von Kohlenstoff zu Stickstoff und Phosphor (C:N:P) wird im Allgemeinen als optimales Verhältnis für ein gutes Biomassewachstum angesehen (Hamza et al. 2019; Carvalho et al. 2022). Es gilt daher die beste Option der Nährstoffzugabe für ein gleichzeitig hohes Biomassewachstum und eine hohe PHA-Produktion zu finden (Nguyenhuynh et al. 2021). Daher gibt es Ansätze zu einer Verfahrensmodifizierung, in der Stickstoff und Kohlenstoff in der Selektionsphase separat dosiert werden, um den Selektionsdruck auf die nicht-PHA-Produzenten zu erhöhen, aber gleichzeitig ein günstiges Zellwachstum zu ermöglichen (Oliveira et al. 2017; Silva et al. 2017; Lorini et al. 2020; Crognale et al. 2022).

Weitere zu berücksichtigende Versuchsparameter während der Selektionsphase sind der pH-Wert und die Temperatur. Ein häufig in der Literatur genutzter Bereich liegt bei einer

Temperatur von 20-30 °C und einem pH-Wert von 7-9, wobei diese Parameter teils im Prozess nicht geregelt werden (Nguyenhuynh et al. 2021). Villano et al. (2010) stellten fest, dass ein pH-Wert zwischen 7,5 und 9,5 einen günstigen Bereich für das Wachstum und die Polymerproduktion der Bakterien in der Selektionsphase darstellt, wobei mit einem Wert von 7,5 die beste PHA-Produktionsperformance erzielt wurde. Je nach pH-Wert variierte auch die Bakterienzusammensetzung. *Lampropedia hyalina* war bei einem pH-Wert von 7,5 dominant, wobei die Gattungen *Acinetobacter* und *Thauera* bei einem pH-Wert von 8,5 und *Bacillus pseudofirmus* sowie *Exiguobacterium sp.* bei einem Wert von 9,5 dominierten. Valentino et al. (2020) untersuchten den Einfluss von Temperaturschwankungen (16,9-33 °C) in der Selektion und Akkumulation im Pilotbetrieb und konnten beobachten, dass mit steigender Temperatur eine erhöhte Substrataufnahme in der Selektionsphase stattfand, allerdings gab es keinen linearen Zusammenhang zwischen PHA-Produktionsperformance in der Akkumulationsphase und der Temperatur. Jiang et al. (2011b) zeigten einen Einfluss der Temperatur auf die Zusammensetzung der Biozönose. Bei einer Temperatur von 20 °C dominierte die Gattung *Zoogloea*, während bei 30 °C *Plasticicumulans acidovorans* dominant war. Crognale et al. (2019) stellten ebenfalls einen Einfluss der Temperatur sowie der Substratzusammensetzung auf die Zusammensetzung der Bakterienkultur fest.

Die Zyklusdauer und das Schlammalter, die durchschnittliche Verweilzeit des Belebtschlammes im System, sind ebenfalls Einflussfaktoren innerhalb der Selektionsphase. Die Versuche von Moretto et al. (2020) fokussierten sich auf die Auswirkungen unterschiedlicher Verhältnisse des Schlammalters zur Zykluslänge. Die besten Ergebnisse von 59 % PHA erzielten sie mit einem Schlammalter von 1 d und einer Zykluslänge von 12 h und dem damit geringsten untersuchten Verhältnis von Schlammalter zu Zykluslänge (Moretto et al. 2020). Eine Studie von Chen et al. (2017) befasste sich mit dem Einfluss verschiedener Kombinationen der Substratkonzentration, des Schlammalters und der Biomassekonzentration auf die PHA-Produktion. 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. Die Untersuchungen von Matos et al. (2021b) und Guarda et al. (2024) zeigten, dass ein Schlammalter von 4 Tagen im Vergleich zu 2 Tagen zu einer Verbesserung der PHA-Produktionsperformance führte. Sie untersuchten zudem unterschiedliche Raumbelastungen in ihren Versuchen und fanden Unterschiede zwischen den Schlammaltern und den Raumbelastungen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose. Matos et al. (2021b) beobachteten eine höhere Wachstumsrate in Kombination mit einer verminderten PHA-Produktion bei der Biozönose mit einem

Schlammalter von 2 d. Sie fanden zudem einen Zusammenhang der PHA-Ausbeute mit der Abundanz potenzieller PHA-Produzenten. Johnson et al. (2010a) fanden heraus, dass ein Schlammalter von 4 d im Vergleich zu 1 d und 0,5 d eine bessere PHA-Produktionsperformance aufwies, wohingegen bei den geringeren Schlammaltern ein Wachstum bevorzugt wurde und der Selektionsdruck durch eine verlängerte feast-Phase verringert wurde. Coats et al. (2007) beobachteten eine verbesserte PHA-Produktionsperformance mit einem Schlammalter von 4 d im Vergleich zu 6 d. Ein geringeres Schlammalter wird im Allgemeinen als vorteilhafter angesehen, da ein erhöhter Selektionsdruck auf die nicht-PHA-Produzenten angenommen wird (Johnson et al. 2009; Chen et al. 2017). Daher wird ein Schlammalter zwischen 2-5 Tagen empfohlen (Nguyenhuynh et al. 2021). Zumeist wird zudem eine Zykluslänge von 12 h genutzt (Albuquerque et al. 2013; Lorini et al. 2020; Nguyenhuynh et al. 2021; Crognale et al. 2022). Jiang et al. (2011b) konnten zwar einen Einfluss der Temperatur, aber nicht der Zykluslänge (1-18 h) auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft feststellen. Dionisi et al. (2007) untersuchten Zykluslängen zwischen 1 und 8 h und fanden eine gute PHA-Produktionsperformance bei Zykluslängen von 2 und 4 h, wohingegen bei 1 und 8 h ein Zellwachstum bevorzugt wurde. Valentino et al. (2014) hingegen erzielten, mit einem PHA-Gehalt von ca. 50 %, die besten Ergebnisse mit einer Zykluslänge von 6 h. Pittmann und Steinmetz (2017) erzielten die besten Ergebnisse mit einer Temperatur von 20 °C, einem pH-Wert von 7, einer niedrigeren Raumbelastung (1,2 statt 2 gCSB(L*d)) und der kürzesten verwendeten Zyklusdauer von 24 h. Die Zykluslänge sollte unter Berücksichtigung der Raumbelastung gewählt werden, da eine zu lange feast-Phase zu einem verminderten Selektionsdruck führt (Queirós et al. 2017; Nguyenhuynh et al. 2021).

Die Zusammensetzung des in der Selektion eingesetzten Substrates kann die Zusammensetzung der Biozönose beeinflussen, da unterschiedliche Organismen verschiedene Substratpräferenzen besitzen (Coats et al. 2007; Albuquerque et al. 2013; Hao et al. 2017; Huang et al. 2020; Clagnan und Adani 2023). Carvalho et al. (2018) untersuchten die Auswirkungen verschiedener realer Substrate auf eine Bakterienmischkultur und deren PHA-Produktionsperformance. Sie beobachteten eine Veränderung in der Zusammensetzung der Mischkultur infolge des Substratwechsels, allerdings blieb die PHA-Produktionskapazität weiterhin stabil (23-25 %). Unter Verwendung von Zuckerrohrmelasse dominierten die Gattungen *Azoarcus*, *Thauera* und *Paracoccus*, während unter Zugabe von Käsemolke *Xanthobacter*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* und *Clostridium* dominant waren. Albuquerque et al. (2013) zeigten, dass unterschiedliche Organismen in der Mischkultur unter Verwendung von fermentierter Zuckermelasse unterschiedliche Präferenzen aufweisen und somit unterschiedliche

Nischen besetzten. Die Gattung *Azoarcus* präferierte Acetat und *Thauera* präferierte Butyrat, während die Gattung *Paracoccus* eine breitere Spanne an Substraten aufwies, da sie Acetat, Propionat und Butyrat konsumierte, und eine höhere Substrataufnahmerate zeigte. Huang et al. (2020) beobachteten jedoch eine Präferenz der Gattung *Thauera* für Propionat und von *Paracoccus* für Acetat und Butyrat.

1.3.3 PHA-Akkumulation

Die PHA-Produktionsperformance wird oftmals als Maßstab für die Eignung und Effektivität der Selektionsbedingungen genutzt. Dabei finden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der Biomasse aus der Selektion in Batch-Versuchen PHA-Akkumulationsversuche statt, um die Performance der Mischkultur beurteilen zu können. Allerdings ist auch eine Betrachtung der Einflussparameter in diesem Prozessschritt von Bedeutung, da diese Parameter ebenfalls Einfluss auf die PHA-Produktion und -Zusammensetzung haben können. Hierzu zählen u.a. die Betriebsweise bzw. die Art der Substratdosierung, die Eigenschaften des Substrates, das Nährstoffverhältnis, die Temperatur und der pH-Wert (Kourmentza et al. 2017; Khatami et al. 2021).

Ein wichtiger Betriebsparameter während der Akkumulationsphase ist die Art der Substratdosierung. Es gibt dabei verschiedene Ansätze in der Literatur, zum einen die Substratzugabe über zeitlich festgelegte (Coats et al. 2016; Tu et al. 2019) oder an den Sauerstoffbedarf angepasst Pulse (Feed-on-demand) (Serafim et al. 2004; Valentino et al. 2015) oder eine kontinuierliche Substratzugabe (Johnson et al. 2009; Albuquerque et al. 2011). Eine häufig genutzte Methode ist die Feed-on-demand-Strategie, bei der der Substratpuls durch den Verbrauch des zuvor zugegebenen Substrates, welcher anhand des Sauerstoffgehaltes im Reaktor detektiert wird, ausgelöst wird. Die Dauer der Akkumulationsphase hängt vom Substratverbrauch ab, sie wird in der Regel beendet, wenn eine Substratsättigung eingetreten ist. Die Dauer liegt im Bereich zwischen 6-20 h (Johnson et al. 2010b; Bengtsson et al. 2017; Oliveira et al. 2018; Moretto et al. 2020). Als Substratkonzentration kann dabei eine CSB-Konzentration von 100-200 mg/L im Substrat bzw. pro Puls (Feed) genutzt werden (Valentino et al. 2015; Bengtsson et al. 2017; Pei et al. 2022).

Der pH-Wert und die Temperatur stellen ebenfalls Betriebsvariablen dar, die einen Einfluss auf die Polymerproduktion haben können. Villano et al. (2010) und Dionisi et al. (2005a) konnten zeigen, dass, unabhängig von der Substratzusammensetzung, der pH-Wert einen Einfluss auf die PHA-Zusammensetzung haben kann, wobei bei steigendem pH-Wert ein höherer HV-Anteil produziert wurde. Zudem zeigten sie, dass im Bereich von 6,5-9,5 eine

hohe PHA-Produktion möglich ist. Kourmentza und Kornaros (2016) stellten ebenfalls einen Einfluss des pH-Wertes auf die PHA-Zusammensetzung fest. Die Temperatur beeinflusst die Substrataufnahmerate, wobei bei höheren Temperaturen eine höhere Aufnahme möglich ist (Johnson et al. 2010b). Außerdem beobachteten Johnson et al. (2010b), dass eine bei 20 °C selektierte Bakterienkultur eine gute PHA-Produktionsperformance bei unterschiedlichen Temperaturen aufweist (15-30 °C). Dieser Bereich eignet sich also für die PHA-Akkumulation. Es werden daher zumeist in der Akkumulationsphase der gleiche pH-Wert sowie die gleiche Temperatur wie in der Selektionsphase eingestellt (Bengtsson et al. 2017; Huang et al. 2018a; Oliveira et al. 2018; Lorini et al. 2020; Guarda et al. 2024).

Das Nährstoffverhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff kann ebenfalls einen Einfluss auf die Polymerausbeute sowie -zusammensetzung haben (Serafim et al. 2004; Johnson et al. 2010a; Silva et al. 2017; Lorini et al. 2020). Ein Stickstoffmangel in der Akkumulationsphase hat sich in einigen Studien als günstig für die PHA-Produktion erwiesen und wird daher meistens verwendet (Serafim et al. 2004; Albuquerque et al. 2007; Johnson et al. 2010a; Reis et al. 2011). Limitierende Mengen an Phosphor während der Akkumulation können ebenfalls zur Verbesserung der PHA-Produktion infolge eines abnehmenden Zellwachstums führen (Cavaillé et al. 2013; Cavaillé et al. 2016). Lorini et al. (2020) und Silva et al. (2017), welche eine Entkopplung von Kohlenstoff und Stickstoff in der Selektion und eine Stickstofflimitation in der Akkumulation nutzten, konnten außerdem zeigen dass die Raumbelastung sowie das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff die Polymerzusammensetzung beeinflussen können. Ein niedrigeres Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff führte dabei zu einem erhöhten HV-Anteil im PHA (Silva et al. 2017). Allerdings zeigen andere Studien, dass ein Stickstoffmangel keinen Einfluss auf die PHA-Produktion hat (Dionisi et al. 2006; Jiang et al. 2012; Moralejo-Gárate et al. 2013) oder sogar eine kontrollierte Limitation von Stickstoff und Phosphor anstelle eines Mangels eine Verbesserung der Polymerproduktion herbeiführen kann (Valentino et al. 2015).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Substratzusammensetzung die PHA-Zusammensetzung beeinflussen kann. In der Regel wird eine Umsetzung von Acetat und Butyrat zu HB und Propionat und Valerat zu HV angenommen (Lemos et al. 2006; Jiang et al. 2011a; Duque et al. 2014; Kourmentza und Kornaros 2016). Ob die Zusammensetzung der Biozönose 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. 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 Bakterienzusammensetzung. Allerdings zeigen andere Studien, dass die Biozönose die Art der produzierten PHAs beeinflussen kann, was Folge unterschiedlicher Stoffwechselprozesse und Substratpräferenzen unterschiedlicher Organismen sein kann (Morgan-Sagastume 2016; Koller et al. 2017). So konnten beispielsweise 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. Huang et al. (2020) fanden zudem heraus, dass die Eigenschaften des Substrates, neben der Zusammensetzung, auch die Ausbeute des produzierten PHA beeinflussen können.

1.4 Charakterisierung PHA-produzierender Mikroorganismen

Untersuchungen zur Mischbiozönose und einzelner PHA-Produzierender Organismen in dem Verfahren zur Polymerherstellung mittels Mischkulturen aus Belebtschlamm erfolgten in den letzten Jahrzehnten durch unterschiedliche Methoden. Viele Untersuchungen fanden zunächst auf morphologischer Ebene statt. Eine Häufig verwendete Praxis hierbei bestand in der Nutzung von Färbemethoden mit Nilblau A oder Sudanschwarz B zur Evaluierung des Vorhandenseins von PHA-produzierenden Organismen im System (Chua und Yu 1999; Dionisi et al. 2002; Bengtsson et al. 2008b; Vishnuvardhan Reddy et al. 2008; Oshiki et al. 2011; Mesquita et al. 2015). Diese Farbstoffe färben intrazellulär vorhandene PHA-Granula (Ostle und Holt 1982; Jenkins et al. 2003). Diese Methoden erlauben allerdings weder eine Identifizierung der PHA-produzierenden Mikroorganismen noch eine Beurteilung der Diversität und Zusammensetzung der Mischbiozönose im System.

Eine weitere häufig angewandte Methode bestand und besteht in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) (Johnson et al. 2009; Jiang et al. 2011a; Albuquerque et al. 2013; Carvalho et al. 2014; Fra-Vázquez et al. 2019). Diese erlaubt, unter Nutzung spezifischer markierter Sonden, die Identifizierung bestimmter Zielorganismen oder

Organismengruppen (Nielsen et al. 2009). Des Weiteren kann hierbei, in Kombination mit anderen Färbungen, wie beispielsweise mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol), oder unter Nutzung von spezifischen Sonden, die alle Bakterien detektieren, eine relative Quantifizierung durchgeführt werden (Lemos et al. 2008; Daims 2009; Albuquerque et al. 2010; Moralejo-Gárate et al. 2013). Auch wird diese Methode teils mit der Nilblau-Färbung kombiniert (Serafim et al. 2006; Oshiki et al. 2013; Queirós et al. 2014). Allerdings bestehen die Nachteile dieses Verfahrens in der zuvor nötigen Kenntnis der im System vorhandenen PHA-Produzenten bzw. einer Vorauswahl an Zielorganismen, der beschränkten Sensitivität und der nötigen Verfügbarkeit von Sonden für die Zielorganismen (Daims 2009; Morgan-Sagastume 2016). Eine detaillierte Beurteilung der mikrobiellen Diversität und Dynamik ist mit dieser Methode ebenfalls nicht möglich, daher muss zuvor eine Kenntnis über wichtige Zielorganismen vorliegen.

Zu Beginn der Forschung zur Polymerherstellung mit Mischkulturen fanden auch Fingerprinting-Techniken, wie DGGE (Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese) und T-RFLP (Terminaler Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus), eine häufige Anwendung (Dionisi et al. 2005a; Coats et al. 2007; Dionisi et al. 2007; Beccari et al. 2009; Valentino et al. 2014). Diese Techniken beinhalten die Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese zur Unterscheidung einzelner Organismen oder Phylotypen (Hastings 1999; Schütte et al. 2008). Sie erlauben allerdings nur einen eingeschränkten Einblick in die Diversität der Biozönose und in Veränderungen dieser, aber eine Identifizierung der einzelnen Organismen in der Mischkultur und eine Untersuchung der Zusammensetzung der Biozönose sowie der Abundanz PHA-produzierender Organismen ist hiermit nicht möglich (Morgan-Sagastume 2016). Teils erfolgten Kombinationen der Fingerprinting-Techniken mit der Erstellung von Genklonbibliotheken und der Sequenzierung einzelner Klone und Banden (Dionisi et al. 2006; Johnson et al. 2009; Villano et al. 2010; Gou et al. 2016; Morgan-Sagastume et al. 2019). Jedoch waren die Informationen, die hierdurch gewonnen werden konnten, ebenfalls begrenzt.

Mit Aufkommen neuer Sequenziermethoden (NGS, „Next-Generation-Sequencing“) war eine Identifizierung und Charakterisierung der gesamten PHA-produzierenden Mischbiozönose möglich (Morgan-Sagastume 2016). Diese Technik ist heute die gängigste zur Untersuchung der Mischkultur im Verfahren zur PHA-Produktion und sie wird teilweise mit anderen Methoden wie Färbungen, FISH und qPCR (quantitative Polymerase Kettenreaktion) kombiniert (Coats et al. 2016; Crognale et al. 2019; Sruamsiri et al. 2020; Correa-Galeote et al. 2022; Crognale et al. 2022; Liu et al. 2024). Durch die qPCR kann dabei beispielsweise mithilfe spezifischer Primer für die unterschiedlichen PHA-Synthase-

Klassen oder für spezifische Gene eine relative Abschätzung der Expression des PhaC-Gens oder der relativen Abundanz bestimmter Organismen erfolgen (Jiang et al. 2011b; Huang et al. 2012; Coats et al. 2016; Inoue et al. 2016; Huang et al. 2018a; Correa-Galeote et al. 2022). Unter den NGS-Methoden wurde teils die Pyrosequenzierung genutzt (Cavallé et al. 2013; Liu et al. 2013; Janarthanan et al. 2016), aber am häufigsten durchgeführt wurde und wird bis heute die Charakterisierung der PHA-produzierenden Mischbiozönose mittels Metabarcoding und Illumina-Sequenzierung (Morgan-Sagastume et al. 2015; Carvalho et al. 2018; Moretto et al. 2020; Matos et al. 2021b; Wen et al. 2021; Zhou et al. 2023; Guarda et al. 2024; Yao et al. 2025). Die gesamte genomische DNA der Probe wird hierfür zunächst isoliert (eDNA, „environmental DNA“). Daraufhin wird ein kurzes Genfragment (Barcode), welches konserviert in der zu untersuchenden Gruppe (z.B. Bakterien) vorliegt, aber variabel genug ist, eine Differenzierung unterschiedlicher Taxa zuzulassen, mittels PCR amplifiziert (Taberlet et al. 2012). Hierdurch wird die zu untersuchende Organismengruppe vorgefiltert und die Menge an DNA für die Sequenzierung wird erhöht. Im Nachfolgenden findet eine Sequenzierung des Barcodes in einem „Sequencing-by-Synthesis“-Ansatz statt (Shokralla et al. 2012). Die Sequenzen werden anschließend bioinformatisch über einen Algorithmus (z.B. DADA2, „Divisive Amplicon Denoising Algorithm“) gefiltert und zu Sequenzvarianten (ASVs, „Amplicon Sequence Variants“) sortiert und zusammengefasst (Callahan et al. 2016). Anschließend kann eine taxonomische Zuordnung der ASVs durch Abgleich mit einer Datenbank erfolgen (Edgar 2016). Mit dieser Technik können Organismen schnell identifiziert werden und sie bietet die Möglichkeit eines geeigneten Monitoringsystems für Bioindikatoren (Stoeck et al. 2018). Auf dieser Grundlage können Analysen zur Zusammensetzung und Dynamik der Mischbiozönose im Verfahren zur PHA-Produktion durchgeführt werden.

1.5 Zusammenfassung zum gegenwärtigen Kenntnisstand und offene Forschungsfragen

In den letzten Jahrzehnten wurde eine intensive Forschung zur Optimierung der PHA-Produktion mit Bakterienmischkulturen durchgeführt, jedoch gibt es immer noch einige offene Fragen und Probleme, die eine industrielle Produktion und eine Marktfähigkeit des Produktes beeinträchtigen. Zur Konkurrenzfähigkeit des Polymers auf dem Markt werden eine konstante Qualität und Quantität des Produktes benötigt, allerdings stellt dies unter Berücksichtigung von schwankenden Abwasserzusammensetzungen im realen Betrieb eines der größten Hindernisse dar (Khatami et al. 2021; Guo et al. 2024). Zudem werden zur Verringerung des Produktpreises günstigere Herstellungsbedingungen bei gleichzeitig hohen Biomasse- und PHA-Ausbeuten durch eine optimierte Prozessführung benötigt

(Valentino et al. 2017; Nguyenhuynh et al. 2021; Guo et al. 2024). Ein entscheidender Parameter zur Lösung dieser Problematik liegt im Verständnis und der Beeinflussung der PHA-produzierenden Mischbiozönose. Um 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 (Morgan-Sagastume 2016; Huang et al. 2018a; Sabapathy et al. 2020). Die Identifizierung von abundanten PHA-Produzenten bzw. Kernorganismen durch Charakterisierung des Mikrobioms bietet eine geeignete Möglichkeit, um die Dynamik der Biozönose verstehen und in Zusammenhang mit der Prozessfunktionalität bringen zu können (Morgan-Sagastume 2016; Saunders et al. 2016). Auf Grundlage dessen können eine Anpassung und Optimierung der Prozessbedingungen stattfinden (Lemos et al. 2008; Serafim et al. 2008). Manche Autoren empfehlen zudem, die Selektion, anstatt in Richtung eines maximierten PHA-Zellgehaltes, in Richtung einer homogenen Population mit einem hohen und stabilen PHA-Speicherungsvermögen 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.

Allerdings sind die Auswirkungen unterschiedlicher Betriebsbedingungen auf die mikrobielle Biozönose, insbesondere auf die Diversität und Abundanz PHA-produzierender Mikroorganismen in der Selektionsphase, und der Zusammenhang dieser mit der PHA-Produktionsperformance bislang nicht ausreichend aufgeklärt (Huang et al. 2018a; Sabapathy et al. 2020; Khatami et al. 2021; Nguyenhuynh et al. 2021). Zudem sind Daten zu diesem Thema aus der Literatur oft schwer oder überhaupt nicht vergleichbar, da in den meisten Studien unterschiedliche Kombinationen der in Kapitel 1.3.1 bis 1.3.3 beschriebenen Betriebsbedingungen verwendet werden und somit jeweils unterschiedliche Einflussfaktoren vorliegen (Morgan-Sagastume 2016). Insgesamt gibt es viele widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss der Prozessbedingungen auf die Biozönose. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, ermöglichte erst das Aufkommen des NGS eine umfängliche Untersuchung zur Zusammensetzung der Mischbiozönose in den letzten zehn Jahren. Daher befassten sich frühere Studien, die die Auswirkungen von Betriebsbedingungen auf den Prozess untersuchten, wenn überhaupt, mit der Untersuchung des Einflusses dieser auf einzelne Organismen oder übergeordneten Mustern der Biozönose unter Verwendung von FISH oder DGGE (Dionisi et al. 2006; Coats et al. 2007; Dionisi et al. 2007; Villano et al. 2010; Jiang et al. 2011a; Albuquerque et al. 2013; Carvalho et al. 2014). Studien, die eine detaillierte Betrachtung der Struktur der Biozönose mithilfe von NGS vornahmen, nutzten meist synthetisches Substrat in ihren

Versuchen und es gibt nur wenige Untersuchungen unter Einsatz von realem Substrat. Huang et al. (2020) und Hao et al. (2017) beispielsweise, welche den Einfluss unterschiedlicher Substratzusammensetzungen untersuchten, sowie die Studie von Crognale et al. (2022) zum Einfluss der Raumbelastung auf die Mischkultur, nutzten synthetische Substrate. Matos et al. (2021b), Carvalho et al. (2018) und Guarda et al. (2024) führten ihre Versuche zum Einfluss der Substrateigenschaften auf die Bakterienkultur in der Selektion zwar mit Reststoff-basierten Substraten durch, allerdings wendeten sie, ebenso wie Crognale et al. (2022), die unterschiedlichen zu untersuchenden Parameter jeweils im selben Selektionsreaktor an, wodurch ein Einfluss der vorherigen Selektionsbedingungen nicht ausgeschlossen werden kann. Lediglich Clagnan und Adani (2023) analysierten den Zusammenhang der Substrateigenschaften mit der Selektion unter Verwendung von unterschiedlichen realen Substraten in verschiedenen Reaktoren mit dem gleichen Belebtschlamm. Gezielte Untersuchungen zum Einfluss des Schlammalters oder der Zyklusdauer auf die Biodiversität und Performance der Mischbiozönose gibt es kaum, das Schlammalter wurde in anderen Versuchen jedoch teils mit berücksichtigt (Matos et al. 2021b; Guarda et al. 2024). Lediglich Moretto et al. (2020) untersuchten eine Kombination dieser beiden Variablen in unterschiedlicher Variation und unter Verwendung von realem Substrat in unterschiedlichen Versuchen. Vergleichende Studien zum Einfluss der einzelnen Parameter Schlammalter und Zyklusdauer auf die Entwicklung der Mischbiozönose und der damit zusammenhängenden PHA-Produktion gibt es nach derzeitigem Kenntnisstand nicht. Eine systematische Untersuchung zum Einfluss der Selektionsdauer auf die Bakterienzusammensetzung bzw. deren Sukzessionsmuster über einen längeren Zeitraum gab es ebenfalls nur selten (Huang et al. 2018a; Crognale et al. 2019; Correa-Galeote et al. 2022). Dabei gab es jedoch in den meisten dieser Studien keine gezielten Analysen zum Einfluss unterschiedlicher Betriebsparameter auf die Biozönose. Nur Crognale et al. (2019) konnten Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung infolge von Temperatur- und Substratschwankungen feststellen. Für die meisten Untersuchungen ist zudem unklar, welches Inokulum verwendet wurde bzw. was die anfängliche Zusammensetzung und Herkunft der Biozönose für Auswirkungen auf die Entwicklung der mikrobiellen Zusammensetzung und Performance haben. Gezielte Experimente zum Einfluss des Inokulums, der Biozönose zu Beginn der Selektion, fanden bisher nur durch Jayakrishnan et al. (2020), Wen et al. (2021) und Zhou et al. (2023) statt. Die Ergebnisse dieser Studien waren jedoch unterschiedlich, denn Jayakrishnan et al. (2020) und Zhou et al. (2023) stellten eine ähnliche Zusammensetzung der Biozönose infolge gleicher Betriebsbedingungen, unabhängig von der Herkunft des Inokulums fest, während Wen et al. (2021) unterschiedliche Zusammensetzungen der Mischkulturen nach

der Selektion fanden. In den meisten der genannten Studien wurden Unterschiede in der Zusammensetzung und Performance der Biozönose zwischen den untersuchten Variationen festgestellt. Trotz einiger Organismen, wie beispielsweise *Thauera* und *Paracoccus*, die in vielen der genannten Studien als abundant festgestellt wurden (Coats et al. 2016; Carvalho et al. 2018; Huang et al. 2018a; Huang et al. 2020; Moretto et al. 2020; Wen et al. 2021; Crognale et al. 2022), waren, neben der unterschiedlichen Kombination an verwendeten Betriebsparametern, ebenfalls unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzungen und PHA-Produktionsperformances in diesen Untersuchungen zu finden. Es bestehen daher zurzeit noch einige Lücken und widersprüchliche Erkenntnisse zu den Auswirkungen der Betriebsbedingungen in der Selektionsphase auf die Dynamik, Diversität und Stabilität der bakteriellen Mischbiozönose, insbesondere der PHA-produzierenden Organismen, sowie deren Einfluss auf die PHA-Produktionsperformance.

Untersuchungen zur selektierten, PHA-produzierenden Mischbiozönose innerhalb des Akkumulationsprozessschrittes sind im Vergleich zum Selektionsprozess bisher nur sehr selten durchgeführt worden (Cavaillé et al. 2013; Janarthanan et al. 2016; Farghaly et al. 2017; 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 mögliche Ursachen für diese beobachteten Veränderungen werden die unterschiedliche Substratzusammensetzung, Nährstoffverfügbarkeit und die Methode der Substratzugabe zwischen dem Selektions- und dem Akkumulationsprozess angenommen (Morgan-Sagastume 2016). Janarthanan et al. (2016) stellten fest, dass eine im Vergleich zur Selektion veränderte VFA-Zusammensetzung im Substrat in der Akkumulation zu einer Veränderung der Biomassenzusammensetzung führte. Sie fanden jedoch keinen Zusammenhang dieser Veränderung mit der PHA-Zusammensetzung. Das Ausmaß des Einflusses der bakteriellen Gemeinschaft auf die Polymerzusammensetzung ist bisher noch unklar. Teilweise wurde lediglich ein Einfluss der Substratzusammensetzung auf diese gefunden (Lemos et al. 2006; Jiang et al. 2011a; Duque et al. 2014; Kourmentza und Kornaros 2016; Werker et al. 2018; Matos et al. 2021b, 2021a), wohingegen in anderen Studien ein Einfluss einzelner abundanter Organismen gefunden oder ein Einfluss des Metabolismus sowie der Substratpräferenzen der Biozönose beobachtet wurde (Carvalho et al. 2014; Hao et al. 2017; Huang et al. 2020). Zudem konzentrieren sich die meisten Studien auf die Maximierung der PHA-Ausbeute (Khatami et al. 2021). Es gab zwar gezielte Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Betriebsparameter auf die PHA-Zusammensetzung in früheren Jahren (Dionisi et al. 2005a; Villano et al. 2010; Albuquerque et al. 2011; Kourmentza und Kornaros 2016), aber wenige aktuelle Studien untersuchten

neben der PHA-Ausbeute die Zusammensetzung des Polymers (Oliveira et al. 2018; Crognale et al. 2022; Clagnan und Adani 2023). 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. Die Nährstoffzugabe in der Selektion kann ebenfalls einen Einfluss auf die Polymerzusammensetzung haben (Silva et al. 2017; Lorini et al. 2020). Unterschiede in der Nährstoffzugabe zwischen Selektion und Akkumulation bieten teils unterschiedliche Ergebnisse zur Erhöhung der möglichen PHA-Produktion (Serafim et al. 2004; Johnson et al. 2009; Valentino et al. 2015). Um die Widersprüche zu den Auswirkungen von Prozessbedingungen und der Biozönose auf die PHA-Zusammensetzung aufzuklären, bedarf es gezielter Untersuchungen unter sonst vergleichbaren Randbedingungen. 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). Wie die Biozönose in der Akkumulationsphase 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.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Auf Grundlage der in Kapitel 1.5 beschriebenen offenen Fragen und Diskrepanzen in der bisherigen Forschung soll unter gezielter Untersuchung der bakteriellen Mischbiozönose ein besseres Prozessverständnis geschaffen werden. Dies soll als Grundlage zur Entwicklung von Charakterisierungsmethoden sowie Betriebsanpassungsstrategien sowie zur Optimierung des Verfahrens dienen. Die folgenden Ziele wurden daher in dieser Arbeit verfolgt.

1. Selektionsstrategien

1.1. Effektivität und Dauer der Selektionsphase

1.1.1. Die Dynamik der PHA-Produktion sowie der bakteriellen Zusammensetzung in der Selektionsphase soll überwacht und auf ein mögliches Einstellen einer stabilen Phase hin überprüft werden.

1.1.2. Die Dauer bis zum Einstellen dieses Zeitpunktes soll ermittelt werden, um eine sinnvolle Dauer für diesen Prozess daraus ableiten zu können.

1.2. Einfluss des Inokulums und der Betriebsparameter

1.2.1. Die Entwicklung der Zusammensetzung der Mischbiozönose unter variierenden Prozessparametern und unter Verwendung unterschiedlicher Biozönosen als Inokulum in der Selektionsphase soll untersucht und verglichen werden. Dies soll zur Identifizierung von Kernorganismen mit dem Potenzial zur PHA-Produktion unter dem jeweiligen Parameter dienen und Aufschluss über das Vorkommen und die Präferenz bestimmter Organismen unter Prozessvariationen geben. Ebenfalls soll dies Aufschluss über die Wahl eines geeigneten Inokulums zu PHA-Produktion geben.

1.2.2. Die PHA-Produktionsperformance unter den jeweiligen Bedingungen soll verglichen und eine Parameterkombination zur bestmöglichen PHA-Produktion ermittelt werden. Dies soll als Grundlage für Empfehlungen für Betriebsstrategien dienen.

1.2.3. Eine Untersuchung der PHA-Zusammensetzung unter variierenden Betriebsbedingungen soll Aufschluss über deren Einfluss, auch in Zusammenhang mit der bakteriellen Zusammensetzung, geben.

2. Langzeitstabilität

2.1. Die Dynamik und Stabilität der Bakteriengesellschaft sowie der PHA-Produktionsperformance unter Nutzung der in Punkt 1.2 ausgewählten Parameterkombination sowie unter schwankenden Substratbedingungen innerhalb eines Langezeitbetriebs soll untersucht werden. Dies soll Einblicke in die Prozessstabilität unter realen Betriebsbedingungen geben.

2.2. Die Stabilität der Zusammensetzung des produzierten PHA in einem Langzeitbetrieb und unter schwankenden Rahmenbedingungen soll überwacht werden, um Einblicke in die Möglichkeiten zur Steuerung und Optimierung der gewünschten Produkteigenschaften zu liefern.

3. Einfluss des Substrates in der Akkumulation

3.1. Die Auswirkungen unterschiedlicher Substratcharakteristika zwischen Selektion und Akkumulation auf die PHA-Produktion und -zusammensetzung in der Akkumulationsphase in Zusammenhang mit der Entwicklung der mikrobiellen Zusammensetzung sollen untersucht werden. Dies soll der Beurteilung der Beeinflussbarkeit der Qualität und Quantität des produzierten Polymers dienen.

1.7 Überblick über den Aufbau der Arbeit

Zum Erreichen der genannten Ziele wurde ein aufeinander aufbauendes Versuchsdesign erarbeitet, in dem zunächst geeignete Selektionsbedingungen ermittelt werden sollten, welche in einem Langzeitversuch angewandt werden konnten (Abbildung 6). Dieser sollte zur Untersuchung der Prozessstabilität und als Grundlage für die Akkumulationsversuche zum Einfluss verschiedener Substrate dienen.

In den Versuchen zu den Selektionsbedingungen wurden zunächst drei Selektionsversuche mit jeweils unterschiedlichem Belebtschlamm als Inokulum verglichen. Dieser wurde zudem hauptsächlich zur Beurteilung der Dauer der Selektionsphase genutzt. Unter Auswahl des jeweils geeignetsten Parameters wurden daraufhin jeweils 2 Selektionsversuche mit unterschiedlichem Schlammalter, unterschiedlicher Zyklusdauer und Raumbelastung durchgeführt. Auf Grundlage dieser Auswahl erfolgte eine Langzeitselektion. Während einer stabilen Prozessphase wurde die in diesem Versuch selektierte Biomasse für zehn Akkumulationsversuche mit unterschiedlicher Substratzusammensetzung, -konzentration und Nährstoffverfügbarkeit genutzt. Die regelmäßigen Akkumulationen zur Beurteilung der Selektionsperformance des Langzeitversuches wurden hierbei als Referenzversuche genutzt.

Die Datenerhebung erfolgte im Rahmen der Projekte „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen - Einflussfaktoren auf Teilprozesse und Entwicklung von Mess-Steuer- und Regelungsstrategien zur Schließung der Verfahrenskette“ und „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen Teil II - Anpassung von Prozessbedingungen und Adaption der Biozönose zur Beeinflussung der Polymerzusammensetzung“, welche von der Willy-Hager-Stiftung Stuttgart gefördert wurden. Teile dieser Dissertation sind daher in beiden Projektberichten verarbeitet worden (Steinmetz et al. 2022; Zimmer und Steinmetz 2024). Die Erarbeitung der in Kapitel 3.1.1 gezeigten Daten zur PHA-Produktion mit unterschiedlichen Inokula erfolgte zudem in Zusammenarbeit mit Dr.-Ing. Thomas Uhrig, welche er im Rahmen seiner Dissertation ebenfalls verwendete (Uhrig 2023).

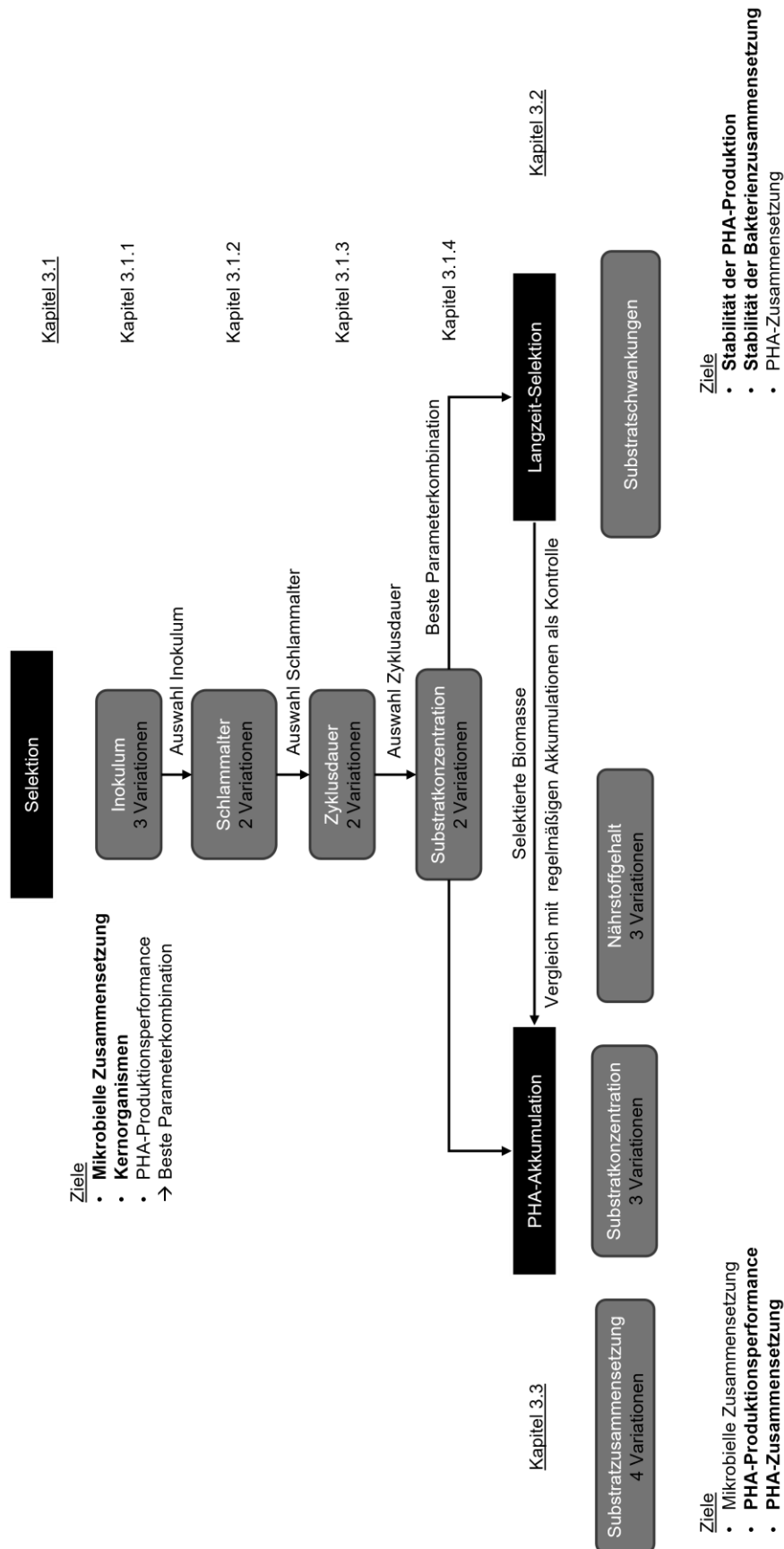


Abbildung 6: Übersicht über den Aufbau der Arbeit. Dargestellt ist die aufeinander aufbauende Versuchsplanung sowie das zugehörige Kapitel zu dem jeweiligen Versuch in dieser Dissertation. Außerdem aufgelistet sind die Hauptziele jedes Versuchsblocks, wobei die wichtigsten in Fett dargestellt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Substratherstellung

Vor Beginn der Versuche erfolgte jeweils im ersten Prozessschritt der PHA-Verfahrenskette die Herstellung eines Substrates zur Nutzung als Kohlenstoff- und Nährstoffquelle für die mikrobielle Mischkultur. Als Grundlage für die Substratherstellung wurde Brauereiabwasser genutzt, da es in vorangegangenen eigenen Versuchen eine Eignung zur Versäuerung sowie zur PHA-Produktion aufwies (Steinmetz et al. 2022). Durch eine Versäuerungsstufe wurden die Kohlenstoffverbindungen im Brauereiabwasser zu VFAs umgesetzt, welche als Grundlage für die PHA-Produktion dienen. Teils wurde zudem in den Versuchen synthetisches Substrat verwendet. Dies wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

2.1.1 Aufbau und Durchführung der Versäuerung

Die Versäuerung wurde in einem IBC-Container mit einem Reaktionsvolumen von 1000 L durchgeführt, wobei 900 L Brauereiabwasser sowie 100 L anaerober Schlamm aus der Kläranlage der Brauerei hinzugegeben wurden (Abbildung 7). Der Prozess wurde bei einer Temperatur von 35,5 °C durchgeführt, welche mithilfe eines Heizmantels (Sonderanfertigung, PiT GmbH, Etzbach, Deutschland) und daran angeschlossenen Temperaturfühler (RT ES11H+, PiT GmbH, Etzbach Deutschland) eingestellt wurde. Dabei erfolgte eine konstante Durchmischung im Reaktor mithilfe von zwei Aquariumpumpen (Turbelle® Nanostream® 6045, Tunze® Aquarientechnik GmbH, Penzberg, Deutschland). Zu Beginn der Versäuerung wurde der pH-Wert mit 25 %-iger Salzsäure (HCl, > 99 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf einen Wert von 5 eingestellt, um eine Methanbildung zu verhindern. Der pH-Wert wurde nachfolgend täglich überprüft und bei Bedarf eingestellt. Nach einer Aufenthaltszeit von 6 Tagen wurde die Versäuerung beendet und eine Fest-Flüssig-Trennung des Substrates mithilfe einer Korbzentrifuge (ZS21 EUR, 3,5 L 2070 g, Eurotec Innovation, Burtenbach, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde das versäuerte Brauereiabwasser in 30 L-Kanister abgefüllt und bei einer Temperatur von 4 °C, für kurze Zeiträume von bis zu wenigen Tagen, bzw. -18 °C, für längere Zeiträume, bis zur weiteren Nutzung gelagert.

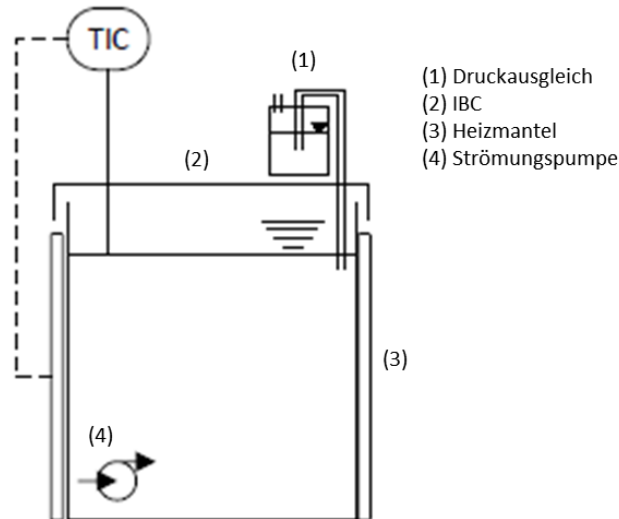


Abbildung 7: Aufbau des Reaktors zur Versäuerung von Brauereiabwasser als Substrat für Selektions- sowie Akkumulationsversuche. TIC: Temperaturregler („Temperature Indicator Controller“). Nach Zimmer und Steinmetz (2024).

2.1.2 Substratvorbereitung für die einzelnen Versuchsblöcke

Inokulum

Das Substrat für die Selektionsversuche mit unterschiedlichen Inokula (s. Kapitel 2.2.2) wurde, zur besseren Vergleichbarkeit der Versuche und um einen Einfluss der bakteriellen Zusammensetzung durch im Substrat vorhandene Bakterien ausschließen zu können, synthetisch hergestellt. Für alle drei Versuche wurde das gleiche Substrat verwendet. Es bestand aus einer Mischung aus Essig- und Propionsäure im molaren Verhältnis von 1:1, resultierend in einer Zugabe von 1,365 g Essigsäure ($\geq 98\%$, TECHNICAL, VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA) und 1,684 g Propionsäure (99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pro Liter Substrat, sowie einer Nährstofflösung, welche in Anlehnung an Smolders et al. (1994) hergestellt wurde (Tabelle 1).

Zur Herstellung der Mikronährstofflösung wurden die Nährstoffe und das EDTA zunächst in destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert wurde anschließend mit NaOH (25%, reinst., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf einen Wert von 6,5 eingestellt. Das Medium wurde daraufhin für 20 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt. Um zudem ein optimales Verhältnis von Kohlenstoff zu den Makronährstoffen Stickstoff und Phosphor (100:5:1) im Substrat zu gewährleisten (Carvalho et al. 2022), wurden 0,304 g NH_4Cl ($> 99\%$, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland) und 0,154 g KH_2PO_4 ($> 99\%$, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland) pro Liter Substrat hinzugefügt. Als

weitere Makronährstoffe wurden in diesen Versuchen 0,255 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (> 99 %, Fluka™, Honeywell Speciality Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland), 0,03 g CaCl_2 (\geq 98 %, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 0,102 g KCl (\geq 99,5 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und 0,003 g Hefeextrakt (Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland) pro Liter hinzugegeben.

Die Säuren (Essig- und Propionsäure) wurden mit destilliertem Wasser auf das für den Prozess benötigte Volumen aufgefüllt, die eingewogenen Makronährstoffe, sowie jeweils 2 ml pro Liter Substrat der Mikronährstofflösung hinzugegeben und vermischt. Im Anschluss wurde der pH-Wert des synthetischen Substrates mit NaOH (25 %, reinst., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf einen Wert von 7 eingestellt. Das synthetische Substrat wurde direkt im Vorlagenbehälter der Substratzugabe für die Selektion gemischt. Für die regelmäßigen Akkumulationsversuche, welche mit der aus der Selektion abgezogenen Biomasse durchgeführt wurden, wurde das gleiche Substrat verwendet, jedoch wurde auf jegliche Zugabe von Nährstoffen verzichtet, um ein Wachstum der Bakterien zum Nachteil der PHA-Produktion zu verhindern (Nguyenhuynh et al. 2021).

Tabelle 1: Zusammensetzung der Mikronährstofflösung. Die Zugabe bezieht sich auf 1 L der Lösung, welche mit destilliertem Wasser hergestellt wurde. Nach Smolders et al. (1994).

Chemikalie	Zugabe [g/L]	Hersteller
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,500	1
H_3BO_3	0,150	2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,030	2
KI	0,018	3
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,120	3
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,060	4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,120	2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,150	5
EDTA	10,00	6

1: > 99 %, AnalaR NORMAPUR®, VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA; 2: > 99 %, EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; 3: > 99 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; 4: \geq 99,0 %, GPR RECTAPUR®, VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA; 5: 98 %, Fluka™, Honeywell Speciality Chemicals Seelze GmbH, Seelze, Deutschland; 6: Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt

Betriebsparameter (Schlammalter, Zyklusdauer, Raumbelastung)

In den weiteren Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern (s. Kapitel 2.2.2) wurde mit Brauereiabwasser ein reales Substrat verwendet. Hier sollte ebenfalls eine Vergleichbarkeit der Versuche innerhalb eines Versuchsblocks gegeben sein und somit eine möglichst gleichbleibende Zusammensetzung des verwendeten Substrates erreicht

werden. Daher wurde für jeden Versuchsblock eine große Menge (1000 L) Substrat vorproduziert und gemischt. Die Eigenschaften der drei produzierten Substratbatches sind nachfolgend aufgeführt (Tabelle 2). Die erste Charge (Brau 1.1) wurde für die Selektionsversuche mit unterschiedlichem Schlammalter, die zweite (Brau 1.2.) für die Versuche mit unterschiedlicher Zyklusdauer und die dritte (Brau 1.3) für die Versuche mit unterschiedlicher Raumbelastung genutzt. Um ein optimales Wachstum während der Selektion zu gewährleisten, wurde ein Nährstoffverhältnis von 100:5:1 $CSB_{gel}:N:P$ (vgl. Abschnitt „Inokulum“) durch Zugabe von NH_4Cl (> 99 %, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland) und KH_2PO_4 (> 99 %, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland) eingestellt (Tabelle 2). Zudem wurden jeweils 2 ml pro Liter Substrat der zuvor bereits beschriebenen Mikronährstofflösung zudosiert (s. Abschnitt „Inokulum“, Tabelle 1).

Tabelle 2: Substratcharakteristika des versäuerten Brauereiabwassers für die Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern. Brau: Brauereiabwasser, CSB: chemischer Sauerstoffbedarf, hom: homogenisiert, gel: gelöst, Ac: Essigsäure, Pro: Propionsäure, Bu: Buttersäure, Val:Valeriansäure, Cap: Capronsäure, RB1: Selektionsversuch Raumbelastung 1, RB2: Selektionsversuch Raumbelastung 2.

Parameter	Brau 1.1	Brau 1.2	Brau 1.3
CSB_{hom} [mg/L]	1550,0 ± 2,0	3316,0 ± 120,0	2354,0 ± 10,0
CSB_{gel} [mg/L]	1388,0 ± 8,0	2587,0 ± 19,0	1654,0 ± 8,0
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}/CSB_{hom} [%]	59,3	59,4	55,6
CSB_{VFA}/CSB_{gel} [%]	66,2	76,1	79,2
CSB_{gel}/CSB_{hom} [%]	89,6	78,0	70,3
Zusammensetzung [%Ac:Pro:Bu:Val:Cap]	45:20:30:4:1	43:18:32:4:3	48:15:24:9:5
Zugabe NH_4Cl [mg/L]	167,7	410,5	3841,0 (RB1) 2115,4 (RB2)
Zugabe KH_2PO_4 [mg/L]	29,1	57,7	863,0 (RB1) 466,6 (RB2)

Im Versuchsblock mit zwei unterschiedlichen Raumbelastungen wurde das aus Brauereiabwasser gewonnene Substrat (Brau 1.3) mit synthetischem Substrat in der gleichen Zusammensetzung gemischt, um die gewünschte Konzentration zu erreichen. Im ersten Versuch (Raumbelastung 1) sollte eine Raumbelastung von 10 $gCSB_{VFA}/(L*d)$ und im zweiten Versuch (Raumbelastung 2) eine Raumbelastung von 6 $gCSB_{VFA}/(L*d)$ erreicht

werden. Die benötigte Zugabe der einzelnen VFA ist in Tabelle 3 aufgelistet. Die sich zudem daraus ergebenden benötigten Mengen an Stickstoff- und Phosphorzugabe in Form von NH_4Cl und KH_2PO_4 sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 3: Zugabe an VFA zum Substrat in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Die Mengen beziehen sich auf die Zugabe pro 1 L Substrat. Das Substrat bestand aus versäuertem Brauereiabwasser.

Chemikalie	Raumbelastung 1	Raumbelastung 2	Hersteller
	Zugabe [g/L]	Zugabe [g/L]	
Essigsäure	4,92	2,62	1
Propionsäure	1,87	1,00	2
Iso-Buttersäure	0,28	0,15	3
Buttersäure	3,31	1,76	4
Iso-Valeriansäure	0,34	0,18	5
Valeriansäure	1,14	0,61	4
Capronsäure	0,93	0,49	2

1: $\geq 98\%$, Technical, VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA; 2: 99% , Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; 3: 99% , Alfa Aesar, ThermoFischer (Kandel) GmbH, Kandel, Deutschland 4: $> 99\%$, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland; 5: 98% , Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland; 6: 98% , Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Ein Auffüllen des Vorlagebehälters mit frischem Substrat erfolgte alle zwei bis drei Tage. Für die regelmäßigen Akkumulationsversuche wurde ebenfalls das gleiche Substrat wie in der Selektion verwendet und es wurde auf die Zugabe von Nährstoffen verzichtet. In den Raumbelastungsversuchen wurde für die Akkumulationen das versäuerte Brauereiabwasser ohne die Zugabe der Säuren verwendet.

Langzeit-Selektion

Im Anschluss an die Selektionsversuche erfolgte mit der daraus getroffenen Auswahl an Selektionsparametern eine Langzeit-Selektion über drei Monate (s. Kapitel 2.2.2). Innerhalb dieses Langzeitversuches wurde ebenfalls Substrat in dem IBC mit einem Volumen von 1000 L produziert und vorgemischt. Dies war für ca. 2 Monate der Selektion ausreichend, sodass insgesamt 2 unterschiedliche Chargen an Brauereiabwasser in diesem Versuch genutzt wurden. Die Eigenschaften dieser hergestellten Substrate sind in Tabelle 4 aufgeführt. Den Substraten wurden vor Zugabe zu den Selektionsreaktoren ebenfalls, wie oben beschrieben (Abschnitt „Betriebsparameter“), Nährstoffe in Form von Makronährstoffen und einer Mikronährstofflösung zudosiert. In den regelmäßigen Akkumulationen wurde erneut auf eine Zugabe von Nährstoffen verzichtet.

Tabelle 4: Substratcharakteristika der Chargen an versäuertem Brauereiabwasser für einen Langzeit-Selektionsversuch. Brau: Brauereiabwasser, CSB: chemischer Sauerstoffbedarf, hom: homogenisiert, gel: gelöst, Ac: Essigsäure, Pro: Propionsäure, Bu: Buttersäure, Val: Valeriansäure, Cap: Capronsäure.

Parameter	Brau 2.1	Brau 2.2
CSB_{hom} [mg/L]	3394,0 ± 22,0	1902,0 ± 34,0
CSB_{gel} [mg/L]	2598,0 ± 4,0	1240,0 ± 24,0
CSB_{VFA} [mg/L]	2420,7 ± 22,9	904,7 ± 0,9
NH₄-N [mg/L]	80,2 ± 1,4	17,9 ± 0,1
PO₄-P [mg/L]	15,9	5,8 ± 0,1
CSB_{gel}:NH₄-N:PO₄-P	100:3,1:0,6	100:1,4:0,5
CSB_{VFA}/CSB_{hom} [%]	71,3	47,6
CSB_{VFA}/CSB_{gel} [%]	93,2	73,0
CSB_{gel}/CSB_{hom} [%]	76,6	65,2
Zusammensetzung [%Ac:Pro:Bu:Val]	43:21:31:5:0	80:11:8:1:0
Zugabe NH₄Cl [mg/L]	189,9	168,5
Zugabe KH₂PO₄ [mg/L]	44,2	29,0

Akkumulationsversuche mit unterschiedlichem Substrat

Während der zweiten und dritten Woche der Langzeit-Selektion wurden, neben den regelmäßigen Akkumulationen zur Evaluation der PHA-Produktionsperformance der selektierten Biozönose, zehn zusätzliche Akkumulationsversuche zur Untersuchung des Einflusses des Substrates in der Akkumulationsphase mit der selektierten Biomasse aus der Langzeit-Selektion durchgeführt (s. Kapitel 2.3.2). In den ersten beiden Akkumulationen wurde synthetisches Substrat genutzt, welches nur aus Essig- und Propionsäure im molaren Verhältnis von 30:70 (AV01) und 70:30 (AV02) bestand. Dies führte zu einer CSB_{VFA} bzw. CSB_{gel}-Konzentration von 2771,6 (synth. Substrat 1) und 2228,4 mg/L (synth. Substrat 2). Vor Zugabe der synthetischen Substrate zur Biomasse wurde deren pH-Wert auf einen Wert von 7 mit 1 M NaOH (> 99 %, PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland) eingestellt. In den nächsten beiden Akkumulationsversuchen wurden zwei Industrieabwässer verwendet. Dabei handelte es sich um ein Abwasser aus der Fruchtsaftherstellung (AV03), welches, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, versäuert wurde und um ein vorbehandeltes Brauereiabwasser (AV04), welches aus der Anaerob-Behandlung der Brauereikläranlage stammte und dort bereits teilweise versäuert wurde. Eine weitere Versäuerung dieses Abwassers im eigenen Labor fand nicht statt. Für die restlichen sechs Akkumulationen wurde das gleiche Substrat wie in der Selektion verwendet (Brau 2.1, vgl. Tabelle 4). Dabei wurden in diesen Versuchen unterschiedliche Substratkonzentrationen und Nährstoffzugaben untersucht (s. Kapitel 2.3.2). In den Versuchen zur Nährstoffzugabe (AV05-AV07) erfolgte eine Zugabe von Stickstoff in Form

von NH_4Cl (189,9 mg/L Substrat) mit einem Zielverhältnis von 100:5 $\text{CSB}_{\text{gel}}:\text{N}$ (AV05), dann eine Zugabe von Phosphor in Form von KH_2PO_4 (44,2 mg/L Substrat) im nächsten Versuch mit einem Ziel von 100:1 $\text{CSB}_{\text{gel}}:\text{P}$ (AV06) und im anschließenden Versuch eine Zugabe von beiden mit einem Verhältnis von $\text{CSB}_{\text{gel}}:\text{N}:\text{P}$ von 100:5:1 (AV07), analog zur Selektion. In den Versuchen zur Substratkonzentration wurde das Brauereiabwasser ohne Zugabe von Nährstoffen verwendet (AV08, AV09, AV10), lediglich die Menge der Substratzugabe variierte (s. 2.3.2). Die Eigenschaften der beiden Industrieabwässer sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Charakteristika der aus Restströmen gewonnenen Substrate für Akkumulationsversuche zum Einfluss verschiedener Substrateigenschaften. Brau: Brauereiabwasser, CSB: chemischer Sauerstoffbedarf, hom: homogenisiert, gel: gelöst, For: Ameisensäure, Ac: Essigsäure, Pro: Propionsäure, Bu: Buttersäure, Val:Valeriansäure, Cap: Capronsäure.

Parameter	Fruchtsaft- abwasser	Vorbehandeltes Brauereiabwasser
CSB_{hom} [mg/L]	2572,0 ± 40,0	1742,0 ± 14,0
CSB_{gel} [mg/L]	2116,0 ± 12,0	1528,0 ± 0,0
CSB_{VFA} [mg/L]	1310,5 ± 13,3	1084,7 ± 10,8
$\text{NH}_4\text{-N}$ [mg/L]	35,4 ± 0,4	5,9 ± 0,0
$\text{PO}_4\text{-P}$ [mg/L]	4,2 ± 0,0	5,2 ± 0,0
$\text{CSB}_{\text{gel}}:\text{NH}_4\text{-N}:\text{PO}_4\text{-P}$	100:1,7:0,2	100:0,4:0,3
$\text{CSB}_{\text{VFA}}/\text{CSB}_{\text{hom}}$ [%]	51,0	62,3
$\text{CSB}_{\text{VFA}}/\text{CSB}_{\text{gel}}$ [%]	61,9	71,0
$\text{CSB}_{\text{gel}}/\text{CSB}_{\text{hom}}$ [%]	82,3	87,7
Zusammensetzung [%For:Ac:Pro:Bu:Val:Cap]	1:65:10:21:2:1	1:50:49:0:0

2.2 Selektion

Es wurden unterschiedliche Versuche zur Selektionsphase durchgeführt, um die Entwicklung der Bakterienmischkultur und der PHA-Produktion unter variierenden Betriebsbedingungen in diesem Prozessschritt untersuchen zu können. Der erste Versuchsblock sollte dabei einer Untersuchung des Einflusses dreier unterschiedlicher Belebtschlämme als Inokulum des Prozesses auf die Entwicklung der mikrobiellen Gesellschaft und der damit zusammenhängenden PHA-Produktionsfähigkeit sowie dessen Zusammensetzung dienen. Im zweiten, dritten und vierten Versuchsblock wurde der Einfluss zweier Schlammalter, zweier Zyklusdauern bzw. zweier unterschiedlicher Raumbelastungen auf die genannten Parameter untersucht. Mit den aus diesen Versuchen gewonnenen Erkenntnissen wurde eine Langzeit-Selektion mit der besten

Parameterkombination durchgeführt, in welcher die Stabilität des Prozesses sowie der Einfluss von Schwankungen im realen Substrat betrachtet werden sollten.

2.2.1 Versuchsaufbau

Die Selektion fand je in drei parallel laufenden Reaktoren mit einem jeweiligen Reaktionsvolumen von 10 L statt (Abbildung 8). Diese hatten die Kennung R2, R3 und R4, nach denen auch die Probenbezeichnung erfolgte. In allen Reaktoren erfolgte eine Sauerstoffversorgung durch Edelstahl-Belüftersteine über die Druckluftleitung des Labors. Dies resultierte in einem Druck von 0,1 bar und einem Sauerstoffgehalt von ca. 8 mg/L innerhalb der Reaktoren. Zudem sorgten Überkopfrührer (RZR 1, Heidolph Scientific Products GmbH, Schwabach, Deutschland) für eine konstante Durchmischung und Heizstäbe für eine Temperaturregelung (Nano ThermoCompact 25W, Dennerle, Münchweiler/Rodalb, Deutschland) auf ca. 21-23 °C in den Reaktoren. Der pH-Wert wurde, neben dem Sauerstoffgehalt, konstant gemessen (SL 82-120 pHT und MF39VP, Xylem Analytics Germany GmbH, Weilheim, Deutschland). Dabei erfolgte in den Versuchen zur Verwendung eines unterschiedlichen Inokulums in der Selektion, in denen synthetisches Substrat verwendet wurde, eine pH-Kontrolle in den Reaktoren, sowohl in der Selektions- als auch in der Akkumulationsphase. Der pH-Wert wurde minütlich gemessen und bei Überschreiten des Schwellwerts erfolgte eine automatische Dosierung von 25 %-iger Salzsäure (HCl, > 99 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bis zum Einstellen eines Wertes von 7. In den anderen Selektionsversuchen (Schlammalter, Zyklusdauer, Raumbelastung und Langzeit-Selektion), in denen reales Substrat verwendet wurde, erfolgte keine pH-Kontrolle, der Wert pendelte sich in einem Bereich zwischen 7 und 8 ein. Die Substratdosierung und der Biomasseabzug erfolgten über Peristaltikpumpen (OEM-Peristaltik-Pumpen M500, Verderflex®, Castleford, UK), welche über Drucksonden (AquaBar (II), NIVUS GmbH, Eppingen, Deutschland) in Verbindung mit einem Labview-basierten Programm (National Instruments™, Version V1.00) gesteuert wurden. Das Programm wurde durch die Elektronik-Werkstatt der Universität individuell angepasst. Bei Aufschäumen der Biomasse nach Substratzugabe wurde ein Tropfen eines Schauminhibitors (Antifoam SE-15, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in die Reaktoren gegeben.

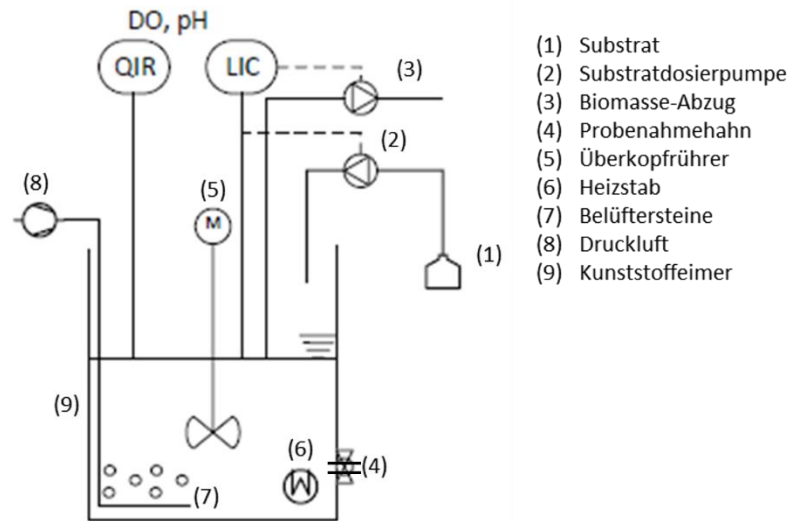


Abbildung 8: Aufbau eines Reaktors zur Selektion PHA-produzierender Mikroorganismen aus einer Mischkultur. DO: Gelöster Sauerstoff („Dissolved Oxygen“). QIR: Durchflussmessgerät („Quantity Indicator Recorder“), LIC: Füllstandsregler („Level Indicator Controller“), M: Motor. Modifiziert nach Zimmer und Steinmetz (2024).

2.2.2 Versuchsbeschreibung

Zu Beginn der Selektionsphase wurden in allen Versuchen zunächst die Reaktoren mit Belebtschlamm befüllt, welcher mit Leitungswasser auf eine gleiche Feststoffkonzentration von 5 g/L verdünnt wurde. Daraufhin erfolgte eine Substratdosierung bis der Füllstand von 10 L erreicht war. Das hinzugefügte Volumen variierte je nach Versuchsblock und ist für die einzelnen Versuche im nachfolgenden Kapitel im Detail beschrieben. Nach Substratzugabe wurde über einen definierten Zeitraum, abhängig von der für den Versuch gewählten Zyklusdauer, eine Hungerphase in den Reaktoren durchgeführt, in der eine konstante Durchmischung und Belüftung stattfand. Nach der gewählten Zeitspanne erfolgte eine Sedimentation, indem die Durchmischung und Belüftung in den Reaktoren für jeweils 45 min abgeschaltet wurden, sodass sich der Belebtschlamm vor Abzug des verbrauchten Substrates absetzen konnte. Diese Sedimentationsphase wurde nur in jedem zweiten Zyklus durchgeführt, sodass in den anderen Zyklen ebenfalls ein Abzug von Überschussschlamm bzw. toter Biomasse erfolgen und das festgelegte Schlammalter eingehalten werden konnte. Der Verlauf der Selektionsphase ist beispielhaft in Abbildung 9 anhand von zwei Zyklen mit einer jeweiligen Dauer von 12 h dargestellt. Es wurden unterschiedliche Selektionsversuche durchgeführt, bei denen die Betriebsparameter variierten. In Tabelle 6 ist eine Übersicht der einzelnen Versuche und der jeweiligen Variationen aufgeführt. Eine detailliertere Erläuterung zu diesen findet sich außerdem im Folgenden.

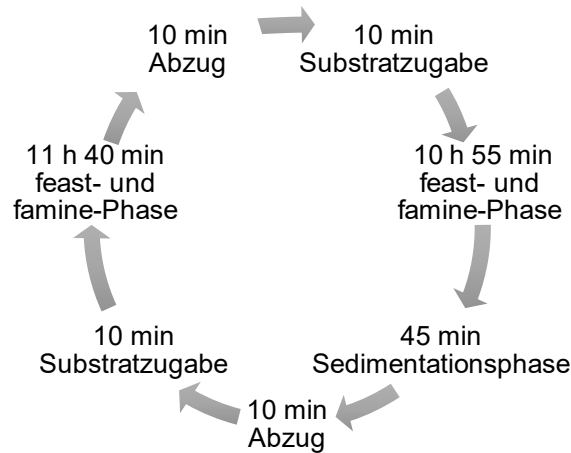


Abbildung 9: Verlauf zweier 12h-Zyklen während der Selektionsversuche. Modifiziert nach Steinmetz et al. (2022).

Tabelle 6: Übersicht über Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern und einen Langzeitversuch. Die zu untersuchenden Parameter sind fett markiert. Bio-P: Biologische Phosphoreliminierung, Brau: Brauereiabwasser, Synth.: synthetisch, CSB: chemischer Sauerstoffbedarf, VFA: flüchtige Fettsäuren, gel: gelöst.

Versuch	Inokulum	Schlammalter [d]	Zyklusdauer [h]	Raumbelastung [gCSB _{VFA} /(L*d)] ([gCSB _{gel} /(L*d))]	Substrat
Inokulum					
1	Kommunal	4	12	2,00 (2,00)	Synth.
2	Bio-P	4	12	2,00 (2,00)	Synth.
3	Brauerei	4	12	2,00 (2,00)	Synth.
Schlammalter					
1	Brauerei	2	12	0,46 (0,69)	Brau 1.1
2	Brauerei	4	12	0,46 (0,69)	Brau 1.1
Zyklusdauer					
1	Brauerei	4	24	0,98 (1,29)	Brau 1.2
2	Brauerei	4	6	0,98 (1,29)	Brau 1.2
Raumbelastung					
1	Brauerei	4	6	10,00 (10,00)	Brau 1.3
2	Brauerei	4	6	6,00 (6,00)	Brau 1.3
Langzeitversuch					
Tag 0-61	Brauerei	4	6	1,21 (1,30)	Brau 2.1
Tag 61-116	Brauerei	4	6	0,45 (0,62)	Brau 2.2

Inokulum

Im ersten Versuchsblock wurden drei Selektionsversuche mit jeweils unterschiedlichem Belebtschlamm als Inokulum hintereinander durchgeführt. Zunächst wurde ein Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit alternierender bzw. intermittierender Stickstoffelimination ausgewählt. Im nachfolgenden Versuch wurde ebenfalls ein Belebtschlamm von einer kommunalen Kläranlage genutzt, welche jedoch eine simultane aerobe Schlammstabilisierung sowie eine biologische Phosphoreliminierung als Verfahren aufwies. Das dritte Inokulum stammte aus der aeroben Behandlungsstufe mit SBR-Verfahren („Sequencing Batch Reactor“) einer Industriekläranlage einer Brauerei. Die Selektionsdauer wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von Huang et al. (2018a) auf 49 Tage festgelegt, jedoch wurde der dritte Versuch, aufgrund fehlender biologischer Proben an Tag 49, in dieser Arbeit nur bis zu Versuchstag 42 betrachtet. In diesem Versuchsblock sollte, neben dem Einfluss des Inokulums, ebenfalls der zeitliche Verlauf der Selektionsphase bis zum Einstellen eines stabilen PHA-Gehaltes untersucht werden. Im ersten Inokulums-Versuch kam es an Tag 11 zu einem Betriebsfehler, da die pH-Dosierung kurzzeitig ausfiel und der pH-Wert daraufhin, aufgrund des Verbrauches an Säuren im synthetischen Substrat, in allen Reaktoren auf einen Wert von 12 anstieg. Der pH-Wert sowie die weiteren Parameter in diesem Versuch regulierten sich wieder, sodass der Versuch weitergeführt wurde. Als Betriebsparameter wurden in diesem Versuchsblock ein Schlammalter von 4 d, eine Zyklusdauer von 12 h sowie eine Raumbelastung von $2 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ gewählt. Hierzu wurden zu Beginn des Versuches jeweils 7,5 L verdünnter Belebtschlamm sowie 2,5 L Substrat in die Reaktoren gefüllt. Alle 12 Stunden erfolgte ein Abzug von jeweils 2,5 L Reaktorvolumen und eine erneute Zugabe von 2,5 L Substrat, wobei nach jedem zweiten Zyklus vor dem Abzug eine Sedimentationsphase stattfand. Als Substrat wurde eine synthetische Mischung aus Essig- und Propionsäure verwendet (s. Kapitel 2.1.2).

Schlammalter

In diesem Versuchsblock wurde der Einfluss des Schlammalters in der Selektionsphase auf die Entwicklung der Biozönose und der PHA-Produktion untersucht. Im ersten Teil dieses Versuchsblocks wurden hierzu ein Schlammalter von 2 d sowie eine Zyklusdauer von 12 h eingestellt. Dazu 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 eine Sedimentationsphase eingestellt. Nach jedem Abzug erfolgte die Zugabe von 5 L frischem Substrat. 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. Der Versuch wurde aufgrund der Ergebnisse der Inokulums-Versuche verkürzt und jeweils über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt. Um zudem die Raumbelastung bei den beiden Versuchen mit einem 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 Leitungswasser zudosiert. Als Substrat wurde in beiden Versuchen dasselbe versäuerte Brauereiabwasser verwendet (s. Kapitel 2.1.2). Die Raumbelastung lag, aufgrund der durch die Versäuerung im Substrat erreichten CSB-Konzentration (vgl. Tabelle 2), bei $0,46 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ bzw. $0,69 \text{ gCSB}_{\text{gel}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ (Tabelle 6).

Zyklusdauer

Für diesen Versuchsblock, in welchem, neben den bisher verwendeten 12 h Zyklusdauer, zwei weitere verglichen werden sollten, 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. Aufgrund der im Substrat erzielten CSB-Konzentration nach der Versäuerung (s. Kapitel 2.1.2), wurde eine Raumbelastung von $0,98 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ bzw. $1,29 \text{ gCSB}_{\text{gel}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ in den Versuchen erreicht (Tabelle 6).

Raumbelastung

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorherigen Versuchsblöcke, wurde für diesen Versuchsblock ein Schlammalter von 4 d sowie eine Zyklusdauer von 6 h ausgewählt. Zudem wurde die Versuchsdauer auf jeweils 14 Tage verkürzt, da die Ergebnisse der vorherigen Versuche auf einen hohen möglichen PHA-Gehalt bereits nach bis zu 14 Tagen hindeuteten und die Performance des Systems in diesem Versuchsblock schlecht ausfiel. Im Gegensatz zu den anderen Selektionsversuchen, in denen eine Raumbelastung von $0,46\text{-}2,0 \text{ gCSB}/(\text{L} \cdot \text{d})$ genutzt wurde, wurden in diesem Versuchsblock zwei Raumbelastungen von 6 und $10 \text{ gCSB}/(\text{L} \cdot \text{d})$ verwendet (Tabelle 6). Hierzu wurde ein versäuertes Brauereiabwasser als Substrat genutzt, welches mit einer Zugabe von VFA im gleichen Verhältnis auf die entsprechende CSB-Konzentration gebracht wurde (s. Kapitel

2.1.2). Alle weiteren Prozesseinstellungen waren wie im Zyklusdauerexperiment mit einer Dauer von 6 h.

Langzeit-Selektion

Im Versuch zur Langzeit-Selektion sollte, unter Nutzung der aus den vorherigen Versuchen hervorgegangenen besten Parameterkombination, die Stabilität der mikrobiellen Zusammensetzung sowie der PHA-Produktion über einen Zeitraum von 3 Monaten untersucht werden. Des Weiteren sollte unter Durchführung eines Substratwechsels eine Substratvariation innerhalb eines realen Betriebs auf einer Kläranlage abgebildet werden und dessen Einfluss auf diese betrachtet werden. Da sich als geeignete Parameterkombination ein Schlammalter von 4 d und eine Zyklusdauer von 6 h ergaben, wurden diese Einstellungen für den zusammenführenden Versuch gewählt. Daher wurde der Prozess wie in den Abschnitten „Zyklusdauer“ und „Raumbelastung“ beschrieben durchgeführt. Um allerdings betriebsbedingte Schwankungen innerhalb eines Langzeitversuches abbilden zu können, wurden Schwankungen im Substrat aufgrund von Variationen im Produktionsprozess zugelassen, sodass zwei Raumbelastungen von $1,21 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ (entspricht $1,30 \text{ gCSB}_{\text{gel}}/(\text{L} \cdot \text{d})$) und $0,45 \text{ gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ (entspricht $0,62 \text{ gCSB}_{\text{gel}}/(\text{L} \cdot \text{d})$), aufgrund der in der Versäuerung erreichten CSB-Konzentrationen des Brauereiabwassers, im Substrat erreicht wurden (Tabelle 6). An Tag 31 kam es während dem Langzeitversuch zu einem Stromausfall. Zudem kam es an Tag 76 zu einem Dosierfehler in der Selektion, sodass bei diesem Zyklus kein Substrat zugegeben wurde.

Der Langzeitversuch, welcher Teil des Projektes „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen Teil II - Anpassung von Prozessbedingungen und Adaption der Biozönose zur Beeinflussung der Polymerzusammensetzung“ war (Zimmer und Steinmetz 2024), wurde im Projekt zur Untersuchung verfahrenstechnischer Fragestellungen über einen längeren Zeitraum von insgesamt 9 Monaten durchgeführt. Jedoch fand für die mikrobiologische Untersuchung in dieser Arbeit eine intensivere Betrachtung der ersten drei Monate statt, da diese Prozessphase einen stabileren Verlauf aufwies.

2.3 PHA-Akkumulation

In allen Selektionsversuchen fanden wöchentliche Akkumulationsversuche zur Beurteilung der PHA-Produktionsperformance der Bakterienmischkultur aus dem Selektionsversuch statt. Zudem wurden in der zweiten und dritten Woche des Langzeit-Selektionsversuches Akkumulationsversuche zum Vergleich unterschiedlicher Substratcharakteristika zwischen Selektions- und Akkumulationsphase und dessen Einfluss auf die Biozönose sowie die PHA-Produktion durchgeführt, da die Ergebnisse bisheriger Versuche auf diesen als geeigneten und stabilen Zeitraum zur PHA-Produktion hindeuteten.

2.3.1 Versuchsaufbau

Die Akkumulation fand in drei parallel laufenden Reaktoren mit einem Reaktionsvolumen von jeweils 5 L statt (Abbildung 10). Der Aufbau der Reaktoren entsprach, mit Ausnahme eines geringeren Volumens sowie eines fehlenden automatisierten Biomasseabzugs, dem der Selektionsreaktoren (vgl. Kapitel 2.2.1). Die Nomenklatur der drei Reaktoren war R1, R5 und R6, wobei die Akkumulation in R1 mit der selektierten Biomasse aus R2, in R5 mit der Biomasse aus R3 und in R6 mit der Biomasse aus R4 erfolgte. Es erfolgte eine zeitgesteuerte Substratzugabe, eine konstante Belüftung und Durchmischung sowie eine Aufzeichnung des Sauerstoffgehaltes und des pH-Wertes.

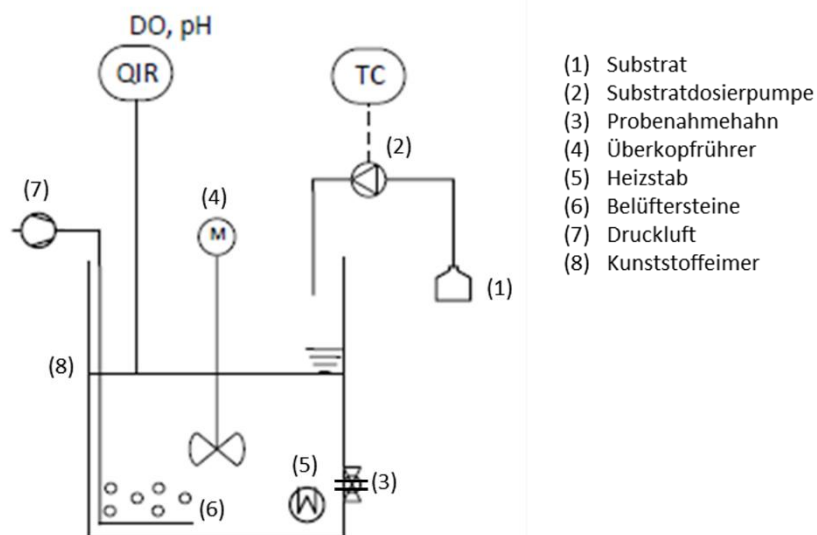


Abbildung 10: Aufbau eines Reaktors zur PHA-Akkumulation mithilfe einer selektierten Biomasse aus einer Mischkultur. DO: Gelöster Sauerstoff („Dissolved Oxygen“). QIR: Durchflussmessgerät („Quantity Indicator Recorder“), TC: Zeitsteuerung der Substratzugabe („Time Control“), M: Motor. Modifiziert nach Zimmer und Steinmetz (2024).

2.3.2 Versuchsbeschreibung

Akkumulationen zu den Selektionsversuchen und dem Langzeitversuch

Zu allen Selektionsversuchen wurden regelmäßige begleitende Akkumulationsversuche durchgeführt, um die PHA-Produktionsperformance, der in den Selektionsversuchen untersuchten Biozönose, beurteilen zu können. Diese erfolgten in der Regel zu Beginn der Selektion (Tag 0) und danach einmal wöchentlich, lediglich im ersten Selektionsversuchsblock mit unterschiedlichen Inokula wurden ebenfalls an den Tagen 1 und 4 zusätzliche Akkumulationen ausgeführt, um die anfängliche zeitliche Entwicklung begutachten zu können. Für die Akkumulationsversuche, welche im Batch-Modus betrieben wurden, fand eine Nutzung der in der Selektion abgezogenen Biomasse statt. Diese wurde vor Versuchsbeginn in einem Gefäß aufgefangen, beprobt und jeweils zwischen 0,5 und 1,5 L der selektierten Biomasse wurden händisch in die Akkumulationsreaktoren überführt. Daraufhin erfolgte das Einstellen einer regelmäßigen Substratdosierung alle 30 min über einen Zeitraum von 24 h. Das Volumen des zudosierten Substrates zu jedem Zeitpunkt war abhängig von der Substratkonzentration des versäuerten Brauereiabwassers (vgl. Tabelle 2 und Tabelle 4). Es wurde eine Substratkonzentration von 100 mg CSB/L bezogen auf die Startbiomasse pro Feed für die Akkumulation ausgewählt. Die Substratdosierung wurde jedoch in allen Versuchen anhand des CSB_{gel} , und nicht anhand des CSB_{VFA} , berechnet, da zu dem Zeitpunkt des Versuchsbeginns die Messergebnisse zur VFA-Konzentration meist noch nicht vorlagen. Die tatsächliche Konzentration an VFA-CSB wurde im Nachhinein berechnet und ist in Tabelle 7 mit aufgeführt. Aus der VFA-Zusammensetzung des genutzten Substrates ergab sich zudem eine theoretische PHA-Zusammensetzung, welche anhand des Verhältnisses von Säuren mit gerader und ungerader Anzahl an Kohlenstoff-Atomen berechnet wurde (s. 2.4.3) (Tabelle 7). Auf eine Nährstoffzugabe wurde in den Akkumulationen verzichtet, da ein Biomassewachstum während der Akkumulation aufgrund einer dadurch verminderten PHA-Produktion vermieden werden sollte.

Tabelle 7: Übersicht über die Akkumulationen in Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern und einem Langzeitversuch. CSB: chemischer Sauerstoffbedarf, VFA: flüchtige Fettsäuren, gel: gelöst, HB: Hydroxybutyrat, HV: Hydroxyvalerat. Die Substratzugabe bezieht sich auf L der Startbiomasse.

Versuchsblock	Substratzugabe pro Feed [mgCSB_{VFA}/L] ([mgCSB_{gel}/L])	Theoretische PHA- Zusammensetzung [% HB:HV]
Inokulum		
1	100,0 (100,0)	60,0:40,0
2	100,0 (100,0)	60,0:40,0
Schlammalter		
1	66,2 (100,0)	73,3:26,7
2	66,2 (100,0)	73,3:26,7
Zyklusdauer		
1	76,1 (100,0)	74,7:25,3
2	76,1 (100,0)	74,7:25,3
Raumbelastung		
1	79,2 (100,0)	71,6:28,4
2	79,2 (100,0)	71,6:28,4
Langzeitversuch		
Tag 0-61	93,2 (100,0)	70,6:29,4
Tag 61-116	73,0 (100,0)	83,8:16,2

Akkumulationsversuche mit unterschiedlichem Substrat

Zusätzliche zehn Akkumulationsversuche wurden während der zweiten und dritten Woche der Langzeit-Selektion durchgeführt. Diese dienten, wie bereits erwähnt, der Untersuchung des Einflusses eines Substratwechsels von Selektions- zu Akkumulationsphase auf die PHA-Produktion sowie die zugehörige Biozönose. Hierzu wurden zwei synthetische Substrate, zwei Industrieabwässer sowie das im gleichen Zeitraum in der Langzeit-Selektion genutzte Brauereiabwasser verwendet (s. Kapitel 2.1.2). Eine Übersicht über die Substratvariationen, die sich aus dem genutzten Substrat ergebenden Feed-Konzentrationen sowie die anhand des Substrates errechnete theoretische PHA-Zusammensetzung für jeden Versuch sind in Tabelle 8 aufgeführt. Für die Versuche zur Substratkonzentration in der Akkumulation wurden als Zielwerte 50, 200 und 300 mg/L pro Fedd ausgewählt und anhand des CSB_{gel} durch Anpassung des zudosierten Substratvolumens eingestellt. Die daraus resultierenden CSB_{VFA}-Konzentrationen sind ebenfalls der Tabelle zu entnehmen. Des Weiteren ist dort der Versuchstag der Langzeit-Selektion angegeben, an welchem der entsprechende Akkumulationsversuch mit der aus der Selektion abgezogenen Biomasse durchgeführt wurde.

Tabelle 8: Übersicht über Akkumulationsversuche mit variierendem Substrat und einer selektierten Biozönose aus einem Langzeit-Selektionsversuch. Die zu untersuchenden Parameter sind fett markiert. CSB: chemischer Sauerstoffbedarf, VFA: flüchtige Fettsäuren, gel: gelöst, HB: Hydroxybutyrat, HV: Hydroxyvalerat, Vorbeh.: vorbehandelt. Die Substratzugabe bezieht sich auf L der Startbiomasse.

Versuch	Versuchstag	Substratzugabe pro Feed [mgCSB_{VFA}/L] ([mgCSB_{gel}/L])	Theoretische PHA- Zusammensetzung [% HB:HV]
Substratzusammensetzung			
Synthetisches Substrat 1	5	100,0 (100,0)	30,0:70,0
Synthetisches Substrat 2	8	100,0 (100,0)	70,0:30,0
Fruchtsaftabwasser	9	61,9 (100,0)	84,0:16,0
Vorbeh. Brauereiabwasser	12	71,0 (100,0)	40,0:60,0
Substratkonzentration			
Konzentration 1	13	46,6 (50,0)	70,6:29,4
Konzentration 2	15	186,4 (200,0)	70,6:29,4
Konzentration 3	16	279,5 (300,0)	70,6:29,4
Nährstoffverfügbarkeit			
Stickstoff	19	93,2 (100,0)	70,6:29,4
Phosphor	20	93,2 (100,0)	70,6:29,4
Stickstoff- und Phosphor	21	93,2 (100,0)	70,6:29,4

2.4 Analytik

In allen Selektionsversuchen erfolgte zu Versuchsbeginn (Tag 0) sowie anschließend einmal wöchentlich eine Probenahme zur Analyse der im Folgenden beschriebenen Parameter. Zu Beginn der Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum wurden zusätzlich an den Tagen 1 und 4 Proben genommen.

2.4.1 Organische Trockensubstanz

Bei jeder Probenahme erfolgte zu Beginn und Ende der Akkumulationsphase eine Bestimmung der organischen Trockensubstanz (oTS) zur Überwachung der Biomassestabilität im System. Die Bestimmung wurde in Anlehnung an DIN 38409-2:1987-03 durchgeführt. Dazu wurden zunächst 150 ml des durchmischten Reaktorinhaltes mittels Büchner-Filtration mit Schwarzbandfiltern (589/1, D = 100 mm, Whatman™, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) in drei Replikaten mit je 50 ml pro Reaktor filtriert. Die Filter wurden in Glühtiegeln bei 105 °C für 24 h getrocknet und anschließend für 4 h bei 550 °C geglüht. Nach beiden Schritten wurden die Tiegel gewogen, nachdem sie in Exsikkatoren abgekühlt waren. Anhand der Gewichts Differenz bezogen auf das analysierte Volumen zu

Beginn der Filtration konnte die organische Trockensubstanz in mg/L für den Reaktor berechnet werden.

2.4.2 Substratparameter

Zur Charakterisierung des produzierten Substrates und 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 CSB- und der VFA-Konzentration sowie des Stickstoff- und Phosphorgehaltes am Ende der Versäuerung im Substrat und in der selektierten Biomasse zu Beginn der Akkumulation genommen. Am Ende der Akkumulation wurde zudem ebenfalls die VFA-Konzentration im Reaktor gemessen, um einen Verbrauch des zugegebenen Substrates ermitteln zu können. Vor der Analyse wurde die Proben zur CSB_{gel}-, VFA- und Nährstoffbestimmung für 10 min bei 4500 g zentrifugiert (SORWALL LYNX 600 380/400 V, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland) und anschließend mit Faltenfiltern (595½, D = 185 mm, Whatman™, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) und Spritzenvorsatzfiltern (0,45 µm, Minisart, regenerierte Zellulose, D = 25 mm, Sartorius, Göttingen, Deutschland) zweifach filtriert. Die Proben zur VFA-Bestimmung wurden außerdem mit Schwefelsäure auf einen pH-Wert von unter 2 angesäuert (95-97 %, EMSURE®, Merck KGaA) und bis zur Messung bei -20 °C eingefroren. Die Analyse der Nährstoffe sowie des CSB erfolgte mittels photometrischer Küvetten-Schnelltests (LCK 514 für CSB_{hom} und CSB_{gel}, LCK 303 und 304 für NH₄-N, LCK350 für PO₄-P, Hach Lange GmbH, Berlin, Deutschland) direkt nach der Vorbereitung. Die Ermittlung des CSB_{hom} erfolgte mit der unfiltrierten und homogenisierten Probe. Eine Bestimmung der VFA-Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Säuren wurde mittels Ionenchromatographie (930 Compact IC Flex mit Kationenaustauschssäule Metrosep Organic Acids - 250/7.8, Metrohm, Herisau, Schweiz) durchgeführt. Die Konzentration der Einzelsäuren wurde anhand von Umrechnungsfaktoren (Ameisensäure: 0,348, Essigsäure: 1,067, Propionsäure: 1,514, n- und iso-Buttersäure: 1,818, n- und iso-Valeriansäure: 2,039, Capronsäure: 2,207 gCSB/gVFA; Rössle und Pretorius 2001) in einen jeweiligen chemischen Sauerstoffbedarf umgerechnet und addiert, um eine zusammenfassende Konzentration CSB_{VFA} zu erhalten.

2.4.3 Bestimmung des PHA-Gehaltes und der PHA-Zusammensetzung

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 war, 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. Die Analytik erfolgte in Anlehnung an Braunegg et al. (1978) und Lo et al. (2009). Zur Bestimmung der PHA-Gehalte und -Zusammensetzung wurden die Proben unmittelbar nach der Entnahme aus dem Reaktor mit Schwefelsäure (95-97 %, EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf einen pH-Wert unter 2 angesäuert, dreifach mit destilliertem Wasser gewaschen und für je 1 min bei 4500 g zentrifugiert (SORWALL LYNX 600 380/400 V, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland) und anschließend gefriergetrocknet (VaCo 5, ZIRBUS technology GmbH, Bad Grund, Deutschland). Es wurden je drei Replikat pro Reaktor genommen, welche nach dem Waschschrift vereinigt wurden. Daraufhin wurden 5 mg der gefriergetrockneten Proben eingewogen und mit 1 ml einer Lösung aus Methanol (LiChrosolv®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 5 % Schwefelsäure, 0,8 ml Chloroform (> 99 %, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland) und 0,2 ml eines Benzoessäurestandards (99,5 %, Acros Organics, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland) in Chloroform (5 mg/ml) versetzt. Die Analytik erfolgte jeweils in einem Doppelansatz. Die Proben wurden in einem Heiz-Thermoschüttler (MHR 23, Hettich AG, Bäch, Schweiz) für 6 h bei 100 °C unter kontinuierlichem Schütteln bei 450 rpm aufgeschlossen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde jeweils 1 ml 1%-ige NaCl-Lösung in Reinstwasser (> 99,5 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Darmstadt, Deutschland) 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™, Darmstadt, Deutschland) 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®, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland). Diese wurde abschließend über einen Gaschromatographen gemessen. Hierfür wurde ein GC-FID-Gerät der Ausführung Agilent 8860 (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Deutschland) 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-Standards (Poly-3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid, 8 % PHV-Gehalt, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und internem Benzoessäurestandard (s.o.).

Die so ermittelte Menge an PHA wurde auf die organische Trockensubstanz der eingewogenen Probe bezogen und als Gehalt PHA/%oTS angegeben. Hierzu wurden weitere 3 Proben pro Reaktor genommen, angesäuert, gewaschen und vereinigt und bis

zur Einwaage nach der Gefriertrocknung genau wie die PHA-Proben (s.o.) behandelt. Die gefriergetrockneten Proben wurden gewogen und anschließend getrocknet und geglüht (s. Kapitel 2.4.1). Zur Beurteilung der molaren Zusammensetzung des produzierten Polymers wurden zunächst die Stoffmengenkonzentrationen der Monomere anhand der gemessenen Konzentration berechnet. Anschließend wurden diese durch Multiplikation mit dem Volumen in die Stoffmenge umgerechnet und zur gesamten PHA-Stoffmenge addiert. Abschließend wurde der jeweilige molare Anteil der Monomere an dem gesamten Polymer ermittelt.

Die theoretische Zusammensetzung an PHA wurde anhand der Substratzusammensetzung errechnet, indem das C-molare Verhältnis der VFA im Substrat ermittelt wurde. Alle Säuren mit gerader Anzahl an Kohlenstoff-Atomen wurden dabei zu einem theoretischen HB-Anteil (Gleichung 1) und alle Säuren mit ungerader Anzahl an Kohlenstoff-Atomen zu einem theoretischen HV-Anteil (Gleichung 2) zusammengefasst.

$$HB = \frac{n_{HAc} * 2 + n_{H(iso)-Bu} * 4 + n_{HCap} * 6}{n_{HFor} + n_{HAc} * 2 + n_{HPro} * 3 + n_{H(iso)-Bu} * 4 + n_{H(iso)-Val} * 5 + n_{HCap} * 6} \quad \text{Gleichung 1}$$

$$HV = \frac{n_{HFor} + n_{HPro} * 3 + n_{H(iso)-Val} * 5}{n_{HFor} + n_{HAc} * 2 + n_{HPro} * 3 + n_{H(iso)-Bu} * 4 + n_{H(iso)-Val} * 5 + n_{HCap} * 6} \quad \text{Gleichung 2}$$

Dabei sind:

HB: Theoretischer Anteil an Hydroxybutyrat.

HV: Theoretischer Anteil an Hydroxyvalerat.

n_i : Stoffmengenkonzentration der jeweiligen VFA [mol/L].

Faktor: Anzahl an Kohlenstoffatomen in der jeweiligen VFA.

2.5 Molekularbiologische Methodik

2.5.1 DNA-Extraktion

Zur Charakterisierung der mikrobiellen Gesellschaft wurden zum Ende der famine-Phase (Beginn Akkumulation) in den wöchentlichen Akkumulationen der Selektionsversuche und des Langzeitversuches Proben zur DNA-Analyse genommen. Außerdem wurden in der Langzeitselektion und in den Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat zusätzlich zum Ende der Akkumulation Biomasseproben zur DNA-Analyse genommen. Nach erfolgter Probenahme von je drei Proben aus den Selektions- (und Akkumulations-) Reaktoren wurden die unbehandelten Proben bis zur weiteren Bearbeitung unmittelbar bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden diese zunächst für 10 min bei 4500 g zentrifugiert (SORWALL LYNX 600 380/400 V, Thermo Fisher Scientific™, Darmstadt, Deutschland), der Überstand wurde verworfen und die Proben wurden vereinigt. Daraufhin wurde eine Extraktion der DNA mittels DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) 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™, Darmstadt, Deutschland) gemessen. Im Anschluss wurden die Extrakte zu StarSEQ GmbH (Mainz, Deutschland) zur PCR-Amplifizierung und paired-end Illumina-MiSeq-Sequenzierung der V3-V4-Region der bakteriellen 16S rDNA versendet. Hierzu wurde das Primerpaar 341F-806R verwendet (Klindworth et al. 2013; Takahashi et al. 2014). Das PCR-Protokoll bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 3 min, gefolgt von 34 Zyklen mit den Schritten Denaturierung (95 °C für 20 s), Annealing (55 °C für 15 s), Elongation (72 °C für 4 min) und einer finalen Verlängerung von 10 min bei 72 °C . Die Proben der Versuche dieser Arbeit wurden in drei Sequenzierläufen analysiert. Der erste Datensatz enthielt dabei die Proben des Selektionsversuches mit unterschiedlichem Inokulum, der zweite enthielt die Proben der Selektionsversuche zum Schlammalter, der Zyklusdauer und der Raumbelastung und der dritte Datensatz enthielt die Proben des Langzeitversuches sowie der Akkumulationsversuche.

2.5.2 Bioinformatische Auswertung

Die Rohsequenzen wurden, nach erfolgreicher Qualitätskontrolle mittels FastQC (v0.11.9, Andrew 2010), nach ihrer spezifischen Probenkennung demultiplext und die Primer wurden mithilfe von CUTADAPT (v1.18, Martin 2011) aus den Sequenzen entfernt. Über den DADA2-Workflow (Callahan et al. 2016) mit dem dada2-Package (v1.8) in RStudio (v4.0.5, R Core Team 2021) wurden die Sequenzen anschließend bioinformatisch ausgewertet,

wobei diese zunächst mithilfe des Befehls *filterAndTrim* gefiltert und gekürzt wurden. Dabei wurden anhand der Qualität der Sequenzen als Parameter eine Sequenzlänge (*truncLen*) von 230 und ein maximaler Fehler (*maxEE*) von 5 für den ersten Sequenzierlauf (Inokula), ein Fehler von 3 für den zweiten Sequenzierlauf (Schlammalter, Zyklusdauer, Raumbelastung) sowie ein Fehler von 2 für den dritten Sequenzierlauf (Langzeitversuch und Akkumulationsversuche) gewählt. Die beiden jeweiligen Reads pro Sequenz wurden mittels *mergePairs* mit einer Mindestüberlappung von 20 Basenpaaren und einem „Mismatch“ von maximal 2 zusammengeführt. Die taxonomische Zuordnung erfolgte durch Abgleich mit der Greengenes-Datenbank (DeSantis et al. 2006) mit dem LCA-Kriterium („Last Common Ancestor“) und einem Syntax-cutoff-Wert von 0,8 (Edgar 2016). Die resultierende Tabelle enthielt alle Sequenzen in Form von ASVs („Amplicon Sequence Variants“), die Anzahl dieser pro Probe sowie die taxonomische Zuordnung. Vor der weiteren statistischen Auswertung wurden alle nicht taxonomische zugeordneten sowie alle nur einmalig auftretenden ASVs aus der Tabelle entfernt.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit RStudio (v4.3.3, R Core Team 2024) und den Packages *vegan* (v2.6-8, Oksanen et al. 2024), *stats* (v4.3.3, R Core Team 2024), *olsrr* (v0.6.1, Hebbali 2024), *car* (v3.1-3, Fox et al. 2019), *rstatix* (v0.7.2, Kassambara 2023b) und *dunn.test* (v1.3.6, Dinno 2024). Die graphische Abbildung der Ergebnisse wurde mit den Packages *ggplot2* (v3.5.2, Wickham 2016), *ggpubr* (v0.6.0, Kassambara 2023a) und *cowplot* (v1.1.3, Wilke 2024) durchgeführt.

Als Grundlage für die Berechnung der relativen Abundanz der einzelnen Taxa und der potenziellen PHA-Produzenten, der Alpha- sowie Beta-Diversität, der Indikator- und Netzwerkanalysen dienten jeweils drei Proben pro Probenahmezeitpunkt, welche aus drei parallel laufenden Reaktoren aus der Selektion (Ende famine-Phase = Anfang Akkumulation) entnommen wurden. Für die PHA-Gehalte und die Anteile an HB und HV am PHA wurden die Proben hingegen zum Ende der Akkumulationsphase entnommen. Für die Alpha-Diversität, den PHA-Gehalt, den Anteil an HB bzw. HV am PHA sowie die relative Abundanz der einzelnen Taxa und der potenziellen PHA-Produzenten insgesamt wurden Mittelwerte sowie die zugehörige Standardabweichung der Stichprobe aus den drei Reaktoren zum jeweiligen Zeitpunkt errechnet.

Taxonomie und Alpha-Diversität

Mithilfe des Packages *vegan* erfolgte, vor einer weiteren Auswertung der Daten, eine Normalisierung der betrachteten Proben auf eine gleiche Anzahl an Sequenzen mit dem Befehl *rarefy*. Alpha-Diversitätsindizes (ASV-Reichtum, Evenness, Simpson-Index, Shannon-Index) wurden mithilfe der Befehle *specnumber* und *diversity* berechnet. Des Weiteren erfolgte, nach Zusammenfassung der ASVs gleicher Taxa zu den entsprechenden Gruppen, eine Berechnung der relativen Abundanz des jeweiligen Taxons pro Probe. ASVs, welche nicht bis auf Gattungsebene bestimmt werden konnten, wurden auf der nächsthöheren möglichen Taxonomieebene zugeordnet. Eine Darstellung der taxonomischen Zusammensetzung erfolgte für die 40 abundantesten Taxa. Zudem erfolgte eine Auswertung der taxonomischen Gruppen mit statistisch signifikanter Änderung über die Zeit in allen Selektionsversuchen, indem lineare Regressionsanalysen mithilfe des Packages *Maaslin2* (v1.16.0, Mallick et al. 2021) durchgeführt wurden. Als „fixed effect“ wurde dabei der Versuchstag festgelegt. Als statistisch signifikant wurden Gruppen mit einem q-Wert von $< 0,25$ angesehen, wobei dieser Wert sich aus dem mittels Benjamin-Hochberg-Verfahren korrigierten p-Wert ergibt (Martin et al. 2022). Die Änderung der relativen Abundanz der so ermittelten, statistisch signifikanten Taxa, welche zudem eine relative Abundanz von mehr als 1 % aufwiesen, wurde im Vergleich zum Startpunkt der Selektion in Heatmaps dargestellt.

Potenzielle PHA-Produzenten

Eine Zuordnung der Organismen zu der Gruppe potenzieller PHA-Produzenten erfolgte nach der taxonomischen Bestimmung anhand einer Liste, die auf Grundlage einer Literaturrecherche zusammengestellt wurde (Anhang 31). Der Anteil potenzieller PHA-Produzenten insgesamt 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. Alle einzelnen Taxa mit Zuordnung zu der Gruppe potenzielle PHA-Produzenten wurden zur Übersichtlichkeit in Abbildungen und im Fließtext mit einer Markierung durch einen Asteriskus (*) hervorgehoben.

Zusammenhang des PHA-Gehaltes mit der Zeit und dem Anteil potenzieller PHA-Produzenten

Eine Untersuchung des Verhältnisses des produzierten PHA sowohl mit dem Experiment als auch mit der Zeit erfolgte für die Versuchsblöcke mit unterschiedlichen

Selektionsparametern (Inokulum, Schlammalter, Zyklusdauer, Raumbelastung) mittels ANCOVA (Kovarianzanalyse). Zunächst wurde mit den Daten mithilfe der Funktion *lm* (stats) ein Modell gebildet und die Residuen wurden mittels Shapiro- und Levene-Test (Funktionen *shapiro_test* und *levene_test* in *rstatix*) auf Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft. Wenn diese nicht gegeben waren, wurden die Daten transformiert. Die gleichen Analysen wurden für den PHA-Gehalt in Zusammenhang mit dem Experiment und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten durchgeführt. Eine Wurzel-Transformation fand für den Datensatz der Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum und für den Datensatz der Schlammalterversuche statt. Für die Versuche mit unterschiedlichem Inokulum wurde neben der gesamten Versuchsdauer zusätzlich der Zeitraum der ersten 7 Tage betrachtet und für den Versuchsblock mit unterschiedlicher Zyklusdauer wurden nur die ersten 7 Tage betrachtet, da für den gesamten Datensatz auch nach Transformation keine Normalverteilung gegeben war. Für den Langzeitversuch erfolgte eine Analyse des Zusammenhangs des PHA-Gehaltes mit der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten mittels linearer Regression. Hierfür wurden die Daten zunächst ebenfalls auf Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft. Die Prüfung der Normalverteilung erfolgte graphisch mittels *ols_plot_resid_hist* (*olsrr*) und die Überprüfung der Varianzhomogenität erfolgte mittels Levene-Testes.

Kruskal-Wallis-, Dunn- und gepaarter Wilcoxon-Test

Ein Unterschied in der Alpha-Diversität sowie dem Anteil an HB im produzierten PHA zwischen den einzelnen Probenahmezeitpunkten wurde für alle Versuche mittels Kruskal-Wallis-Test mit der *kruskal.test*-Funktion des Packages *stats* und anschließendem Dunn-post-hoc-Test mit der *dunn.test*-Funktion des Packages *dunn.test* ermittelt. Zudem wurden Unterschiede im produzierten PHA-Gehalt zwischen Versuchszeitpunkten bzw. Versuchen für den Langzeit-Selektionsversuch und die Akkumulationsversuche mit unterschiedlichem Substrat so auf Signifikanz getestet. Taxonomische Unterschiede zwischen den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter sowie unterschiedlicher Zyklusdauer und Raumbelastung wurden zunächst mittels Kruskal-Wallis und anschließendem gepaarten Wilcoxon-Test mit der Funktion *pairwise.wilcox.test* des Packages *stats* durchgeführt. Dabei wurden alle Probenahmezeitpunkte innerhalb jedes Versuches zusammengenommen. Für die Unterschiede in der taxonomischen Zusammensetzung zu Beginn und Ende der Akkumulationsphase in den Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat wurde ebenfalls ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Eine Korrektur der p-Werte erfolgte mittels Bonferroni-Methode.

Indikatoranalysen

Für die Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum, Schlammalter sowie unterschiedlicher Zyklusdauer und Raumbelastung wurden Analysen zur Ermittlung von Indikatororganismen für die einzelnen Parameter und Kombinationen von Parametern durchgeführt. Dabei wurde der Versuchsblock mit unterschiedlichem Inokulum jedoch separat betrachtet, da in diesem im Vergleich zu den anderen Versuchsblöcken, ein reines Substrat verwendet wurde. Die Indikatoranalyse basiert auf der relativen Abundanz eines Organismus in Kombination mit der Frequenz des Vorkommens dieses Organismus in einer bestimmten Umgebung (Dufrene und Legendre 1997). Hierzu wird ein Index-Wert berechnet (IndVal), welcher mit steigendem Wert (0-1) eine höhere Spezifität dieses Organismus für diese Umgebung darstellt. Für diese Analyse wurde der Befehl *multipatt* aus dem Package *indicspecies* (v1.8.0, Cáceres und Legendre 2009) mit einer Anzahl an Permutationen von 999 verwendet. Dies stellt eine Erweiterung des IndVal-Wertes dar, in welcher nicht nur einzelne Standorte, sondern auch Kombinationen aus diesen betrachtet werden, sodass ein Organismus ein Indikator für mehrere Umgebungen sein kann (Cáceres und Legendre 2009). Bei Zugehörigkeit zu allen Umgebungen werden Organismen aus der Analyse ausgeschlossen, da sie nicht signifikant sind. Diese wurden jedoch hier in den Untersuchungen ebenfalls mit aufgenommen, da sie Indikatoren für alle Systeme darstellen können. Der Signifikanzwert p wurde mittels Benjamin-Hochberg-Methode korrigiert. Organismen mit einem IndVal-Wert von mindesten 0,25 werden als starke Indikatoren gewertet (Dufrene und Legendre 1997). Da in der Analyse mittels *multipatt* die Quadratwurzel des IndVal-Wertes angegeben wird, gilt in diesem Fall ein Organismus mit einem Wert von über 0,5 als guter Indikator (Cáceres und Legendre 2009). In weiteren Studien wird ein IndVal-Wert von über 0,7 als starke Assoziation angesehen (McGeoch et al. 2002; Mercado-Gómez et al. 2023). Für die Darstellung in dieser Arbeit erfolgte aufgrund der Übersichtlichkeit eine Auswahl an Organismen mit einem Index-Wert von über 0,8, welche als sehr starke Indikatoren betrachtet wurden.

Beta-Diversität

Die Beta-Diversität der bakteriellen Mischkulturen innerhalb der Selektions- und Akkumulationsversuche wurde mittels Bray-Curtis-Ähnlichkeitskoeffizienten über die *metaMDS*-Funktion in *vegan* ermittelt und in eine Distanzmatrix überführt. Eine anschließende graphische Darstellung erfolgte durch eine NMDS („nicht-metrische multidimensionale Skalierung“). Der PHA-Gehalt wurde mittels *envfit*-Funktion als Vektor in die Ordination eingefügt, sofern eine Signifikanz vorlag. Diese wurde mit einer Monte-Carlo-Analyse mit 1000 Permutationen ermittelt. Der zeitliche Effekt sowie der Effekt des

Experiments in den Versuchen mit unterschiedlichen Selektionsparametern (Inokulum, Schlammalter, Zyklusdauer, Raumbelastung), des Substratwechsels in dem Langzeit-Selektionsversuch bzw. der Phase (Beginn und Ende Akkumulation) in den Akkumulationsversuchen auf das Muster der bakteriellen Zusammensetzung wurde mithilfe einer PERMANOVA mit 999 Permutationen sowie anschließenden pairwise-Adonis-Tests mit der *adonis2*- sowie der *pairwise.adonis*-Funktion des Packages *pairwiseAdonis* (v.0.4, Martinez 2020) getestet. Eine Korrektur der p-Werte erfolgte mittels Bonferroni-Methode.

Netzwerkanalysen

Die Netzwerkanalysen wurden in Anlehnung an Forster et al. (2021) und Qu et al. (2021) durchgeführt. Netzwerke wurden für die Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaft der drei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum über die Zeit in *NetworkNullHPC* (v0.5, Lentendu und Dunthorn 2021) berechnet. Dieses Skript wendet die Null-Modell-Strategie nach Connor et al. (2017) an. Als Grundlage für die Analyse diente die ASV-Abundanz-Matrix vor Normalisierung. Im Verlauf der Analyse wurden zunächst seltene ASVs mit einer Präsenz in weniger als 10 % der Proben entfernt. Daraufhin folgte eine Normalisierung der Proben aufgrund der Sequenzabundanz unter Berücksichtigung der zu erwartenden Sequenziertiefe. Ein hinzufügen von „random noise“ mittels 1000 Permutationen zur Matrix wurde durchgeführt, um Schwellwerte für die ermittelten Spearman-Rank-Korrelationskoeffizienten zu erhalten. Diese lagen für die ersten beiden Inokulumsversuche bei 0,6 und -0,6 und für den dritten Inokulumsversuch bei 0,63 und -0,63. Nur Korrelationen von ASVs mit einem höheren Wert wurden in die Netzwerke einbezogen. Der PHA-Gehalt sowie die Anteile an HB und HV wurden als Umweltfaktoren mit der Option *-e* in die Analyse inkludiert. Eine graphische Darstellung der Netzwerke erfolgte über *visNetwork* (v2.1.2, Almende et al. 2022). Für die Netzwerke wurden zudem mithilfe des Packages *igraph* (v2.1.2, Csárdi et al. 2024) in R einige Eigenschaften ermittelt. Hierzu zählten der mittlere Grad, welcher die mittlere Anzahl an Kanten pro Knoten angibt, die mittlere Weglänge, welche die mittlere Entfernung in Kanten pro Knoten angibt, sowie die Dichte, dem Anteil an realen Kanten im Netzwerk im Vergleich zu einem komplett verknüpften Netzwerk mit gleicher Kantenanzahl. Außerdem wurde der Umfang (maximale Weglänge zwischen zwei Knoten), die Modularität (Aufteilung des Netzwerks in Gruppen mit stark assoziierten Knoten) und die Transitivität (Anzahl dreifach verbundener Knoten im Vergleich zu einem voll verbundenen Netzwerk) als Eigenschaften ermittelt.

Markerorganismen

Für den Langzeit-Selektionsversuch wurden für die einzelnen Zeitpunkte in der Selektion Markerorganismen identifiziert. Dies erfolgte mithilfe einer LEfSe-Analyse („Lineare Diskriminanten Analyse der Effektgröße“), einer Erweiterung der LDA („Lineare Diskriminanten Analyse“), die es erlaubt Taxa zu identifizieren, welche die Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen charakterisieren (Segata et al. 2011). Dabei werden die Abundanzen zwischen den Gruppen bzw. Zeitpunkten miteinander verglichen und statistische Unterschiede analysiert. Hierzu wurden die Packages `coin` (v1.4-3, Hothorn et al. 2006) und `microbiomeMarker` (v0.0.1, Cao et al. 2022) mit dem Befehl `run_lefse` in R verwendet. Als Kriterien wurden ein Wilcoxon- sowie ein Kruskal-Wallis-cutoff von 0,05 und ein LDA-cutoff von 2 und die Gattung als zu untersuchende Taxonomieebene ausgewählt. Als Datengrundlage diente ein `Phyloseq`-Objekt welches aus der normalisierten ASV-Abundanz-Matrix, einer Taxonomie-Tabelle und einer Tabelle mit Probenzuordnung mithilfe des Packages `phyloseq` (v1.46.0, McMurdie und Holmes 2013) erstellt wurde. Es wurden jeweils 6 Proben pro Versuchstag, und zwar zu Beginn und Ende der Akkumulationsphase für die Berechnung verwendet. Eine Korrektur der p-Werte erfolgte mittels Bonferroni-Methode.

3 Ergebnisse

3.1 Selektion

In den Versuchen zur Selektionsphase sollte der Nutzen dieser sowie ihr zeitlicher Verlauf bezüglich mikrobieller Zusammensetzung und PHA-Produktionsperformance untersucht werden. Hierzu fand eine Variation verschiedener Betriebsbedingungen statt, wobei in jedem Versuchsblock zwei bis drei Variationen eines Parameters miteinander verglichen wurden und ein Parameter als Grundlage für den nächsten Versuchsblock ausgewählt wurde. Der erste Versuchsblock zur Untersuchung des Einflusses des verwendeten Inokulums (Kapitel 3.1.1) wurde unter Verwendung von synthetischem Substrat und die nachfolgenden Versuche zur Selektion (Kapitel 3.1.2-3.1.3) wurden mit realem Substrat (Brauereiabwasser) bzw. einer Mischung aus realem und synthetischem Substrat (Kapitel 3.1.4) durchgeführt.

3.1.1 Inokulum

Im ersten Versuchsblock erfolgte ein Vergleich der Entwicklung der mikrobiellen Mischbiozönose und deren PHA-Produktionsperformance drei verschiedener Inokula über die Selektionsphase. Dafür wurden Belebtschlämme unterschiedlicher Herkunft als Inokulum in den Selektionsreaktoren genutzt. Das erste und zweite Inokulum stammten von kommunalen Kläranlagen, wobei letzteres eine biologische Phosphoreliminierung im Prozess inbegriffen hatte. Das dritte Inokulum stammte von einer Industriekläranlage einer Brauerei. Des Weiteren war ein Ziel dieses Versuchsblocks den Erfolg bzw. Nutzen einer Selektionsphase im PHA-Produktionsprozess zu untersuchen und den zeitlichen Verlauf bis zum Einstellen einer erfolgreichen Selektion zu beobachten.

Sequenzdaten

Für alle Proben der drei Versuche mit unterschiedlichem Inokulum konnte eine annähernde Sättigung der ermittelten Sequenzen mit der Sequenzierung erreicht werden (Anhang 3). Im Versuch mit dem Inokulum 1 lag das Sequenzminimum bei 26.746, im Versuch mit dem zweiten Inokulum bei 19.151 und im letzten Versuch bei 22.668 Sequenzen. Eine Normalisierung zur weiteren Analyse der Biozönose erfolgte bei Vergleich aller drei Versuche in einem Datensatz auf ein gemeinsames Sequenzminimum von 19.151 Sequenzen und bei Betrachtung der Biozönose innerhalb eines Versuches auf das jeweilige Minimum.

Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten

Zunächst wurde die PHA-Produktionsperformance und deren Verbindung mit der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten dreier Belebtschlämme unterschiedlicher Herkunft untersucht (Abbildung 11). Im ersten Selektionsversuch mit einem Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage (Inokulum 1) stieg der PHA-Gehalt bis an Tag 7 an und erreichte dort mit einem PHA-Wert von im Mittel ($n = 3$) $50,4 (\pm 6,1) \% \text{oTS}$ sein Maximum. Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten stieg bis zu diesem Zeitpunkt ebenfalls an, erreichte jedoch erst an Tag 14 ihren maximalen Wert von $71,6 (\pm 7,5) \%$. Nach Tag 7 erfolgte ein starker Einbruch des PHA-Gehaltes auf einen Wert von $13,3 (\pm 7,3) \% \text{oTS}$, vergleichbar mit der PHA-Produktion des unselektierten Inokulums zu Beginn des Versuches ($13,3 \pm 1,1 \% \text{oTS}$). Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten folgte mit einer verzögerten Antwort und lag an Tag 21 nur noch bei $39,5 (\pm 3,9) \%$. Dies war vermutlich Folge eines Betriebsfehlers, wobei es zu einem pH-Dosierfehler kam (vgl. Kapitel 2.2). Jedoch erholten sich sowohl die relative Häufigkeit der potenziellen PHA-Produzenten als auch der produzierte PHA-Gehalt nach diesem Einbruch bis Tag 42 erneut, bis letzterer einen vergleichbaren Wert zu dem PHA-Gehalt an Tag 7 aufwies ($50,1 \pm 5,1 \% \text{oTS}$). Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten lag zu diesem Zeitpunkt bei $55,5 (\pm 3,5) \%$.

In den anderen beiden Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Inokula wurde ebenfalls ein maximaler PHA-Gehalt von ca. 50 % erreicht. Im zweiten Selektionsversuch mit einem Belebtschlamm aus einer Anlage mit biologischer Phosphoreliminierung (Inokulum 2) wurde dieser Maximalwert nach 28 Tagen ($49,7 \pm 8,5 \% \text{oTS}$), im dritten Versuch mit einem Schlamm aus einer Brauerei (Inokulum 3) wurde er nach 14 Tagen ($49,8 \pm 3,1 \% \text{oTS}$) erreicht. Jedoch lagen die PHA-Gehalte in beiden Versuchen ebenfalls an Tag 7 bereits bei hohen Werten von $48,5 (\pm 7,6) \% \text{oTS}$ und $40,5 (\pm 2,4) \% \text{oTS}$ und es war nur noch eine geringe Steigerung zu beobachten. In beiden Versuchen war nach Tag 7 bzw. 14 eine annähernde Sättigung zu beobachten. Ob dieses Muster auch im ersten Selektionsversuch zu beobachten gewesen wäre ist aufgrund des Betriebsfehlers unklar. Der Anteil potenzieller PHA-Produzenten zeigte in beiden Fällen (Inokulum 2 und 3) einen ähnlichen Verlauf zur PHA-Produktion und wies nach Tag 7 einen vergleichbaren mittleren Wert in beiden Versuchen auf ($55,4 \pm 4,5 \%$ für Inokulum 2 und $60,5 \pm 4,7 \%$ für Inokulum 3). Eine statistische Untersuchung mittels ANCOVA zeigte, dass es keinen signifikanten Unterschied im PHA-Gehalt zwischen den Experimenten ($F = 1,77$, $DF = 2$, $p = 0,177$), jedoch über die Versuchsdauer ($F = 37,91$, $DF = 1$, $p < 0,001$) und in Zusammenhang mit der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten gab ($F = 44,02$, $DF = 1$, $p < 0,001$)

(Anhang 1). Zudem gab es in den ersten 7 Tagen der Versuche einen signifikanten Unterschied im PHA-Gehalt zwischen den Experimenten ($F = 12,27$, $DF = 2$, $p < 0,001$) und über die Versuchsdauer ($F = 251,88$, $DF = 1$, $p < 0,001$) (Anhang 2).

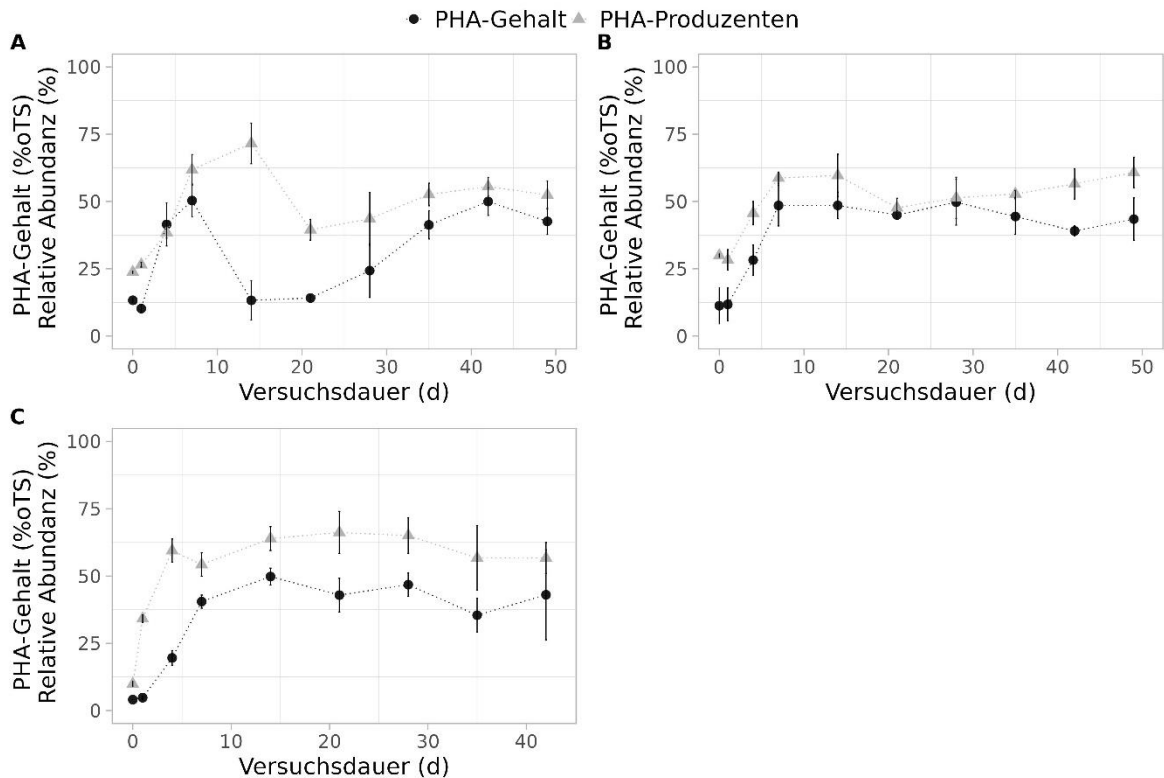


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum. A) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. B) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung. C) Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Eine Verbindung der Punkte mittels gepunkteter Linie dient als optische Unterstützung zur Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufs.

Die PHA-Zusammensetzung wies über die Versuchsdauer einen unterschiedlichen Verlauf zwischen den drei Inokula auf (Abbildung 12). Im ersten sowie im dritten Versuch mit den Inokula aus der kommunalen und der Industriekläranlage zeigte sich über den zeitlichen Verlauf eine Zunahme des HB- im Vergleich zum HV-Anteil im produzierten PHA. Zunächst bestand das produzierte Polymer im Selektionsversuch mit Inokulum 1 zu $72,7 (\pm 0,2) \%$ und im dritten Versuch zu $100,0 (\pm 0,0) \%$ aus HV. Im Versuch mit Inokulum 2 lag der HV-Anteil zu Beginn bei $76,4 (\pm 20,4) \%$. Da in allen Versuchen das gleiche synthetische Substrat verwendet wurde, welches eine Zusammensetzung aus VFA mit gerader und ungerader Anzahl von C-Atomen im Verhältnis von 60,0 zu 40,0 % enthielt, wurde ebenso dieses Verhältnis von HB zu HV im Polymer als theoretische Zusammensetzung berechnet (vgl. Kapitel 2.4.3). Das produzierte PHA wurde hinsichtlich seiner Zusammensetzung mit

diesem theoretischen Wert verglichen und ist als gestrichelte Linie dargestellt (Abbildung 12). Im ersten Versuch sowie im letzten Versuch entwickelte sich die PHA-Zusammensetzung über die Zeit tendenziell in diese Richtung. Zum Ende des ersten Versuches bestand das produzierte PHA zu 62,0 % aus HB und zu 38,0 % aus HV ($\pm 3,6\%$) und zum Ende des dritten Versuches bestand dieses zu 48,4 % aus HB und zu 51,6 % aus HV ($\pm 5,4\%$). Diese Tendenz zeigte sich im letzten Versuch bereits nach 7 Tagen und im ersten Versuch nach Tag 28. Im zweiten Versuch jedoch entwickelte sich die Zusammensetzung des produzierten PHA zwar bis Tag 14 in diese Richtung (49,6 % HB und 50,4 % HV $\pm 7,2\%$), jedoch stieg der Anteil an HV bis zum Versuchsende kontinuierlich an und lag zum Ende des Versuches bei 67,8 ($\pm 9,8\%$). Die Entwicklung des HB-Anteils wies keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Experiment ($\chi^2 = 1,73$, DF = 2, $p = 0,42$), jedoch mit der Selektionszeit auf ($\chi^2 = 44,88$, DF = 9, $p < 0,001$).

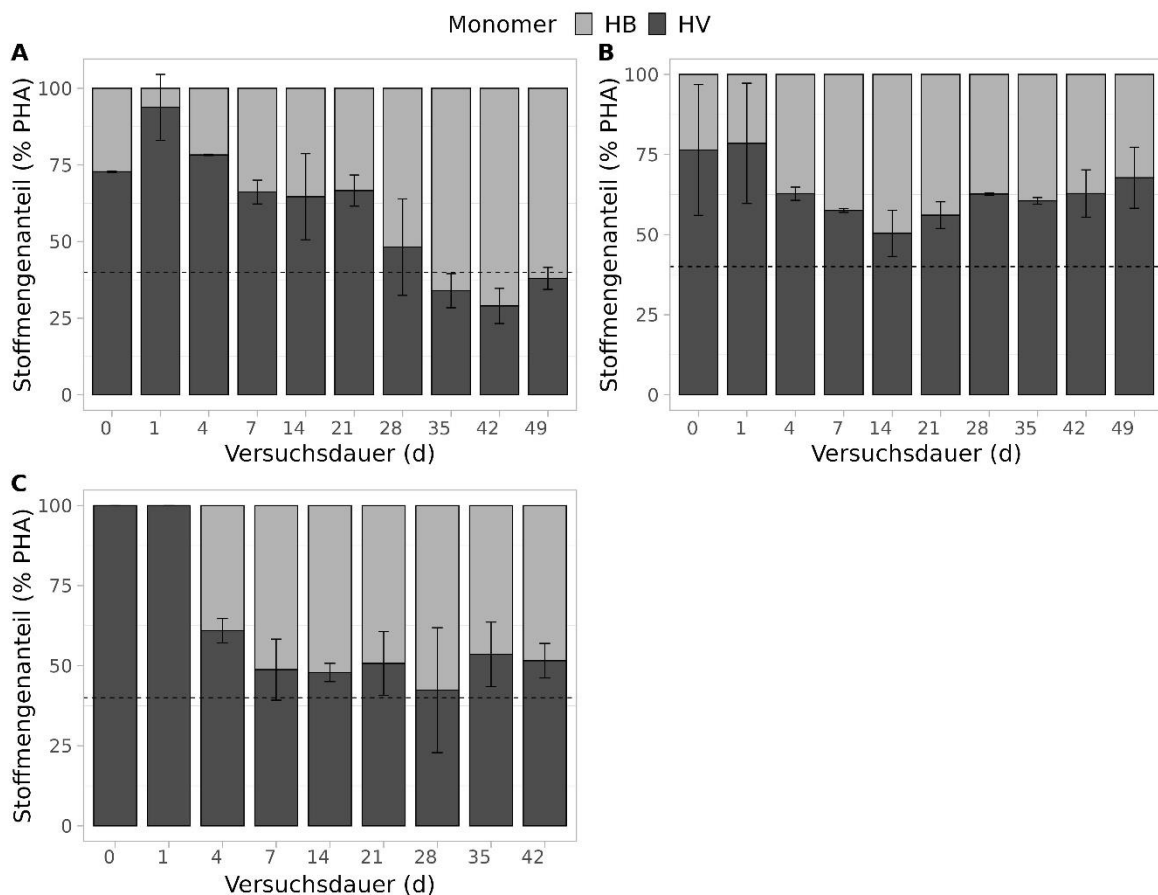


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum. A) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. B) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung. C) Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Die gestrichelte Linie markiert die aufgrund der Substratzusammensetzung berechnete theoretische PHA-Zusammensetzung.

Alpha-Diversität der mikrobiellen Mischbiozönose

Die Entwicklung der Alpha-Diversität zeigte in allen drei Versuchen mit unterschiedlichem Inokulum eine Abnahme über die Selektionsdauer hinweg (Abbildung 13). Diese war für alle Diversitätsindizes in den ersten beiden Versuchen signifikant (Tabelle 9). Im dritten Versuch zeigte sich zwar die gleiche Tendenz, die Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant (Tabelle 9). Ein statistischer signifikanter Unterschied der Parameter zwischen einzelnen Versuchstagen konnte, mit Ausnahme der Tage 0 und 14 und 1 und 14 für den ASV-Reichtum in Inokulum 1, nicht festgestellt werden (Dunn-post-hoc-Test: $Z = 3,43$, $p = 0,03$; $Z = 3,34$, $p = 0,04$).

In dem Selektionsversuch mit Inokulum 1 war zunächst eine starke Abnahme der Diversitätsindizes bis zu Tag 14 bzw. 21 (ASV-Reichtum an Tag 14: $146,7 \pm 30,3$; Evenness an Tag 21: $0,68 \pm 0,06$; Shannon an Tag 14: $5,38 \pm 0,17$, Simpson an Tag 21: $0,90 \pm 0,05$) gefolgt von einer leichten Zunahme bis zum Versuchsende zu verzeichnen (Abbildung 13 A). Insgesamt war jedoch von Beginn der Selektion bis zum Ende des Experiments eine Abnahme des ASV-Reichtums von $514,0 (\pm 125,9)$ auf $291,3 (\pm 35,0)$ und der Evenness von $0,87 (\pm 0,01)$ auf $0,71 (\pm 0,02)$ zu beobachten. Auch der Shannon- sowie der Simpson-Index zeigten eine Abnahme von $5,38 (\pm 0,17)$ auf $4,01 (\pm 0,15)$ und von $0,99 (\pm 0,00)$ auf $0,94 (\pm 0,00)$.

Im zweiten Selektionsversuch nahmen alle Diversitätsparameter mit Ausnahme des ASV-Reichtums kontinuierlich über die Selektionsdauer ab (Evenness: von $0,88 \pm 0,01$ auf $0,72 \pm 0,05$; Shannon: von $5,24 \pm 0,14$ auf $3,85 \pm 0,21$; Simpson: von $0,99 \pm 0,00$ auf $0,93 \pm 0,04$) (Abbildung 13 B). Der Reichtum an ASVs nahm zunächst von $386,0 (\pm 56,9)$ an Tag 0 auf einen Wert von $437,7 (\pm 34,2)$ bis an Tag 7 zu und nahm danach bis Tag 49 auf $209,7 (\pm 25,0)$ ab.

Im Selektionsversuch mit Inokulum 3 war eine Abnahme des ASV-Reichtums bis zum 7. Versuchstag zu beobachten (von $258,3 \pm 58,1$ auf $175,3 \pm 13,0$) (Abbildung 13 C). Dieser stieg danach zunächst auf einen Wert von $238,0 (\pm 26,5)$ an Tag 21 an und sank bis zum Ende des Versuches erneut, bis er bei $161,7 (\pm 47,2)$ lag. Der Shannon-Index verhielt sich ähnlich und sank zunächst bis Tag 7 (von $4,23 \pm 0,19$ auf $4,03 \pm 0,13$), woraufhin er nach erneutem Anstieg ($4,22 \pm 0,27$ an Tag 21) bis zu Tag 42 absank ($3,86 \pm 0,31$). Der Simpson-Index sowie der Evenness-Wert zeigten einige sehr leichte Schwankungen, blieben aber insgesamt über die Selektion bei einem vergleichbaren Wert (Simpson: $0,95 \pm 0,01$ an Tag 0 und $0,96 \pm 0,01$ an Tag 42; Evenness: $0,76 \pm 0,00$ an Tag 0 und $0,76 \pm 0,02$ an Tag 42). Eine Übersicht der Einzelwerte der Alpha-Diversitätsindizes findet sich in Anhang 32.

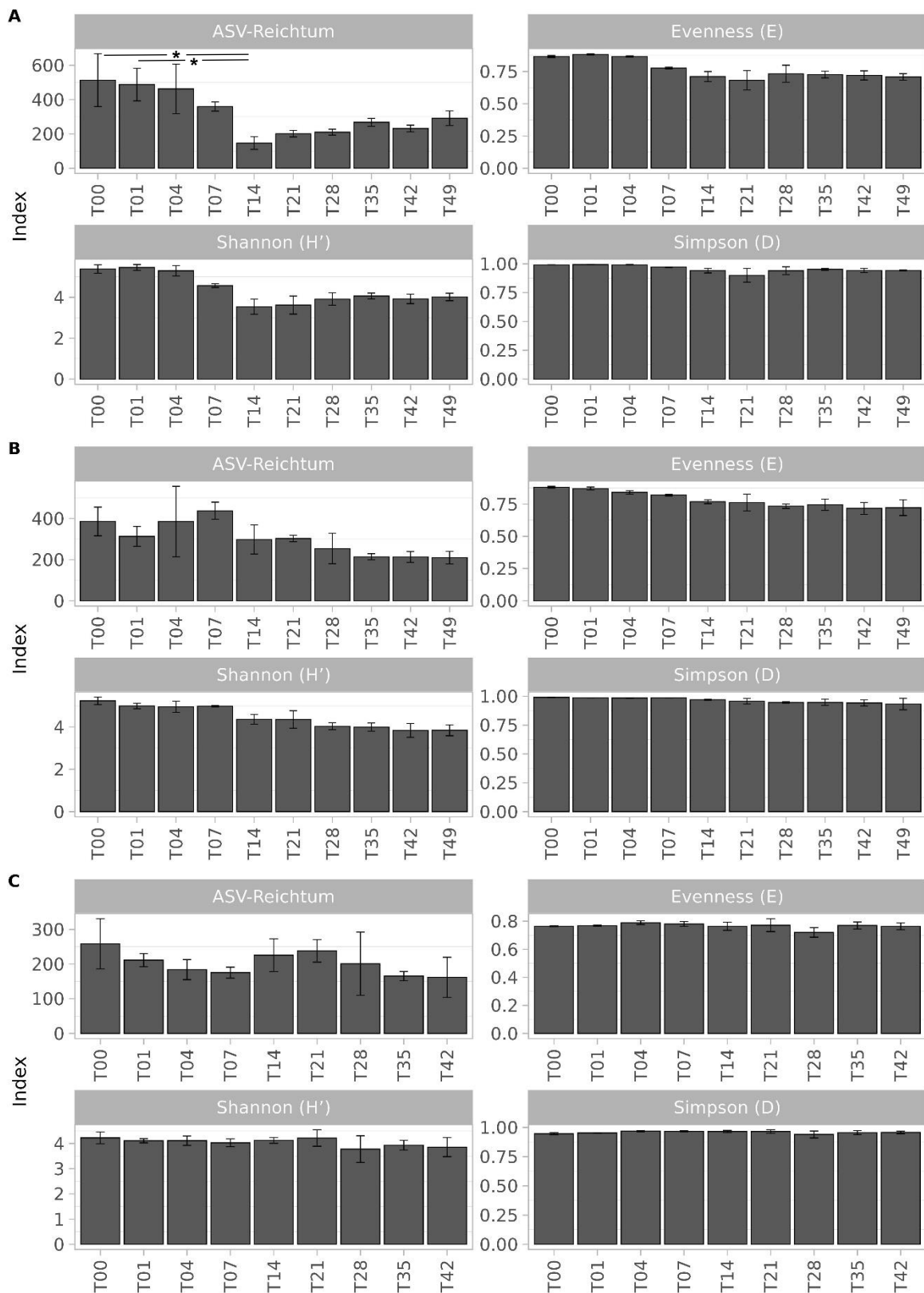


Abbildung 13: Alpha-Diversitätsindizes in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum. A) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. B) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung. C) Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag) mit zugehöriger Standardabweichung. Signifikante Unterschiede wurden mithilfe eines Kruskal-Wallis und anschließendem Dunn-post-hoc-Test ermittelt und sind mittels Asteriskus gekennzeichnet.

Tabelle 9: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests der Alpha-Diversitätsindizes zwischen verschiedenen Zeitpunkten über drei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum. χ^2 : Teststatistik; DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); p: Signifikanzwert.

Index	χ^2	DF	p
Inokulum 1			
ASV-Reichtum	26,76	9	0,002
Evenness (E)	22,10	9	0,009
Shannon-Index (H')	24,41	9	0,004
Simpson-Index (D)	22,20	9	0,008
Inokulum 2			
ASV-Reichtum	20,40	9	0,014
Evenness (E)	23,06	9	0,006
Shannon-Index (H')	24,99	9	0,003
Simpson-Index (D)	22,97	9	0,006
Inokulum 3			
ASV-Reichtum	10,23	8	0,250
Evenness (E)	9,47	8	0,304
Shannon-Index (H')	4,96	8	0,761
Simpson-Index (D)	11,28	8	0,186

Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose

Zur Untersuchung des Einflusses der Wahl des Inokulums und der Selektionsphase auf die Entwicklung der mikrobiellen Gesellschaft erfolgte eine vergleichende Betrachtung der taxonomischen Zusammensetzung über den Versuchsverlauf (Abbildung 14). Aufgrund der Übersichtlichkeit sind die Mittelwerte ohne Standardabweichung dargestellt. Eine Darstellung der Einzelwerte der taxonomischen Zusammensetzung für die jeweiligen Reaktoren findet sich in Anhang 11 und Anhang 33. Des Weiteren sind die Taxa, welche Organismen mit dem Potenzial zur PHA-Produktion enthalten, sowohl in der Abbildung als auch im Text mit einem Asteriskus markiert.

Die Zusammensetzung der Bakteriengesellschaft zu Beginn der Selektionsversuche wies in den beiden Versuchen mit den Belebtschlämmen der kommunalen Kläranlagen (Inokulum 1 und 2) eine ähnliche Zusammensetzung auf. Dabei waren die abundantesten Taxa unter anderem nicht näher bestimmbare Vertreter der Familien Chitinophagaceae ($6,0 \pm 0,2$ % und $9,9 \pm 1,3$ %), Comamonadaceae ($5,7 \pm 0,7$ % und $9,7 \pm 0,6$ %), Saprospiraceae ($10,5 \pm 0,7$ % und $10,1 \pm 1,4$ %) und der Gruppen TM7-1 ($9,0 \pm 0,5$ % und $2,4 \pm 0,3$ %) und TM7-3 ($6,3 \pm 0,3$ % und $3,4 \pm 0,5$ %) (Abbildung 14). Diese Gruppen wurden jedoch teils nach einer Woche der Selektion verdrängt.

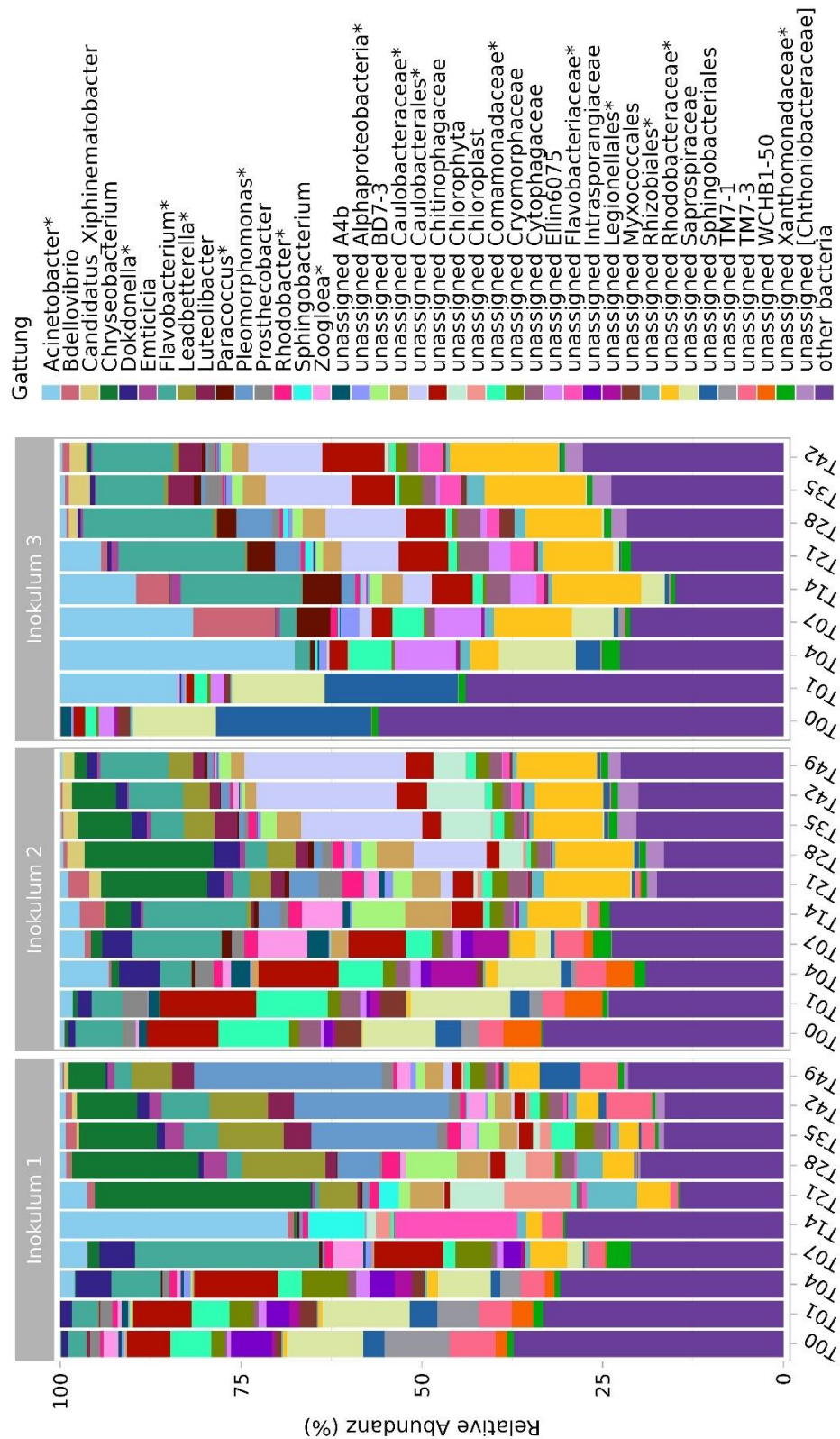


Abbildung 14: Taxonomische Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum. 1: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. 2: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung. 3: Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag). Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Bis zu Versuchstag 7 der Selektion mit Inokulum 1 konnte eine Zunahme von Gattungen mit potenziellen PHA-Produzenten, darunter *Flavobacterium** ($25,4 \pm 0,1$ %), *Zoogloea** ($4,1 \pm 3,9$ %) und *Dokdonella** ($4,9 \pm 1,1$ %), verzeichnet werden. An Tag 14 waren *Acinetobacter** ($31,4 \pm 6,7$ %), *Sphingobacterium* ($7,9 \pm 3,3$ %) und nicht näher bestimmte Vertreter der Familie Flavobacteraceae* ($17,0 \pm 9,5$) die Organismengruppen mit der höchsten relativen Abundanz. Die Zusammensetzung im ersten Selektionsversuch änderte sich bis zu Tag 21 erneut drastisch. Zu diesem Zeitpunkt dominierte die Gattung *Chryseobacterium* ($29,9 \pm 12,1$ %). Weitere abundante Taxa zu diesem Zeitpunkt waren außerdem *Leadbetterella** ($5,3 \pm 1,8$ %) und Vertreter der Gruppe Rhodobacteraceae* ($4,5 \pm 1,2$ %). Die Gattung *Chryseobacterium* nahm bis zum Ende des Versuches stetig ab ($5,2 \pm 4,4$ %), wohingegen die Gattung *Pleomorphomonas** eine starke Zunahme verzeichnete (von $0,8 \pm 0,8$ % an Tag 21 auf $26,0 \pm 2,5$ % an Tag 49). Am letzten Versuchstag zählte *Leadbetterella** mit $5,7 (\pm 3,2)$ % ebenfalls zu den abundantesten Organismen. Taxa mit signifikanter Änderung über den Versuchsverlauf und einer relativen Abundanz über 1 % sind in Abbildung 15 zusammengefasst. Hier wird ebenfalls die zuvor beschriebene Dynamik der Gruppen ersichtlich und es wird außerdem deutlich, dass es eine Tendenz zur Zunahme von Taxa mit potenziellen PHA-Produzenten über den Selektionsverlauf gab, wohingegen Taxa ohne diese Fähigkeit eine Abnahme in ihrer Abundanz aufwiesen. Jedoch ist im ersten Selektionsversuch ein Einbruch dieses Musters und eine starke Änderung in der Zusammensetzung nach Tag 14 zu beobachten. Dieser Verlauf der Abundanz potenzieller PHA-Produzenten wird zudem in Abbildung 11 widerspiegelt.

Im zweiten Selektionsversuch war bis zu Tag 7 zunächst eine Zunahme der relativen Abundanz der Gattungen *Flavobacterium** ($12,3 \pm 2,6$ %), *Zoogloea** ($6,8 \pm 1,6$ %), *Dokdonella** ($4,9 \pm 1,1$ %) sowie von nicht näher bestimmten Organismen der Gruppe Legionellales* ($4,7 \pm 0,2$ %) zu verzeichnen (Abbildung 14). Die Zusammensetzung ähnelte der Zusammensetzung von Tag 4, allerdings wiesen *Acinetobacter** ($6,7 \pm 1,1$ %) und *Dokdonella** ($5,6 \pm 0,4$ %) eine Zunahme in der relativen Abundanz bis Tag 4 auf und nahmen bis Tag 7 wieder ab ($3,3 \pm 0,6$ und $4,2 \pm 0,3$ %). An Tag 14 zählten, neben *Flavobacterium** ($14,3 \pm 2,3$ %) und *Zoogloea** ($5,7 \pm 3,6$ %), nicht näher bestimmbare Vertreter der Gruppen Caulobacteraceae* ($6,3 \pm 0,6$ %), Rhodobacteraceae* ($7,4 \pm 1,0$ %) und BD7-3 ($7,3 \pm 1,9$ %) ebenfalls zu den abundantesten Bakteriengruppen. Einige Taxa, die zu Beginn zu den abundantesten gehörten und welche keine Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzen, wie die Gruppen Chitinophagaceae, Saprospiraceae, TM7-1 und TM7-3 zeigten eine Abnahme bis zu Tag 14 ($4,3 \pm 1,1$ %, $0,8 \pm 0,3$ %, $0,0 \pm 0,0$ %, $1,5 \pm 0,6$ %). Ebenso nahm die Gruppe Comamonadaceae* bis zu diesem Zeitpunkt ab ($0,8 \pm 0,2$ %). Der potenzielle PHA-Produzent *Pleomorphomonas** war lediglich an den Tagen 14 und 21

relativ häufig in der Bakteriengesellschaft zu finden ($3,1 \pm 2,1$ und $4,9 \pm 2,9$ %). Bis zu diesem Zeitpunkt war die Gattung *Acinetobacter** ($1,1 \pm 0,5$ %) nahezu verschwunden, allerdings zählte ab diesem Tag *Leadbetterella** ($2,9 \pm 2,1$ %) mit einer konstanten relativen Abundanz bis zum Versuchsende ebenfalls zu den abundantesten Organismen. Bis Tag 28 zeigten die Taxa *Chryseobacterium* ($17,8 \pm 2,7$ %), Caulobacterales* ($10,1 \pm 7,1$ %) und Rhodobacteraceae* ($10,8 \pm 0,6$ %) eine starke Zunahme. Diese zählten zu diesem Zeitpunkt zu den abundantesten Organismen im System, wohingegen die Gattung *Flavobacterium** abnahm ($3,0 \pm 1,4$ %). Bis Versuchsende blieben die nicht näher bestimmten Vertreter der Gruppen Caulobacterales* und Rhodobacteraceae* unter den abundantesten Organismen ($22,2 \pm 14,7$ % und $11,1 \pm 3,6$ %), allerdings kam es zu einer erneuten Zunahme der relativen Abundanz der Gattung *Flavobacterium** ($9,4 \pm 1,1$ %), während die Gattung *Chryseobacterium* abnahm ($1,7 \pm 0,1$ %). Auch hier konnte insgesamt eine Abnahme von Bakterien ohne Befähigung zur PHA-Produktion zugunsten der Zunahme von potenziellen PHA-Produzenten über den Selektionsverlauf beobachtet werden (Abbildung 15), was sich ebenfalls mit den Ergebnissen in Abbildung 11 deckt.

Die mikrobielle Zusammensetzung im dritten Selektionsversuch mit dem Inokulum aus der Industriekläranlage einer Brauerei wies zu Versuchsbeginn eine andere Zusammensetzung auf als die beiden kommunalen Belebtschlämme (Abbildung 14). Dabei waren unter anderem die nicht näher bestimmten Gruppen Ellin6075 ($2,2 \pm 0,3$ %), Saprospiraceae ($12,8 \pm 1,2$ %) und Sphingobacteriales ($18,5 \pm 0,2$ %) unter den Taxa mit der höchsten relativen Abundanz. Zudem war der Anteil der Taxa mit niedriger Abundanz relativ hoch („other bacteria“). Bis an Tag 4 kam es zu einer starken Zunahme der relativen Abundanz der Gattung *Acinetobacter** ($32,4 \pm 6,4$ %) sowie einer Zunahme der nicht auf Gattungsebene bestimmten Gruppen Comamonadaceae* ($6,0 \pm 1,4$ %) und Ellin6075 ($8,5 \pm 0,2$ %). An Tag 7 waren die genannten sowie die zu Beginn dominanten Gruppen in ihrer relativen Abundanz reduziert. Jedoch wiesen die Gattungen *Bdellovibrio* ($11,3 \pm 1,3$ %) und *Paracoccus** ($4,7 \pm 0,1$ %) sowie die nicht näher bestimmte Gruppe Rhodobacteraceae* ($10,8 \pm 3,9$ %) eine erhöhte relative Abundanz auf. Bis zu Tag 28 konnte unter anderem eine Zunahme der Gattungen *Flavobacterium** ($18,0 \pm 9,7$ %), *Pleomorphomonas** ($5,0 \pm 5,0$ %) und der nicht auf Gattungsebene bestimmten Taxa Caulobacterales* ($11,1 \pm 12,1$ %) und Chitinophagaceae ($5,6 \pm 1,5$ %) vernommen werden. Die Gattungen *Bdellovibrio* ($0,3 \pm 0,4$ %) und *Paracoccus** ($2,6 \pm 0,5$ %) hingegen zeigten eine Abnahme der relativen Abundanz bis zu diesem Zeitpunkt. Zum Ende des Versuches hin zählten zu den abundantesten Gattungen *Flavobacterium** ($11,2 \pm 3,4$ %) und *Luteolibacter* ($3,1 \pm 5,1$ %) sowie die nicht auf Gattungsebene bestimmten Taxa Caulobacterales* ($10,3 \pm 3,0$ %), Chitinophagaceae ($8,6 \pm 2,5$ %), Flavobacteraceae* ($3,2$

$\pm 1,3\%$) und Rhodobacteraceae* ($15,0 \pm 4,9\%$). Eine zusammenfassende Darstellung der Dynamik bestimmter Taxa mit signifikanter Abundanzänderung ist ebenfalls in Abbildung 15 zu finden. Die Ergebnisse der statistischen Analyse hierzu sind in Anhang 34 aufgeführt. Diese Abbildung zeigt erneut eine Abnahme nicht-PHA-produzierender Organismengruppen und die vornehmliche Zunahme potenzieller PHA-Produzenten über den Selektionsverlauf. Die Zunahme der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in der Selektionsphase ist ebenfalls in Abbildung 11 zu erkennen.



Abbildung 15: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum im Vergleich zum Versuchsstart. A) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. B) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung. C) Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Es sind nur Taxa mit statistischer signifikanter Änderung der relativen Abundanz über den Versuch sowie mit einer relativen Abundanz von $> 1\%$ dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Maaslin2 ermittelt (q -Wert $< 0,25$). Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Zu den potenziellen PHA-Produzenten mit der höchsten relativen Abundanz in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum zählten somit die Gattungen *Flavobacterium**, *Acinetobacter**, *Pleomorphomonas**, *Leadbetterella**, *Dokdonella** sowie die Gruppen Rhodobacteraceae*, Caulobacterales*, Comamonadaceae* und Caulobacteraceae*. Zu den Taxa ohne diese Fähigkeit, welche in den Versuchen häufig waren, zählten *Chryseobacterium* und die Gruppen TM7-3, Cytophagaceae, Cryomorpaceae, Saprospiraceae und Sphingobacteriales. In allen drei Versuchen lässt sich zudem feststellen, dass es eine kontinuierliche Fluktuation in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft über die Zeit während der Selektionsphase gab. Dabei nahmen einige dominante Organismen zu bestimmten Zeitpunkten in ihrer relativen Abundanz ab, während andere Zunahmen, beispielsweise *Acinetobacter** und *Flavobacterium** in Inokulum 3 (Abbildung 14, Abbildung 15). Trotz dieser Dynamik blieben sowohl der PHA-Gehalt als auch die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten insgesamt in diesem Zeitraum stabil (Abbildung 11).

Indikatororganismen

Bei Betrachtung der Indikatoranalysen mithilfe des IndVal-Indexes zeigte sich, dass eine Zuordnung von Taxa exklusiv zu den einzelnen Inokula mit einem Wert von über 0,8 nur für einige wenige Gruppen ohne die Fähigkeit zur PHA-Produktion in Inokulum 3 stattfand (Tabelle 10). Einige der zuvor diskutierten Organismen mit hoher relativer Abundanz zu bestimmten Zeitpunkten der Versuche wie beispielsweise *Chryseobacterium* und TM7-3 bzw. *Dokdonella**, *Zoogloea**, mit der potenziellen Fähigkeit zur PHA-Produktion, waren charakteristisch für die Inokula 1 und 2 von den kommunalen Kläranlagen. Die Gattung *Paracoccus** dagegen war ein Indikator für die Selektionsversuche mit dem Inokulum 2 und 3. Jedoch waren viele der o.g. dominanten Gruppen, vor allem mit dem Potenzial zur PHA-Produktion, in allen drei Selektionsversuchen häufig und stellten Indikatoren für alle Systeme dar, daher wiesen sie keine statistische Signifikanz auf (Tabelle 11). Dabei zeigten u.a. die potenziellen PHA-Produzenten aus den Gattungen *Flavobacterium**, *Acinetobacter**, *Rhodobacter** und aus den Familien Comamonadaceae* und Rhodobacteraceae* einen starken Bezug zu allen drei Selektionsversuchen. Die Gattung *Peomorphomonas** wies ebenfalls eine starke Zugehörigkeit zu allen drei Inokula auf (IndVal: 0,788; s. Anhang 37). Eine Auflistung aller Ergebnisse der Indikatoranalysen findet sich in Anhang 37.

Tabelle 10: Indikatororganismen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Inokula mit signifikanter Zuordnung zu einzelnen Versuchen. 1: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. 2: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit Phosphoreliminierung. 3: Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Indikatororganismen wurden anhand des IndVal-Indexes ermittelt. Aufgeführt sind Taxa mit einem IndVal-Wert von $> 0,8$ und signifikanter Teststatistik ($p \geq 0,005$). Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert. Der Wert 1 bzw. 0 gibt an, ob das Taxon als Indikator gewertet wurde oder nicht.

Gattung	Inokulum1	Inokulum2	Inokulum3	Stat
unassigned pLW-97	0	0	1	0,875
unassigned BA008	0	0	1	0,866
unassigned VC2_1_Bac22	0	0	1	0,865
<i>Methanobacterium</i>	0	0	1	0,839
unassigned Anaerolinaceae	0	0	1	0,839
<i>Methanosaeta</i>	0	0	1	0,808
<i>Caldilinea</i>	0	0	1	0,802
<i>Chryseobacterium</i>	1	1	0	0,972
unassigned TM7-3	1	1	0	0,969
<i>Dokdonella*</i>	1	1	0	0,950
<i>Devosia</i>	1	1	0	0,898
<i>Prostheco bacter</i>	1	1	0	0,869
<i>Zoogloea*</i>	1	1	0	0,842
unassigned Verrucomicrobiaceae	1	1	0	0,820
<i>Mycoplana*</i>	1	1	0	0,810
unassigned Chloroplast	1	1	0	0,809
unassigned Ellin6075	0	1	1	0,899
<i>Paracoccus*</i>	0	1	1	0,824
unassigned A4b	0	1	1	0,818

Tabelle 11: Indikatororganismen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Inokula ohne signifikante Zuordnung zu einzelnen Versuchen. 1: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. 2: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit Phosphoreliminierung. 3: Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Indikatororganismen wurden anhand des IndVal-Indexes ermittelt. Aufgeführt sind Taxa mit einem IndVal-Wert von > 0,8, welche in allen drei Versuchen zu finden waren. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert. Der Wert 1 bzw. 0 gibt an, ob das Taxon als Indikator gewertet wurde oder nicht.

Gattung	Inokulum1	Inokulum2	Inokulum3	Stat
unassigned Chitinophagaceae	1	1	1	1,000
unassigned Comamonadaceae*	1	1	1	0,994
unassigned Xanthomonadaceae*	1	1	1	0,988
unassigned Rhizobiales*	1	1	1	0,971
unassigned Cryomorphaceae	1	1	1	0,965
<i>Flavobacterium</i> *	1	1	1	0,959
unassigned Rhodobacteraceae*	1	1	1	0,959
<i>Acinetobacter</i> *	1	1	1	0,941
unassigned Cytophagaceae	1	1	1	0,941
unassigned Sphingobacteriales	1	1	1	0,916
unassigned Alphaproteobacteria*	1	1	1	0,897
<i>Bdellovibrio</i>	1	1	1	0,891
<i>Rhodobacter</i> *	1	1	1	0,884
unassigned Caulobacteraceae*	1	1	1	0,871
unassigned Myxococcales	1	1	1	0,871
unassigned BD7-3	1	1	1	0,864
<i>Dyadobacter</i>	1	1	1	0,864
unassigned Rhodocyclaceae*	1	1	1	0,858
unassigned Betaproteobacteria*	1	1	1	0,858
unassigned Saprospiraceae	1	1	1	0,851
unassigned Hyphomonadaceae	1	1	1	0,844
unassigned [Saprospirales]	1	1	1	0,824
<i>Runella</i>	1	1	1	0,824
unassigned Bacteroidales	1	1	1	0,816
unassigned Caulobacterales*	1	1	1	0,809
<i>Amaricoccus</i> *	1	1	1	0,809
unassigned Gammaproteobacteria*	1	1	1	0,802

Entwicklung der mikrobiellen Mischbiozönose

Für alle drei Inokula zusammen erfolgte ein Vergleich der Veränderungen der Biozönosen über die Selektionsphase in Zusammenhang mit dem produzierten PHA-Gehalt mittels NMDS (Abbildung 16). Anhand der 95%-Konfidenzintervalle in der Abbildung wird ersichtlich, dass die drei Selektionsversuche jeweils ein Cluster bildeten, wobei das Cluster des zweiten Selektionsversuches nahezu komplett innerhalb des Clusters des Selektionsversuches mit Inokulum 1 liegt. Die beiden Inokula, bei welchen es sich um Belebtschlämme zweier kommunaler Kläranlagen handelte, wiesen daher innerhalb der Selektionsphase, und insbesondere auch zu Beginn der Versuche, eine ähnlich mikrobielle Zusammensetzung auf. Das dritte Inokulum hingegen, welches aus einer Industriekläranlage einer Brauerei stammte, zeigte zu Beginn eine sehr unterschiedliche Bakterienzusammensetzung zu den anderen beiden Belebtschlämmen. Jedoch entwickelte sich diese im Verlauf des Selektionsprozesses in eine ähnliche Richtung wie die beiden anderen Inokula, was zum einen an den Überschneidungen der Ellipsen und zum anderen an der zunehmenden Nähe der Punkte (Reaktoren bzw. Replikate) erkennbar ist. Die Replikate des Versuchstags 14 aus dem ersten Selektionsversuch sind zwar klar als Ausreißer aus dem Muster erkennbar, was vermutlich auf den zuvor beschriebenen Betriebsfehler zurückgeführt werden kann, jedoch entwickelte sich die Biozönose im weiteren Selektionsverlauf trotzdem in einer ähnlichen Weise wie in den anderen beiden Versuchen. Alle drei Gesellschaften entwickelten sich unter den gleichen Randbedingungen zwar bis zum Ende der Versuche in eine ähnliche Richtung, die Dominanz und relative Abundanz der potenziellen PHA-Produzenten variierten trotzdem teilweise zum Ende der Versuche hin (vgl. Abbildung 14). Des Weiteren stand die Entwicklung der Biozönosen über die Selektionsdauer in signifikantem Zusammenhang mit dem PHA-Gehalt ($R^2 = 0,34$, $p = 0,001$). Ein signifikanter Einfluss der Experimente in Kombination mit der Selektionsdauer auf die Zusammensetzung der Bakteriengesellschaft konnte mittels PERMANOVA festgestellt werden ($F = 14,23$, $DF = 5$, $p = 0,001$). Ein Pairwise-Adonis-Test zeigte signifikante Unterschiede der mikrobiellen Zusammensetzung zwischen allen Inokula und zwischen unterschiedlichen Zeitpunkten, insbesondere zwischen dem Beginn und Ende der Experimente (Anhang 5 und Anhang 6).

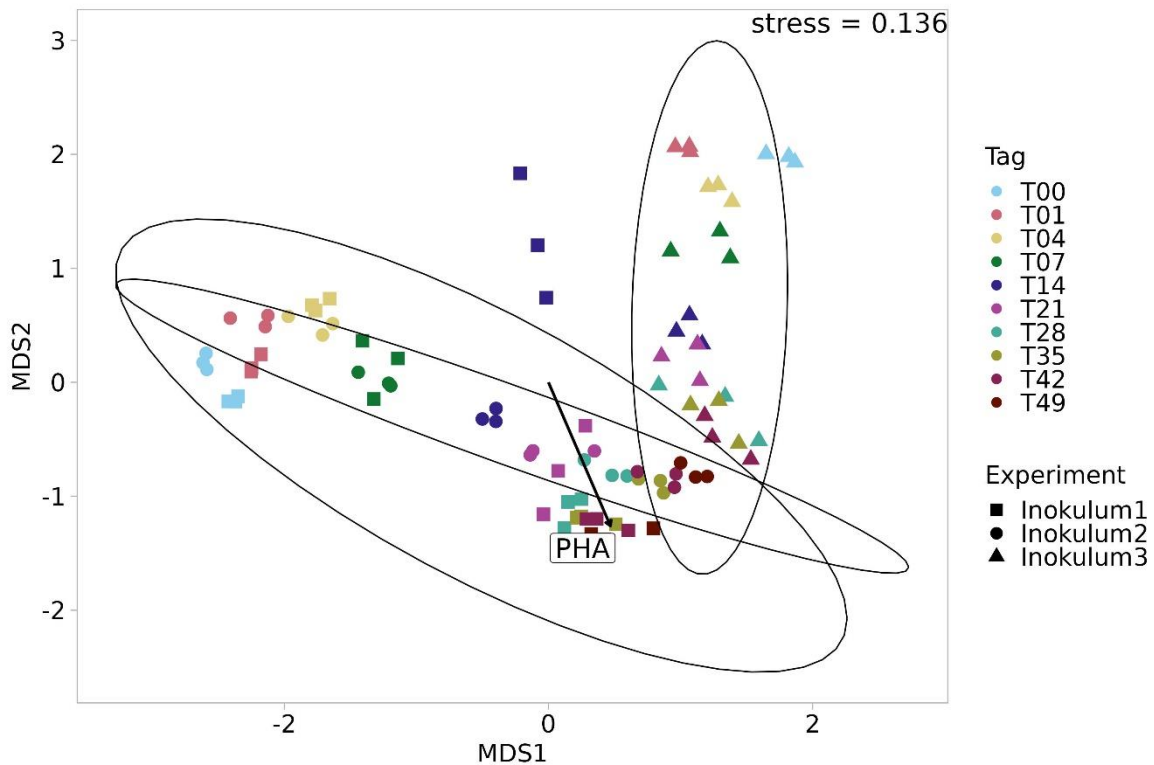


Abbildung 16: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlichem Inokulum. Die Ordination der Matrix erfolgte basierend auf dem Bray-Curtis-Ähnlichkeitskoeffizienten. 1: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. 2: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung. 3: Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Dargestellt sind jeweils drei Replikate (parallel laufende Versuchsreaktoren) zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt. Die Ellipsen zeigen 95%-Konfidenzintervalle für die Biozönosen der jeweiligen Versuche.

Netzwerkanalysen

Zum Verständnis der Komplexität der Biozönosen und des Einflusses der Selektion auf diese wurden Netzwerke erstellt (Abbildung 17). Eine Zusammenfassung der Netzwerkcharakteristika ist in Tabelle 12 gegeben. Bei Betrachtung dieser zeigt sich, dass es sich bei Inokulum 1 um das komplexeste Netzwerk handelte, wohingegen Inokulum 3 das Netzwerk mit der niedrigsten Komplexität zu sein scheint. Dies ist auch in der Abbildung (Abbildung 17 C) ersichtlich. Das Netzwerk von Inokulum 3 besaß zwar nur etwa halb so viele Input-ASVs und damit einhergehend nur etwa halb so viele Knoten wie das Netzwerk von Inokulum 1, allerdings waren die Knoten im Netzwerk von Inokulum 3 nur durch etwa ein Viertel so viele Kanten verbunden (Tabelle 12). Zudem wies das Netzwerk des dritten Selektionsversuches die niedrigste Transitivität und Dichte auf, was ebenfalls auf die verminderten Assoziationen zwischen Organismen hindeutet. Die niedrigere Komplexität des Netzwerkes des dritten Inokulums wird zudem durch die erhöhte mittlere Weglänge, einen erhöhten Umfang und einen niedrigeren mittleren Grad deutlich. Die höhere Modularität in Inokulum 3 weist außerdem auf eine höhere Fragmentierung dieses

Netzwerkes in einzelne Module hin. Dieses Netzwerk war demnach weniger dicht und verbunden als die anderen beiden, insbesondere das des ersten Selektionsversuches.

Tabelle 12: Netzwerkcharakteristika mikrobieller Biozönosen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Inokula. 1: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. 2: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit Phosphoreliminierung. 3: Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Die Proben wurden an 10 Versuchstagen (9 bei Inokulum 3) aus jeweils 3 parallel laufenden Reaktoren entnommen.

	Inokulum 1	Inokulum 2	Inokulum 3
Input Proben	30	30	27
Input ASVs (nach Normalisierung)	1229	1147	679
Spearman's rho co-exclusion Grenzwert	0,6	0,6	0,63
Spearman's rho co-occurrence Grenzwert	-0,6	-0,6	-0,63
Kanten (co-occurrence)	1273	787	264
Knoten (co-occurrence)	141	132	76
Kanten (co-exclusion)	122	330	71
Knoten (co-exclusion)	73	71	31
Kanten	1395	1117	335
Knoten	141	133	77
Knoten (Parameter)	3	3	3
Mittlerer Grad	19,79	16,80	8,70
Mittlere Weglänge	2,42	2,86	2,80
Dichte	0,14	0,13	0,12
Umfang	6	7	7
Modularität	0,41	0,35	0,44
Transitivität	0,69	0,64	0,55

In den Netzwerken aller drei Selektionsversuche ist zudem erkennbar, dass sich zwei Haupt-Cluster bildeten, welche Organismen mit und ohne die Fähigkeit zur PHA-Produktion voneinander trennen (Abbildung 17). Hierdurch wird der zeitliche Verlauf bzw. ebenfalls die Effektivität der Selektionsphase deutlich. Zudem kommt es bei diesem Muster vermehrt zum gegenseitigen Ausschluss („co-exclusion“) von Organismen mit und ohne die Fähigkeit zur PHA-Produktion, aber auch zum Verdrängen dieser untereinander im Verlauf der Selektion sowie zum gemeinsamen Auftreten von Organismen mit dieser Fähigkeit („co-occurrence“). Beispielsweise zeigten im Netzwerk des Inokulum 1 die potenziellen PHA-Produzenten *Pleomorphomonas** (ASV_0002) und ein Organismus der nicht auf Gattungsebene bestimmten *Caulobacterales** (ASV_0004) sowie ein Organismus der nicht näher bestimmten *Rhodobacteraceae** (ASV_0016) ein gemeinsames Vorkommen, während *Pleomorphomonas** (ASV_0002) und *Dokdonella** (ASV_0018) sich ausschlossen

(Anhang 38). Weiterhin wiesen *Pleomorphomonas** (ASV_0006) und ein Vertreter der Saprospiraceae (ASV_0024) ein sich gegenseitig ausschließendes Vorkommen auf. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Abbildung 14 und Abbildung 15 überein. Auch zeigte sich ein Zusammenhang des Vorkommens der potenziellen PHA-Produzenten *Pleomorphomonas** (ASV_0002, ASV_0006, ASV_0955), *Leadbetterella** (ASV_0027, ASV_0107, ASV_0552), *Rhodobacter** (ASV_0118), *Dokdonella** (ASV_0078), *Pseudoxanthomonas** (ASV_0674) und einem Vertreter der Caulobacterales* (ASV_0004) mit dem produzierten HB-Anteil. Der PHA-Gehalt nahm zusammen mit der Gattung *Zoogloea** (ASV_0017) zu.

Die Ergebnisse der Netzwerke der anderen beiden Selektionsversuche stützen die zuvor beschriebenen Ergebnisse aus Abbildung 14 und Abbildung 15 (Anhang 38). In Inokulum 2 und 3 zeigte sich eine gemeinsame Zunahme von potenziellen PHA-Produzenten der Gruppen Caulobacterales* (ASV0003) und Rhodobacteraceae* (ASV0007). Zudem wiesen Organismen der Gruppen Rhodobacteraceae* und Saprospiraceae einen diametralen Verlauf ihres Vorkommens in Inokulum 2 auf. Des Weiteren zeigte dieses Netzwerk, dass der PHA-Gehalt in Zusammenhang mit dem ASV_0055 der Gattung *Rhodobacter** in Verbindung stand. Der HB-Anteil zeigte ein gemeinsames Vorkommen mit den potenziellen PHA-Produzenten *Pleomorphomonas** (ASV_0006), *Zoogloea** (ASV_0017), *Agrobacterium** (ASV_0035) und *Rhodobacter** (ASV_0055) (Anhang 38). Im Netzwerk des dritten Selektionsversuches schlossen sich beispielsweise die Vorkommen von Organismen der Gruppen Caulobacterales* (ASV0003) und Sphingobacteriales (ASV0009) aus, wobei letztere keine Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzt und diese während der Selektionsphase abnahm. In Inokulum 3 konnte zudem u.a. eine gemeinsame Zunahme des PHA-Gehaltes mit potenziellen PHA-Produzenten der Gattungen *Flavobacterium** (ASV0005), *Paracoccus** (ASV00028) und der Ordnung Caulobacterales* (ASV0004) festgestellt werden. Der HB-Anteil stand unter anderem in Zusammenhang mit *Pleomorphomonas** (ASV0006), *Zoogloea** (ASV0017), *Agrobacterium** (ASV0035) und *Rhodobacter** (ASV0055) (Anhang 38).

3.1.2 Schlammalter

Da die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1 zeigten, dass mit unterschiedlichen Belebtschlämmen als Inokula in der Selektion vergleichbare PHA-Gehalte erzielt werden konnten und da aufgrund der gleichen Quelle eine mögliche bereits erfolgte Anpassung an das in den folgenden Versuchen verwendete, reale Substrat angenommen werden konnte, wurde für diese das Inokulum aus der Brauerei (Inokulum 3) genutzt. Im nachfolgenden Versuchsblock wurden zwei unterschiedliche Schlammalter (2 und 4 d) miteinander bezüglich ihrer mikrobiellen Dynamik und PHA-Produktionsperformance verglichen.

Sequenzdaten

Eine annähernde Sättigung der Sequenzen innerhalb der beiden Selektionsversuche mit unterschiedlichem Schlammalter war in allen Proben nach der Sequenzierung gegeben (Anhang 8). Die minimal erreichte Anzahl an Sequenzen im ersten Versuch mit einem Schlammalter von 2 d lag bei 39.478 und im zweiten Versuch mit einem Schlammalter von 4 d bei 37.760, was als Grenzwert für die Normalisierung aller Proben genommen wurde, wenn eine gemeinsame Betrachtung der Versuche stattfand.

Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten

Im ersten Selektionsversuch mit einem Schlammalter von 2 d wurde nach 7 Tagen bereits ein maximaler PHA-Gehalt von 28,4 ($\pm 1,3$) %oTS erreicht (Abbildung 18 A). Dieser zeigte einen instabilen Verlauf und sank bis Tag 14 auf einen Wert von 17,4 ($\pm 10,7$), stieg erneut bis Tag 21 an (23,6 $\pm 8,1$ %oTS) und sank bis zum Ende des Versuches auf ein Minimum von 7,5 ($\pm 1,5$) %oTS. Der relative Anteil potenzieller PHA-Produzenten erreichte ebenfalls an Tag 7 sein Maximum (71,6 $\pm 7,2$ %) und sank danach bis zum Versuchsende ab (57,0 $\pm 7,5$ %).

Bei dem Versuch mit einem Schlammalter von 4 d war der Verlauf des produzierten PHA ähnlich instabil (Abbildung 18 B). Zunächst stieg der produzierte PHA-Gehalt von 9,6 ($\pm 1,0$) %oTS an Tag 0 auf 17,5 ($\pm 16,6$) %oTS an Tag 7 an und sank bis Tag 14 stark ab (1,6 $\pm 1,4$ %oTS). An Tag 21 wurde mit 19,1 ($\pm 14,6$) %oTS der maximale PHA-Gehalt in diesem Versuch erreicht. Jedoch konnte am letzten Versuchstag keine PHA-Produktion verzeichnet werden. Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten stieg zunächst bis Tag 7 an (50,0 $\pm 6,8$ %) und erreichte dann ein annäherndes Plateau. Zum Ende des Versuches lag diese mit 58,6 ($\pm 13,3$) % am höchsten innerhalb dieses Versuches.

Es konnte in beiden Versuchen mit unterschiedlichem Schlammalter insgesamt nur ein relativ geringer PHA-Gehalt produziert werden, dabei erzielte die Biozönose mit einem Schlammalter von 2 d einen signifikant höheren PHA-Gehalt als die mit einem Schlammalter von 4 d. Einen signifikanten Zusammenhang der Versuchsdauer und des PHA-Gehaltes konnte jedoch nicht festgestellt werden (ANCOVA Experiment: $F = 8,14$, $DF = 1$, $p = 0,008$; Versuchsdauer: $F = 3,59$, $DF = 1$, $p = 0,069$) (Anhang 7). Der insgesamt in beiden Versuchen höchste PHA-Gehalt wurde im Versuch mit einem Schlammalter von 4 d an Tag 7 mit $35,3\%$ oTS erzielt. Der PHA-Gehalt und der Anteil potenzieller PHA-Produzenten standen nicht in signifikantem Zusammenhang (ANCOVA Experiment: $F = 7,51$, $DF = 1$, $p = 0,011$, PHA-Potenzial: $F = 0,001$, $DF = 1$, $p = 0,972$) (Anhang 7).

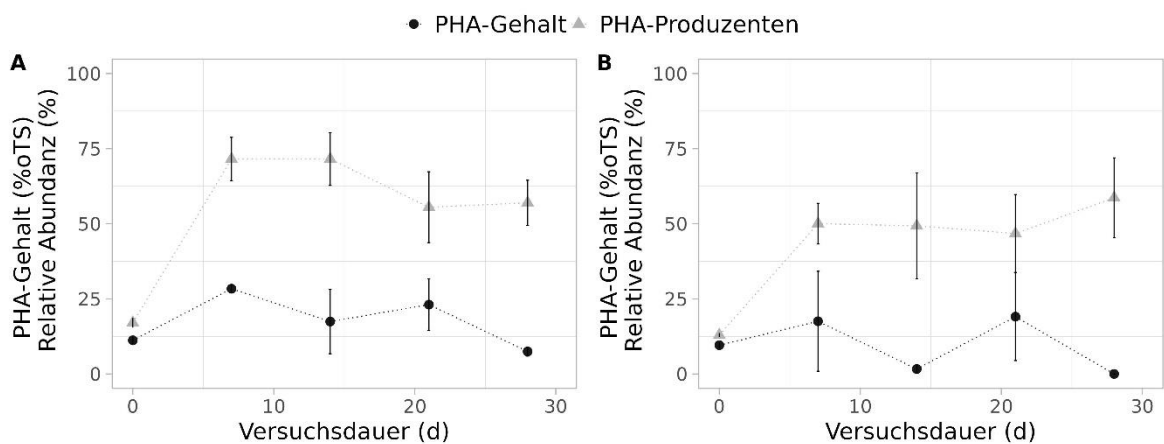


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. A) Schlammalter 2 d. B) Schlammalter 4 d. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Eine Verbindung der Punkte mittels gepunkteter Linie dient als optische Unterstützung zur Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufs.

Die Zusammensetzung des zu den jeweiligen Versuchstagen produzierten PHAs in beiden Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter ist in Abbildung 19 dargestellt. In beiden Experimenten wurde hauptsächlich HB produziert, wobei der Anteil dieses Monomers am produzierten Polymer im Laufe der Versuche variierte. Zunächst nahm der Anteil an HB im produzierten PHA in beiden Versuchen von Tag 0 bis an Tag 14 zu (von $58,6 \pm 1,3\%$ auf $93,1 \pm 6,0\%$ und von $65,8 \pm 1,5\%$ auf $100,0 \pm 0,0\%$) und sank bis Tag 21 wieder ab ($79,7 \pm 1,5$; $86,0 \pm 12,2\%$). Im ersten Selektionsversuch stieg der HB-Anteil daraufhin wieder etwas an ($84,6 \pm 6,2\%$), im zweiten Selektionsversuch wurde an Tag 28 kein PHA hergestellt. In dem Versuch mit einem Schlammalter von 4 d lag der HB-Anteil im Mittel ein wenig höher als bei dem Versuch mit einem Schlammalter von 2 d ($84,1 \pm 12,2\%$; $80,3 \pm 11,7\%$). Es zeigte sich auch hier der schon zuvor beschriebene instabile Verlauf des produzierten PHAs (Abbildung 18). Die theoretisch zu erwartende PHA-Zusammensetzung

lag bei 73,3:26,7% HB/HV und wurde in beiden Versuchen nicht erreicht. Der Anteil an HB im produzierten PHA war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Experimenten ($\chi^2 = 1,72$, DF = 1, $p = 0,19$), jedoch zwischen den Probenahmezeitpunkten ($\chi^2 = 11,26$, DF = 4, $p = 0,024$).

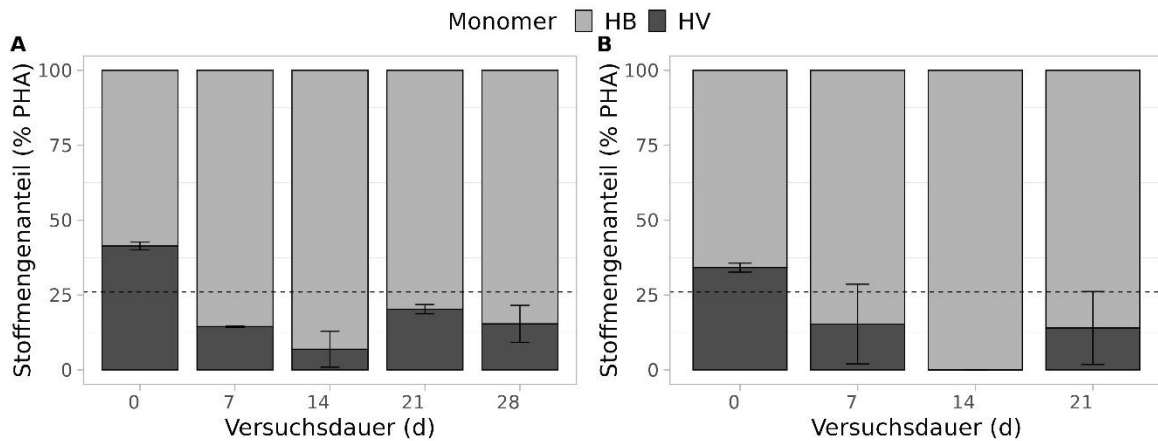


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. A) Schlammalter 2 d. B) Schlammalter 4 d. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Die gestrichelte Linie markiert die aufgrund der Substratzusammensetzung berechnete theoretische PHA-Zusammensetzung.

Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose

Bei Betrachtung der taxonomischen Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose über den Selektionsverlauf der beiden Versuche mit unterschiedlichem Schlammalter zeigte sich, wie auch in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum (vgl. Kapitel 3.1.1), dass einige Taxa mit potenziellen PHA-Produzenten im Verlauf der Selektion zunahmten, während Gruppen ohne diese Fähigkeit eher abnahmen (Abbildung 20, Abbildung 21). Diese Zunahme war jedoch nicht konstant (vgl. Abbildung 18). Zudem war auch hier ein Wechsel der dominanten Organismen, insbesondere der potenziellen PHA-Produzenten, über den Verlauf der Selektion zu beobachten. Die Alpha-Diversität zeigte, wie zuvor schon beobachtet (vgl. Kapitel 3.1.1), eine Abnahme im Versuch mit einem Schlammalter von 4 d (Anhang 9, Anhang 10). Lediglich im Versuch mit einem Schlammalter von 2 d war der Verlauf der Alpha-Diversität anders. Diese nahm bis an Tag 7 zunächst ab, danach jedoch stieg sie an und erreichte am letzten Versuchstag einen nahezu so hohen Wert wie zu Beginn der Selektion. Aufgrund der Übersichtlichkeit sind die Mittelwerte der taxonomischen Zusammensetzung ohne Standardabweichung dargestellt und die potenziellen PHA-Produzenten mittels Asteriskus markiert (Abbildung 20).

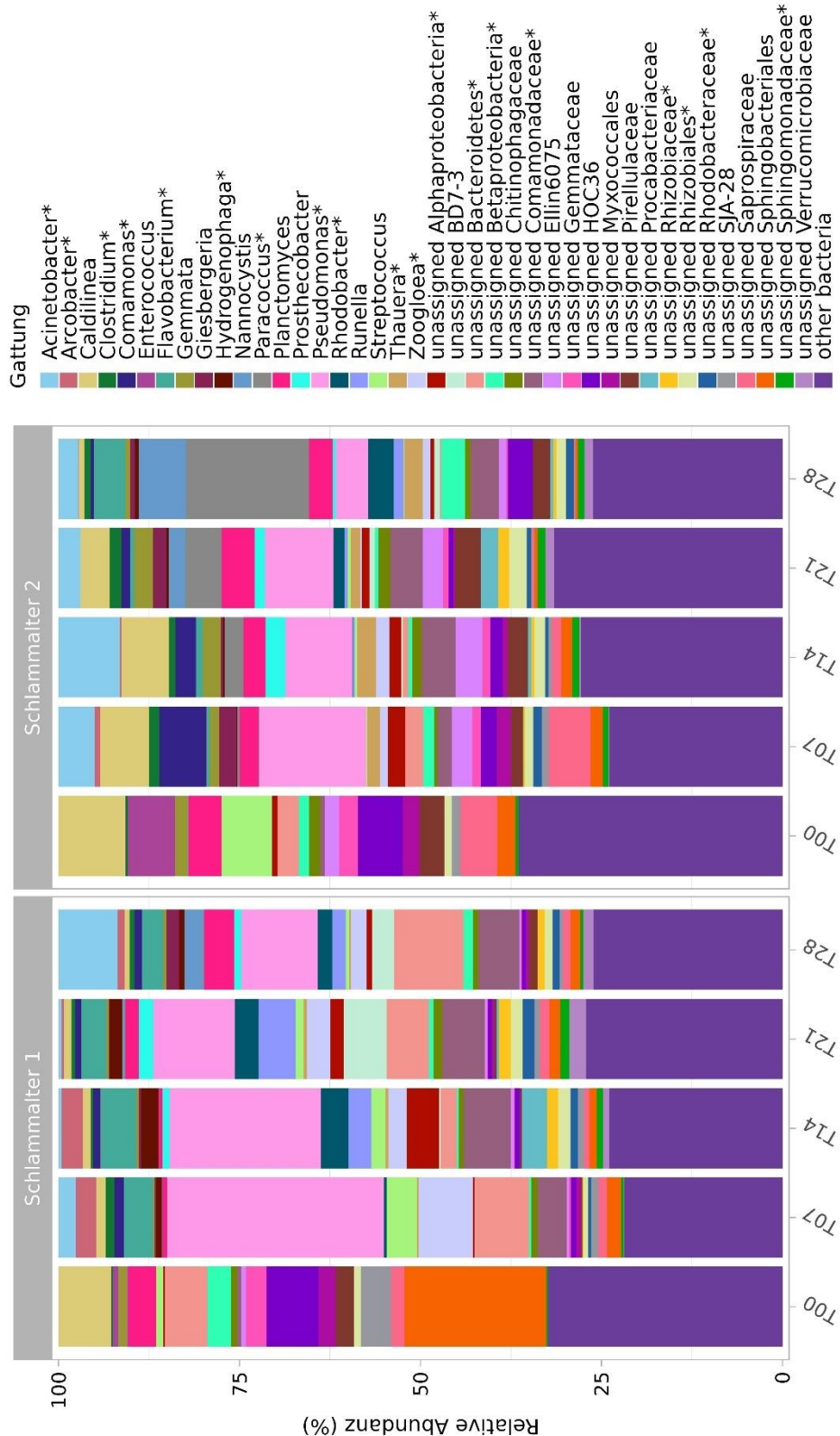


Abbildung 20: Taxonomische Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. 1: Schlammalter 2 d 2: Schlammalter 4 d. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag). Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Zu den abundantesten Organismen im ersten Selektionsversuch mit einem Schlammalter von 2 d an Tag 0 zählten unter anderem die Gattungen *Caldilinea* ($7,3 \pm 0,6$ %) und *Planctomyces* ($4,0 \pm 0,4$ %) sowie die nicht auf Gattungsebene bestimmten Gruppen HOC36 ($7,2 \pm 0,5$ %), Sphingobacteriales ($19,6 \pm 0,4$ %) und Bacteroidetes* ($5,9 \pm 0,8$ %) (Abbildung 20). Nach 7 Tagen der Selektion war *Pseudomonas** mit $29,9 (\pm 8,6)$ % das am stärksten vertretene Taxon. Die Gattungen *Flavobacterium** ($4,0 \pm 5,5$ %), *Zoogloea** ($7,5 \pm 5,5$ %) und *Streptococcus* ($4,2 \pm 1,1$ %) sowie nicht näher bestimmte Vertreter der Gruppen Bacteroidetes* ($7,5 \pm 5,9$ %) und Comamonadaceae* ($4,1 \pm 0,2$ %) zählten ebenfalls zu den abundantesten Gruppen an Tag 7. Die zu Beginn häufigsten Taxa *Calidinea*, *Planctomyces*, HOC36 und Sphingobacteriales waren zu diesem Zeitpunkt stark in ihrer relativen Abundanz zurückgegangen ($1,3 \pm 0,5$ %; $0,6 \pm 0,3$ %; $0,7 \pm 0,3$ %; $2,0 \pm 0,8$ %). Einige der häufigsten Taxa an Tag 7, wie *Pseudomonas**, *Zoogloea** und die Gruppe der Bacteroidetes* zeigten eine Abnahme bis Tag 14 ($21,0 \pm 3,6$ %; $2,6 \pm 1,6$ %; $2,3 \pm 2,8$ %). Hierfür konnten jedoch die Gattungen *Flavobacterium** ($5,0 \pm 2,9$ %), *Hydrogenophaga** ($2,4 \pm 1,9$ %), *Arcobacter* ($2,9 \pm 1,9$ %), *Rhodobacter** ($3,8 \pm 1,1$ %) und *Runella* ($3,1 \pm 2,4$ %) sowie die nicht auf Gattungsebene bestimmten Taxa Alphaproteobacteria* ($4,4 \pm 4,5$ %) und Procabacteriaceae ($3,5 \pm 6,0$ %) an relativer Abundanz gewinnen. Die meisten der vormals genannten Taxa wiesen jedoch bis zum Ende des Versuches eine erneute Abnahme in ihrer relativen Abundanz auf, darunter beispielsweise *Rhodobacter** ($2,0 \pm 0,6$ %), *Runella* ($1,9 \pm 1,1$ %) und die Gruppe der Alphaproteobacteria* ($0,8 \pm 0,4$ %). Zu diesem Zeitpunkt dominierten unter anderem die Gattungen *Acinetobacter** ($8,1 \pm 4,4$ %) und *Pseudomonas** ($10,7 \pm 2,8$ %) sowie die Taxa Bacteroidetes* ($9,6 \pm 4,7$ %) und Comamonadaceae* ($5,6 \pm 2,6$ %).

Im zweiten Selektionsversuch mit einem Schlammalter von 4 d zählten zu den abundantesten Organismen zu Beginn der Selektion unter anderem *Caldilinea* ($9,2 \pm 0,5$ %), *Enterococcus* ($6,5 \pm 0,8$ %), *Planctomyces* ($4,6 \pm 0,7$ %), *Streptococcus* ($7,0 \pm 0,7$ %), und nicht näher bestimmte Bakterien aus den Gruppen HOC36 ($6,2 \pm 0,9$ %) und Saprospiraceae ($5,1 \pm 2,6$ %) (Abbildung 20). An Tag 7 waren *Acinetobacter** ($5,0 \pm 2,0$ %), *Comamonas** ($6,5 \pm 1,5$ %) und *Pseudomonas** ($14,8 \pm 2,0$ %) die Taxa mit der höchsten relativen Abundanz, wohingegen die vorherigen, in ihrer relativen Abundanz sanken (*Enterococcus* $0,07 \pm 0,02$ %; *Planctomyces* $2,6 \pm 0,2$ %; *Streptococcus* $0,2 \pm 0,2$ %; HOC36 $2,2 \pm 2,3$ %). Lediglich *Caldilinea* ($6,7 \pm 2,1$ %) und die Gruppe Sphingobacteriales ($1,7 \pm 0,8$ %) zählten zu diesem Zeitpunkt ebenfalls zu den Taxa mit der höchsten relativen Abundanz. Letztere nahm bis Tag 14 in ihrer relativen Häufigkeit ab ($1,5 \pm 1,1$ %). Dafür konnte die Gattung *Acinetobacter** eine Zunahme der relativen Abundanz verzeichnen ($8,5 \pm 9,2$ %). Die vormals dominanten potenziellen PHA-

Produzenten *Acinetobacter** und *Pseudomonas** nahmen bis zum Ende des Versuches hin ab ($2,8 \pm 2,2$ % und $4,5 \pm 2,5$ %), wohingegen *Flavobacterium** und *Paracoccus** häufiger wurden ($4,3 \pm 3,5$ % und $17,0 \pm 13,3$ %). Auch die Taxa *Rhodobacter** ($3,5 \pm 1,0$ %), *Thauera** ($2,6 \pm 1,4$ %), *Nannocystis* ($6,5 \pm 5,5$ %) und die nicht näher bestimmbaren Taxa HOC36 ($3,4 \pm 5,7$ %) und Betaproteobacteria* ($3,3 \pm 1,6$ %) nahmen bis zum Versuchsende hin zu. Dieser Wechsel wird auch in Abbildung 21 ersichtlich, welche die Taxa mit statistisch signifikanter Änderung über die Versuchsdauer zeigt. Die Ergebnisse der zugrundeliegenden Maaslin2-Analyse sind in Anhang 34 aufgeführt. Eine Darstellung der Einzelwerte der taxonomischen Zusammensetzung für die jeweiligen Reaktoren findet sich in Anhang 11 und Anhang 33.

Die potenziellen PHA-Produzenten mit der höchsten relativen Abundanz über beide Versuche insgesamt waren die Gattungen *Pseudomonas**, *Acinetobacter**, *Paracoccus**, *Flavobacterium**, *Zoogloea**, *Comamonas** und *Rhodobacter** sowie die Gruppen Comamonadaceae* und Bacteroidetes*. Häufige Taxa ohne diese Fähigkeit waren *Calidinea*, *Planctomyces* und *Streptococcus* sowie die Gruppen Sphingobacteriales, HOC36, Saprospiraceae und Pirellulaceae (vgl. auch Anhang 33).

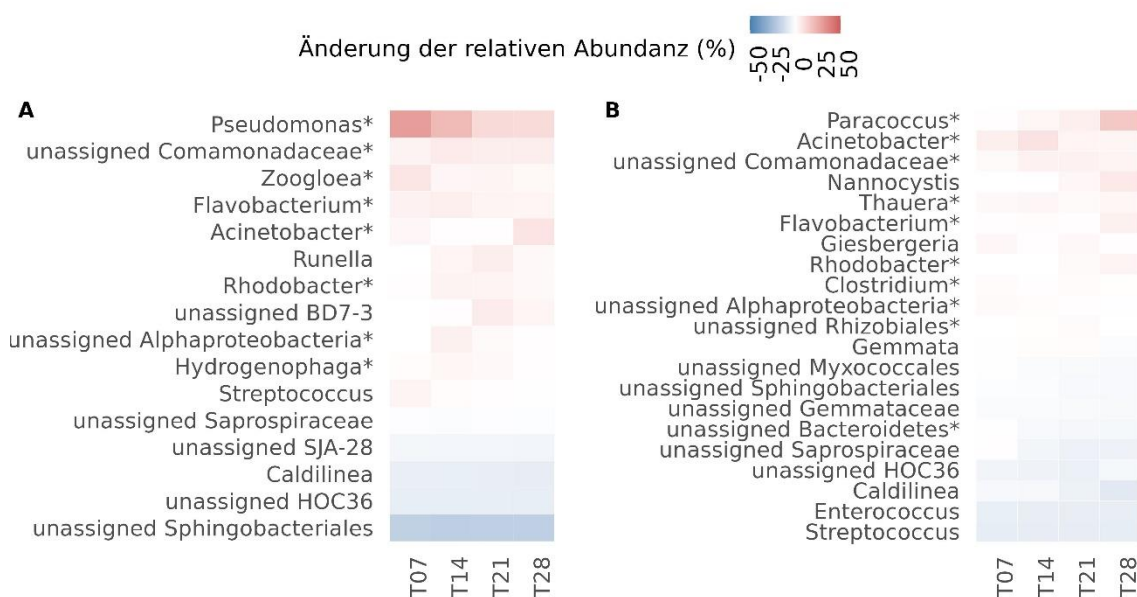


Abbildung 21: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter im Vergleich zum Versuchsstart. A) Schlammalter 2 d. B) Schlammalter 4 d. Es sind nur Taxa mit statistischer signifikanter Änderung der relativen Abundanz über den Versuch sowie mit einer relativen Abundanz von > 1 % dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Maaslin2 ermittelt (q-Wert < 0,25). Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Entwicklung der mikrobiellen Mischbiozönose

Die Entwicklung der mikrobiellen Biozönose in beiden Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter in Form einer NMDS-Ordination ist in Abbildung 22 dargestellt. Das Inokulum zu Beginn der beiden Versuche wies starke Ähnlichkeit zueinander auf, was anhand der Nähe der Punkte an Versuchstag 0 in der Abbildung ersichtlich wird. Die 95%-Konfidenzintervalle der beiden Selektionsversuche zeigen eine Überschneidung, allerdings wird deutlich, dass sich beide Bakteriengemeinschaften im Verlauf der Selektionen teils unterschiedlich entwickelten. Insbesondere Tag 7 des ersten Selektionsversuches mit einem Schlammalter von 2 d Tagen sticht heraus, da die Punkte dieser Replikate in der Abbildung am weitesten von denen des zweiten Versuches mit einem Schlammalter von 4 d entfernt sind. Die Punkte der Tage 14 bis 28 des ersten Schlammalters nähern sich allerdings dem Cluster des zweiten Schlammalters erneut an. Der PHA-Gehalt stand in signifikantem Zusammenhang mit der MDS2-Achse ($R^2=0,28$, $p = 0,014$). Der Einfluss der Zeit und des Experimentes auf das Muster wiesen ein statistisch signifikantes Ergebnis auf (PERMANOVA: $F = 7,63$, $DF = 3$, $p = 0,001$; Pairwise-Adonis Experiment: $F = 6,01$, $DF = 1$, $p = 0,001$). Dabei unterschieden sich die Versuchszeitpunkte insbesondere zu Beginn und zum Ende der Selektion statistisch signifikant (Anhang 12).

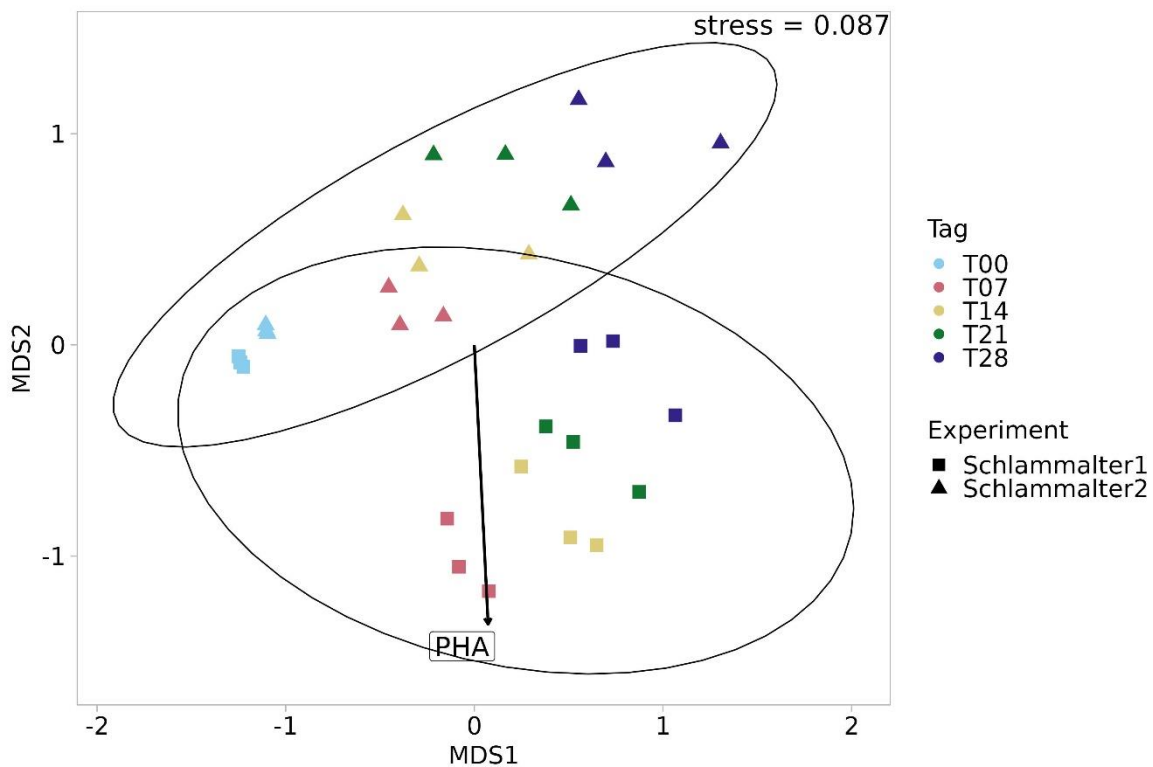


Abbildung 22: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. Die Ordination der Matrix erfolgte basierend auf dem Bray-Curtis-Ähnlichkeitskoeffizienten. 1: Schlammalter 2 d. 2: Schlammalter 4 d. sind jeweils drei Replikate (parallel laufende Versuchsreaktoren) zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt. Die Ellipsen zeigen 95%-Konfidenzintervalle für die Biozönosen der jeweiligen Versuche.

3.1.3 Zyklusdauer

Aus den Ergebnissen des Kapitels 3.1.2 konnte nicht eindeutig festgestellt werden, welches der beiden verglichenen Schlammalter sich besser zur PHA-Produktion eignete. Innerhalb des Versuches mit einem Schlammalter von 2 d konnte zwar im Mittel ein höherer PHA-Gehalt erzielt werden, jedoch wurde im Versuch mit einem Schlammalter von 4 d der insgesamt höchste PHA-Gehalt erreicht. Zudem besaß die Biozönose in letzterem Versuch eine niedrigere Alpha-Diversität nach der Selektionsphase. Aufgrund dessen, Ergebnissen aus der Literatur und der Vergleichbarkeit mit den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum wurde für die weiteren Versuche ein Schlammalter von 4 d gewählt. Im nachfolgend beschriebenen Versuchsblock wurden zwei unterschiedliche Zyklusdauern (24 und 6 h) auf ihre mikrobielle Dynamik und PHA-Produktionsperformance hin untersucht und miteinander verglichen.

Sequenzdaten

Die Proben der beiden Selektionsversuche mit unterschiedlicher Zyklusdauer wiesen alle eine annähernde Sättigung der Sequenzanzahlen im Vergleich der ermittelten ASVs auf (Anhang 14). Die minimale Anzahl an Sequenzen lag dabei im ersten Zyklusdauerexperiment bei 25.248 und im zweiten Zyklusdauerexperiment bei 33.918, sodass alle Proben bei gemeinsamer Betrachtung der Versuche auf die minimale Anzahl des ersten Zyklusdauerexperimentes normalisiert wurden.

Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten

Bei Betrachtung des produzierten PHA-Gehaltes zeigte sich, dass im Versuch mit einer Zyklusdauer von 6 h (Zyklusdauer 2) insgesamt sehr viel höhere PHA-Gehalte erzielt werden konnten als in dem Versuch mit einer Zyklusdauer von 24 h (Zyklusdauer 1) (Abbildung 23). Der maximale produzierte PHA-Gehalt im Versuch mit einer Zyklusdauer von 6 h wurde an Tag 7 erreicht und lag mit einem Wert von 40,7 (\pm 6,0) %oTS um mehr als doppelt so hoch wie der maximale PHA-Gehalt des Versuches mit der Zyklusdauer von 24 h an Tag 14 mit einem Wert von 17,5 (\pm 4,8) %oTS. Zudem lag er damit ebenfalls etwa doppelt so hoch wie die maximalen mittleren PHA-Gehalte aus den beiden Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter, welche mit einer Zyklusdauer von 12 h durchgeführt wurden (vgl. Kapitel 3.1.2). In beiden Versuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer war nach Erreichen des maximalen PHA-Gehaltes an Tag 7 bzw. 14 ein Absinken dieses bis zum Versuchsende zu verzeichnen (Abbildung 23).

Im Versuch mit einer Zyklusdauer von 24 h sank der PHA-Gehalt dabei sogar auf einen niedrigeren Wert ($2,3 \pm 4,0$ %oTS) als zum Versuchsstart ($11,9 \pm 0,6$ %oTS). Im Versuch mit einer Zyklusdauer von 6 h war dieses Absinken nicht so stark ausgeprägt und der PHA-Gehalt an Tag 28 lag noch bei einem Wert von $24,6 \pm (8,6)$ %oTS. Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten hingegen stieg in beiden Selektionen bis zum Ende des Versuches an und war zwischen diesen vergleichbar (Zyklusdauer 1: von $21,6 \pm 0,4$ % auf $60,4 \pm 13,4$; Zyklusdauer 2: von $20,4 \pm 0,3$ auf $56,2 \pm 3,3$ %). Ein statistischer signifikanter Zusammenhang zwischen Versuchsdauer, Experiment und relativer Abundanz potenzieller PHA-Produzenten mit dem PHA-Gehalt mittels ANCOVA konnte nicht ermittelt werden, da keine Normalverteilung der Daten gegeben war. Jedoch konnte ein solcher Zusammenhang in den ersten 7 Tagen der Versuche gefunden werden (Experiment: $F = 69,98$, $DF = 1$, $p < 0,001$; Versuchsdauer: $F = 42,19$, $DF = 1$, $p < 0,001$; PHA-Produzenten: $F = 2,16$, $DF = 1$, $p = 0,002$) (Anhang 13).

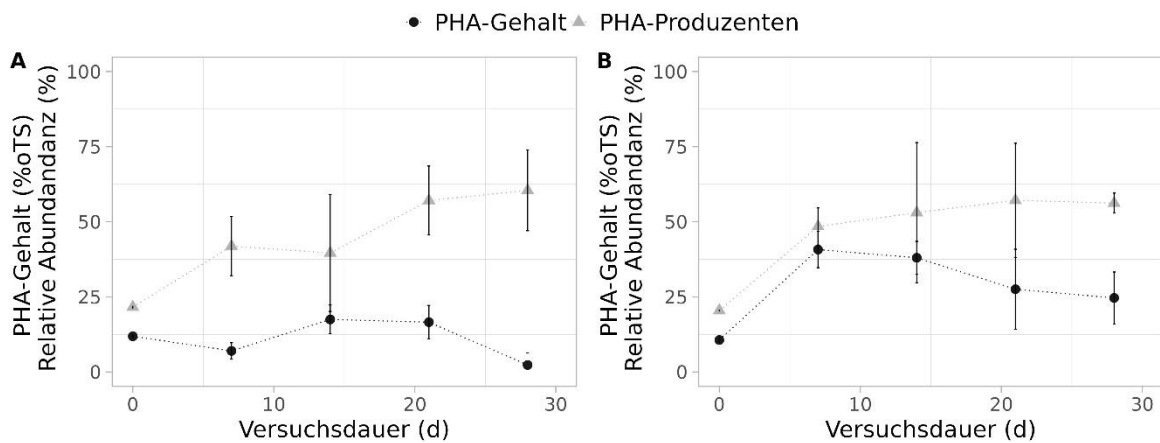


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. A) Zyklusdauer 24 h. B) Zyklusdauer 6 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Eine Verbindung der Punkte mittels gepunkteter Linie dient als optische Unterstützung zur Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufs.

Die Zusammensetzung des produzierten PHA zeigte in beiden Zyklusdauer-Versuchen einen ähnlichen HB-Anteil von $61,4 (\pm 0,4)$ % im ersten und $63,5 (\pm 3,1)$ % im zweiten Experiment zu Versuchsbeginn (Abbildung 24). Im ersten Versuch mit einer Zyklusdauer von 24 h stieg dieser bis zu Tag 7 auf $85,3 (\pm 4,1)$ % und erreichte an den Tagen 14 und 21 mit $77,6 (\pm 1,7)$ % bzw. $73,7 (\pm 0,8)$ % annähernd den Wert der erwarteten PHA-Zusammensetzung von $74,7:25,3$ % HB/HV, da der HB-Anteil erneut leicht absank. An Tag 28 lag dieser mit jedoch mit $81,3 (\pm 0,0)$ wieder höher (Abbildung 24 A).

Im Versuch mit einer Zyklusdauer von 6 h war die Zusammensetzung ab Tag 7 im erwarteten Verhältnis und lag bei 74,9 ($\pm 1,5$) % an Tag 7, 75,4 ($\pm 2,2$) % an Tag 14, 76,1 ($\pm 3,0$) % an Tag 21 und 77,3 ($\pm 1,5$) % an Tag 28 (Abbildung 24 B). Der produzierte HB-Anteil unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Experimenten ($\chi^2 = 0,00$, DF = 1, $p = 0,98$), aber über die Zeit ($\chi^2 = 12,15$, DF = 4, $p = 0,016$).

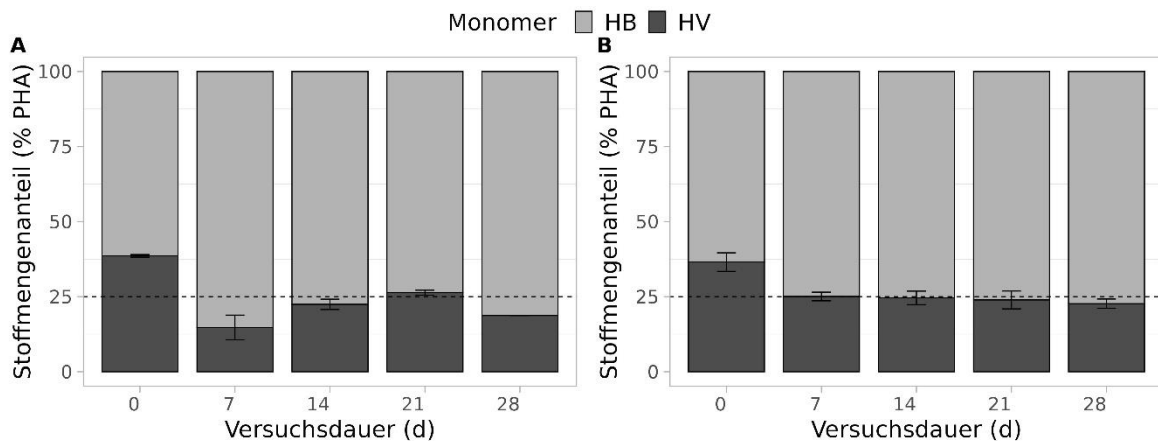


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. A) Zyklusdauer 24 h. B) Zyklusdauer 6 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Die gestrichelte Linie markiert die aufgrund der Substratzusammensetzung berechnete theoretische PHA-Zusammensetzung.

Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose

Neben der Entwicklung der PHA-Produktion in Systemen mit unterschiedlicher Zyklusdauer während der Selektionsphase, fand eine Betrachtung der taxonomischen Zusammensetzung der Bakteriengesellschaft über den Selektionsverlauf hin statt (Abbildung 25). Auf eine Darstellung der Standardabweichungen wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet, die Einzelwerte der Reaktoren finden sich in Anhang 17 und Anhang 33.

Zu Beginn der beiden Versuche wies das jeweilige Inokulum eine ähnliche Zusammensetzung auf, wobei unter anderem *Caldilinea* (Zyklusdauer 1: $4,3 \pm 0,3$ % und Zyklusdauer 2: $3,8 \pm 0,1$ %), *Planctomyces* ($5,7 \pm 0,1$ % und $5,7 \pm 0,2$ %), *Streptococcus* ($8,4 \pm 0,5$ % und $4,6 \pm 0,3$ %) und die nicht näher bestimmten Gruppen Ellin6075 ($2,5 \pm 0,1$ % und $3,2 \pm 0,3$ %), HOC36 ($9,2 \pm 0,5$ % und $9,6 \pm 0,8$ %), Pirellulaceae ($3,3 \pm 0,2$ % und $3,0 \pm 0,2$ %) und Saprospiraceae ($2,8 \pm 0,1$ % und $8,8 \pm 0,5$ %) zu den Taxa mit der höchsten relativen Abundanz zählten (Abbildung 25).



Abbildung 25: Taxonomische Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. 1: Zyklusdauer 24 h. 2: Zyklusdauer 6 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag). Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbar Taxa wurden mit der letzten bestimmbar Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

An Tag 7 der Selektion mit einer Zyklusdauer von 24 h waren diese alle in ihrer Abundanz stark reduziert (*Calidinea*: $1,5 \pm 0,3$ %; *Planctomyces*: $1,5 \pm 0,5$ %; *Streptococcus*: $0,7 \pm 0,5$ %; Ellin6075: $1,1 \pm 0,3$ %; HOC36: $0,7 \pm 0,3$ %; Pirellulaceae: $0,7 \pm 0,1$ %; Saprospiraceae: $0,8 \pm 0,3$ %). Die potenziellen PHA-Produzenten *Comamonas** ($8,2 \pm 4,7$ %), *Flavobacterium** ($5,3 \pm 2,1$ %) und *Pseudomonas** ($10,3 \pm 8,8$ %) sowie die Gruppen *Methanosaeta* ($5,9 \pm 0,9$ %), *Methanobacterium* ($7,8 \pm 0,7$ %) und Chitinophagaceae ($8,7 \pm 2,4$ %) waren dafür zu diesem Zeitpunkt unter den Organismen mit der höchsten relativen Abundanz (Abbildung 25 Zyklusdauer 1). An Tag 14 jedoch dominierten neben *Comamonas** ($5,9 \pm 8,1$ %) und der Gruppe der Chitinophagaceae ($5,6 \pm 6,1$ %) die Gattungen *Paracoccus** ($7,2 \pm 10,0$ %) und *Prostheco bacter* ($7,5 \pm 7,8$ %) sowie nicht näher bestimmte Vertreter der Familie Verrucomicrobiaceae ($4,4 \pm 6,1$ %). Bis zu Tag 21 konnte die Gattung *Paracoccus** ($16,8 \pm 3,6$ %) einen starken Zuwachs in der relativen Abundanz verzeichnen. Daneben wiesen auch die Gruppen BD7-3 ($4,1 \pm 0,1$) und Comamonadaceae* ($5,8 \pm 2,4$ %) eine Zunahme bis Tag 21 auf. Weitere Organismen, die zu den Taxa mit der höchsten relativen Abundanz zu diesem Zeitpunkt gehörten, waren *Comamonas** ($4,7 \pm 1,7$ %), *Planctomyces* ($4,6 \pm 0,2$ %) und die nicht auf Gattungsebene bestimmten Chitinophagaceae ($4,9 \pm 5,3$ %), welche jedoch im Vergleich zum Versuchsbeginn bzw. Tag 7 der Selektion eine Abnahme der relativen Abundanz aufwiesen. Bis zum letzten Versuchstag nahmen die Taxa *Leadbetterella** ($4,3 \pm 1,3$ %) und Rhodocyclaceae* ($12,3 \pm 14,0$ %) zu, wohingegen *Comamonas** ($3,4 \pm 3,8$ %) und die Gruppe Chitinophagaceae ($2,7 \pm 3,1$ %) abnahmen. Weitere zu diesem Zeitpunkt dominante Taxa waren unter anderem *Paracoccus** ($14,3 \pm 13,4$ %), *Planctomyces* ($5,3 \pm 1,7$ %), die Gruppe BD7-3 ($5,3 \pm 4,2$ %) und die Familie der Comamonadaceae* ($6,2 \pm 1,8$ %).

Im Versuch mit einer Zyklusdauer von 6 h nahmen die zu Beginn im Inokulum abundanten Organismen ebenfalls bis Tag 7 der Selektion ab (*Calidinea*: $1,2 \pm 0,9$ %; *Planctomyces*: $2,5 \pm 0,8$ %; *Streptococcus*: $0,4 \pm 0,2$ %; Ellin6075: $2,2 \pm 1,8$ %; HOC36: $0,3 \pm 0,3$ %; Pirellulaceae: $1,1 \pm 0,8$ %; Saprospiraceae: $5,3 \pm 4,6$ %), wohingegen *Paracoccus** ($19,6 \pm 1,5$ %) und die nicht auf Gattungsebene bestimmten Gruppen Chitinophagaceae ($7,4 \pm 2,8$ %) und BD7-3 ($5,0 \pm 4,1$ %) unter den dominanten Taxa waren (Abbildung 25 Zyklusdauer 2). Die ersten beiden Taxa nahmen bis Tag 14 in ihrer relativen Abundanz ab (*Paracoccus*: $3,8 \pm 0,7$ %; Chitinophagaceae: $4,3 \pm 3,4$ %), wohingegen die Gruppe BD7-3 ($16,9 \pm 12,0$ %) eine starke Zunahme aufwies. Daneben waren zu diesem Zeitpunkt unter anderem Organismen der Gruppen Rhodocyclaceae* ($21,7 \pm 28,5$ %) und *Acinetobacter** ($3,7 \pm 1,6$ %) unter den abundantesten Taxa. Auch an Tag 21 waren diese (Rhodocyclaceae*: $15,4 \pm 17,1$ %; *Acinetobacter**: $7,3 \pm 2,8$ %), neben *Pedobacter* ($3,9 \pm$

3,9 %), *Planctomyces* ($5,1 \pm 0,3$ %) und den Gruppen Actinomycetales* ($3,6 \pm 4,7$ %), Bacteroidetes* ($4,0 \pm 5,2$ %) und Comamonadaceae* ($5,4 \pm 5,6$ %), unter den Taxa mit der höchsten relativen Abundanz. Die Gattungen *Flavobacterium** ($7,7 \pm 6,5$ %) und *Planctomyces* ($5,6 \pm 1,8$ %) zeigten eine Zunahme in ihrer relativen Abundanz bis zu Tag 28. Weitere zu diesem Zeitpunkt häufige Organismen gehörten unter anderem zu den Taxa *Acinetobacter** ($3,6 \pm 3,1$ %), Actinomycetales* ($2,9 \pm 2,9$ %), BD7-3 ($5,0 \pm 5,6$ %), Bacteroidetes* ($5,5 \pm 4,8$ %), Comamonadaceae* ($4,3 \pm 3,2$ %) und Rhodocyclaceae* ($11,9 \pm 2,6$ %).

Zu den insgesamt abundantesten Organismen mit dem Potenzial zur PHA-Produktion über beide Versuche zählten die Gattungen *Paracoccus**, *Comamonas**, *Pseudomonas**, *Flavobacterium** und *Acinetobacter** sowie die nicht auf Gattungsebene bestimmten Gruppen Rhodocyclaceae*, Comamonadaceae* und Bacteroidetes*. Taxa ohne diese Fähigkeit, welche häufig in den beiden Zyklusdauer-Versuchen waren, waren die Gattungen *Planctomyces*, *Prostheco bacter*, *Methanobacterium*, *Streptococcus* sowie die Gruppen BD7-3, Chitinophagaceae, Saprospiraceae, HOC36 und Verrucomicrobiaceae (vgl. auch Anhang 33). Die meisten dieser letzten Gruppen nahmen jedoch im Verlauf der Selektion in ihrer relativen Abundanz ab. Aus Abbildung 26 wird ebenfalls eine Zunahme einiger PHA-fähigen Taxa einhergehend mit einer Abnahme von Gruppen ohne diese Fähigkeit über die Selektion ersichtlich. Dies deckt sich ebenfalls mit der Beobachtung der Zunahme der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten über den Verlauf der Selektion insgesamt (vgl. Abbildung 23). In Abbildung 26 wie auch in Abbildung 25 wird zudem deutlich, dass einige potenziellen PHA-Produzenten im Verlauf der Selektion abnahmen, während andere potenzielle PHA-Produzenten zunahmen. So nahmen beispielsweise *Pseudomonas** im Versuch mit der Zyklusdauer 1 oder *Paracoccus** im Versuch mit der Zyklusdauer 2, im System ab, während *Paracoccus** (Zyklusdauer 1) und die Gruppe Rhodocyclaceae* (Zyklusdauer 2) zunahmen. Die statistische Signifikanz der Änderung der relativen Abundanz der in Abbildung 26 gezeigten Taxa wurde mit Maaslin2 getestet. Die Ergebnisse sind in Anhang 34 zu finden. Zudem war in beiden Versuchen eine Abnahme der Alpha-Diversität über den Selektionsverlauf zu beobachten (Anhang 15, Anhang 16).

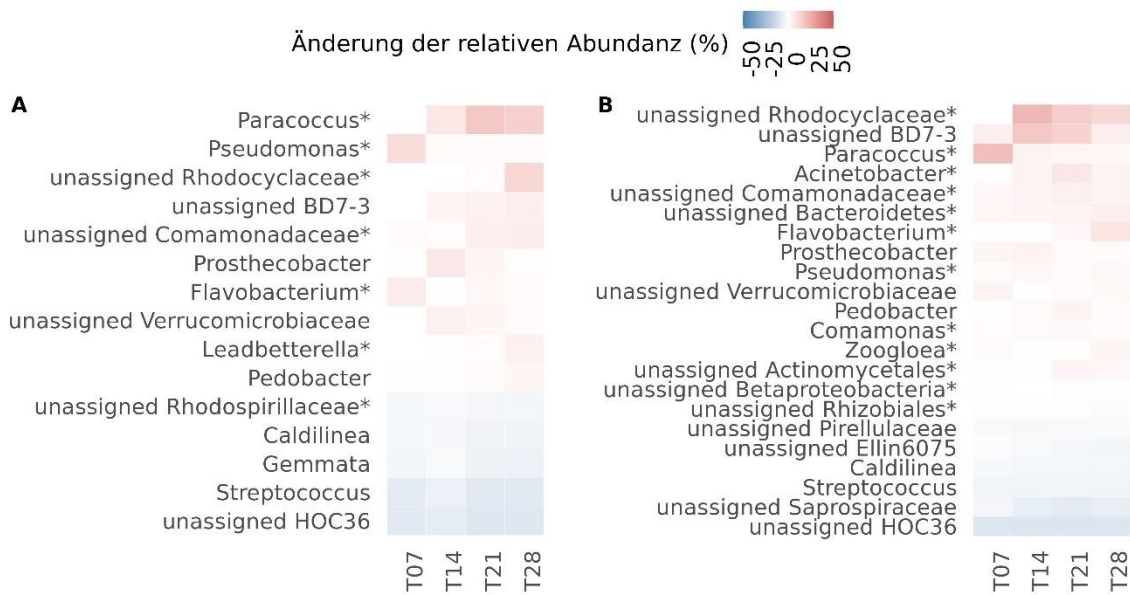


Abbildung 26: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer im Vergleich zum Versuchsstart. A) Zyklusdauer 24 h. B) Zyklusdauer 6 h. Es sind nur Taxa mit statistischer signifikanter Änderung der relativen Abundanz über den Versuch sowie mit einer relativen Abundanz von > 1 % dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Maaslin2 ermittelt (q-Wert < 0,25). Nicht auf Gattungsebene bestimmbar Taxa wurden mit der letzten bestimmbar Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Entwicklung der mikrobiellen Mischbiozönose

Die NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung der beiden Versuche mit unterschiedlicher Zyklusdauer zu verschiedenen Zeitpunkten der Selektion zeigt, dass die Inokula in beiden Versuchen zu Beginn sehr ähnlich zueinander waren (Abbildung 27). Die 95%-Konfidenzintervalle der beiden Experimente weisen zudem großräumige Überschneidungen auf, was insbesondere bis Tag 14 der Selektion zu beobachten ist. Die Punkte der Tage 21 und 28 im zweiten Selektionsversuch mit einer Zyklusdauer von 6 h liegen außerhalb des Konfidenzintervalls des ersten Zyklusdauerversuches. Die Biozönosen zeigten daher in den beiden Versuchen über die Zeit eine teils unterschiedliche Entwicklung. Zudem ist in der Abbildung erkennbar, dass die Streuung der Punkte mit der Zeit teilweise zunimmt. Insbesondere die Proben des Tags 14 aus den drei Reaktoren im ersten Zyklusdauerversuch liegen sehr weit auseinander und weisen somit eine sehr unterschiedliche Zusammensetzung untereinander auf. Jedoch entwickelten sich die Bakteriengesellschaften bis Tag 28 wieder in eine ähnlichere Richtung. Der produzierte PHA-Gehalt wies keine statistische Signifikanz auf und wurde daher nicht dargestellt ($p = 0,295$). Sowohl der Versuch als auch die Zeit zeigten einen signifikanten Einfluss auf das Muster der Zusammensetzung der Biozönose (PERMANOVA: $F = 6,09$, $DF = 3$, $p = 0,001$; Pairwise-Adonis-Test: Experiment: $F = 2,54$, $DF = 1$, $p = 0,024$). Dabei wiesen

die Tage 0 und 7, 0 und 21, 0 und 28 sowie 7 und 28 einen signifikanten Unterschied zueinander auf (Anhang 18).

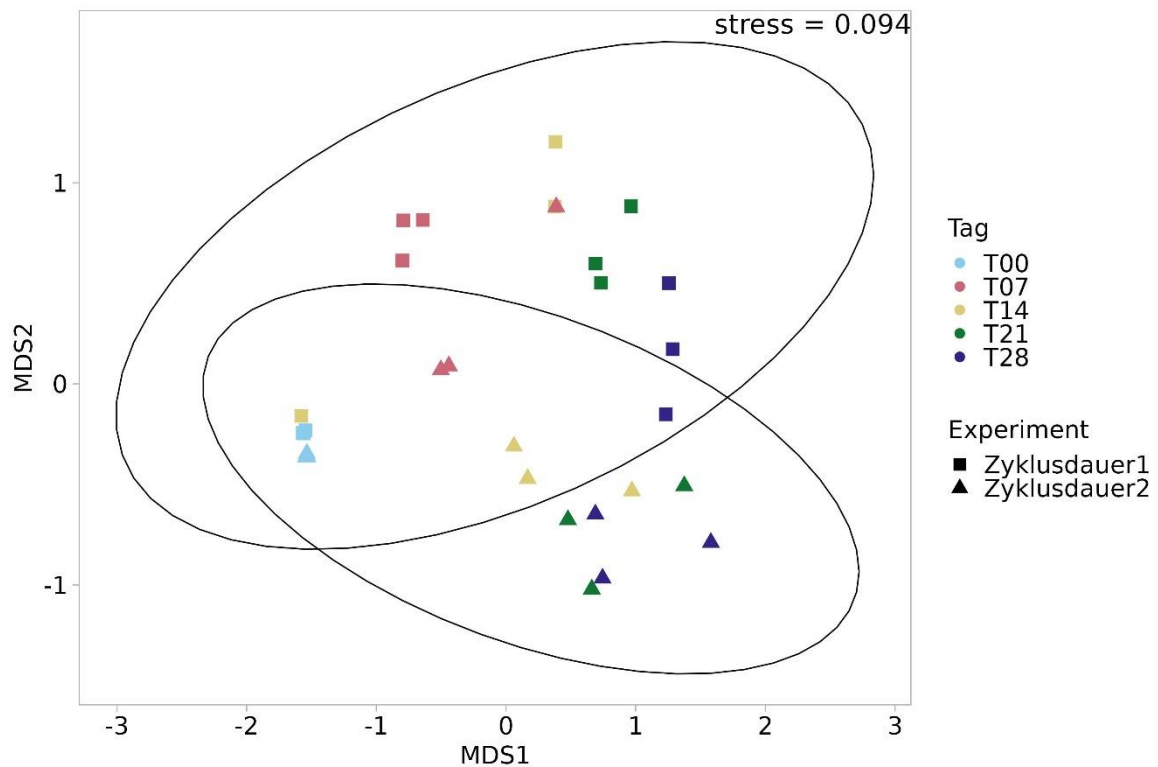


Abbildung 27: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Die Ordination der Matrix erfolgte basierend auf dem Bray-Curtis-Ähnlichkeitskoeffizienten. 1: Zyklusdauer 24 h. 2: Zyklusdauer 6 h. Dargestellt sind jeweils drei Replikate (parallel laufende Versuchsreaktoren) zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt. Die Ellipsen zeigen 95%-Konfidenzintervalle für die Biozöten der jeweiligen Versuche.

3.1.4 Raumbelastung

Aufgrund des mit einer Zyklusdauer von 6 h in der Selektion höheren erzielten PHA-Gehaltes (vgl. Kapitel 3.1.3), wurde diese Zyklusdauer für die nachfolgenden Versuche genutzt. Im folgenden Versuchsblock sollten zwei unterschiedliche, im Vergleich zu den bisher genutzten höhere, Substratkonzentrationen bzw. Raumbelastungen in der Selektionsphase und deren Einfluss auf die Entwicklung der Biozönose und der PHA-Produktion untersucht werden (Raumbelastung 1: $10 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})^2$; Raumbelastung 2: $6 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$).

Sequenzdaten

Die Sequenzanzahlen in den beiden Versuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung waren 32.831 im ersten und 40.133 im zweiten Selektionsversuch. Eine Normalisierung aller Proben wurde daher auf die gemeinsame minimale Anzahl von 32.831 durchgeführt, wenn beide Versuchsblöcke in einer Analyse betrachtet wurden. In allen Proben beider Versuche war zudem eine annähernde Sättigung der Sequenzen im Vergleich zu den ASVs zu beobachten (Anhang 20).

Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten

Der PHA-Gehalt in beiden Versuchen mit hoher Substratkonzentration war über den gesamten Verlauf der Experimente sehr gering (Abbildung 28). Der zu Beginn des Versuches mit einer höheren Raumbelastung von $10 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ produzierte PHA-Gehalt lag bei $6,0 (\pm 2,1) \text{ ‰TS}$ und stieg bis Tag 7 und Tag 14 mit Werten von $6,5 (\pm 4,0) \text{ ‰TS}$ und $8,3 (\pm 0,9) \text{ ‰TS}$ kaum an (Abbildung 28 A). Auch der im zweiten Selektionsversuch mit einer etwas geringeren Raumbelastung von $6 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ produzierte PHA-Gehalt stieg von Tag 0 bis Tag 7 kaum an (von $5,6 \pm 4,8$ auf $9,4 \pm 4,3 \text{ ‰TS}$) und sank sogar bis Tag 14 wieder ab ($5,7 \pm 3,7 \text{ ‰TS}$) (Abbildung 28 B). Dies wurde auch mittels statistischen Tests bestätigt, welcher keine Signifikanz des PHA-Gehaltes in Zusammenhang mit der Zeit und dem Experiment aufwies (ANCOVA Experiment: $F = 0,0007$, $DF = 1$, $p = 0,980$; Versuchsdauer: $F = 0,33$, $DF = 1$, $p = 0,573$) (Anhang 19). Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten hingegen zeigte ein anderes Muster und stieg in beiden Versuchen von Tag 0 bis Tag 14 an, im Versuch mit der Raumbelastung 1 von $16,0 (\pm 0,3)$ auf $49,2 (\pm 4,4) \%$ und im Versuch mit der Raumbelastung 2 von $15,4 (\pm 1,0)$ auf $67,5 (\pm 3,1) \%$, wobei im zweiten Raumbelastungsversuch ein höherer Anteil potenzieller PHA-Produzenten erreicht wurde (Abbildung 28). Es konnte kein signifikanter Zusammenhang dieses Anteils mit dem

² Die Raumbelastung ist in $\text{gCSB}_{\text{VFA}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ angegeben und im Folgenden als $\text{g}/(\text{L} \cdot \text{d})$ verkürzt.

PHA-Gehalt nachgewiesen werden (ANCOVA Experiment: $F = 0,26$, $DF = 1$, $p = 0,616$; Potenzielle PHA-Produzenten: $F = 1,38$, $DF = 1$, $p = 0,260$) (Anhang 19).

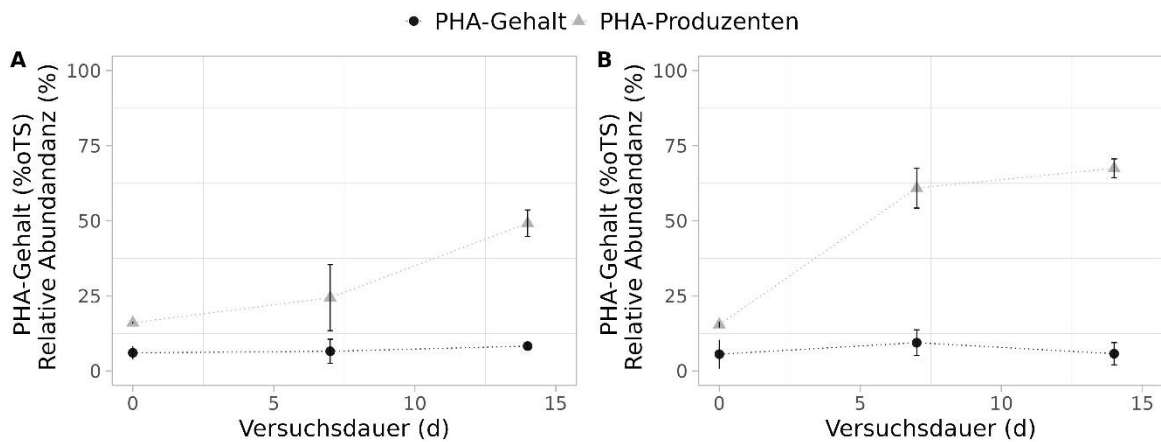


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. A) Raumbelastung 10 g/(L*d). B) Raumbelastung 6 g/(L*d). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Eine Verbindung der Punkte mittels gepunkteter Linie dient als optische Unterstützung zur Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufs.

Die PHA-Zusammensetzung wies zu Beginn der beiden Versuche einen erhöhten HV-Anteil im Vergleich zu den restlichen Versuchstagen auf (Raumbelastung 1: $66,6 \pm 29,0$ %; Raumbelastung 2: $39,0 \pm 3,1$ %) (Abbildung 29 A und B). Dieser lag im ersten Raumbelastungsversuch zudem um einiges höher als im zweiten Versuch. In beiden Selektionen sank der HV-Anteil kontinuierlich bis Tag 14 ab (Raumbelastung 1: $0,0 \pm 0,0$ %; Raumbelastung 2: $6,6 \pm 11,4$ %), sodass das produzierte PHA zu diesem Zeitpunkt nahezu bzw. ausschließlich aus HB bestand. Die zu erwartende PHA-Zusammensetzung von 71,6:28,4 %HB:HV wurde in keinem Versuch zu keinem Zeitpunkt erreicht. Zwischen den beiden Versuchen wurde kein signifikant unterschiedlicher HB-Anteil im PHA festgestellt ($\chi^2 = 0,41$, $DF = 1$, $p = 0,52$). Dieser unterschied sich jedoch zwischen den Zeitpunkten signifikant ($\chi^2 = 12,87$, $DF = 2$, $p = 0,016$).

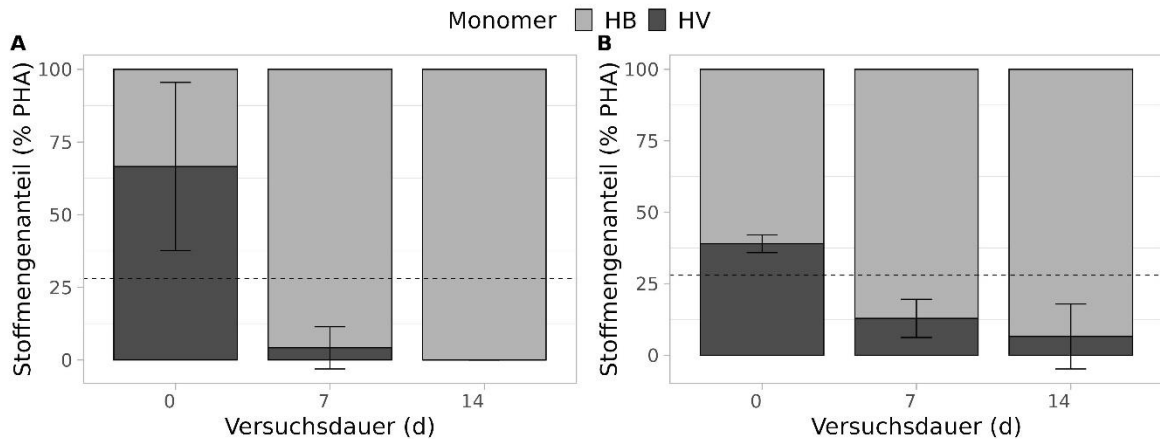


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. A) Raumbelastung 10 g/(L*d). B) Raumbelastung 6 g/(L*d). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Die gestrichelte Linie markiert die aufgrund der Substratzusammensetzung berechnete theoretische PHA-Zusammensetzung.

Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose

Neben der PHA-Produktion wurde der Einfluss der Raumbelastung auf die taxonomische Zusammensetzung während der Selektionsphase untersucht (Abbildung 30). Eine Darstellung der Einzelwerte ist in Anhang 23 und Anhang 33 zu finden.

Die mikrobielle Gesellschaft wies zu Beginn beider Versuche eine ähnliche Zusammensetzung auf, wobei unter anderem die Gattungen *Calidinea* (Raumbelastung 1: $3,8 \pm 0,1$ % und Raumbelastung 2: $4,1 \pm 0,8$ %), *Planctomyces* ($4,1 \pm 0,2$ % und $3,7 \pm 0,6$ %) und *Streptococcus* ($4,8 \pm 0,7$ % und $12,0 \pm 2,3$ %) und die nicht näher bestimmten Gruppen HOC36 ($4,9 \pm 0,5$ % und $6,6 \pm 0,5$ %), Pirrellulaceae ($4,7 \pm 0,3$ % und $4,4 \pm 0,4$ %), Rhodospirillaceae* ($3,2 \pm 0,2$ % und $5,2 \pm 1,4$ %) und Saprospiraceae ($4,0 \pm 0,3$ % und $4,5 \pm 0,3$ %) zu den Taxa mit der höchsten relativen Abundanz zählten (Abbildung 30). Im ersten Selektionsversuch mit höherer Raumbelastung waren zudem *Enterococcus* ($5,1 \pm 0,4$ %) und die Gruppe der Sphingobacteriales ($10,1 \pm 1,4$ %), im zweiten dagegen die Gattung *Veillonella* ($3,5 \pm 0,5$ %) unter den abundantesten Gruppen. Diese Taxa nahmen jedoch alle im Verlauf der Selektion stark in ihrer relativen Abundanz ab, wohingegen einige Taxa mit potenziellen PHA-Produzenten zunahmen (Abbildung 30). Die Zunahme potenzieller PHA-Produzenten geht ebenfalls aus Abbildung 28 und Abbildung 31 hervor. Die Analyse-Ergebnisse des Maalin2-Tests hierzu sind in Anhang 34.

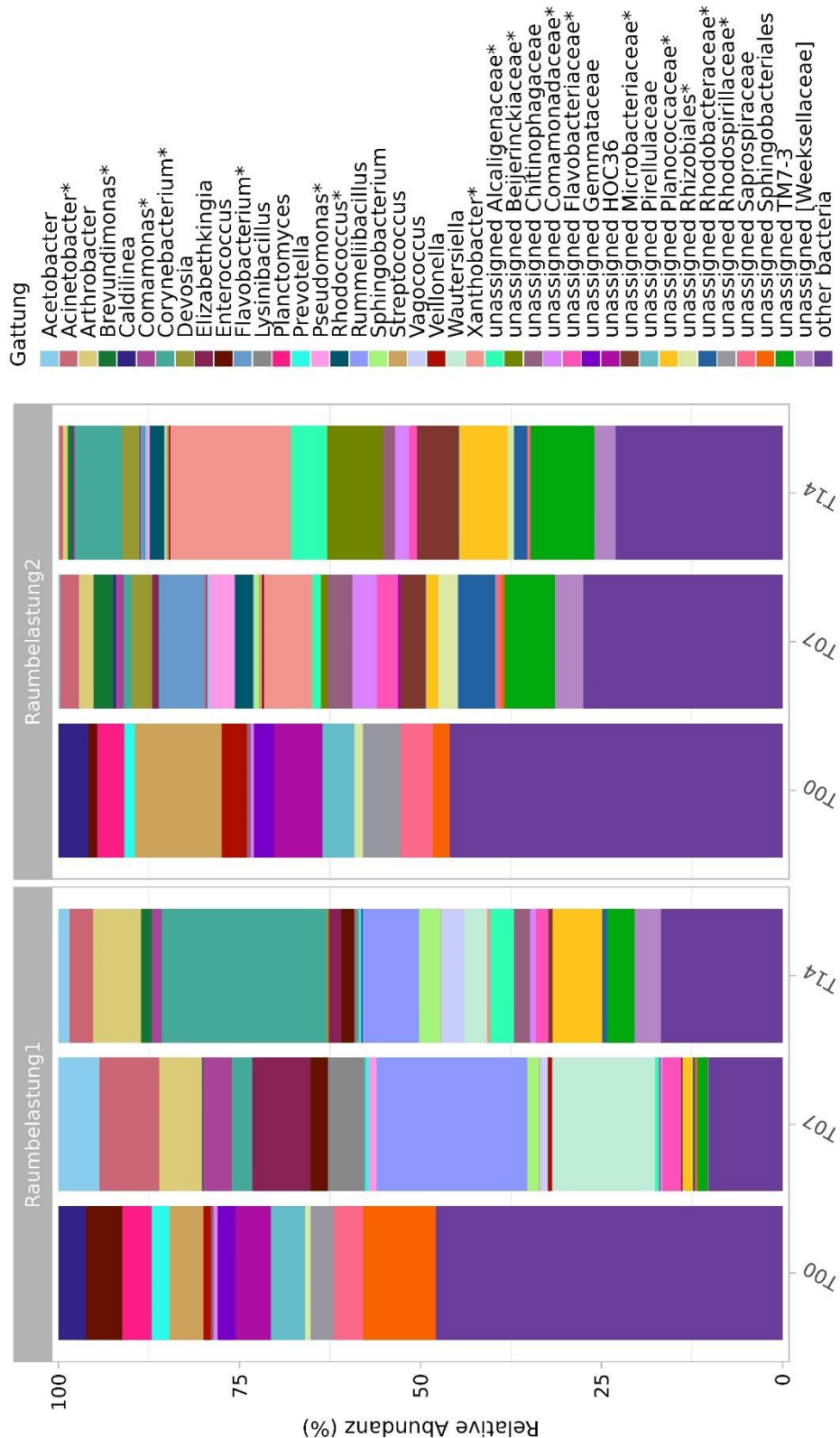


Abbildung 30: Taxonomische Zusammensetzung in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. 1: Raumbelastung 10 g/(L*d). 2: Raumbelastung 6 g/(L*d). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag). Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

An Tag 7 des ersten Raumbelastungsversuches waren unter den Organismen mit der höchsten relativen Abundanz die potenziellen PHA-Produzenten *Acinetobacter** ($8,2 \pm 6,9$ %), *Comamonas** ($4,0 \pm 2,2$ %), *Corynebacterium** ($2,8 \pm 2,0$ %) sowie die Taxa *Acetobacter* ($5,7 \pm 4,4$ %), *Arthrobacter* ($5,9 \pm 1,4$ %), *Elizabethkingia* ($8,1 \pm 10,2$ %), *Lysinibacillus* ($5,1 \pm 3,4$ %), *Rummeliibacillus* ($20,9 \pm 14,7$ %) und *Wautersiella* ($14,3 \pm 12,2$ %) (Abbildung 30 Raumbelastung 1). Einige dieser Gruppen verzeichneten bis Tag 14 eine starke Abnahme, darunter *Acetobacter* ($1,5 \pm 2,5$ %), *Acinetobacter** ($3,2 \pm 4,1$ %), *Comamonas** ($1,4 \pm 1,2$ %), *Elizabethkingia* ($1,7 \pm 1,8$ %), *Rummeliibacillus* ($7,8 \pm 8,5$ %) und *Wautersiella* ($3,1 \pm 2,4$ %), wohingegen die Taxa *Corynebacterium** ($22,8 \pm 5,4$ %), *Alcaligenaceae** ($3,3 \pm 1,2$ %) und *Planococcaceae** ($6,9 \pm 7,0$ %) eine Zunahme verzeichneten. Eine Verringerung mancher Taxa in ihrer relativen Abundanz wie bei der Gattung *Rummeliibacillus* einhergehend mit einer Zunahme anderer Gruppen wie beispielsweise der Gattung *Corynebacterium** ist ebenfalls in Abbildung 31 zu erkennen, welche signifikante Änderungen abundanter Taxa darstellt.

Im zweiten Versuch mit geringerer Raumbelastung waren unter den abundantesten Taxa an Tag 7 die potenziellen PHA-Produzenten *Acinetobacter** ($2,6 \pm 0,2$ %), *Brevundimonas** ($2,8 \pm 1,8$ %), *Flavobacterium** ($6,3 \pm 5,8$ %), *Pseudomonas** ($3,6 \pm 2,3$ %), *Xanthobacter** ($6,6 \pm 4,3$ %) und die nicht auf Gattungsebene bestimmten *Comamonadaceae** ($3,4 \pm 1,0$ %), *Flavobacteraceae** ($2,9 \pm 3,6$ %), *Microbacteriaceae** ($3,5 \pm 2,6$ %), *Rhodobacteraceae** ($5,1 \pm 1,9$ %) sowie nicht-PHA-Produzenten wie die Gruppen *Chitinophagaceae* ($3,4 \pm 4,3$ %) und *TM7-3* ($6,9 \pm 5,8$ %) (Abbildung 30 Raumbelastung 2). Die Taxa mit der höchsten relativen Abundanz wechselten bis Tag 14 und einige konnten an relativer Abundanz dazu gewinnen. Zu diesem Zeitpunkt waren die dominanten Taxa *Corynebacterium** ($6,5 \pm 1,5$ %), *Xanthobacter** ($16,6 \pm 8,2$ %) und nicht näher bestimmte *Alcaligenaceae** ($5,0 \pm 5,2$ %), *Beijerinckiaceae** ($7,7 \pm 10,4$ %), *Microbacteriaceae** ($5,8 \pm 2,7$ %), *Planococcaceae** ($6,7 \pm 5,7$ %) und *TM73* ($8,8 \pm 6,0$ %). Insgesamt konnte eine Zunahme PHA-fähiger Taxa beobachtet werden, was auch aus Abbildung 28 und Abbildung 31 hervorgeht.

Die über beide Versuche insgesamt abundantesten potenziellen PHA-Produzenten waren die Gattungen *Corynebacterium**, *Xanthobacter**, *Acinetobacter** und die Familien *Planococcaceae**, *Microbacteriaceae**, *Beijerinckiaceae** und *Rhodospirillaceae**. Die Gattungen *Rummeliibacillus*, *Wautersiella*, *Streptococcus*, *Arthrobacter*, *Elizabethkingia* und *Enterococcus* sowie die Gruppen *TM7-3*, *Sphingobacteriales*, *HOC36*, *Weeksellaceae*, *Alcaligenaceae* *Saprospiraceae*, *Pirellulaceae* waren unter den Taxa mit der höchsten relativen Abundanz, welche diese Fähigkeit nicht besitzen (vgl. auch Anhang 33).

Die taxonomische Zusammensetzung innerhalb der einzelnen Reaktoren zum Probenahmezeitpunkt wies teilweise eine erhöhte Variation auf (Anhang 23). Die Alpha-Diversitätsindizes in beiden Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung wiesen eine Abnahme über den Versuchsverlauf auf (Anhang 21, Anhang 22).

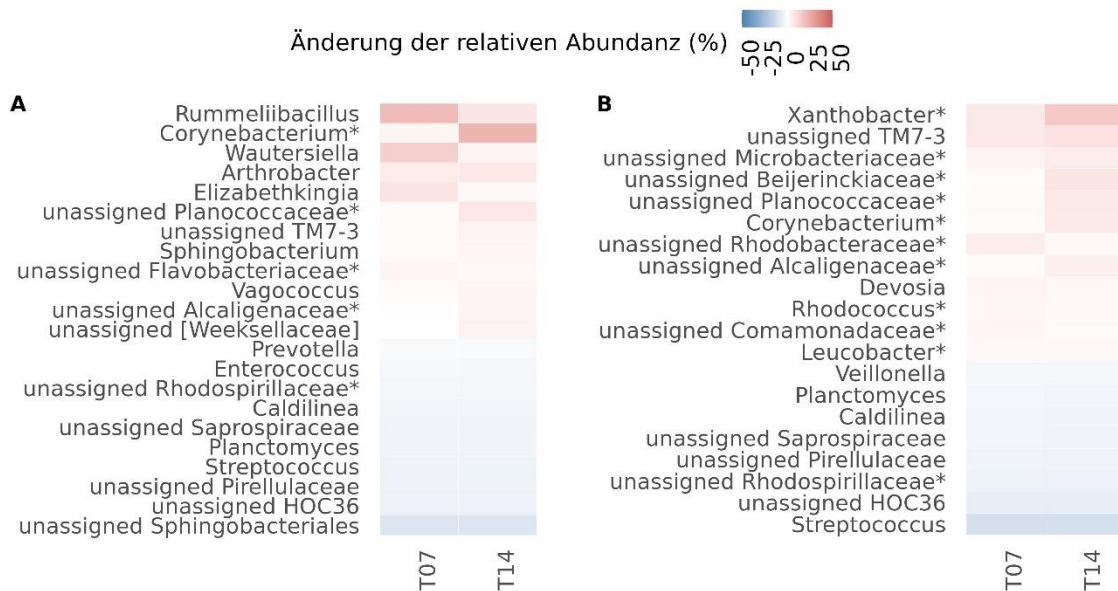


Abbildung 31: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung im Vergleich zum Versuchsstart. A) Raumbelastung 10 g/(L*d). B) Raumbelastung 6 g/(L*d). Es sind nur Taxa mit statistischer signifikanter Änderung der relativen Abundanz über den Versuch sowie mit einer relativen Abundanz von > 1 % dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Maaslin2 ermittelt (q -Wert < 0,25). Nicht auf Gattungsebene bestimmbar Taxa wurden mit der letzten bestimmbar Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Entwicklung der mikrobiellen Mischbiozönose

Aus der NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung innerhalb der beiden Raumbelastungsversuche wird ersichtlich, dass die beiden Biozönosen sich zu Beginn des jeweiligen Versuches sehr ähnlich waren, sich jedoch über die Selektionszeit unterschiedlich entwickelten (Abbildung 32). Die 95%-Konfidenzintervalle überschneiden sich nur zu Beginn der beiden Versuche. Der PHA-Gehalt wies kein signifikantes Ergebnis auf und ist daher nicht in der Abbildung dargestellt ($p = 0,734$). Sowohl das Experiment als auch die Selektionsdauer hatten einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Biozönose (PERMANOVA: $F = 5,0$, $DF = 3$, $p = 0,001$; Pairwise-Adonis-Test: Experiment: $F = 2,64$, $DF = 1$, $p = 0,02$). Dabei wiesen die Tage 0 und 7 sowie 0 und 14 ein signifikantes Ergebnis bezüglich der taxonomischen Zusammensetzung auf (Pairwise-Adonis-Tests: $F = 9,47$, $DF = 1$, $p = 0,006$; $F = 10,35$, $DF = 1$, $p = 0,009$).

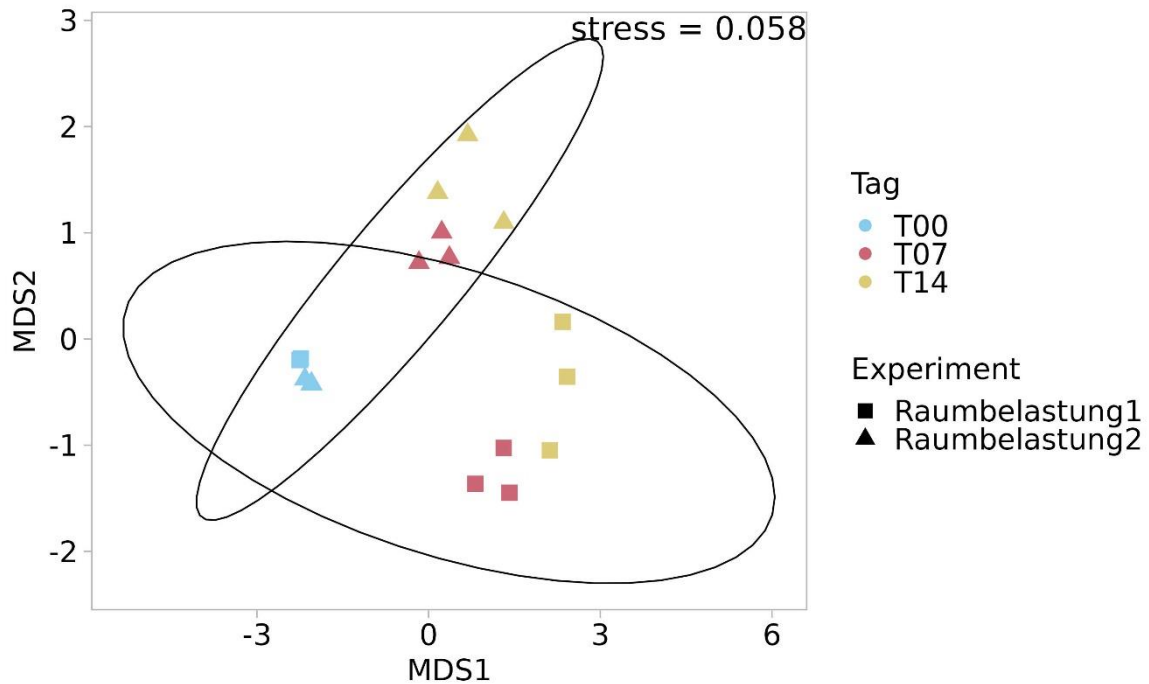


Abbildung 32: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. Die Ordination der Matrix erfolgte basierend auf dem Bray-Curtis-Ähnlichkeitskoeffizienten. 1: Raumbelastung 10 g/(L*d). 2: Raumbelastung 6 g/(L*d). Dargestellt sind jeweils drei Replikate (parallel laufende Versuchsreaktoren) zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt. Die Ellipsen zeigen 95%-Konfidenzintervalle für die Biozöosen der jeweiligen Versuche.

3.1.5 Zusammenfassende Analyse der Versuche mit realem Substrat

Entwicklung der mikrobiellen Mischbiozöosen in den Selektionsversuchen

Eine zusammenfassende Darstellung der Entwicklung der mikrobiellen Biozönose über den Selektionsverlauf mit unterschiedlichen Parametern in der Selektion und deren Zusammenhang mit dem produzierten PHA-Gehalt ist in der NMDS-Ordination in Abbildung 33 dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer und unterschiedlichem Schlammalter im Verlauf der Selektion teils ähnlich entwickelten bzw. einige Überschneidungen zeigten. Diese Entwicklung stand zudem in signifikantem Zusammenhang mit dem produzierten PHA-Gehalt ($R^2 = 0,087$, $p = 0,034$). Die Bakteriengesellschaften der beiden Versuche mit hoher Raumbelastung hingegen entwickelten sich sehr unterschiedlich hierzu und ebenfalls zueinander und standen nicht in Zusammenhang mit der Produktion an PHA. Alle zu Beginn der Versuche genutzten Inokula wiesen zudem eine große Ähnlichkeit zueinander auf. Das beobachtete Muster wies ein statistisch signifikantes Ergebnis auf ($F = 7,35$, $DF = 11$, $p = 0,001$), wobei sowohl das Experiment als auch die Zeit einen Einfluss hierauf hatten. Dabei waren insbesondere die Zeitpunkte zu Beginn und zum Ende der Selektion signifikant unterschiedlich zueinander

(Anhang 24). Nur die Tage 7 und 14, 14 und 21 sowie 21 und 28 wiesen keinen Unterschied auf. Die beiden Raumbelastungsversuche zeigten einen signifikanten Unterschied in ihrer Bakterienzusammensetzung im Vergleich zu allen anderen Versuchen, aber nicht zueinander. Die beiden Schlammalterversuche wiesen einen signifikanten Unterschied sowohl zueinander als auch zu den Versuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer auf, die beiden Zyklusdauerversuche waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich zueinander (Anhang 25).

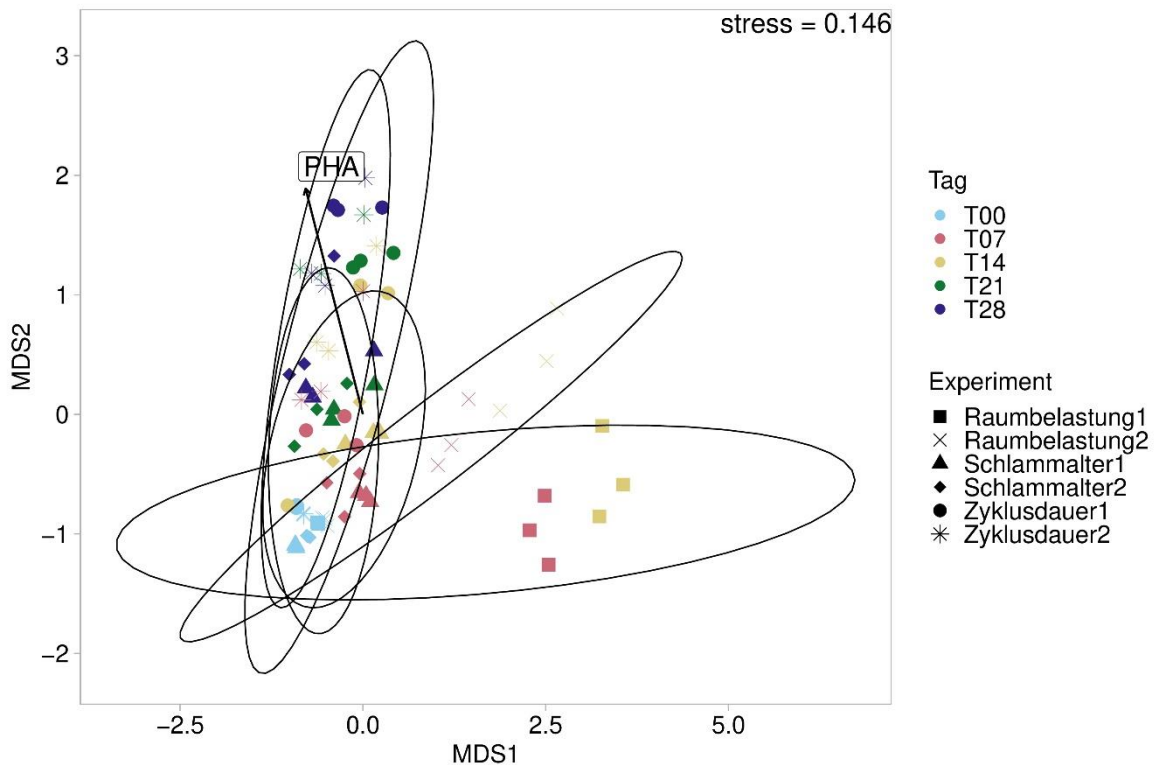


Abbildung 33: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase in Versuchen mit unterschiedlichen Parametern. Die Ordination der Matrix erfolgte basierend auf dem Bray-Curtis-Ähnlichkeitskoeffizienten. Raumbelastung 1: 10 g/(L*d). Raumbelastung 2: 6 g/(L*d). Schlammalter 1: 2 d. Schlammalter 2: 4 d. Zyklusdauer 1: 24 h. Zyklusdauer 2: 6 h. Dargestellt sind jeweils drei Replikate (parallel laufende Versuchsreaktoren) zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt. Die Ellipsen zeigen 95%-Konfidenzintervalle für die Biozönosen der jeweiligen Versuche.

Unterschiede in der taxonomischen Zusammensetzung zwischen den Selektionsversuchen

Abbildung 34 zeigt welche Taxa mit einer Abundanz von mindestens 1 % in einer Probe signifikant unterschiedlich zwischen Selektionsversuchen waren. Die Testergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests sowie des gepaarten Wilcoxon-Testes mit allen signifikant unterschiedlichen Taxa finden sich in Anhang 35. Vor allem in den Versuchen mit den beiden Raumbelastungen gab es, wie bereits anhand von Abbildung 33 ersichtlich wurde, einige Unterschiede zu den anderen Selektionsversuchen. Im Versuch mit der Raumbelastung 1 waren vor allem *Acetobacter* ($2,4 \pm 3,5 \%$), *Elizabethkingia* ($3,3 \pm 6,4 \%$), *Rummeliibacillus* ($9,5 \pm 12,5 \%$), Sphingobacteriales ($3,5 \pm 5,0 \%$) und *Wautersiella* ($5,8 \pm 9,0 \%$) sehr stark vertreten, während diese Taxa in den anderen Selektionsversuchen keine hohe relative Abundanz aufwiesen (Abbildung 34; Anhang 33). Im Versuch mit der Raumbelastung 2 waren unter anderem die Gruppen Weeksellicaceae ($2,3 \pm 3,9 \%$), TM7-3, Beijerinckiacaceae* ($2,9 \pm 6,3 \%$) und *Xanthobacter** ($7,7 \pm 8,5 \%$) häufiger vertreten als in den anderen Selektionsversuchen. Darunter enthielten nur die letztgenannten beiden Taxa potenzielle PHA-Produzenten. In beiden Experimenten mit unterschiedlicher Raumbelastung waren zudem *Arthrobacter* (Raumbelastung 1: $4,2 \pm 4,0 \%$; Raumbelastung 2: $0,9 \pm 1,3 \%$) und die Familie Alcaligenaceae* (Raumbelastung 1: $1,3 \pm 1,7 \%$; Raumbelastung 2: $2,1 \pm 3,5 \%$) abundanter als in anderen Versuchen. In diesen Selektionen waren insgesamt einige Organismen ohne die Fähigkeit zur PHA-Produktion häufiger als in den anderen Selektionen, wohingegen in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter und unterschiedlicher Zyklusdauer einige potenzielle PHA-Produzenten häufiger waren. Die Gattung *Acinetobacter** war in allen Versuchen außer im Selektionsversuch mit der Zyklusdauer von 24 h (Zyklusdauer 1: $0,4 \pm 0,6 \%$) relativ häufig (Raumbelastung 1: $3,8 \pm 5,4 \%$; Raumbelastung 2: $1,1 \pm 1,2 \%$; Zyklusdauer 2: $3,0 \pm 3,2 \%$; Schlammalter 1: $2,3 \pm 3,6 \%$, Schlammalter 2: $3,9 \pm 4,7 \%$). Für die Gattung *Flavobacterium** verhielt es sich ebenso im Versuch mit der Raumbelastung 1, in welchem diese, im Gegensatz zu den anderen Versuchen (Raumbelastung 2: $2,3 \pm 4,2 \%$; Zyklusdauer 1: $2,0 \pm 2,2 \%$; Zyklusdauer 2: $2,1 \pm 4,0 \%$; Schlammalter 1: $3,1 \pm 3,2 \%$; Schlammalter 2: $1,2 \pm 2,1 \%$), kaum vorhanden war ($0,03 \pm 0,05 \%$). Auch die Familie der Comamonadaceae* war in diesem Versuch am seltensten ($0,5 \pm 0,4 \%$). Die Taxa *Paracoccus** (Zyklusdauer 1: $7,7 \pm 9,7 \%$; Zyklusdauer 2: $5,7 \pm 7,4 \%$), BD7-3 ($2,5 \pm 3,2$ und $8,1 \pm 10,3 \%$), Chitinophagaceae ($4,6 \pm 4,3$ und $3,3 \pm 3,0 \%$) und Rhodocyclaceae* ($2,7 \pm 7,3$ und $9,8 \pm 15,4 \%$) waren am abundantesten vertreten in den beiden Zyklusdauerexperimenten im Vergleich zu den anderen Versuchen (u.a. *Paracoccus**: Schlammalter 1: $0,06 \pm 0,08 \%$; Raumbelastung 1: $0,0 \pm 0,0 \%$; Raumbelastung 2: $0,07 \pm 0,15 \%$), wobei *Paracoccus** auch im Versuch mit dem Schlammalter 2 häufig war ($5,0 \pm$

8,4 %). Für die beiden Versuche mit unterschiedlichem Schlammalter waren dies die Gruppen *Pseudomonas** (Schlammalter 1: $14,5 \pm 11,1$ %; Schlammalter 2: $7,6 \pm 5,6$ %), *Zoogloea** ($3,1 \pm 3,4$ und $0,8 \pm 0,8$ %) und *Bacteroidetes** ($6,2 \pm 4,1$ und $1,3 \pm 1,8$ %), welche eine höhere relative Abundanz als in den anderen Versuchen aufwiesen (u.a. *Pseudomonas**: Zyklusdauer 1: $2,8 \pm 5,2$ %; Zyklusdauer 2: $1,4 \pm 1,2$ %; Raumbelastung 1: $0,4 \pm 0,6$ %; Raumbelastung 2: $1,4 \pm 2,1$ %). Lediglich die Gruppe *Bacteroidetes* besaß auch eine hohe relative Abundanz im Experiment mit der zweiten Zyklusdauer ($3,4 \pm 3,8$ %). Im Versuch mit dem Schlammalter 2 war die Gattung *Nannocystis* ($1,8 \pm 3,7$ %) zudem häufiger als in den anderen Selektionen (Schlammalter 1: $0,6 \pm 1,8$ %; Zyklusdauer 1: $0,01 \pm 0,02$ %; Zyklusdauer 2: $0,0 \pm 0,0$ %; Raumbelastung 1: $0,01 \pm 0,01$ %; Raumbelastung 2: $0,01 \pm 0,02$ %). *Prostheco bacter* und die Gruppe *Verrucomicrobiaceae* waren in den Versuchen mit unterschiedlichem Schlammalter (Schlammalter 1: $0,8 \pm 0,8$ und $0,9 \pm 1,1$ %; Schlammalter 2: $0,9 \pm 1,5$ und $0,6 \pm 0,7$ %) und unterschiedlicher Zyklusdauer (Zyklusdauer 1: $2,3 \pm 4,3$ und $1,9 \pm 2,9$ %; Zyklusdauer 2: $1,8 \pm 2,3$ und $1,4 \pm 2,6$ %) in ihrer relativen Abundanz höher als in den Versuchen mit den höheren Raumbelastungen (Raumbelastung 1: $0,0 \pm 0,0$ und $0,003 \pm 0,005$ %; $0,004 \pm 0,009$ und $0,002 \pm 0,007$ %).

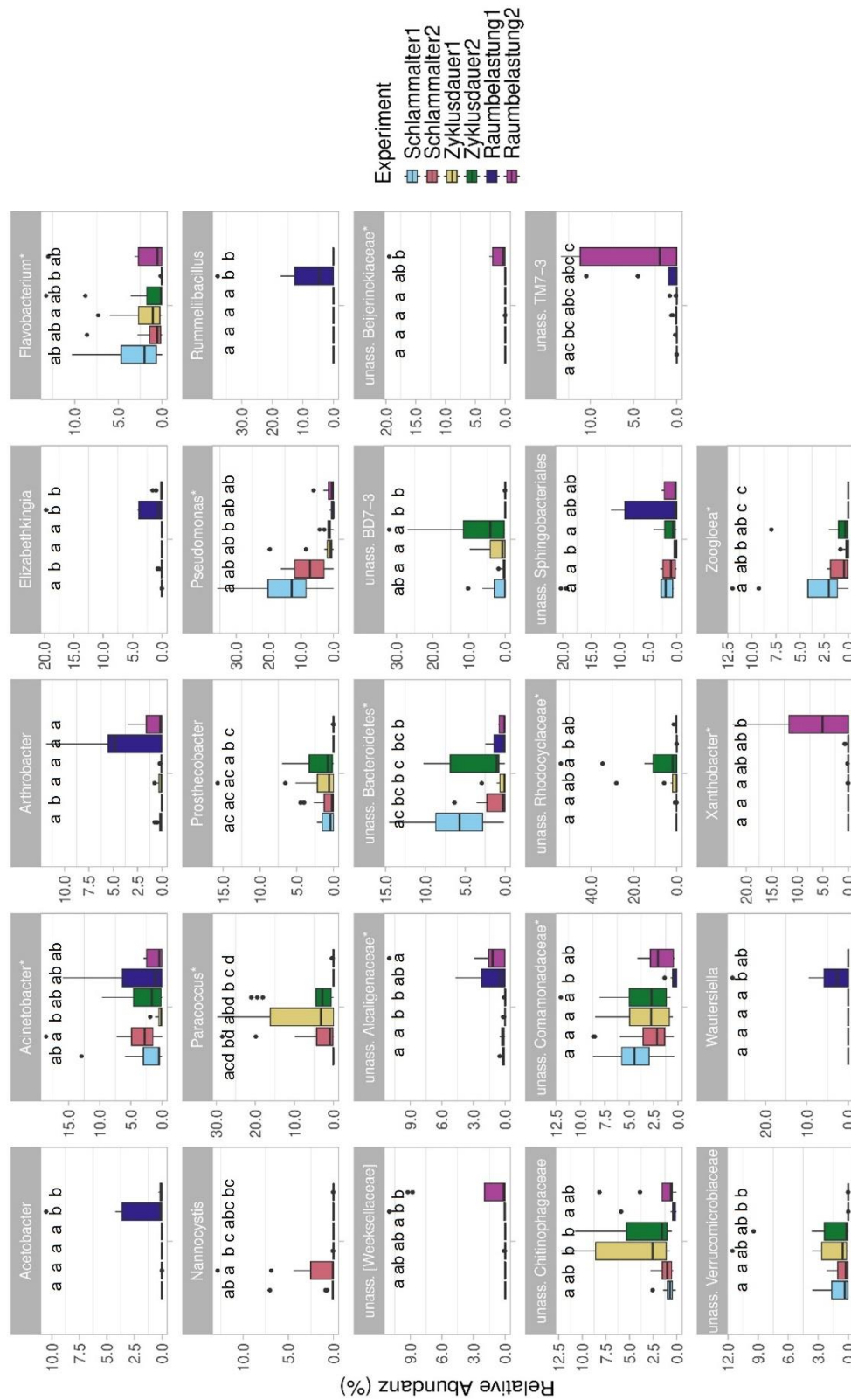


Abbildung 34: Taxonomische Unterschiede zwischen Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Parametern. Raumbelastung 1: 10 g/(L*d). Raumbelastung 2: 6 g/(L*d). Schlammalter 1: 2 d. Schlammalter 2: 4 d. Zyklusdauer 1: 24 h. Zyklusdauer 2: 6 h. Es sind nur Gattungen mit signifikantem Ergebnis ($p > 0,05$) und einer relativen Abundanz von über 0,1 % dargestellt. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbarsten Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert. Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis- und anschließend dem gepaarten Wilcoxon-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede sind mit Buchstaben dargestellt.

Indikatoranalysen

Bei Betrachtung der Indikatoranalysen wurden, wie auch schon zuvor beobachtet, die Gattungen *Wautersiella* und *Rummeliibacillus* u.a. als charakteristische Organismen für den Selektionsversuch mit der Raumbelastung 1 festgestellt, wohingegen *Paludibacter*, *Xanthobacter** und die nicht näher bestimmte Gruppe Beijerinckiaceae* Indikatoren für den Versuch mit der Raumbelastung 2 darstellten (Tabelle 13). Für beide Versuche waren unter anderem *Acetobacter* und *Lactobacillus* und die Familie Flavobacteriaceae* Indikatororganismen. Wichtige Indikatoren mit einem IndVal-Wert von über 0,8 für die einzelnen Systeme der anderen Selektionsversuche gab es kaum und es waren Taxa mit nur geringer relativer Abundanz in den Versuchen insgesamt. Diese waren *Rheinheimeria*, *Exiguobacterium* und die Familie der Aeromonadaceae* im Versuch mit dem ersten Schlammalter und die nicht näher bestimmte Gruppe OD1 im Versuch mit dem zweiten Schlammalter. Für beide Versuche charakteristisch waren unter anderem der potenzielle PHA-Produzent *Dechloromonas** sowie die Gattungen *Gisbergia* und *Nannocystis*. Die potenziellen PHA-Produzenten *Zoogloea** und *Rubrivivax** waren Indikatoren für die Selektionsversuche mit den beiden unterschiedlichen Schlammaltern und der kürzeren Zyklusdauer von 6 h (Zyklusdauer 2). Die Gattung *Paracoccus** hingegen war ein Indikator für die beiden Zyklusdauerversuche sowie das höhere Schlammalter von 4 d (Schlammalter 2). Vertreter der Gruppen BD7-3, und Verrucomicrobiaceae sowie der Taxa Hyphomonadaceae*, Rhizobiaceae*, *Thiothrix**, *Thauera**, *Pedomicrobium** und *Rhodobacter** waren Indikatoren für die Selektionsversuche mit unterschiedlichem Schlammalter und unterschiedlicher Zyklusdauer, allerdings nicht für die beiden Versuche mit unterschiedlicher Raumbelastung. Die beiden potenziellen PHA-Produzenten *Stenotrophomonas** und *Sphingobium** zeigten ein Vorkommen in allen Selektionen außer im Versuch mit der Zyklusdauer 2. Vertreter der Gruppen Caulobacteraceae*, Rhizobiales*, Rhodocyclaceae*, Burkholderiales* sowie *Hydrogenophaga** und *Flavobacterium** u.a. waren Indikatoren für alle Selektionsversuche außer den Versuch mit der höchsten Raumbelastung von 10 g/(L*d) (Raumbelastung 1).

Taxa mit einem Vorkommen in allen Versuchen, für die ein Status als Indikator für alle Selektionsversuche ermittelt wurde, sind in Tabelle 14 aufgeführt. Für diese konnte aufgrund des Vorkommens in allen Gruppen keine Signifikanz nachgewiesen werden. Hierzu zählten unter anderem potenzielle PHA-Produzenten aus den Familien Comamonadaceae*, Xanthomonadaceae*, Rhodospirillaceae*, Hyphomicrobiaceae*, Rhodobacteraceae* sowie aus den Gattungen *Clostridium**, *Acinetobacter**, *Comamonas**, *Hyphomicrobium** und *Bradyrhizobium**. Taxa ohne die Fähigkeit zur PHA-Produktion, die

Indikatoren für alle Versuche waren, waren unter anderem Vertreter der Gruppen Chitinophagaceae, Saprospiraceae, Shingobacteriales und Gemmataceae sowie der Gattungen *Streptococcus*, *Planctomyces*, *Methanobacterium* und *Caldilinea*. Eine Auflistung aller Ergebnisse der Indikatoranalysen findet sich in Anhang 37.

Tabelle 13: Indikatororganismen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern mit signifikanter Zuordnung zu einzelnen Versuchen. RB1: Raumbelastung 1 (10 g/(L*d)). RB2: Raumbelastung 2 (6 g/(L*d)). SA1: Schlammalter 1 (2 d). SA2: Schlammalter 2 (4 d). ZD1: Zyklusdauer 1 (24 h). ZD2: Zyklusdauer 2 (6 h). Indikatororganismen wurden anhand des IndVal-Indexes ermittelt. Aufgeführt sind Taxa mit einem IndVal-Wert von > 0,8 und signifikanter Teststatistik ($p \geq 0,05$). Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert. Der Wert 1 bzw. 0 gibt an, ob das Taxon als Indikator gewertet wurde oder nicht. Unass. = unassigned. Die Tabelle wird auf den nächsten Seiten fortgesetzt.

Gattung	RB1	RB2	SA1	SA2	ZD1	ZD2	Stat
<i>Coprococcus</i>	1	0	0	0	0	0	0,816
<i>Wautersiella</i>	1	0	0	0	0	0	0,816
<i>Rummeliibacillus</i>	1	0	0	0	0	0	0,814
<i>Lysinibacillus</i>	1	0	0	0	0	0	0,800
<i>Paludibacter</i>	0	1	0	0	0	0	0,849
unass. Beijerinckiaceae*	0	1	0	0	0	0	0,816
<i>Xanthobacter</i> *	0	1	0	0	0	0	0,807
<i>Rheinheimera</i>	0	0	1	0	0	0	0,854
<i>Exiguobacterium</i> *	0	0	1	0	0	0	0,841
unass. Aeromonadaceae*	0	0	1	0	0	0	0,838
unass. OD1	0	0	0	1	0	0	0,921
<i>Mitsuokella</i>	1	1	0	0	0	0	0,935
<i>Lactobacillus</i>	1	1	0	0	0	0	0,817
<i>Acetobacter</i>	1	1	0	0	0	0	0,816
unass. Flavobacteriaceae*	1	1	0	0	0	0	0,810
vadinHB04	1	1	0	0	0	0	0,810
unass. ABY1	0	1	0	1	0	0	0,818
<i>Methylibium</i>	0	0	1	1	0	0	0,929
unass. Phycisphaerales	0	0	1	1	0	0	0,924
<i>Giesbergeria</i>	0	0	1	1	0	0	0,870
<i>Dechloromonas</i> *	0	0	1	1	0	0	0,861
<i>Nannocystis</i>	0	0	1	1	0	0	0,851
unass. Sinobacteraceae	0	0	1	1	0	0	0,841
unass. CL500-15	0	0	1	1	0	0	0,827
<i>Thermomonas</i> *	0	0	0	0	1	1	0,944
<i>Arthrobacter</i>	1	1	1	0	0	0	0,836
<i>Corynebacterium</i> *	1	1	1	0	0	0	0,805
unass. Enterobacteriaceae*	1	1	0	1	0	0	0,840

Tabelle 13: fortgesetzt.

Gattung	RB1	RB2	SA1	SA2	ZD1	ZD2	Stat
<i>Elizabethkingia</i>	1	1	0	1	0	0	0,816
<i>Enterococcus</i>	1	1	0	1	0	0	0,808
unass. TM7-3	1	1	0	0	1	0	0,865
unass. Planococcaceae*	1	1	0	0	0	1	0,800
unass. pLW-97	1	0	1	1	0	0	0,862
<i>Bifidobacterium</i>	0	1	1	1	0	0	0,878
E6	0	1	1	0	1	0	0,839
<i>Pedobacter</i>	0	1	0	0	1	1	0,808
<i>Novosphingobium</i> *	0	0	1	1	1	0	0,930
<i>Zoogloea</i> *	0	0	1	1	0	1	0,905
unass. auto67_4W	0	0	1	1	0	1	0,859
<i>Rubrivivax</i> *	0	0	1	1	0	1	0,826
unass. Clostridiaceae*	0	0	0	1	1	1	0,896
<i>Paracoccus</i> *	0	0	0	1	1	1	0,879
unass. Alcaligenaceae*	1	1	1	1	0	0	0,952
unass. B97	1	1	1	1	0	0	0,852
<i>Desulfovibrio</i> *	1	1	1	0	1	0	0,874
<i>Prevotella</i>	1	1	1	0	0	1	0,929
<i>Veillonella</i>	1	1	0	0	1	1	0,921
<i>Megasphaera</i>	1	1	0	0	1	1	0,888
unass. Lachnospiraceae	1	1	0	0	1	1	0,842
<i>Lactococcus</i>	1	1	0	0	1	1	0,816
<i>Gemmata</i>	1	0	1	1	1	0	0,899
unass. Christensenellaceae	0	1	1	1	1	0	0,878
unass. Cytophagaceae	0	1	0	1	1	1	0,938
unass. Cryomorphaceae	0	1	0	1	1	1	0,932
unass. Verrucomicrobiaceae	0	0	1	1	1	1	0,991
unass. Hyphomonadaceae	0	0	1	1	1	1	0,941
unass. BD7-3	0	0	1	1	1	1	0,922
<i>Thiothrix</i> *	0	0	1	1	1	1	0,921
<i>Thauera</i> *	0	0	1	1	1	1	0,903
unass. Rhizobiaceae*	0	0	1	1	1	1	0,901
unass. WPS-2	0	0	1	1	1	1	0,869
<i>Pedomicrobium</i> *	0	0	1	1	1	1	0,846
<i>Prosthecobacter</i>	0	0	1	1	1	1	0,846
<i>Rhodobacter</i> *	0	0	1	1	1	1	0,820
unass. Acidimicrobiales	0	0	1	1	1	1	0,818
<i>Dyadobacter</i>	0	0	1	1	1	1	0,806

Tabelle 13: fortgesetzt.

Gattung	RB1	RB2	SA1	SA2	ZD1	ZD2	Stat
unass. GCA004	1	1	1	1	1	0	0,882
C1_B004	1	1	1	1	1	0	0,879
<i>Sphingobium</i> *	1	1	1	1	1	0	0,862
<i>Stenotrophomonas</i> *	1	1	1	1	1	0	0,842
unass. SJA-28	1	1	1	1	0	1	0,901
<i>Kosmotoga</i>	1	1	1	0	1	1	0,953
unass. Veillonellaceae	1	1	1	0	1	1	0,927
unass. Bacteriovoracaceae	1	1	1	0	1	1	0,925
unass. Microbacteriaceae*	1	1	0	1	1	1	0,902
unass. Rickettsiales*	1	0	1	1	1	1	0,904
<i>Bdellovibrio</i>	0	1	1	1	1	1	0,990
unass. Caulobacteraceae*	0	1	1	1	1	1	0,990
unass. Rhizobiales*	0	1	1	1	1	1	0,981
unass. Alphaproteobacteria*	0	1	1	1	1	1	0,976
unass. Phyllobacteriaceae*	0	1	1	1	1	1	0,968
unass. Sphingomonadaceae*	0	1	1	1	1	1	0,958
unass. Rhodocyclaceae*	0	1	1	1	1	1	0,955
<i>Hydrogenophaga</i> *	0	1	1	1	1	1	0,950
unass. Burkholderiales*	0	1	1	1	1	1	0,943
<i>Flavobacterium</i> *	0	1	1	1	1	1	0,915
unass. Peptostreptococcaceae	0	1	1	1	1	1	0,902
unass. TM7	0	1	1	1	1	1	0,856
unass. Methanobacteriaceae	0	1	1	1	1	1	0,802

Tabelle 14: Indikatororganismen aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern ohne signifikante Zuordnung zu einzelnen Versuchen. RB1: Raumbelastung 1 (10 g/(L*d)). RB2: Raumbelastung 2 (6 g/(L*d)). SA1: Schlammalter 1 (2 d). SA2: Schlammalter 2 (4 d). ZD1: Zyklusdauer 1 (24 h). ZD2: Zyklusdauer 2 (6 h). Indikatororganismen wurden anhand des IndVal-Indexes ermittelt. Aufgeführt sind Taxa mit einem IndVal-Wert von > 0,8 und Vorkommen in allen Selektionsversuchen. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert. Der Wert 1 bzw. 0 gibt an, ob das Taxon als Indikator gewertet wurde oder nicht. Unass. = unassigned.

Gattung	RB1	RB2	SA1	SA2	ZD1	ZD2	Stat
unass. Comamonadaceae*	1	1	1	1	1	1	1
unass. Chitinophagaceae	1	1	1	1	1	1	1
<i>Streptococcus</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Methanobacterium</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Clostridium</i> *	1	1	1	1	1	1	1
<i>Methanosaeta</i>	1	1	1	1	1	1	1
T78	1	1	1	1	1	1	0,987
unass. Porphyromonadaceae	1	1	1	1	1	1	0,987
unass. SHA-1	1	1	1	1	1	1	0,987
<i>Planctomyces</i>	1	1	1	1	1	1	0,981
unass. Bacteroidetes*	1	1	1	1	1	1	0,981
unass. Saprospiraceae	1	1	1	1	1	1	0,981
unass. Pirellulaceae	1	1	1	1	1	1	0,981
<i>Syntrophobacter</i>	1	1	1	1	1	1	0,981
unass. Xanthomonadaceae*	1	1	1	1	1	1	0,981
unass. Clostridiales*	1	1	1	1	1	1	0,981
unass. Bacteria	1	1	1	1	1	1	0,981
<i>Caldilinea</i>	1	1	1	1	1	1	0,974
unass. Betaproteobacteria*	1	1	1	1	1	1	0,974
unass. Bacteroidales	1	1	1	1	1	1	0,974
unass. Ellin6075	1	1	1	1	1	1	0,967
unass. Sphingobacteriales	1	1	1	1	1	1	0,961
unass. [Mogibacteriaceae]	1	1	1	1	1	1	0,961
unass. Rhodospirillaceae*	1	1	1	1	1	1	0,954
unass. SHA-20	1	1	1	1	1	1	0,947
unass. Caldilineaceae	1	1	1	1	1	1	0,934
unass. Brachyspiraceae	1	1	1	1	1	1	0,934
unass. Anaerolinaceae	1	1	1	1	1	1	0,920
unass. JG30-KF-CM45	1	1	1	1	1	1	0,920
unass. Hyphomicrobiaceae*	1	1	1	1	1	1	0,913
unass. TM7-1	1	1	1	1	1	1	0,913
unass. Microthrixaceae	1	1	1	1	1	1	0,913
unass. OPB56	1	1	1	1	1	1	0,913
unass. A4b	1	1	1	1	1	1	0,906

Tabelle 14: fortgesetzt.

Gattung	RB1	RB2	SA1	SA2	ZD1	ZD2	Stat
unass. S0208	1	1	1	1	1	1	0,906
<i>Acinetobacter</i> *	1	1	1	1	1	1	0,899
unass. HOC36	1	1	1	1	1	1	0,899
unass. Rhodobacteraceae*	1	1	1	1	1	1	0,899
unass. Gemmataceae	1	1	1	1	1	1	0,892
<i>Comamonas</i> *	1	1	1	1	1	1	0,870
unass. [Saprospirales]	1	1	1	1	1	1	0,870
unass. Ignavibacteriaceae	1	1	1	1	1	1	0,870
<i>Hyphomicrobium</i> *	1	1	1	1	1	1	0,855
unass. Anaerolineae	1	1	1	1	1	1	0,855
unass. Ruminococcaceae	1	1	1	1	1	1	0,855
unass. Deltaproteobacteria*	1	1	1	1	1	1	0,847
unass. ML635J-21	1	1	1	1	1	1	0,840
<i>Nitrospira</i>	1	1	1	1	1	1	0,832
unass. Isosphaeraceae	1	1	1	1	1	1	0,832
unass. RB40	1	1	1	1	1	1	0,824
<i>Bradyrhizobium</i> *	1	1	1	1	1	1	0,824
<i>Bacteroides</i>	1	1	1	1	1	1	0,816
unass. Gammaproteobacteria*	1	1	1	1	1	1	0,801

3.2 Langzeit-Selektion

Im nachfolgend beschriebenen Versuch wurde eine Langzeit-Selektion unter Verwendung von realem Substrat, in diesem Fall versäuertes Brauereiabwasser, durchgeführt. Dabei wurden insbesondere die Schwankungen im verwendeten Substrat und deren Auswirkungen auf die Biozönose und die PHA-Produktion untersucht. Des Weiteren sollte die Stabilität dieser Faktoren über einen längeren Zeitraum analysiert werden. Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche (Kapitel 3.1.1 bis 3.1.3) wurden als Parameter für die Selektion das Inokulum der Brauerei, ein Schlammalter von 4 d und eine Zyklusdauer von 6 h ausgewählt.

Sequenzdaten

Die minimale Anzahl an Sequenzen, welche in den Proben der Langzeit-Selektion gefunden werden konnte, lag bei 17.361 (Anhang 26). Auf diese wurden alle Proben zur weiteren Analyse der Biozönose normalisiert.

Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten

Der Verlauf der PHA-Produktion zeigte, wie zuvor schon beobachtet (vgl. Kapitel 3.1.1 bis 3.1.3), einen rapiden Anstieg von Tag 0 bis Tag 7 von 8,1 ($\pm 1,1$) auf 24,8 ($\pm 2,6$) %oTS und stieg bis Tag 35 weiter auf 34,1 ($\pm 10,1$) %oTS an (Abbildung 35). Eine annähernde Sättigung, wie teils in anderen Versuchen beobachtet (vgl. Kapitel 3.1.1), konnte hier nicht festgestellt werden, da der produzierte PHA-Gehalt bis an Tag 56 weiter auf 48,3 ($\pm 9,9$) %oTS anstieg. Der Störfall vor Tag 35 (Kapitel 2.2) zeigte sich möglicherweise in einem leichten Einbruch des PHA-Gehaltes an Tag 42 ($30,7 \pm 17,4$ %oTS), dieser war jedoch nicht signifikant (Dunn-Test: $Z = 0,27$, $p = 1$). Nach dem Substratwechsel mit einer etwa halb so hohen Raumbelastung war der PHA-Gehalt an Versuchstag 63 um mehr als die Hälfte abgesunken ($23,1 \pm 15,1$ %oTS). Nach einem leichten Anstieg an Tag 70 ($27,7 \pm 9,9$ %oTS) war erneut ein Einbruch an Tag 77 ($13,9 \pm 7,7$ %oTS) zu verzeichnen. Jedoch muss hier erwähnt werden, dass es vor der Probenahme an Tag 77 zu einem Dosierfehler kam (vgl. Kapitel 2.2). Nach diesem Tag stieg der produzierte PHA-Gehalt jedoch erneut und war mit 35,4 ($\pm 6,2$) %oTS an Tag 84 bzw. 31,0 ($\pm 12,2$) %oTS an Tag 91 auf einem vergleichbaren Niveau wie nach 42-49 Tagen der Selektion mit dem ersten Substrat. Es wurden signifikante Unterschiede im PHA-Gehalt zwischen den Tagen 0 und 49 sowie 0 und 56 festgestellt (Kruskal-Wallis-Test: $\chi^2 = 24,75$, $DF = 13$, $p = 0,025$; Dunn-Test: $Z = -3,36$, $p = 0,035$; $Z = -3,49$, $p = 0,041$; $Z = -3,54$, $p = 0,022$). Des Weiteren konnte kein

signifikanter Unterschied im PHA-Gehalt zwischen den beiden Substraten gefunden werden (Kruskal-Wallis-Test: $\chi^2 = 0,82$, DF = 1, $p = 0,37$).

Bis zu Versuchstag 49 verhielt sich die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten im System ähnlich wie der PHA-Gehalt und stieg von $9,9 (\pm 0,5)$ auf $69,0 (\pm 13,4)$ % an (Abbildung 35). Der Einbruch, wie in der PHA-Produktion an Tag 63 beobachtet, war hier bereits an Tag 56 ($55,6 \pm 4,8$ %) festzustellen, obwohl der Substratwechsel erst später erfolgte. Danach war ebenfalls ein Anstieg bis Tag 70 auf $69,3 (\pm 7,1)$ % erkennbar, jedoch sank der Anteil potenzieller PHA-Produzenten daraufhin kontinuierlich bis Versuchstag 91 ($52,9 \pm 7,0$ %). Er lag zu diesem Zeitpunkt ebenfalls in einem vergleichbaren Bereich wie an den Tagen 42 und 49. Zwischen den Versuchstagen war kein signifikanter Unterschied im Anteil potenzieller PHA-Produzenten zu verzeichnen (Kruskal-Wallis-Test: $\chi^2 = 20,43$, DF = 13, $p = 0,085$). Der Wechsel des Substrates war in einem signifikanten Unterschied im Anteil potenzieller PHA-Produzenten erkennbar (Kruskal-Wallis-Test: $\chi^2 = 4,633$, DF = 1, $p = 0,031$). Die beiden Faktoren PHA-Gehalt und Anteil potenzieller PHA-Produzenten wiesen einen statistisch signifikanten Zusammenhang auf (LM: $F = 3,02$, $p = 0,004$).

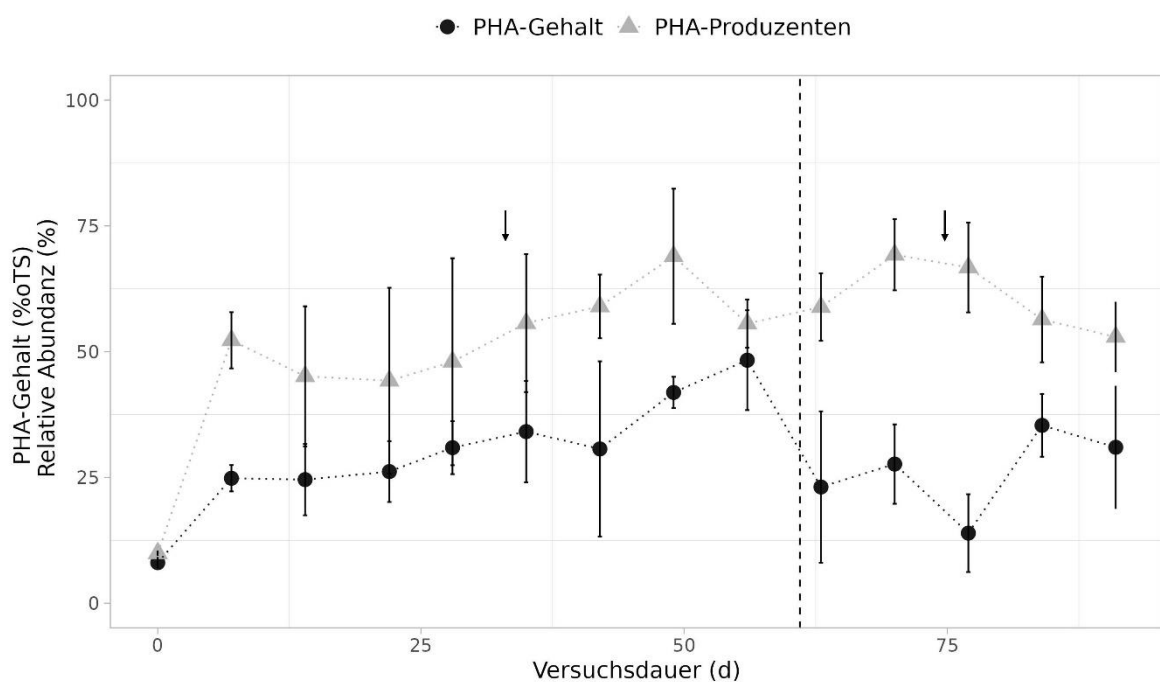


Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der PHA-Produktion und der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in einem Langzeit-Selektionsversuch. Die gestrichelte Linie markiert einen Wechsel des Substrates, resultierend in unterschiedlichen Raumbelastungen ($1,21$ und $0,45$ $\text{g}/(\text{L}\cdot\text{d})$). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Eine Verbindung der Punkte mittels gepunkteter Linie dient als optische Unterstützung zur Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufs. Die Pfeile kennzeichnen Zeitpunkte, an denen es zu Betriebsfehlern kam (T31: Stromausfall, T76: Dosierfehler des Substrates).

Die Zusammensetzung des während des Langzeitversuches produzierten PHA wich zu Beginn der Selektion mit einem HB-Anteil von $57,8 (\pm 11,4) \%$ an Tag 0 und $79,2 (\pm 20,8) \%$ an Tag 7 erheblich von der theoretischen Zusammensetzung von $70,6:29,4 \%$ HB:HV ab, jedoch entsprach sie ab Tag 22 ($70,8 \pm 6,4 \%$) bis hin zu Tag 56 ($68,3 \pm 5,1 \%$) nahezu genau dem theoretischen Wert (Abbildung 36). Nach dem Substratwechsel lag die Zusammensetzung des PHAs allerdings an Tag 63 mit $69,8:30,2 (\pm 6,6) \%$ HB:HV immer noch in einem vergleichbaren Bereich zu den vorherigen Versuchstagen. Der HV-Anteil sank bis Tag 70 zwar ab ($23,9 \pm 1,6 \%$) und blieb auf einem ähnlichen Niveau bis Tag 91 ($24,8 \pm 3,7 \%$), jedoch lag dieser über dem theoretischen Wert, der durch den Substratwechsel zu erwarten gewesen wäre ($83,8:16,2 \%$ HB:HV). Das Substrat zu diesem Zeitpunkt wies einen höheren Anteil von flüchtigen Fettsäuren mit gerader Anzahl an Kohlenstoff-Atomen auf, sodass mit einem höheren Anteil an HB zu rechnen war (s. Kapitel 2.1). Der Versuchszeitpunkt hatte einen signifikanten Einfluss auf den HB-Anteil (Kruskal-Wallis-Test: $\chi^2 = 27,04$, $DF = 13$, $p = 0,012$). Dieser wies einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Tagen 0 und 7 auf (Dunn-Test: $Z = -3,59$, $p = 0,015$). Auch der Substratwechsel beeinflusste die PHA-Zusammensetzung in signifikanter Weise (Kruskal-Wallis-Test: $\chi^2 = 6,15$, $DF = 1$, $p = 0,013$).

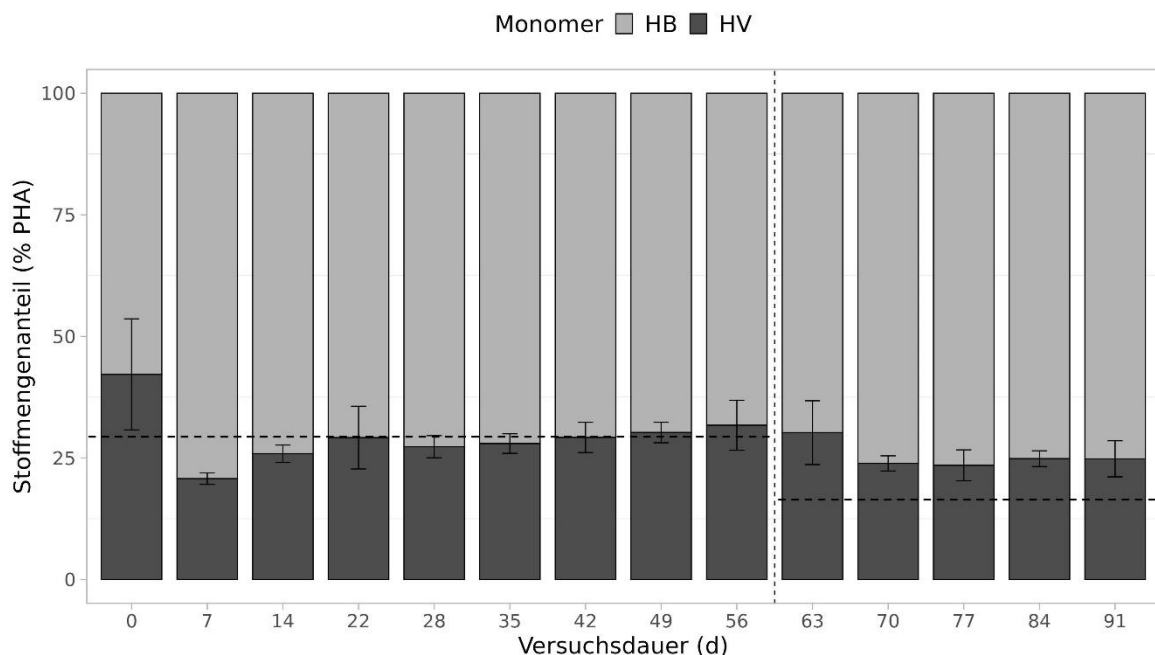


Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der PHA-Zusammensetzung in einem Langzeit-Selektionsversuch. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt mit zugehöriger Standardabweichung. Die gestrichelte vertikale Linie markiert den Wechsel des Substrates, resultierend in unterschiedlichen Raumbelastungen ($1,21$ und $0,45 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{d})$). Die gestrichelten horizontalen Linien markieren die aufgrund der Substratzusammensetzung berechnete theoretische PHA-Zusammensetzung.

Alpha-Diversität der mikrobiellen Mischbiozönose

Der Reichtum an ASVs zeigte über den Verlauf der Langzeit-Selektion eine Abnahme von 613,3 ($\pm 48,0$) an Tag 0 auf 338,7 ($\pm 112,3$) an Tag 28 bzw., nach kurzzeitigem erneutem Anstieg bis Tag 42 (432,0 $\pm 101,1$), auf 371,3 ($\pm 171,0$) an Tag 49 und eine erneute tendenzielle Zunahme bis Tag 77 (496,0 $\pm 123,2$) (Abbildung 37). Bis Tag 91 blieb der Reichtum an ASVs auf einem vergleichbaren Niveau (442,7 $\pm 111,2$). Für die anderen Diversitätsparameter war ebenfalls die Tendenz zu einer Abnahme bis Tag 49 zu beobachten (Evenness: von 0,75 $\pm 0,007$ auf 0,63 $\pm 0,16$; Shannon: von 4,82 $\pm 0,11$ auf 3,74 $\pm 1,19$; Simpson: von 0,97 $\pm 0,002$ auf 0,87 $\pm 0,16$), gefolgt von einer Zunahme bis Tag 91 (Evenness: 0,75 $\pm 0,02$; Shannon: 4,54 $\pm 0,15$; Simpson: 0,97 $\pm 0,01$). Insgesamt lag der Wert der Indizes, mit Ausnahme des ASV-Reichtums, am Ende bei einem vergleichbaren Wert zum Start der Selektion. Zur Versuchsmittle hin stieg die Abweichung zwischen den drei Versuchsreaktoren und sank bis Tag 91 erneut ab. Daher wiesen die Diversitätsindizes keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchszeitpunkten der Langzeitselektion auf (Tabelle 15). Die Einzelwerte der Alpha-Diversitätsindizes sind in Anhang 32 zu finden.

Tabelle 15: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests der Alpha-Diversitätsindizes zwischen verschiedenen Zeitpunkten über einen Langzeit-Selektionsversuch. χ^2 : Teststatistik; DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); p: Signifikanzwert.

Index	χ^2	DF	p
ASV-Reichtum	15,90	13	0,255
Evenness (E)	5,95	13	0,948
Shannon-Index (H')	8,84	13	0,785
Simpson-Index (D)	3,97	13	0,992

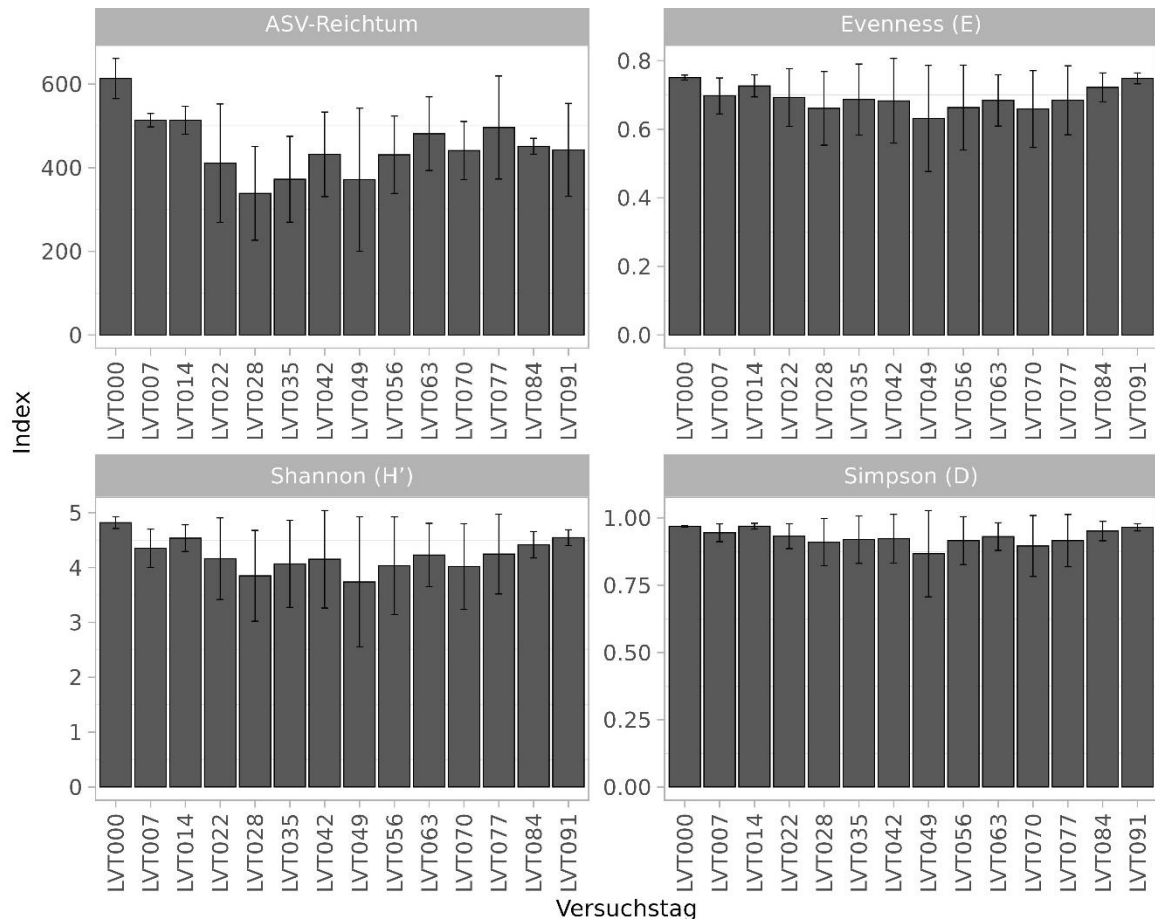


Abbildung 37: Alpha-Diversitätsindizes der Mischbiozönose während eines Langzeit-Selektionsversuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (LVT = Tag des Langzeitversuches) mit zugehöriger Standardabweichung.

Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose

Während der ersten vier Wochen des Langzeitversuches änderte sich die taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose in den Selektionsreaktoren stetig und war zu jedem wöchentlichen Probenahmezeitpunkt unterschiedlich (Abbildung 38). Die dominantesten Organismen im Inokulum zu Beginn der Selektion gehörten zu den Gattungen *Calidinea* ($5,2 \pm 0,4$ %) und *Planctomyces* ($2,6 \pm 0,5$ %) und den Gruppen HOC36 ($3,2 \pm 0,3$ %), Pirellulaceae ($4,7 \pm 0,4$ %), SJA-28 ($4,9 \pm 0,6$ %) sowie Sphingobacteriales ($14,5 \pm 0,5$ %). Neben diesen Taxa, welche teils eine Abnahme aufwiesen (*Calidinea*: $3,0 \pm 0,4$ %; *Planctomyces*: $2,6 \pm 1,1$ %; HOC36: $0,3 \pm 0,2$ %; Pirellulaceae: $2,3 \pm 1,2$ %; Sphingobacteriales: $6,9 \pm 3,0$ %), zählten an Tag 7 die potenziellen PHA-Produzenten *Hydrogenophaga** ($5,4 \pm 2,5$ %) und *Zoogloea** ($23,8 \pm 8,0$ %) sowie die Familie der Comamonadaceae* ($6,2 \pm 5,4$ %) zu den Taxa mit der höchsten relativen Abundanz.

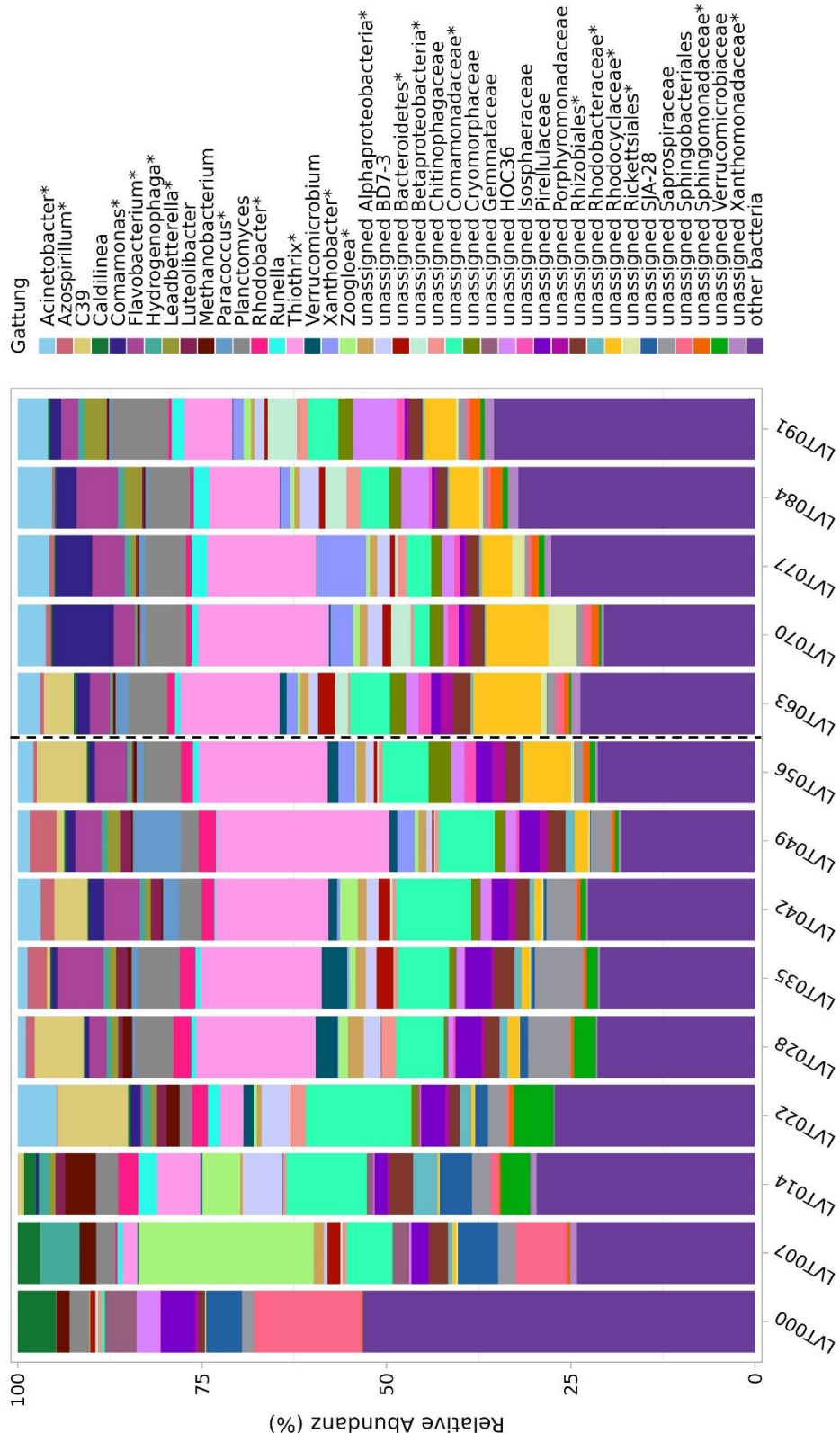


Abbildung 38: Taxonomische Zusammensetzung der Mischbiozönose während der Selektion innerhalb eines Langzeitversuches mit Substratwechseln. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (LVT = Tag des Langzeitversuches). Die gestrichelte Linie markiert einen Wechsel des Substrates. Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbarsten Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

An Tag 14 waren unter anderem die Gattungen *Methanobacterium* ($4,1 \pm 1,7$ %), *Thiothrix** ($5,9 \pm 4,8$), *Zoogloea** ($5,1 \pm 5,8$ %) sowie die nicht auf Gattungsebene bestimmten Taxa BD7-3 ($5,5 \pm 5,3$ %), Comamonadaceae* ($10,9 \pm 8,0$ %), Rhizobiales* ($3,3 \pm 1,5$ %), Rhodobacteraceae* ($3,3 \pm 2,1$ %) und Verrucomicrobiaceae ($4,0 \pm 3,3$ %) die Gruppen mit der höchsten relativen Abundanz. *Thiothrix** ($3,1 \pm 2,9$ %), BD7-3 ($3,8 \pm 2,6$ %), Comamonadaceae* ($14,3 \pm 19,7$ %) und Verrucomicrobiaceae ($5,4 \pm 2,4$ %) waren am Tag 22 der Selektion ebenfalls unter den abundantesten Taxa, jedoch zählten auch die Gattungen *Acinetobacter** ($5,3 \pm 2,1$ %) und C39 ($9,6 \pm 16,7$ %) dazu. Ab Tag 28 dominierten *Thiothrix** ($16,2 \pm 21,8$ %) und die Familie der Comamonadaceae* ($6,5 \pm 8,2$ %), daneben waren die Gattungen *Planctomyces* ($5,2 \pm 1,3$ %), C39 ($6,7 \pm 10,0$ %), *Flavobacterium** ($2,4 \pm 3,6$ %), *Rhodobacter** ($2,4 \pm 2,1$ %) und *Verrucomicrobium* ($3,0 \pm 2,0$ %) sowie die Familien Pirellulaceae ($3,5 \pm 1,7$ %) und Saprospiraceae ($5,7 \pm 6,4$ %) relativ häufig vertreten. Bis Tag 49 blieben die meisten dieser Gruppen unter den Taxa mit der höchsten relativen Abundanz, jedoch verzeichneten die Gattungen *Azospirillum** ($3,6 \pm 6,2$ %), *Paracoccus** ($6,5 \pm 11,1$ %) und *Xanthobacter** ($2,4 \pm 4,0$ %) ebenfalls eine Zunahme. Die drei letztgenannten zeigten bis Tag 63 eine Abnahme in der relativen Abundanz (*Azospirillum**: $0,5 \pm 0,9$ %; *Paracoccus**: $1,8 \pm 3,0$ %; *Xanthobacter**: $1,5 \pm 2,2$ %), wohingegen die Gattung *Planctomyces* ($5,3 \pm 2,6$ %) und die Familie der Rhodocyclaceae* ($9,2 \pm 12,5$ %) eine Zunahme aufwiesen. Ab Tag 70 zählten zu den Organismen mit der höchsten relativen Abundanz die Gattungen *Acinetobacter** ($3,8 \pm 4,1$ %), *Comamonas** ($8,3 \pm 3,6$ %), *Flavobacterium** ($2,9 \pm 3,5$ %), *Planctomyces* ($5,5 \pm 1,4$ %), *Thiothrix** ($17,7 \pm 26,0$ %), *Xanthobacter** ($3,0 \pm 2,6$ %) sowie die nicht auf Gattungsebene bestimmten Gruppen Betaproteobacteria* ($2,7 \pm 0,2$ %), Comamonadaceae* ($2,1 \pm 0,7$ %), Cryomorpaceae ($1,9 \pm 1,5$ %) und Rhodocyclaceae* ($8,5 \pm 9,4$ %). Die meisten dieser herrschten bis Tag 91 vor, wobei *Comamonas** ($1,5 \pm 0,5$ %), *Flavobacterium** ($2,3 \pm 2,1$ %), *Xanthobacter** ($1,4 \pm 1,9$ %) und die Familie der Rhodocyclaceae* ($4,2 \pm 3,8$ %) bis zu diesem Zeitpunkt eine leichte Abnahme ihrer relativen Abundanz aufwiesen und *Leadbetterella** ($3,0 \pm 4,4$ %) sowie die Gruppe HOC36 ($5,9 \pm 8,6$ %) zunahmen.

Zu den über den gesamten Versuchszeitraum häufigsten Organismen mit dem Potenzial zur PHA-Produktion zählten die Gattungen *Thiothrix**, *Flavobacterium**, *Acinetobacter**, *Zoogloea** und *Comamonas** sowie die Gruppen Comamonadaceae*, Rhodocyclaceae* und Rhizobiales*. Taxa ohne diese Fähigkeit mit der höchsten relativen Abundanz waren *Planctomyces*, Saprospiraceae, Sphingobacteriales, Pirellulaceae, BD7-3, HOC36 (vgl. Anhang 33).

Die Fluktuationen der dominantesten Organismen, insbesondere der Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion, spiegelt sich ebenfalls in Abbildung 39 sowie den Schwankungen der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten insgesamt in Abbildung 35 wider. Es zeigte sich zudem einen Wechsel der dominanten potenziellen PHA-Produzenten über den Selektionsverlauf (Abbildung 39). So nahm beispielsweise die Gattung *Flavobacterium** zunächst bis Tag 35 zu, dann bis Tag 70 ab und zeigte daraufhin eine erneute Zunahme. Dafür zeigten andere potenzielle PHA-Produzenten wie *Comamonas**, *Paracoccus** und nicht näher bestimmte Vertreter der Gruppe Rhodocyclaceae* teils Zunahmen in den Zeiträumen mit geringerer relativer Abundanz der Gattung *Flavobacterium**. Zu diesem Zeitpunkt gab es jedoch auch insgesamt einen Einbruch in der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten (Abbildung 35). Einige der zu Beginn der Langzeit-Selektion relativ häufigen Taxa, welche keine Fähigkeit zur PHA-Produktion besitzen, wie beispielsweise die Familien Verrucomicrobiaceae, Saprospiraceae und Pirellulaceae nahmen über den Selektionsverlauf ab. Ab Tag 28 und vor allem an Tag 49 war der dominanteste Organismus mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion die Gattung *Thiothrix**, diese nahm zwar nach diesem Zeitpunkt leicht in ihrer relativen Abundanz ab, blieb aber bis Tag 91 relativ häufig im System und wies daher keine signifikante Änderung über den gesamten Selektionsverlauf auf (Abbildung 38).

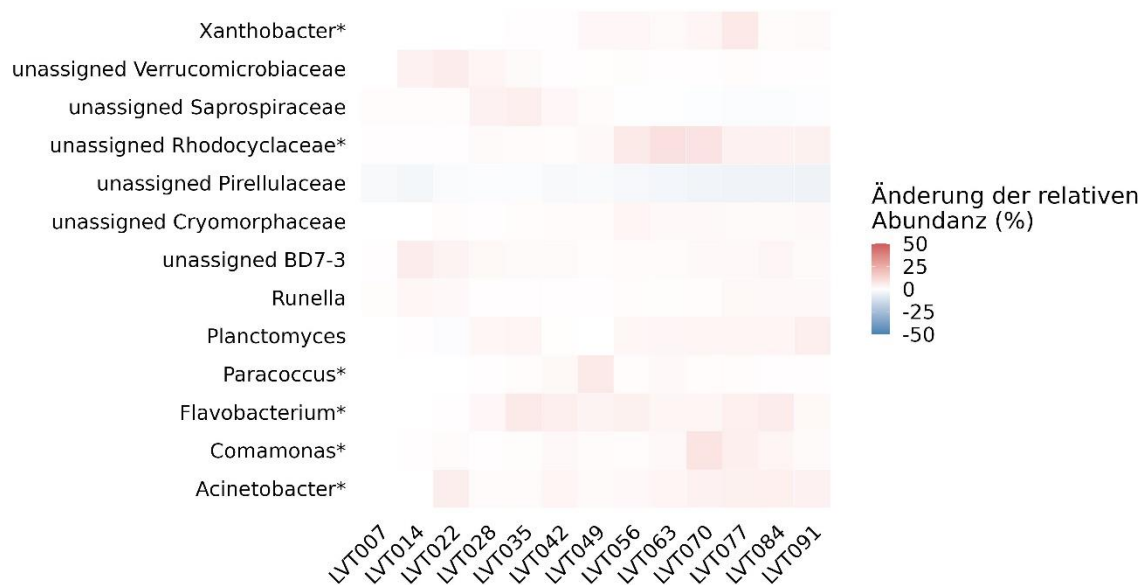


Abbildung 39: Änderung der relativen Abundanz bestimmter Taxa während der Selektion innerhalb eines Langzeitversuches mit Substratwechsellern im Vergleich zum Versuchsstart. Es sind nur Taxa mit statistisch signifikanter Änderung der relativen Abundanz über den Versuch sowie mit einer relativen Abundanz von > 1 % dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Maaslin2 ermittelt (q-Wert < 0,25). Nicht auf Gattungsebene bestimmbar Taxa wurden mit der letzten bestimmbar Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Entwicklung der mikrobiellen Mischbiozönose

Die NMDS-Ordination zeigt eine Entwicklung der mikrobiellen Zusammensetzung der Mischbiozönose innerhalb der Langzeit-Selektion annähernd entlang der MDS1-Achse während der Phase der Zugabe des ersten Substrates bis Tag 56 (Abbildung 40). Danach, und teilweise bereits ab Tag 49, zeigt die Entwicklung der mikrobiellen Zusammensetzung in der Selektion mehr einen Verlauf entlang der MDS2-Achse. Der PHA-Gehalt wies einen signifikanten Zusammenhang mit der Dynamik der Biozönose entlang der MDS1-Achse auf (NMDS1 = 0,395, NMDS2 = 0,261, $R^2 = 0,22$, $p = 0,004$). Der zeitliche Verlauf hatte einen signifikanten Effekt auf die Entwicklung der Biozönose (PERMANOVA: $F = 9,57$, $DF = 1$, $p = 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Tagen konnten dabei nicht festgestellt werden, jedoch zwischen den beiden Substrat-Phasen (Pairwise-Adonis: $F = 6,52$, $DF = 1$, $p = 0,001$). Die Variation in der Bakterienzusammensetzung zwischen den Reaktoren nahm über die Zeit zu, was aus der zunehmenden Streuung der Punkte hervorgeht. Dies konnte auch in der Abbildung der taxonomischen Zusammensetzung der einzelnen Reaktoren (Anhang 27) beobachtet werden.

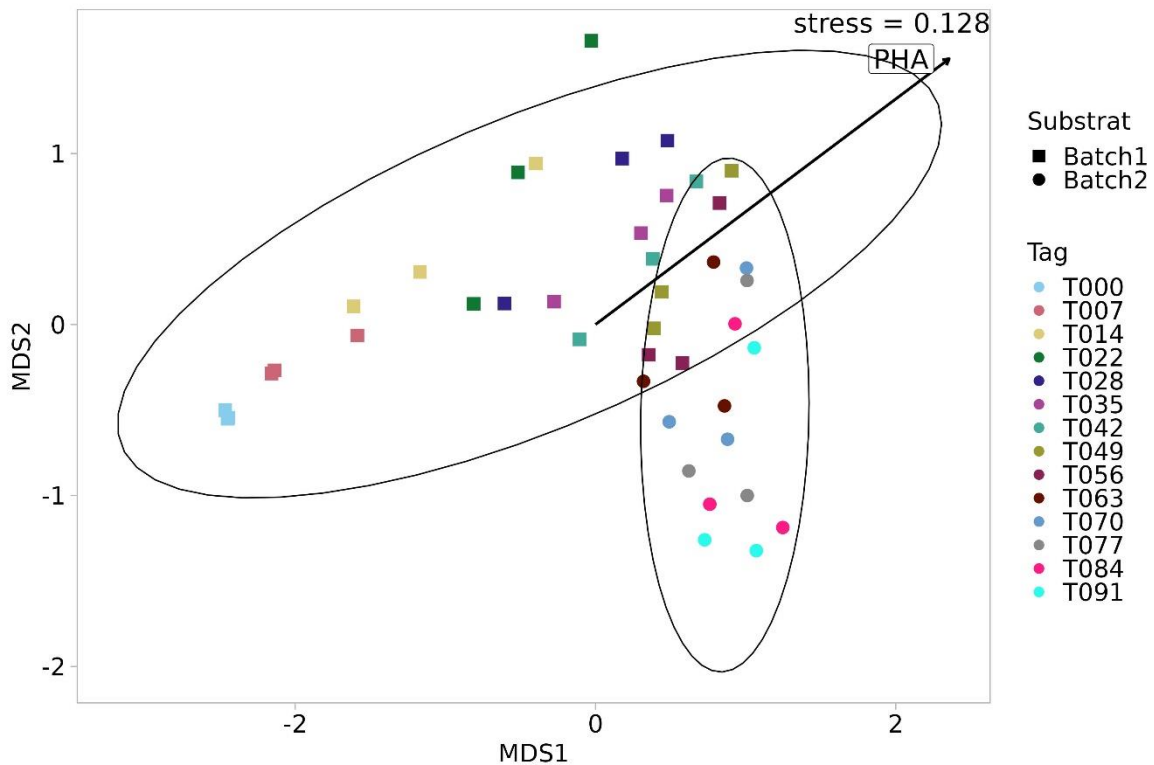


Abbildung 40: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung im Verlauf der Selektionsphase innerhalb eines Langzeitversuches unter Verwendung zweier unterschiedlicher Substrate. Dargestellt sind jeweils drei Replikate (parallel laufende Versuchsreaktoren) zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt. Die Ordination der Matrix erfolgte unter basierend auf dem Bray-Curtis-Ähnlichkeitskoeffizienten. Die Ellipsen zeigen 95%-Konfidenzintervalle für die Biozönosen der beiden Zeiträume mit unterschiedlichen Substraten innerhalb des Langzeitversuches.

Markerorganismen

Bei Betrachtung der Markerorganismen zeigte sich, wie auch schon aus Abbildung 38 ersichtlich wurde, dass sich im Laufe der Langzeit-Selektion die Bakteriengesellschaft kontinuierlich veränderte (Abbildung 41). Eine Übersicht der LDA- und p-Werte der jeweiligen Markerorganismen findet sich in Anhang 28. Dabei waren die mikrobiellen Biozönosen zu unterschiedlichen Selektionszeitpunkten durch verschiedene Organismen charakterisiert. Tag 0 war durch Mikroorganismen ohne die Fähigkeit zur PHA-Produktion, wie *Calidinea* und *Streptococcus* gekennzeichnet, während an Tag 7, neben dem Taxon SJA-28, *Zoogloea** und *Hydrogenophaga** als Markerorganismen vorkamen (Abbildung 41). Wichtige potenzielle PHA-Produzenten waren an Tag 14 die Gattung *Rhodobacter** und Organismen aus der Familie der Rhodobactereaceae* und an Tag 28 Vertreter der Familie Comamonadaceae*. Die Gattung *Thiothrix**, welche insgesamt sehr stark während der Langzeit-Selektion vertreten war, war ein charakteristisches Taxon für Tag 35, so wie *Comamonas** für Tag 70 und *Acinetobacter** für Tag 91.

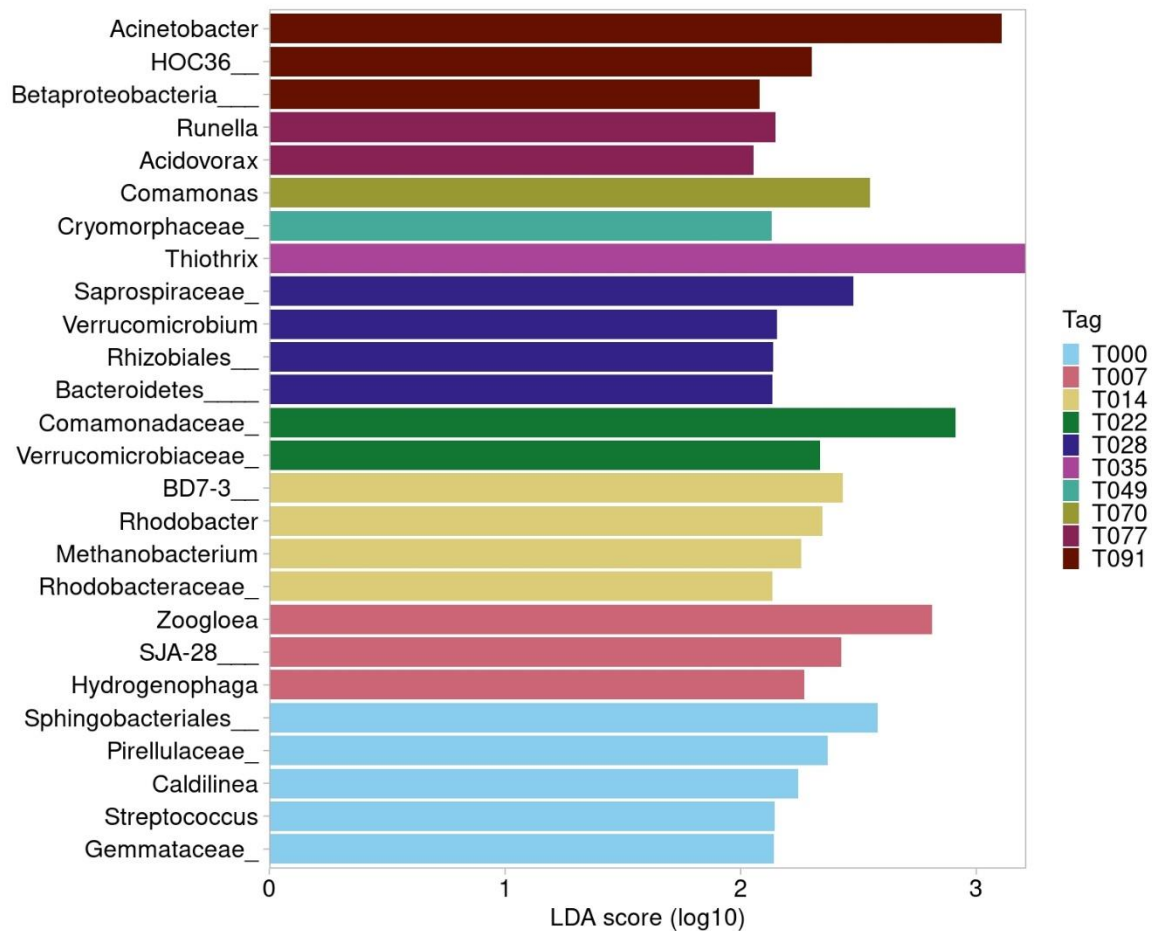


Abbildung 41: LEfSe-Analyse der mikrobiellen Mischbiozönose zu unterschiedlichen Zeitpunkten während eines Langzeit-Selektionsversuches. Dargestellt sind die Markerorganismen zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag). Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe einer LEfSe-Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung zu Beginn und Ende der Akkumulationsphase pro Tag (n = 6) ermittelt (Wilcoxon-Grenzwert = 0,05; Kruskal-Wallis-Grenzwert = 0,05; LDA-Grenzwert = 2).

3.3 PHA-Akkumulation

Während der ersten drei Wochen der ersten Selektionsphase des Langzeitversuches wurden mit der selektierten Biomasse zusätzliche Akkumulationsversuche durchgeführt, um den Einfluss der Substratzusammensetzung und -konzentration sowie der Nährstoffverfügbarkeit in der Akkumulation auf die mikrobielle Zusammensetzung und die PHA-Produktion während der Akkumulationsphase zu untersuchen.

Sequenzdaten

In den Proben zu Beginn der Akkumulationsphase war eine minimale Sequenzanzahl von 23.963 und zum Ende der Phase eine Anzahl von 24.877 zu finden (Anhang 29). Die Proben wurden zur weiteren Analyse der Biozönose auf den gemeinsamen minimalen Wert von 23.963 normalisiert.

PHA-Produktion

Während der ersten beiden Akkumulationsversuche, in denen synthetisches Substrat verwendet wurde, konnte der höchste PHA-Gehalt dieses Versuchsblocks erzielt werden (Abbildung 42). Dieser lag bei 50,8 ($\pm 1,4$) %oTS und wurde im Versuch mit einem Substrat aus Essig- und Propionsäure im molaren Verhältnis von 70:30 (AV02) erreicht. In dem anderen Versuch mit synthetischem Substrat (AV01), welches ein Verhältnis von Essig- zu Propionsäure von 30:70 besaß, war der produzierte PHA-Gehalt bei einem niedrigeren Wert von 33,0 ($\pm 3,1$) %oTS. Dieser lag jedoch, mit Ausnahme des Versuches AV06, in welchem mit 35,6 ($\pm 7,9$) %oTS der zweithöchste PHA-Gehalt erreicht wurde, trotzdem etwas höher als in allen anderen Akkumulationsversuchen dieses Versuchsblocks und den Kontrollproben. Der Versuchsblock mit synthetischem Substrat wies einen signifikant unterschiedlichen PHA-Gehalt im Vergleich zu den Versuchsblöcken mit Industrieabwässern und Nährstoffzugaben sowie zur Kontrolle auf (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 11,21$, DF = 4, p = 0,024; Dunn-post-hoc-Tests: Z = -2,81, p = 0,025; Z = -2,56, p = 0,050; Z = -2,99, p = 0,014).

Sowohl in den Versuchen mit dem vorbehandelten Brauereiabwasser (AV04; 30,5 \pm 2,1 %oTS), als auch in den Versuchen mit der höchsten Substratkonzentration (AV07; 30,0 \pm 6,9 %oTS) und der Stickstoff- bzw. Phosphorzugabe (AV08 und AV09; 29,7 \pm 4,4 und 29,3 \pm 4,9 %oTS) konnten vergleichbare PHA-Gehalte produziert werden wie in den Kontroll-Akkumulationen der Tage 7, 14 und 22 des Langzeitversuches (24,8 \pm 2,6, 24,6 \pm 7,1 und 26,1 \pm 6,0 %oTS) (vgl. Kapitel 3.2). Unter Verwendung eines versäuerten Fruchtsaftabwassers (AV03; 16,6 \pm 1,7 %oTS) sowie unter Nutzung einer

niedrigen Substratkonzentration von 50 mg/(L*Feed) (AV05; $17,2 \pm 9,3$ %oTS) wurden die niedrigsten PHA-Gehalte erzielt. Diese waren signifikant unterschiedlich zum PHA-Gehalt, welcher im Versuch mit synthetischem Substrat (AV02) erreicht werden konnte (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 24,34$, DF = 12, p = 0,018; Dunn-post-hoc-Tests: Z = -3,26, p = 0,044; Z = 3,51, p = 0,018). Bei Zugabe von Stickstoff und Phosphor zum Substrat in der Akkumulation (AV10) wurde ebenfalls ein niedrigerer PHA-Gehalt von $20,3 (\pm 7,2)$ %oTS erzielt.

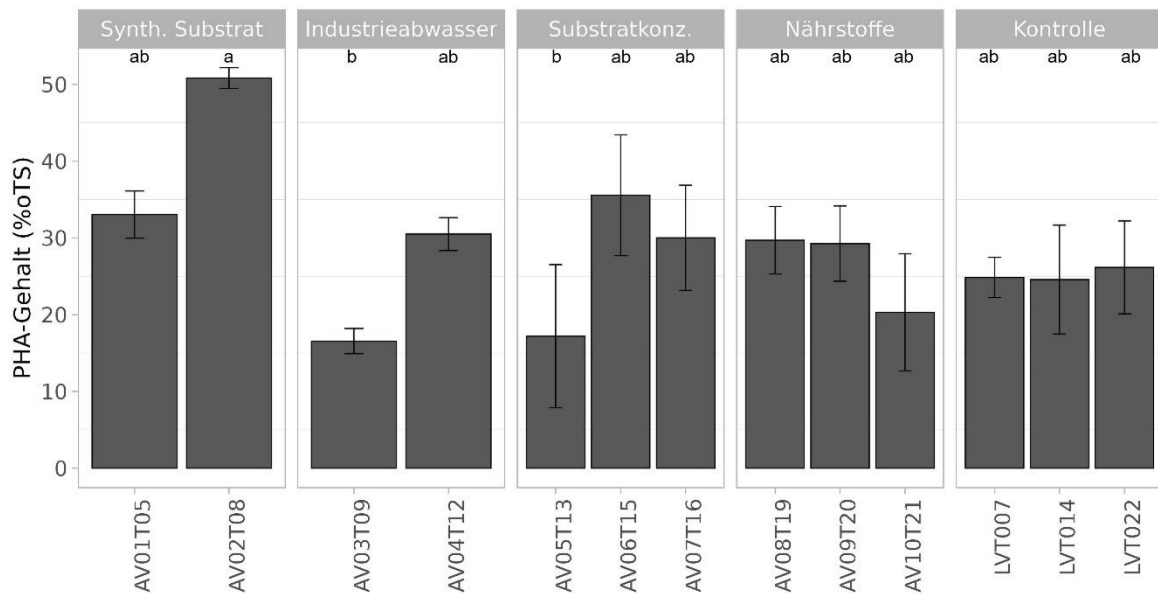


Abbildung 42: PHA-Produktion während Akkumulationsversuchen unter Verwendung unterschiedlicher Substrate und gleicher Biozönose aus einem Langzeitselektionsversuch. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung. Die Substrate besaßen unterschiedliche Eigenschaften: 1) Synthetisches Substrat: Essig- und Propionsäure im molaren Verhältnis 30:70 (AV01) und 70:30 (AV02). 2) Industrieabwasser: versäuertes Fruchtsaftabwasser (AV03) und Brauereiabwasser (AV04). 3) Substratkonzentration: Feedkonzentration 50 mg/L (AV05), 200 mg/L (AV06) und 300 mg/L (AV07). 4) Nährstoffe: Stickstoffzugabe (AV08), Phosphorzugabe (AV09) sowie Stickstoff- und Phosphorzugabe (AV10). 5) Kontrolle: Akkumulationen mit Brauereiabwasser, einer Feedkonzentration von 100 mg/L und ohne Nährstoffzugabe während der ersten drei Wochen des Langzeitversuches. Der Selektionszeitpunkt während des Langzeitversuches, an welchem die Akkumulationsversuche durchgeführt wurden, ist am Ende der Probenbenennung angegeben (T = Tag). Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis- und anschließend dem Dunn-post-hoc-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede sind durch Buchstaben gekennzeichnet.

In den beiden Akkumulationsversuchen mit synthetischem Substrat mit einer Zusammensetzung von Essig- und Propionsäure im Verhältnis 30:70 bzw. 70:30 wichen die Zusammensetzungen des produzierten PHA von dem theoretischen Verhältnis ab, sie zeigten jedoch eine Tendenz in diese Richtung (Abbildung 43). Im Versuch mit einer Substratzusammensetzung von 30 % Essigsäure und 70 % Propionsäure (AV01) bestand das produzierte PHA aus einem Verhältnis von 20,3 % HB zu $79,7 (\pm 1,8)$ % HV und im Versuch mit der gegensätzlichen Zusammensetzung (AV02) bestand es zu 55,5 % aus HB und zu $44,5 (\pm 7,4)$ % aus HV. Bei der Akkumulation mit versäuertem Fruchtsaftabwasser

als Substrat (AV03) wurde eine PHA-Zusammensetzung erreicht (83,6:16,4 ± 0,6 % HB:HV), welche nahezu genau mit der, durch die Zusammensetzung des Substrates berechneten, Zusammensetzung (84,0:16,0 % HB:HV) übereinstimmte. Bei dem zweiten Versuch mit einem Industrieabwasser (vorbehandeltes Brauereiabwasser; AV04), war der HB-Anteil im produzierten PHA mit 32,7 (± 4,6) % geringer als er durch die Substratzusammensetzung zu erwarten gewesen wäre (60,0:40,0 % HB:HV). Das in den Versuchen mit synthetischem Substrat produzierte PHA unterschied sich hinsichtlich seiner Zusammensetzung signifikant von dem PHA, welches in den Versuchen mit unterschiedlicher Substratkonzentration und den Kontroll-Akkumulationen hergestellt wurde (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 13,34$, DF = 4, p = 0,01; Dunn-post-hoc-Tests: Z = 3,09, p = 0,01; Z = 3,38, p = 0,004). Der Anteil an HB des im Akkumulationsversuch mit dem vorbehandelten Brauereiabwasser (AV04) produzierten PHA war zudem signifikant niedriger als der Anteil an HB des im Versuch mit Fruchtsaftabwasser (AV03) produzierten PHA sowie im PHA der Kontrollprobe (LVT07) (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 29,82$, DF = 12, p = 0,003; Dunn-post-hoc-Tests: Z = -3,55, p = 0,015; Z = -3,22, p = 0,05). Auch das im ersten Versuch mit synthetischem Substrat hergestellte PHA (AV01) unterschied sich signifikant von diesen beiden (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 29,82$, DF = 12, p = 0,003; Dunn-post-hoc-Tests: Z = 5,51, p = 0,004; Z = -3,55, p = 0,015).

In den jeweils drei Akkumulationsversuchen mit unterschiedlicher Substratkonzentration und Nährstoffzugabe wurde das gleiche Substrat wie in der Langzeitselektion, aus der die Biozönose für die Akkumulationen stammte, und den Vergleichsakkumulationen verwendet. Die Zusammensetzungen des in diesen Akkumulationsversuchen produzierten PHA ähnelten der durch die Substratzusammensetzung theoretisch zu erwartenden Zusammensetzung (70,6:29,4 % HB:HV), wobei das PHA aus den drei Nährstoff-Versuchen (AV08-AV10) dieser noch ähnlicher war (AV08: 71,0:29,0 ± 5,1 %; AV09: 70,2:29,8 ± 7,9 %; AV10: 69,4:30,6 ± 9,1 % HB:HV). Diese Biozönosen stammten aus der dritten Selektionswoche des Langzeitversuches, in welchem die PHA-Zusammensetzung in der Vergleichsakkumulation (LVT022) sich ebenfalls mehr dem theoretischen Wert angenähert hatte als in den beiden Wochen zuvor (70,8:29,2 % HB:HV). Das mit den aus der zweiten Woche der Langzeit-Selektion stammenden Biomassen produzierte PHA der Versuche unterschiedlicher Substratkonzentration (AV05: 74,6:25,4 ± 2,0 %; AV06: 74,7:25,3 ± 3,0 %; AV07: 73,3:26,7 ± 3,3 % HB:HV) zeigten ebenfalls eine ähnliche Zusammensetzung wie das in der Vergleichsakkumulation des gleichen Zeitraums (LVT014) produzierte PHA (74,1:25,9 ± 1,8 % HB:HV).

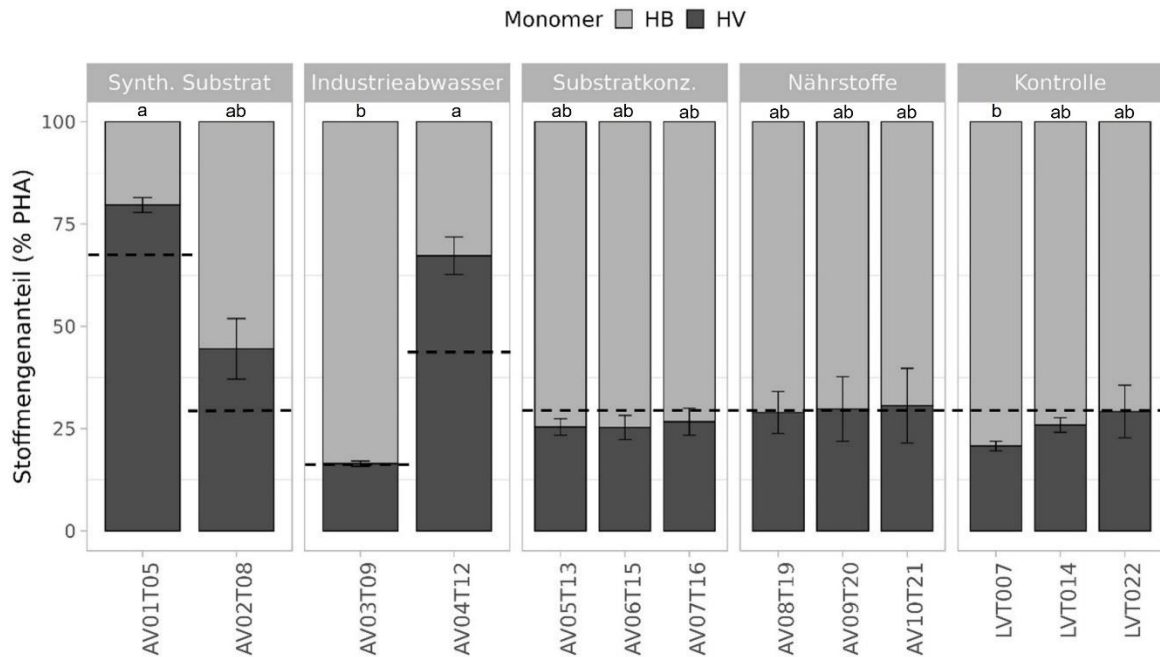


Abbildung 43: PHA-Zusammensetzung des produzierten PHA aus Akkumulationsversuchen unter Verwendung unterschiedlicher Substrate und gleicher Biozönose aus einem Langzeitselektionsversuch. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung. Die Substrate besaßen unterschiedliche Eigenschaften: 1) Synthetisches Substrat: Essig- und Propionsäure im molaren Verhältnis 30:70 (AV01) und 70:30 (AV02). 2) Industrieabwasser: versäuertes Fruchtsaftabwasser (AV03) und Brauereiabwasser (AV04). 3) Substratkonzentration: Feedkonzentration 50 mg/L (AV05), 200 mg/L (AV06) und 300 mg/L (AV07). 4) Nährstoffe: Stickstoffzugabe (AV08), Phosphorzugabe (AV09) sowie Stickstoff- und Phosphorzugabe (AV10). 5) Kontrolle: Akkumulationen mit Brauereiabwasser, einer Feedkonzentration von 100 mg/L und ohne Nährstoffzugabe während der ersten drei Wochen des Langzeitversuches. Der Selektionszeitpunkt während des Langzeitversuches, an welchem die Akkumulationsversuche durchgeführt wurden, ist am Ende der Probenbenennung angegeben (T = Tag). Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis- und anschließendem Dunn-post-hoc-Test ermittelt.

Anteil potenzieller PHA-Produzenten

Der Anteil potenzieller PHA-Produzenten änderte sich in keinem der Akkumulationsversuche mit unterschiedlichem Substrat zwischen Beginn und Ende der Akkumulationsphase signifikant (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 0,14$, DF = 1, $p = 0,71$) (Abbildung 44). Zwischen den Versuchen gab es zudem keinen signifikanten Unterschied in der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 16,69$, DF = 9, $p = 0,054$). Lediglich in den Versuchen AV02 und AV03, welche während der Tage 8 und 9 der Langzeitselektion stattfanden, lag der Anteil potenzieller PHA-Produzenten mit $54,9 (\pm 9,2) \%$ und $53,6 (\pm 10,1) \%$ höher als im ersten Versuch (AV01) mit $33,9 (\pm 0,4) \%$. Im vierten Akkumulationsversuch (AV04) war dieser mit einem Wert von $42,4 (\pm 8,4) \%$ vergleichbar zum ersten Versuch und blieb über die anderen Versuche konstant. Dies stimmt mit dem Verlauf der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in den ersten drei Wochen des Langzeitversuches überein, da diese an Tag 7 bei $52,0 (\pm 5,4) \%$ lag und

bis Tag 14 auf einen Wert von $45,0 (\pm 14,8)$ % bzw. bis Tag 22 auf $43,9 (\pm 18,2)$ % absank (vgl. Abbildung 35).

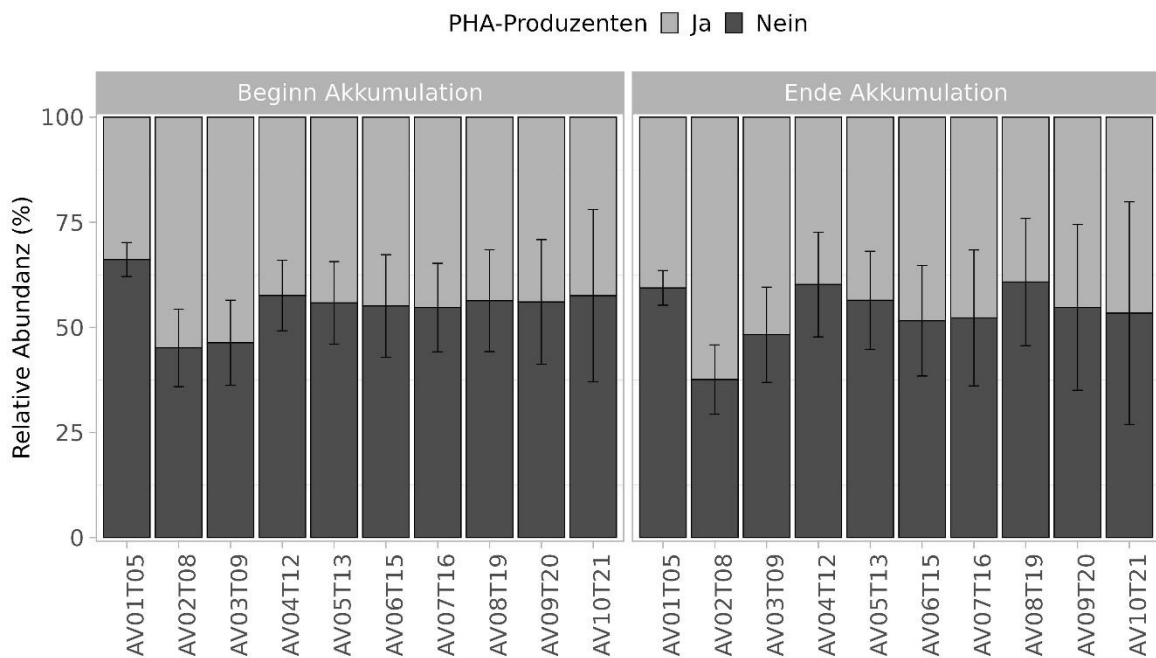


Abbildung 44: Anteil potenzieller PHA-Produzenten in der mikrobiellen Mischbiozönose zu Beginn und Ende der Akkumulation in Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Reaktoren mit zugehöriger Standardabweichung. Der Selektionszeitpunkt während des Langzeitversuches, an welchem die Akkumulationsversuche durchgeführt wurden, ist am Ende der Probenbenennung angegeben (T = Tag).

Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose

Bei Betrachtung der taxonomischen Zusammensetzung der Biozönose wird ebenfalls deutlich, dass es zwischen Beginn und Ende der Akkumulationsphase kaum Veränderungen innerhalb der mikrobiellen Biozönose kam (Abbildung 45). Lediglich in den Akkumulationen 2 und 3 gab es eine Zunahme der Gruppen *Bacteroidetes** (von $0,7 \pm 0,5$ zu Beginn auf $8,2 \pm 1,6$ % am Ende der Akkumulation) bzw. *Lactococcus* (von $0,6 \pm 0,3$ auf $3,8 \pm 1,6$ %) während der Akkumulationsphase. Die Gattungen *Streptococcus* und *Veillonella* zeigten ebenfalls eine Zunahme in ihrer relativen Abundanz von Beginn bis Ende der Akkumulationsphase im Akkumulationsversuch 4 (von $0,2 \pm 0,07$ auf $15,8 \pm 6,5$ % und von $0,2 \pm 0,2$ auf $4,3 \pm 4,8$ %). Ab dem dritten Akkumulationsversuch war zudem eine Erhöhung der relativen Abundanz der Gattungen *Rhodobacter** (von $0,7 \pm 0,7$ auf $3,9 \pm 4,1$ %) und *Sphingobacterium* (von $1,0 \pm 1,8$ auf $1,5 \pm 2,8$ %) in den Akkumulationsphasen zu beobachten. Des Weiteren wies die Gattung *Comamonas** eine leichte Zunahme in der relativen Abundanz während der Akkumulation in den Versuchen 7, 8 und 9 auf (von $0,4 \pm 0,4$ auf $3,0 \pm 3,0$ %; von $0,5 \pm 0,5$ auf $2,0 \pm 1,6$ und von $1,1 \pm 0,8$ auf $2,2 \pm 1,6$ %).

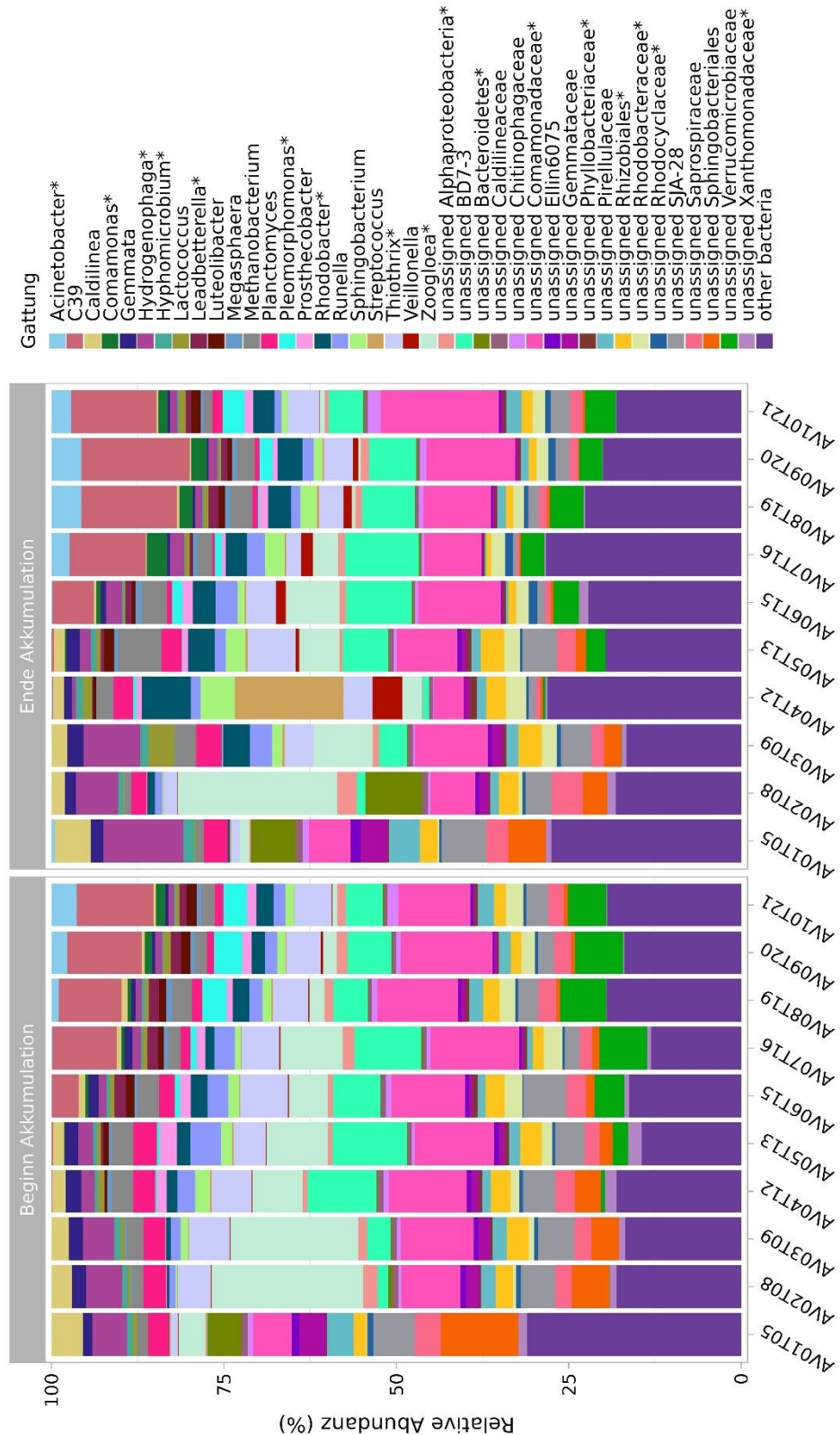


Abbildung 45: Taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose zu Beginn und Ende der Akkumulation in Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag). Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Beim Vergleich der taxonomischen Zusammensetzung zwischen den einzelnen Akkumulationsversuchen (Abbildung 45) spiegelte sich die über den zeitlichen Verlauf der Langzeit-Selektion beobachtete Veränderung in der mikrobiellen Zusammensetzung wider (vgl. Kapitel 3.2). Die Zusammensetzung der Biozöosen innerhalb der Akkumulationsversuche war jeweils ähnlich zu der Zusammensetzung der Biozönose zum jeweiligen Selektionszeitpunkt im Langzeitversuch. Dabei fand eine vergleichende Betrachtung des Beginns der Akkumulationsphase statt, da in den Akkumulationen der Langzeit-Selektion keine Untersuchung zur Zusammensetzung der Biozönose stattfand. Die Taxa mit der höchsten relativen Abundanz im ersten Akkumulationsversuch waren unter anderem *Calidinea* ($5,6 \pm 0,7$ %), *Hydrogenophaga** ($5,0 \pm 2,0$ %) sowie die nicht näher bestimmten Bacteroidetes* ($4,9 \pm 3,3$ %), Comamonadaceae* ($5,6 \pm 2,9$ %), SJA-28 ($6,1 \pm 1,0$ %) und Sphingobacteriales ($11,2 \pm 5,1$ %) (Abbildung 45). Dieser wurde am Tag 5 der Langzeit-Selektion durchgeführt und die Zusammensetzung war teilweise ähnlich zum Tag 0 sowie Tag 7 des Langzeitversuches, an denen ebenfalls unter anderem *Calidinea* und nicht näher bestimmte Sphingobacteriales sowie die Gruppen *Hydrogenophaga**, SJA-28, *Zoogloea** und Comamonadaceae* zu den dominantesten Taxa zählten (vgl. Abbildung 38). In den Akkumulationen 2 und 3, welche an Tag 8 und 9 des Langzeitversuches stattfanden, gehörten, neben *Hydrogenophaga** ($5,2 \pm 1,5$ und $4,5 \pm 1,8$ %) und den Gruppen SJA-28 ($5,0 \pm 3,1$ und $5,3 \pm 3,5$ %) sowie Sphingobacteriales ($5,5 \pm 1,5$ und $4,0 \pm 1,6$ %), auch *Thiothrix** ($4,8 \pm 7,6$ und $5,9 \pm 9,1$ %) und *Zoogloea** ($21,9 \pm 11,3$ und $18,6 \pm 19,4$ %) zu den dominantesten Taxa. In den Akkumulationen 4 und 5 nahm ebenfalls die Gruppe BD7-3 in ihrer relativen Abundanz im Vergleich zu den vorherigen Akkumulationen zu ($10,0 \pm 7,3$ und $10,9 \pm 5,7$ %) (Abbildung 45). Diese Versuche fanden während der zweiten Selektionswoche des Langzeitversuches statt, in welcher unter anderem *Thiothrix**, *Zoogloea**, *Methanobacterium* sowie Vertreter der Comamonadaceae* und BD7-3 dominierten (LVT014; Abbildung 38). C39 und Organismen der Familie Verrucomicrobiaceae zeigten zudem eine Zunahme in den Akkumulationsversuchen 6 und 7 ($3,9 \pm 6,7$ und $9,3 \pm 16,1$ %; $2,7 \pm 0,07$ und $6,9 \pm 4,8$ %). Die Gattungen *Calidinea* ($1,0 \pm 0,8$ und $0,7 \pm 0,7$ %) und *Hydrogenophaga** ($1,2 \pm 1,0$ und $1,2 \pm 0,9$ %) nahmen bis zu diesen Versuchen in ihrer relativen Abundanz ab, jedoch nahmen ab Akkumulationsversuch 8 die Gattungen *Acinetobacter** ($1,1 \pm 1,4$ %) und *Pleomorphomonas** ($3,6 \pm 6,2$ %) zu. Die Gattungen *Acinetobacter** und *Pleomorphomonas** zählten im letzten Akkumulationsversuch zu den Taxa mit den höchsten relativen Abundanzen ($3,7 \pm 2,7$ % und $3,5 \pm 5,0$ %). Daneben gehörten auch C39 ($11,2 \pm 19,3$ %), *Rhodobacter** ($2,5 \pm 1,6$ %), *Thiothrix** ($5,4 \pm 5,2$ %) sowie die Gruppen BD7-3 ($5,3 \pm 5,2$ %), Comamonadaceae* ($10,4 \pm 12,4$ %), Rhodobacteraceae* ($2,5 \pm$

2,5 %), SJA-28 ($3,2 \pm 5,3$ %), Saprospiraceae ($2,3 \pm 0,7$ %) und Verrucomicrobiaceae ($5,6 \pm 1,9$ %) dazu (Abbildung 45). Die Versuche AV08, AV09 und AV10 wurden um den Probenahmezeitpunkt T22 innerhalb des Langzeitversuches durchgeführt, an welchem ebenfalls *Acinetobacter**, C39, BD7-3, sowie die Familien Comamonadaceae* und Verrucomicrobiaceae unter den abundantesten Taxa waren (Abbildung 38).

Insgesamt wiesen nur wenige Taxa eine Änderung während der Akkumulationsphasen auf und es handelte sich zudem um Gruppen mit insgesamt geringer relativer Abundanz. Taxa mit signifikantem Unterschied zwischen Beginn und Ende der Akkumulationsphase sowie einer relativen Abundanz von über 1 % in mindestens einer Probe sind in Abbildung 46 dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt (Anhang 36). Nur die Gattungen *Rhodobacter** und *Veillonella* waren so häufig, dass sie ebenfalls in der Abbildung 45 mit den 40 abundantesten Taxa vertreten sind. Wie hieraus bereits hervorging, nahmen beide Gattungen insgesamt während der Akkumulationsphase, von Beginn bis Ende der Akkumulation, zu (*Rhodobacter**: im Mittel von $1,5 \pm 1,2$ auf $3,3 \pm 2,8$ %; *Veillonella*: von $0,2 \pm 0,1$ auf $1,0 \pm 1,8$ %). Weitere Taxa, die während der Akkumulationsphase an relativer Abundanz zunahmen, waren unter anderem die Gattungen *Brevundimonas** (von $0,05 \pm 0,07$ auf $0,2$ auf $0,4$ %), *Paracoccus** (von $0,05 \pm 0,07$ auf $0,6 \pm 0,9$ %) sowie *Pseudoxanthomonas** (von $0,02 \pm 0,04$ auf $0,2 \pm 0,4$ %) (Abbildung 46). *Rubrivivax** und *Sphingobium** jedoch zeigten eine Abnahme von Beginn bis Ende der Akkumulation (von $0,3 \pm 0,4$ auf $0,1 \pm 0,2$ % und von $0,6 \pm 0,5$ auf $0,3 \pm 0,3$ %).

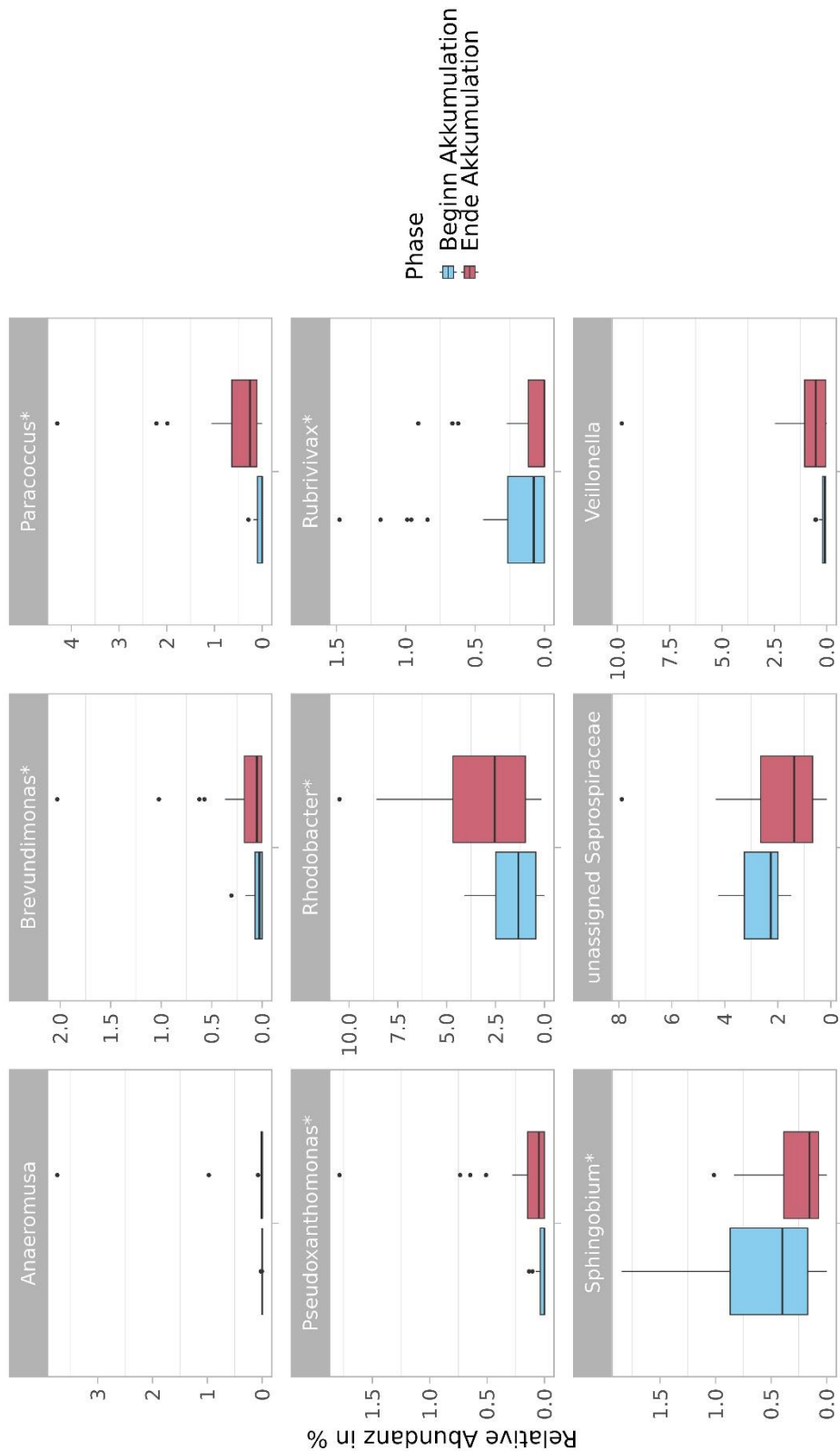


Abbildung 46: Taxa mit signifikanter Änderung zwischen Beginn und Ende der Akkumulationsphase in Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. Dargestellt sind die relativen Abundanzen der jeweiligen Taxa über 10 Akkumulationen. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert. Signifikante Unterschiede wurden mittels Kruskal-Wallis-Test ermittelt.

Entwicklung der mikrobiellen Mischbiozönose

In der NMDS-Ordination ist ebenfalls zu sehen, dass es zwischen den Proben zu Beginn und Ende der Akkumulation insgesamt kaum Unterschiede in der Zusammensetzung der Mischbiozönose gab (Abbildung 47). Lediglich in dem Akkumulationsversuch AV04 lagen die Biozönosen vor und nach der Akkumulationsphase weiter auseinander, was auch aus Abbildung 45 hervorgeht. Reaktor 4 (bzw. 6) der Akkumulationen AV07-AV10 entwickelte sich unterschiedlich zu den anderen beiden Reaktoren (Anhang 30), was sich anhand der Lage abseits des Musters der anderen Proben zeigt. Jedoch zeigten sich zwischen Beginn und Ende der Selektion in diesem Reaktor keine großen Unterschiede in der Zusammensetzung, was anhand der Nähe der Punkte und der Abbildung in Anhang 30 zu erkennen ist. Die 95%-Konfidenzintervalle der Proben zu Beginn und Ende der Akkumulationsphase überschneiden sich nahezu komplett, jedoch führten die erwähnten einzelnen Proben außerhalb dieses Musters zu einem größeren Konfidenzintervall der Proben zu Beginn der Akkumulation. Des Weiteren wies das Muster der Biozönosen der Akkumulationsversuche eine zeitliche Entwicklung auf. Der PHA-Gehalt wies keinen signifikanten Zusammenhang mit dem beobachteten Muster der Entwicklung der Biozönose auf ($p = 0,11$). Der Akkumulationsversuch bzw. die Zeit hatten einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Bakteriengesellschaft (PERMANOVA: $F = 3,33$, $DF = 9$, $p = 0,001$), wobei sich die Versuche AV01 und AV06 signifikant unterschieden ($F = 10,04$, $DF = 1$, $p = 0,045$). Die Phase der Beprobung (Beginn oder Ende der Akkumulation) hatte hingegen keinen Einfluss auf diese ($F = 1,52$, $DF = 1$, $p = 0,164$).

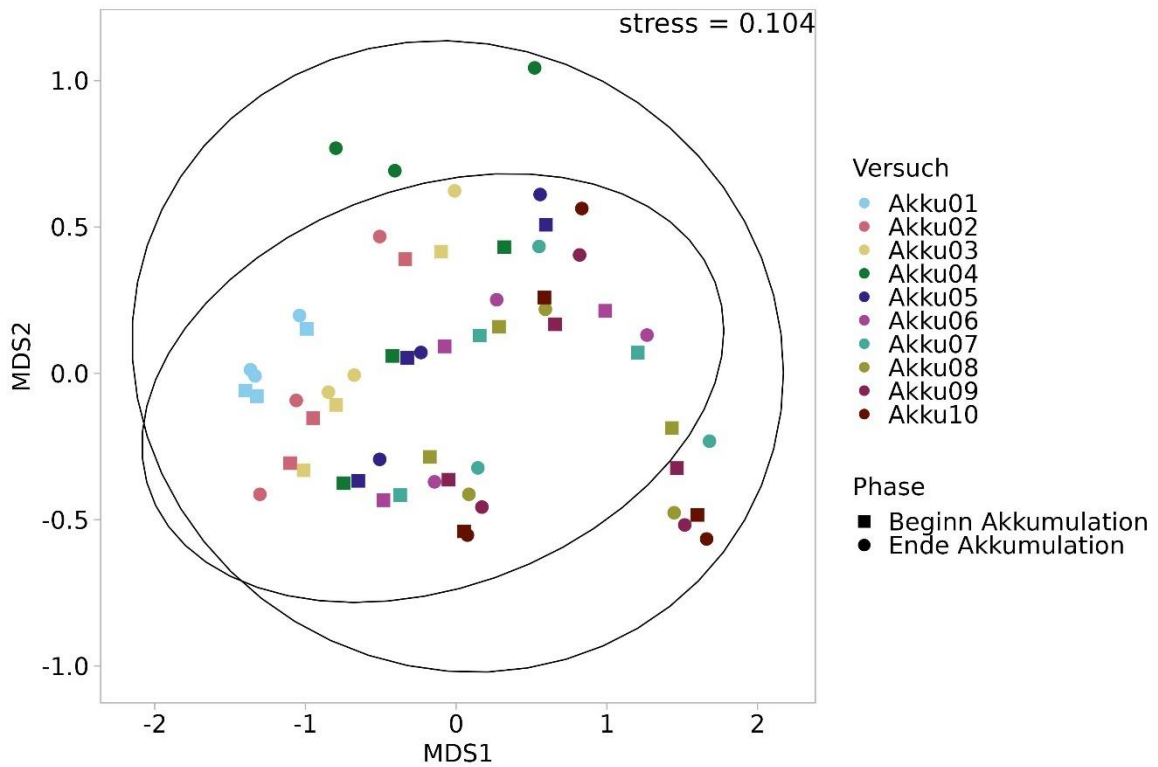


Abbildung 47: NMDS-Ordination der mikrobiellen Zusammensetzung der Mischbiozönose zu Beginn und Ende der Akkumulation in Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. Dargestellt sind jeweils drei Replikate (parallel laufende Versuchsreaktoren) pro Phase und zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt. Die Ordination der Matrix erfolgte basierend auf dem Bray-Curtis-Ähnlichkeitskoeffizienten.

4 Diskussion

4.1 Selektion

Zur Evaluierung der Effektivität der Selektionsphase, zur Untersuchung des Verlaufes dieser und zur Ermittlung geeigneter Betriebsparameter in der Selektion, wurden Versuche zur Selektion einer PHA-produzierenden mikrobiellen Mischbiozönose unter variierenden Betriebsbedingungen und unter Nutzung unterschiedlicher Inokula durchgeführt.

4.1.1 Betriebsparameter in der Selektion

Einfluss des Inokulums auf die PHA-Produktion und -zusammensetzung

Unter Verwendung dreier unterschiedlicher Belebtschlämme als Inokulum für die Selektion konnten vergleichbare PHA-Gehalte von ca. 50 % erzielt werden. Dies liegt in dem von Valentino et al. (2017) berichteten, zu erwartenden, Bereich an produziertem PHA mit Mischbiozönosen. Trotz der unterschiedlichen Herkunft der Inokula konnten unter Nutzung des gleichen synthetischen Substrates und unter gleichen Betriebsbedingungen Biozönosen selektiert werden, die eine vergleichbare PHA-Produktionskapazität aufweisen. Dies stimmt überein mit Ergebnissen aus der Literatur, in denen ebenfalls, trotz unterschiedlicher Startzusammensetzung oder Herkunft der Schlämme, vergleichbare PHA-Gehalte mit den selektierten Biozönosen erzielt werden konnten (Jayakrishnan et al. 2020; Wen et al. 2021; Zhou et al. 2023). Pei et al. (2022) untersuchten das PHA-Produktionspotenzial von Belebtschlämmen unterschiedlicher Herkunft ohne eine Selektionsphase. Sie erzielten zwar unterschiedliche PHA-Gehalte, aber sie fanden ebenfalls eine vergleichbare PHA-Produktionsfähigkeit der Biozönose bezogen auf die PHA-produzierende Biomasse. Obwohl im Selektionsversuch mit Inokulum 1 ein Betriebsfehler stattfand, welcher in einem rapiden Abstieg des PHA-Gehaltes bis Tag 14 resultierte, erholte sich das System bis Tag 42 und zeigte erneut eine vergleichbare PHA-Produktionskapazität, was auf eine starke Resilienz der Mischbiozönose hindeutet. Die relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten zeigte in allen drei Versuchen einen ähnlichen Verlauf zur PHA-Produktion, auch sie erholte sich nach dem Betriebsfehler im ersten Versuch wieder.

Die Zusammensetzung des produzierten PHA veränderte sich über die Selektionsdauer der Versuche, wozu eine metabolische Anpassung der Mischbiozönose in den drei Selektionen beigetragen haben könnte. Die Veränderung der Zusammensetzung zeigte dabei in allen Versuchen eine gleiche Tendenz, allerdings war der zeitliche Verlauf unterschiedlich. Die Dynamik der Mischbiozönose spielt hierbei vermutlich eine wichtige Rolle, da

unterschiedliche Organismen unterschiedliche Substratpräferenzen (Coats et al. 2007; Albuquerque et al. 2013; Clagnan und Adani 2023) sowie ein unterschiedliches genetisches Potenzial besitzen und dadurch unterschiedliche Stoffwechselwege zur PHA-Produktion nutzen können (Serafim et al. 2008; Chen et al. 2015a; Nguyenhuynh et al. 2021). Dabei kann die gleiche VFA, wie z.B. Propionat, ebenfalls über verschiedene Stoffwechselwege metabolisiert und zu unterschiedlichen PHA umgesetzt werden (Serafim et al. 2008). Die Studien von Hao et al. (2017) und Huang et al. (2020) deuten ebenfalls auf eine metabolische Anpassung der Mischbiozönose hin, da das Substrat während der Selektion einen Einfluss auf die Substratpräferenz, die PHA-Produktion und die PHA-Zusammensetzung während der Akkumulation hatte. Dies ist jedoch nicht nur von der Art des verfügbaren Substrates abhängig, sondern auch von der Komplexität des Substrates und von interspezifischen Interaktionen in der komplexen Biozönose. So können Konkurrenz und die jeweiligen Substratpräferenzen eine Nischendifferenzierung einzelner Organismen bewirken, welche für diese unter unterschiedlichen Betriebsbedingungen und Zusammensetzungen der Biozönose und des Substrates jeweils unterschiedlich sein können (Ghoul und Mitri 2016; Celis et al. 2022). Es ist daher schwierig die Nutzung und Umwandlung spezifischer VFA zu PHA, und daraus resultierend den Anteil an verschiedenen Monomeren in der PHA-Produktion, mit einzelnen Organismen in Verbindung zu bringen.

Einfluss des Inokulums auf die Bakterienzusammensetzung

Die Selektion unter vergleichbaren und konstanten Bedingungen führte in den drei Biozönosen nicht nur zu einer vergleichbaren PHA-Produktion, auch entwickelten sich die Bakterienkulturen mit zunehmender Selektionsdauer in eine ähnliche Richtung, was auch in anderen Studien bestätigt wurde (Jayakrishnan et al. 2020; Zhou et al. 2023). Wenngleich zum Ende der Selektionsversuche unterschiedliche Organismen dominierten, zeigten die drei Biozönosen starke Überschneidungen, auch in den wichtigsten potenziellen PHA-Produzenten. Dies spricht für eine ubiquitär verbreitete Kerngemeinschaft an PHA-produzierenden Bakterien in Belebtschlämmen unterschiedlicher Herkunft. Dies deckt sich mit der Erkenntnis, dass eine Kerngemeinschaft von Mikroorganismen in Belebtschlämmen weltweit vorkommt, die eine ähnliche Funktionalität aufweist (Saunders et al. 2016; Wu et al. 2019). Einige der in diesen beiden Studien als Kernorganismen im Belebtschlamm unterschiedlicher Herkunft identifizierter Bakterien sind ebenfalls für ihre Fähigkeit zur PHA-Produktion bekannt. Die potenziellen PHA-Produzenten in dieser Arbeit zeigten jedoch einen unterschiedlichen Verlauf in der relativen Abundanz über den Selektionsverlauf in den drei Versuchen. Der Betriebsfehler im ersten Versuch zeigte sich auch in der

bakteriellen Zusammensetzung, welche an Tag 14 eine sehr unterschiedliche Zusammensetzung zu den anderen beiden Versuchen aufwies, allerdings regenerierte sich diese, was ebenfalls auf eine starke Resilienz der mikrobiellen Biozönose hindeutet. Die Belebtschlämme der beiden kommunalen Kläranlagen zeigten eine ähnliche Zusammensetzung zu Beginn der Selektion, der Schlamm von der Brauereikläranlage unterschied sich stark von diesen, dennoch entwickelte sich die Bakteriengemeinschaft ähnlich. Die Möglichkeiten für die Wahl des Belebtschlammes als Inokulum für die PHA-Produktion sind daher vielfältig und eine globale PHA-Produktion aus Restströmen und Belebtschlämmen im Industriemaßstab ist möglich. Die zu Beginn vorkommenden abundantesten, nicht-PHA-produzierenden Organismen, wurden im Verlauf der Selektion, zumeist während der ersten Woche, in allen drei Versuchen verdrängt und es kam zu einer Zunahme der relativen Abundanzen potenzieller PHA-Produzenten. Dies bestätigt, dass die Selektion PHA-produzierender Bakterien stark von den Umweltbedingungen beeinflusst wird (Serafim et al. 2008). Eine ähnliche Entwicklung der Biozönosen durch die Selektion unter Verwendung unterschiedlicher Inokula wurden ebenfalls in anderen Studien gefunden (Jayakrishnan et al. 2020; Zhou et al. 2023). Zhou et al. (2023) untersuchten zudem den Unterschied zweier verschiedener Schlammalter (2 und 8 d) auf die Zusammensetzung und Performance der Mischbiozönose und sie fanden auch zwischen diesen eine ähnliche Entwicklung. Dabei war *Paracoccus** der dominanteste Organismus in allen Systemen. Weitere abundante Organismen gehörten zu den Gattungen *Gemmobacteria*, *Brevundimonas** und *Hydrogenophaga**. In dieser Arbeit jedoch, waren die abundantesten potenziellen PHA-Produzenten in allen Selektionen *Flavobacterium**, *Acinetobacter**, *Pleomorphomonas** und die Gruppen Comamonadaceae*, Caulobacteraceae* sowie Rhodobacteraceae*. Allerdings waren diese in den drei Selektionsversuchen zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter den abundantesten Organismen. Zhou et al. (2023) untersuchten ebenfalls den zeitlichen Verlauf der mikrobiellen Zusammensetzung während der Selektion über 45 Tage mit unterschiedlichen Inokula und fanden eine starke Änderung in dieser nach 7 Tagen. Dies konnte in den Versuchen dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Jayakrishnan et al. (2020) untersuchten nur jeweils die Zusammensetzung der Mischbiozönose der besten PHA-Akkumulation der beiden untersuchten Schlämme. Sie zeigten eine ähnliche Zusammensetzung mit den abundantesten Organismen aus den Familien Erysipelotrichaceae, Xanthomonadaceae* und Rhizobiaceae*. Obwohl in diesen Untersuchungen sowie in der Studie von Wen et al. (2021), wie bereits zuvor beschrieben, vergleichbare PHA-Gehalte zwischen den verschiedenen Inokula erzielt wurden, fanden diese eine unterschiedliche Zusammensetzung der Biozönose nach der Selektionsphase. Sie untersuchten allerdings zusätzlich unterschiedliche Raumbelastungen während der

Selektion der beiden Inokula und nutzten dabei Glycerol als Substrat unter schrittweiser Erhöhung. Unter Nutzung gleichbleibender Selektionsbedingungen scheint demnach eine effektive Selektion einer Biozönose mit einer guten PHA-Produktionskapazität und ähnlicher Zusammensetzung möglich zu sein. In dieser Arbeit wurde ein synthetisches Substrat für diese Versuche genutzt, allerdings zeigen die zuvor genannten Studien, dass diese Beobachtung wohl auch unter Nutzung von realen Substraten möglich ist. Die Kernorganismen zwischen den Studien unterschieden sich möglicherweise unter anderem aus diesem Grund, aber eine funktionelle Verteilung von Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion wird hierdurch erneut bestätigt, denn eine effektive PHA-Produktion war mit allen Biozönosen möglich.

Einfluss der Betriebsparameter auf die PHA-Produktion und -zusammensetzung

Die Ergebnisse zeigen, dass mit einem Schlammalter von 4 d, einer Zyklusdauer von 6 h, einer Raumbelastung von ca. $1 \text{ g CSB}_{\text{VFA}}/(\text{L} \cdot \text{d})$ ein maximaler PHA-Gehalt von etwa 41 % erreicht werden konnte. Dieser Wert ist ebenfalls vergleichbar mit dem von Valentino et al. (2017) prognostizierten Bereich und mit Werten aus der Literatur, welche mit realem Substrat erzielt wurden (Oliveira et al. 2018; Tamang et al. 2019; Moretto et al. 2020; Guarda et al. 2024).

Beim Vergleich der beiden Schlammalter von 2 und 4 d konnte nicht festgestellt werden, welches der beiden zu einer besseren PHA-Produktionsperformance der Mischkultur führte. Jedoch wurde der maximale Einzelwert der PHA-Produktion im Versuch mit einem Schlammalter von 4 d erzielt. Ergebnisse aus der Literatur zeigen ebenfalls eine bessere Eignung eines Schlammalters von 4 d im Vergleich zu geringeren Schlammaltern von 0,5-2 d (Johnson et al. 2010a; Matos et al. 2021b; Guarda et al. 2024). Bei geringeren Schlammaltern wurde in diesen Studien ein Wachstum im Gegensatz zur PHA-Produktion bevorzugt (Johnson et al. 2010a; Matos et al. 2021b). Mit geringerem Schlammalter werden Bakterien mit höherer Wachstumsrate bevorzugt (Friedrich et al. 2015). Bei höheren Schlammaltern von 6 und 10 d wurde ebenfalls eine schlechtere PHA-Produktionsperformance im Vergleich zu 4 bzw. 5 d beobachtet (Coats et al. 2007; Chen et al. 2017). Hierbei wird ein verringerter Selektionsdruck auf die nicht-PHA-Produzenten bei höherem Schlammalter angenommen (Johnson et al. 2009; Chen et al. 2017). Bei geringerem Schlammalter besitzen die PHA-Produzenten einen Wachstumsvorteil, da sie während der feast-Phase eine schnellere Substrataufnahmerate aufweisen (Chen et al. 2017). Ein Schlammalter von 4 d scheint somit eine geeignete Parameterwahl zur Selektion

einer PHA-produzierenden Mischbiozönose zu sein. In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Eignung dieses Parameters für eine effiziente Selektion sowie PHA-Produktion gezeigt.

Die deutlich bessere erzielte PHA-Produktion mit einer Zyklusdauer von 6 h im Vergleich zu 24 h steht teilweise im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien, in denen eine Zyklusdauer von 24 h oder die längere Zyklusdauer von 12 h in Kombination mit einem kurzen Schlammalter von 1 d vorteilhafter gegenüber einer Zyklusdauer von 6 h und einem längeren Schlammalter von 2 d waren (Moralejo-Gárate et al. 2013; Moretto et al. 2020). In der Studie von Moralejo-Gárate et al. (2013) jedoch wurde einerseits Glycerol als Substrat verwendet und andererseits erfolgte eine Selektion der Biozönose unter einer Zykluslänge von 6 h und mit dieser Biomasse erfolgte lediglich eine Kurzzeitakklimatisierung an einen Zyklus von 24 h. Diese beiden Biozönosen wurden hinsichtlich ihrer PHA-Produktionsperformance verglichen, jedoch lässt sich eine unbeeinflusste Aussage über eine Auswirkung unterschiedlicher Zykluslängen auf die Selektion dadurch schwer treffen. Zudem wird eine mögliche Verkürzung der Zyklusdauer unter Verwendung von VFA im Vergleich zu Glycerol angenommen, da eine leichtere Abbaubarkeit eines VFA-reichen Substrates gegeben ist (Nguyenhuynh et al. 2021). Eine häufig verwendete Zyklusdauer zur Selektion einer PHA-produzierenden Mischbiozönose unter Verwendung von VFA liegt bei 12 h (Matos et al. 2021b; Nguyenhuynh et al. 2021; Wen et al. 2021; Crognale et al. 2022; Guarda et al. 2024). Allerdings zeigten andere Studien auch, dass sich eine kurze Zyklusdauer von 2 bzw. 4 h oder 6 h zur Selektion einer PHA-produzierenden Biozönose mit guter Produktionsperformance eignen (Dionisi et al. 2007; Valentino et al. 2014). In dieser Arbeit wurden in dem Versuch mit einer Zyklusdauer von 6 h ebenfalls höhere PHA-Gehalte erzielt als in den anderen Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter, in denen eine Zyklusdauer von 12 h verwendet wurde. Allerdings ist dabei zu beachten, dass sich aufgrund der Schwankungen in dem genutzten realen Substrat, in den beiden Versuchsblöcken unterschiedliche Raumbelastungen ergaben. In dem Versuchsbock zur Untersuchung unterschiedlicher Zyklusdauern von 24 und 6 h war die Raumbelastung aufgrund der VFA-Konzentration im Substrat etwa doppelt so hoch wie in dem Versuchsblock zum Einfluss des Schlammalters, in dem eine Zyklusdauer von 12 h genutzt wurde. Ein Einfluss der Substratkonzentration auf die bessere Performance, der unter einer Zyklusdauer von 6 statt 12 h ausgewählten Biozönose, kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Daher kann möglicherweise auch mit einer Zyklusdauer von 12 h eine gute bzw. vergleichbare PHA-Produktion erreicht werden, jedoch konnte ebenfalls eine gute Eignung einer Zyklusdauer von 6 h gezeigt werden.

Bei der Untersuchung zwei höherer Raumbelastungen von 6 und 10 g/(L*d) im Vergleich zu den, ansonsten in den Selektionsversuchen mit realem Substrat in dieser Arbeit, verwendeten 0,5 und 1 g/(L*d) wurde eine schlechte PHA-Produktionsperformance in beiden Versuchen festgestellt. Jedoch wurde ebenfalls ein Verlust an Biomasse im System beobachtet. Nur bei dem Versuch mit einer Raumbelastung von 6 g/(L*d) kam es zwischenzeitig zu einem Anstieg des Feststoffgehaltes in den Reaktoren, sodass insgesamt auch nicht von einem bevorzugten Wachstum ausgegangen werden kann (Zimmer und Steinmetz 2024). Dies deutet auf einen Überschuss an Substrat und eine Substratinhibierung hin (Li et al. 2024). In der Literatur werden jedoch zumeist solch hohe oder sogar noch höhere Raumbelastungen verwendet (Dionisi et al. 2006; Matos et al. 2021b, 2021a; Crognale et al. 2022). Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass die Raumbelastung mit der Zyklusdauer, dem Schlammalter und dem Biomassewachstum zusammenhängt. Bei Erhöhung der Raumbelastung ohne Erhöhung der Zyklusdauer kann es zu einer Abnahme des Selektionsdrucks und zu einer verminderten Selektion an PHA-Produzenten in der Mischkultur kommen, da aufgrund eines länger verfügbaren Substrates auch ein Wachstum der anderen Bakterien in der Kultur während der famine-Phase möglich ist (Nguyenhuynh et al. 2021). Die Zyklusdauer ist daher ebenfalls abhängig von der Raumbelastung und den anderen Faktoren, sodass unterschiedliche Zyklusdauern in der Literatur je nach Wahl der Raumbelastung nicht unbedingt vergleichbar sind und umgekehrt. Ein präferiertes Wachstum wurde zudem bei sehr niedrigen Zyklusdauern und Schlammaltern festgestellt (Dionisi et al. 2007; Johnson et al. 2010a). In anderen Studien wurden jedoch Raumbelastungen genutzt, welche mit Werten zwischen 1-3 g/(L*d) vergleichbar mit den in dieser Arbeit genutzten Raumbelastungen der weiteren Selektionsversuche waren (Farghaly et al. 2017; Pittmann und Steinmetz 2017; Jayakrishnan et al. 2020; Wen et al. 2021; Zhou et al. 2023; Guarda et al. 2024). Dabei zeigte sich zumeist eine mittlere Raumbelastung als am besten geeignet. Wen et al. (2021) beispielsweise fanden eine bessere PHA-Produktionsperformance bei 2 g/(L*d) im Vergleich zu 1,2 und 2,8 g/(L*d). In den Versuchen von Pittmann und Steinmetz (2017) hingegen, war eine Raumbelastung von 1,2 g/(L*d) gegenüber einer Raumbelastung von 2 g/(L*d) vorteilhaft für die PHA-Produktion. Zudem spielt dabei das Verhältnis der Substratkonzentration mit der Biomassekonzentration im System eine wichtige Rolle, da eine hohe Raumbelastung bei geringer Schlammkonzentration im Reaktor zu einer erhöhten Substratverfügbarkeit führt (Wu et al. 2019). Diese als Schlammbelastung bezeichnete, auf die Schlammkonzentration bezogene, Raumbelastung (Miwa et al. 2022), wird in der Literatur zur PHA-Herstellung mittels Mischkulturen und Restströmen nach derzeitigem Kenntnisstand nicht betrachtet, ist allerdings im Belebtschlammverfahren auf

Kläranlagen ein wichtiger Parameter (Lobos et al. 2008; Yuan et al. 2015; Ahnert et al. 2021). Eine kontinuierliche Messung der Feststoffkonzentration in den Reaktoren mit flexibler Anpassung der Raumbelastung, anstatt einer entkoppelten Betrachtung dieser Faktoren, wäre daher vorteilhaft. In den eigenen Versuchen wurde zumeist eine Abnahme der Feststoffkonzentration in den Reaktoren über den Zusammenhang der Selektion beobachtet (Zimmer und Steinmetz 2024), was die Schlammbelastung im Verlauf der Versuche demnach erhöhte. Insgesamt wird die Biomassekonzentration in den Reaktoren ebenfalls selten in anderen Studien gemessen oder thematisiert. Lediglich Chen et al. (2017) und Wen et al. (2021) untersuchten diese und sie stellten ebenfalls eine Abnahme über die Selektion hin fest, jedoch stabilisierte sich die Feststoffkonzentration nach einer Selektionsdauer von 30-40 Tagen bei den Untersuchungen von Chen et al. (2017) in fast allen Reaktoren wieder, wohingegen sie bei Wen et al. (2021) bei einem niedrigen Wert blieb. Liu et al. (2024) beobachteten ebenfalls eine instabile Feststoffkonzentration über die Selektion, wobei mit zunehmender PHA-Produktivität verschlechterte Sedimentiereigenschaften des Schlammes beobachtet wurden. Auch sie stellten eine spontane Regeneration dieser nach etwa einer Woche fest, allerdings nahm nach 60 Tagen der Selektion der SVI („sludge volume index“), der ein Maß für Sedimentiereigenschaften darstellt, wieder rapide zu. Eine Betrachtung des Verlaufes der Biomassekonzentration in den Reaktoren in zukünftigen Studien sowie eine Entwicklung einer angepassten Substratzugabestrategie und die Untersuchung der Zyklusdauer in Zusammenhang mit anderen Faktoren wären daher sinnvoll. Die in dieser Arbeit ermittelte geeignetere Raumbelastung von ca. 1 g/(L*d) kann demnach bei einer geringen Feststoffkonzentration und einer kurzen Zyklusdauer günstig sein und gute PHA-Gehalte erzielen.

Die PHA-Zusammensetzung zeigte in der Regel keinen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Betriebsbedingungen, allerdings über die Zeit. Zumeist zeigte sich eine Zunahme des HB-Anteils im PHA im Verlauf der Selektion. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum und spricht ebenfalls für eine metabolische Anpassung der Mischbiozönose in der Selektion. Diese zeitliche Veränderung der PHA-Zusammensetzung wurde nach derzeitigem Kenntnisstand noch nicht von anderen Autoren beobachtet. Die sich nicht zwischen verschiedenen Betriebsparametern unterscheidende Polymerzusammensetzung widerspricht den Ergebnissen einer anderen Studien, in welcher ein erhöhter HV-Anteil mit höherer Raumbelastung und ein verminderter HV-Anteil bei zu hoher Raumbelastung gefunden wurde (Crognale et al. 2022). In anderen Untersuchungen jedoch, wurde ebenfalls kein Unterschied in der PHA-Zusammensetzung zwischen unterschiedlichen Betriebsbedingungen festgestellt (Oliveira et al. 2017; Guarda et al. 2024).

Einfluss der Betriebsparameter auf die Bakterienzusammensetzung

Die mikrobiellen Mischbiozöten entwickelten sich unter den unterschiedlichen Betriebsparametern im Gesamten größtenteils unterschiedlich, sie wiesen jedoch einen Kern an abundanten Organismen auf, der zwischen den Untersuchungen starke Überschneidungen zeigte. In allen Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern zeigte das Inokulum eine ähnliche Zusammensetzung zu Beginn der Selektion. Die zu Beginn abundanten Taxa wiesen jedoch im Verlauf der Selektionsphase jeweils eine Abnahme in ihrer relativen Abundanz auf, dafür nahmen Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion in der relativen Abundanz zu. Die dominanten Organismen zeigten zudem über den Selektionsverlauf meist eine Änderung in der relativen Abundanz. Andere Studien zum Einfluss der Betriebsparameter auf die Bakterienzusammensetzung fanden ebenfalls eine unterschiedliche Entwicklung dieser infolge unterschiedlicher Parameter in der Selektion (Lemos et al. 2008; Carvalho et al. 2014; Moretto et al. 2020; Matos et al. 2021b; Crognale et al. 2022; Guarda et al. 2024).

Matos et al. (2021b) und Guarda et al. (2024) untersuchten den Einfluss des Schlammalters auf die Zusammensetzung der Mischbiozöten und der PHA-Produktion. In der Studie von Guarda et al. (2024) wurde die Selektion in vier Phasen durchgeführt, wobei drei unterschiedliche Kombinationen von Schlammalter (2 und 4 d) und Raumbelastung (40 und 60 Cmmol/(L*d)) getestet wurden und alle Variationen in derselben Biomasse stattfanden. Sie betrachteten ebenfalls den zeitlichen Verlauf der bakteriellen Zusammensetzung und stellten eine Stabilität innerhalb jeder Phase fest. Es waren in allen Phasen die gleichen Taxa unter den dominantesten Organismen, allerdings variierten die jeweiligen relativen Abundanzen. Matos et al. (2021b) verglichen zwei Schlammalter (4 und 2 d) in zwei separaten Reaktoren, allerdings untersuchten sie den Einfluss der Raumbelastung unter schrittweiser Erhöhung (6,3, und 12,3 bzw. 6,3, 12,9 und 14,5 gCSB/(L*d)) dieser im jeweils gleichen Reaktor. Bei einem Schlammalter von 2 d wurde unter Erhöhung der Raumbelastung eine zunehmende Abundanz potenzieller PHA-Produzenten festgestellt, jedoch wurde ein Wachstum bevorzugt und die PHA-Produktivität war schlechter als bei einem Schlammalter von 4 d. Bei diesem war die höchste Abundanz potenzieller PHA-Produzenten bei der niedrigsten Raumbelastung zu finden. Unter beiden Schlammaltern und allen verwendeten Raumbelastungen entwickelten sich die Bakterienmischkulturen unterschiedlich. Bei einem Schlammalter von 4 d dominierten bei der niedrigsten Raumbelastung die Gattung *Paracoccus**, bei der höheren, neben *Paracoccus**, die Taxa *Amaricoccus**, *Brevundimonas**, *Flavobacterium** und Rhodobacteraceae*, Comamonadaceae*. Bei einem Schlammalter von 2 d dominierten bei der niedrigsten

Raumbelastung die Taxa *Flavobacterium**, Rhizobiales*, *Pseudoxanthomonas** und Xanthobacteraceae*, bei der mittleren *Paracoccus** sowie Rhodobacteraceae* und bei der hohen *Lampropedia**, *Amaricoccus** und Rhodobacteraceae*. Einige dieser Taxa wurden auch in den Versuchen dieser Arbeit mit Schlammaltern von 2 und 4 d, darunter u.a. auch in den Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer, gefunden, auch wenn die Raumbelastungen höher als die in dieser Arbeit genutzten waren. In den beiden Schlammalterversuchen war die Gattung *Pseudomonas** dominant in den Mischkulturen. Zum Ende der Selektion mit dem Schlammalter von 2 d war daneben *Acinetobacter** einer der dominanten Organismen, während im Versuch mit einem Schlammalter von 4 d nach 28 Tagen der Selektion *Paracoccus** der dominanteste Organismus war. Die potenziellen PHA-Produzenten *Zoogloea**, *Hydrogenophaga** waren zudem mehr mit dem Schlammalter von 2 d assoziiert, während *Comamonas**, *Thauera** dominanter in der Biozönose mit einem Schlammalter von 4 d waren. Die Gattungen *Acinetobacter**, *Flavobacterium** und *Rhodobacter** gehörten in beiden Versuchen zu den abundantesten Organismen, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

In den beiden Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Zyklusdauern und einem Schlammalter von 4 d entwickelten sich die Zusammensetzungen der beiden Biozönosen ebenfalls über den Selektionsverlauf unterschiedlich, wobei es teils Ähnlichkeiten in den abundantesten Organismen gab. In beiden Versuchen waren die Gattung *Paracoccus** und Vertreter der Familie Rhodocyclaceae* sehr stark vertreten. Die Gattung *Flavobacterium** und die Familie der Comamonadaceae* gehörten in beiden Versuchen ebenfalls zu den wichtigsten potenziellen PHA-Produzenten. Zudem waren die Gattungen *Comamonas**, *Pseudomonas** und *Leadbetterella** im ersten Zyklusdauerexperiment (24 h) unter den abundantesten Taxa, während es im zweiten Versuch (6 h) eher die Gruppen *Acinetobacter** und Actinomycetales* waren. Der Einfluss der Zyklusdauer auf die Zusammensetzung der Biozönose ist kaum untersucht. Bei Untersuchungen zum Einfluss der Zyklusdauer in Kombination mit dem Schlammalter (1 und 2 d, 6 und 12 h) wurde unter Verwendung des kürzesten Schlammalters von 1 d und der längsten Zyklusdauer von 12 h die Biozönose mit der besten PHA-Produktionsperformance selektiert (Moretto et al. 2020). Dabei waren die Gattungen *Paracoccus** und *Flavobacterium** die dominanten Organismen unter diesen Betriebsbedingungen. In den Versuchen mit einem Schlammalter von 1 d und einer Zyklusdauer von 6 h sowie einem Schlammalter von 2 d und einer Zyklusdauer von 12 h dominierten die Gattungen *Brevundimonas**, *Exiguobacterium** und *Thauera**. Ein häufiger Organismus in den Versuchen mit geringem Schlammalter von 1 d und beiden Zyklusdauern war *Leadbetterella**. Im Versuch mit der geringsten PHA-Produktion, einem Schlammalter von 2 d und einer Zyklusdauer von 6 h waren die abundantesten Organismen

u.a. *Rhodobacter** und *Thauera** (Moretto et al. 2020). Das Vorkommen der Gattung *Paracoccus** bei dem geringen Schlammalter und der höheren Zyklusdauer steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit und denen von Lemos et al. (2008). *Thauera**, *Rhodobacter** und *Flavobacterium** hingegen kamen bei allen Zyklusdauern in den Selektionsversuchen dieser Arbeit vor. Die Gattung *Zoogloea** war ein Indikator für die beiden Schlammalter und die kürzere Zyklusdauer, während *Paracoccus** ein Indikator für beide Zyklusdauern und das Schlammalter von 4 d war.

In den beiden Versuchen mit höheren Raumbelastungen in dieser Arbeit (10 und 6 g/(L*d)) entwickelte sich die Biozönose, trotz der ähnlichen Startbiozönose, sehr unterschiedlich zu den anderen Versuchen und zueinander. Auch über die Selektionsdauer zeigten sich starke Variationen in der mikrobiellen Zusammensetzung innerhalb jedes Versuches. Die in dieser Arbeit insgesamt häufig vorkommenden PHA-Produzenten zeigten eine Präferenz für niedrigere Raumbelastungen. Die beiden höheren Raumbelastungen, insbesondere die höchste, führten größtenteils zu einer Selektion einer anderen Biozönose. *Wautersiella* und *Rummeliibacillus* waren Indikatoren für die höchste Raumbelastung von 10 g/(L*d), *Xanthobacter** und die Gruppe Beijerinckiaceae* für die Raumbelastung von 6 g/(L*d). Die potenziellen PHA-Produzenten *Thiothrix**, *Thauera** und *Rhodobacter** waren u.a. Indikatoren für beide Schlammalter- und beide Zyklusdauerexperimente. Die Gattungen *Hydrogenophaga** und *Flavobacterium** sowie die Gruppen Caulobacteriaceae*, Rhizobiales* und Rhodocyclaceae* waren Indikatoren für alle Versuche, außer den Versuch mit der höchsten Raumbelastung. Die Gruppen Comamonadaceae*, Rhodospirillaceae*, Rhodobacteraceae*, *Acinetobacter** und *Comamonas** waren Indikatoren für alle Versuche. Insgesamt zeigte sich eine ähnlichere Entwicklung der Zusammensetzung der Biozönosen in den Schlammalter- und Zyklusdauerexperimenten im Vergleich zu den beiden Raumbelastungsversuchen. Andere Forschungsgruppen stellten ebenfalls Unterschiede in der Zusammensetzung der Mischbiozönose bei verschiedenen Raumbelastungen fest (Matos et al. 2021b; Crognale et al. 2022; Guarda et al. 2024). Carvalho et al. (2014) fanden in ihren Studien, unter Betrachtung einzelner Zielorganismen mittels FISH, ein erhöhtes Vorkommen der Gattung *Thauera** bei der höchsten untersuchten Raumbelastung von 120 Cmmol/(L*d) im Vergleich zu 90 und 60 Cmmol/(L*d), wohingegen die Gattung *Paracoccus** eine Präferenz für die mittlere Raumbelastung von 90 Cmmol/(L*d) zeigte. Lemos et al. (2008) hingegen fanden keinen Einfluss der Raumbelastung oder des Schlammalters auf das Vorkommen der Gattung *Thauera**, nur die Art des Substrates wirkte sich auf dieses aus. Sie fanden zudem in keinem der Reaktoren mit unterschiedlicher Raumbelastung und unterschiedlichem Schlammalter sowie verschiedenen Substraten hohen Abundanzen der Gattung *Paracoccus**. Die verwendeten Raumbelastungen entsprachen denen der Studie

von Carvalho et al. (2014), jedoch lagen die Schlammalter in diesen Versuchen bei 1 d und 10 d. Möglicherweise stellen diese ungeeignete Schlammalter für die Selektion von *Paracoccus** dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf ein bevorzugtes Vorkommen von *Paracoccus** bei einem Schlammalter von 4 d im Vergleich zu 2 d in der Selektion hin. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Gattung ein mittleres Schlammalter präferiert. Die Raumbelastung scheint insgesamt ein kritischer Faktor in der Selektion einer PHA-produzierenden Mischbiozönose zu sein. Einerseits konnte hinreichend gezeigt werden, dass eine zu hohe oder zu niedrige Raumbelastung für die Selektion sowie PHA-Produktion von Nachteil ist (Albuquerque et al. 2010; Matos et al. 2021b; Wen et al. 2021; Crognale et al. 2022), andererseits wurde in dieser Arbeit der gravierendste Einfluss dieses Parameters auf die Entwicklung der Biozönose festgestellt. Sie bestimmt maßgeblich den Selektionsdruck im System mit und hängt mit anderen Faktoren wie dem Schlammalter und der Zyklusdauer zusammen. Die Wahl des richtigen Maßes spielt dabei eine große Rolle, da die Raumbelastung ausreichend für ein gutes Wachstum sein muss, allerdings nicht zu hoch sein darf, da dies zu einer Substratinhibierung führen kann und nachteilig für einen hohen Selektionsdruck sein kann (Chen et al. 2015b; Nguyenhuynh et al. 2021; Li et al. 2024). Sie scheint zudem, wie auch in anderen Studien gezeigt wurde, einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der Biozönose zu haben.

Die hier gefundenen, dominanten Organismen kamen teilweise ebenfalls in weiteren Studien mit anderen verwendeten Betriebsparametern vor. Daten aus der Literatur zu den Präferenzen der einzelnen Organismen und dem Zusammenhang des Vorkommens dieser in bestimmten Betriebsbedingungen liegen bisher kaum vor oder sie zeigen kein eindeutiges Bild. Einige PHA-Produzenten scheinen sich in einem breiten Spektrum an Selektionsbedingungen durchsetzen zu können. Zudem sind die genauen Bedingungen zur Selektion spezifischer Organismen in einer Mischkultur schwierig zu bestimmen, da komplexe Interaktionen zwischen den Organismen und mit den Umweltfaktoren stattfinden. Die breiten Spannen der untersuchten Variablen sprechen allerdings für eine Robustheit und gute Eignung der Organismen zur PHA-Produktion. Weitere Forschung zu dem Vorkommen bestimmter Organismen unter bestimmten Betriebsbedingungen und der Sensitivität der Biozönose gegenüber Veränderungen im Prozess sind notwendig.

4.1.2 Kernorganismen

Trotz der teils unterschiedlichen Entwicklung der Biozönose unter variierenden Betriebsparametern, zeigten diese Überschneidungen zwischen den dominantesten potenziellen PHA-Produzenten, sie variierten jedoch in ihrer relativen Abundanz im

zeitlichen Verlauf der verschiedenen Selektionen. Hierzu zählten die Gattungen *Acinetobacter**, *Pseudomonas**, *Paracoccus**, *Comamonas**, *Flavobacterium**, *Zoogloea**, *Rhodobacter**, *Leadbetterella** und *Hydrogenophaga**.

Die Gattung *Acinetobacter** gehört zu der Familie der Moraxellaceae innerhalb der Gammaproteobacteria und umfasst stäbchenförmige (0,9-1,6 x 1,5–2,5 µm), paarweise vorkommende, nicht-motile, strikt aerobe, gram-negative Organismen. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt im mesophilen Bereich. Sie bilden zudem mukoide Kapseln aus und wachsen bevorzugt auf definierten Kohlenstoffquellen wie beispielsweise Acetat (Nemec 2015). Eine konstante Substratzusammensetzung könnte daher für sie von Vorteil sein. Sie werden mit hohen PHA-Ausbeuten in Verbindung gebracht (Liu et al. 2013). Ihre Fähigkeit zur PHA-Produktion wurde in verschiedenen Studien gezeigt (Sabapathy et al. 2018; Anburajan et al. 2019) und sie wurde in hoher Abundanz in PHA-akkumulierenden Systemen nachgewiesen (Liu et al. 2013; Yang et al. 2013; Correa-Galeote et al. 2022; Clagnan und Adani 2023). Dabei wurde die Fähigkeit zur Produktion von PHBV-Copolymeren festgestellt (Sabapathy et al. 2018). Zudem wurde auch die Verwendung eines Lipidreichen Substrates als geeignet zur Nutzung durch diese Gattung angesehen (Snellman et al. 2002; Correa-Galeote et al. 2022). Die Gattung *Pseudomonas** gehört ebenfalls zur Klasse der Gammaproteobacteria. Sie befindet sich in der Familie der Pseudomonadaceae und umfasst gram-negative, stäbchenförmige (0,5-1,0 x 1,5-5,0 µm), motile, strikt aerobe, chemoorganotrophe Organismen, die teilweise auch Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen können (Palleroni 2015). Die Gattung ist bekannt für die Fähigkeit PHA zu produzieren (Yao et al. 1999; Koller et al. 2017; Crognale et al. 2019), wobei sie eine PHA-Synthase der Klasse II besitzt und präferiert MCL-Polymere synthetisiert (Preusting et al. 1993; Silva-Queiroz et al. 2009; Ciesielski et al. 2010; Huang et al. 2012; Yang et al. 2013; Chek et al. 2019; Manoli et al. 2022). *Paracoccus** ist eine Gattung gram-negativer, sphärischer oder stäbchenförmiger (0,5-0,9 x 1,1-1,3 µm), einzeln- oder in kleinen Clustern vorkommender, aerober, chemoorgano- oder chemoautolithotropher, teilweise denitrifizierender Organismen innerhalb der Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria) (van Spanning et al. 2015). Die Fähigkeit zur PHA-Produktion dieser Gattung wurde oftmals gezeigt und sie war häufig Zielorganismus der Erforschung der PHA-Produktion in mikrobiellen Mischbiozönosen (Lemos et al. 2008; Albuquerque et al. 2013; Carvalho et al. 2014; Queirós et al. 2014; Queirós et al. 2017; Carvalho et al. 2018; Wen et al. 2021; Zhou et al. 2023). Eine Herstellung von PHBV-Copolymeren durch diese Gattung wurde gezeigt (Kim et al. 1997). Zudem konnte festgestellt werden, dass sie eine Substratpräferenz für Butyrat, Valerat und Propionat

gegenüber Acetat besitzt und dass sie einen höheren Anteil an HB produzieren kann (Albuquerque et al. 2013; Wang et al. 2020). Die Gattung *Comamonas**, welche zur Familie der Comamonadaceae innerhalb der Betaproteobacteria gehört, enthält stäbchen- oder spirillenförmige (0,3-0,8 x 1,1-4,4 µm), einzeln oder in Paaren vorkommende, gram-negative Bakterien. Mit Ausnahme einer Spezies sind alle Arten durch den Besitz von Flagellen motil. Die meisten sind chemoorganotroph, manche können Nitrat oder Eisen-III-Ionen als Elektronenakzeptor nutzen und die wenigsten besitzen die Fähigkeit zur Denitrifikation. Sie wachsen hauptsächlich auf organischen Säuren und Aminosäuren und weniger auf zuckerhaltigen Substraten (Willems und Gillis 2015a; Dueholm et al. 2022). Zudem wurde ihr Vorkommen als abundanter PHA-Produzent mehrfach festgestellt und die Fähigkeit zur PHA-Produktion wurde gezeigt (Dionisi et al. 2006; Oshiki et al. 2008, 2013; Fra-Vázquez et al. 2019), wobei die Spezies *Comamonas acidovorans* die Fähigkeit besitzt, unter Verwendung von 1,4-Butandiol oder 4-Hydroxybuttersäure als Substrat, Copolymere aus 3HB und 4HB herzustellen (Saito und Doi 1994). *Flavobacterium** wird häufig in PHA-produzierenden Mischkulturen gefunden (Dionisi et al. 2005a; Albuquerque et al. 2013; Wang et al. 2017; Moretto et al. 2020; Correa-Galeote et al. 2022; Clagnan und Adani 2023), allerdings ist die Rolle dieser Gattung in diesen Systemen nicht gänzlich aufgeklärt. Manche Autoren listen sie als PHA-Produzenten (Steinbüchel 1991; Dionisi et al. 2005a; Queirós et al. 2017; Correa-Galeote et al. 2022), manche jedoch nicht (Wang et al. 2017; Clagnan und Adani 2023), da die Fähigkeit erst einmal nachgewiesen wurde (Tezuka 1969). Die Gattung gehört zur Familie der Flavobacteriaceae in der Klasse der Flavobacteriia. Die Bakterien kommen als einzelne Stäbchen (0,3-0,5 x 2-5 µm), manchmal filamentös (10-40 µm), vor, sie sind nicht beweglich 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 proteolytische Tätigkeit auf (Bernardet und Bowman 2015). Die Gattung *Zoogloea** gehört zur Familie der Rhodocyclaceae innerhalb der Betaproteobacteria. Sie sind stäbchenförmig (1,0-1,3 x 2,1-3,6 µm) und in jungen Kolonien durch Besitz eines Flagellums motil, jedoch bilden sie in späteren Koloniestadien gelatinöse Flocken oder Biofilme (sog. Zoogloeen) aus. Des Weiteren sind sie strikt aerob und nutzen Sauerstoff oder Nitrat als Elektronenakzeptor. Als Substrat werden Salze von organischen oder aromatischen Säuren sowie Aminosäuren genutzt und die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 28-37 °C, der optimale pH-Wert liegt zwischen 7 und 7,5 (Unz 2015). Die Gattung ist bekannt für ihre Fähigkeit PHA zu produzieren (Oshiki et al. 2008; Jiang et al. 2011b; Huang et al. 2012; Oshiki et al. 2013; Coats et al. 2016; Janarthanan et al. 2016). Die Gattung *Rhodobacter** ist ebenfalls ein bekannter PHA-Produzent (Jiang et al. 2009;

Ciesielski et al. 2010; Yang et al. 2012; Oshiki et al. 2013; Queirós et al. 2017; Crognale et al. 2022). Dabei synthetisiert *Rhodobacter** SCL-PHA, insbesondere PHB (Brandl et al. 1991; Ciesielski et al. 2010). Die Gattung gehört zu den Rhodobacteraceae innerhalb der Klasse der Alphaproteobacteria. Die Bakterien sind ovoid oder stäbchenförmig, gram-negativ und motil durch ein polares Flagellum oder non-motil. Zudem können sie Kapseln oder Biofilme bilden (Imhoff 2015). Sie besitzen einen vielseitigen Stoffwechsel und können photoorganotroph, photolithotroph, chemoheterotroph oder chemolithoautotroph wachsen. Sie nutzen außerdem Zucker wie Pyruvat, Succinat, Lactat zur aeroben Atmung (Dueholm et al. 2022). Die Gattung *Hydrogenophaga** zählt zu den Comamonadaceae innerhalb der Betaproteobacteria (Willems und Gillis 2015b). Ihre Fähigkeit zur PHA-Produktion ist bekannt und sie wurde teilweise auch in anderen selektierten PHA-produzierenden Mischbiozönosen als abundantes Taxon festgestellt (Sheu et al. 2000; Huang et al. 2012; Valentino et al. 2014; Crognale et al. 2019; Moretto et al. 2020; Zhou et al. 2023). Es wurde zudem gezeigt, dass sie in Reinkulturen Copolymere aus 3HB, 3HV und 4HB herstellen kann (Choi et al. 1999; Choi et al. 2003) sowie dass sie diese aus Zuckern wie Saccharose und Lactose synthetisieren kann (Povolo et al. 2013). Diese Gattung zeigte in anderen Studien zur PHA-Produktion mittels Mischkulturen ein gutes Wachstum bei höheren Temperaturen (30 °C), einer niedrigen Zykluslänge (6 h) und bei Vorhandensein von LCL-VFA (Valentino et al. 2018; Crognale et al. 2019). Es handelt sich bei den Organismen dieser Gattung um stäbchenförmige (0,3-0,6 x 0,6-5,5 µm), gram-negative, aerobe Bakterien. Sie kommen einzeln oder in Paaren vor, sind durch ein polares Flagellum motil. Sie sind chemoorganotroph oder chemolithoautotroph und zwei Spezies sind zur Denitrifikation in der Lage (Willems und Gillis 2015b). Die Gattung *Leadbetterella** zählt zu den Spirosomataceae innerhalb der Klasse der Cytophagia. Die Bakterien dieser Gattung sind stäbchenförmig (0,6-0,9 x 2-7 µm), non-motil und strikt aerob (Whitman 2015). Diese Gattung enthält nur eine bekannte Spezies, *Leadbetterella byssophila*, und wurde ebenfalls häufig als abundanter PHA-Produzent in selektierten Mischbiozönosen gefunden (Coats et al. 2016; Morgan-Sagastume et al. 2019; Moretto et al. 2020; Clagnan und Adani 2023; Guarda et al. 2024). Zudem wurde ihre Fähigkeit zur Produktion von 3HB-3HH-Copolymeren in Reinkultur gezeigt (Shen et al. 2015).

Trotz der unterschiedlichen Betriebsparameter anderer Studien und dieser Arbeit gibt es einige PHA-produzierende Organismen, die sich häufig in den selektierten Mischbiozönosen durchsetzen. Allerdings gibt es zwischen verschiedenen Studien und Betriebsparametern Unterschiede im Vorkommen und der Abundanz dieser. Zudem sind ebenfalls in anderen Untersuchungen andere Organismen dominant. Das Durchsetzen bestimmter PHA-Produzenten unter bestimmten Bedingungen ist daher schwierig

vorhersagbar. Da Mischkulturen außerdem komplexe Systeme sind, in denen viele Faktoren und inter- sowie intraspezifische Interaktionen von Bedeutung sind, ist eine eindeutige Festlegung von Parametern zur Selektion bestimmter einzelner Organismen umso schwieriger. Jedoch scheint die Identifizierung von Kernorganismen trotzdem eine gute Möglichkeit zur Beurteilung der Selektion zu sein, da es einige PHA-Produzenten gibt, die häufig in solchen Systemen dominant sind und diese scheinen ein breites Spektrum an Parametern tolerieren zu können. Der Ansatz der Detektion und Untersuchung von Kernorganismen in den Mischkulturen bietet die Möglichkeit unter geringem Aufwand eine flexible Anpassung der Betriebsparameter vorzunehmen. Zudem kann bei Kenntnis der Kern-PHA-Produzenten eine gezielte Untersuchung der Präferenzen und Eigenschaften dieser Organismen in Mischkulturen vorgenommen werden, um die Parameter anpassen und optimieren zu können. Hierzu bedarf es jedoch noch weiterer Forschung. Mithilfe der Identifizierung von Kernorganismen können Methoden zum selektiven Monitoring dieser in der Mischkultur weiterentwickelt werden. Durch das Design spezifischer Sonden und Primer kann beispielsweise eine schnelle Detektion und Quantifizierung der Organismen mittels qPCR, dPCR oder qFISH stattfinden. Zudem kann durch Kenntnis der Gensequenz für die PHA-Synthase im jeweiligen Organismus nicht nur dessen Vorkommen, sondern auch die Expression dieses Gens im PHA-Produktionsprozess mithilfe dieser Methoden ermittelt werden. Solche Untersuchungen wurden bisher zwar schon durchgeführt, aber es wurden oftmals nur einzelne oder wenige Organismen betrachtet (vgl. Kapitel 1.4). Aufgrund der hohen zeitlichen Dynamik in der Mischkultur während der Selektionsphase, sollte allerdings eine Untersuchung mehrerer Kernorganismen gleichzeitig erfolgen. Die hier gefundenen Kernorganismen stellen einen Ansatz zur weiteren Untersuchung dar, die Identifizierung der jeweils wichtigen Organismen im betrachteten System sind jedoch trotzdem empfehlenswert.

4.1.3 Effektivität und Dauer der Selektionsphase

In allen Selektionsversuchen konnte eine effektive Selektion und Anreicherung potenzieller PHA-Produzenten erfolgen. Dies zeigte sich zum einen in der Abnahme der Diversität und der Abnahme der Komplexität der Biozönose, und zum anderen in der Zunahme der relativen Abundanz von Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion bei gleichzeitiger Abnahme der relativen Abundanz von Gruppen ohne diese Fähigkeit. Nach erfolgreicher Selektion lag der Anteil potenzieller PHA-Produzenten bei ca. 50-75 %. Eine Abnahme der Biodiversität und eine Erhöhung der relativen Abundanz von PHA-Produzenten während der Selektionsphase konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (Huang et al. 2018a; Correa-Galeote et al. 2022; Zhou et al. 2023; Guarda et al. 2024; Liu et al. 2024).

Zumeist war in den Selektionsversuchen dieser Arbeit bereits nach 7 bis 14 Tagen ein hoher Anteil potenzieller PHA-Produzenten in den Biozönosen erreicht. Der PHA-Gehalt zeigte ebenfalls den stärksten Anstieg in diesem Zeitraum. Dies scheint daher ein geeigneter Zeitraum für eine effektive Selektion zu sein. Der Verlauf der PHA-Produktion korrelierte jedoch nicht in jedem Fall mit dem Anteil potenzieller PHA-Produzenten. Insbesondere im Versuch mit den beiden hohen Raumbelastungen zeigte sich zwar eine Zunahme der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten über die Selektion, allerdings blieb der PHA-Gehalt insgesamt gering. Dies zeigt, dass das Vorkommen PHA-produzierender Organismen nicht unbedingt auch zu einer PHA-Produktion führt. Im Fall dieser beiden Versuche ist von einer Substratinhibierung auszugehen. Weiterhin muss die Methodik der Untersuchung der Biozönose berücksichtigt werden. Eine Identifizierung bis auf Artebene ist mit der Methode des Metabarcodings der V3-V4-Region der 16S rDNA oft nicht möglich, auch die Auflösung bis auf Gattungsebene ist teils schwierig (Bukin et al. 2019; Catozzi et al. 2020). Eine zusammenfassende Betrachtung aller Taxa, die PHA-Produzenten enthalten, fand in diesen Versuchen statt, sodass auch Taxa ohne diese Fähigkeit mit inbegriffen sein können. Eine Anreicherung potenzieller PHA-Produzenten über die Selektionsphase kann dennoch aus den Ergebnissen geschlossen werden. Bei der Untersuchung der Dynamik der Mischbiozönose über den Selektionsverlauf in den unterschiedlichen Versuchen zeigte sich zudem, dass zu verschiedenen Zeitpunkten ein Wechsel der dominanten Organismen in der Mischkultur stattfand. Dabei kam es beispielsweise zu einer Abnahme der relativen Abundanz der Gattung *Acinetobacter** in Kombination mit einer Zunahme der relativen Abundanz der Gattung *Flavobacterium** im Selektionsversuch mit Inokulum 3, jedoch wiesen der Anteil potenzieller PHA-Produzenten sowie die PHA-Produktion trotz dieser Änderung in der Dominanz der potenziellen PHA-Produzenten eine gewisse Stabilität auf. Diese funktionelle Redundanz wurde ebenfalls in anderen Studien beobachtet (Coats et al. 2016; Carvalho et al. 2018; Huang et al. 2018a; Crognale et al. 2019; Clagnan und Adani 2023). Dies zeigt, die Robustheit und Stabilität des Prozesses. Auch konnten sich sowohl der Anteil potenzieller PHA-Produzenten als auch der PHA-Gehalt nach einem Betriebsfehler im Selektionsversuch mit Inokulum 1 wieder regenerieren, was auf eine starke Resilienz der Biozönose hindeutet.

4.2 Langzeitstabilität

Mit der aus den Selektionsversuchen ausgewählten Betriebsparameterkombination wurde ein Langzeit-Selektionsversuch zur Untersuchung der Stabilität der PHA-Produktion sowie der mikrobiellen Mischkultur durchgeführt.

4.2.1 Verlauf der PHA-Produktion und -zusammensetzung

Wie bereits in den Versuchen zum Einfluss verschiedener Betriebsparameter in der Selektion beobachtet, zeigte sich eine hohe PHA-Produktion bereits nach 7 Tagen der Selektion. Hier war jedoch eine weitere Steigerung des produzierten PHA-Gehaltes bis an Tag 56 zu beobachten. An diesem Tag konnte mit ca. 48 % der höchste PHA-Gehalt in dieser Arbeit unter Verwendung von realem Substrat erzielt werden. Er ist vergleichbar mit den in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum erzielten PHA-Gehalten, unter Nutzung von synthetischem Substrat. Obwohl die Substratkonzentration des zweiten Substrates, nach dem Substratwechsel, in einer halb so hohen Raumbelastung resultierte, war zwischen beiden Phasen kein signifikanter Unterschied in der PHA-Produktion festzustellen. Lediglich der Substratwechsel sowie der zweite Betriebsfehler führten zu kurzzeitigen verschlechterten PHA-Produktionen, die sich allerdings wieder regenerierten. Dies spricht erneut für eine Anpassung der mikrobiellen Mischbiozönose und eine Resilienz des Systems. Der Anteil potenzieller PHA-Produzenten war ebenfalls nicht unterschiedlich zwischen den beiden Phasen und er korrelierte mit der PHA-Produktion. Matos et al. (2021b) stellten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Anteil der PHA-Produzenten und dem produzierten PHA-Gehalt fest. Allerdings kam es bereits vor dem Substratwechsel im Langzeitversuch dieser Arbeit zu einem Einbruch in der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten. Der Grund hierfür ist jedoch unklar. Der kurzzeitig geringere PHA-Gehalt könnte also auch Folge dieser Beobachtung sein und muss nicht zwangsläufig durch den Substratwechsel zustande gekommen sein. Auch nach der fehlerhaften Substratdosierung an Tag 76 kam es zu einem Einbruch im Anteil potenzieller PHA-Produzenten, wenngleich der PHA-Gehalt zu diesem Zeitpunkt erneut anstieg. Wie im Kapitel zuvor bereits erwähnt, spiegelt der Anteil potenzieller PHA-Produzenten, auch wenn er einen guten Einblick in die Selektion gibt, aufgrund gewisser Ungenauigkeiten nicht exakt die tatsächliche PHA-Produktion wider. Die PHA-Zusammensetzung näherte sich in der ersten Phase über den Selektionsverlauf immer mehr der, durch die Substratzusammensetzung zu erwartenden, Zusammensetzung an, bis sie nach 42 Tagen übereinstimmte. In der ersten Akkumulation nach dem Substratwechsel blieb die PHA-Zusammensetzung zunächst unverändert und entsprach

der mit dem vorherigen Substrat erreichten Zusammensetzung. Danach jedoch näherte sie sich erneut dem, durch das neue Substrat zu erwarteten, Verhältnis an. Dies zeigt abermals eine metabolische Adaption der bakteriellen Mischkultur, welche sich an die Substratveränderungen anpasste. Veröffentlichungen zu Langzeit-Selektionsphasen und gezielte Untersuchungen zum Verlauf der PHA-Produktion und der PHA-Zusammensetzung über die Zeit gibt es nach derzeitigem Kenntnisstand nur wenige (Cui et al. 2016; Chen et al. 2017; Huang et al. 2018a). Sie beschreiben allerdings ebenfalls eine Zunahme des PHA-Gehaltes über die Selektionsdauer. Zudem gibt es noch weniger Untersuchungen zur Sukzession der Biozönose während einer Langzeit-Selektion (Huang et al. 2018a; Liu et al. 2024). In der Studie von Chen et al. (2017) nahm der produzierte PHA-Gehalt bis zum Ende der Versuche (92 d), mit Ausnahme eines Reaktors konstant zu. Allerdings lag der maximale PHA-Gehalt zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nur bei ca. 30 %. Cui et al. (2016) erhielten das gleiche Ergebnis, ebenfalls mit maximalen PHA-Gehalten von ca. 30 %, über eine Selektionsdauer von 125 d. Bei den Versuchen von Huang et al. (2018a) stellte sich eine stabile PHA-Produktion mit Gehalten von etwa 60 % nach einer Selektionsdauer von 50 d ein. Queirós et al. (2016) stellten ebenfalls eine stabile PHA-Produktion zwischen den Tagen 150 und 350 einer Langzeit-Selektion fest, die Zeit davor wurde nicht gezielt bezüglich des Verlaufes der PHA-Produktion untersucht. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der PHA-Zusammensetzung während einer Langzeit-Selektion zu finden ist schwierig. Zhou et al. (2023) untersuchten allerdings die PHA-Produktion einer selektierten Biomasse aus dem am besten performenden Selektionsreaktor über eine Langzeit-Akkumulationsphase von 12 Zyklen. Sie beobachteten eine stabile PHA-Produktion und -Zusammensetzung. Bei Langzeit-Selektionsversuchen mit Substratwechseln konnten ebenfalls ähnliche PHA-Gehalte zwischen den Phasen mit unterschiedlichen Substraten festgestellt werden, wobei PHA-Zusammensetzungen erreicht wurden, die der durch die Zusammensetzung des Substrates anzunehmenden Zusammensetzung entsprachen (Duque et al. 2014; Carvalho et al. 2018). Dies entspricht den hier gefundenen Ergebnissen und zeigt die Robustheit des Prozesses.

4.2.2 Dynamik der mikrobiellen Mischbiozönose

Während der Selektionsphase kam es zu einer graduellen zeitlichen Änderung der Zusammensetzung der Biozönose. Zu Beginn der Selektion gab es zudem einige gravierendere Veränderungen innerhalb der ersten 2 Wochen. Dabei kam es insbesondere zu einer Abnahme nicht-PHA-produzierender Taxa in ihrer relativen Abundanz. Des Weiteren wechselten, mit Ausnahme der Gattung *Thiothrix**, teils die dominanten

Organismen, insbesondere die potenziellen PHA-Produzenten. Mit Ausnahme der Gattungen *Thiothrix** und *Xanthobacter**, deckten sich viele der zeitweise dominanten Organismen mit den in den Selektionsversuchen zuvor abundanten potenzielle PHA-Produzenten, z.B. *Zoogloea**, *Hydrogenophaga**, *Flavobacterium** und *Paracoccus**. Das Vorkommen von *Thiothrix** in PHA-produzierenden Mischbiozönosen wurde erst selten beobachtet (Jiang et al. 2009), jedoch wurde eine schnelle Aufnahme von Acetat in Kombination mit einer Produktion von PHB mit dieser Gattung in Reinkultur gezeigt (Majone et al. 2007). Sie gehören zur Familie der Thiothrichaceae innerhalb der Klasse der Gammaproteobacteria, sind filamentös und unbeweglich, gram-negativ, aerob sowie fakultativ anaerob. Sie können chemolithoautotroph oder heterotroph wachsen. Sauerstoff, Nitrat oder Thiosulfat können als Elektronenakzeptoren dienen. Zudem speichern sie intrazellulär elementaren Schwefel (Grabovich et al. 2015). Sie sind häufig in Industriekläranlagen zu finden und stehen mit Betriebsproblemen in Form von Blähschlamm in Verbindung (Dueholm et al. 2022). Im Abwasser wird ihr Wachstum durch hohe Konzentrationen an VFA und reduzierten Schwefelverbindungen, eine geringe Sauerstoffkonzentration und einen Nährstoffmangel begünstigt (Henriet et al. 2017). Die Gattung *Xanthobacter**, welche ebenfalls zeitweise während des Langzeitversuches, insbesondere in der zweiten Phase, unter den abundantesten Organismen war, wurde ebenfalls in anderen Versuchen zur Selektion einer PHA-produzierenden Mischbiozönose gefunden (Carvalho et al. 2018; Wen et al. 2021; Brison et al. 2022). Dabei wurde das Vorkommen dieser Gattung mit einem hohen Verhältnis von Kohlenstoff zu Phosphor in Verbindung gebracht (Brison et al. 2022). Die Organismen sind stäbchenförmig (0,4-1,0 x 0,8-6,0 µm), wobei die Form je nach Substrat auch variieren kann. Die Bildung intrazellulärer PHA-Granula ist zudem bekannt. Sie sind strikt aerob, gram-negativ, auch wenn sie teils fälschlicherweise eine positive Färbung zeigen, strikt aerob und ihr Wachstumsoptimum liegt bei einer Temperatur von 25-30 °C sowie einem pH-Wert von 5,8-9,0 (Wiegel 2015). Während die Familie der Comamonadaceae* bis zum Substratwechsel eine der abundantesten Taxa mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion war, waren es nach dem Substratwechsel, neben *Thiothrix**, eher die Familie der Rhodocyclaceae* und die Gattungen *Acinetobacter**, *Comamonas**, *Leadbetterella** und *Xanthobacter**. Allerdings waren bereits vor dem Substratwechsel Veränderungen, wie beispielsweise die Zunahme der Rhodocyclaceae* zu beobachten. Wie bereits erläutert, konnte eine kurzzeitige Abnahme der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten insgesamt zu diesem Zeitpunkt und bereits vor dem Substratwechsel beobachtet werden. Ob die Änderung in der Zusammensetzung und die kurzzeitige Verschlechterung der PHA-Produktion nur mit dem Substratwechsel in Verbindung stehen, ist daher unklar. Allerdings beobachteten Carvalho

et al. (2018) ebenfalls eine Veränderung in der Zusammensetzung der Mischbiozönose infolge eines Substratwechsels während der Selektionsphase. Dennoch blieb auch in ihrem Versuch der PHA-Gehalt in einem vergleichbaren Bereich. Dies spricht erneut für eine Robustheit des Systems und eine funktionelle Redundanz der Bakterienbiozönose. Die beiden Betriebsfehler zeigten sich außerdem nicht in einer Änderung der Zusammensetzung der Biozönose.

Wie bereits in den Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern zuvor beobachtet, gab es über den Verlauf der Selektionsphase eine zeitliche Veränderung der Bakterienzusammensetzung, dabei wechselten Organismen bzw. PHA-Produzenten in ihrer Dominanz in den Systemen. Dies wurde ebenfalls in anderen Studien zur Sukzession der Bakterienbiozönose beobachtet (Huang et al. 2018a; Celis et al. 2022; Liu et al. 2024). Die Struktur mikrobieller Mischkulturen wird sowohl durch deterministische als auch durch stochastische Prozesse bestimmt (Wu et al. 2019; Liu et al. 2024). Als deterministische Faktoren spielen dabei die Temperatur und die Substratverfügbarkeit eine wichtige Rolle (Wu et al. 2019), wobei Konkurrenz und Interaktionen zwischen Organismen und eine daraus resultierende Nischendifferenzierung (Ghoul und Mitri 2016; Celis et al. 2022), Prädation (Liu et al. 2024) und die Infektion über Phagen (Yao et al. 2025) als stochastische Faktoren wirken. Während des Selektionsprozesses zur Anreicherung PHA-produzierender Organismen in einer Mischkultur wirkt der durch den Prozess angelegte Selektionsdruck mittels feast-famine-Verfahren als deterministischer Prozess, der zur Selektion PHA-produzierender Bakterien führt (Liu et al. 2024). Die Prädation durch räuberische Bakterien wie *Bdellovibrio* wurde als wichtiger stochastischer Faktor beobachtet, welcher für ein Sukzessionsmuster in der Selektion sorgt, in dem die dominanten PHA-Produzenten in ihrer Abundanz wechseln (Liu et al. 2024). Nach Eliminierung der dominantesten PHA-Produzenten durch *Bdellovibrio* kann die Nische dabei von einem anderen PHA-Produzenten eingenommen werden. Das Vorkommen von *Bdellovibrio* könnte in dieser Arbeit beispielsweise den Wechsel von *Acinetobacter** zu *Flavobacterium**, als einen der dominantesten PHA-Produzenten in Inokulum 3, im ersten Versuchsblock zur Selektion erklären, denn eine zunehmende Abundanz dieser Gattung zum Zeitpunkt des Wechsels der potenziellen PHA-Produzenten wurde festgestellt (vgl. Kapitel 3.1.1). Liu et al. (2024) schlossen, dass die Entwicklung der Zusammensetzung aus dem Inokulum zu Beginn der Selektion stochastischen Prozessen folgt und dass sich zwar deterministisch PHA-Produzenten durch die Selektion durchsetzen, es aber zufällig sein kann, welche PHA-Produzenten dies tun. Sie konnten zudem, neben der Prädation der abundantesten PHA-Produzenten durch *Bdellovibrio*, einen Zusammenhang dieser mit der Sedimentierfähigkeit des Schlammes im System finden. Als wichtigste PHA-Produzenten fanden sie in ihren

Versuchen *Flavobacterium**, *Paracoccus**, *Thauera**, *Meganema** und *Brevundimonas**, wobei sie einen Wechsel dieser als dominante Organismen beobachteten. In der späten Selektionsphase mit erhöhter Abundanz von *Bdellovibrio* und schlechten Sedimentiereigenschaften des Schlammes dominierten *Thauera** und *Flavobacterium**, welche sie mit einer Zunahme der Bildung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und der Verschlechterung der Sedimentiereigenschaften in Verbindung brachten. Zudem fanden sie in einem Reaktor eine erhöhte Auflösung der Belebtschlammflocken durch ein hohes Aufkommen filamentöser Bakterien. Sie vermuteten eine erhöhte EPS-Produktion zum Schutz vor der Prädation, da die Prädationsaktivität von *Bdellovibrio* durch die Viskosität beeinflusst werden kann (Im et al. 2019). Diese erhöhte EPS-Produktion resultierte in der Auflösung der Schlammflocken (Liu et al. 2024). Auch Huang et al. (2018a) konnte diese Beobachtung der Prozessinstabilität durch erhöhte EPS-Bildung machen und mit der Dominanz der Gattung *Thauera** in Verbindung bringen. Sie beobachtete zudem ebenfalls den Wechsel der dominanten PHA-Produzenten im System mit gleichbleibender PHA-Produktion und setzten dies ebenfalls in Zusammenhang mit stochastischen Prozessen wie einer möglichen Phageninfektion der abundantesten Organismen. Liu et al. (2024) beobachteten, ähnlich wie Huang et al. (2018a), zudem das Einstellen einer Sättigungsphase der PHA-Produktion nach 30 d mit einem Wert von 50-60 %. Trotz des Wechsels der dominanten PHA-Produzenten und der Verschlechterung der Schlammeigenschaften blieb die PHA-Produktionsperformance stabil. Diese Verschlechterung der Schlammeigenschaften wurde auch in den Versuchen dieser Arbeit festgestellt, die Ergebnisse hierzu sind allerdings nur im Projektbericht aufgeführt (Zimmer und Steinmetz 2024). Die Veränderungen der Schlammeigenschaften resultieren daher aus den Eigenschaften der dominanten Organismen im System. Die hohe relative Abundanz der Gattung *Thiothrix** könnte, aufgrund ihrer filamentösen Zellform und dem bekannten Verursachen von Problemen mit dem Auflösen von Belebtschlammflocken auf Kläranlagen, ein Grund hierfür in den Versuchen dieser Arbeit sein. Des Weiteren könnte ebenfalls eine hohe Produktion von EPS dazu geführt haben. Dies wurde zwar nicht gezielt untersucht, aber die Veränderung der Schlammphysiologie, mehr zu einem Biofilm hin, über die Selektion wurde in den eigenen Versuchen beobachtet. Yao et al. (2025) konnten ebenfalls das Sukzessionsmuster der Biozönose mit einem Wechsel der dominanten PHA-Produzenten beobachten und sie konnten durch Anwendung von Metatranscriptomics und Metagenomics als Ursache Phagen-Infektionen der dominanten Organismen zeigen. Sie schlugen Phagen-Therapie als Ansatz zur Verfahrensoptimierung vor, indem beispielsweise gezielt Phagen zur Eliminierung nicht-PHA-produzierender Organismen im System eingesetzt werden.

Eine Fluktuation der Zusammensetzung der mikrobiellen Mischbiozönose während der Selektionsphase, insbesondere der dominanten PHA-Produzenten bei gleichzeitiger stabiler PHA-Produktion und funktioneller Redundanz konnte also gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie der zuvor diskutierten Studien lassen die Schlussfolgerung zu, dass stochastische Prozess eine wichtige Rolle bei der Formung der Zusammensetzung der Biozönose spielen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Dominanz bestimmter PHA-Produzenten bei verschiedenen Betriebsparametern nicht nur ein Resultat der Präferenzen dieser Organismen ist, sondern auch eine Zufallsbeobachtung sein kann. Dies macht die Untersuchung der Präferenzen und Eigenschaften wichtiger PHA-Produzenten in Mischkulturen umso schwieriger. Allerdings gibt es doch einige PHA-Produzenten, die sich in verschiedenen Systemen und unter unterschiedlichen Prozessbedingungen durchsetzen können, sie scheinen daher ein breites Spektrum von Betriebsparametern tolerieren zu können. Aufgrund des Sukzessionsmusters der selektierten PHA-produzierenden Mischbiozönose, ist unter Betrieb eines Langzeitprozesses die Untersuchung einiger wichtiger PHA-Produzenten, und nicht nur einzelner Organismen, wichtig, um die Stabilität des Prozesses monitoren und beurteilen zu können. Durch Kenntnis von Kern-PHA-Produzenten im jeweiligen System können schnellere und weniger aufwendige Methoden zum Monitoring verwendet werden und eine regelmäßige Untersuchung der gesamten Biozönose ist unter Umständen nicht mehr nötig. Eine Betrachtung prädatorischer Bakterien sowie Phagen in den Selektionsreaktoren bei regelmäßigen Untersuchungen sollte ebenfalls in Erwägung gezogen werden. Wenn eine kontinuierliche Langzeit-Selektion zur PHA-Produktion als Verfahren in Betracht gezogen werden soll, müssen diese Schwankungen in der Bakterienbiozönose berücksichtigt werden. Insgesamt scheint die PHA-Produktion mittels Mischbiozönosen, aufgrund von funktioneller Redundanz, jedoch ein stabiler, robuster und resilienter Prozess zu sein. Sollten jedoch Einbrüche in der PHA-Produktion aufgrund von Schwankungen in der Bakterienzusammensetzung und der Abundanz von PHA-Produzenten stattfinden, können, unter Kenntnis der Kern-PHA-Produzenten des Systems, Ansätze wie beispielsweise eine Bioaugmentation in Betracht gezogen werden. Durch Bioaugmentation kann die PHA-Produktion verbessert werden (Khatami et al. 2021; Jantharadej et al. 2024). Jantharadej et al. (2024) beispielsweise konnten durch Bioaugmentation der PHA-produzierenden Bakterienmischkultur mit *Thauera mechernichensis* TL1 eine Steigerung der PHA-Produktion um mehr als das Doppelte erreichen. Des Weiteren sollte, zur Sicherung der gleichbleibenden Qualität und Zusammensetzung des produzierten Polymers, eine Mischung des Substrates, z.B. durch den Betrieb von Ausgleichsbehältern, stattfinden, um größere Schwankungen in der Substratzusammensetzung und -konzentration zu

vermeiden. Eine weitere Prozessanpassung zur Optimierung der PHA-Produktion im realen Betrieb könnte die flexible Anpassung der Substratkonzentration durch kontinuierliche Messung der Schlammkonzentration im System darstellen, da diese einen kritischen Einfluss auf die Zusammensetzung und Funktion der Biozönose darstellt. Weitere Prozessanpassungen zur Vermeidung der Verschlechterung der Sedimentiereigenschaften der PHA-produzierenden Biomasse sollten ebenfalls untersucht werden. Liu et al. (2024) schlugen beispielsweise eine Modifizierung des feast-famine-Prozesses mit zusätzlichen Sedimentationsphasen während der feast-Phase vor, um den physikalischen Selektionsdruck zu erhöhen und die Sedimentierbarkeit so zu verbessern. Auch sollte, aufgrund der möglichen Schwankungen in der Bakterienzusammensetzung und der Schlammeigenschaften, in Betracht gezogen werden, ob eine Kurzzeit-Selektion geeigneter ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch nach einer Selektion von 7 bis 14 Tagen bereits gute PHA-Gehalte erzielt werden können, wenngleich eine weitere Steigerung mit längerer Selektion möglich ist. Mit einer Kurzzeitselektion könnte jedoch möglicherweise eine höhere Produktivität insgesamt erreicht werden, da der Verlust eines Feststoffgehaltes im geringeren Maß stattfindet. Sowohl eine Langzeitselektion als auch eine kurze Selektion können geeignet zur PHA-Produktion sein. Die Wahl des Selektionsverfahrens hängt von dem Anwendungsvorhaben und der Bilanzierung des jeweiligen benötigten Energieaufwandes mit der Produktivität des Systems ab.

4.3 PHA-Akkumulation

Die Auswirkungen unterschiedlicher Substratcharakteristika zwischen Selektions- und Akkumulationsphase auf die PHA-Produktion und -Zusammensetzung sowie auf die mikrobielle Zusammensetzung wurden untersucht. Hierfür wurde die selektierte Biozönose aus dem Langzeitversuch genutzt.

4.3.1 PHA-Produktion und -Zusammensetzung bei variierenden Substraten

Unter Verwendung von synthetischem Substrat konnte ein höherer PHA-Gehalt erzielt werden als mit den realen Industrieabwässern. Die Gründe für eine höhere PHA-Produktion mit synthetischem Substrat im Vergleich zu realem Substrat liegen vermutlich in der geringeren Komplexität des Substrates und der dadurch einfacheren und schnelleren Verstoffwechslung (Farghaly et al. 2017; Ren et al. 2024). Zudem sind keine weiteren inhibitorischen Stoffe oder andere Kohlenstoffverbindungen vorhanden, die den Prozess durch das Wachstum anderer nicht-PHA-produzierender Organismen stören können (Jia et al. 2014; Valentino et al. 2017; Morgan-Sagastume et al. 2020). Die einzelnen VFA, wie beispielsweise Acetat und Propionat, stellen zudem direkte Vorstufen zu PHA-Monomeren dar und können so direkt zu diesen umgesetzt werden (Serafim et al. 2008; Ren et al. 2024). Allerdings schien hierbei die Ähnlichkeit des synthetischen Substrates zum realen Substrat, welches zur Selektion der Mischkultur genutzt wurde, hinsichtlich seiner Zusammensetzung eine Rolle zu spielen, denn mit dem synthetischen Substrat in der Mischung 70:30 % Essig- zu Propionsäure wurde ein höherer Gehalt erzielt als mit dem Substrat der konträren Zusammensetzung. Bei Nutzung realer Substrate wurde ein niedrigerer PHA-Gehalt bei Verwendung eines versäuerten Fruchtsaftabwassers produziert. Hier führte demnach ebenfalls das Substrat, welches näher an der in der Selektion verwendeten war, zu einer besseren PHA-Produktion. Das andere genutzte, reale Substrat, welches ein vorbehandeltes Brauereiabwasser war, stammte von der gleichen Kläranlage wie der Belebtschlamm sowie das Substrat, welches zur Selektion der verwendeten Biozönose genutzt wurde. Es hatte zwar eine Zusammensetzung von VFA mit geradem zu VFA mit ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen von 60 zu 40 %, war dabei allerdings näher an der Zusammensetzung des in der Selektion verwendeten Substrates (ca. 70 zu 30 %) als das versäuerte Fruchtsaftabwasser mit einem Verhältnis von 84 zu 16 %. In den Akkumulationsversuchen, in denen das in der Selektion genutzte Substrat verwendet wurden, konnten größtenteils vergleichbare PHA-Gehalte erzielt werden. Allerdings wurden unter Zugabe von Stickstoff und Phosphor und bei Nutzung der niedrigsten Substratzugabe niedrigere PHA-Gehalte erreicht. Bei mittlerer Substratkonzentration wurde dabei ein

höherer PHA-Gehalt erzielt. Die Substratkonzentration während der Akkumulation hatte demnach einen ähnlichen Effekt wie in der Selektion, da eine Erhöhung der Substratzugabe nur bis zu einem gewissen Punkt zu einer verbesserten PHA-Produktion führte, danach jedoch wieder abnahm. Es sind also vermutlich ebenfalls in diesem Prozessschritt mittlere Substratkonzentrationen von Vorteil. Die Nährstoffzugabe von Stickstoff oder Phosphor hatte, nicht wie oftmals in anderen Studien beobachtet (Serafim et al. 2004; Albuquerque et al. 2007; Johnson et al. 2010a; Cavaillé et al. 2013; Cavaillé et al. 2016; Jayakrishnan et al. 2020), einen negativen Effekt auf die PHA-Akkumulation, sondern nur die Zugabe beider Nährstoffe im Überschuss wirkte sich negativ auf die PHA-Produktion aus. Diese Studien untersuchten jedoch zumeist nur einen gezielten Einfluss entweder von Stickstoff oder von Phosphor, jedoch nicht von beiden. In anderen Studien zeigte sich ebenfalls kein negativer Einfluss einer Nährstoffverfügbarkeit einzelner Nährstoffe in der Akkumulation (Dionisi et al. 2006; Moralejo-Gárate et al. 2013; Janarthanan et al. 2016). Dies impliziert, dass auch Abwasserströme mit einem Rest an Nährstoffen für eine PHA-Produktion prinzipiell geeignet sind, allerdings dürfen nicht beide Nährstoffe im Überschuss vorliegen, da dies zu einem präferierten Wachstum führen könnte. Eine gezielte Limitation, wie durch Valentino et al. (2015) gezeigt wurde, kann ebenfalls vorteilhaft sein.

Die Zusammensetzung des produzierten PHA war in allen Versuchen, mit dem gleichen Substrat wie in der Selektion, vergleichbar und wurde nicht durch die Zugabe von Nährstoffen oder veränderte Substratkonzentrationen beeinflusst. Bei Nutzung des versäuerten Fruchtsaftabwassers wurde zudem ein Polymer produziert, welches in seiner Zusammensetzung genau der, durch das Substrat zu erwartenden, Zusammensetzung entsprach. In den beiden Versuchen mit synthetischem Substrat und dem Versuch mit dem, auf der Kläranlage vorbehandelten, Brauereiabwasser wich die PHA-Zusammensetzung allerdings von der theoretischen Zusammensetzung ab. Die Zusammensetzung des Fruchtsaftabwassers unterschied sich zwar hinsichtlich des Anteils an geraden und ungeraden VFA mehr von dem Substrat aus der Brauerei als die anderen Substrate, allerdings wies sie eine ähnlichere Zusammensetzung bezüglich der einzelnen VFA auf. Während das Substrat aus der Selektion ein Verhältnis von Acetat zu Propionat und Butyrat von 43:21:31 hatte, beinhalteten sowohl das synthetische Substrat als auch das vorbehandelte Brauereiabwasser nur Acetat und Propionat im Verhältnis von 30:70, 70:30 und 50:49. Das versäuerte Fruchtsaftabwasser bestand im Gegensatz dazu ebenfalls aus Acetat, Propionat und Butyrat (65:10:21). Hier zeigte sich daher auch, dass ein hinsichtlich der Zusammensetzung an VFA ähnlicheres Substrat im Vergleich zur Selektion zu einer konstanteren Zusammensetzung des produzierten Polymers führte.

Die Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass Substrate, die eine Ähnlichkeit zum in der Selektion verwendeten Substrat aufweisen, zu einer besseren PHA-Produktionsperformance führen. Des Weiteren scheint eine metabolische Adaption der Biozönose während der Selektion stattzufinden, worauf auch die anderen Ergebnisse zum Verlauf der PHA-Zusammensetzung in den Selektionsversuchen dieser Arbeit hindeuten. Dabei scheint die metabolische Anpassung der gesamten Mischkultur mehr von Bedeutung zu sein als die Dominanz einzelner Organismen, da teils auch unter Variation der dominanten PHA-Produzenten ähnliche PHA-Zusammensetzungen erreicht werden konnten, sich diese in allen Selektionen über die Zeit änderte und oftmals dem theoretischen Wert annäherte. Beziehungsweise ist davon auszugehen, dass die Substrateigenschaften eine Biozönose mit entsprechend angepassten metabolischen Eigenschaften selektiert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hao et al. (2017) und Huang et al. (2020), welche ebenfalls eine Zusammensetzung des Polymers beobachteten, die von dem verwendeten Substrat in der Selektion und der Anpassung an diese durch die Biozönose abhing. Während eines Langzeitprozesses, bei einer Verwendung ähnlicher Substrate wie in der Selektionsphase oder bei geringen Schwankungen im Substrat, ist daher mit einer gut adaptierten Biozönose möglicherweise eine konstante Polymerzusammensetzung erzielbar. Jedoch können größere Schwankungen in der Substratzusammensetzung und -konzentration möglicherweise die Quantität und Qualität des produzierten PHAs beeinflussen. Daher sollten diese durch Mischen des Substrates, wie im vorherigen Kapitel bereits vorgeschlagen, vermieden werden. Ein wichtiger Faktor der zudem bei der Qualität des PHA berücksichtigt werden muss, ist außerdem, neben der Zusammensetzung, der Polymerisierungsgrad bzw. die Kettenlänge (Nguyenhuynh et al. 2021). Auch gibt der Anteil an gemessenen HB- und HV-Monomeren noch keinen Aufschluss über die Zusammensetzung, da diese auch als Monomere oder teils als Homopolymere vorliegen können. Daher sollte in folgenden Studien zum einen vermehrt die Betrachtung der Zusammensetzung und zum anderen eine Untersuchung der Kettenlänge des erzeugten PHA unter den untersuchten Prozessbedingungen erfolgen, um Aufschlüsse über die Polymereigenschaften und Qualität und deren Beeinflussung zu erhalten.

4.3.2 Dynamik der selektierten Biozönose in der Akkumulationsphase

Die mikrobielle Mischbiozönose zeigte kaum Veränderungen in der Zusammensetzung zwischen Beginn und Ende der Akkumulationsphase. Es konnte somit hier kein Einfluss des Substrates in der Akkumulationsphase auf die Zusammensetzung der Biozönose festgestellt werden, wie in anderen Studien beobachtet (Cavaillé et al. 2013; Janarthanan

et al. 2016; Farghaly et al. 2017; Morgan-Sagastume et al. 2019). Diese Studien führten allerdings teilweise nur eine kurze Akklimatisierungsphase vor der Akkumulation oder eine direkte Akkumulation, ohne vorangehende Selektion, durch (Cavaillé et al. 2013; Morgan-Sagastume et al. 2019). In einer Studie fand zudem keine detaillierte Untersuchung der Zusammensetzung der Biozönose statt (Morgan-Sagastume et al. 2019). Farghaly et al. (2017) nutzten zur Selektion der PHA-produzierenden Mischbiozönose ein synthetisches Substrat, welches nur Acetat enthielt und sie wechselten in der Akkumulation zu einem fermentierten Abwasser der Papierindustrie, welches aus Acetat, Propionat, Butyrat, Valerat und einem nicht-VFA-Anteil zusammengesetzt war. Janarthanan et al. (2016) führten die Selektion unter Zugabe von fermentierter Käsemolke durch, welche zum Großteil aus Acetat bestand und untersuchten unterschiedliche Substratzugabestrategien unter Verwendung unterschiedlicher synthetischer Substrate bestehend aus Acetat oder Propionat und einer Mischung oder alternierenden Zugabe von beiden. Die größte Änderung in der mikrobiellen Zusammensetzung während der Akkumulation stellten sie im Reaktor fest, in welchem nur Propionat zugegeben wurde, während in der Akkumulation unter Verwendung von reinem Acetat kaum Unterschiede in der Biozönose zu beobachten waren. Diese nötige metabolische Anpassung an die komplexere Substratzusammensetzung bzw. das alleinige Vorkommen von Propionat war vermutlich der Grund der beobachteten Änderungen in der Zusammensetzung der Biozönose während der Selektion in beiden Studien. Die Umsetzung von Propionat sowie der anderen VFA zu PHA erfordert andere Stoffwechselwege, welche in einer, auf Acetat basierenden, Selektion womöglich nicht vorhanden sind, sodass sich andere Bakterien mit der Fähigkeit zur Nutzung dieser etablieren müssen. In den Versuchen dieser Arbeit konnten nur einige Änderungen in der relativen Abundanz einzelner Organismen festgestellt werden. Beispielsweise zeigte das Taxon *Bacteroidetes** eine Zunahme während der Akkumulationsphase im zweiten Akkumulationsversuch. Allerdings handelt es sich bei der taxonomischen Ebene um ein Phylum, sodass möglicherweise andere taxonomische Gruppen wie Sphingobacteriales und Saprospiraceae, die in diesem Phylum angesiedelt sind und in dem Reaktor mit relativer Häufigkeit vorkamen, aufgrund einer geringeren Sequenzqualität nicht auf die gleiche Taxonomieebene aufgelöst werden konnten. Die hohe relative Abundanz der Gattung *Streptococcus* am Ende der Selektion im vierten Akkumulationsversuch könnte zudem eine mögliche Kontamination darstellen. Auch sind Einflüsse durch das Einbringen anderer Bakterien mit dem Substrat, in diesem Fall andere Industrieabwässer, möglich (Saunders et al. 2016). Zunahmen von einzelnen Organismen während der Akkumulationsphase beschränkten sich größtenteils auf seltene Taxa. Insgesamt konnte jedoch kein signifikanter Unterschied, insbesondere im Anteil potenzieller

PHA-Produzenten, zwischen Beginn und Ende der Phase gefunden werden. Zudem folgte die Zusammensetzung der selektierten Bakterienbiozönose der Dynamik, die während der Langzeitselektion beobachtet wurde.

Obwohl kein Einfluss des Substrates auf die Biozönose während der Akkumulation zu beobachten war, wurden teils unterschiedliche PHA-Gehalte und -Zusammensetzung bei Verwendung unterschiedlicher Substrate erreicht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Eigenschaften des produzierten Polymers stark von dem in der Selektion verwendeten Substrat sowie der Adaption des Metabolismus der selektierten Bakterienbiozönose abhängen. Obwohl unterschiedliche Organismen verschiedene Stoffwechselwege zur PHA-Produktion verwenden, unterschiedliche Substratpräferenzen aufweisen und unterschiedliche PHA herstellen können, scheint die Mischbiozönose sich dabei während der Selektion so zu adaptieren, dass die Polymerzusammensetzung größtenteils durch die Substratzusammensetzung vorhergesagt werden kann. Hierzu bedarf es allerdings weiterer Studien, insbesondere im Hinblick auf die unterschiedlichen PHA-Produktionseigenschaften der Kern-PHA-Produzenten. Trotz der festgestellten funktionellen Redundanz und Stabilität der PHA-Produktion, sind, aufgrund der unterschiedlichen Stoffwechselwege und PHA-Produktionsfähigkeiten, unter Berücksichtigung der Schwankungen in der Dominanz potenzieller PHA-Produzenten im Prozessverlauf Schwankungen in den Polymereigenschaften nicht auszuschließen. Die genauere Kenntnis der PHA-Produktionseigenschaften der einzelnen Kern-PHA-Produzenten bietet zudem die Möglichkeit der gezielten Beeinflussung der PHA-Produktion, beispielsweise einer Optimierung des PHA-Gehaltes, sofern bessere PHA-Produktionskapazitäten einzelner Organismen vorkommen. Weiterhin ist die Komplexität des in der Selektion verwendeten Substrates zu beachten, da sich eine Biozönose mit diverseren Stoffwechselwegen und einer höheren Anpassung an komplexe Substrate unter der Verwendung eines komplexen oder realen Substrates etabliert, während eine Anpassung, nach Selektion mit einfachen Kohlenstoffquellen, bei Verwendung komplexer Substrate in der Akkumulation nötig sein kann.

5 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit sollte der Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Betriebsbedingungen in der Selektions- sowie Akkumulationsphase im Prozess zur PHA-Produktion mit mikrobiellen Mischbiozönosen auf die PHA-Produktion und die Zusammensetzung des Polymers sowie der zugrundeliegenden Biozönose dienen und zu einem vertieften Verständnis des Prozesses beitragen.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Selektionsphase eine effektive Selektion und Anreicherung potenzieller PHA-Produzenten in der Mischbiozönose erreicht werden kann, da es im Verlauf dieser zu einer sinkenden Diversität und Komplexität innerhalb des Mikrobioms sowie zur Zunahme der relativen Abundanz potenzieller PHA-Produzenten kam. Zudem war eine Steigerung der PHA-Produktion infolgedessen zu beobachten. Die Zunahme der PHA-Produktion sowie des Anteils potenzieller PHA-Produzenten erreichte dabei bereits nach etwa einer bis zwei Wochen der Selektion ein hohes Maß. Unter Verwendung unterschiedlicher Inokula in der Selektion konnten unter gleichen Betriebsbedingungen ähnlich zusammengesetzte Biozönosen mit einer vergleichbaren PHA-Produktionskapazität von ca. 50 % erzielt werden. Bei Variation anderer Parameter in der Selektion wurden Unterschiede in der Entwicklung der Mischkultur festgestellt, jedoch gab es ebenfalls Überschneidungen in den dominantesten potenziellen PHA-Produzenten. Zu den anderen selektierten Biozönosen sehr unterschiedliche Zusammensetzungen wurden dabei bei Nutzung von zwei hohen Raumbelastungen beobachtet. Zu den wichtigsten Kernorganismen mit der Fähigkeit zur PHA-Produktion in den Selektionsversuchen zählten *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Comamonas*, *Flavobacterium*, *Zoogloea*, *Rhodobacter*, *Leadbetterella* und *Hydrogenophaga*. Diese wurden ebenfalls in einigen anderen Studien mit teils sehr unterschiedlichen Betriebsparametern als abundante PHA-Produzenten gefunden. Daher besitzen einige PHA-Produzenten offenbar eine Toleranz für eine große Variation an Betriebsparametern und die einzelnen Variablen für das Vorkommen eines bestimmten Organismus auszumachen ist schwierig. Die Identifizierung und Untersuchung von Kernorganismen kann als Ansatz genutzt werden, um ein schnelles Monitoring des Prozesses zu erlauben.

Durch Vergleich der PHA-Produktionsperformance konnten geeignete Betriebsparameter zur effektiven Selektion einer PHA-produzierenden Bakterienbiozönose festgelegt werden. Bei Verwendung eines Schlammalters von 4 d, einer Zyklusdauer von 6 h und einer Raumbelastung von ca. 1 g/(L*d) konnten mit versäuertem Brauereiabwasser maximale PHA-Gehalte von 41 bzw. 48 % erreicht werden. Dabei war eine weitere Steigerung des PHA-Gehaltes, neben der hohen Steigerung innerhalb der ersten Woche, bis zu Tag 56 in

einem Langzeit-Selektionsbetrieb zu beobachten. Über die Selektionsphase, so wie auch in anderen Selektionsversuchen, war teils ein Wechsel der dominanten Organismen, insbesondere der potenziellen PHA-Produzenten, über den zeitlichen Verlauf festzustellen. Trotzdem wurde größtenteils eine stabile PHA-Produktion beobachtet. Dies spricht für eine funktionelle Redundanz der PHA-produzierenden Organismen. Es gibt bisher nur wenige Studien, welche sich mit der Dynamik der Bakteriengesellschaft und der PHA-Produktion über eine Langzeit-Selektion beschäftigen. Allerdings wurde dieses Sukzessionsmuster mit einem Wechsel der dominanten PHA-Produzenten in anderen Studien ebenfalls beobachtet und Gründe hierfür können in stochastische Faktoren, wie einer Prädation oder Phagen-Infektion liegen. Aufgrund des Einflusses deterministischer sowie stochastischer Faktoren auf die Entwicklung der PHA-produzierenden Mischbiozönose ist eine Determination des Zusammenhangs des Auftretens bestimmter Organismen mit bestimmten Variablen umso schwieriger. Eine Untersuchung eines breiten Spektrums an wichtigen PHA-Produzenten während des Prozesses ist daher sinnvoll. Zudem werden weitere Untersuchungen zu den Eigenschaften dieser Organismen, insbesondere im Hinblick auf ihre PHA-Produktionsmechanismen, in Mischkulturen benötigt. Bei Betrieb einer Langzeit-Selektion könnte, aufgrund der Dynamik potenzieller PHA-Produzenten über die Selektionsdauer, unter Kenntnis der Kernorganismen eine Prozessstabilität mittels Bioaugmentation erhalten oder die Produktivität optimiert werden. Ein abnehmender Feststoffgehalt in den Reaktoren während der Selektion stellt ebenfalls ein Problem dar, da daraus eine geringere PHA-Produktivität insgesamt resultiert. Weitere Forschung zum Einfluss der Eigenschaften PHA-produzierender Organismen auf diese Beobachtung und die Entwicklung von Prozessadaptionen sind daher nötig. Aufgrund des kritischen Einflusses der Raumbelastung auf die Zusammensetzung der Mischkultur und der PHA-Produktion wäre, unter Berücksichtigung der Feststoffproblematik, eine kontinuierliche Messung der Biomassekonzentration im System und eine flexible Anpassung der Substratkonzentration von Vorteil. Die Zusammensetzung des Substrates kann ebenfalls einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Biozönose und die PHA-Produktion haben, wobei in dieser Arbeit eine schnelle Anpassung dieser nach einem Substratwechsel zu beobachten war. Allerdings wäre in einem Langzeit-Selektionsbetrieb die Minimierung von Substratschwankungen beispielsweise durch die Nutzung von Ausgleichsbehältern sinnvoll. Im Langzeitversuch dieser Arbeit wurde insgesamt eine gewisse Stabilität, Robustheit und Resilienz der PHA-produzierenden Mischbiozönose festgestellt. Nach Betriebsstörungen konnte sich das System ebenfalls wieder erholen. Zudem war nach einer Adaptationszeit die PHA-Zusammensetzung ähnlich der theoretisch zu erwartenden Zusammensetzung und passte sich nach einem Substratwechsel ebenfalls in eine ähnliche

Richtung der, aufgrund des neuen Substrates zu erwartenden, Zusammensetzung an. Aufgrund der stochastischen Prozesse, die zu Fluktuationen in der Mischbiozönose führen, und wegen der abnehmenden Biomassekonzentration über eine Langzeit-Selektion hinweg, kann, je nach Anwendung, auch eine Kurzzeitselektion in Erwägung gezogen werden. Denn eine effektive Selektion einer PHA-produzierenden Mischbiozönose bereits nach 7 bis 14 Tagen konnte gezeigt werden.

Bei Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichen Substrateigenschaften konnte gezeigt werden, dass zu dem in der Selektionsphase verwendeten Substrat ähnliche Substrate zu einer höheren PHA-Produktion sowie voraussagbareren Polymerzusammensetzungen führten. In den Akkumulationen zur Beurteilung der Selektionsversuche wurden ebenfalls, nach einer Anpassungszeit, größtenteils PHA-Zusammensetzungen erreicht, die ähnlich der aufgrund der Substratzusammensetzung theoretisch zu erwartenden waren. Unter Verwendung von unterschiedlichen Substratkonzentrationen in der Akkumulation zeigte sich, dass, analog zu der Selektionsphase, sich eine Steigerung nur bis zu einem gewissen Grad positiv auswirkte. Zudem führten Substratzugaben mit einem Überschuss an Stickstoff oder Phosphor nicht zu einer schlechteren PHA-Produktion, nur das Vorhandensein beider Nährstoffe hatte negative Auswirkungen auf die Polymerproduktion. Unter Verwendung unterschiedlicher Substrate wurden außerdem kaum Veränderungen in der Bakterienzusammensetzung während der Akkumulationsphase festgestellt. Dies steht im Gegensatz zu anderen Studien. Allerdings wurde in diesen Studien eine Selektion mit Acetat-basierten Substraten sowie eine Akkumulation mit komplexeren Substraten, bestehend aus verschiedenen VFA durchgeführt. Eine Adaption der Biozönose an das komplexere Substrat resultierte daher, aufgrund der Notwendigkeit anderer Stoffwechselwege zur Nutzung dieser, in einer Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung. Unterschiedliche Organismen besitzen unterschiedliche Stoffwechselwege und Substratpräferenzen, können unterschiedliche PHA herstellen und sie können zudem teils aus einzelnen VFA über variierende Stoffwechselwege unterschiedliche PHA herstellen. In einem komplexen System spielen dabei auch Faktoren wie Konkurrenz und Nischendifferenzierung eine wichtige Rolle. Eine genauere Kenntnis dieser Faktoren sowie des PHA-Produktionsverhaltens der einzelnen Kern-PHA-Produzenten wäre daher von Vorteil. Die unterschiedlichen PHA-Zusammensetzungen infolge der unterschiedlichen Substrate trotz gleichbleibender Zusammensetzung der Biozönose sprechen für eine metabolische Anpassung der mikrobiellen Mischbiozönose insgesamt. Daher hängt die Zusammensetzung des produzierten PHA offenbar stark von dem Substrat in der Selektion sowie der Adaption der Biozönose an dieses ab. Die Komplexität des Substrates in der Selektion spielt hierbei zudem eine wichtige Rolle.

6 Literaturverzeichnis

- Agnihotri S, Yin D-M, Mahboubi A, Sapmaz T, Varjani S, Qiao W, Koseoglu-Imer DY, Taherzadeh MJ (2022) A Glimpse of the World of Volatile Fatty Acids Production and Application: A review. *Bioengineered* 13:1249–1275.
- Ahnert M, Schalk T, Brückner H, Effenberger J, Kuehn V, Krebs P (2021) Organic matter parameters in WWTP - a critical review and recommendations for application in activated sludge modelling. *Water Science and Technology* 84:2093–2112.
- Albuquerque MG, Carvalho G, Kragelund C, Silva AF, Barreto Crespo MT, Reis MA, Nielsen PH (2013) Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community. *The ISME journal* 7:1–12.
- Albuquerque MG, Eiroa M, Torres C, Nunes BR, Reis MA (2007) Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of biotechnology* 130:411–421.
- Albuquerque MG, Martino V, Pollet E, Avérous L, Reis MA (2011) Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of biotechnology* 151:66–76.
- Albuquerque MG, Torres CA, Reis MA (2010) Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water research* 44:3419–3433.
- Almende BV, Thieurmel B, and Contributors (2022) visNetwork: Network Visualization using 'vis.js' Library. R package version 2.1.2.
- Amara AA, Moawad AH (2011) PhaC Synthases and PHA Depolymerases: The Enzymes that Produce and Degrade Plastic. *IIUMEJ* 12.
- Amha YM, Anwar MZ, Brower A, Jacobsen CS, Stadler LB, Webster TM, Smith AL (2018) Inhibition of anaerobic digestion processes: Applications of molecular tools. *Bioresource technology* 247:999–1014.
- Anburajan P, Naresh Kumar A, Sabapathy PC, Kim G-B, Cayetano RD, Yoon J-J, Kumar G, Kim S-H (2019) Polyhydroxy butyrate production by *Acinetobacter junii* BP25, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, and their co-culture using a feast and famine strategy. *Bioresource technology* 293:122062.
- Anderson AJ, Dawes EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* 54:450–472.
- Andrew S (2010) FastQC: Ein Qualitätskontroll-Tool für Hochdurchsatz-Sequenzdaten. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

- Atasoy M, Eyice O, Schnürer A, Cetecioglu Z (2019) Volatile fatty acids production via mixed culture fermentation: Revealing the link between pH, inoculum type and bacterial composition. *Bioresource technology* 292:121889.
- Atasoy M, Owusu-Agyeman I, Plaza E, Cetecioglu Z (2018) Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. *Bioresource technology* 268:773–786.
- Beccari M, Bertin L, Dionisi D, Fava F, Lampis S, Majone M, Valentino F, Vallini G, Villano M (2009) Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic–aerobic process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84:901–908.
- Ben M, Kennes C, Veiga MC (2016) Optimization of polyhydroxyalkanoate storage using mixed cultures and brewery wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91:2817–2826.
- Bengtsson S, Hallquist J, Werker A, Welander T (2008a) Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal* 40:492–499.
- Bengtsson S, Karlsson A, Alexandersson T, Quadri L, Hjort M, Johansson P, Morgan-Sagastume F, Anterrieu S, Arcos-Hernandez M, Karabegovic L, Magnusson P, Werker A (2017) A process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from municipal wastewater treatment with biological carbon and nitrogen removal demonstrated at pilot-scale. *New Biotechnology* 35:42–53.
- Bengtsson S, Werker A, Christensson M, Welander T (2008b) Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource technology* 99:509–516.
- Bernardet J-F, Bowman JP (2015) *Flavobacterium*. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp 1–75.
- Brandl H, Gross R, Lenz R, Lloyd R, Fuller R (1991) The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* 155.
- Braunegg G, Sonnleitner B, Lafferty RM (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6:29–37.
- Brison A, Rossi P, Derlon N (2022) Influent carbon to phosphorus ratio drives the selection of PHA-storing organisms in a single CSTR. *Water research X* 16:100150.
- Bucci K, Tulio M, Rochman CM (2020) What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review. *Ecological applications: a publication of the Ecological Society of America* 30:e02044.

- Bukin YS, Galachyants YP, Morozov IV, Bukin SV, Zakharenko AS, Zemskaya TI (2019) The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific data* 6:190007.
- Cáceres M de, Legendre P (2009) Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology* 90:3566–3574.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods* 13:581–583.
- Cao Y, Dong Q, Wang D, Zhang P, Liu Y, Niu C (2022) microbiomeMarker: an R/Bioconductor package for microbiome marker identification and visualization. *Bioinformatics (Oxford, England)* 38:4027–4029.
- Carvalho G, Oehmen A, Albuquerque MG, Reis MA (2014) The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. *New Biotechnology* 31:257–263.
- Carvalho G, Pedras I, Karst SM, Oliveira CS, Duque AF, Nielsen PH, Reis MA (2018) Functional redundancy ensures performance robustness in 3-stage PHA-producing mixed cultures under variable feed operation. *New Biotechnology* 40:207–217.
- Carvalho JM, Marreiros BC, Reis MA (2022) Polyhydroxyalkanoates Production by Mixed Microbial Culture under High Salinity. *Sustainability* 14:1346.
- Catozzi C, Cecilian F, Lecchi C, Talenti A, Vecchio D, Carlo E de, Grassi C, Sánchez A, Francino O, Cuscó A (2020) Short communication: Milk microbiota profiling on water buffalo with full-length 16S rRNA using nanopore sequencing. *Journal of dairy science* 103:2693–2700.
- Cavaillé L, Albuquerque M, Grousseau E, Lepeuple A-S, Uribelarrea J-L, Hernandez-Raquet G, Paul E (2016) Understanding of polyhydroxybutyrate production under carbon and phosphorus-limited growth conditions in non-axenic continuous culture. *Bioresource technology* 201:65–73.
- 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. *Bioresource technology* 149:301–309.
- Celis M de, Duque J, Marquina D, Salvadó H, Serrano S, Arregui L, Santos A, Belda I (2022) Niche differentiation drives microbial community assembly and succession in full-scale activated sludge bioreactors. *NPJ biofilms and microbiomes* 8:23.
- Chek MF, Hiroe A, Hakoshima T, Sudesh K, Taguchi S (2019) PHA synthase (PhaC): interpreting the functions of bioplastic-producing enzyme from a structural perspective. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:1131–1141.

- Chen G-Q (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society reviews* 38:2434–2446.
- Chen G-Q, Hajnal I, Wu H, Lv L, Ye J (2015a) Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. *Trends in Biotechnology* 33:565–574.
- Chen Z, Huang L, Wen Q, Guo Z (2015b) Efficient polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation by a new continuous feeding mode in three-stage mixed microbial culture (MMC) PHA production process. *Journal of biotechnology* 209:68–75.
- 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. *Journal of Environmental Sciences* 52:76–84.
- Choi MH, Lee H-J, Rho JK, Yoon SC, Nam JD, Lim D, Lenz RW (2003) Biosynthesis and local sequence specific degradation of poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) in *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Biomacromolecules* 4:38–45.
- Choi MH, Yoon SC, Lenz RW (1999) Production of poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly(4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Applied and environmental microbiology* 65:1570–1577.
- Choi SY, Cho IJ, Lee Y, Kim Y-J, Kim K-J, Lee SY (2020) Microbial Polyhydroxyalkanoates and Nonnatural Polyesters. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 32:e1907138.
- Chua H, Yu PH (1999) Production of biodegradable plastics from chemical wastewater — A novel method to reduce excess activated sludge generated from industrial wastewater treatment. *Water Science and Technology* 39.
- Ciesielski S, Pokoj T, Klimiuk E (2010) Cultivation-dependent and -independent characterization of microbial community producing polyhydroxyalkanoates from raw-glycerol. *Journal of microbiology and biotechnology* 20:853–861.
- Ciobotă V, Burkhardt E-M, Schumacher W, Rösch P, Küsel K, Popp J (2010) The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry* 397:2929–2937.
- Clagnan E, Adani F (2023) Influence of feedstock source on the development of polyhydroxyalkanoates-producing mixed microbial cultures in continuously stirred tank reactors. *New Biotechnology* 76:90–97.
- Coats ER, Loge FJ, Smith WA, Thompson DN, Wolcott MP (2007) Functional Stability of a Mixed Microbial Consortium Producing PHA From Waste Carbon Sources. In: Mielenz JR, Adney WS, Klasson KT, McMillan JD (eds) *Applied Biochemistry and Biotechnology. The Twenty-Eighth Symposium Proceedings of the Twenty-Eight Symposium on*

- Biotechnology for Fuels and Chemicals Held April 30-May 3, 2006, in Nashville, Tennessee. Humana Press, Totowa, NJ, pp 909–925.
- Coats ER, Watson BS, Brinkman CK (2016) Polyhydroxyalkanoate synthesis by mixed microbial consortia cultured on fermented dairy manure: Effect of aeration on process rates/yields and the associated microbial ecology. *Water research* 106:26–40.
- Connor N, Barberán A, Clauset A (2017) Using null models to infer microbial co-occurrence networks. *PloS one* 12:e0176751.
- Correa-Galeote D, Argiz L, Del Val Rio A, Mosquera-Corral A, Juarez-Jimenez B, Gonzalez-Lopez J, Rodelas B (2022) Dynamics of PHA-Accumulating Bacterial Communities Fed with Lipid-Rich Liquid Effluents from Fish-Canning Industries. *Polymers* 14.
- Crognale S, Lorini L, Valentino F, Villano M, Marzo Gago C, Tonanzi B, Majone M, Rossetti S (2022) Effect of the organic loading rate on the PHA-storing microbiome in sequencing batch reactors operated with uncoupled carbon and nitrogen feeding. *The Science of the total environment* 825:153995.
- Crognale S, Tonanzi B, Valentino F, Majone M, Rossetti S (2019) Microbiome dynamics and phaC synthase genes selected in a pilot plant producing polyhydroxyalkanoate from the organic fraction of urban waste. *The Science of the total environment* 689:765–773.
- Csárdi G, Nepusz T, Müller K, Horvát S, Traag V, Zanini F, Noom D (2024) igraph for R: R interface of the igraph library for graph theory and network analysis. R package version 2.1.2.
- Cui Y-W, Zhang H-Y, Lu P-F, Peng Y-Z (2016) Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic dynamic feeding process. *Scientific reports* 6:30766.
- Daims H (2009) Quantitative FISH for the cultivation-independent quantification of microbes in wastewater treatment plants. In: Nielsen PH, Daims H, Lemmer H (eds) *FISH handbook for biological wastewater treatment. Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. IWA Publishing, London, New York.
- Dalton B, Bhagabati P, Micco J de, Padamati RB, O'Connor K (2022) A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications. *Catalysts* 12:319.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology* 72:5069–5072.

- Dias JM, Lemos PC, Serafim LS, Oliveira C, Eiroa M, Albuquerque MG, Ramos AM, Oliveira R, Reis MA (2006) Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromolecular bioscience* 6:885–906.
- Dilkes-Hoffman LS, Lant PA, Laycock B, Pratt S (2019) The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study. *Marine pollution bulletin* 142:15–24.
- DIN 38409-2:1987-03 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe_H); Bestimmung der abfiltrierbaren Stoffe und des Glührückstandes_(H_2). DIN Media GmbH, Berlin.
- Dinno A (2024) dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sum. R package version 1.3.6.
- Dionisi D, Beccari M, Di Gregorio S, Majone M, Papini MP, Vallini G (2005a) Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80:1306–1318.
- Dionisi D, Carucci G, Papini MP, Riccardi C, Majone M, Carrasco F (2005b) Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water research* 39:2076–2084.
- Dionisi D, Levantesi C, Renzi V, Tandoi V, Majone M (2002) PHA storage from several substrates by different morphological types in an anoxic/aerobic SBR. *Water Science and Technology* 46:337–344.
- 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. *Biotechnology and bioengineering* 93:76–88.
- Dionisi D, Majone M, Vallini G, Di Gregorio S, Beccari M (2007) Effect of the length of the cycle on biodegradable polymer production and microbial community selection in a sequencing batch reactor. *Biotechnology progress* 23:1064–1073.
- Dueholm MK, Nierychlo M, Andersen KS, Rudkjøbing V, Knutsson S, Albertsen M, Nielsen PH (2022) MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature communications* 13:1908.
- Dufrene M, Legendre P (1997) Species Assemblages and Indicator Species: The Need for a Flexible Asymmetrical Approach. *Ecological Monographs* 67:345.

- Duque AF, Oliveira CS, Carmo IT, Gouveia AR, Pardelha F, Ramos AM, Reis MA (2014) Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *New Biotechnology* 31:276–288.
- Edgar RC (2016) SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences.
- Emadian SM, Onay TT, Demirel B (2017) Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste management (New York, N.Y.)* 59:526–536.
- European Bioplastics e.V. (2024) Bioplastics. Available online at: <http://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>.
- Farghaly A, Enitan AM, Kumari S, Bux F, Tawfik A (2017) Polyhydroxyalkanoates production from fermented paperboard mill wastewater using acetate-enriched bacteria. *Clean Techn Environ Policy* 19:935–947.
- Forster D, Qu Z, Pitsch G, Bruni EP, Kammerlander B, Pröschold T, Sonntag B, Posch T, Stoeck T (2021) Lake Ecosystem Robustness and Resilience Inferred from a Climate-Stressed Protistan Plankton Network. *Microorganisms* 9.
- Fox J, Weisberg S, Price B (2019) *An R Companion to Applied Regression*, Third edition. Sage, Thousand Oaks CA.
- 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. *Chemical Engineering Journal* 360:1255–1261.
- Friedrich M, Takács I, Tränckner J (2015) Physiological adaptation of growth kinetics in activated sludge. *Water research* 85:22–30.
- Garcia-Aguirre J, Aymerich E, González-Mtnez de Goñi J, Esteban-Gutiérrez M (2017) Selective VFA production potential from organic waste streams: Assessing temperature and pH influence. *Bioresource technology* 244:1081–1088.
- Geyer R (2020) Production, use, and fate of synthetic polymers. In: Letcher TM (ed) *Plastic Waste and Recycling. Environmental Impact, Societal Issues, Prevention, and Solutions*. Elsevier, pp 13–32.
- Ghoul M, Mitri S (2016) The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in microbiology* 24:833–845.
- Gou M, Zeng J, Wang H, Tang Y, Shigematsu T, Morimura S, Kida K (2016) Microbial community structure and dynamics of starch-fed and glucose-fed chemostats during two years of continuous operation. *Front. Environ. Sci. Eng.* 10:368–380.
- Grabovich MY, Ravin NV, Boden R (2015) Thiothrix. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp 1–21.

- Guarda EC, Amorim CL, Pasculli G, Castro PM, Galinha CF, Duque AF, Reis MA (2024) Polyhydroxyalkanoates production from a waste-derived feedstock driven by the reactor operating conditions: The role of biomass microbiome and its reactivation capacity. *Journal of Cleaner Production* 451:141810.
- Guo R, Cen X, Ni B-J, Zheng M (2024) Bioplastic polyhydroxyalkanoate conversion in waste activated sludge. *Journal of environmental management* 370:122866.
- Hamza RA, Zaghoul MS, Iorhemen OT, Sheng Z, Tay JH (2019) Optimization of organics to nutrients (COD:N:P) ratio for aerobic granular sludge treating high-strength organic wastewater. *The Science of the total environment* 650:3168–3179.
- Hao J, Wang X, Wang H (2017) Investigation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis from mixed culture enriched by valerate-dominant hydrolysate. *Front. Environ. Sci. Eng.* 11:450.
- Hastings R (1999) Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis to Microbial Ecology. In: Edwards C (ed) *Environmental Monitoring of Bacteria*. Humana Press, New Jersey, pp 175–186.
- Hebbali A (2024) *olsrr: Tools for Building OLS Regression Models*. R package version 0.6.1.9000.
- Henriet O, Meunier C, Henry P, Mahillon J (2017) Filamentous bulking caused by Thiothrix species is efficiently controlled in full-scale wastewater treatment plants by implementing a sludge densification strategy. *Scientific reports* 7:1430.
- Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MA, Zeileis A (2006) A Lego System for Conditional Inference. *The American Statistician* 60:257–263.
- 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. *Bioresource technology* 296:122369.
- Huang L, Chen Z, Wen Q, Zhao L, Lee D-J, Yang L, Wang Y (2018a) Insights into Feast-Famine polyhydroxyalkanoate (PHA)-producer selection: Microbial community succession, relationships with system function and underlying driving forces. *Water research* 131:167–176.
- Huang L, Chen Z, Xiong D, Wen Q, Ji Y (2018b) Oriented acidification of wasted activated sludge (WAS) focused on odd-carbon volatile fatty acid (VFA): Regulation strategy and microbial community dynamics. *Water research* 142:256–266.
- Huang Y-T, Chen P-L, Semblante GU, You S-J (2012) Detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria from domestic wastewater treatment plant using highly sensitive PCR primers. *Journal of microbiology and biotechnology* 22:1141–1147.

- Im H, Kwon H, Cho G, Kwon J, Choi SY, Mitchell RJ (2019) Viscosity has dichotomous effects on *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 predation. *Environmental microbiology* 21:4675–4684.
- Imhoff JF (2015) Rhodobacter. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp 1–12.
- Inoue D, Suzuki Y, Uchida T, Morohoshi J, Sei K (2016) Polyhydroxyalkanoate production potential of heterotrophic bacteria in activated sludge. *Journal of bioscience and bioengineering* 121:47–51.
- Janarthanan OM, Laycock B, Montano-Herrera L, Lu Y, Arcos-Hernandez MV, Werker A, Pratt S (2016) Fluxes in PHA-storing microbial communities during enrichment and biopolymer accumulation processes. *New Biotechnology* 33:61–72.
- Jantharadej K, Jaroensawat J, Matanachai K, Limpiyakorn T, Tobino T, Thayanukul P, Suwannasilp BB (2024) Bioaugmentation of *Thauera mechernichensis* TL1 for enhanced polyhydroxyalkanoate production in mixed microbial consortia for wastewater treatment. *The Science of the total environment* 916:170240.
- Jayakrishnan U, Deka D, Das G (2020) Influence of inoculum variation and nutrient availability on polyhydroxybutyrate production from activated sludge. *International journal of biological macromolecules* 163:2032–2047.
- Jendrossek D (2009) Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of bacteriology* 191:3195–3202.
- Jenkins D, Richard MG, Daigger GT (2003) *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking, Foaming, and Other Solids Separation Problems*. CRC Press.
- Jia Q, Xiong H, Wang H, Shi H, Sheng X, Sun R, Chen G (2014) Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by bacterial consortium from excess sludge fermentation liquid at laboratory and pilot scales. *Bioresource technology* 171:159–167.
- Jiang J, Zhang Y, Li K, Wang Q, Gong C, Li M (2013) Volatile fatty acids production from food waste: effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresource technology* 143:525–530.
- Jiang Y, Chen Y, Zheng X (2009) Efficient polyhydroxyalkanoates production from a waste-activated sludge alkaline fermentation liquid by activated sludge submitted to the aerobic feeding and discharge process. *Environmental science & technology* 43:7734–7741.
- Jiang Y, Hebly M, Kleerebezem R, Muyzer G, van Loosdrecht MC (2011a) Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Water research* 45:1309–1321.

- Jiang Y, Marang L, Kleerebezem R, Muyzer G, van Loosdrecht MC (2011b) Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor. *The ISME journal* 5:896–907.
- Jiang Y, Marang L, Tamis J, van Loosdrecht MC, Dijkman H, Kleerebezem R (2012) Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water research* 46:5517–5530.
- Johnson K, Jiang Y, Kleerebezem R, Muyzer G, van Loosdrecht MC (2009) Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules* 10:670–676.
- Johnson K, Kleerebezem R, van Loosdrecht MC (2010a) Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. *Water research* 44:2141–2152.
- Johnson K, van Geest J, Kleerebezem R, van Loosdrecht MC (2010b) Short- and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures. *Water research* 44:1689–1700.
- Kassambara A (2023a) ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.6.0.
- Kassambara A (2023b) rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. R package version 0.7.2.
- Khatami K, Perez-Zabaleta M, Owusu-Agyeman I, Cetecioglu Z (2021) Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? *Waste management (New York, N.Y.)* 119:374–388.
- Kim B-K, Yoon S-C, Nam J-D, Lenz R-W (1997) Effect of C/N Ratio on the Production of Poly(3-Hydroxyalkanoates) by the Methylotroph *Paracoccus denitrificans*. *Journal of microbiology and biotechnology* 7:391–396.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research* 41:e1.
- Koller M, Maršálek L, Sousa D, Braunegg G (2017) Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology* 37:24–38.
- Kourmentza C, Kornaros M (2016) Biotransformation of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates by employing mixed microbial consortia: The effect of pH and carbon source. *Bioresource technology* 222:388–398.

- Kourmentza C, Plácido J, Venetsaneas N, Burniol-Figols A, Varrone C, Gavala HN, Reis MA (2017) Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 4.
- Kuruti K, Nakkasunchi S, Begum S, Juntupally S, Arelli V, Anupoju GR (2017) Rapid generation of volatile fatty acids (VFA) through anaerobic acidification of livestock organic waste at low hydraulic residence time (HRT). *Bioresource technology* 238:188–193.
- Laumeyer CM, Zimmer J, Steinmetz H (2025) From fruit juice wastewater to biopolymer – How the mixed microbial culture and PHA content develop over time. *Chemical Engineering Journal* 503:158314.
- Lee WS, Chua AS, Yeoh HK, Ngoh GC (2014) A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal* 235:83–99.
- Lemos PC, Levantesi C, Serafim LS, Rossetti S, Reis MA, Tandoi V (2008) Microbial characterisation of polyhydroxyalkanoates storing populations selected under different operating conditions using a cell-sorting RT-PCR approach. *Applied microbiology and biotechnology* 78:351–360.
- Lemos PC, Serafim LS, Reis MA (2006) Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *Journal of biotechnology* 122:226–238.
- Lentendu G, Dunthorn M (2021) Phylogenetic relatedness drives protist assembly in marine and terrestrial environments. *Global Ecol Biogeogr* 30:1532–1544.
- Li B, Liu C, Bai J, Huang Y, Su R, Wei Y, Ma B (2024) Strategy to mitigate substrate inhibition in wastewater treatment systems. *Nature communications* 15:7920.
- Li Z, Yang J, Loh XJ (2016) Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Mater* 8:e265-e265.
- 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. *Applied microbiology and biotechnology* 97:9377–9387.
- Liu S, Chen Z, Liu B, Wen Q, Wang Z, Lin X, Wang Y (2024) Ecological succession and community assembly of mixed microbial culture polyhydroxyalkanoate production systems: Drivers of polyhydroxyalkanoate synthesis and *Bdellovibrio* predation. *Bioresource technology* 394:130204.
- Lo C-W, Wu H-S, Wei Y-H (2009) Optimizing acidic methanolysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in gas chromatography analysis. *Asia-Pacific Jnl of Chem. Eng* 4:487–494.

- Lobos J, Wiesniewski C, Heran M, Grasmick A (2008) Sequencing versus continuous membrane bioreactors: Effect of substrate to biomass ratio (F/M) on process performance. *Journal of Membrane Science* 317:71–77.
- 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. *New Biotechnology* 56:140–148.
- Majone M, Beccari M, Dionisi D, Levantesi C, Ramadori R, Tandoi V (2007) Effect of periodic feeding on substrate uptake and storage rates by a pure culture of *Thiothrix* (CT3 strain). *Water research* 41:177–187.
- Majone M, Massanisso P, Carucci A, Lindrea K, Tandoi V (1996) Influence of storage on kinetic selection to control aerobic filamentous bulking. *Water Science and Technology* 34.
- Mallick H, Rahnavard A, McIver LJ, Ma S, Zhang Y, Nguyen LH, Tickle TL, Weingart G, Ren B, Schwager EH, Chatterjee S, Thompson KN, Wilkinson JE, Subramanian A, Lu Y, Waldron L, Paulson JN, Franzosa EA, Bravo HC, Huttenhower C (2021) Multivariable association discovery in population-scale meta-omics studies. *PLoS computational biology* 17:e1009442.
- Manoli M-T, Nogales J, Prieto A (2022) Synthetic Control of Metabolic States in *Pseudomonas putida* by Tuning Polyhydroxyalkanoate Cycle. *mBio* 13:e0179421.
- Marciniak P, Możejko-Ciesielska J (2021) What Is New in the Field of Industrial Wastes Conversion into Polyhydroxyalkanoates by Bacteria? *Polymers* 13:1731.
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* 17:10.
- Martin VM, Virkud YV, Dahan E, Seay HL, Itzkovits D, Vlamakis H, Xavier R, Shreffler WG, Yuan Q, Yassour M (2022) Longitudinal disease-associated gut microbiome differences in infants with food protein-induced allergic proctocolitis. *Microbiome* 10:154.
- Martinez A (2020) pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R package version 0.4.
- Matos M, Cruz RA, Cardoso P, Silva F, Freitas EB, Carvalho G, Reis MA (2021a) Combined Strategies to Boost Polyhydroxyalkanoate Production from Fruit Waste in a Three-Stage Pilot Plant. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 9:8270–8279.
- Matos M, Cruz RA, Cardoso P, Silva F, Freitas EB, Carvalho G, Reis MA (2021b) Sludge retention time impacts on polyhydroxyalkanoate productivity in uncoupled storage/growth processes. *The Science of the total environment* 799:149363.

- McGeoch MA, van Rensburg BJ, Botes A (2002) The verification and application of bioindicators: a case study of dung beetles in a savanna ecosystem. *Journal of Applied Ecology* 39:661–672.
- McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS one* 8:e61217.
- Mercado-Gómez YL, Mercado-Gómez JD, Giraldo-Sánchez CE (2023) What Do Butterflies Tell Us about an Intermediate Disturbance in a Dry Tropical Forest Context? *Diversity* 15:927.
- Mesquita DP, Amaral AL, Leal C, Oehmen A, Reis MA, Ferreira EC (2015) Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Analytica chimica acta* 865:8–15.
- Mezzolla V, D'Urso OF, Poltronieri P (2018) Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers* 10.
- Mir MA, Hussain A, Verma C (2016) Design considerations and operational performance of anaerobic digester: A review. *Cogent Engineering* 3:1181696.
- Miwa T, Takimoto Y, Mizuta Y, Hatamoto M, Watari T, Yamaguchi T (2022) An increase in sludge loading rate induces gel fouling in membrane bioreactors treating real sewage. *Chemosphere* 309:136557.
- Moralejo-Gárate H, Palmeiro-Sánchez T, Kleerebezem R, Mosquera-Corral A, Campos JL, van Loosdrecht MC (2013) Influence of the cycle length on the production of PHA and polyglucose from glycerol by bacterial enrichments in sequencing batch reactors. *Biotechnology and bioengineering* 110:3148–3155.
- Moretto G, Lorini L, Pavan P, Crognale S, Tonanzi B, Rossetti S, Majone M, Valentino F (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). *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8:14531–14539.
- Morgan-Sagastume F (2016) Characterisation of open, mixed microbial cultures for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Rev Environ Sci Biotechnol* 15:593–625.
- Morgan-Sagastume F, Bengtsson S, Grazia G de, Alexandersson T, Quadri L, Johansson P, Magnusson P, Werker A (2020) Mixed-culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production integrated into a food-industry effluent biological treatment: A pilot-scale evaluation. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8:104469.
- Morgan-Sagastume F, Hjort M, Cirne D, Gérardin F, Lacroix S, Gaval G, Karabegovic L, Alexandersson T, Johansson P, Karlsson A, Bengtsson S, Arcos-Hernández MV, Magnusson P, Werker A (2015) Integrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs)

- with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale. *Bioresource technology* 181:78–89.
- Morgan-Sagastume F, Valentino F, Hjort M, Zanaroli G, Majone M, Werker A (2019) Acclimation Process for Enhancing Polyhydroxyalkanoate Accumulation in Activated-Sludge Biomass. *Waste Biomass Valor* 10:1065–1082.
- Moronkola AA, Oyedeko KF, Patinvoh RJ, Akinbomi JG, Wainaina S, Taherzadeh MJ (2025) Optimization of volatile fatty acids from food wastes for polyhydroxyalkanoates synthesis. *Biomass Conv. Bioref.*
- Muneer F, Rasul I, Azeem F, Siddique MH, Zubair M, Nadeem H (2020) Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. *J Polym Environ* 28:2301–2323.
- Nemec A (2015) *Acinetobacter*. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp 1–78.
- Nguyenhuynh T, Yoon LW, Chow YH, Chua AS (2021) An insight into enrichment strategies for mixed culture in polyhydroxyalkanoate production: feedstocks, operating conditions and inherent challenges. *Chemical Engineering Journal* 420:130488.
- Nielsen PH, Daims H, Lemmer H, eds (2009) *FISH handbook for biological wastewater treatment. Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*. IWA Publishing, London, New York.
- Noike T, Endo G, Chang JE, Yaguchi J, Matsumoto J (1985) Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnology and bioengineering* 27:1482–1489.
- Oksanen J, Simpson GL, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Solymos P, Stevens MH, Szoecs E, Wagner H, Barbour M, Bedward M, Bolker B, Borcard D, Carvalho G, Chirico M, Caceres M de, Durand S, Evangelista HB, FitzJohn R, Friendly M, Furneaux B, Hannigan G, Hill MO, Lahti L, McGlinn D, Ouellette M-H, Ribeiro Cunha E, Smith T, Stier A, Braak CJ ter, Weedon J, Borman T (2024) *vegan: community ecology package*. R package version 2.6-10.
- Oliveira CS, Silva CE, Carvalho G, Reis MA (2017) Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. *New Biotechnology* 37:69–79.
- Oliveira CS, Silva MO, Silva CE, Carvalho G, Reis MA (2018) Assessment of Protein-Rich Cheese Whey Waste Stream as a Nutrients Source for Low-Cost Mixed Microbial PHA Production. *Applied Sciences* 8:1817.

- Oshiki M, Onuki M, Satoh H, Mino T (2008) PHA-accumulating microorganisms in full-scale wastewater treatment plants. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 58:13–20.
- Oshiki M, Onuki M, Satoh H, Mino T (2013) Microbial community composition of polyhydroxyalkanoate-accumulating organisms in full-scale wastewater treatment plants operated in fully aerobic mode. *Microbes and environments* 28:96–104.
- Oshiki M, Satoh H, Mino T (2011) Rapid quantification of polyhydroxyalkanoates (PHA) concentration in activated sludge with the fluorescent dye Nile blue A. *Water Science and Technology* 64:747–753.
- Ostle AG, Holt JG (1982) Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and environmental microbiology* 44:238–241.
- Palleroni NJ (2015) *Pseudomonas*. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, p 1.
- Pei R, Estévez-Alonso Á, Ortiz-Seco L, van Loosdrecht MC, Kleerebezem R, Werker A (2022) Exploring the Limits of Polyhydroxyalkanoate Production by Municipal Activated Sludge. *Environmental science & technology* 56:11729–11738.
- Pittmann T, Steinmetz H (2014) Polyhydroxyalkanoate production as a side stream process on a municipal waste water treatment plant. *Bioresource technology* 167:297–302.
- Pittmann T, Steinmetz H (2017) Polyhydroxyalkanoate Production on Waste Water Treatment Plants: Process Scheme, Operating Conditions and Potential Analysis for German and European Municipal Waste Water Treatment Plants. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 4.
- Povolo S, Romanelli MG, Basaglia M, Ilieva VI, Corti A, Morelli A, Chiellini E, Casella S (2013) Polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Hydrogenophaga pseudoflava* DSM1034 from structurally unrelated carbon sources. *New Biotechnology* 30:629–634.
- Preusting H, Hazenberg W, Witholt B (1993) Continuous production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans* in a high-cell-density, two-liquid-phase chemostat. *Enzyme and Microbial Technology* 15:311–316.
- Qu Z, Forster D, Bruni EP, Frantal D, Kammerlander B, Nachbaur L, Pitsch G, Posch T, Pröschold T, Teubner K, Sonntag B, Stoeck T (2021) Aquatic food webs in deep temperate lakes: Key species establish through their autecological versatility. *Molecular ecology* 30:1053–1071.
- Queirós D, Fonseca A, Lemos PC, Serafim LS (2016) Long-term operation of a two-stage polyhydroxyalkanoates production process from hardwood sulphite spent liquor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91:2480–2487.

- Queirós D, Fonseca A, Rossetti S, Serafim LS, Lemos PC (2017) Highly complex substrates lead to dynamic bacterial community for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 44:1215–1224.
- Queirós D, Rossetti S, Serafim LS (2014) PHA production by mixed cultures: a way to valorize wastes from pulp industry. *Bioresource technology* 157:197–205.
- R Core Team (2021) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available online at: <https://www.R-project.org/>.
- R Core Team (2024) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available online at: <https://www.R-project.org/>.
- Raza ZA, Tariq MR, Majeed MI, Banat IM (2019) Recent developments in bioreactor scale production of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Bioprocess and biosystems engineering* 42:901–919.
- Reddy CS, Ghai R, Rashmi, Kalia VC (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology* 87:137–146.
- Rehm BH, Steinbüchel A (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International journal of biological macromolecules* 25:3–19.
- Reis M, Albuquerque M, Villano M, Majone M (2011) Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus/Wastes as Feedstocks. In: Moo-Young M (ed) *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, pp 669–683.
- Ren Y, Inoue D, Ike M (2024) Potential of activated sludge-derived mixed microbial culture enriched on acetate to produce polyhydroxyalkanoates from various substrates. *J Mater Cycles Waste Manag* 26:2355–2365.
- Richard EN, Hilonga A, Machunda RL, Njau KN (2019) A review on strategies to optimize metabolic stages of anaerobic digestion of municipal solid wastes towards enhanced resources recovery. *Sustain Environ Res* 29.
- Rössle WH, Pretorius WA (2001) A review of characterisation requirements for in-line fermenters: Paper 1: Wastewater characterisation. *WSA* 27.
- Sabapathy PC, Devaraj S, Meixner K, Anburajan P, Kathirvel P, Ravikumar Y, Zabed HM, Qi X (2020) Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production - A review. *Bioresource technology* 306:123132.
- Sabapathy PC, Devaraj S, Parthiban A, Kathirvel P (2018) Bioprocess optimization of PHB homopolymer and copolymer P3 (HB-co-HV) by *Acinetobacter junii* BP25 utilizing rice mill effluent as sustainable substrate. *Environmental technology* 39:1430–1441.

- Saito Y, Doi Y (1994) Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. *International journal of biological macromolecules* 16:99–104.
- Saunders AM, Albertsen M, Vollertsen J, Nielsen PH (2016) The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *The ISME journal* 10:11–20.
- Schütte UM, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, Pierson JD, Forney LJ (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:365–380.
- Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology* 12:R60.
- Serafim LS, Lemos PC, Albuquerque MG, Reis MA (2008) Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Applied microbiology and biotechnology* 81:615–628.
- Serafim LS, Lemos PC, Oliveira R, Reis MA (2004) Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and bioengineering* 87:145–160.
- Serafim LS, Lemos PC, Rossetti S, Levantesi C, Tandoi V, Reis MA (2006) Microbial community analysis with a high PHA storage capacity. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 54:183–188.
- Shen D, Yin J, Yu X, Wang M, Long Y, Shentu J, Chen T (2017) Acidogenic fermentation characteristics of different types of protein-rich substrates in food waste to produce volatile fatty acids. *Bioresource technology* 227:125–132.
- Shen L, Hu H, Ji H, Zhang C, He N, Li Q, Wang Y (2015) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from excess activated sludge as a promising substitute of pure culture. *Bioresource technology* 189:236–242.
- Sheu D-S, Wang Y-T, Lee C-Y (2000) Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology (Reading, England)* 146 (Pt 8):2019–2025.
- Shokralla S, Spall JL, Gibson JF, Hajibabaei M (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology* 21:1794–1805.
- Silva F, Campanari S, Matteo S, Valentino F, Majone M, Villano M (2017) Impact of nitrogen feeding regulation on polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *New Biotechnology* 37:90–98.

- Silva-Queiroz SR, Silva LF, Pradella JG, Pereira EM, Gomez JG (2009) PHA(MCL) biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of biotechnology* 143:111–118.
- Smolders GJ, van der Meij J, van Loosdrecht MC, Heijnen JJ (1994) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotechnology and bioengineering* 43:461–470.
- Snellman EA, Sullivan ER, Colwell RR (2002) Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. *European journal of biochemistry* 269:5771–5779.
- Sruamsiri D, Thayanukul P, Suwannasilp BB (2020) In situ identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-accumulating microorganisms in mixed microbial cultures under feast/famine conditions. *Scientific reports* 10:3752.
- Steinbüchel A (1991) Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom D (ed) *Biomaterials*. Palgrave Macmillan UK, London, pp 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“. Technische Universität Kaiserslautern.
- Stoeck T, Pan H, Dully V, Forster D, Jung T (2018) Towards an eDNA metabarcode-based performance indicator for full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water research* 144:322–331.
- Stoett P, Scrich VM, Elliff CI, Andrade MM, M. Grilli N de, Turra A (2024) Global plastic pollution, sustainable development, and plastic justice. *World Development* 184:106756.
- Sudesh K, Abe H, Doi Y (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* 25:1503–1555.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E (2012) Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular ecology* 21:2045–2050.
- Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M (2014) Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS one* 9:e105592.
- 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. *Journal of environmental sciences (China)* 78:137–146.
- Tezuka Y (1969) Cation-dependent flocculation in a *Flavobacterium* species predominant in activated sludge. *Applied microbiology* 17:222–226.
- Tsuge T, Hyakutake M, Mizuno K (2015) Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:6231–6240.
- Tsuge T, Taguchi K, Seiichi T, Doi Y (2003) Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid beta-oxidation. *International journal of biological macromolecules* 31:195–205.
- Tu W, Zhang D, Wang H, Lin Z (2019) Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented thermal-hydrolyzed sludge by PHA-storing denitrifiers integrating PHA accumulation with nitrate removal. *Bioresource technology* 292:121895.
- 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.
- Ujang Z, Salim MR, Md Din MF, Ahmad MA (2007) Intracellular biopolymer productions using mixed microbial cultures from fermented POME. *Water Science and Technology* 56:179–185.
- Unz RF (2015) Zoogloea. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp 1–13.
- Valentino F, Beccari M, Fraraccio S, Zanaroli G, Majone M (2014) Feed frequency in a sequencing batch reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. *New Biotechnology* 31:264–275.
- Valentino F, Brusca AA, Beccari M, Nuzzo A, Zanaroli G, Majone M (2012) Start up of biological sequencing batch reactor (SBR) and short-term biomass acclimation for polyhydroxyalkanoates production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88:261–270.
- Valentino F, Gottardo M, Micolucci F, Pavan P, Bolzonella D, Rossetti S, Majone M (2018) Organic Fraction of Municipal Solid Waste Recovery by Conversion into Added-Value Polyhydroxyalkanoates and Biogas. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 6:16375–16385.
- Valentino F, Karabegovic L, Majone M, Morgan-Sagastume F, Werker A (2015) Polyhydroxyalkanoate (PHA) storage within a mixed-culture biomass with simultaneous growth as a function of accumulation substrate nitrogen and phosphorus levels. *Water research* 77:49–63.

- Valentino F, Lorini L, Gottardo M, Pavan P, Majone M (2020) Effect of the temperature in a mixed culture pilot scale aerobic process for food waste and sewage sludge conversion into polyhydroxyalkanoates. *Journal of biotechnology* 323:54–61.
- Valentino F, Morgan-Sagastume F, Campanari S, Villano M, Werker A, Majone M (2017) Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnology* 37:9–23.
- van Spanning RJ, Stouthamer AH, Baker SC, van Verseveld HW (2015) *Paracoccus*. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp 1–14.
- Vázquez-Fernández A, Suárez-Ojeda ME, Carrera J (2022) Review about bioproduction of Volatile Fatty Acids from wastes and wastewaters: Influence of operating conditions and organic composition of the substrate. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10:107917.
- Vicente D, Proença DN, Morais PV (2023) The Role of Bacterial Polyhydroalkanoate (PHA) in a Sustainable Future: A Review on the Biological Diversity. *International journal of environmental research and public health* 20.
- 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. *Process Biochemistry* 45:714–723.
- Vishnuvardhan Reddy S, Thirumala M, Kishore Reddy TV, Mahmood SK (2008) Isolation of bacteria producing polyhydroxyalkanoates (PHA) from municipal sewage sludge. *World journal of microbiology & biotechnology* 24:2949–2955.
- Wang K, Yin J, Shen D, Li N (2014) Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: effect of pH. *Bioresource technology* 161:395–401.
- Wang X, Oehmen A, Carvalho G, Reis MA (2020) Community profile governs substrate competition in polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing mixed cultures. *New Biotechnology* 58:32–37.
- Wang X, Oehmen A, Freitas EB, Carvalho G, Reis MA (2017) The link of feast-phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production. *Water research* 112:269–278.
- Wang Y, Chen R, Cai J, Liu Z, Zheng Y, Wang H, Li Q, He N (2013) Biosynthesis and thermal properties of PHBV produced from levulinic acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS one* 8:e60318.

- Wen Q, Liu S, Liu Y, Chen Z (2021) Effect of inoculum and organic loading on mixed culture polyhydroxyalkanoate production using crude glycerol as the substrate. *International journal of biological macromolecules* 182:1785–1792.
- Werker A, Bengtsson S, Korving L, Hjort M, Anterrieu S, Alexandersson T, Johansson P, Karlsson A, Karabegovic L, Magnusson P, Morgan-Sagastume F, Sijstermans L, Tietema M, Visser C, Wypkema E, van der Kooij Y, Deeke A, Uijterlinde C (2018) Consistent production of high quality PHA using activated sludge harvested from full scale municipal wastewater treatment - PHARIO. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research* 78:2256–2269.
- Whitman WB, ed (2015) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley.
- Wickham H (2016) *ggplot2. Elegant graphics for data analysis*. R package version 3.5.2.
- Wiegel JK (2015) *Xanthobacter*. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp 1–22.
- Wilke C (2024) *cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for 'ggplot2'*. R package version 1.1.3.
- Willems A, Gillis M (2015a) *Comamonas*. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp 1–17.
- Willems A, Gillis M (2015b) *Hydrogenophaga*. In: Whitman WB (ed) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, pp 1–15.
- Wu L, Ning D, Zhang B, Li Y, Zhang P, Shan X, Zhang Q, Brown MR, Li Z, van Nostrand JD, Ling F, Xiao N, Zhang Y, Vierheilig J, Wells GF, Yang Y, Deng Y, Tu Q, Wang A, Zhang T, He Z, Keller J, Nielsen PH, Alvarez PJ, Criddle CS, Wagner M, Tiedje JM, He Q, Curtis TP, Stahl DA, Alvarez-Cohen L, Rittmann BE, Wen X, Zhou J (2019) Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nature microbiology* 4:1183–1195.
- Yang C, Zhang W, Liu R, Zhang C, Gong T, Li Q, Wang S, Song C (2013) Analysis of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase gene and PHA-producing bacteria in activated sludge that produces PHA containing 3-hydroxydodecanoate. *FEMS Microbiology Letters* 346:56–64.
- Yang X, Du M, Lee D-J, Wan C, Chen C, Wan F (2012) Enriching polyhydroxyalkanoates (PHA) producing microorganisms by complex organics from quickly alkaline fermentation liquor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 43:953–957.
- Yao J, Zeng Y, Hong X, Wang M, Zhang Q, Chen Y, Gou M, Xia Z-Y, Tang Y-Q (2025) Phages-bacteria interactions underlying the dynamics of polyhydroxyalkanoate-producing mixed microbial cultures via meta-omics study. *mSystems* 10:e0020025.

- Yao J, Zhang G, Wu Q, Chen GQ, Zhang R (1999) Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas nitroreducens*. *Antonie van Leeuwenhoek* 75:345–349.
- Yu J (2007) Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources. In: Yang S-T (ed) *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Elsevier, pp 585–610.
- Yuan Q-B, Guo M-T, Yang J (2015) The sludge loading rate regulates the growth and release of heterotrophic bacteria resistant to six types of antibiotics in wastewater activated sludge. *Environmental science. Processes & impacts* 17:206–212.
- Zhou M, Yan B, Wong JW, Zhang Y (2018) Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource technology* 248:68–78.
- Zhou T, Wang S, Zhang W, Yin F, Cao Q, Lian T, Dong H (2023) Comparison of different aerobic sludge on enriching polyhydroxyalkanoate mixed microbial culture using lactic acid fermentation broth of agricultural wastes. *Chemical Engineering Journal* 475:146000.
- Zimmer J, Steinmetz H (2024) Abschlussbericht an die Willy-Hager-Stiftung zum Projekt „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen Teil II - Anpassungen von Prozessbedingungen und Adaption der Biozönose zur Beeinflussung der Polymerzusammensetzung“. Rheinland-Pfälzisch Technische Universität Kaiserslautern-Landau.

7 Anhang

7.1 Selektion

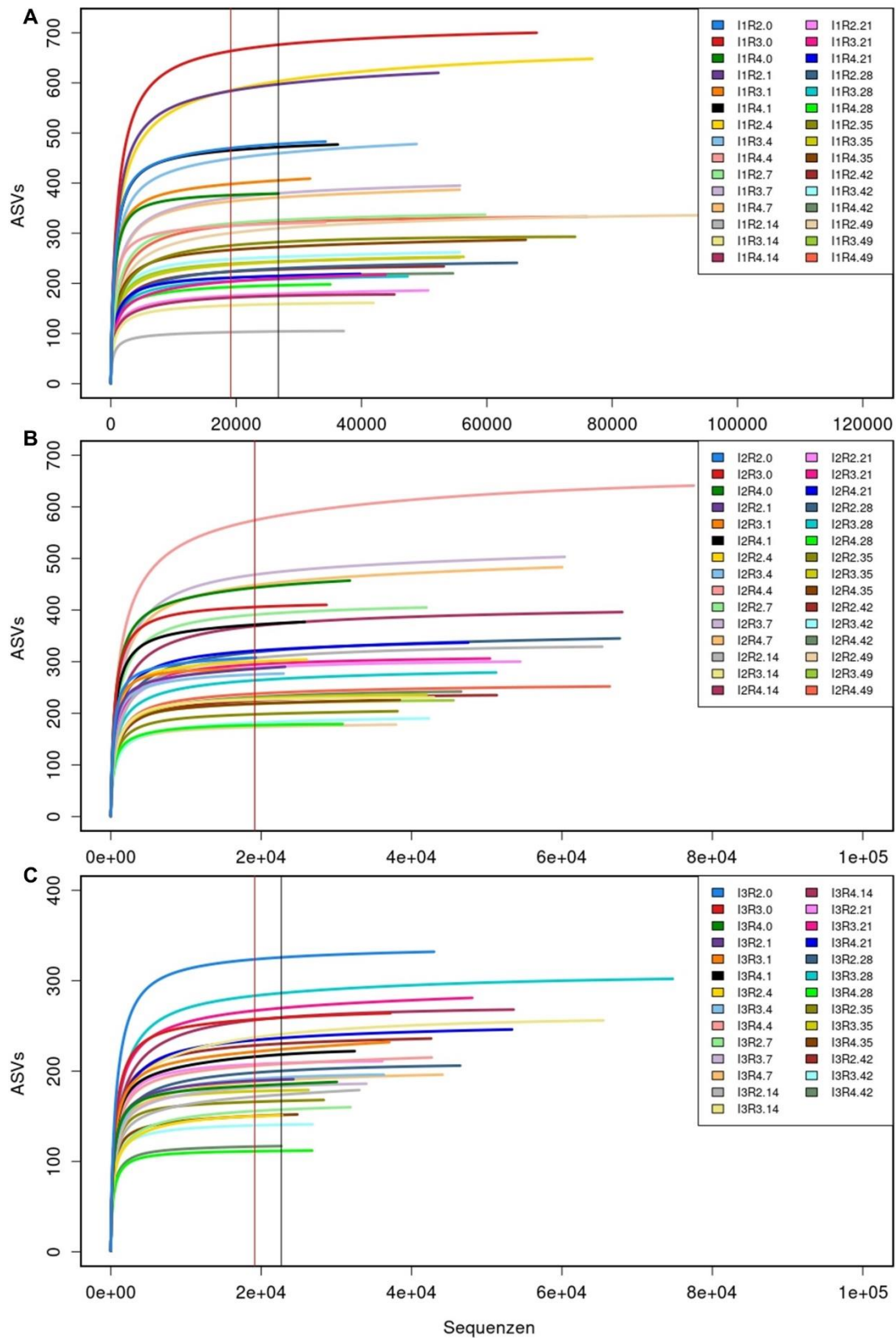
Inokulum

Anhang 1: Ergebnisse von ANCOVA-Analysen transformierter Daten des PHA-Gehaltes in Verbindung mit der Selektionsdauer und dem Anteil potenzieller PHA-Produzenten über drei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum. DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS: Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F: F-Statistik.

PHA nach Selektionszeit	SS	DF	F	p
Experiment	7,076	2	1,77	0,177
Versuchsdauer	75,713	1	37,91	0,000
Interaktionsterm	6,143	2	1,54	0,221
Residuen	161,779	81		
PHA nach Anteil potenzieller PHA-Produzenten	SS	DF	F	p
Experiment	2875435	2	2,16	0,122
Potenzielle PHA-Produzenten	29345958	1	44,02	0,000
Interaktionsterm	2155113	2	1,62	0,205
Residuen	54001364	81		

Anhang 2: Ergebnisse von ANCOVA-Analysen transformierter Daten des PHA-Gehaltes in Verbindung mit der Selektionsdauer und dem Anteil potenzieller PHA-Produzenten über drei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum innerhalb der ersten 7 Tage der Versuche. DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS: Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F: F-Statistik.

PHA nach Selektionszeit	SS	DF	F	p
Experiment	835,7	2	12,27	0,000
Versuchsdauer	8576,3	1	251,88	0,000
Interaktionsterm	28,7	2	0,42	0,660
Residuen	1021,5	30		
PHA nach Anteil potenzieller PHA-Produzenten	SS	DF	F	p
Experiment	0,7343	2	8,05	0,002
Potenzielle PHA-Produzenten	3,3606	1	73,64	0,000
Interaktionsterm	0,0633	2	0,69	0,508
Residuen	1,3690	30		



Anhang 3: Rarefaction-Kurven für die Proben der Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum. Die schwarze Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl innerhalb jedes einzelnen Versuches. Die rote Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl für alle drei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum, auf welche der Datensatz für weitere Analysen normalisiert wurde. A) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. B) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung. C) Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei.



Anhang 4: Taxonomische Zusammensetzung der einzelnen Reaktoren in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum. 1: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. 2: Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung. 3: Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei. Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbar Taxa wurden mit der letzten bestimmbar Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Anhang 5: Ergebnisse des Pairwise-Adonis-Tests des zeitlichen Effektes auf die Bray-Curtis-Distanzmatrix in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum. DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS: Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F: F-Statistik; p: p-Wert nach Bonferroni-Korrektur. Die Tabelle wird auf der nächsten Seite weitergeführt.

Tag	DF	SS	F	R ²	p
0 vs 1	1	0,21	0,65	0,04	1
0 vs 4	1	0,75	2,27	0,12	1
0 vs 7	1	1,26	3,85	0,19	0,09
0 vs 14	1	1,60	4,69	0,23	0,045
0 vs 21	1	1,85	5,81	0,27	0,045
0 vs 28	1	1,92	6,01	0,27	0,09
0 vs 35	1	1,85	5,67	0,26	0,045
0 vs 42	1	1,89	5,84	0,27	0,045
0 vs 49	1	1,67	5,31	0,29	0,045
1 vs 4	1	0,51	1,57	0,09	1
1 vs 7	1	1,11	3,40	0,18	0,54
1 vs 14	1	1,57	4,64	0,22	0,045
1 vs 21	1	1,85	5,85	0,27	0,045
1 vs 28	1	1,94	6,15	0,28	0,09
1 vs 35	1	1,88	5,80	0,27	0,045
1 vs 42	1	1,91	5,97	0,27	0,045
1 vs 49	1	1,69	5,43	0,29	0,045
4 vs 7	1	0,47	1,45	0,08	1
4 vs 14	1	1,24	3,66	0,19	0,045
4 vs 21	1	1,64	5,15	0,24	0,045
4 vs 28	1	1,84	5,80	0,27	0,045
4 vs 35	1	1,82	5,59	0,26	0,045
4 vs 42	1	1,86	5,76	0,26	0,045
4 vs 49	1	1,65	5,29	0,29	0,09
7 vs 14	1	0,82	2,43	0,13	1
7 vs 21	1	1,36	4,29	0,21	0,045
7 vs 28	1	1,62	5,12	0,24	0,045
7 vs 35	1	1,67	5,14	0,24	0,045
7 vs 42	1	1,70	5,28	0,25	0,045
7 vs 49	1	1,54	4,96	0,28	0,045
14 vs 21	1	0,58	1,78	0,10	1
14 vs 28	1	0,93	2,85	0,15	0,09
14 vs 35	1	1,05	3,13	0,16	0,045
14 vs 42	1	1,13	3,40	0,18	0,045
14 vs 49	1	1,10	3,36	0,21	0,045
21 vs 28	1	0,24	0,78	0,05	1

Anhang 5: fortgesetzt.

Tag	DF	SS	F	R ²	p
21 vs 35	1	0,49	1,57	0,09	1
21 vs 35	1	0,49	1,57	0,09	1
21 vs 42	1	0,65	2,10	0,12	1
21 vs 49	1	0,75	2,50	0,16	0,495
28 vs 35	1	0,20	0,64	0,04	1
28 vs 42	1	0,36	1,14	0,07	1
28 vs 49	1	0,49	1,63	0,11	1
35 vs 42	1	0,09	0,28	0,02	1
35 vs 49	1	0,22	0,71	0,05	1
42 vs 49	1	0,15	0,49	0,04	1

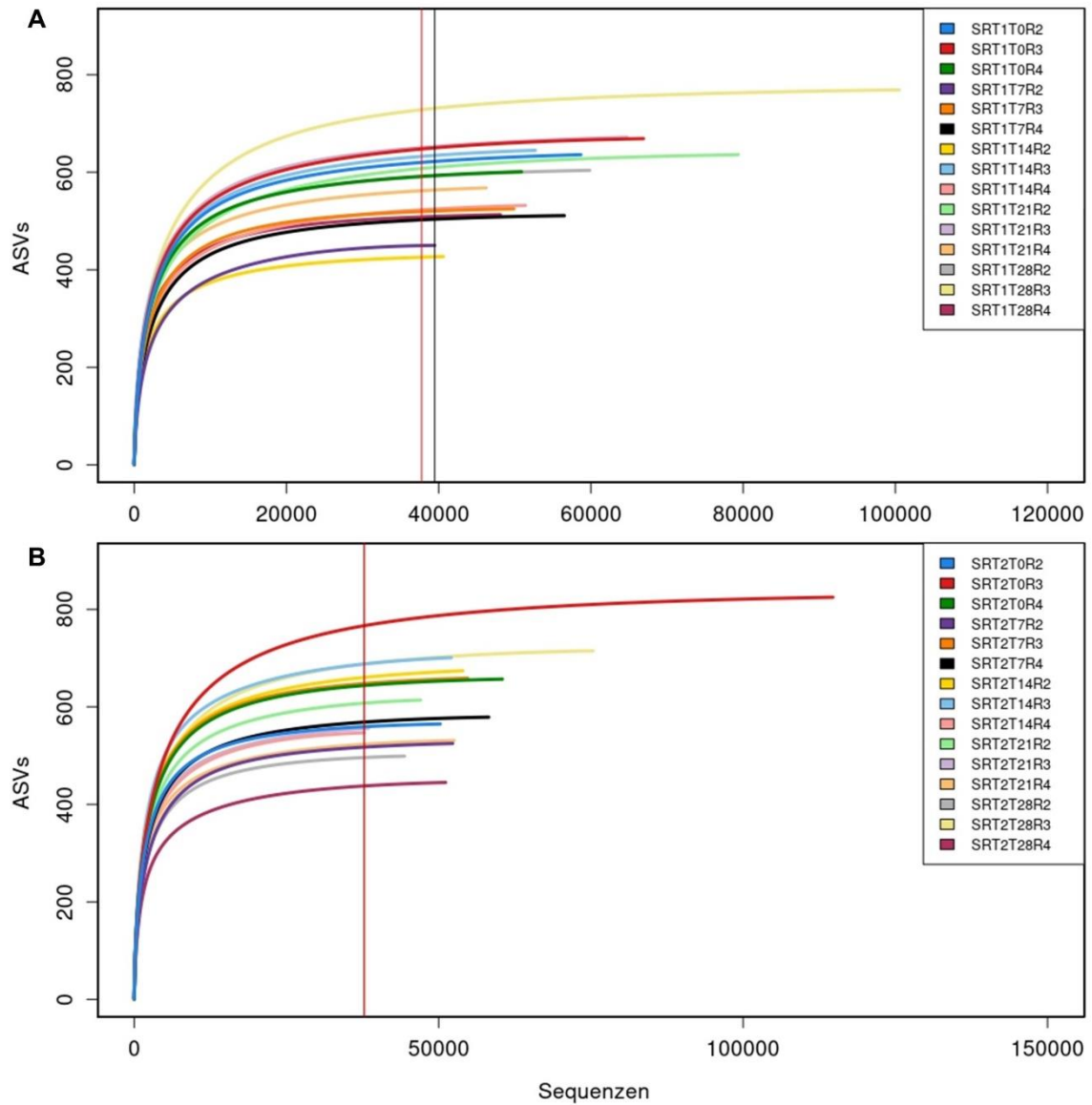
Anhang 6: Ergebnisse des Pairwise-Adonis-Tests des Einflusses des Experiments auf die Bray-Curtis-Distanzmatrix in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Inokulum. DF = Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS = Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F = F-Statistik; p = p-Wert nach Bonferroni-Korrektur.

Experiment	DF	SS	F	R ²	p
Inokulum1 vs Inokulum2	1	2,18	6,16	0,10	0,003
Inokulum1 vs Inokulum3	1	3,88	11,16	0,17	0,003
Inokulum2 vs Inokulum3	1	3,55	10,64	0,16	0,003

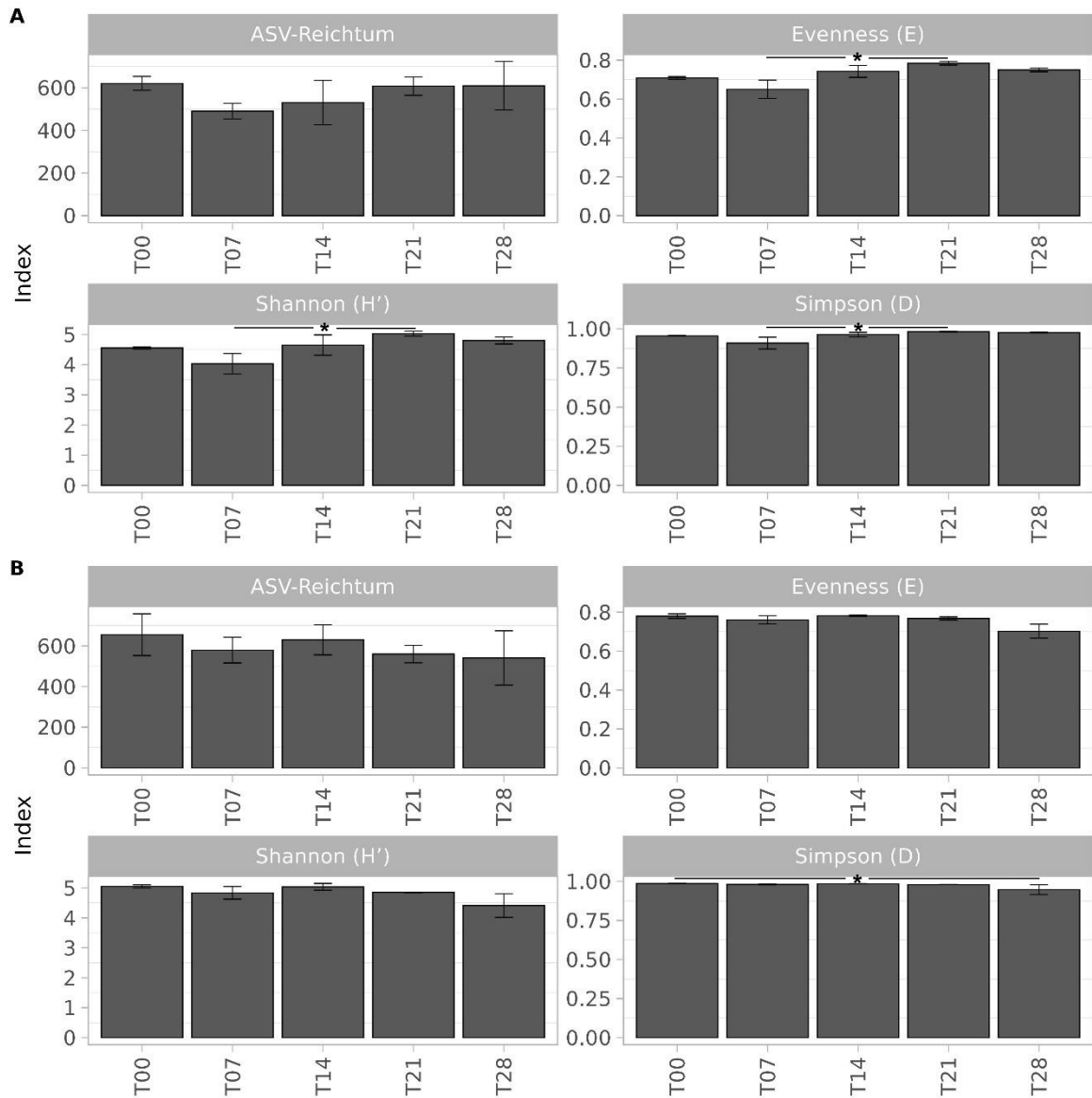
Schlammalter

Anhang 7: Ergebnisse von ANCOVA-Analysen transformierter Daten des PHA-Gehaltes in Verbindung mit der Selektionsdauer und dem Anteil potenzieller PHA-Produzenten über zwei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Schlammalter. DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS: Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F: F-Statistik.

PHA nach Selektionszeit	SS	DF	F	p
Experiment	19,848	1	8,14	0,008
Versuchsdauer	8,751	1	3,59	0,069
Interaktionsterm	2,400	1	0,99	0,330
Residuen	63,379	26		
PHA nach Anteil potenzieller PHA-Produzenten	SS	DF	F	p
Experiment	18,556	1	7,51	0,011
Potenzielle PHA-Produzenten	0,003	1	0,001	0,972
Interaktionsterm	10,319	1	4,18	0,051
Residuen	64,208	26		



Anhang 8: Rarefaction-Kurven für die Proben der Selektionsversuche mit unterschiedlichem Schlammalter. Die schwarze Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl innerhalb jedes einzelnen Versuches. Die rote Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl für alle drei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum, auf welche der Datensatz für weitere Analysen normalisiert wurde. A) Schlammalter 2 d. B) Schlammalter 4 d.



Anhang 9: Alpha-Diversitätsindizes in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammlalter. A) Schlammlalter 2 d. B) Schlammlalter 4 d. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag) mit zugehöriger Standardabweichung. Signifikante Unterschiede wurden mithilfe eines Kruskal-Wallis- und anschließendem Dunn-post-hoc-Test ermittelt und sind mittels Asteriskus gekennzeichnet.

Anhang 10: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests der Alpha-Diversitätsindizes zwischen verschiedenen Zeitpunkten über zwei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Schlammalter. χ^2 : Teststatistik; DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); p: Signifikanzwert.

Index	χ^2	DF	p
Schlammalter 1			
ASV-Reichtum	5,90	4	0,207
Evenness (E)	12,13	4	0,016
Shannon-Index (H')	10,83	4	0,029
Simpson-Index (D)	11,73	4	0,020
Schlammalter 2			
ASV-Reichtum	3,26	4	0,515
Evenness (E)	9,53	4	0,049
Shannon-Index (H')	10,70	4	0,030
Simpson-Index (D)	11,43	4	0,022



Anhang 11: Taxonomische Zusammensetzung der einzelnen Reaktoren in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. 1: Schlammalter 2 d. 2: Schlammalter 4 d. Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

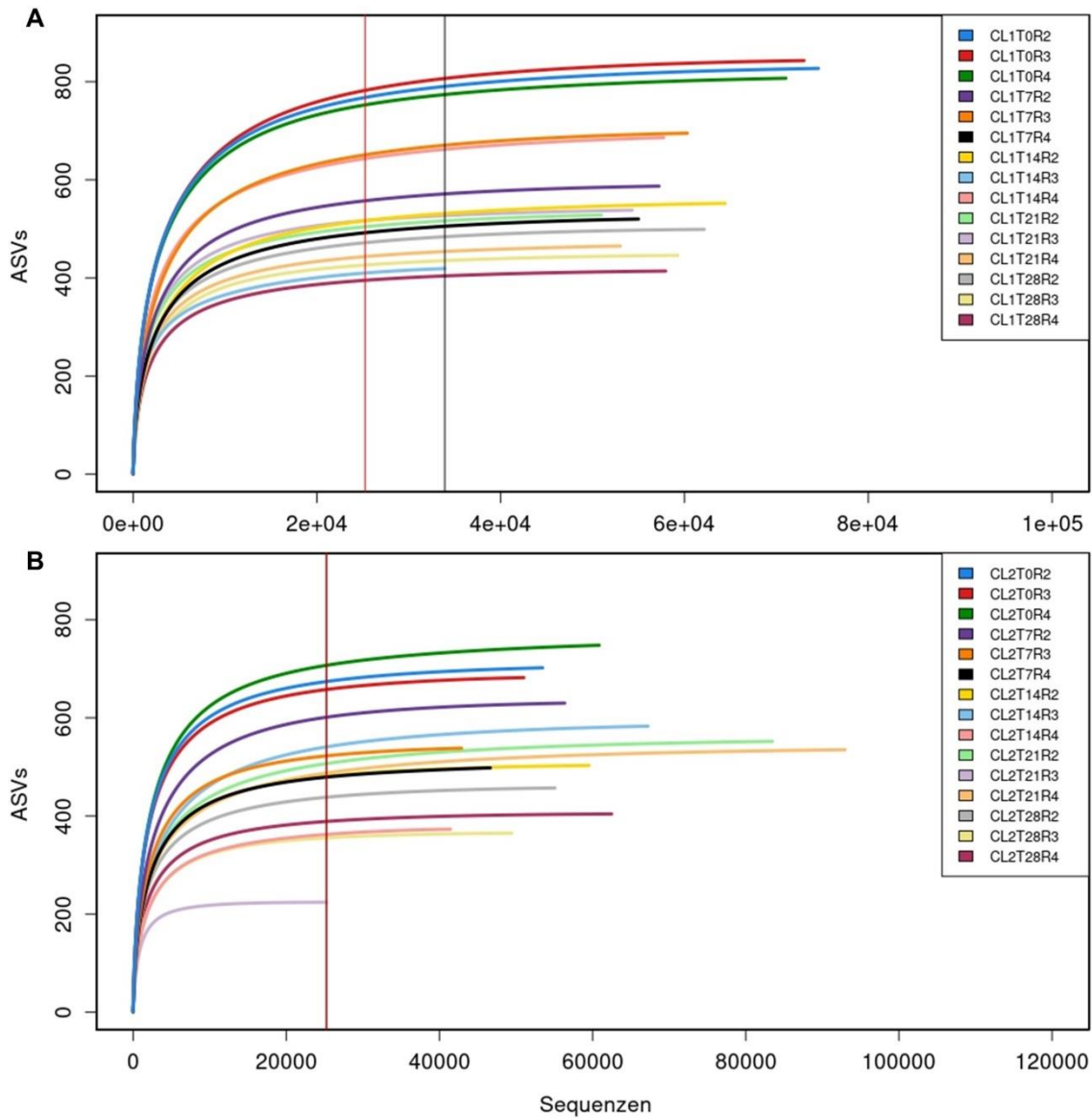
Anhang 12: Ergebnisse des Pairwise-Adonis-Tests des zeitlichen Effektes auf die Bray-Curtis-Distanzmatrix in Selektionsversuchen mit unterschiedlichem Schlammalter. DF = Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS = Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F = F-Statistik; p = p-Wert nach Bonferroni-Korrektur.

Tag	DF	SS	F	R ²	p
0 vs 7	1	0,98	7,76	0,44	0,02
0 vs 14	1	1,24	8,61	0,46	0,02
0 vs 21	1	1,37	8,99	0,47	0,03
0 vs 28	1	1,68	11,49	0,53	0,03
7 vs 14	1	0,30	1,41	0,12	1
7 vs 21	1	0,57	2,62	0,21	0,35
7 vs 28	1	0,89	4,19	0,30	0,03
14 vs 21	1	0,22	0,93	0,08	1
14 vs 28	1	0,60	2,62	0,21	0,11
21 vs 28	1	0,29	1,23	0,11	1

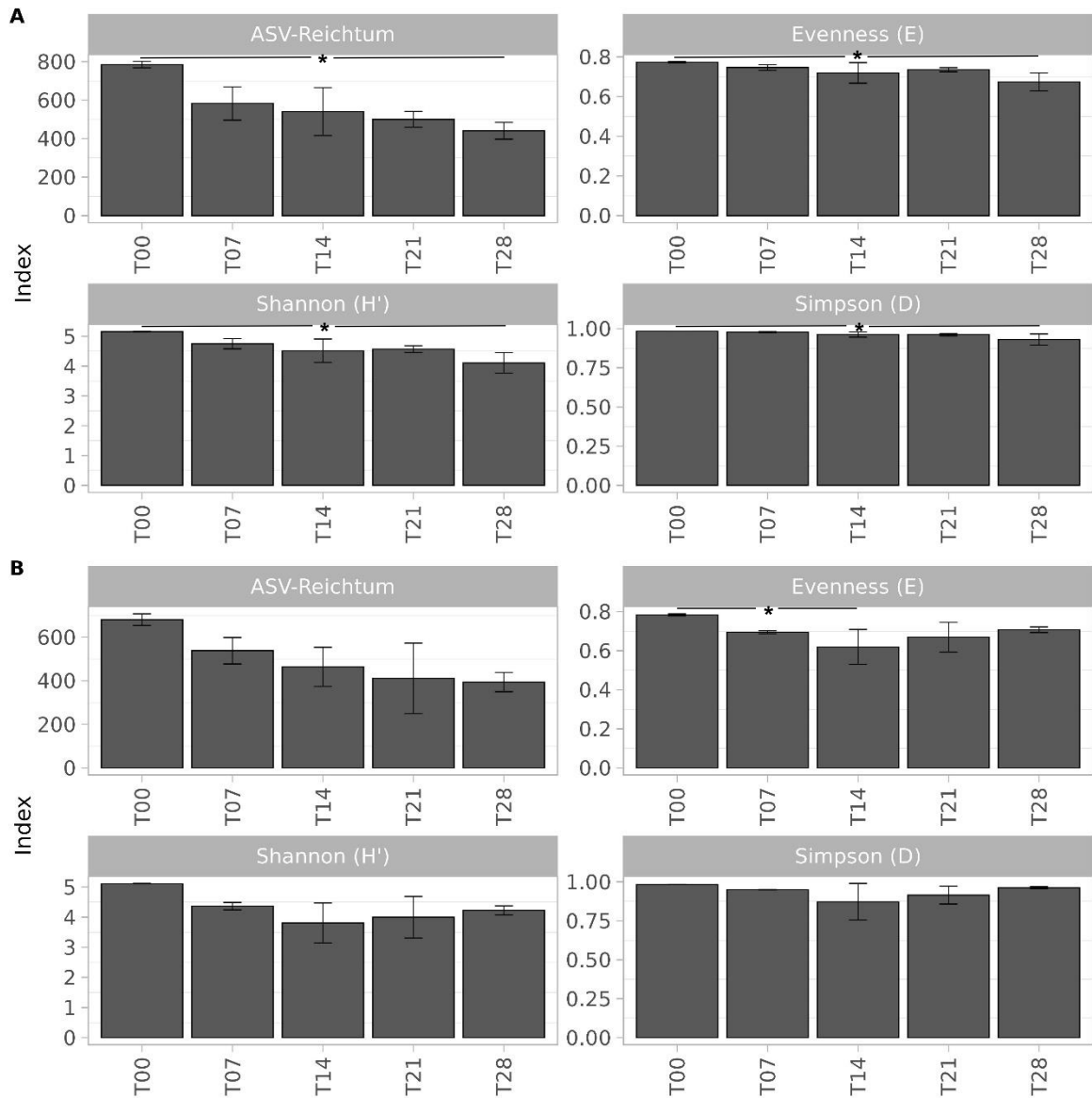
Zyklusdauer

Anhang 13: Ergebnisse von ANCOVA-Analysen Daten des PHA-Gehaltes in Verbindung mit der Selektionsdauer und dem Anteil potenzieller PHA-Produzenten über drei Selektionsversuche mit unterschiedlicher Zyklusdauer innerhalb der ersten 7 Tage der Versuche. DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS: Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F: F-Statistik.

PHA nach Selektionszeit	SS	DF	F	p
Experiment	792,19	1	69,98	0,000
Versuchsdauer	477,54	1	42,19	0,000
Interaktionsterm	917,00	1	81,01	0,000
Residuen	90,56	8		
PHA nach Anteil potenzieller PHA-Produzenten	SS	DF	F	p
Experiment	655,17	1	23,90	0,001
Potenzielle PHA-Produzenten	552,61	1	20,16	0,002
Interaktionsterm	713,22	1	26,02	0,001
Residuen	219,18	8		



Anhang 14: Rarefaction-Kurven für die Proben der Selektionsversuche mit unterschiedlicher Zyklusdauer. Die schwarze Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl innerhalb jedes einzelnen Versuches. Die rote Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl für alle drei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum, auf welche der Datensatz für weitere Analysen normalisiert wurde. A) Zyklusdauer 24 h. B) Zyklusdauer 6 h.



Anhang 15: Alpha-Diversitätsindizes in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. A) Zyklusdauer 24 h. B) Zyklusdauer 6 h. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag) mit zugehöriger Standardabweichung. Signifikante Unterschiede wurden mithilfe eines Kruskal-Wallis- und anschließendem Dunn-post-hoc-Test ermittelt und sind mittels Asteriskus gekennzeichnet.

Anhang 16: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests der Alpha-Diversitätsindizes zwischen verschiedenen Zeitpunkten über zwei Selektionsversuche mit unterschiedlicher Zyklusdauer. χ^2 : Teststatistik; DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); p: Signifikanzwert.

Index	χ^2	DF	p
Zyklusdauer 1			
ASV-Reichtum	9,90	4	0,042
Evenness (E)	10,50	4	0,003
Shannon-Index (H')	9,83	4	0,043
Simpson-Index (D)	10,27	4	0,036
Zyklusdauer 2			
ASV-Reichtum	9,23	4	0,056
Evenness (E)	9,80	4	0,045
Shannon-Index (H')	8,83	4	0,065
Simpson-Index (D)	9,63	4	0,047



Anhang 17: Taxonomische Zusammensetzung der einzelnen Reaktoren in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. 1: Zyklusdauer 24 h. 2: Zyklusdauer 6 h. Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

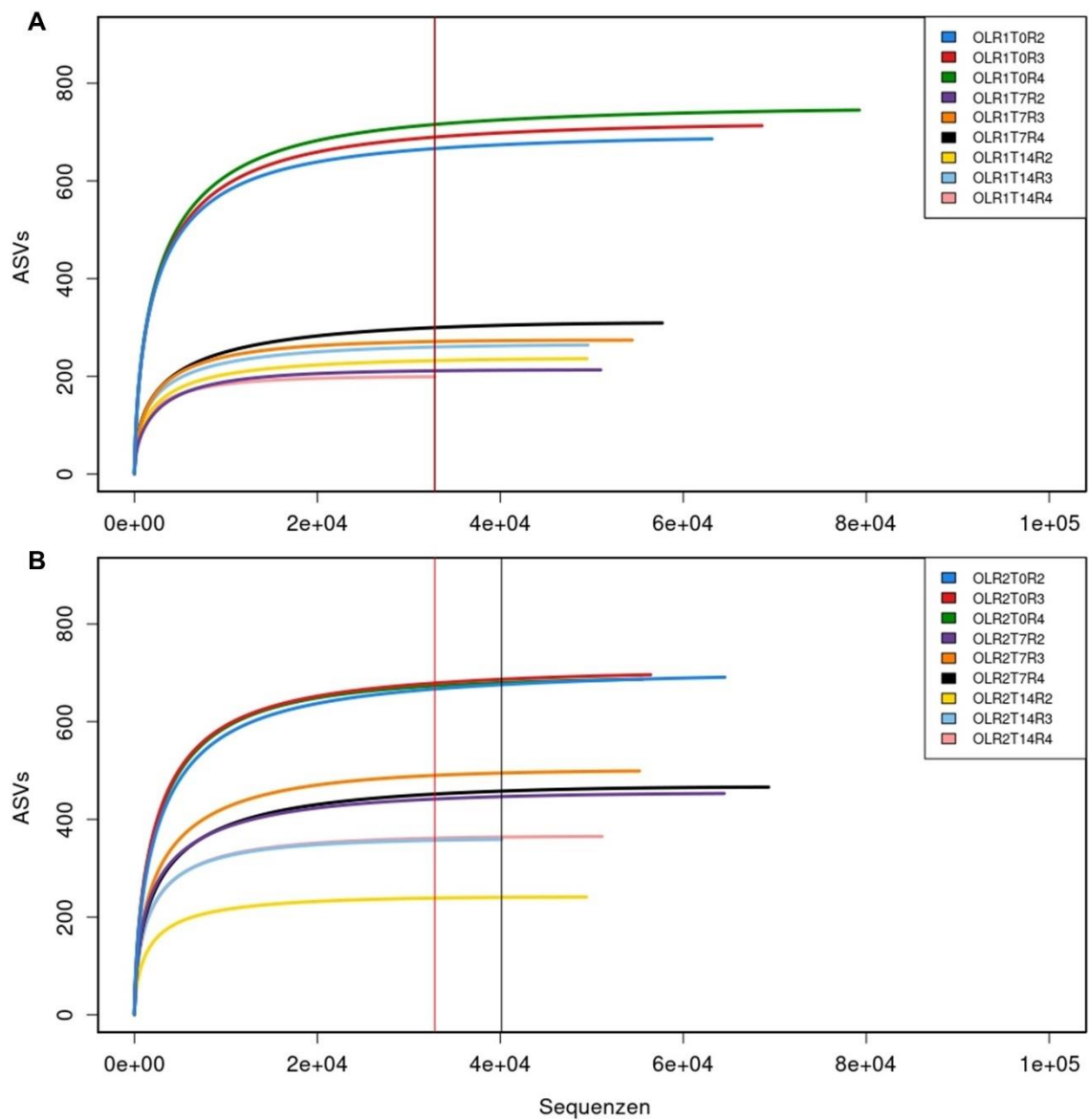
Anhang 18: Ergebnisse des Pairwise-Adonis-Tests des zeitlichen Effektes auf die Bray-Curtis-Distanzmatrix in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Zyklusdauer. DF = Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS = Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F = F-Statistik; p = p-Wert nach Bonferroni-Korrektur.

Tag	DF	SS	F	R ²	p
0 vs 7	1	1,19	9,97	0,50	0,02
0 vs 14	1	1,21	6,62	0,40	0,08
0 vs 21	1	1,96	13,03	0,57	0,03
0 vs 28	1	2,08	15,06	0,60	0,03
7 vs 14	1	0,41	1,53	0,13	1
7 vs 21	1	0,90	3,86	0,28	0,06
7 vs 28	1	1,25	5,67	0,36	0,03
14 vs 21	1	0,31	1,03	0,09	1
14 vs 28	1	0,53	1,85	0,16	0,27
21 vs 28	1	0,22	0,89	0,08	1

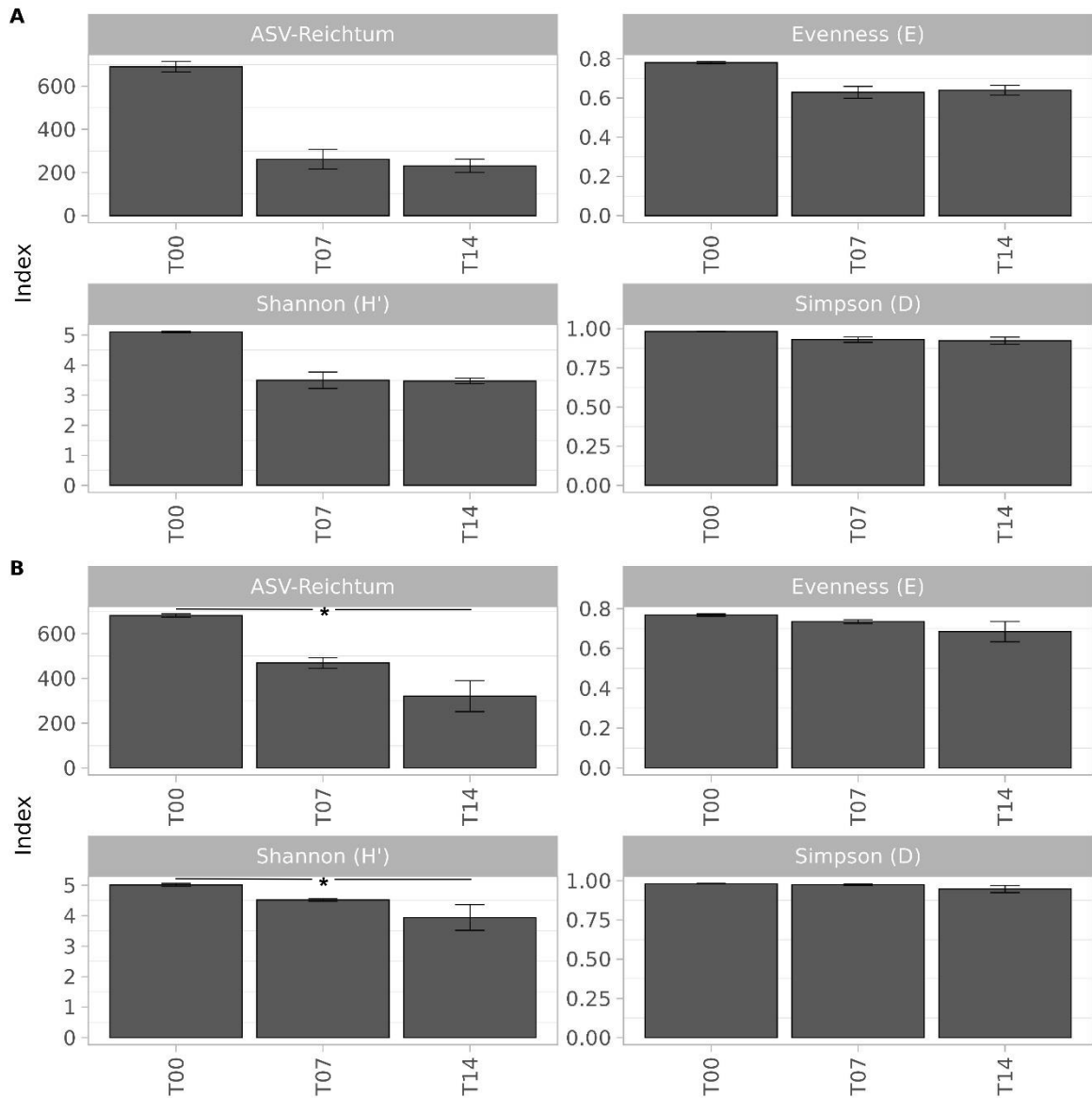
Raumbelastung

Anhang 19: Ergebnisse von ANCOVA-Analysen des PHA-Gehaltes in Verbindung mit der Selektionsdauer und dem Anteil potenzieller PHA-Produzenten über drei Selektionsversuche mit unterschiedlicher Raumbelastung. DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS: Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F: F-Statistik.

PHA nach Selektionszeit	SS	DF	F	p
Experiment	0,009	1	0,007	0,980
Versuchsdauer	4,320	1	0,33	0,573
Interaktionsterm	3,203	1	0,25	0,627
Residuen	181,979	14		
PHA nach Anteil potenzieller PHA-Produzenten	SS	DF	F	p
Experiment	3,173	1	0,26	0,616
Potenzielle PHA-Produzenten	16,594	1	1,38	0,260
Interaktionsterm	4,316	1	0,36	0,559
Residuen	168,592	14		



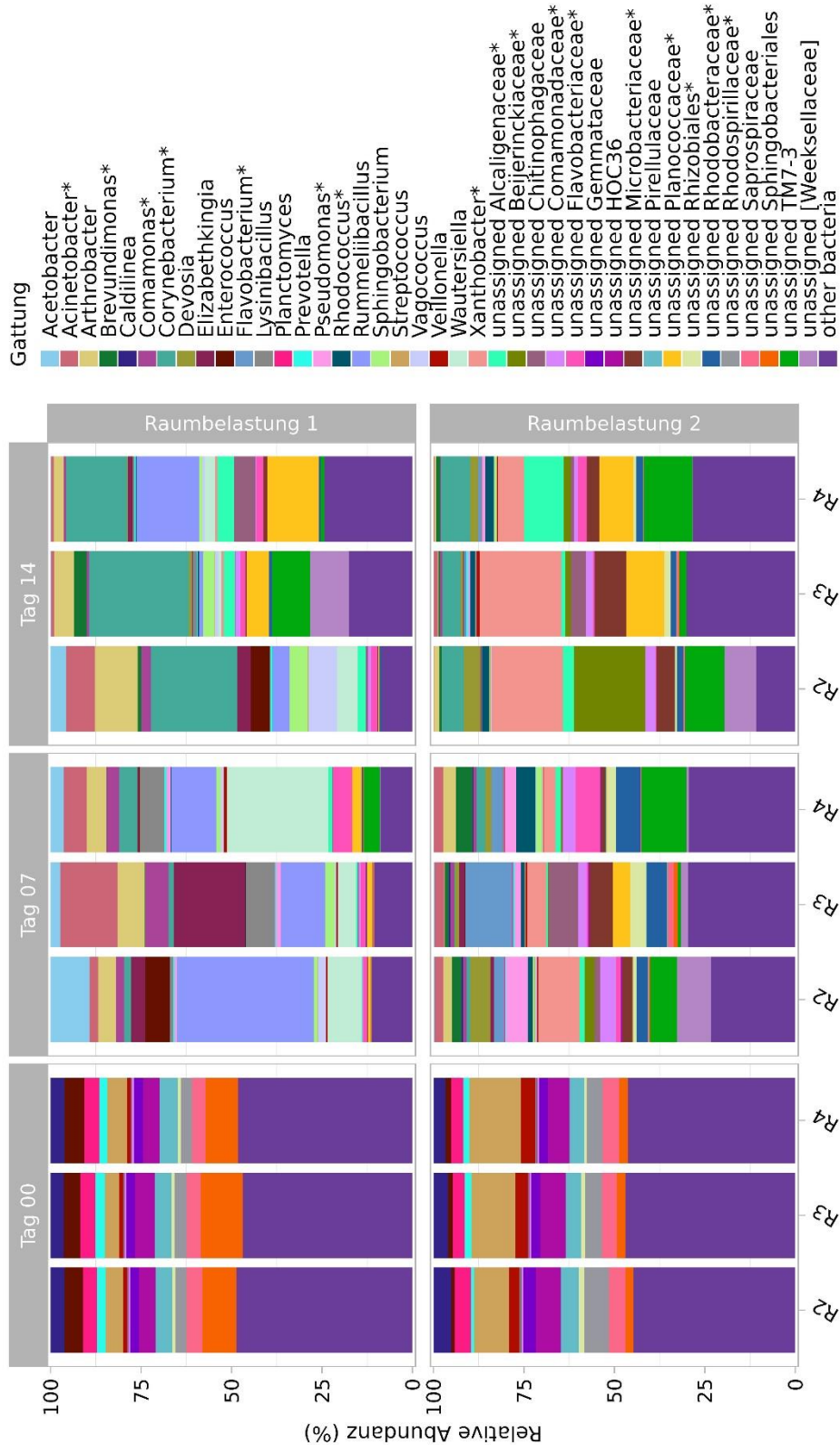
Anhang 20: Rarefaction-Kurven für die Proben der Selektionsversuche mit unterschiedlicher Raumbelastung. Die schwarze Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl innerhalb jedes einzelnen Versuches. Die rote Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl für alle drei Selektionsversuche mit unterschiedlichem Inokulum, auf welche der Datensatz für weitere Analysen normalisiert wurde. A) Raumbelastung 10 g/(L*d). B) Raumbelastung 6 g/(L*d).



Anhang 21: Alpha-Diversitätsindizes in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. A) Raumbelastung 10 g/(L*d). B) Raumbelastung 6 g/(L*d). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Reaktoren zum jeweiligen Probenahmezeitpunkt (T = Tag) mit zugehöriger Standardabweichung. Signifikante Unterschiede wurden mithilfe eines Kruskal-Wallis- und anschließendem Dunn-post-hoc-Test ermittelt und sind mittels Asteriskus gekennzeichnet.

Anhang 22: Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests der Alpha-Diversitätsindizes zwischen verschiedenen Zeitpunkten über zwei Selektionsversuche mit unterschiedlicher Raumbelastung. χ^2 : Teststatistik; DF: Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); p: Signifikanzwert.

Index	χ^2	DF	p
Raumbelastung 1			
ASV-Reichtum	5,96	2	0,051
Evenness (E)	5,96	2	0,051
Shannon-Index (H')	5,60	2	0,061
Simpson-Index (D)	5,42	2	0,067
Raumbelastung 2			
ASV-Reichtum	7,20	2	0,027
Evenness (E)	5,96	2	0,051
Shannon-Index (H')	7,20	2	0,027
Simpson-Index (D)	5,69	2	0,058



Anhang 23: Taxonomische Zusammensetzung der einzelnen Reaktoren in Selektionsversuchen mit unterschiedlicher Raumbelastung. 1: Raumbelastung 10 g/(L*d). 2: Raumbelastung 6 g/(L*d). Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Zusammenfassende Analyse der Versuche mit realem Substrat

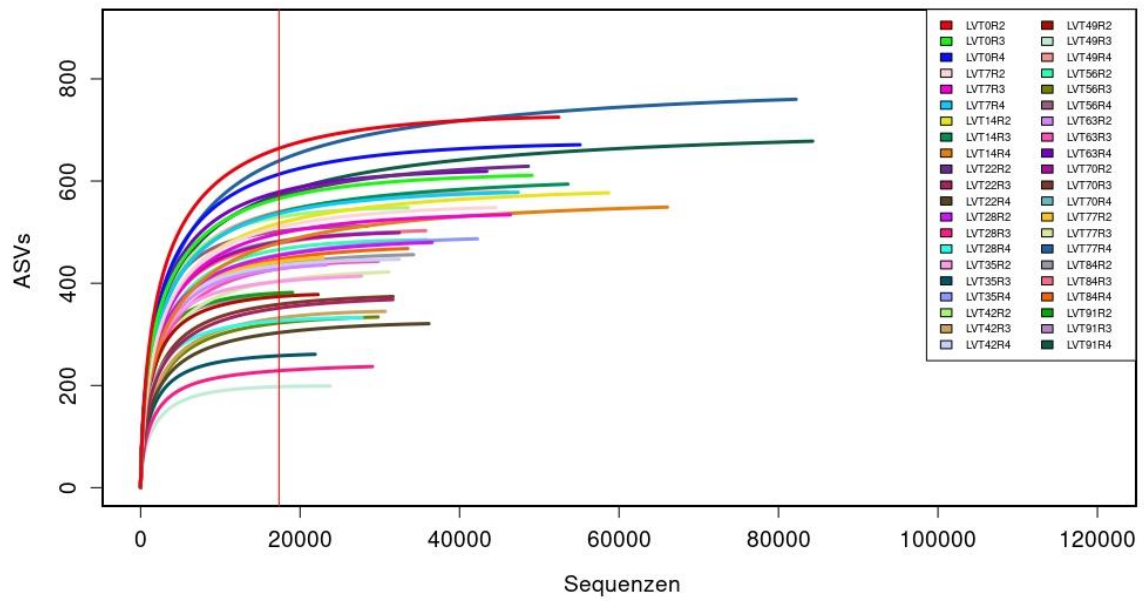
Anhang 24: Ergebnisse des Pairwise-Adonis-Tests des zeitlichen Effektes auf die Bray-Curtis-Distanzmatrix in Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern. DF = Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS = Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F = F-Statistik; p = p-Wert nach Bonferroni-Korrektur.

Tag	DF	SS	F	R ²	p
0 vs 7	1	2,37	10,01	0,23	0,01
0 vs 14	1	2,80	10,92	0,24	0,01
0 vs 21	1	2,91	14,81	0,35	0,01
0 vs 28	1	3,41	17,82	0,39	0,01
7 vs 14	1	0,44	1,15	0,03	1
7 vs 21	1	0,92	2,63	0,09	0,01
7 vs 28	1	1,31	3,79	0,12	0,01
14 vs 21	1	0,54	1,45	0,05	1
14 vs 28	1	0,90	2,42	0,08	0,03
21 vs 28	1	0,26	0,81	0,04	1

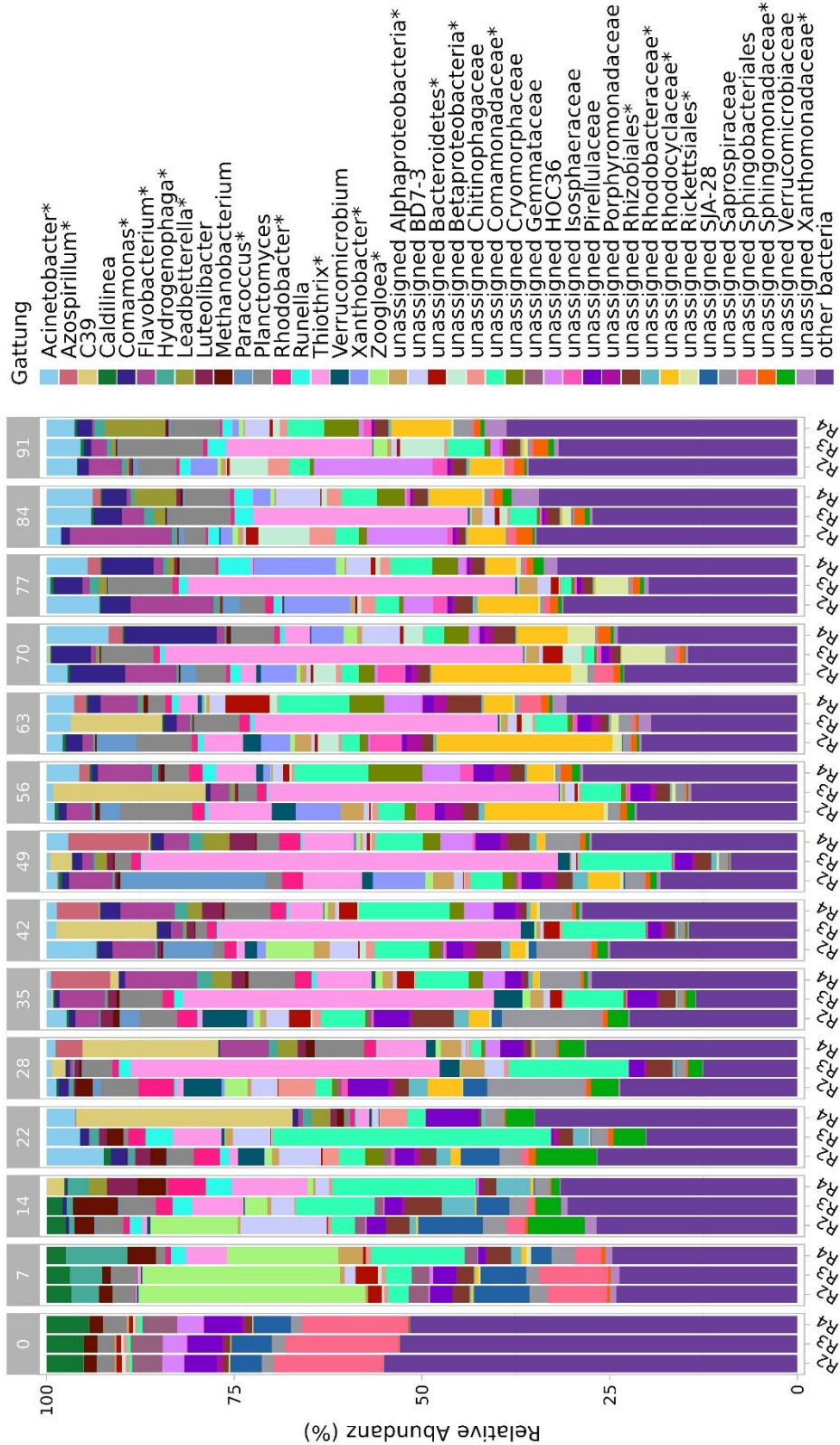
Anhang 25: Ergebnisse des Pairwise-Adonis-Tests des Einflusses des Experimentes auf die Bray-Curtis-Distanzmatrix in Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern. DF = Freiheitsgrad („Degree of Freedom“); SS = Summe der Quadrate („Sum of Squares“); F = F-Statistik; p = p-Wert nach Bonferroni-Korrektur.

Experiment	DF	SS	F	R ²	p
Raumbelastung1 vs Raumbelastung2	1	0,89	2,64	0,14	0,315
Raumbelastung1 vs Schlammalter1	1	1,79	6,34	0,22	0,015
Raumbelastung1 vs Schlammalter2	1	1,71	6,19	0,22	0,015
Raumbelastung1 vs Zyklusdauer1	1	1,51	4,61	0,17	0,015
Raumbelastung1 vs Zyklusdauer2	1	1,57	4,91	0,18	0,015
Raumbelastung2 vs Schlammalter1	1	1,77	6,55	0,23	0,015
Raumbelastung2 vs Schlammalter2	1	1,70	6,43	0,23	0,015
Raumbelastung2 vs Zyklusdauer1	1	1,36	4,29	0,16	0,03
Raumbelastung2 vs Zyklusdauer2	1	1,51	4,89	0,18	0,015
Schlammalter1 vs Schlammalter2	1	1,42	6,01	0,18	0,015
Schlammalter1 vs Zyklusdauer1	1	2,02	7,30	0,21	0,015
Schlammalter1 vs Zyklusdauer2	1	2,08	7,66	0,21	0,015
Schlammalter2 vs Zyklusdauer1	1	1,63	5,98	0,18	0,015
Schlammalter2 vs Zyklusdauer2	1	1,84	6,92	0,20	0,015
Zyklusdauer1 vs Zyklusdauer2	1	0,78	2,55	0,08	0,27

7.2 Langzeit-Selektion



Anhang 26: Rarefaction-Kurven für die Proben eines Langzeit-Selektionsversuches. Die rote Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl des Versuches, auf welche der Datensatz für weitere Analysen normalisiert wurde.

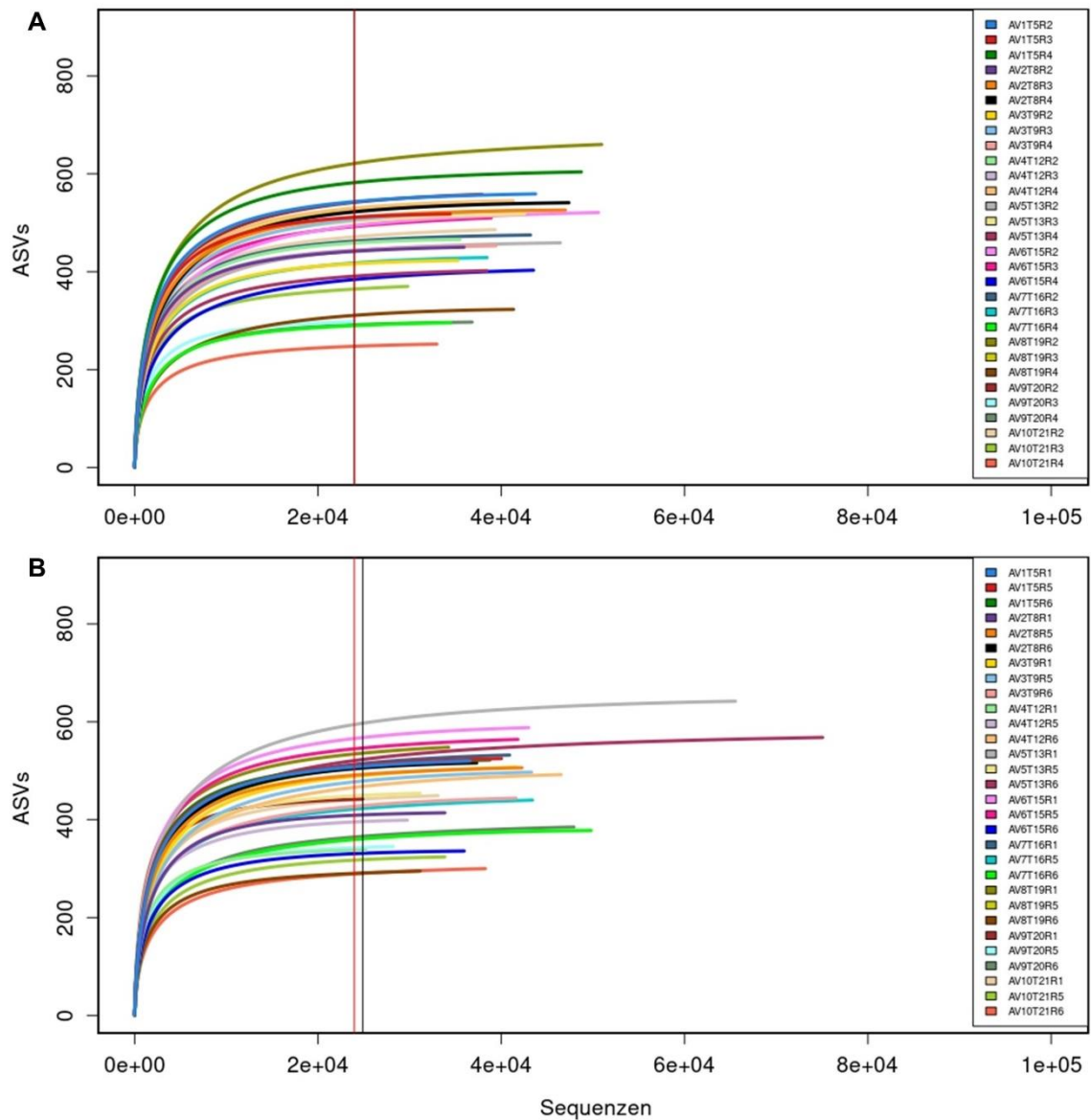


Anhang 27: Taxonomische Zusammensetzung der einzelnen Reaktoren in einem Langzeit-Selektionsversuch. Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

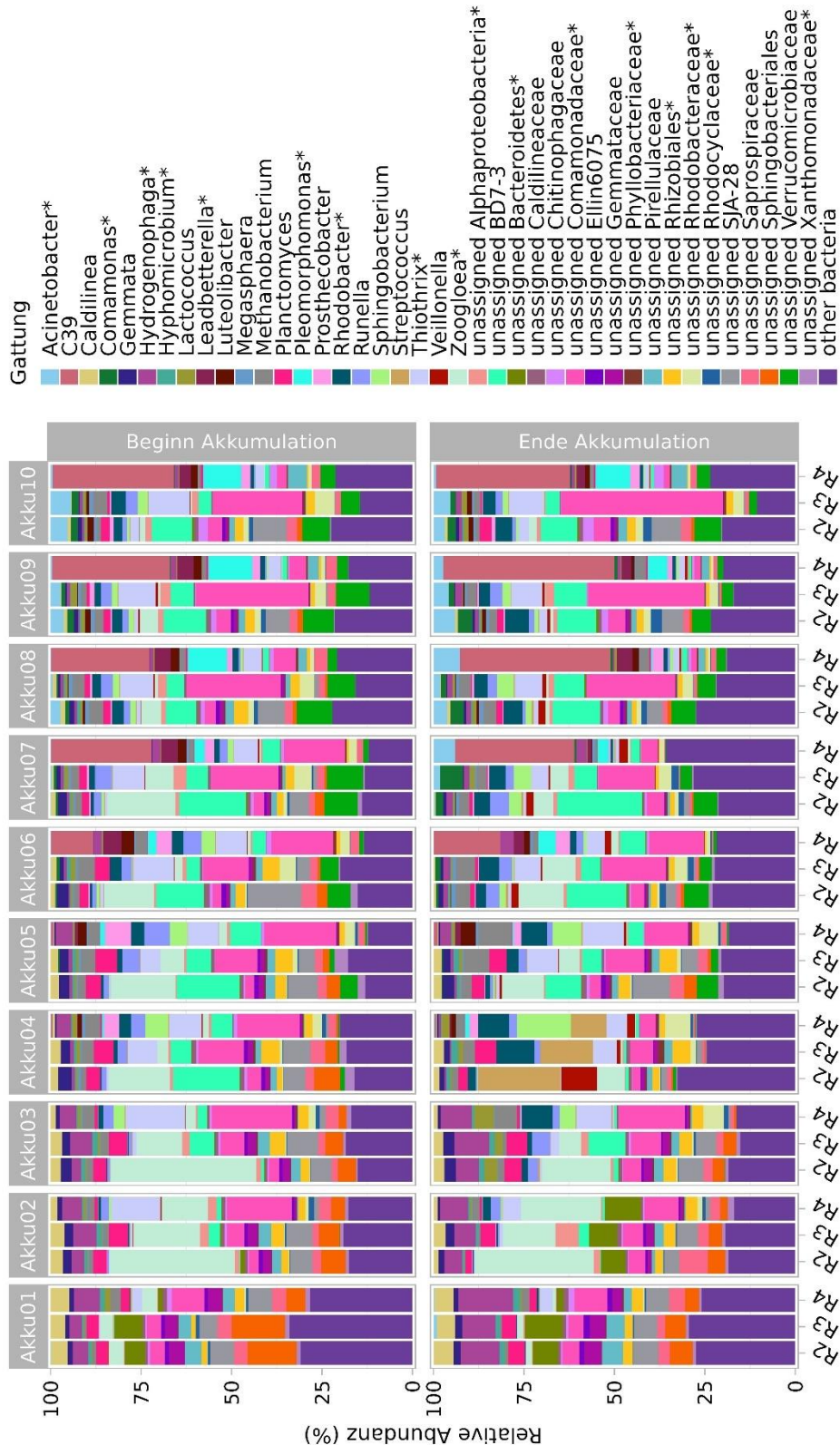
Anhang 28: LDA- und Bonferroni-korrigierte p-Werte für die mittels LefSe-Analyse ermittelten Markerorganismen innerhalb eines Langzeit-Selektionsversuches. Wilcoxon-Grenzwert = 0,05; Kruskal-Wallis-Grenzwert = 0,05; LDA-Grenzwert = 2. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Taxon	Marker für Tag	LDA-Wert	p
unassigned Sphingobacteriales	0	2,580	0,000
unassigned Pirellulaceae	0	2,370	0,000
<i>Caldilinea</i>	0	2,244	0,000
<i>Streptococcus</i>	0	2,144	0,000
unassigned Gemmataceae	0	2,141	0,000
<i>Zoogloea</i> *	7	2,811	0,000
unassigned SJA-28	7	2,428	0,000
<i>Hydrogenophaga</i> *	7	2,271	0,000
unassigned BD7-3	14	2,434	0,001
<i>Rhodobacter</i> *	14	2,346	0,000
<i>Methanobacterium</i>	14	2,257	0,000
unassigned Rhodobacteraceae*	14	2,135	0,000
unassigned Comamonadaceae*	22	2,911	0,001
unassigned Verrucomicrobiaceae	22	2,338	0,000
unassigned Saprospiraceae	35	2,478	0,000
<i>Verrucomicrobium</i>	35	2,153	0,000
unassigned Rhizobiales*	35	2,138	0,027
unassigned Bacteroidetes*	35	2,136	0,000
<i>Thiothrix</i> *	49	3,212	0,003
unassigned Cryomorphaceae	56	2,132	0,000
<i>Comamonas</i> *	70	2,549	0,000
<i>Runella</i>	77	2,148	0,000
<i>Acidovorax</i>	77	2,053	0,000
<i>Acinetobacter</i> *	91	3,107	0,000
unassigned HOC36	91	2,302	0,031
unassigned Betaproteobacteria	91	2,081	0,000

7.3 PHA-Akkumulation



Anhang 29: Rarefaction-Kurven für die Proben der Akkumulationsversuche zu Beginn und Ende der Akkumulationsphase. Die schwarze Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl innerhalb der einzelnen Phase. Die rote Linie zeigt die minimale Sequenzanzahl für beide Phasen, auf welche der Datensatz für weitere Analysen normalisiert wurde. A) Beginn der Akkumulationsphase. B) Ende der Akkumulationsphase.



Anhang 30: Taxonomische Zusammensetzung der einzelnen Reaktoren zu Beginn und Ende der Akkumulationsphase in Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. Die 40 abundantesten Taxa auf Gattungsebene sind abgebildet, alle weiteren wurden in die Gruppe „other bacteria“ zusammengefasst. Nicht auf Gattungsebene bestimmbare Taxa wurden mit der letzten bestimmbaren Ebene und dem Präfix „unassigned“ benannt. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

7.4 Digitaler Anhang

Die im Folgenden aufgelisteten Dateien sind in digitaler Form verfügbar.

Anhang 31: Bakterientaxa mit dem Potenzial zur PHA-Produktion.

Anhang 32: Alpha-Diversitätsindizes der einzelnen Reaktoren aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern und einem Langzeit-Selektionsversuch. A) Selektionsversuche mit drei verschiedenen Inokula. B) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Schlammaltern. C) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Zyklusdauern. D) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Raumbelastungen. E) Langzeit-Selektionsversuch.

Anhang 33: Relative Abundanz der Gattungen innerhalb der einzelnen Reaktoren aus Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern, einem Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. A) Selektionsversuche mit drei verschiedenen Inokula. B) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Schlammaltern. C) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Zyklusdauern. D) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Raumbelastungen. E) Langzeit-Selektionsversuch. F) Akkumulationsversuche mit zehn Substratvariationen. Die nicht auf Gattungsebene bestimmbar Taxa sind mit dem Präfix „unassigned“ versehen. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert. Die gesamte relative Abundanz der jeweiligen Taxa über den Versuchsblock und die Präsenz in den Proben über den betrachteten Versuchsblock sind am Ende jedes Tabellenblattes aufgeführt.

Anhang 34: Signifikante Ergebnisse der Maaslin2-Tests über die zeitliche Veränderung der taxonomischen Zusammensetzung innerhalb von Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern und einem Langzeit-Selektionsversuch. A) Selektionsversuche mit drei verschiedenen Inokula. B) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Schlammaltern. C) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Zyklusdauern. D) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Raumbelastungen. E) Langzeit-Selektionsversuch. Die nicht auf Gattungsebene bestimmbar Taxa sind mit dem Präfix „unassigned“ versehen. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Anhang 35: Signifikante Ergebnisse der Kruskal-Wallis- und gepaarten Wilcoxon-Tests der relativen Abundanz der Taxa zwischen den Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern (Schlammalter, Zyklusdauer und Raumbelastung). Die nicht auf Gattungsebene bestimmbar Taxa sind mit dem Präfix „unassigned“ versehen. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Anhang 36: Signifikante Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests der relativen Abundanz der Taxa mit signifikanter Änderung in der relativen Abundanz zwischen Beginn und Ende der Akkumulationsphase. Nicht auf Gattungsebene bestimmbar Taxa sind mit dem Präfix „unassigned“ versehen. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert.

Anhang 37: Ergebnisse der Indikatoranalysen in Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern. A) Selektionsversuche mit drei verschiedenen Inokula. B) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Schlammaltern, Zyklusdauern und Raumbelastungen. Indikatororganismen wurden anhand des IndVal-Indexes ermittelt. Aufgeführt sind die Gruppenzuordnungen (index), Quadratwurzel des IndVal-Wertes (stat), p-Werte und korrigierte p-Werte. Potenzielle PHA-Produzenten sind mit einem Asteriskus markiert. Der Wert 1 bzw. 0 gibt an, ob das Taxon als Indikator gewertet wurde oder nicht.

Anhang 38: Kanten innerhalb der Netzwerke von Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Inokula. A) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage. B) Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Phosphoreliminierung. C) Belebtschlamm einer Industriekläranlage einer Brauerei.

Anhang 39: Taxonomische Zuordnung und Sequenzanzahl aller ASVs in Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern, einem Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. Die Daten wurden in drei Sequenzläufen ermittelt. A) Selektionsversuche mit drei unterschiedlichen Inokula. B) Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern (zwei verschiedene Schlammalter, zwei Zyklusdauern, zwei Raumbelastungen). C) Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuche mit zehn verschiedenen Substraten.

Anhang 40: PHA-Gehalt, PHA-Zusammensetzung und relative Abundanz potenzieller PHA-Produzenten in den einzelnen Reaktoren in Selektionsversuchen mit unterschiedlichen Betriebsparametern, einem Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. A) Selektionsversuche mit drei verschiedenen Inokula. B) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Schlammaltern. C) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Zyklusdauern. D) Selektionsversuche mit zwei verschiedenen Raumbelastungen. E) Langzeit-Selektionsversuch. F) Akkumulationsversuche mit zehn Substratvariationen.

Anhang 41: Probenbenennung der sequenzierten Datensätze für Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern, einem Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. Die Daten wurden in drei Sequenzläufen ermittelt. A) Selektionsversuche mit drei unterschiedlichen Inokula. B) Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern (zwei verschiedene Schlammalter, zwei Zyklusdauern, zwei Raumbelastungen). C) Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuche mit zehn verschiedenen Substraten.

Anhang 42: Sequenztabelle für Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern, einem Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. Die Daten wurden in drei Sequenzläufen ermittelt. A) Selektionsversuche mit drei unterschiedlichen Inokula. B) Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern (zwei verschiedene Schlammalter, zwei Zyklusdauern, zwei Raumbelastungen). C) Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuche mit zehn verschiedenen Substraten.

Anhang 43: Sequenzrohdaten für Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern, einem Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuchen mit unterschiedlichem Substrat. Die Daten wurden in drei Sequenzläufen ermittelt. A) Selektionsversuche mit drei unterschiedlichen Inokula. B) Selektionsversuche mit unterschiedlichen Betriebsparametern (zwei verschiedene Schlammalter, zwei Zyklusdauern, zwei Raumbelastungen). C) Langzeit-Selektionsversuch und Akkumulationsversuche mit zehn verschiedenen Substraten.

Anhang 44: Digitale Version der Dissertation.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den nachstehenden Personen meinen besonderen Dank ausdrücken.

Prof. Dr. Heidrun Steinmetz für die Betreuung dieser Arbeit und die Ermöglichung der Bearbeitung dieses Themas. Außerdem danke ich ihr für den konstruktiven, wissenschaftlichen Austausch und die Anregungen zu neuen Ideen sowie für die ermutigenden und motivierenden Gespräche. Außerdem möchte ich ihr für die Durchsicht der Dissertation danken.

Prof. Dr. Thorsten Stoeck ebenfalls für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, die freundliche Hilfe sowie für die konstruktiven Gespräche.

Dr. Thomas Uhrig und **Cora Laumeyer** für die gute Zusammenarbeit, die Hilfe in der Betreuung der Versuchsanlage, die unzähligen und wertvollen intellektuellen sowie persönlichen Diskussionen. Thomas Uhrig danke ich zudem für die Geduld in der Anleitung zur Betreuung der Versuchsanlage und der Heranführung an die verfahrenstechnischen und ingenieurwissenschaftlichen Aspekte des Themas. Zudem möchte ich Cora Laumeyer für die Durchsicht dieser Dissertation danken.

Dr. Sven Katzenmeier und **Maren Nothof** für die motivierenden Worte, die moralische Unterstützung, die ertragreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die Anregungen zu neuen Ideen. Des Weiteren möchte ich Sven Katzenmeier für seine geduldige Unterstützung und Beratung in der statistischen Auswertung der Daten sowie für die mehrfache Durchsicht der Dissertation danken. Maren Nothof möchte ich ebenfalls für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

Patrick Bottelberger für das Korrekturlesen der Arbeit und dafür, dass er mich immer unterstützt und aufgebaut hat.

Allen studentischen Hilfskräften und Volontären sowie dem Personal der Versuchshalle und des Labors des Institutes WIR, insbesondere **Luciana Schäfer** und **Jens Just**, für die Unterstützung in der Versuchsbetreuung, Probenahme und Analytik. Zudem möchte ich dem Institut WIR für die freundliche Aufnahme in das Team und die gute Zusammenarbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, ohne deren Unterstützung und Ermutigung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke ihnen für ihr liebevolles Verständnis, ihre motivierenden Worte und dass sie immer für mich da waren.

Darlegung des Eigenanteils

Julia Zimmer

Dynamik der mikrobiellen Mischbiozönose und der PHA-Produktion aus Restströmen unter variierenden Betriebsstrategien

Die Datenerhebung in dieser Arbeit fand im Rahmen der beiden Projekte „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen - Einflussfaktoren auf Teilprozesse und Entwicklung von Mess-Steuer- und Regelungsstrategien zur Schließung der Verfahrenskette“ und „Biopolymerproduktion aus industriellen Abwasserströmen Teil II - Anpassungen von Prozessbedingungen und Adaption der Biozönose zur Beeinflussung der Polymerzusammensetzung“, finanziert durch die Willy-Hager-Stiftung Stuttgart, statt. Die Konzeption und Planung des ersten Projektes wurden von Thomas Uhrig und Heidrun Steinmetz durchgeführt. Das Versuchsdesign, die Methodenentwicklung sowie die Datenerhebung zur PHA-Produktion zum Versuch aus Kapitel 3.1.1 erfolgten in Zusammenarbeit mit Thomas Uhrig. Die Datenerhebung und -analyse der mikrobiologischen Untersuchungen erfolgte durch mich. Die Konzeption und Konstruktion der Versuchsanlage erfolgten vollständig durch Herrn Uhrig. Die Steuerung der Versuchsanlage basierte auf einem durch die Elektronikwerkstatt der Universität angepassten Labview-Programm. Die Planung des zweiten Projektes erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Heidrun Steinmetz. Cora Laumeyer, Jens Just und einige studentische Hilfskräfte sowie Volontäre unterstützten bei der Betreuung der Versuchsanlage sowie bei der Probenahme. Die Probenaufbereitung und -analyse wurde in Teilen durch studentische Hilfskräfte und die Labormitarbeiterinnen Annette Knaus und Luciana Schäfer durchgeführt. Die genannten Personen gehören oder gehörten alle der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau an.

Die in Abbildung 11 und Abbildung 12 gezeigten Daten sind Daten zur PHA-Produktion aus drei Versuchen, die ich in Zusammenarbeit mit Thomas Uhrig erhoben habe.

Die vorliegende Einschätzung über die erbrachte Leistung von Dritten wurde mit den genannten Personen einvernehmlich abgestimmt.

Datum, Unterschrift Doktorand/in

Datum, Unterschrift Betreuer/in

Darlegung aller benutzten Hilfsmittel und Hilfestellungen

Julia Zimmer

Dynamik der mikrobiellen Mischbiozönose und der PHA-Produktion aus Restströmen unter variierenden Betriebsstrategien

Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes RStudio v4.0.5 und v4.3.3. Sven Katzenmeier hat mich bei der statistischen Analyse der Daten unterstützt, indem er Skripte zur Verfügung gestellt und bei der Anpassung geholfen hat. Weitere Skripte zur statistischen Analyse in RStudio wurden von Maren Nothof (RPTU) bereitgestellt und durch mich angepasst. Die Arbeit wurde von Sven Katzenmeier, Heidrun Steinmetz und von Cora Laumeyer von der Rheinland-Pfälzisch Technischen Universität Kaiserslautern-Landau sowie von Patrick Bottelberger Korrektur gelesen.

Datum, Unterschrift Doktorand/in

Erklärungen entsprechend § 6 der Promotionsordnung des FB Biologie

Ich erkläre wahrheitsgemäß, dass

- mir die Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern vom 27. November 2018 bekannt ist,
- ich die eingereichte Dissertation selbst angefertigt und, alle für die Arbeit benutzten Hilfsmittel und Hilfestellungen in der Arbeit angegeben habe,
- ich die Dissertation oder Teile hiervon bisher nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- ich
- die gleiche oder eine andere Abhandlung nicht bei einem anderen Fachbereich oder einer anderen Universität als Dissertation eingereicht habe,
- die gleiche oder eine andere Abhandlung bei einem anderen Fachbereich oder einer anderen Universität als Dissertation eingereicht habe, mit folgendem Erfolg:

-
- mir im Falle einer **kumulativen Dissertation** die in § 8, Abs. (5) und (6) genannten Voraussetzungen und Besonderheiten bekannt sind und in meiner Dissertation erfüllt werden.

Bei erfolgreich abgeschlossenem Promotionsverfahren wünsche ich zu meiner in Deutsch ausgestellten Promotionsurkunde zusätzlich eine englische Version: ja

nein

Ort

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Julia Zimmer
Geburtsort: Saarbrücken

AUSBILDUNG

- Seit 11/2019 **Promotion am Fachbereich Biologie**
*Rheinland-Pfälzisch Technische Universität
Kaiserslautern-Landau*
Titel der Abschlussarbeit: „Dynamik der mikrobiellen
Mischbiozönose und der PHA-Produktion aus
Restströmen unter variierenden Betriebsstrategien“
- 10/2017 – 11/2019 **Masterstudium Biology**
Technische Universität Kaiserslautern
Vertiefungsrichtung Ecology
Titel der Abschlussarbeit: „Randeffekte auf die
Zusammensetzung und Struktur eines
Waldfragments sowie Implikationen für die
Habitatnutzung durch *Muscardinus avellanarius*“
- 10/2014 – 08/2017 **Bachelorstudium Biowissenschaften**
Technische Universität Kaiserslautern
Titel der Abschlussarbeit: „Auswirkungen des
Pflanzenvolatils Linalool auf die anatomische
Performance und das Wachstum von *Leucocoprinus
gongylophorus*“
- 08/2006 – 06/2013 **Erreichen des Abiturs**
Albert-Einstein-Gymnasium Völklingen

PRAXISERFAHRUNG

- 11/2019 – 06/2024 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
*Fachgebiet Ressourceneffiziente
Abwasserbehandlung, Rheinland-Pfälzische
Technische Universität Kaiserslautern-Landau*
Schwerpunkt: Biopolymerherstellung aus Abwasser
- 05/2018 – 09/2018 **Studentische Hilfwissenschaftlerin**
*Fachbereich Biologie, Technische Universität
Kaiserslautern*

PUBLIKATIONEN

Laumeyer, Cora; **Zimmer, Julia**; Steinmetz, Heidrun (2025): From fruit juice wastewater to biopolymer – How the mixed microbial culture and PHA content develop over time. In: Chemical Engineering Journal 503 (Pt A):158314. DOI: 10.1016/j.cej.2024.158314

Laumeyer, Cora; **Zimmer, Julia**; Steinmetz, Heidrun (2024): Development of Microbial Community, Polyhydroxyalkanoate (PHA) Yield, and Composition Using Residual Streams of the Fruit Juice Industry. In: Mannina, G., Cosenza, A., Mineo, A. (eds) Resource Recovery from Wastewater Treatment. ICWRR 2024. Lecture Notes in Civil Engineering, vol 524. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-031-63353-9_75

Hobus, Inka; Kolisch, Gerd; Steinmetz, Heidrun; Uhrig, Thomas; **Zimmer, Julia**; Döhler, Cora; Bornemann, Catrin (2022): Rückgewinnung von kohlenstoffbasierten Stoffen aus kommunalem Abwasser. In: Wasser und Abfall 24 (5), S. 35–40. DOI: 10.1007/s35152-022-0773-z.

Uhrig, Thomas; **Zimmer, Julia**; Rankenhohn, Florian; Steinmetz, Heidrun (2020): Biopolymerproduktion aus Abwasserströmen für eine kreislauforientierte Siedlungswasserwirtschaft. In: Wasser und Abfall 22 (6), S. 13–18. DOI: 10.1007/s35152-020-0229-2.

STIPENDIEN

Stipendium Arten- und Biotopschutz 2019: Ministerium für Umwelt, Energie, Ernährung und Forsten Rheinland-Pfalz, Thema: „Waldrandeffekte und Habitatnutzung der Haselmaus (*Muscardinus avellanarius*)“