

DIGIT~Bio~TECH



LO7 UMWELTNUTZEN DURCH MODERNE BIOTECHNOLOGIE UND IKT-ANWENDUNGEN

Fortgeschrittenes Niveau

AUTOR:

DIANA DI GIOIA



Inhalt

Erneuerbare Energien: Biotechnologie zur Biogas- und Bioethanolproduktion.....	3
Biogas.....	3
Bioethanol	8
Biotechnologie für die Biokunststoffproduktion (Stufe B).....	15
Wichtigste Schritte zu modernen BIOPLASTICS	15
1. Kunststoffe auf Stärkebasis.....	17
2. Polymilchsäure-Kunststoffe	19
3. Polyhydroxyalkanoate.....	20
Biotechnologie zur Altlastensanierung	22
Mikrobielle Technologien für die Gesundheit von Honigbienen.....	26
Verweise.....	35



Erneuerbare Energien: Biotechnologie zur Biogas- und Bioethanolproduktion

BIOGAS

Der Prozess der Biogaserzeugung wurde bereits im Abschnitt Grundstufe beschrieben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Entwicklungsländern das Interesse an der Entwicklung von Technologien zur Erzeugung erneuerbarer Energiequellen gestiegen ist. Die anaerobe Vergärung hat in den letzten Jahren seit der Energiekrise Anfang der 1970er Jahre und insbesondere nach dem Golfkrieg eine neue Aufmerksamkeit erhalten. Das Verfahren beinhaltet die Behandlung von landwirtschaftlichen und industriellen Abfällen unterschiedlicher Art zur Biogaserzeugung. Das Interesse an der anaeroben Behandlung von Abfällen aus der Agrarindustrie steigt, da sie neben einigen anderen Vorteilen gegenüber aeroben Behandlungsverfahren wirtschaftlich ist, einen geringeren Energiebedarf hat und ökologisch sinnvoll ist. Das Verfahren erzeugt Faulschlamm, die hauptsächlich als Dünger für den Pflanzenbau verwendet wird, da die Nährstoffe des Rohstoffs als zugängliche Verbindungen im mineralisierten Schlamm verbleiben. Die Behandlung von Abfällen zur Gewinnung von Kraftstoff und das Recycling von Nährstoffen stellt einen nachhaltigen Kreislauf dar.

Die anaerobe Vergärung ist ein komplexer, natürlicher, zweistufiger Prozess des Abbaus organischer Verbindungen durch eine Vielzahl von Zwischenprodukten zu Methan und Kohlendioxid durch die Wirkung eines Konsortiums von Mikroorganismen. Die gegenseitige Abhängigkeit der Bakterien ist ein Schlüsselfaktor im anaeroben Vergärungsprozess. Im ersten Schritt werden die flüchtigen Feststoffe im Mist von anaeroben Bakterien, den sogenannten Säurebildnern, in Fettsäuren umgewandelt. In der zweiten Stufe werden diese Säuren von spezialisierteren Bakterien, den sogenannten „Methanbildnern“, weiter in Biogas umgewandelt. Der anaerobe Vergärungsprozess, der seit Millionen von Jahren in der Natur funktioniert, kann bewältigt werden, um den oft problematischen Abfallstrom eines Landwirts in einen Vermögenswert umzuwandeln.

Hier geben wir einige zusätzliche Details zu den Reaktoren, die für die Biogasproduktion verwendet werden. Es ist bekannt, dass mehrere Parameter für die Entwicklung und das Management einer Biogaserzeugungsanlage wichtig sind. Speziell:

Die Arbeitstemperatur. Der Prozess kann durchgeführt werden bei:

- psychrophile Bedingungen (20°C) (bei konventionellen Pflanzen nicht viel verwendet)
- mesophile Bedingungen (35 - 42°C)
- thermophile Bedingungen (> 50°C);



2019-1-BG01-KA203-062371

Mesophile Verdauung. Der Fermenter wird auf 30 - 35°C erhitzt und das Ausgangsmaterial verbleibt typischerweise 15 - 30 Tage im Fermenter. Der mesophile Aufschluss ist tendenziell robuster und toleranter als der thermophile Prozess, aber die Gasproduktion ist geringer, größere Aufschlussstanks sind erforderlich und die Desinfektion, falls erforderlich, ist ein separater Prozessschritt.

Thermophiler Aufschluss. Der Fermenter wird auf 55°C erhitzt und die Verweilzeit beträgt typischerweise 12 - 14 Tage. Thermophile Aufschlussysteme bieten eine höhere Methanproduktion, einen schnelleren Durchsatz, eine bessere Abtötung von Krankheitserregern und Viren, erfordern jedoch eine teurere Technologie, einen höheren Energieeinsatz und einen höheren Grad an Betrieb und Überwachung. Dabei werden 30 - 60% der verdaulichen Feststoffe in Biogas umgewandelt.

Daher ist der Prozess unter thermophilen Bedingungen schneller, aber mesophile Bedingungen werden verwendet, wenn sich die Eigenschaften des/der Fütterungs substrat(e) mit der Zeit, Jahreszeit usw. ändern.

→ **der Feststoffgehalt im Reaktor.** Wir können unterscheiden:

- Nass-/Feuchtprozesse (5 - 8% Trockenmasse im Reaktor)
- Halbtrockenprozesse (Trockenmasse = 8 - 20%)
- Trockenprozesse (Trockenmasse >20%)

→ **die Stoffwechselphasen im Reaktor.**

- EINE PHASE: die gesamte mikrobielle Kette wird in einem einzigen Reaktor gehalten;
- ZWEI PHASEN: die hydrolytische fermentative Phase wird von der methanogenen getrennt.

Wie funktioniert eine Biogasanlage? Bitte überprüfen Sie die Website: <https://www.youtube.com/watch?v=3UafRz3QeO8>

Das folgende Bild (Abb. 1) zeigt die verschiedenen Bioreaktorkonfigurationen, die für die Biogasproduktion entwickelt werden können. Sie können sich in zwei Parametern unterscheiden: dem

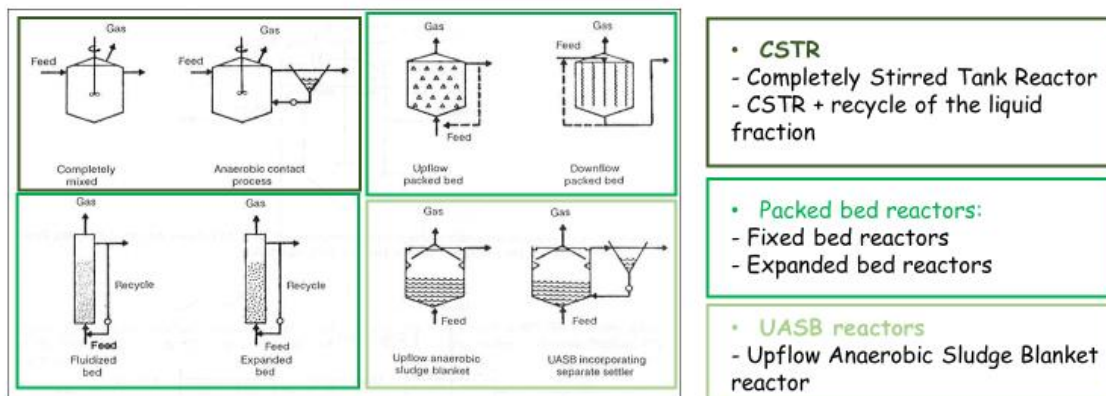


Abb. 1. Reaktoren zur Biogaserzeugung



2019-1-BG01-KA203-062371

hydraulischen Schema und der Arbeitsweise der Mikroorganismen im Reaktor (freie oder immobilisierte Zellen).

Der **kontinuierliche Rührkesselreaktor** (CSTR) ist ein gängiges Modell für einen chemischen Reaktor in der Umwelttechnik. Es handelt sich um einen Chargenreaktor, der mit einem Flügelrad oder einer anderen Mischvorrichtung ausgestattet ist, um ein effizientes Mischen zu gewährleisten. Ein idealer CSTR setzt eine perfekte Mischung voraus. In einem perfekt gemischten Reaktor wird die Beschickung beim Eintritt sofort und gleichförmig durch den gesamten Reaktor gemischt. Folglich ist die Leistung eine Funktion von Verweilzeit und Reaktionsgeschwindigkeit. Der Kontakt mit der Festphase des Bioreaktors kann durch einen Sedimentationstank verbessert werden, der das flüssige Medium vom festen Anteil trennt, der dann wieder in den Bioreaktor geleitet wird (in der Abbildung als anaerobes Kontaktverfahren bezeichnet).

CSTRs bestehen aus: einem Tankreaktor (normalerweise mit konstantem Volumen), einem Rührsystem zum Mischen von Reaktanten (Impeller oder schnell fließendes Einleiten von Reaktanten), Zuführ- und Auslassrohren zum Einführen von Reaktanten und Entfernen von Produkten CSTR werden üblicherweise in der industriellen Verarbeitung verwendet. Biofermenter für die Biogasproduktion sind kontinuierliche Rührkesselreaktoren aus Beton oder Stahl.

Der **anaerobe Festbettreaktor** ist mit einem inerten Träger gefüllt, der eine sehr große Oberfläche für das mikrobielle Wachstum bietet. Der Zufluss strömt durch die Medien und anaerobe Mikroben heften sich an den Träger, wodurch eine dünne Schicht anaerober Bakterien namens Biofilm entsteht – dieser Film gibt dem Fermenter seinen Namen, Festfilmreaktor oder Festbettreaktor. Diese Mikroben wachsen dann weiter, indem sie beim Vorbeifließen Material aus dem Abwasser entfernen. In den meisten Fermentern schwimmen die Mikroben in der Flüssigkeit und ein Teil dieser aktiv wachsenden Mikroorganismen wird kontinuierlich mit dem Abwasser ausgetragen. In einem Festbettfermenter bleiben die Bakterien beim Ablassen des Abwassers am Kunststoffträger haften. Mikroorganismen sind bereits „am Werk“, wenn der neue Zufluss hinzukommt. Festbett-Fermenter haben kleinere Reaktorbehälter, kürzere Retentionszeiten und müssen mit einem Einsatzmaterial beladen werden, das leicht durch das Medium fließt, ohne zu verstopfen. Drei bis fünf Tage Retentionszeiten sind typisch und Fermenter können bei Umgebungstemperaturen in heißen Klimazonen betrieben werden, werden aber normalerweise auf mesophile oder thermophile Temperaturen erhitzt.

Welche Vorteile bietet der anaerobe Festbettreaktor? Eine erhöhte Stabilität und Leistung in anaeroben Reaktoren kann erreicht werden, wenn das mikrobielle Konsortium im Reaktor gehalten wird. Zwei Möglichkeiten, dies zu erreichen, sind die Verwendung dichter Bakteriengranula wie in **UASB-Reaktoren** oder eines mikrobiellen Biofilms, der auf inerten Trägern in den oben beschriebenen Festbettreaktoren befestigt ist. Die **anaerobe Schlammdecke (UASB) mit Aufwärtsströmung**, normalerweise als UASB-Reaktor bezeichnet, ist in der Tat eine Form eines anaeroben Faulbehälters, der zur Abwasserbehandlung und als methanogener (methanerzeugender) Faulbehälter verwendet wird. Eine ähnliche, aber variantenreiche Technologie wie UASB ist der Expander-Granulat-Schlammbett-(EGSB)-Fermenter (Abb. 2). Eine Variante des UASB-Konzepts ist ein **Expanded-Granular-Sludge-**



2019-1-BG01-KA203-062371

Bed (EGSB)-Reaktor. Die Besonderheit besteht darin, dass für das durch das Schlammbett strömende Abwasser eine schnellere Aufwärtsströmungsgeschwindigkeit ausgelegt ist. Der erhöhte Fluss ermöglicht eine teilweise Expansion (und davon leitet sich der Name des Reaktors ab) des körnigen Schlammbetts, wodurch der Abwasser-Schlamm-Kontakt verbessert sowie die Abscheidung kleiner inaktiver Schwebstoffe aus dem Schlammbett verbessert wird. Die erhöhte Strömungsgeschwindigkeit wird entweder durch Verwendung von hohen Reaktoren oder durch Einbau einer Abwasserrückführung (oder beides) erreicht.

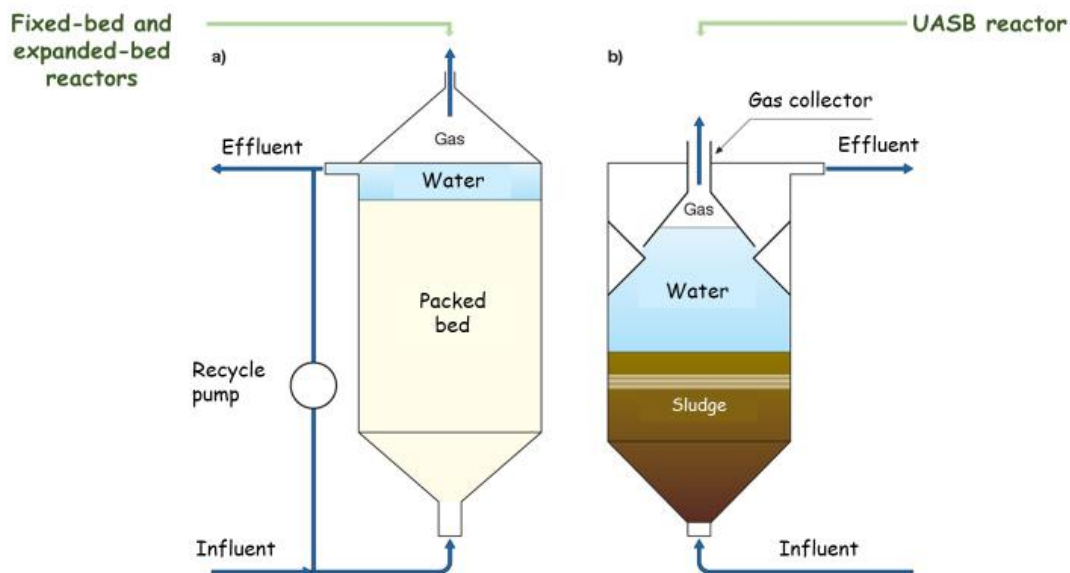


Abb. 2. Festbett-/Expandbettreaktoren (links) und UASB- (rechts) Reaktor

UASB ist ein anaerober Prozess, der eine Decke aus körnigem Schlamm bildet, der im Tank suspendiert. Abwasser strömt nach oben durch die Decke und wird von den anaeroben Mikroorganismen verarbeitet. Die Aufwärtsströmung in Kombination mit der Absetzwirkung der Schwerkraft suspendiert die Decke mit Hilfe von Flockungsmitteln. Die Decke beginnt mit etwa drei Monaten Reife zu erreichen. Es bilden sich kleine Schlammkörnchen, die organisches Material und Bakterien ohne Stützmatrix enthalten, die Strömungsbedingungen schaffen eine selektive Umgebung, in der nur Mikroorganismen überleben und sich vermehren können, die sich aneinander anlagern können. Schließlich bilden die Aggregate dichte kompakte Strukturen, die als "Granulat" bezeichnet werden. Es entsteht Biogas mit hoher Methankonzentration, das aufgefangen und energetisch genutzt werden kann, Strom für den Export zu erzeugen und den eigenen Betriebsstrom zu decken. Die Technik muss während des Einsatzes ständig überwacht werden, um sicherzustellen, dass die Schlammdecke erhalten bleibt und nicht



2019-1-BG01-KA203-062371

ausgewaschen wird (und damit die Wirkung verliert). Die bei der Stromerzeugung anfallende Wärme kann zur Beheizung der Faulbehälter wiederverwendet werden. Das Packungsmedium im Festbettreaktor und der körnige Schlamm im UASB-Reaktor dienen als Filter, der das Auswaschen von Bakterien verhindert und auch eine größere Oberfläche für eine schnellere Biofilmentwicklung und eine verbesserte Methanogenese bietet. Es wurde festgestellt, dass die spezifische Oberfläche, Porosität, Oberflächenrauheit, Porengröße und Orientierung des Packungsmaterials eine wichtige Rolle bei der Leistung des anaeroben Reaktors spielen. Biofilm- oder Festfilmreaktoren hängen von der natürlichen Tendenz gemischter mikrobieller Populationen ab, an Oberflächen zu adsorbieren und einen Biofilm zu bilden. Viele Trägermaterialien wurden auf ihre Eignung als Träger für Biofilme untersucht, darunter billige, leicht verfügbare Materialien wie Sand, Ton, Glas, Quarz und eine Reihe von Kunststoffen. In der Natur bewohnen Mikroorganismen die äußeren und inneren Oberflächen von Stein, Kies oder Sand. Diese Biofilmbildung wird ein wichtiger Faktor für die Selbstreinigungsfähigkeit des Wassers. Das Wachstum von Mikroorganismen in einem Biofilm ist die Grundlage für die biologische Wasseraufbereitung wie die Denitrifikation und die Intensivierung der aeroben und anaeroben Abwasserreinigung. Es wurde auch über den Einsatz von Festbettreaktoren zur Behandlung verschiedener Arten von Abwasser berichtet, beispielsweise von Molkerei- und Brauereiabwässern. Die Biofilmbildung auf Trägermaterialien verbessert die Umsatzraten, indem sie die Empfindlichkeit gegenüber Konzentrationsschwankungen und Hemmsubstanzen verringert. Die Effizienz der Entfernung organischer Stoffe in Festbettreaktoren steht in direktem Zusammenhang mit den Eigenschaften des zur Immobilisierung von Anaerobiern verwendeten Trägermaterials. Reticulärer Polyurethanschaum hat eine hohe spezifische Oberfläche. Es ist eine ausgezeichnete Kolonisationsmatrix für einen anaeroben Filterreaktor. Die Porengröße war einer der wichtigsten Parameter für mikrobiologische und technische Anforderungen in Hochleistungsbetten. Für den Abbau einer Vielzahl von organischen Abfällen in anaeroben Vergärungsreaktoren wurden viele Arten von Bettungsmodellen in Betracht gezogen.

Die Entwicklung fester Biomassereaktoren hat dafür gesorgt, dass bedeutende Fortschritte im Wissen und in der Anwendung anaerober Verfahren zur Abfallbehandlung erzielt wurden. Im Vergleich zu herkömmlichen Anlagen arbeiten Bioreaktoren mit festem Film effizient bei höheren organischen Beladungsraten aufgrund einer effektiveren Biomasserückhaltung in der Reaktionszone, was zu höheren zellulären Retentionszeiten führt. Anaerobe Reaktoren aus immobilisierter Biomasse zeigen auch bessere Reaktionen auf organische Schockbelastungen und toxische Einträge. In vielen Fällen stellen immobilisierte Biomassereaktoren nach solchen Störungen ihre Leistung vollständig wieder her.

Wie funktioniert ein UASB-Reaktor? Bitte schau dir dieses Video an <https://www.youtube.com/watch?v=0QsEdJgIII>

Ein nützliches Vergärungsprodukt des anaeroben Vergärungsprozesses ist Gärrest. Gärrest ist der verbleibende Teil der abgebauten Biomasse nach der Biogasproduktion: Es handelt sich um stabile organische Substanz, die reich an verschiedenen Nährstoffen (N, P, K) ist. Je nach eingesetztem Rohstoff für die Biogasproduktion kann Gärrest direkt als organischer Dünger verwertet werden, genauso wie rohe Tiergülle in der Landwirtschaft auf Felder ausgebracht wird. Es kann auch weiter aufgerüstet

werden, um hochwertige Mineralnährstoffe zurückzugewinnen. Die Verwendung von Gärresten als organischer Dünger weist mehrere Vorteile auf: Er ermöglicht die Wiederverwendung von Nährstoffen und ersetzt mineralischen Dünger fossilen Ursprungs. Im Vergleich zu Rohmist wird auch Gärrest hygienisiert, da der Biogas-Produktionsprozess die meisten Krankheitserreger des ursprünglichen Rohstoffs wie Bakterien und Pflanzenkrankheiten neutralisiert. Homogenität und Dichte der Gärreste ermöglichen auch ein schnelleres Eindringen in den Boden im Vergleich zu Rohmist, Nährstoffe für die Pflanzen im Boden leichter zugänglich zu machen. Gärreste können, sofern sie für landwirtschaftliche Zwecke nicht geeignet sind, weiterverarbeitet und als Rohstoff für industrielle Prozesse verwendet werden.

Nachfolgend ist ein Gesamtschema einer Biogaserzeugungsanlage dargestellt (Abb. 3).

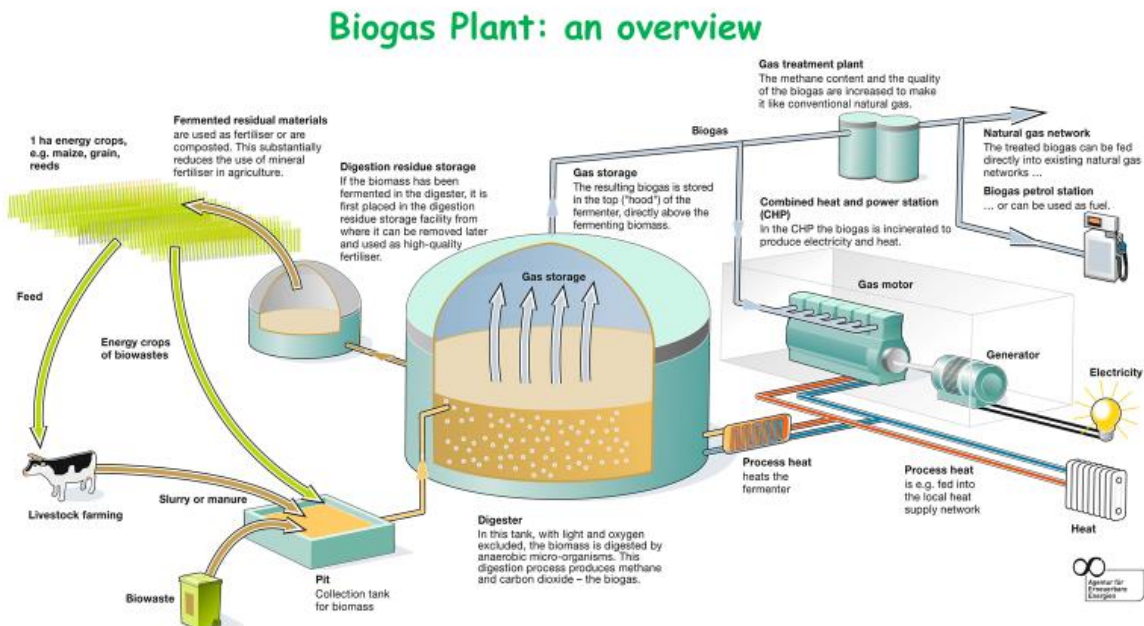


Abb. 3. Eine Biogasanlage di biogas

BIOETHANOL

Länder weltweit haben Maßnahmen zur verstärkten und wirtschaftlichen Nutzung von Biomasse zur Deckung ihres zukünftigen Energiebedarfs erwogen und ausgerichtet, um die im Kyoto-Protokoll festgelegten CO₂-Reduktionsziele zu erreichen und die Abhängigkeit und Abhängigkeit von der Versorgung mit fossilen Brennstoffen zu verringern. Obwohl Biomasse eine große Quelle für Verkehrskraftstoffe wie Bioethanol sein kann, wird Biomasse häufig zur Erzeugung von Strom und Wärme verwendet, im Allgemeinen durch Verbrennung. Ethanol ist derzeit der am häufigsten

2019-1-BG01-KA203-062371

verwendete flüssige Biokraftstoff für Kraftfahrzeuge. Die Bedeutung von Ethanol nimmt aufgrund einer Reihe von Gründen wie der globalen Erwärmung und des Klimawandels zu.

Der Weltmarkt für Bioethanol ist in eine Phase des schnellen Übergangs eingetreten. Viele Länder auf der ganzen Welt verlagern ihren Fokus auf erneuerbare Energien für die Stromerzeugung, weil die Erdölreserven erschöpfen. Der Trend erstreckt sich auch auf den Transport von Kraftstoffen. Ethanol hat das Potenzial als wertvoller Ersatz für Benzin auf dem Markt für Transportkraftstoffe. Die Kosten der Bioethanolproduktion sind jedoch höher als die von fossilen Brennstoffen. Brasilien und die USA sind die beiden größten Ethanolproduzenten mit 62% der Weltproduktion. Die großtechnische Produktion von Kraftstoffethanol basiert hauptsächlich auf **Saccharose aus Zuckerrohr in Brasilien oder Stärke, hauptsächlich aus Mais, in den USA**. Siehe eine schematische Abbildung unten (Abb. 4).

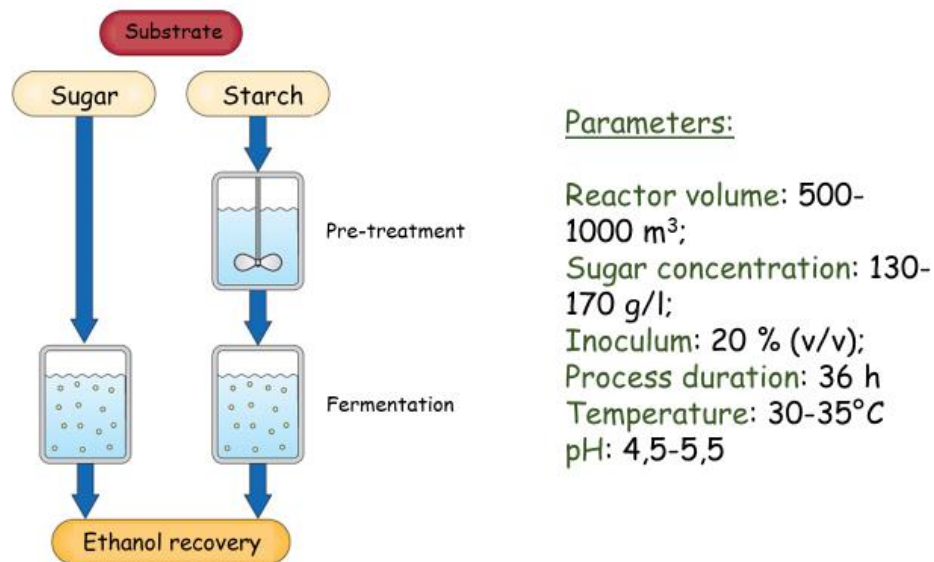


Abb. 4. Schematische Herstellung von Bioethanol aus Zuckerpflanzen und Stärke

Die derzeitige Ethanolproduktion auf Basis von Mais-, Stärke- und Zuckerstoffen ist aufgrund ihres Lebens- und Futterwertes möglicherweise nicht wünschenswert. Die Kosten sind ein wichtiger Faktor für die groß angelegte Expansion der Bioethanolproduktion. Der grüne Goldtreibstoff aus lignozellulosehaltigen Abfällen vermeidet die bestehende Konkurrenz von Nahrungsmitteln gegenüber Treibstoff, die durch die Getreide-basierte Bioethanolproduktion verursacht wird. Somit könnte die Bioethanolproduktion der Weg zur effektiven Verwertung landwirtschaftlicher Abfälle sein. Reisstroh,



2019-1-BG01-KA203-062371

Weizenstroh, Maisstroh und Zuckerrohr-Bagasse sind die wichtigsten landwirtschaftlichen Abfälle in Bezug auf die verfügbare Biomasse.

Lignocellulosehaltige Materialien sind erneuerbar, kostengünstig und in Hülle und Fülle verfügbar. Dazu gehören Ernterückstände, Gräser, Sägemehl, Holzspäne usw. Zur Ethanolproduktion aus Lignozellulose wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt. Lignocellulose wird in drei Hauptprozessen für die Bioethanolproduktion verarbeitet:

- 1) eine Vorbehandlung zur Delignifizierung ist notwendig, um Cellulose und Hemicellulose vor der Hydrolyse freizusetzen;
- 2) Hydrolyse von Zellulose und Hemizellulose zur Herstellung von fermentierbaren Zuckern einschließlich Glucose, Xylose, Arabinose, Galaktose, Mannose und Fermentation von reduzierenden Zuckern.
- 3) Die Nicht-Kohlenhydrat-Komponenten von Lignin haben auch wertschöpfende Anwendungen

Die wichtigste Verarbeitungsherausforderung bei der Herstellung von Biokraftstoff ist die Vorbehandlung der Biomasse. Lignocellulosehaltige Biomasse besteht aus drei Hauptbestandteilen, nämlich Hemizellulose, Lignin und Zellulose. Vorbehandlungsverfahren beziehen sich auf die Solubilisierung und Abtrennung einer oder mehrerer dieser Komponenten der Biomasse. Es macht die verbleibende feste Biomasse einer weiteren chemischen oder biologischen Behandlung zugänglicher. Der lignocellulosehaltige Komplex besteht aus einer Matrix aus Cellulose und Lignin, die durch Hemicelluloseketten gebunden sind. Die Vorbehandlung erfolgt zum Aufbrechen der Matrix, um den Kristallinitätsgrad der Cellulose zu verringern und den Anteil an amorpher Cellulose, der am besten geeigneten Form für den enzymatischen Angriff, zu erhöhen. Eine Vorbehandlung wird vorgenommen, um eine Veränderung der makroskopischen und mikroskopischen Größe und Struktur der Biomasse sowie der submikroskopischen Struktur und chemischen Zusammensetzung zu bewirken. Es macht die lignocellulosehaltige Biomasse anfällig für eine schnelle Hydrolyse mit erhöhten Ausbeuten an monomeren Zuckern.

Die Ziele eines effektiven Vorbehandlungsprozesses sind:

- (i) Bildung von Zuckern direkt oder nachträglich durch Hydrolyse zur Vermeidung von Verlust und/oder Abbau der gebildeten Zucker
- (ii) um die Bildung von Hemmprodukten zu begrenzen
- (iii) Energiebedarf zu senken und Kosten zu minimieren.

Physikalische, chemische, physikalisch-chemische und biologische Behandlungen sind die vier grundlegenden Arten von angewandten Vorbehandlungstechniken. Im Allgemeinen wird eine Kombination dieser Verfahren im Vorbehandlungsschritt verwendet.

Bei der **physikalischen Vorbehandlung** ist der erste Schritt zur Ethanolproduktion aus landwirtschaftlichen Abfällen die mechanische Zerkleinerung durch Mahlen oder Hacken. Dies reduziert



2019-1-BG01-KA203-062371

die Kristallinität von Cellulose und verbessert die Effizienz der Weiterverarbeitung. Die Pyrolyse ist eine physikalische Behandlung: Die Materialien werden bei einer Temperatur von mehr als 300°C behandelt, wobei sich Zellulose schnell zu gasförmigen Produkten und Restkohle zersetzt. Die restliche Kohle wird durch Auslaugen mit Wasser oder mit milder Säure weiter behandelt. Das Sickerwasser enthält genügend Kohlenstoffquelle, um das mikrobielle Wachstum für die Bioethanolproduktion zu unterstützen. Glukose ist der Hauptbestandteil von Wassersickerwasser. Die Vorbehandlung von lignocellulosehaltiger Biomasse in einem Mikrowellenherd ist ebenfalls ein praktikables Verfahren, das die hohe Heizeffizienz eines Mikrowellenherds nutzt. Die Mikrowellenbehandlung nutzt thermische und nicht-thermische Effekte, die durch Mikrowellen in wässrigen Umgebungen erzeugt werden. Wärme wird in der Biomasse durch Mikrowellenstrahlung erzeugt, die aus den Schwingungen der polaren Bindungen in der Biomasse und dem umgebenden wässrigen Medium resultiert. Diese einzigartige Erwärmungsfunktion führt zu einem Explosionseffekt zwischen den Partikeln und verbessert das Aufbrechen der widerspenstigen Strukturen von Lignocellulose. Beim nicht-thermischen Verfahren, dh dem Elektronenstrahl-Bestrahlungsverfahren, vibrieren polare Bindungen, da sie mit einem sich ständig ändernden Magnetfeld ausgerichtet werden, und die Zerstörung und Erschütterung der polaren Bindungen beschleunigt chemische, biologische und physikalische Prozesse.

Unter den **physikalisch-chemischen** Behandlungen ist die Dampfexplosion eine vielversprechende Methode, die Biomasse für den Celluloseangriff leichter zugänglich macht. Bei diesem Vorbehandlungsverfahren wird kein Katalysator verwendet und die Biomasse fraktioniert, um Lävulinsäure, Xylit und Alkohole zu erhalten. Bei diesem Verfahren wird die Biomasse mit Hochdruckdampf (20 - 50 bar, 160 - 290°C) für einige Minuten erhitzt; die Reaktion wird dann durch plötzliche Dekompression auf Atmosphärendruck gestoppt. Wenn Dampf innerhalb der Lignocellulose-Matrix expandieren kann, trennt er die einzelnen Fasern. Die hohe Rückgewinnung von Xylose (45 - 65%) macht die Dampfexplosionsvorbehandlung wirtschaftlich attraktiv.

Chemische Vorbehandlung Methoden beinhalten die Verwendung von verdünnter Säure, Alkali, Ammoniak, organischen Lösungsmitteln, CO₂ oder anderen Chemikalien. Diese Verfahren sind einfach in der Anwendung und haben gute Umwandlungsausbeuten in kurzer Zeit. Die Säurevorbehandlung gilt als eine der wichtigsten Techniken und zielt auf hohe Zuckerausbeuten aus Lignocellulose ab. Sie wird normalerweise mit konzentrierten oder verdünnten Säuren (üblicherweise zwischen 0,2% und 2,5% w/w) bei Temperaturen zwischen 130°C und 210°C durchgeführt. Das saure Medium greift die Polysaccharide an, insbesondere Hemicellulosen, die leichter zu hydrolysieren sind als Cellulose. Die Säurevorbehandlung führt jedoch zur Produktion verschiedener Inhibitoren wie Essigsäure, Furfural und 5-Hydroxymethylfurfural. Diese Produkte sind Wachstumshemmer von Mikroorganismen. Hydrolysate, die für die Fermentation verwendet werden sollen, müssen daher entgiftet werden. Die alkalische Vorbehandlung von Lignocellulosen verdaut die Ligninmatrix und macht Cellulose und Hemicellulose für den enzymatischen Abbau verfügbar. Die alkalische Behandlung von Lignocellulose zerstört die Zellwand durch Auflösen von Hemicellulosen, Lignin und Siliciumdioxid, durch Hydrolysieren von Uron- und Essigsäureestern und durch Quellen von Cellulose. Die Kristallinität von Cellulose wird durch das Quellen verringert. Durch dieses Verfahren können die



2019-1-BG01-KA203-062371

Substrate in alkalilösliches Lignin, Hemicellulosen und Reststoffe fraktioniert werden, was ihre Verwendung für wertvollere Produkte erleichtert. Der Endrückstand (hauptsächlich Zellulose) kann zur Herstellung von Papier oder Zellulosederivaten verwendet werden. Organische Lösungsmittel sind alternative Methoden zur Delignifizierung von Lignocellulosematerialien. Die Verwendung von organischen Lösungsmittel/Wasser-Gemischen macht das Verbrennen der Lauge überflüssig und ermöglicht die Isolierung der Lignine (durch Destillation des organischen Lösungsmittels). Beispiele für solche Vorbehandlungen umfassen die Verwendung von 90% Ameisensäure und der von unter Druck stehenden Kohlendioxid in Kombination (50% Alkohol/Wasser-Gemisch und 50% Kohlendioxid). Andere verschiedene organische Lösungsmittel, die zur Delignifizierung verwendet werden können, sind Methanol, Ethanol, Essigsäure, Perameisensäure und Peressigsäure, Aceton usw.

Biologische Behandlungen. Die enzymatische Hydrolyse ist aufgrund ihrer höheren Ausbeuten, höheren Selektivität, niedrigeren Energiekosten und milderer Betriebsbedingungen als chemische Verfahren das bevorzugte Verzuckerungsverfahren.

Unterschiedliche Art der Gärung. Die Fermentation von Bioethanol kann im Batch-, Fed-Batch-, Repeated-Batch- oder kontinuierlichen Modus durchgeführt werden. Beim Batch-Prozess wird das Substrat zu Beginn des Prozesses bereitgestellt, ohne dass das Medium hinzugefügt oder entfernt wird. Es ist als das einfachste Bioreaktorsystem mit flexiblem und einfachem Steuerungsprozess bekannt. Der Fermentationsprozess erfolgt in einem geschlossenen System mit hoher Zuckerkonzentration am Anfang und endet mit hoher Produktkonzentration. Es gibt mehrere Vorteile des Chargensystems, einschließlich einer vollständigen Sterilisation, erfordert keine Arbeitsfähigkeiten, ist leicht mit den Einsatzstoffen zu handhaben und kann leicht kontrolliert werden. Die Produktivität ist jedoch gering und erfordert intensive und hohe Arbeitskosten. Die Anwesenheit einer hohen Zuckerkonzentration im Fermentationsmedium kann zu einer Substrathemmung des Zellwachstums und der Ethanolproduktion führen. Die Batch-Fermentation mit Zellenrecycling ist eine strategische Methode für eine effektive Ethanolproduktion, da sie Zeit und Kosten für die Herstellung des Inokulums reduziert. Die anderen Vorteile des wiederholten Batch-Prozesses sind die einfache Zellsammlung, der stabile Betrieb und die langfristige Produktivität. Zuckermaterialien und immobilisierte Hefezellen werden verwendet, um die Zelltrennung für das Zellrecycling zu erleichtern. Ihre Anwendung im Prozess von Lignocellulosematerialien ist jedoch äußerst schwierig, da Lignocelluloserückstände zusammen mit Hefezellen im Fermentationsmedium verbleiben. Die Verwendung freier Zellen in diesem System verringert die Hefezellkonzentration und führt zu einer geringeren Ethanolproduktion in den nachfolgenden Chargen. Eine wiederholte Batch-Fermentation kann durchgeführt werden, indem freie Zellen durch die immobilisierten Zellen ersetzt werden. Die Fed-Batch-Fermentation ist eine Kombination aus Batch- und kontinuierlichem Modus, bei der Substrat in den Fermenter zugegeben wird, ohne das Medium zu entfernen. Es wurde verwendet, um das Problem der Substrathemmung im Chargenbetrieb zu überwinden. Das Kulturvolumen in Fed-Batch-Verfahren kann stark variieren, es muss jedoch mit einer bestimmten Geschwindigkeit mit der richtigen Komponentenzusammensetzung richtig zugeführt werden. Die Produktivität der Fed-Batch-Fermentation kann erhöht werden, indem das Substrat auf einer niedrigen Konzentration gehalten wird, was die Umwandlung einer ausreichenden



2019-1-BG01-KA203-062371

Menge an fermentierbaren Zuckern in Ethanol ermöglicht. Das Kulturvolumen in Fed-Batch-Verfahren kann stark variieren, es muss jedoch mit einer bestimmten Geschwindigkeit mit der richtigen Komponentenzusammensetzung richtig zugeführt werden. Die Produktivität der Fed-Batch-Fermentation kann erhöht werden, indem das Substrat auf einer niedrigen Konzentration gehalten wird, was die Umwandlung einer ausreichenden Menge an fermentierbaren Zuckern in Ethanol ermöglicht.

Der kontinuierliche Betrieb erfolgt durch ständige Zugabe von Substraten, Kulturmedium und Nährstoffen in einen Bioreaktor mit aktiven Mikroorganismen. Das Kulturvolumen im kontinuierlichen Betrieb muss konstant sein und die Fermentationsprodukte werden kontinuierlich aus den Medien entnommen. Am oberen Ende des Bioreaktors können verschiedene Arten von Produkten wie Ethanol, Zellen und Restzucker gewonnen werden. Die Vorteile des kontinuierlichen Systems gegenüber Batch- und Fed-Batch-Systemen sind höhere Produktivität, kleinere Bioreaktorumfänge und geringere Investitions- und Betriebskosten. Bei hoher Verdünnungsrate wird die Ethanolproduktivität erhöht, während die Ethanolausbeute aufgrund des unvollständigen Substratverbrauchs durch Hefen verringert wird. Die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination ist jedoch höher als bei anderen Fermentationsarten.

Faktoren, die die Bioethanolproduktion beeinflussen

Mehrere Faktoren beeinflussen die Produktion von Bioethanol: Temperatur, Zuckerkonzentration, pH-Wert, Fermentationszeit, Rührgeschwindigkeit und Inokulummenge. Die Wachstumsrate der Mikroorganismen wird direkt von der Temperatur beeinflusst. Hohe Temperaturen, die für das Zellwachstum ungünstig sind, werden für Mikroorganismen zu einem Stressfaktor. Der ideale Temperaturbereich für die Fermentation liegt für *Saccharomyces cerevisiae* zwischen 20 und 35°C. Freie Zellen von *S. cerevisiae* haben eine optimale Temperatur nahe 30°C, wohingegen immobilisierte Zellen aufgrund ihrer Fähigkeit, Wärme von der Partikeloberfläche in das Innere der Zellen zu übertragen, eine etwas höhere optimale Temperatur aufweisen. Darüber hinaus sind Enzyme, die die mikrobielle Aktivität und den Fermentationsprozess regulieren, empfindlich gegenüber hohen Temperaturen, die ihre Tertiärstruktur denaturieren und die Enzyme inaktivieren können. Daher,

Der Anstieg der Zuckerkonzentration bis zu einem bestimmten Niveau führte zu einer Erhöhung der Fermentationsrate. Die Verwendung einer übermäßigen Zuckerkonzentration führt jedoch zu einer stetigen Fermentationsrate. Dies liegt daran, dass die Konzentration des Zuckerverbrauchs die Aufnahmekapazität der mikrobiellen Zellen übersteigt. Im Allgemeinen wird die maximale Ethanolproduktionsrate erreicht, wenn Zucker in einer Konzentration von 150 g/L verwendet wird. Die anfängliche Zuckerkonzentration wurde auch als wichtiger Faktor bei der Ethanolproduktion angesehen. Eine hohe Ethanolproduktivität und Ausbeute bei der Batch-Fermentation kann durch Verwendung einer höheren anfänglichen Zuckerkonzentration erreicht werden. Es erfordert jedoch eine längere Fermentationszeit und höhere Gewinnungskosten.

Die Ethanolproduktion wird durch den pH-Wert der Brühe beeinflusst, da er die bakterielle Kontamination, das Hefewachstum, die Fermentationsrate und die Bildung von Nebenprodukten beeinflusst. Die Durchlässigkeit einiger essentieller Nährstoffe in die Zellen wird durch die H⁺-



2019-1-BG01-KA203-062371

Konzentration in der Fermentationsbrühe beeinflusst. Darüber hinaus wird das Überleben und das Wachstum von Hefen durch den pH-Wert im Bereich von 2,75 - 4,25 beeinflusst. Bei der Fermentation zur Ethanolproduktion liegt der optimale pH-Bereich von *S. cerevisiae* bei 4,0 - 5,0 [34]. Wenn der pH-Wert niedriger als 4,0 ist, ist eine längere Inkubationszeit erforderlich, aber die Ethanolkonzentration wird nicht signifikant reduziert. Wenn jedoch der pH-Wert über 5,0 lag, verringerte sich die Ethanolkonzentration wesentlich.

Die Fermentationszeit beeinflusst das Wachstum von Mikroorganismen. Eine kürzere Fermentationszeit verursacht eine ineffiziente Fermentation aufgrund eines unzureichenden Wachstums von Mikroorganismen. Andererseits führt eine längere Fermentationszeit aufgrund der hohen Ethanolkonzentration in der fermentierten Brühe zu einer toxischen Wirkung auf das mikrobielle Wachstum, insbesondere im Batch-Modus. Eine vollständige Fermentation kann bei niedrigerer Temperatur erreicht werden, indem eine längere Fermentationszeit verwendet wird, was zu der niedrigsten Ethanolausbeute führt.

Die Rührgeschwindigkeit steuert die Durchlässigkeit von Nährstoffen aus der Fermentationsbrühe in das Innere der Zellen und die Entfernung von Ethanol aus der Zelle in die Fermentationsbrühe. Je höher die Rührgeschwindigkeit, desto höher die produzierte Ethanolmenge. Außerdem erhöht es den Zuckerverbrauch und reduziert die Hemmung von Ethanol auf Zellen. Die übliche Rührgeschwindigkeit für die Fermentation durch Hefezellen beträgt 150–200 U/min. Eine übermäßige Rührgeschwindigkeit ist für eine reibungslose Ethanolproduktion nicht geeignet, da sie die Stoffwechselaktivitäten der Zellen einschränkt.

Die Inokulumkonzentration hat keine signifikanten Auswirkungen auf die endgültige Ethanolkonzentration, aber sie beeinflusst die Verbrauchsrate von Zucker und die Ethanolproduktivität.



Biotechnologie für die Biokunststoffproduktion (Stufe B)

WICHTIGSTE SCHRITTE ZU MODERNEN BIOPLASTICS

- ✓ Biokunststoffe sind keine wirkliche Innovation: Naturharze wurden seit der Antike verwendet (z.B. Bernstein, Schellack etc.)
- ✓ Ab 1860 wurden die ersten auf Zellulose basierenden Kunststoffe freigegeben (z. B. Zelluloid, Zellophan)
- ✓ In den 1940er Jahren fertigte Henry Ford Autoteile mit Kunststoffen aus Soja
- ✓ In den 50er Jahren aus Öl gewonnene Kunststoffe
- ✓ Ölkrise in den 70er Jahren: Das Interesse an Biokunststoffen wurde wiederentdeckt.

Derzeit steigt die Nachfrage nach Biokunststoffen, vor allem aufgrund der drängenden Umweltprobleme (Ressourcenverknappung, Treibhauseffekt, Müllentsorgung etc.). Abb. 5, 6 und 7 geben einige grundlegende Informationen zu Biokunststoffen.

Bioplastics: state of art

Packaging waste accounts for more than a third of municipal solid waste.

The EU directive 2004/12/CE (regarding packaging and packaging waste) defined that, by 2009, 60% of packaging waste must be recycled. According to this rule, composting is considered as a way of recycling waste.

In compliance with this directive, the individual member states took various measures. Italy and France decided that since 2010 all plastic bags had to be made of biodegradable plastics. In Italy this measure was implemented from January 2011. This leads to a potential saving of 300 000 tons of plastic bags per year, which corresponds to 430 000 tons of oil and 200 000 tons of CO₂.

In December 2015, the EC adopted an EU action plan for the circular economy, in which plastics were identified as a key priority and committed itself to elaborating "one strategy to address the challenges posed by plastics at all stages of the value chain and take into account their whole life cycle."

In 2017, it confirmed its intention to work towards achieving the objective of the recyclability of all plastic packaging by 2030.



Abb. 5. Biokunststoffe und europäische Vorschriften

Kunststoff und Gummi sind polymere Materialien, die aus Monomeren bestehen. Diese werden hauptsächlich aus Erdöl hergestellt und das gewonnene Material ist daher nicht erneuerbar. Rund 4% des weltweiten Ölverbrauchs werden als Rohstoff in der Kunststoffproduktion verwendet, eine ähnliche Menge wird im Produktionsprozess als Energie verwendet. Neben Erdöl erfordert die



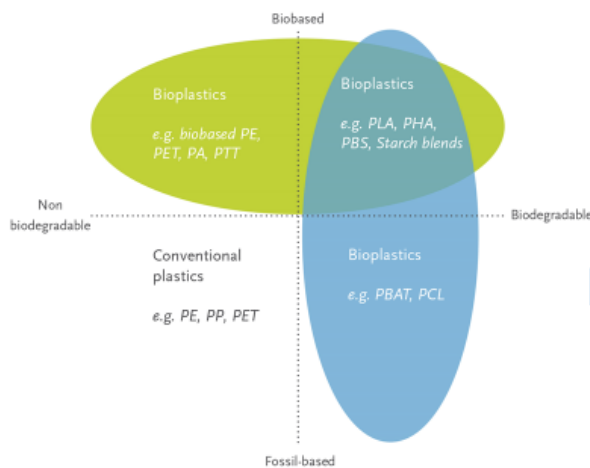
2019-1-BG01-KA203-062371

Kunststoffherstellung den Einsatz chemischer Zusatzstoffe wie Weichmacher, Flammschutzmittel, Hitze- und UV-Stabilisatoren, Biozide, Pigmente und Füllstoffe. Mehrere Zusatzstoffe sind nach den EU-Verordnungen als gefährlich eingestuft (krebserzeugend, erbgutverändernd, schädlich für die Fortpflanzungsgesundheit oder für Wasserorganismen oder mit anhaltenden negativen Auswirkungen auf die Umwelt).

In den 60er Jahren wurde Plastik zum ersten Mal als ein Problem der Meeres- und Ozeanverschmutzung betrachtet und es wurden negative gesundheitliche Auswirkungen auf Mensch und Umwelt beschrieben. Tatsächlich setzen Kunststoffe während des gesamten Lebenszyklus des Produkts giftige Chemikalien frei.

Als mögliche Lösung stellte sich das **Kunststoffrecycling** heraus. Recycling ist jedoch nicht die einzige Lösung, um die Plastikmüllkrise zu lösen, die die Umwelt verschmutzen. Kunststoff kann nicht recycelbar sein, nur ein- oder zweimal recycelbar sein oder eine definierte Anzahl von Malen, aber nicht für immer. Nach dieser Grenze landet der Kunststoff auf einer Deponie. Darüber hinaus erlauben viele Plastik Konsumenten ihrem Plastik nicht einmal eine so lange Lebensdauer. **Erneuerbare Kunststoffe**, d. h. Kunststoffe, die aus erneuerbaren Quellen stammen und in der Umwelt leicht biologisch abbaubar sind, können eine Lösung für das Problem der Biokunststoffvergiftung bieten.

What are bioplastics?



Bioplastics are not just one single material. They comprise of a whole family of materials with different properties and applications. According to European Bioplastics, a plastic material is defined as a bioplastic if it is either biobased, biodegradable, or features both properties.

Bioplastics are biobased, biodegradable, or both.

'Biobased' does not equal 'biodegradable'

Abb. 6. Biobasierte und biologisch abbaubare Kunststoffe



2019-1-BG01-KA203-062371

Global production bioplastics capacities by material type (2019)

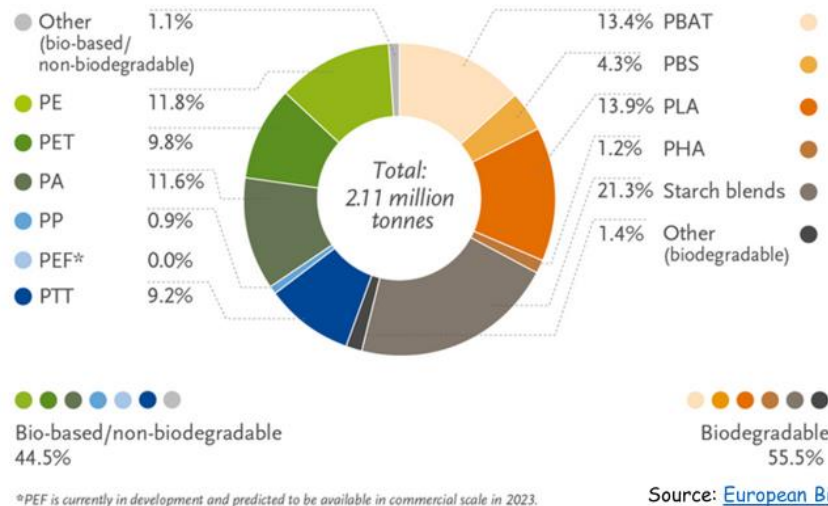


Abb. 7. Wichtigste weltweit produzierte

Biobasiert wird in der europäischen Norm EN 16575 als „aus Biomasse gewonnen“ definiert. Biologisch abbaubare Materialien sind Materialien, die von Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilzen zu Wasser, Kohlendioxid oder Methan und Biomasse abgebaut werden können. Die biologische Abbaubarkeit hängt jedoch von den Umgebungsbedingungen ab: Anwesenheit von Mikroorganismen, Temperatur und Verfügbarkeit von Sauerstoff und Wasser. Kompostierbare Materialien sind Materialien, die unter Kompostierungsbedingungen zerfallen. Die Bedingungen für die industrielle Kompostierung erfordern eine erhöhte Temperatur (55°C - 60°C) in Kombination mit einer hohen relativen Luftfeuchtigkeit und der Anwesenheit von Sauerstoff, und sie sind im Vergleich zu anderen Abbaubedingungen wie Boden, Oberflächenwasser und Meerwasser tatsächlich optimal. Die Einhaltung der EN 13432 gilt als gutes Maß für die Kompostierbarkeit von Verpackungsmaterialien. Nach dieser Norm ist Kunststoffverpackungen können als kompostierbar bezeichnet werden. Im Folgenden werden einige Details zu den 3 Hauptkategorien von Biokunststoffen gegeben.

1. Kunststoffe auf Stärkebasis

75% des gesamten organischen Materials auf der Erde liegt in Form von Polysacchariden vor. Ein wichtiges Polysaccharid ist Stärke. Pflanzen synthetisieren und speichern Stärke in ihrer Struktur als Energiereserve. Stärke kommt in Samen, Knollen oder Wurzeln der Pflanzen vor. Stärkequellen sind Mais, Weizen, Reis, Kartoffeln, Tapioka, Erbsen und viele andere pflanzliche Ressourcen. Der größte Teil der weltweit produzierten Stärke wird aus Mais gewonnen. Stärke wird im Allgemeinen durch

2019-1-BG01-KA203-062371

Nassmahlverfahren aus Pflanzenressourcen gewonnen. Stärke besteht aus zwei Arten von Glucosepolymeren: Amylose und Amylopektin. Amylose ist im Wesentlichen ein lineares Polymer, in dem Glucoseeinheiten überwiegend durch α -D-(1,4)-glucosidische Bindungen verbunden sind. Amylopektin ist ein verzweigtes Polymer, das periodische Verzweigungen enthält, die durch α -D-(1, 6)-glucosidische Bindungen mit dem Rückgrat verbunden sind.

Eine wichtige Kunststoffklasse stellen stärkebasierte Kunststoffe dar. Seit Anfang der 1990er Jahre ist es durch Forschung und Technologieentwicklung möglich, natürliche Polymere wie Stärke (aus Mais, Kartoffel etc.) mit biologisch abbaubaren Makromolekülen (polymere Komplexbildner) zu komplexieren, um thermoplastische und biologisch abbaubare innovative Materialien im industriellen Maßstab zu erhalten. Insbesondere die stärkebasierte Technologie von

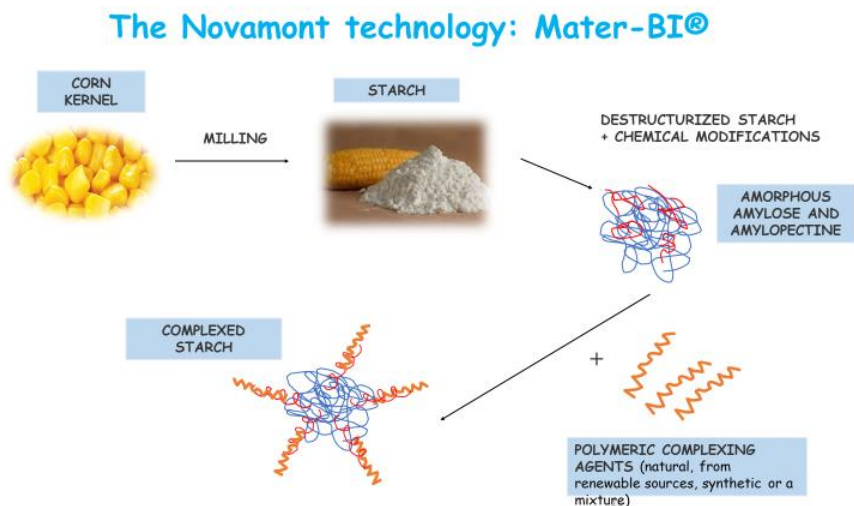


Abb. 8. Stärkebasierte Technologie von Novamont

Novamont (Abb. 8) verwendet Verarbeitungsbedingungen, die die Kristallinität von Amylose und Amylopektin in Gegenwart von Makromolekülen, die mit Amylose einen Komplex bilden können, fast vollständig zerstören können. Sie können natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein und sind biologisch abbaubar. Der von Amylose mit dem Komplexbildner gebildete Komplex ist im Allgemeinen kristallin und ist durch eine einzelne Helix von Amylose gekennzeichnet, die um den Komplexbildner herum gebildet wird. Im Gegensatz zu Amylose interagiert Amylopektin nicht mit dem Komplexbildner und verbleibt in seinem amorphen Zustand. Die Quelle der Stärke, dh ihr Verhältnis zwischen Amylose und Amylopektin, die Verarbeitungsbedingungen und die Art der Komplexbildner erlauben das Engineering verschiedener supramolekularer Strukturen mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften. In den letzten Jahren wurden viele erfolgreiche Anstrengungen unternommen, um den Anteil nachwachsender Rohstoffe zur Herstellung biologisch abbaubarer Polyester zu erhöhen. Novamont ist damit einer der wichtigsten Player bei stärkebasierten Biokunststoffen.



2019-1-BG01-KA203-062371

2. Polymilchsäure-Kunststoffe

Synthetische biologisch abbaubare Polyactone wie Polymilchsäure (PLA), Polyglycolsäure (PGA) und Polycaprolacton (PCL) sind Polymere, die durch einfache Hydrolyse der Esterbindungen abgebaut werden. Die hydrolytischen Produkte eines solchen Abbauprozesses werden dann in ungiftige Nebenprodukte umgewandelt (Abb. 9).

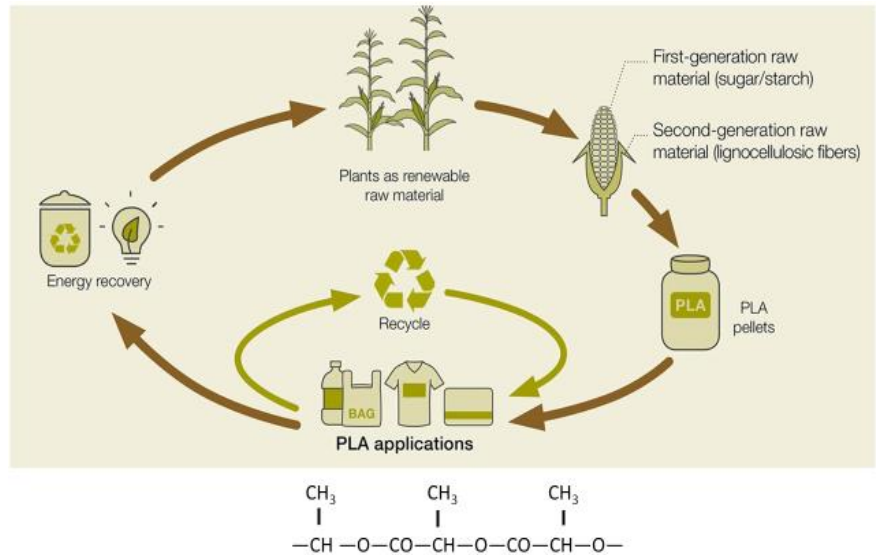


Abb. 9. PLA-Lebenszyklus

PLA-Kunststoffe werden aus der Fermentation von landwirtschaftlichen Nebenprodukten wie stärkereichen Substanzen wie Mais, Weizen oder Zucker und Maisstärke gewonnen. Der Prozess umfasst die Umwandlung von Mais oder anderen Kohlenhydratquellen in Glukose, gefolgt von einer Fermentation in Milchsäure (Abb. 9 und 10).

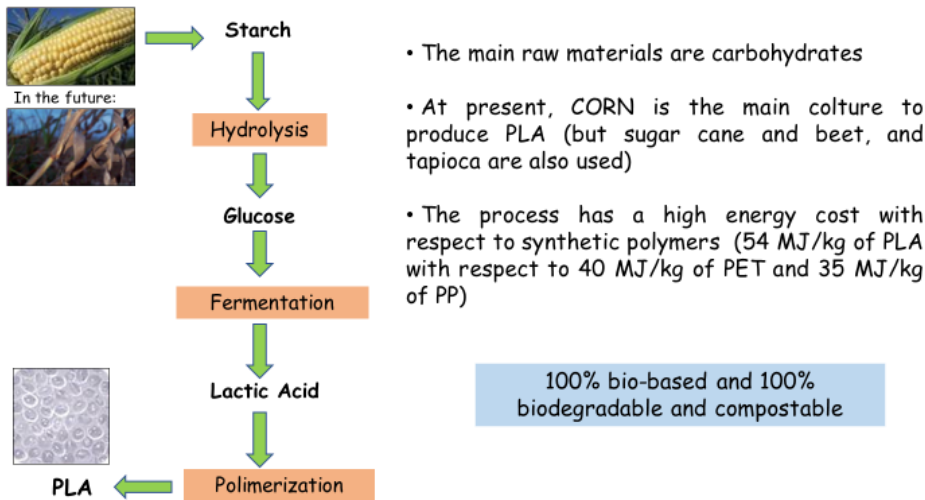


Abb. 10. PLA-Herstellung aus Stärke

des Milchsäuremonomers ab. Bei Verwendung von 100 % L-PLA-Monomeren führt dies zu einer sehr hohen Kristallinität und einem sehr hohen Schmelzpunkt, wohingegen 90/10% D/L-Copolymere die Anforderungen von Bulk-Verpackungen erfüllen. PLA ist das erste biobasierte Polymer, das in großem

Milchsäure abgeleitetes PLA ist ein thermoplastischer, biologisch abbaubarer aliphatischer Polyester mit großem Potenzial für Verpackungsanwendungen. Die Milchsäuremonomere werden entweder direkt polykondensiert oder unterliegen einer Ringöffnungspolymerisation von Lactid, was zur Bildung von PLA-Pellets führt. Die Eigenschaften von PLA als Verpackungsmaterial hängen vom Verhältnis der beiden optischen Isomere



2019-1-BG01-KA203-062371

Maßstab kommerzialisiert und zu Spritzgussobjekten, Folien und Beschichtungen geformt werden kann. PLA hat als Verpackungsmaterial High-Density-Polyethylen, Low-Density-Polyethylen (LDPE), Polyethylenterephthalat und PS ersetzt.

Die Haupteigenschaften von PLA sind: i) die mechanische Beständigkeit und Wärmeempfindlichkeit sind denen von herkömmlichen Kunststoffen ähnlich; ii) Härte, Steifigkeit und Elastizitätsgrad sind PET ähnlich, iii) es kann Fette, Öle, Alkohol und aliphatische Moleküle enthalten, iv) geringe Beständigkeit gegen Säuren und Basen ist aber gute Beständigkeit gegen UV-Strahlung, v) es kann bedruckt werden und gefärbt, vi) es kann durch Standardmaschinen, die für traditionelle Kunststoffe verwendet werden, in Waren umgewandelt werden, vii) die Nachnutzungsphase kann die Kompostierung in Industrieanlagen beinhalten.

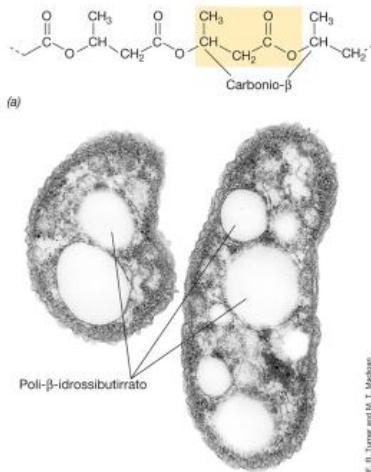
3. Polyhydroxyalkanoate

Polyhydroxyalkanoate (PHAs) sind biologisch abbaubare Polymere, die von manchen Bakterien als Speichersubstanz in Form von intrazellulären Granulaten angereichert werden. PHA gehört zu den Biopolymeren, die die herkömmlichen petrochemischen Kunststoffe mit ihren parallelen Materialeigenschaften effektiv ersetzen können. Ihre Produktion im großen Maßstab ist jedoch noch immer durch die hohen Herstellungskosten im Vergleich zu herkömmlichen Kunststoffen auf Basis fossiler Brennstoffe begrenzt, da der PHA-Preis je nach Polymerzusammensetzung mit 2,2 bis 5,0 €/kg mindestens dreimal so hoch ist wie die wichtigsten Polymere auf petrochemischer Basis, die weniger als 1,0 €/kg kosten (Berechnungen im Jahr 2016).

In den meisten Unternehmen, die PHAs herstellen, werden meist Reinkulturen verwendet. Das Problem bei der Verwendung von Reinkulturen sind die Voraussetzungen für Sterilität, veredelte Substrate, wenn keine pflanzlichen Rohstoffe verwendet werden, was den Kommerzialisierungsprozess einschränkt. All diese Probleme sollen mit Mixed Microbial Cultures (MMCs) überwunden werden: Diese kombinieren die Umwandlung von Abfällen in eine wertschöpfende Produktproduktion. Die biologische Behandlung von Abwasser und Schlammmanagement zur Rückgewinnung von Kohlenstoff aus Abwasser als PHAs ist ein Weg, um die Umweltschutzinfrastruktur am Ende der Rohrleitung in Bioraffinerien umzuwandeln. Integrationsstrategien für die Produktion von MMC-PHA in Abwasserbehandlungsprozessen wurden für industrielle Prozessabwässer und kommunale Abwasserbehandlung vorgeschlagen.

2019-1-BG01-KA203-062371

Eines der am besten charakterisierten Mitglieder der PHA-Familie ist Polyhydroxybutirat (PHB), das von Mikroorganismen produziert wird, die es im Zellzytoplasma speichern. 1926 wurde erstmals



- Discovered for the first time in 1926 in *Bacillus megaterium*
- It was then found in many other bacterial genera (e.g. *Pseudomonas* and *Alcaligenes*)
- Stored inside the cell in big granules until 90% of its dry weight
- Produced when the cell is under a nutritional stress

die mikrobielle Produktion von linearem Polyester aus D(-)-3-Hydroxybuttersäure als intrazelluläres Granulat entdeckt, die sowohl bei grampositiven als auch bei gramnegativen Bakterien unter Hungerbedingungen auftrat (Abb. 11). Die Kosten sind der Hauptnachteil der PHB-Produktion während der Industrialisierung. Die industrielle Herstellung von PHB ist teurer als die von Petroplastik. Die

Abb. 11. Polyhydroxybutirat

Produktion von PHB in großen Mengen wird auf etwa 4,4 USD/kg geschätzt, dh weitaus teurer als die Produktionskosten für Polypropylen, die nahe 1 USD/kg liegen. Die finanziellen Schwierigkeiten stehen zweifellos im Zusammenhang mit den Produktionskosten, sowohl vor- als auch nachgelagerten Prozessen. CA, 40 % bzw. 50 % der Gesamtproduktionskosten von PHB wurden den Rohmaterial- bzw. Trenn-/Reinigungssystemen zugewiesen. Bei Bioextraktionstechniken wird Gentechnik am häufigsten verwendet, um Mikroorganismen einzuführen, und sie sind in der Lage, PHB effektiv aus PHB-akkumulierenden Zellen zu extrahieren. Es gibt mehrere Ansätze, die untersucht wurden, darunter ein Bakteriophagen-vermitteltes Lysesystem und räuberische Bakterien, die besser sind als die herkömmlichen Extraktionsansätze, die umweltschädliche Lösungsmittel produzieren, mit höheren Abbaukosten. Aufgrund der nicht umwelt- und wirtschaftsunfreundlichen Eigenschaften herkömmlicher Extraktionsverfahren wird daher Bioextraktionssystemen mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Gentechnik wird am häufigsten verwendet, um Mikroorganismen einzuführen, und sie sind in der Lage, PHB effektiv aus PHB-akkumulierenden Zellen zu extrahieren.

Biotechnologie zur Altlastensanierung

Diese Einheit konzentriert sich im Wesentlichen auf die Technologien, die die Untersuchung der Mikrobiota in Böden oder komplexen Matrizen ermöglichen. Die wichtigsten Technologien sind unten dargestellt (Abb. 12).

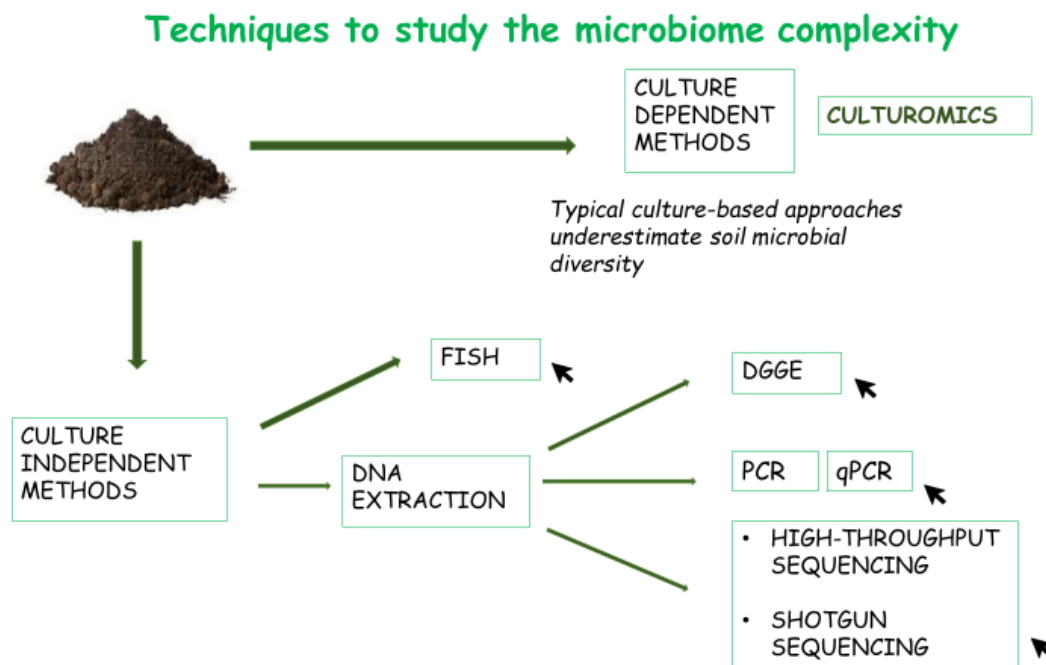


Abb. 12: Techniken zur Untersuchung der Mikrobiomkomplexität

Der kulturelle Ansatz ist in dem von Digit-Biotech produzierten Video gut beschrieben. Diese "klassische Methode" sieht die Identifizierung von Mikroorganismen durch die Isolierung von Reinkulturen vor, gefolgt von Tests, die einige morphophysiologische und biochemische Eigenschaften analysieren. Diese Analysen reichen oft nicht aus, um die meisten Arten von Mikroorganismen zu identifizieren und beschränken sich zudem auf kultivierbare Arten, die einen sehr geringen Prozentsatz aller in der Natur vorkommenden Arten ausmachen. Diese Tests haben auch die ernsthafte Einschränkung, dass sie einen beträchtlichen Zeitaufwand erfordern. Sie haben jedoch den großen Vorteil der Gewinnung durch den Isolierungsansatz von Zielmikroorganismen, die im Bioremediationsansatz verwendet werden können.



2019-1-BG01-KA203-062371

In den letzten Jahrzehnten hat die Forschung auf dem Gebiet der Umweltmikrobiologie gezeigt, dass mikrobielle Gemeinschaften eine funktionelle Rolle bei der Kontrolle von Ökosystemen spielen, die nicht einzelnen Arten, sondern den Gemeinschaften selbst als "funktionale Einheiten" zugeschrieben wird. Diese funktionelle Aktivität mikrobieller Gemeinschaften ist in vielen Fällen für wichtige Prozesse für den Menschen verantwortlich, darunter der biologische Abbau von Altabfällen in Kläranlagen und Deponien, die Kompostierung und allgemein alle Prozesse, bei denen chemische Umwandlungen der von die Aktivitäten stattfinden. Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE), Real-Time-PCR (oder quantitative PCR), und der Gesamtgenom-Ansatz (Hochdurchsatz-Sequenzierung und Shotgun-Sequenzierung) sind die wichtigsten Technologien, die für die Untersuchung mikrobieller Populationen in der Umwelt verwendet werden.

DGGE: Es handelt sich um eine elektrophoretische Trenntechnik zur Trennung und Analyse von DNA-Fragmenten, die sich auch in der Nukleotidsequenz eines einzelnen Basenpaars unterscheiden. Bei der klassischen Elektrophorese, die auf Agarose- oder Acrylamidgel durchgeführt wird, werden DNA-Fragmente auf der Basis des Molekulargewichts getrennt; die Laufgeschwindigkeit nimmt parallel zur Längenzunahme des Fragments ab. Im Gegensatz dazu werden in der DGGE DNA-Fragmente mit gleichem Molekulargewicht nach dem Denaturierungsmuster getrennt. Das Vorhandensein von Hitze oder chemischen Denaturierungsmitteln ermöglicht die Denaturierung der beiden Filamentbestandteile eines doppelsträngigen DNA-Moleküls (dsDNA). Temperatur und Konzentration des Denaturierungsmittels, bei dem die Trennung der beiden Filamente erfolgt, hängen stark von der Sequenz des Fragments selbst ab. Ausschlaggebend sind insbesondere: Menge der Wasserstoffbindungen, die zwischen komplementären Basen aufgebaut werden und Art der Wechselwirkungen, die zwischen Basen aufgebaut werden, die auf demselben Strang benachbart sind (Stapelwechselwirkung). Ein DNA-Molekül hat daher Domänen mit charakteristischen Schmelztemperaturen oder T_m , bestimmt durch die Nukleotidsequenz. DNA-Fragmente, die im Molekulargewicht fast identisch sind, sich aber auch in einem einzigen Nukleotid unterscheiden, können durch voneinander verschiedene T_m - und Schmelzdomänen charakterisiert werden. Die DGGE-Analyse wird auf einem Polyacrylamidgel durchgeführt, das einen denaturierenden Gradienten enthält, so dass die dsDNA während des Laufs einer Erhöhung der Denaturierungsbedingungen mit nachfolgender Trennung an den Schmelzdomänen unterliegt. Im oberen Teil des Gels, wo milde Denaturierungsbedingungen vorliegen, die Schmelzdomänen bei niedrigeren T_m beginnen teilweise zu denaturieren, wodurch verzweigte Moleküle mit geringerer Mobilität entstehen. Die Zunahme der Denaturierungsbedingungen entlang des Polyacrylamidgels kann die vollständige Dissoziation von teilweise denaturierten Fragmenten in einzelsträngiger DNA (ssDNA) bestimmen. Experimentell wird die vollständige Dissoziation der beiden dsDNA-Stränge durch die Einführung von Domänen am Ende jedes Filaments verhindert, die durch einen hohen Gehalt an G + C und eine hohe T_m gekennzeichnet sind. An einem Ende der dsDNA werden durch Einbau einer GC-Klemme während der Amplifikationsreaktionen G + C-reiche Regionen künstlich erzeugt. Der Einbau der GC-Klemme wird durch die Verwendung von Primern ermöglicht, die durch eine Sequenz von ca. 30-40 GC am 5'-Ende gekennzeichnet sind. Das Vorhandensein der GC-Klemme der gleichen Sequenz am Ende jedes Moleküls bewirkt, dass die Unterschiede zwischen den Hubprofilen der analysierten Fragmente



2019-1-BG01-KA203-062371

hauptsächlich durch Variationen in der Sequenz der niedrighschmelzenden Domänen bestimmt werden. Da T_m durch die Nukleotidsequenz bestimmt wird, kann das Vorliegen einer einzelnen Mutation ein anderes Denaturierungsprofil und folglich einen anderen Elektrophoreselauf erzeugen. Daher kann das Wiederauftreten von Polymorphismen in hochkonservierten Genen von der DGGE analysiert werden und nützliche Informationen zur Charakterisierung der Struktur mikrobieller Gemeinschaften liefern. Tatsächlich erhält man bei der denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese ein elektrophoretisches Profil, das durch eine Reihe von Banden gebildet wird, in dem in erster Näherung die Anzahl der Banden ist proportional zur Anzahl der vorhandenen Arten und die Position jeder Bande ist für jede Art unterschiedlich. Die DGGE-Technik bietet daher einen einfachen Ansatz, um mikrobielle Gemeinschaftsprofile zu erhalten, mit denen räumliche und zeitliche Unterschiede in der Gemeinschaftsstruktur identifiziert oder Strukturänderungen als Reaktion auf Umweltstörungen überwacht werden können.

Echtzeit-PCR: Es ist eine Technik, die es ermöglicht, eine Ziel-DNA-Sequenz zu amplifizieren und gleichzeitig zu quantifizieren. Dabei werden fluoreszierende Farbstoffe wie Sybr Green verwendet, die in den kleinen Sulcus des DNA-Doppelstrangs interkalieren, oder Sonden mit spezifischen Sequenzen, die aus mit fluoreszierenden Mitteln markierten Oligonukleotiden bestehen. Die emittierte Fluoreszenz wird ständig gemessen und liefert "Echtzeit"-Informationen über die Menge des produzierten Amplikons. Aus einer Amplifikationsreaktion wird ein Graph mit einer sigmoidalen Kurve erhalten; diese setzt so schnell wie möglich ein, je größer die Menge an Ausgangs-DNA ist und wächst mit exponentiellem Trend weiter, bis sie einen Maximalwert (Plateau) erreicht, bei dem sich die Reaktion aufgrund der Erschöpfung der Substrate verlangsamt.

Bei der Untersuchung eines Real-Time-PCR-Graphen werden drei Parameter festgelegt:

- die Fluoreszenz-Basislinie oder Basislinienregion;
- die Schwellenlinie, parallel zur Grundlinie;
- der für jede Probe spezifische Schwellenwertzyklus oder CT identifiziert den Wert des PCR-Zyklus, in dem die exponentielle Phasenkurve die Schwellenwertlinie schneidet.

Die meisten Real-Time-PCR-Instrumente sind so programmiert, dass sie die Wellenlängen des SYBR Green-Emissions- und Anregungsspektrums (jeweils 495 nm und 537 nm) ablesen. Dieser Farbstoff ist sehr lichtempfindlich, er bindet nur an doppelsträngige DNA und damit nur an das neu synthetisierte Amplikon. Die Proben werden auf der Grundlage von Eichkurven quantifiziert, die unter Verwendung bekannter Mengen von 16 S rDNA-Genkopien erhalten wurden. Der Vergleich des von der unbekanntem Probe emittierten Signals mit den zur Erstellung der Kalibrierkurve verwendeten Fluoreszenzwerten ermöglicht die Quantifizierung einer bestimmten mikrobiellen Spezies. Neben der quantitativen Messung von Zielbakterien ermöglichen Interkalatoren wie SYBR Green die Unterscheidung von Amplikons unterschiedlicher Länge und den Nachweis eventuell vorhandener unspezifischer Amplifikationen.



2019-1-BG01-KA203-062371

Sequenzierung der nächsten Generation: Die Besonderheit dieser 2006 eingeführten Technologie besteht nicht nur in der Möglichkeit, ein einzelnes DNA-Fragment auf einmal zu sequenzieren und diesen Prozess auf Millionen von Fragmenten gleichzeitig auszudehnen, sondern auch in der Fähigkeit, DNA-Fragmente in beide Richtungen zu sequenzieren.

Der erste Schritt umfasst einzelsträngige DNA-Fragmente, an deren Enden eindeutige Sequenzen, genannt "Index", auf einen Zellstrom geladen werden, wo sie auf einer Oberfläche eingefangen werden, die "Oligonukleotide noch" enthält, die zu den Indizes komplementär sind, auf denen sie werden für die Herstellung der Bibliotheken immobilisiert. Die Hybridisierung zwischen letzteren und den DNA-Fragmenten erfolgt durch Erhitzen und Kühlen, gefolgt von Inkubation mit spezifischen Reagenzien und einer isothermen Polymerase. Durch eine "überbrückte" Amplifikation wird jedes Fragment eindeutig von den anderen amplifiziert, wodurch ein Cluster von Klonen entsteht. Wenn die Cluster-Generierung abgeschlossen ist, sind die generierten Modelle nach entsprechender Denaturierung bereit für die eigentliche Sequenzierung.

Illumina verwendet eine Technologie, die auf kettenterminierenden fluoreszierenden Nukleotiden mit einem OH bei 3' basiert; dies stellt sicher, dass eine einzige Base pro Zyklus eingearbeitet wird. Es folgt ein Bildgebungsschritt, um das in jedem Cluster eingebaute Nukleotid zu identifizieren, und ein chemischer Schritt, um die fluoreszierende Gruppe und das terminale OH zu entfernen, um den Einbau einer anderen Base im nächsten Zyklus zu ermöglichen.

Am Ende der Sequenzierung, die ca. 4 Tage dauert, wird die Sequenz jedes Clusters Selektionsprozessen (Trimming) unterzogen, um die minderwertigen Produkte zu eliminieren. Bei der Datenanalyse werden die Fragmente unterschiedlicher Länge ausgerichtet und überlagert, so ist es möglich, die Abfolge des Ausgangsfilaments zu erkennen. In einem Standardverfahren werden mindestens 40-50 Millionen Sequenzen analysiert.

Die Shotgun-Sequenzierung ist die Sequenz aller Genome, die in einer komplexen Matrix, wie einer Bodenprobe, vorhanden sind. Die Shotgun-Sequenzierung ist daher der effizienteste Weg, um ein großes Stück DNA zu sequenzieren. Dazu wird die Ausgangs-DNA nach dem Zufallsprinzip in viele kleinere Stücke zerlegt, eine Art Schrotflinte, wobei jedes dieser Stücke dann einzeln sequenziert wird. Die aus den verschiedenen Stücken erzeugten resultierenden Sequenzlesevorgänge werden dann von einem Computerprogramm analysiert, wobei nach Sequenzabschnitten von unterschiedlichen Lesevorgängen gesucht wird, die miteinander identisch sind. Wenn identische Regionen identifiziert werden, werden sie miteinander überlappt, wodurch die beiden Sequenzlesevorgänge zusammengefügt werden können. Dieser Computerprozess wird immer wieder wiederholt und liefert schließlich die vollständige Sequenz des Ausgangsstücks der DNA.



Mikrobielle Technologien für die Gesundheit von Honigbienen

Zahlreiche biotische und abiotische Belastungen, wie der massive Einsatz von Pestiziden in der Landwirtschaft und der Klimawandel, gefährden das Überleben bestäubender Insekten mit potenziell schädlichen Folgen sowohl für Agrarökosysteme als auch für natürliche Systeme. Tatsächlich sind Bienen für die Bestäubung von 84% der Kulturpflanzenarten verantwortlich, von denen 35% von globaler Bedeutung sind und 78% der Wildpflanzen. Es genügt zu sagen, dass allein 70% der Saatkulturen (wie Karotten, Zwiebeln, Knoblauch usw.) strikt auf Insektenbestäubung angewiesen sind, ebenso wie 80% der 264 interessierenden Kulturpflanzenarten in Europa. Daraus folgt, dass die Aktivität bestäubender Insekten, einschließlich Bienen, auf wirtschaftlicher Ebene eine wesentliche Rolle spielt, deren monetäre Schätzung allein in Europa etwa 15 Mrd. € / Jahr beträgt, während sie weltweit auf 153 Mrd. € / Jahr anwächst.

Neben einem unkalkulierbaren Wert für die Erhaltung der Biodiversität und des Gleichgewichts in den verschiedenen Ökosystemen liefern Bienen also Honig, Bienenwachs, Propolis, Pollen und Gelée Royale: In Europa ergaben die 2010 erhobenen Daten eine Produktion von rund 220 000 Tonnen 000 Honig mit Preisen zwischen 1,50 und 40 €/kg je nach Herkunftsgebiet. Oder in Australien bewegt sich die Produktion von Honig und Bienenwachs jährlich um einen Handelswert von 90 Millionen US-Dollar, was einmal mehr die Bedeutung der Imkerei im Panorama unterstreicht. Weltwirtschaft. Honigbienenvölker sind von 6 Millionen in den 1940er Jahren auf heute etwa 2,6 Millionen rapide zurückgegangen. Der hohe jährliche Verlust an Bienenvölkern wird immer noch beobachtet und ist für Imker zur Norm geworden.

Bruten, die von "Colony Collapse Disorder" (CCD) oder "Hive Depopulation Syndrome" betroffen waren, zeigten ebenfalls signifikante Anzeichen eines Ungleichgewichts. Die Ursachen dieses Syndroms sind noch unklar, es wird jedoch vermutet, dass sie auf veränderte Umweltfaktoren, Mangelernährung, das Vorhandensein von Krankheitserregern und den massiven Einsatz von Insektiziden zurückzuführen sind. Die Symptomatologie sieht das Vorhandensein von Bruten, die ihre Larven trotz Anwesenheit der Königin verlassen, und Appetitlosigkeit auf Pollen- und Nektarvorräte, die nicht sofort verzehrt werden (Abb. 13).

Eine der möglichen Ursachen für dieses Absterben kann mit der Darmmikrobiota-Dysbiose als mikrobielle Veränderung in Bezug auf Menge und Zusammensetzung zusammenhängen. Mit diesem Begriff bezeichnen wir das Phänomen, das die positiven Funktionen der Mikrobiota negativ beeinflusst und mit spezifischen Stoffwechselstörungen verbunden ist. Tatsächlich könnten diese Mängel ernsthafte Probleme für die Entwicklung junger Erwachsener verursachen, indem sie ihre Fähigkeit beeinträchtigen, Resistenzgene zu entwickeln, einschließlich derer für die Synthese von Vitellogenin, und die Funktionen des Immunsystems hemmen, da nachgewiesen wird, dass dieselbe Mikrobiota die seine Wirksamkeit (Abb. 14). Vor einigen Jahren haben wir versucht zu verstehen, welche Faktoren die Mikrobiota destabilisieren können und kamen zu dem Schluss, dass Dysbiose sowohl durch biotische als auch durch abiotische Faktoren verursacht wird. Betrachtet man biotischen Stress, so hat sich gezeigt, dass

die Ernährung, das Vorhandensein bestimmter Krankheitserreger und Erkrankungen (zB CCD) sowie widrige Umweltbedingungen eine grundlegende Rolle spielen. Der Nährstoffmangel wirkt sich destruktiv auf die normale Entwicklung der mikrobiellen Darmflora aus, was die Sterblichkeit der

Honeybee decline (CCD): a serious problem for honeybee health

Possible causes

- 🐝 Pests (e.g. Varroa, Vespa velutina...), pathogens (e.g. Bacteria, microsporidia...) and viruses (e.g. Deformed Wing Virus, Chronic Bee Paralysis Virus...);
- 🐝 Poor nutrition (e.g., due to loss of foraging habitat and increased reliance on supplemental diets);
- 🐝 Pesticide and agrochemicals exposure;
- 🐝 Bee management practices (e.g., long migratory routes to support pollination services);

What is CCD?

➡ It is the acronym of "Colony Collapse Disorder". CCD is the phenomenon that occurs when the majority of worker bees in a colony disappear and leave behind a queen, plenty of food and a few nurse bees to care for the remaining immature bees and the queen.



Click for watching

Abb. 13. Einblicke in die Koloniekollaps-Störung

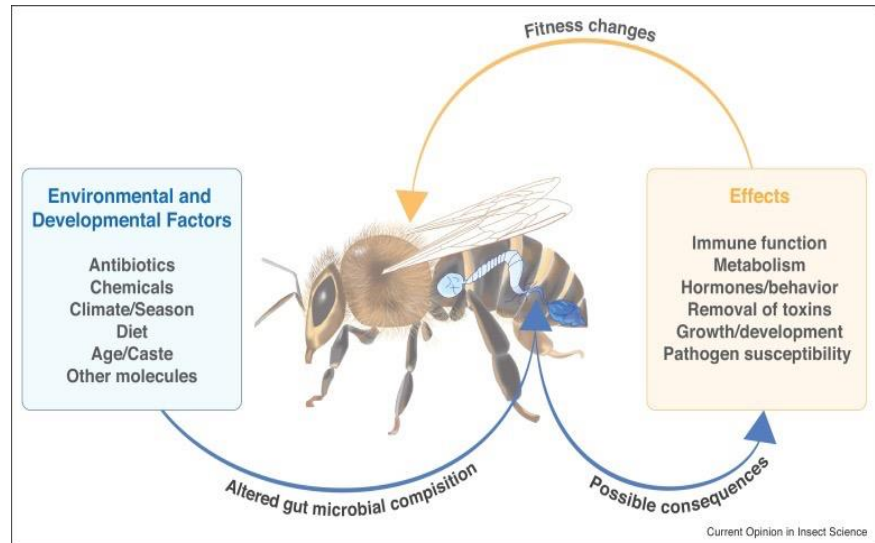


Abb. 14. Folgen einer veränderten mikrobiellen Zusammensetzung des Darms bei Bienen



2019-1-BG01-KA203-062371

Honigbienen sowie die Anfälligkeit für Krankheiten und Krankheitserreger erhöht. Darüber hinaus induzieren die anormalen Temperaturen bei den Wirten einen Stresszustand, der dramatische Auswirkungen auf die Symbionten hat.

Bei abiotischen Stressoren sind die Schäden fast ausschließlich auf den Einsatz von Insektiziden, Fungiziden, Akariziden und Antibiotika zurückzuführen. Tatsächlich besteht die Gefahr, dass die Bienen während der Nahrungssuche indirekt aufgenommen werden und die Wirkstoffe sowohl auf den behandelten Hauptkulturen als auch auf den benachbarten, der Drift ausgesetzten Pflanzen treffen. Dies könnte zu ernsthaften Problemen und Ungleichgewichten im Stoffwechsel und der Immunabwehr führen: Tatsächlich besteht die Möglichkeit, dass die Exposition gegenüber bestimmten Substanzen die Fähigkeit der Bienen beeinträchtigt, ihre mikrobielle Darmpopulation zu regulieren.

Aus diesen Gründen zielt eine der innovativsten Zukunftsperspektiven darauf ab, die tiefgreifende Beziehung zwischen Mikroorganismen und Honigbienen zu verstehen, um ihre dramatische Lebensdauer und Bedingungen zu verbessern.

Darmdisbiose: ein Beispiel

Angesichts des wachsenden Interesses der Öffentlichkeit an diesem Produkt fällt die erste objektive Analyse auf die Wirkung von Glyphosat (N-Phosphonomethyl-Glycin). Es ist ein nicht-selektives systemisches Nachauflaufherbizid, also ein Totalherbizid. Sein Wirkmechanismus unterbricht den Stoffwechselweg, der für die Synthese von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan verantwortlich ist, und hemmt die Synthese von 3-Phosphoshikimat-1-Carboxyvinyltransferase (EPSP-Synthase). Dieses Herbizid gilt seit jeher als eines der am wenigsten giftigen Produkte für Tiere, da ihnen dieser Stoffwechselweg fehlt. Trotzdem wurde gezeigt, dass es Nicht-Zielorganismen mit hochtoxischen Wirkungen gegenüber Regenwürmern, Mikroalgen, Wasserbakterien, Rhizosphäre und Endophyten beeinflussen kann.

Insbesondere Motta et al. (2018) führten eine Studie zur Charakterisierung der Mikrobiota von Bienen durch, die Glyphosat ausgesetzt waren, und kamen zu dem Schluss, dass die absolute Häufigkeit von *S. alvi*, *G. apicola*, *Lactobacillus* sp. und *Bifidobacterium* sp. (Abb. 15) deutlich zurückgegangen ist.



2019-1-BG01-KA203-062371

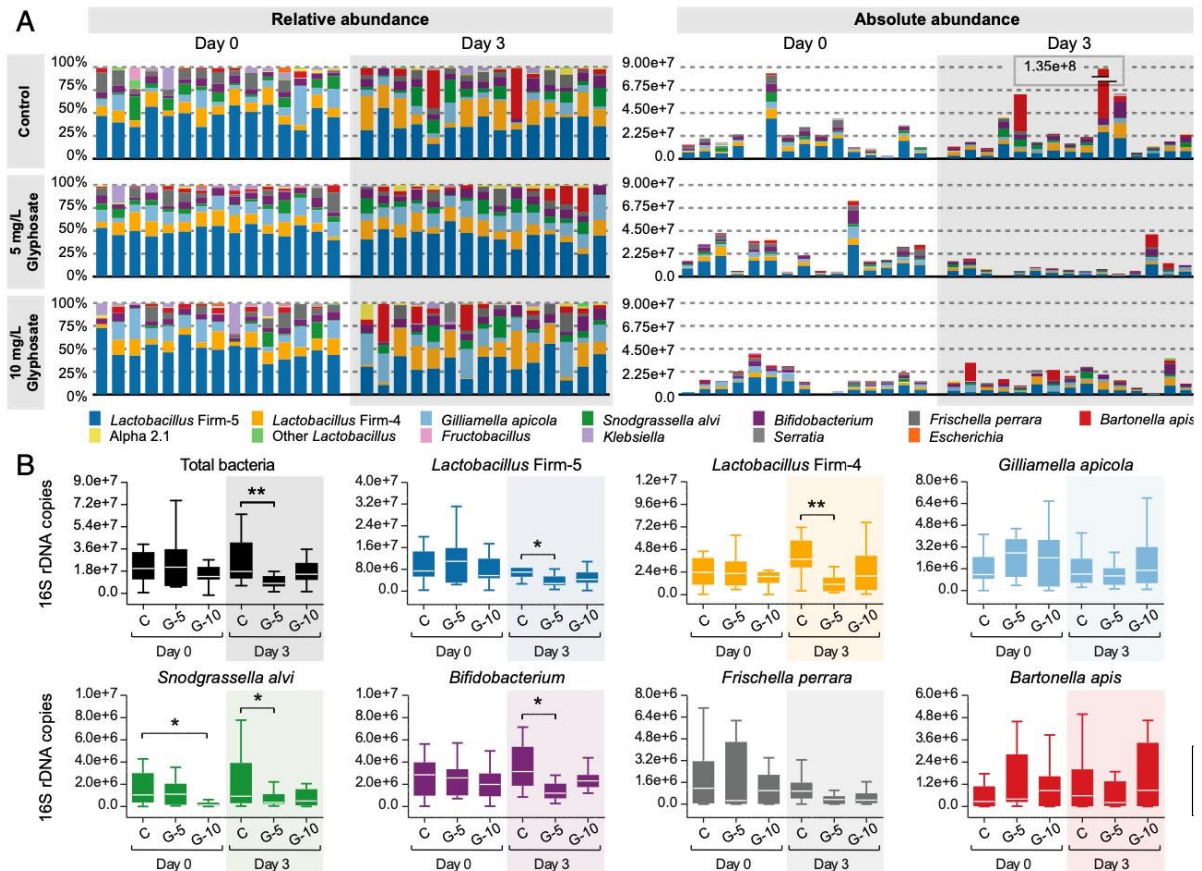


Abb. 15. Analysen zur Bienendarmmikrobiota

Das Produkt beeinträchtigte die Bakterienflora, indem es ihr Wachstum stoppte, ohne sie jedoch direkt abzutöten. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Wirkung auf die Zellteilung in den frühen Tagen der Kolonisation abnahm. Die Bienen, die auf dem Feld auf das Herbizid gestoßen sind, hätten den Wirkstoff nämlich im Inneren des Bienenstocks getragen, der, da er sehr stabil und wasserunlöslich ist, lange Zeit auf der Oberfläche hätte verbleiben können. Auch im Feld bedeutet Persistenz, dass die Kontamination lange anhalten kann.



2019-1-BG01-KA203-062371

Wie wird die Mikrobiota erworben?

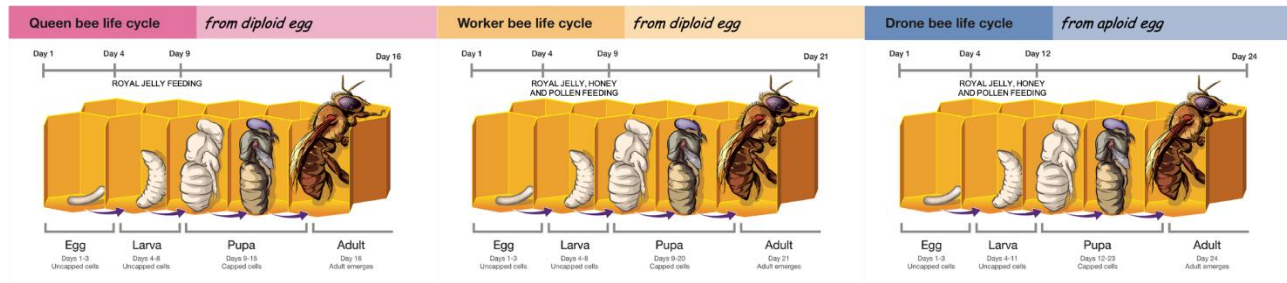


Abb. 16. Der Wachstumszyklus einer Biene

Natürliche Bakterien, die von Honigbienen aus Blüten aufgenommen werden, während sie Nektar und Pollen sammeln, befinden sich hauptsächlich im Mitteldarm und Hinterdarm der Honigbiene. Die bei Honigbienen natürlich vorkommenden Darmbakterien sind dynamisch. Während der Entwicklung der Larven (Abb. 16) schwankt die Bakterienpopulation. Larven erhalten einige Bakterien von den Ammenbienen, die sie füttern. Während der Verpuppung wird die Darmschleimhaut abgestoßen und der Darm einer neu aufkommenden erwachsenen Honigbiene ist steril. Der Darm wird schnell wieder mit charakteristischen Mikrobiota besiedelt. Wie kommt es dazu? Hauptwege sind oral-Trochallaxis, Interaktion mit Bienenstockmaterial und fäkal-orale Übertragung. Insbesondere beginnt sich die charakteristische Mikrobiota erwachsener Bienen etwa vier Tage nach dem Flimmern zu entwickeln.

Obwohl die Faktoren, die die Entwicklung der Mikrobiota für jedes Lebewesen ermöglichen, noch unbekannt sind, ist es bewiesen, dass soziale Bienen je nach Familie, zu der sie gehören, eine charakteristische Mikroflora besitzen. Es hat sich zum Beispiel gezeigt, dass die Analyse der Mikrobiota verschiedener Gattungen von eusozialen corbiculaten *Apoidea* wie *Bombus* spp., *Megachile* spp. und *Apis* spp., die wichtigsten Bakteriengattungen rezidivierend waren (*Snodgrassella* spp., *Gilliamella* spp., *Bifidobacterium* spp. und *Lactobacillus* spp.), aber die Arten variierten in Bezug auf die Insektenarten. Daher die Hypothese, dass die Mikrobiota das Ergebnis einer dynamischen Koevolution zwischen Mikroorganismen und Wirten ist, abhängig von der Umwelt und den genotypischen Variationen, denen die Arten im Laufe der Jahrhunderte ausgesetzt waren, deren Reichtum auch mit der Größe einzelner Bienen und ganzer Völker korreliert. Tatsächlich ist die Etablierung einer artspezifischen mikrobiellen Flora das Ergebnis einer langen Selektion, bei der die optimalen Nutzverhältnisse sowohl für die Mikroorganismen als auch für die Wirte festgestellt wurden.

Wer und wo sind sie?

Es wurde geschätzt, dass sich im Darm von erwachsenen Arbeiterinnen etwa 1 Milliarde Bakterienzellen befinden, von denen 95% speziell im Hinterdarm lokalisiert sind (Abb. 17). Dabei wurde eine spezifische Unterscheidung zwischen Ileus und Rektum festgestellt; in den ersten drei Arten von

2019-1-BG01-KA203-062371

Proteobakterien wie *G. apicola*, *F. perrara* und *S. alvi*, die einen dichten Biofilm entsprechend den Malpighischen Röhren bilden und sich entlang der Ileumwand fortsetzen.

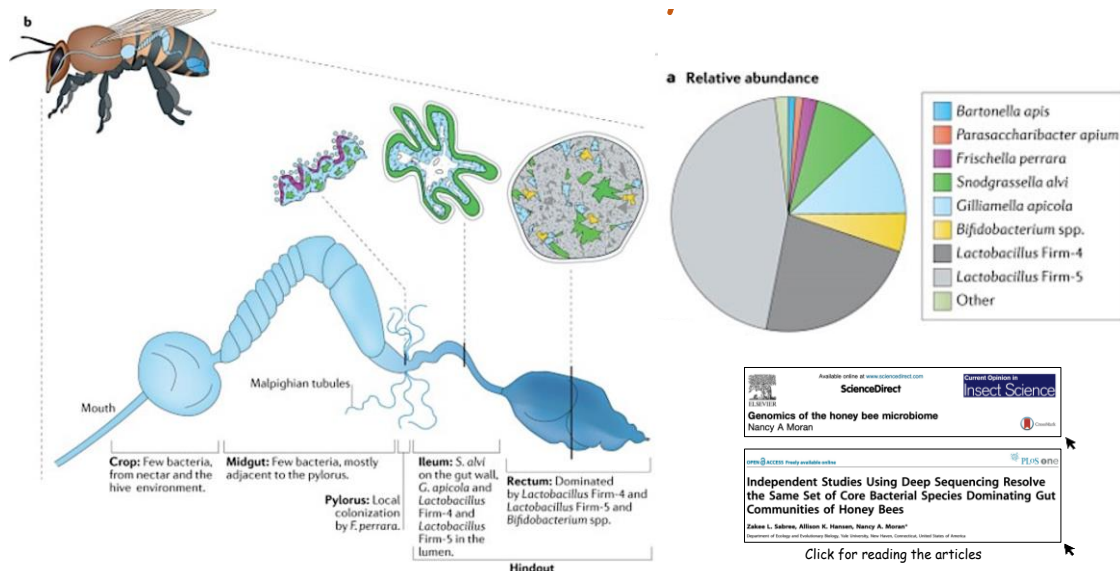


Abb. 17. Die Kernbienenmikrobiota

Im Rektum herrscht jedoch eine dichte Bakteriengemeinschaft vor, die aus drei Klassen von Gram-positiven, wie *Firmicutes* (Firm-4, Firm-5) und Bifidobakterien besteht. Was den Mitteldarm betrifft, so wurde festgestellt, dass hauptsächlich *Lactobacillus* spp. und *Acetobacteraceae*, d. h. jene Taxa, die auch in Pollen, Nektar und allgemeiner im Bienenstock vorkommen. Es kann daher gesagt werden, dass im Mitteldarm keine vorangepasste Mikrobiota existiert und dass diese in Abhängigkeit von der Umgebung und den Essgewohnheiten des Einzelnen variiert. Quantitativ gesehen gibt es hier also eine viel weniger reichhaltige Flora als im Rektum. Der Mitteldarm enthält auch wenige Bakterien, und diese sind im proventrikulären Bereich neben dem Hinterdarm konzentriert.

Was sind die Funktionen der Darmmikrobiota?

In den letzten Jahren hat sich die wissenschaftliche Gemeinschaft zunehmend für die Rolle der Mikrobiota für das Wohlergehen von Honigbienen interessiert (Abb. 18). Zahlreiche Studien und Forschungen haben gezeigt, dass Interaktionen mit dem Wirt sowohl auf metabolischer und ernährungsphysiologischer Ebene als auch in Bezug auf die Immunantwort auf Krankheitserreger unterstützende Wirkungen haben. Was die Nahrungsergänzung angeht, ist eine ausgewogene Bakterienflora für eine korrekte Aufnahme von Nährstoffen notwendig, da sie dank ihrer enzymatischen Aktivität am Abbau komplexer Zucker beteiligt ist. Der Artenreichtum ist nicht nur für das Vorhandensein von Cellulasen, Hemicellulasen und ligninolytischen Enzymen im Darm verantwortlich,



2019-1-BG01-KA203-062371

die für den Verdauungsprozess von Pollenkörnern nützlich sind, sondern ermöglicht auch die Koexistenz verschiedener Zuckerkatalysewege (insbesondere für *Gammaproteobakterien*, *Firmicutes* und *Bifidobacteriaceae*). Tatsächlich wurde geschätzt, dass 91% der Proteintranskripte, die mit der Verdauung von Pflanzenmakromolekülen und den Fermentationsphänomenen von monomeren Untereinheiten verbunden sind, von Bakterien produziert werden. Ein weiteres konkretes Beispiel betrifft Pektin-Lyasen, die in der Lage sind, die in den Zellen der Pollenkörnerwand vorhandenen Pektine abzubauen. Letzteres ist auch ein ausgezeichneter Indikator für die hohe genetische Variabilität und Anpassungsfähigkeit innerhalb derselben Spezies von Mikroorganismen. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass nur einige Stämme von *G. apicola* sie besitzen, während andere davon völlig frei sind. Die Bedeutung einer größeren Verdauungskapazität und damit der Fähigkeit, nicht abbaubare Nährstoffe zu verstoffwechseln, wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen. (Zhenget al. (2017) zum Beispiel). Durch den Vergleich von Bienen mit normaler Mikrobiota und anderen ohne jegliche Art von Darmflora zeigten sie deutliche physiologische Unterschiede. Bei ersteren beeinflussten die Symbionten die Darmgröße, das Gewicht der Individuen, die Werte von Vitellogenin und Insulin sowie die Zuckerempfindlichkeit positiv. Diese Ergebnisse legten dann nahe, dass die Mikrobiota den Appetit und das Wachstum des Bienenkörpers durch die Zunahme von Signalen im Zusammenhang mit der Anwesenheit von Insulin beeinflussen könnte.

Neben der Hydrolyse komplexer Kohlenhydrate produzieren Darmmikroorganismen nützliche Stoffwechselsubstrate wie Vitamin B und andere und kurze Fettsäureketten. Beispielsweise wurde festgestellt, dass die Gattungen *Lactobacillus* sp. und *Bifidobacterium* sp. sind an den Fermentationsprozessen von Pollen und Nektar beteiligt, so dass sie für den Vitaminwert von Honig verantwortlich sind. Das Phänomen der Symbiose mit dem Wirt geht über die Ernährung und den Stoffwechsel hinaus: Die Mikrobiota spielt eine wichtige Rolle bei der Unterstützung des Immunsystems. Tatsächlich könnten die Bakterien in erster Linie die Produktion der bieneneigenen Abwehrmoleküle direkt anregen. Nach dem Kontakt zwischen der Epitheloberfläche und dem Peptidoglycan (Hauptbestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien) das Immunsystem könnte die Gene aktivieren, um 6 antimikrobielle Peptide zu produzieren, wie zum Beispiel: Abaecin, Hymenoptaecin, Apidicin, Defensin-1 und Defensin-2. Die Produktion dieser Verbindungen wird dann durch die Veränderungen der mikrobiellen Membranen selbst verstärkt und kann auch durch Exposition gegenüber einigen pathogenen und nicht-pathogenen Mikroorganismen induziert werden. *Frischella perrara* zum Beispiel, ein Symbiont, der die Ileumregion im Enddarm besiedelt, stimuliert vor allem die Produktion von Apidicin. Zweitens kann die Mikrobiota direkt für die Produktion antimikrobieller Verbindungen verantwortlich sein, was unter anderem durch zahlreiche Studien bestätigt wird. Saraivaet al. (2015), zum Beispiel hat dies aufgenommen.



2019-1-BG01-KA203-062371

Generic function of the honey bee gut microbiota	Specific function	Target microorganisms (where available)	Generic function of the honey bee gut microbiota	Specific function	Target microorganisms (where available)			
Nutritional support	Source of vitamins, fatty acids, amino acids	-	Host protection: other strategies	Antimicrobial activity against <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Melissococcus plutonius</i> and <i>Ascosphaera apis</i>	<i>Bacillus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.			
	Lignin degradation	<i>Fructobacillus</i> spp.						
	Sugar uptake systems	<i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i>						
	Breakdown of plant-derived macromolecules	<i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i>						
	Pectin degradation activity (strain specific)	<i>G. apicola</i>						
	Aerobic oxidation of the end-products of the fermentation process	<i>S. alvi</i>						
	Glycoside hydrolase activities	Lactic acid bacteria						
	Trehalose degradation IV pathway	<i>Bifidobacterium</i> spp.						
	Direct stimulation of the bee's immune system	Increased expression level of antimicrobial peptides (AMPs) under pathogen exposure in bee larvae				-	Biofilm formation and structures resembling extracellular polymeric substances Biosynthesis of cell wall exopolysaccharides Genes encoding a relevant number of functions related to biofilm formation and host interaction (Type IV pili, outer membrane proteins, and secretion)	LAB symbionts from honey crop "Firm4" and "Bifido" groups <i>G. apicola</i> and <i>S. alvi</i>
		Increased expression level of selected AMPs in bee larvae upon feeding with probiotic bacteria				-		
Strong positive correlation between the amount of total honey bee gut bacteria and transcript levels AMPs		-						

Abb. 18. Funktionen der Bienendarmmikrobiota

Was können wir tun?

Nach unseren und allgemeinen Erfahrungen bei Mensch und Tier können biotische und abiotische Belastungen die Zusammensetzung der Darmmikrobiota negativ beeinflussen und somit spezifische Veränderungen der Mikroorganismenaktivitäten auf Darnebene bewirken.

Wir müssen uns fragen, ob irgendeine Art von Mikrobiota-Modulation durch die Verabreichung ausgewählter Stämme diese Störung wiederherstellen, das Bienensterben reduzieren und/oder die Gesundheit der Honigbienen verbessern könnte.

Probiotika sind „lebende Mikroorganismen, die bei Verabreichung in ausreichender Menge einen Nutzen für die Gesundheit des Wirts bringen, ausgenommen Hinweise auf Biotherapeutika und nützliche Mikroorganismen, die nicht in Lebensmitteln verwendet werden“ (FAO/WHO, 2001). Ihre Verabreichung darf daher nicht mit negativen Auswirkungen auf Organismen und Umwelt verbunden sein. Die Wirkungsweise dieser Mikroorganismen lässt sich in folgende Funktionen zusammenfassen:

- SCHUTZFUNKTION: Dislokation von Krankheitserregern, Konkurrenz um Nährstoffe, Konkurrenz mit Rezeptoren und Produktion antimikrobieller Moleküle (zB Bakteriocine, organische Säuren ...);
- STRUKTURFUNKTION: Barrierewirkung, Biofilm an der Darmhaarwand, Entwicklung des Immunsystems;



2019-1-BG01-KA203-062371

- STOFFWECHSELFUNKTION: Differenzierung und Vermehrung von Darmepithelzellen, Katalyse von krebserregenden Substanzen in der Nahrung, Synthese von Vitaminen, Fermentation von unverdaulichem Zucker, Ionenabsorption und Energieeinsparung.

Der Hauptwirkungsmechanismus von Probiotika scheint jedoch die Stimulierung des Immunsystems zu sein: Nach der Kohäsion mit der Darmwand können sie eine Reihe von Kaskadensignalen stimulieren, die die Synthese antimikrobieller Peptide aktivieren. In der Praxis sind sie in der Lage, die zuvor beschriebenen Aufgaben, die die Mikrobiota der Biene von Natur aus erfüllt, zu erfüllen und sich als hypothetisch optimales Hilfsmittel zu deren Sicherung und Optimierung sowie zur Verbesserung der Lebensaussichten der Biene zu erweisen.

Wie bei der menschlichen und tierischen Ernährung sind die wichtigsten Bakterien, die zu diesen Vorteilen in der Lage sind, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacillus* spp.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einsatz von Probiotika vor kurzem auch im Bienenstock selbst evaluiert wurde. Obwohl Bienen lieber frischen Pollen verzehren, müssen sie sich unter bestimmten Bedingungen, wie Saisonalität, mit den gespeicherten Reserven selbst versorgen. Die feuchte Umgebung (50-60% RH), die nach der Pollensammlung entsteht, erhöht das Risiko eines unkontrollierten Bakterien- und vor allem Pilzwachstums. Es besteht eine klare Notwendigkeit, die Bestände im Bienenstock zu erhalten, um Infektionen zu vermeiden, die tödliche Folgen haben könnten, wie zum Beispiel verkalkte Larven durch *Ascospaera apis* oder Darminfektionen durch *Nosema* spp.

Overview of beneficial microorganism applications for the treatment of the main honey bee microbial infections

Honey bee disease	Infection dose	Microorganisms/metabolites	Source	Reported effect(s)	References
<i>P. larvae</i> - AFB	10 ³ and 10 ⁴ spores/ml	<i>L. kunkeei</i> , <i>L. mellis</i> , <i>L. kimbladii</i> , <i>L. kullabergensis</i> , <i>L. helsinborgensis</i> , <i>L. melliventris</i> , <i>L. apis</i> , <i>L. mellifer</i> , <i>B. asteroides</i> and <i>B. coryneforme</i> (10 ⁷ bacteria/ml)	Honey crop	Reduced larvae mortality	Forsgren et al. 2010
	Not described	<i>B. thuringiensis</i> HD110, <i>B. laterosporus</i> BMG65.	Honey bee gut	Reduced larvae mortality	Hamdi and Daffonchio 2011
<i>M. plutonius</i> - EPB	10 ⁷ -10 ⁶ -10 ⁵ bacteria/ml	<i>L. kunkeei</i> , <i>L. mellis</i> , <i>L. kimbladii</i> , <i>L. kullabergensis</i> , <i>L. helsinborgensis</i> , <i>L. melliventris</i> , <i>L. apis</i> , <i>L. mellifer</i> , <i>B. asteroides</i> and <i>B. coryneforme</i> (10 ⁷ bacteria/ml)	Honey crop	Reduced larvae mortality	Vásquez et al. 2012
<i>N. ceranae</i>	1st trial: 10 ⁴ spores/μl	<i>L. kunkeei</i> Dan39, <i>L. plantarum</i> Dan91 and <i>L. johnsonii</i> Dan92, <i>B. asteroides</i> DSM 20431, <i>B. coryneforme</i> C155, <i>B. indicum</i> C449. (10 ⁶ -10 ⁷ cfu/ml of sugar syrup)	Honey bee gut	Reduced spore detection	Baffoni et al. 2016
	2nd trial: natural infection				
<i>Nosema</i> spp.	10 ³ spores/μl	<i>P. apium</i> C6 (10 ⁵ cfu/500 μl)	2nd instar larvae	Reduced spore detection	Corby-Harris et al. 2014
	Diseased bees	<i>L. johnsonii</i> CRL1647 (10 ⁵ cfu/ml)	Honey bee gut	Reduced spore detection	Audisio et al. 2015
	Diseased bees	10 ⁵ spores/mL of <i>Bacillus subtilis</i> Mri2 spores	Honey	Reduced spore detection	Sabaté et al. 2012

Adapted from Alberoni et al. 2016



Verweise

EFSA (2009). Bee mortality and bee surveillance in Europe. CFP/EFSA/AMU/2008/02

Motta EVS, Raymann K, Moran NA. 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honeybees. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 1-6

Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA. 2017. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114: 4775-4780

Saraiva MA, Zemolin APP, Franco JL, Boldo JT, et al. 2015. Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. *Antoine Van Leeuwenhoek*, 107: 921-933

FAO/WHO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United States, World Health Organization

Kainthola J, Kalamdhad AS, Goud VV. 2019. A review on enhanced biogas production from anaerobic digestion of lignocellulosic biomass by different enhancement techniques. *Process Biochemistry*, 84: 81-90

Shamurad B, Sallis P, Petropoulos E, Tabraiz S, Ospina C, Leary P, et al. 2020. Stable biogas production from single-stage anaerobic digestion of food waste. *Applied Energy*, 263: 114609

Kumar M, Dutta S, You S, Luo G, Zhang S, Show PL, et al. 2021. A critical review on biochar for enhancing biogas production from anaerobic digestion of food waste and sludge. *Journal of Cleaner Production*, 127143

Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61.

Galbe M, Zacchi G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Biofuels*, 41-65.

Kim S, Dale BE. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and bioenergy*, 26(4): 361-375.

Vilpoux O, Averous L. 2004. Starch-based plastics. Technology, use and potentialities of Latin American starchy tubers, 521-553.



2019-1-BG01-KA203-062371

Sin LT. 2012. Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications. William Andrew.

Koh JJ, Zhang X, He C. 2018. Fully biodegradable Poly (lactic acid)/Starch blends: A review of toughening strategies. International journal of biological macromolecules, 109: 99-113.

Poltronieri P, Kumar P. 2017. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in industrial applications. Handbook of Ecomaterials. Cham: Springer International Publishing, 1-30.



Project website: www.digit-biotech.eu

The European Commission's support for the production of this publication does not constitute an endorsement of the contents, which reflect the views only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.