

# Endbericht

## Akkumulation und schadstoffarme Verfügbarmachung von Bio-P aus Klärschlamm

Aktenzeichen 32062/01-32



Projektlaufzeit: 01.02.2015 – 31.01.2017  
Projektleiter: Prof. Dr. Susann Müller  
Arbeitsgruppe Flow Cytometry  
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ  
Verfasser: Dr. Susanne Günther  
Datum: 24.01.2017

**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



Az	<b>32062/01-32</b>	Referat	<b>32</b>	Fördersumme <b>124.252 €</b>
----	--------------------	---------	-----------	------------------------------

**Antragstitel**                      **Akkumulation und schadstoffarme Verfügbarmachung von Bio-P aus Klärschlamm**

**Stichworte**

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
<b>2 Jahre</b>	<b>01.02.2015</b>	<b>31.01.2017</b>	

Zwischenberichte	31.01.2016
------------------	------------

<b>Bewilligungsempfänger</b>	Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ, Department Umweltmikrobiologie 04318 Leipzig	Tel	++49 (0)341 235 1318
		Fax	++49 (0)341 235 1351
		Projektleitung	Prof. Dr. Susann Müller
		Bearbeiter	Dr. Susanne Günther

**Kooperationspartner**      CENTEC  
Gesellschaft für Labor- und Prozessmesstechnik mbH  
63477 Frankfurt-Maintal

***Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens***

Phosphor ist eine nicht-erneuerbare Ressource, die weltweit knapp wird. Sein Einsatz erfolgt hauptsächlich in der Landwirtschaft als Dünger. Je nach Modell reichen die P-Reserven noch 50-330 Jahre. Die Qualität des geförderten Phosphors sinkt zunehmend, da der Anteil von Uran, Cadmium und anderen Schwermetallen zunimmt. Deshalb ist es das Ziel des Projektes, Phosphor aus dem Klärschlamm einer Kläranlage zurückzugewinnen. Dabei soll die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (aus Endführungen von Brauereien) als Phosphatakkumulierer eingesetzt werden. Die mit Phosphor angereicherten, schadstoffarmen Hefen können als biologischer Phosphatdünger und zur Verbesserung der Bodenqualität eingesetzt werden.

***Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden***

Für eine Rückgewinnung des Phosphors aus der Kläranlage muss der Phosphor zunächst aus dem Schlamm rückgelöst werden. Die idealen Bedingungen dafür sind zu untersuchen. Der rückgelöste Phosphor wird im nachfolgenden Schritt von den Hefezellen aufgenommen. Dafür werden zwei Laborreaktoren etabliert: ein A-Reaktor für die Rücklösung und Überführung des Phosphors aus dem Schlamm der Kläranlage in die wässrige Phase und ein H-Reaktor für die Refixierung des Phosphors aus der wässrigen Phase des A-Reaktors (AP1 und AP2). Neben dem Phosphorgehalt der wässrigen Phase und der Hefezellen soll der Einfluss anderer Parameter auf die Akkumulation des Phosphors in der Biomasse wie Sauerstoff, pH, Temperatur und Durchmischung bestimmt werden (AP 2 und AP3). Die Speicherung des Phosphors in den Hefezellen soll zum einen auf Einzelzellbasis mittels Durchflusszytometrie und zum anderen durch eine Ultraschallsonde des Kooperationspartners Centec verfolgt werden. Die gewonnene P-reiche Hefe soll auf ihre Eignung als Dünger geprüft werden (AP4 Düngemitteltests, Schadstoff- und Pathogenbelastung). In der Kläranlage werden über einen Zeitraum von mehreren Monaten die Phosphorkonzentrationen im Überschussschlamm verfolgt (AP5). Die Effizienz in der Phosphatakkumulation aus dem verfügbaren Phosphorgehalt im ÜSS und die Eignung als Düngemittel werden eingeschätzt (AP6).

## **Ergebnisse und Diskussion**

Alle in diesem Projekt gewonnenen Ergebnisse zeigen die gute Eignung des Verfahrens für die schadstoffarme Düngemittelproduktion. Der im Überschussschlamm der Kläranlage als Polyphosphat gebundene Phosphor kann ohne Energieeintrag und pH-Wert-Änderung unter anaeroben Bedingungen innerhalb von 48h zurückgelöst werden. Dabei werden Rücklösequoten von 20 bis über 45% des P-Gehaltes der Frischmasse erreicht (im Mittel: 34%). Die erzielte Rücklösung ist dabei hauptsächlich abhängig von der Menge der eingelagerten Polyphosphate. Die Refixierung des Phosphors in den Hefen erfolgt unter aeroben Bedingungen innerhalb von 2 h. Es werden bis zu 88% des rückgelösten Phosphors entfernt und in den Hefezellen gespeichert. Die Menge des aufgenommenen Phosphors ist hauptsächlich abhängig von der verfügbaren Phosphorkonzentration der Lösung. Die P-angereicherten Hefen haben eine Düngewirkung, die sich mit der des mineralischen Düngers Superphosphat vergleichen lässt. Dies wurde sowohl an Mais, als auch an Sommergerste getestet. Die in den Hefen enthaltenen Schwermetallkonzentrationen liegen unterhalb der Nachweisgrenze und auch Salmonellen konnten durch ein externes Labor im Hefeprodukt nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchung der P-Aufnahme in die Hefen erfolgte konventionell durch photometrische P-Bestimmung in Lösung und Biomasse und durch zytometrische Polyphosphatbestimmung. Zusätzlich dazu wurden Sensoren der Firma Centec getestet. Sowohl der getestete Ultraschall-, als auch der Dichtesensor zeigen Veränderungen im Phosphorgehalt der Testlösungen und erlauben damit eine chemikalienfreie P-Bestimmung zur Überwachung des Prozesses.

## **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

Es ist geplant, die erhaltenen Ergebnisse in einer nationalen Zeitschrift (beispielsweise in der Zeitschrift *KA Korrespondenz Abwasser, Abfall* der Deutschen Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.) zu publizieren. Ebenso werden die Ergebnisse im Rahmen der Frontiers International Conference on Wastewater Treatment (21-24 Mai 2017 – Palermo, Italien) vorgestellt. Weiterhin werden die Ergebnisse in einem halb-öffentlichen Vortrag (UMB-Forschungstag) am 06.04.2017 vorgestellt. Eine Patenteinreichung wird derzeit durch die UFZ-Administration geprüft.

## **Fazit**

Die Ergebnisse aus dem Projekt zeigen, dass die vorgestellte Methode eine Rückgewinnung des Phosphors aus dem Wässern und Schlämmen einer Kläranlage mit biologischer Phosphatelimination ermöglicht. Der dabei gewonnene Dünger ist nachweislich gut pflanzenverfügbar und schadstofffrei. Somit bietet die Methode eine Möglichkeit, die Rückgewinnung von Phosphor überall dort zu betreiben, wo es z.B. durch eine nahegelegene Brauerei kostengünstige Resthefen gibt. Zur Überwachung des Prozesses wurden die von der Firma Centec entwickelten Sensoren positiv getestet. Die Sensoren sind in der Lage auf Basis von Ultraschall und Dichte verschiedener Lösungen zu charakterisieren und den Phosphorgehalt zu bestimmen.

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Kurzzusammenfassung	1
2. Anlass und Zielsetzung des Projekts	2
2.1 Phosphor als Rohstoff	2
2.2 Lösungsansatz	2
3. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden	5
4. Ergebnisse der Arbeitsschritte	6
4.1 (I) Akkumulation und Freisetzung von Phosphor	6
4.1.1 Freisetzung von Phosphor aus dem Überschussschlamm im Laborreaktor	7
4.1.2 Akkumulation von Phosphor in der Biomasse verschiedener Klärstufen	8
4.2 (II) Akkumulation von Phosphor in Hefezellen aus dem Brauprozess	13
4.3 (III) Bestimmung der Phosphorkonzentration über Sensoren der Firma Centec (Teilprojekt 2)	16
4.3.1 Schallsensor mit kurzer Schallgabel	16
4.3.2 Schallsensor mit langer Schallgabel	24
4.4 (IV) Bewertung der Düngemittelqualität	27
4.5 (V) Einschätzung der Ergebnisse aus der Refixierung und der Düngemitteluntersuchung	31
5. Diskussion der Ergebnisse	32
6. Öffentlichkeitsarbeit	33
7. Fazit	33
8. Literaturangaben	34

## Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1.	Rückgewinnungsverfahren eingeteilt nach den Ausgangsstoffen und Vorbehandlung	3
Abbildung 2.	Schema der Phosphatakkumulation im Labormaßstab.	4
Abbildung 3.	Schematischer Aufbau der Polyphosphatketten durch verknüpfte <i>ortho</i> -Phosphateinheiten.	6
Abbildung 4.	Polyphosphataufbau und -abbau in Mikroorganismen unter den jeweiligen Umweltbedingungen (aerob bzw. anaerob).	6
Abbildung 5.	Freisetzung des Phosphors aus dem Überschussschlamm der Kläranlage in den Überstand zwischen 0 h und 48 h.	7
Abbildung 6.	Einfluss verschiedener Parameter auf die Rücklöseeffizienz aus Überschussschlamm der Kläranlage Eilenburg.	8
Abbildung 7.	Aufbau der Kläranlage in Eilenburg.	9
Abbildung 8.	Anteile der Polyphosphatakkumulierer an unterschiedlichen Stationen der Abwasserreinigung.	11
Abbildung 9.	Gesamtphosphorgehalt im Faulturm und Gehalt an Polyphosphat-akkumulierenden Organismen (PAOs) in der Belebungsstufe (Oktober/November 2016).	11
Abbildung 10.	Korrelationen der PAO-Anteile mit verschiedenen abiotischen Parametern.	12
Abbildung 11.	Refixierung des in der Lösung vorhandenen Phosphors durch die Hefen zwischen 0 und 3,2 h.	14
Abbildung 12.	Korrelationsanalyse (Spearman) der P-Aufnahme durch Hefezellen und verschiedener abiotischer Parameter.	14
Abbildung 13.	Zusammenhang zwischen Refixierungseffizienz der Hefezellen und dem P-Gehalt der Lösung.	15
Abbildung 14.	Vergleich des Ultraschallsensors Sonatec mit kurzer Schallgabel (1,5 cm; links) und dem Prototypen des neues Schallsensors mit langer Schallgabel (5 cm, rechts).	16
Abbildung 15.	Versuchsanordnung mit eingebundenen Sensoren.	17
Abbildung 16.	Links: Schallgeschwindigkeit, rechts: Dichte jeweils mit und ohne Temperaturkompensation.	18
Abbildung 17.	Änderung der Schallgeschwindigkeit bei Konzentrationsänderung des gelösten Stoffes am Beispiel von Ethanol.	18
Abbildung 18.	Schallgeschwindigkeit und Dichte verschiedener Lösungen.	19
Abbildung 19.	Schallgeschwindigkeit und Dichte verschiedener Lösungen.	20
Abbildung 20.	Zytometrische Messung des Polyphosphatgehaltes zum Zeitpunkt 4a und 4b.	20
Abbildung 21.	Stufenversuch mit verschiedenen Konzentrationen an $\text{KH}_2\text{PO}_4$ in Leitungswasser.	24
Abbildung 22.	Änderungen in Schallgeschwindigkeit und Dichte von verschiedenen Lösungen.	25
Abbildung 23.	A) Stufenversuch mit Leitungswasser unter Phosphorzugabe. B) Eichgeraden für die Schallgeschwindigkeit und die Dichte	26
Abbildung 24.	Überblick über das Wachstum von Mais und Sommergerste im Vergleich mit dem Mineraldünger Superphosphat ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ) und der ungedüngten Kontrolle (K).	28
Abbildung 25.	Wachstum, Inhaltsstoffe und Nährstoffentzug aus dem Boden für Mais gedüngt mit Hefedünger und Mineraldünger in 3 unterschiedlichen Konzentrationsstufen.	29
Abbildung 26.	Ergebnisse des Düngerversuches mit Hefe-P auf leicht saurem Boden (pH 5,8).	30

## Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1.	Phosphorgehalt der Schlämme und Wässer der Kläranlage Eilenburg in den Monaten Oktober und November 2016.	10
Tabelle 2.	Zusammenfassung des in Abbildung 19 gezeigten Versuches.	21
Tabelle 3a.	<i>P</i> -Werte für die (gemittelte) Dichte nach Student's t-Test (zweiseitig, homoskedastisch).	22
Tabelle 3b.	<i>P</i> -Werte für die (gemittelte) Schallgeschwindigkeit nach Student's t-Test (zweiseitig, homoskedastisch).	23
Tabelle 4.	Zusammenfassung des in Abbildung 24 gezeigten Versuches.	24
Tabelle 5.	Schadstoff- und Pathogenkonzentrationen in 3 Düngemittelproben	31
Tabelle 6.	Theoretisch verfügbarer Phosphor an verschiedenen Stellen der Kläranlage.	32

## Abkürzungsverzeichnis

AbklärV	Klärschlammverordnung
AP	Arbeitspaket
Bel	Belebung
BTM	Biotrockemasse
Dref	Referenzdichte
DWA	Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
EW	Einwohnergleichwert
FT	Faulturm
GAOs	Glycogen-akkumulierende Organismen
Gef.	Gefäß
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
NKB	Nachklärbecken
OD	optische Dichte
P	Phosphor
PAC	Polyaluminiumchlorid
PAO	Polyphosphat-akkumulierende Organismen
Pges.	Gesamtphosphor
Redox	Redoxpotential
RLS	Rücklaufschlamm
rpm	Umdrehungszahl pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
Sref	Referenzschallgeschwindigkeit
T	Temperatur
TM	Trockenmasse
Tref	Referenztemperatur
Trüb	Trübwasser
TS	Trockensubstanz
U	Uran
ÜSS	Überschussschlamm
VKB	Vorklärbecken

## 1. Kurzzusammenfassung

Ziel des Teilprojektes war es, Phosphor aus dem Klärschlamm einer mit biologischer Phosphateliminierung arbeitenden Kläranlage zurückzugewinnen. Dabei sollte *Saccharomyces cerevisiae* (aus Endführungen von Brauereien) als Phosphatakkumulierer eingesetzt werden. Die mit Phosphat angereicherten Hefen können als biologischer Phosphatdünger und zur Verbesserung der Bodenqualität eingesetzt werden.

Wichtige Parameter für eine optimale Freisetzung des Phosphors aus Überschussschlamm (ÜSS) sind die Verweilzeit, der Sauerstoffeintrag, der pH-Wert und die bereits in der Biomasse vorliegende Menge an Phosphor. Für die Refixierung des Phosphors durch die Hefezellen ist es neben der Verweilzeit, dem Sauerstoffeintrag und der Vermehrung hauptsächlich die Phosphorkonzentration der Lösung, die Einfluss auf die Effizienz der Refixierung nimmt. Die Düngewirkung der Hefen zeigte in Gefäßversuchen mit Mais und Sommergerste mit dem Mineraldünger Superphosphat vergleichbare Werte sowohl hinsichtlich der Ertragswerte, als auch in der Nährstoffzusammensetzung der geernteten Pflanzen und der Nährstoffaufnahme der Pflanzen über die Kultivierungsdauer. Schadstoffe (Schwermetalle) und Pathogene (Salmonellen) wurden in den zur Untersuchung an ein externes Labor eingeschickten Düngemittelproben nicht nachgewiesen. Bei der Untersuchung der Aktivität der phosphatakkumulierenden Organismen in der Kläranlage wurde festgestellt, dass neben dem Anteil an Brauereiabwasser vorwiegend die internen Phosphorkonzentrationen der einzelnen Behandlungsstufen ausschlaggebend für den Anteil der aktiv Polyphosphat-speichernden Mikroorganismen sind.

Die im Teilprojekt 2 zu testenden Sonden der Firma Centec für die chemikalienfreie Überwachung des P-Aufnahmeprozesses waren ebenfalls erfolgreich. Nach erfolgter Temperaturkompensation können sowohl mit dem Ultraschall-, als auch mit dem Dichtesensor verschiedene Lösungszusammensetzungen unterschieden und deren Phosphorkonzentration bestimmt werden.

## 2. Anlass und Zielsetzung des Projekts

### 2.1 Phosphor als Rohstoff

Phosphor ist ein lebensnotwendiger Rohstoff und essentieller Bestandteil aller Lebewesen. Sein Einsatz erfolgt hauptsächlich in der Landwirtschaft als Dünger. Phosphor ist eine nicht-erneuerbare Ressource, die weltweit knapp wird. Je nach Modell reichen die P-Reserven noch 50-330 Jahre. Die Qualität des geförderten Phosphors wird als zunehmend nachlassend bezeichnet, da der Anteil von Uran, Cadmium und anderen Schwermetallen zunimmt. Dies bewirkt eine Erhöhung der Aufbereitungskosten. Unabhängig davon enthalten Handelsdünger wie Superphosphat bzw. Triple-Superphosphat inzwischen Spitzenwerte von 172 mg U/kg 208 mg U/kg Dünger (Dienemann und Utermann, 2012). Diese hohen Zahlen weisen neben der Verknappung der Phosphorressourcen darauf hin, dass dringend Alternativen gefunden werden müssen. Nach Literaturangaben wäre es möglich, mindestens 40% des Düngebedarfs in Deutschland durch P-Rückgewinnung zu decken (Montag, 2008). Besonders aussichtsreich ist die Rückgewinnung aus Kläranlagen, da dort Phosphat täglich verfügbar ist ( $\sim 2 \text{ g P}_{\text{ges}}/\text{EW} \cdot \text{d}$ ; Montag, 2008). Die direkte Ausbringung P-reichen Klärschlammes als Dünger in der Landwirtschaft wird jedoch durch die Klärschlammverordnung (AbfKlärV) streng geregelt und ist in Zukunft keine Option mehr, insbesondere wegen der hohen Schwermetallbelastung von Klärschlamm, dem Vorhandensein von pathogenen Organismen und, zunehmend, das Vorhandensein von biologisch aktiven Stoffen wie Antibiotika und endokrinen Substanzen. Hinzu kommt noch, dass mit der neuen Klärschlammverordnung, die vermutlich 2018 in Kraft treten wird, ein weiterer Schritt in Richtung verpflichtende Phosphorrückgewinnung getan wird. Alle Betreiber von Kläranlagen mit mehr als 50.000 angeschlossenen Einwohnern müssen spätestens 12 Jahre nach Inkrafttreten der Verordnung eine P-Rückgewinnung durchführen bzw. durchführen lassen, wenn der Phosphorgehalt im Klärschlamm 20 g/kg Trockensubstanz übersteigt (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit, 2016). Da dies auf die Betreiber der meisten kommunalen Kläranlagen der Ausbaustufe 4b (>50.000 EW) und größer zutrifft (mittlerer P-Gehalt im Klärschlamm: 27,3 g/kg P bzw. 62,7 g/kg  $\text{P}_2\text{O}_5$ ; Hoffmann, 2008), müssen Lösungen geschaffen werden, die technisch einfach und kostengünstig umzusetzen sind. Denn für die derzeit favorisierte Methode der Klärschlammmonoverbrennung fehlen derzeit die Kapazitäten um alle Klärschlämme behandeln zu können (DWA, 2015).

### 2.2 Lösungsansatz

Die Eliminierung von Phosphor aus Klärschlamm ist Bestandteil des Reinigungskonzeptes von Abwasser, welches in die Umwelt erst wieder eingeleitet werden kann, wenn ein Wert von 1-2 mg/l (Anlagen der Größenklasse 5 bzw. 4 mit mehr als 100.000 bzw. 10.000 angeschlossenen EW) nicht überschritten wird. Phosphor wird dabei im Wesentlichen als Phosphat über chemische Fällungsreaktion mittels Fe-, Al- und Ca-Ionen (z.B. mittels  $\text{FeCl}_3$  oder Polyaluminiumchlorid (PAC)) dem Abwasser entzogen. Bei der ökologisch verträglicheren Alternative, der biologischen Eliminierung von Phosphat, wird Phosphat dem Abwasser durch Mikroorganismen entzogen und gespeichert (Jardin und Pöpel, 1996). Eine Akkumulation kann sowohl unter bevorzugt aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen stattfinden (z.B. denitrifizierende Bakterien, Günther *et al.*, 2012). *On-line* Überwachungsmethoden zur Phosphatakkumulation sind bisher nicht verfügbar, daher ist eine effektive Steuerung/Modellierung der biologischen Akkumulation bisher nicht durchgeführt und auch aus dem Labormaßstab nicht bekannt.

Phosphor wird auf den Kläranlagen nicht nur aus dem Abwasser entfernt, sondern kann dort auch für eine Wiederverwertung zurückgewonnen werden. Abbildung 1 zeigt den aktuellen Stand der in der Literatur beschriebenen Rückgewinnungsverfahren, sowie deren Ausgangsstoffe und Produkte, die bei der Verarbeitung von Klärschlämmen bzw. Aschen einer Kläranlage eingesetzt werden. Bislang sind nur Verfahren im großtechnischen Maßstab erprobt, die Phosphor mit einer Effizienz von 10-30% bezogen auf den Kläranlagenzulauf aus Klärschlamm und Zentrat des Klärschlammes zurückgewinnen (siehe Abbildung 1, grün markiert, Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2015). Alle anderen aufgeführten Verfahren (gelbgrün und gelb markiert) sind vorerst im halbtechnischen bzw. Labormaßstab erprobt.

	anaerobe Rücklösung	AirPrex <sup>®1</sup>	NuReSys <sup>®1</sup>	PHOSPAQ <sup>TM1</sup>	Phostrip <sup>1,2</sup>	
Schlamm	Laugung	Crystalactor <sup>®2</sup>	Seaborne <sup>1,2</sup>	Stuttgarter Verfahren <sup>1</sup>	Budenheim Verfahren <sup>2</sup>	
	thermisch	EuPhoRe <sup>3</sup>	LysoPhos <sup>1</sup>	Mephrec <sup>®2</sup>	KREPRO <sup>4</sup>	
	Adsorption	FixPhos <sup>1,2</sup>				
Zentrat	Kristallisation	P-RoC <sup>1,2</sup>	PEARL <sup>®1</sup>			
Asche	unbehandelt	sePura <sup>*</sup>				
	Laugung	CleanMAP <sup>®1</sup>	LeachPhos <sup>2</sup>	PASCH <sup>2,5</sup>	P-Bac <sup>2,4</sup>	RecoPhos <sup>®*</sup>
	thermisch	ASH DEC <sup>*</sup>				

Abbildung 1. Rückgewinnungsverfahren eingeteilt nach den Ausgangsstoffen und Vorbehandlung. (Quelle: Abbildung nach Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2015, S. 27 und 29; sowie Remy C., Kabbe C. Übersicht der Umsetzung von Verfahren in Europa – Erfahrungen aus P-REX. Kompetenzzentrum Wasser Berlin, Bonn, 09. Oktober 2013). Grün markierte Verfahren befinden sich im Vollmaßstab, blaue im halbtechnischen Maßstab und orange dargestellte im Labormaßstab. Art des Rezyklats: <sup>1</sup>MAP, <sup>2</sup>Ca-P, <sup>3</sup>K-P, <sup>4</sup>Fe-P, <sup>5</sup>Al-P, \*P-Asche

Die erste Innovation des Projektes liegt in der Speicherung des aus Klärschlamm zurückgelösten Phosphors in ökologisch unbedenklichen Mikroorganismen anstelle einer chemikalienintensiven Ausfällung. Diese Mikroorganismen sollten aufgrund ihrer Herkunft (Lebensmittelverarbeitung) und der Prozessführung von Schadstoffen und pathogenen Keimen weitestgehend getrennt werden, um einen wertvollen organischen Dünger zur Verfügung zu stellen. Durch die technisch einfach ausführbare Rücklösung des im Überschussschlamm gebundenen Phosphors unter anaeroben Bedingungen wird der Phosphor in eine Form gebracht, in der er durch andere Organismen aufgenommen und gespeichert werden kann. Für diese Speicherung wurden Resthefen aus dem Brauprozess eingesetzt, eine Reinkultur also, die in Ihrer Beschaffung preisgünstig und deren ökologische Unbedenklichkeit mehrfach untersucht wurde (Shalaby und El-Nady, 2008; Botha, 2011; Cordero-Bueso *et al.*, 2011). Da bei diesem Prozess einerseits keine chemische Fällung erfolgt und andererseits der Schlamm in den Phosphateliminierungsprozess nicht einbezogen wird, wurde erwartet, dass die Schwermetallbelastung des potentiellen Phosphordüngers sehr niedrig ist.

Die zweite Innovation betrifft die wissensbasierte Steuerung von Abwasser-Anlagen über neue einzelzellbasierte/bioinformatische Tools sowie über Neuentwicklungen in der Sensortechnik (Firma Centec), wobei insbesondere Bedingungen zur gezielten Phosphatakkumulierung in Abhängigkeit von der Qualität des eingehenden Abwassers eingestellt werden sollen. Centec wollte in diesem Zusammenhang einen Ultraschallsensor testen bzw. weiterentwickeln, der *on-line* und ohne Einsatz von Chemikalien die Veränderung der Phosphorkonzentration in Lösungen und damit auch die Phosphataufnahme in Mikroorganismen messen soll. Eine exakte Messung biotischer und abiotischer Datensätze ist für die effektive Steuerung komplexer biotechnischer Prozesse wie der Abwasserreinigung in Kombination mit den cytometrischen Tools essentiell.

Um die Rückgewinnung von Phosphor aus Klärschlamm mit Hilfe von *Saccharomyces cerevisiae* als Phosphatakkumulierer zu untersuchen, wurde ein Labor bench-top Reaktorsystem etabliert (Abb. 2). Im Reaktor A (A = Abwasser: Rücklösung des Phosphors) wurde der im Überschussschlamm angereicherte Phosphor wieder in Lösung gebracht. Der zurückgelöste Phosphor wurde danach in den Reaktor H (= Hefe: Refixierung des Phosphors) überführt, in dem die Brauhefen den Phosphor zellulär akkumulieren.

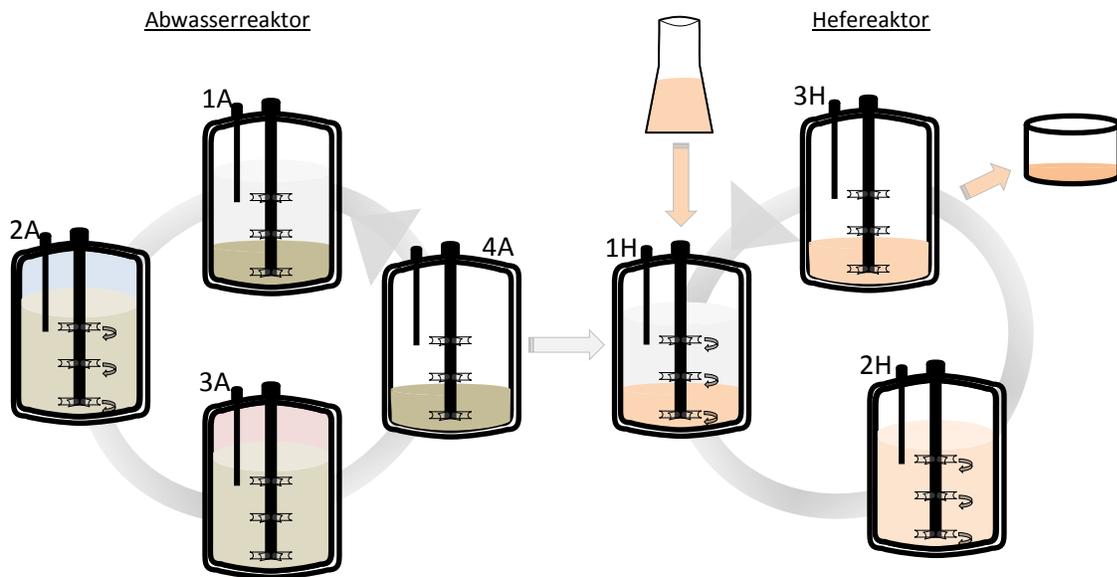


Abbildung 2. Schema der Phosphatakkumulation im Labormaßstab. Die Anlage besteht aus zwei Reaktoren. Im Abwasserreaktor (A) befindet sich der Überschussschlamm, bestehend aus der phosphorreichen mikrobiellen Gemeinschaft des Belebungsbeckens der Kläranlage. Ohne Belüftung wird der Phosphor von den Mikroorganismen an den Überstand abgegeben. Dieser Phosphor-haltige Überstand wird dann in den zweiten Reaktor (H) übertragen und während der Belüftungsphase von den Hefezellen intrazellulär gespeichert. Die Phosphor-angereicherten Hefen können anschließend geerntet werden.

Die in dem Projekt untersuchte Methode zur Phosphatrückgewinnung bietet eine Reihe von Vorteilen:

1. Der pH wird nicht künstlich verändert, so dass die Prozessabwässer bedenkenlos in die Belebungsstufe der Kläranlage zurückgeleitet werden können.
2. Es wird eine Reinkultur genutzt, deren Pflanzenverträglichkeit und ökologische Unbedenklichkeit mehrfach untersucht wurde.
3. Die Schadstoffbelastung des hergestellten organischen Düngers ist sehr gering.

4. Ebenso werden keine zusätzlichen Chemikalien benötigt.
5. Ein weiterer Vorteil ist die Einbindung in den normalen Betriebsablauf der Kläranlage, die es erlaubt, noch vor dem Eindickungsschritt des Überschussschlammes das Phosphat zu gewinnen. Dies führt zu einer verbesserten Eindickung des Schlammes und zu einem geringeren Polymerverbrauch. Polyphosphate bestimmen zusammen mit dem pH-Wert die Struktur der sogenannten Hydrogele in den Belebtschlammflocken. Hydrogele werden durch die extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS, bestehend hauptsächlich aus langkettigen Polysaccharid- und Proteinverbindungen) gebildet. Je stärker die Hydrogele ausgebildet sind, desto schlechter wird die Eindickung. Bei Verringerung der Phosphatkonzentration kann der Schlamm besser eingedickt werden (bis zu 5% mehr TS). Dies spart Polymere, die für die Eindickung notwendig sind (Kopp, 2009). Außerdem wird die Phosphatbelastung der methanogenen Behandlungsstufe gesenkt, was sich nach bisherigen Erkenntnissen positiv auf die Stabilität und Effizienz der Methangasbildung auswirken sollte.

### 3. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Die Rückgewinnung von Phosphat aus Klärschlamm mit Hilfe von mikrobiologischen Phosphatakkumulierern sollte in diesem Projekt untersucht werden. In 3 Schritten soll das Verfahren untersucht und optimiert werden.

- (I) Für eine Rückgewinnung des Phosphors aus der Kläranlage musste das Potential der im ÜSS enthaltenen Mikroorganismen zur Freisetzung getestet werden. Es sollten die Parameter gefunden werden, mit denen sich auf der Kläranlage die Akkumulation des Phosphors in den ÜSS (AP5) und die Freisetzung des Phosphors im Laborreaktor (A-Reaktor) maximieren lässt (AP2 und AP3).
- (II) Die Akkumulierung des freigesetzten Phosphors durch Brauhefen wurde durch Überführung des Phosphat-angereicherten ÜSS-Überstandswassers in einen zweiten Reaktor (H-Reaktor) initiiert. Eine Optimierung der Phosphatrefixierung durch die Hefezellen wurde angestrebt (AP1 und AP2). Neben dem Phosphatgehalt der wässrigen Phase und der Zellen (ÜSS-Überstand bzw. Hefezellen) sollte dabei auch der Einfluss anderer Parameter wie Sauerstoff, pH, Temperatur und Durchmischung bestimmt werden (AP2 und AP3).
- (III) Die direkte Speicherung des Phosphors in den Zellen sollte zum einen auf Einzelzellbasis mittels Durchflusszytometrie verfolgt werden und zum anderen durch eine Sensorkombination aus Ultraschall- und Dichtesensor des Kooperationspartners Centec über die Änderung des Phosphorgehaltes im Medium.
- (IV) Im Anschluss an die Etablierung beider Reaktoren sollte die gewonnene P-reiche Hefe auf ihre Eignung als Dünger geprüft werden (AP4 Düngemitteltests, Untersuchung von Schadstoff- und Pathogenbelastung).
- (V) Im Anschluss an die Versuche sollte die Effizienz des Prozesses und Eignung als Düngemittel eingeschätzt werden (AP6).

#### 4. Ergebnisse der Arbeitsschritte

##### 4.1 (I) Akkumulation und Freisetzung von Phosphor

Die beprobte Kläranlage eliminiert Phosphor hauptsächlich über die erweiterte biologische Phosphatelimination. Hierbei wird der im Wasser enthaltene Phosphor in Mikroorganismen aufgenommen und unter Energiefreisetzung in Form von Polyphosphaten (Abbildung 3) gespeichert.

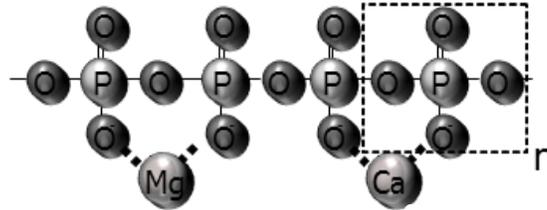


Abbildung 3. Schematischer Aufbau der Polyphosphatketten durch verknüpfte *ortho*-Phosphateinheiten.

Polyphosphate sind Ketten aus *ortho*-Phosphateinheiten, die durch Anhydridbindungen kettenförmig miteinander verbunden sind. Die Länge der Ketten kann mehrere hundert Einheiten umfassen. Ihre negative Ladung wird durch divalente Kationen (Ca, Mg) ausgeglichen.

Die Synthese von Polyphosphaten erfolgt unter Verbrauch von Energie. Der Abbau der Polyphosphate setzt dagegen wiederum Energie frei. Aus diesem Grund gelten Polyphosphate als die evolutionär ältesten Energiespeicher von Zellen (Kulaev, 1997, Kulakovskaya *et al.*, 2015).

In der Abwasseraufbereitung wird die Fähigkeit verschiedener Mikroorganismen genutzt, Polyphosphate in großen Mengen einzulagern. Der normale Phosphorgehalt von Belebtschlamm beträgt ungefähr 1-2,5% der Zelltrockenmasse. Wenn die biologische Phosphorelimination angewandt wird, steigt dieser Anteil bis auf 15% (Blackall *et al.*, 2002). Mikroorganismen und auch Hefen sind in der Lage, Polyphosphate bis zu einem Anteil von 40% des Gesamtphosphatgehaltes und 10 bis über 35% der Zelltrockenmasse zu speichern (Moreno und Docampo 2013; Urech *et al.*, 1978; Vagabov *et al.*, 2000). Viele Kläranlagen nutzen die biologische Phosphorelimination, um Phosphor aus dem Abwasser zu entziehen. Allerdings bleibt der Phosphor nur unter aeroben Bedingungen intrazellulär gespeichert. Wenn die Zellen z.B. in der Schlammfäulung anaeroben Bedingungen ausgesetzt werden, kommt es zur Rücklösung der Polyphosphate und zur Freisetzung von *ortho*-Phosphat. Abbildung 4 zeigt schematisch die Akkumulation und die Rücklösung der Polyphosphate in Mikroorganismen.

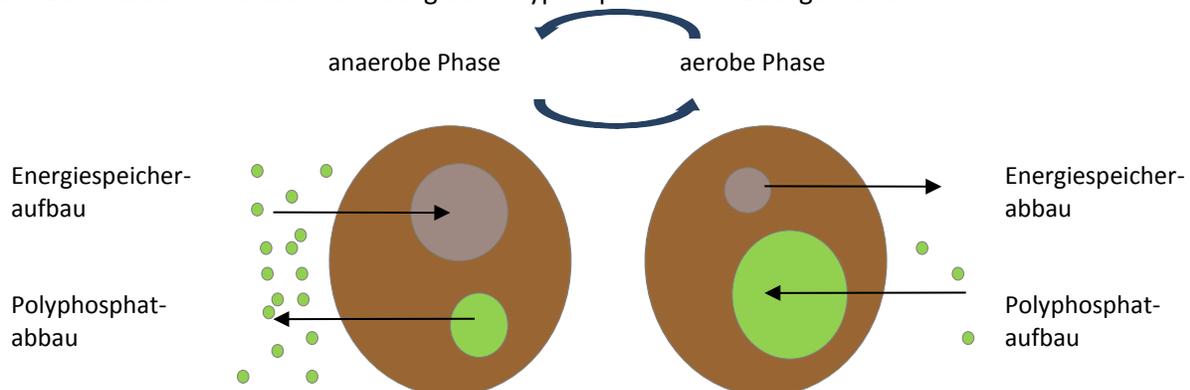


Abbildung 4. Polyphosphataufbau und -abbau in Mikroorganismen unter den jeweiligen Umweltbedingungen (aerob bzw. anaerob).

#### 4.1.1 Freisetzung von Phosphor aus dem Überschussschlamm im Laborreaktor

Der Aufbau der Polyphosphatspeicher erfolgt also zumeist unter aeroben Bedingungen, die Freisetzung unter anaeroben Bedingungen. Dies zeigten auch unsere Versuche. Eine maximale Freisetzung im A-Reaktor (siehe Abbildung 2) wird nach 48 Stunden erreicht, wenn folgende Bedingungen eingehalten werden: (I) Sauerstoffeintrag durch Belüftung wird vermieden, (II) Durchmischung wird auf das nötigste beschränkt (2x pro Tag für 1,5 bis max. 5 min ist ausreichend, um den rückgelösten Phosphor in den Überstand zu bringen), (III) es wird auf eine klare Trennung zwischen Überschussschlamm und dessen Überstand geachtet, bevor der Überstand entnommen wird. Der zeitliche Verlauf der Phosphorrücklösung ist beispielhaft in Abbildung 5 dargestellt. Weitere Informationen dazu sind im Zwischenbericht des Projektes zu finden (26.01.2016, DBU Projektnummer: 32062/01-32).

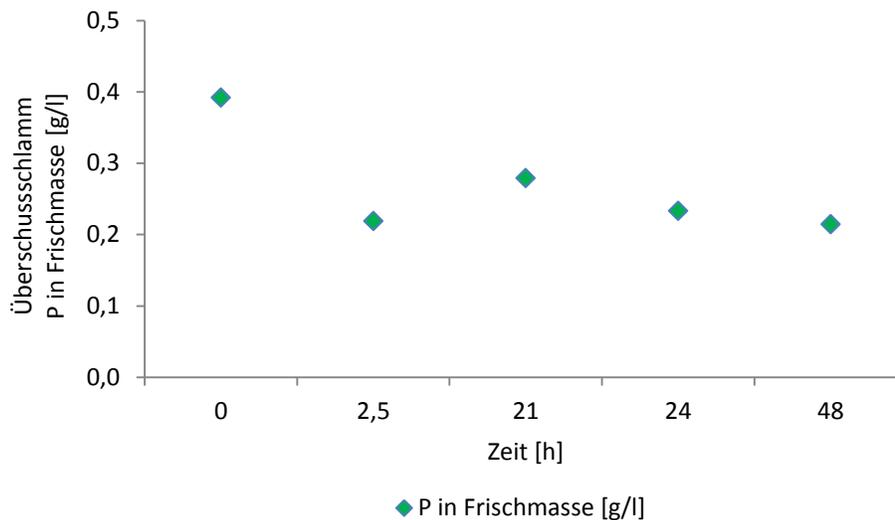


Abbildung 5. Freisetzung des Phosphors aus dem Überschussschlamm der Kläranlage in den Überstand zwischen 0 h und 48 h. Pro Tag wurde der Ansatz jeweils zwei Mal für 1,5 min durchmischt.

Der Gesamtphosphorgehalt des in Abbildung 5 gezeigten Überschussschlammes betrug 0,392 g/l P in Frischmasse Überschussschlamm (Werte für Juni 2015). Die Rücklösung des Phosphors aus dem Überschussschlamm nach 48 h betrug 0,178 g/l, d.h. 0,214 g/l P in Frischmasse verbleiben im Überschussschlamm. Das bedeutet, dass 45% des Phosphors zurückgelöst werden konnten. Das dürfte, gemessen am möglichen Gesamtpolyphosphatgehalt der mikrobiellen, meist bakteriellen Zellen (ca. 40%), der gesamte in den Zellen als Polyphosphat gespeicherte Phosphor sein (vgl. hierzu Vagabov *et al.*, 2000). Generell lag die Rücklöseeffizienz zwischen 23 und 48% mit einem Mittelwert von 33,19% ( $\pm 8,42$ ). Bei P-Gehalten in der Frischmasse von 0,125 bis 0,392 g/l (Mittelwert: 0,307 g/l;  $\pm 0,088$ ) konnten dabei zwischen 0,059 und 0,178 g/l Phosphor rückgelöst werden (Mittelwert: 0,094 g/l;  $\pm 0,024$ ).

Die Bedeutung weiterer Parameter außer Sauerstoffgehalt und Durchmischung für die Rücklöseeffizienz ist in der nachfolgenden Korrelationsanalyse gezeigt (Abbildung 6, Spearmans Rang-Korrelationskoeffizient).

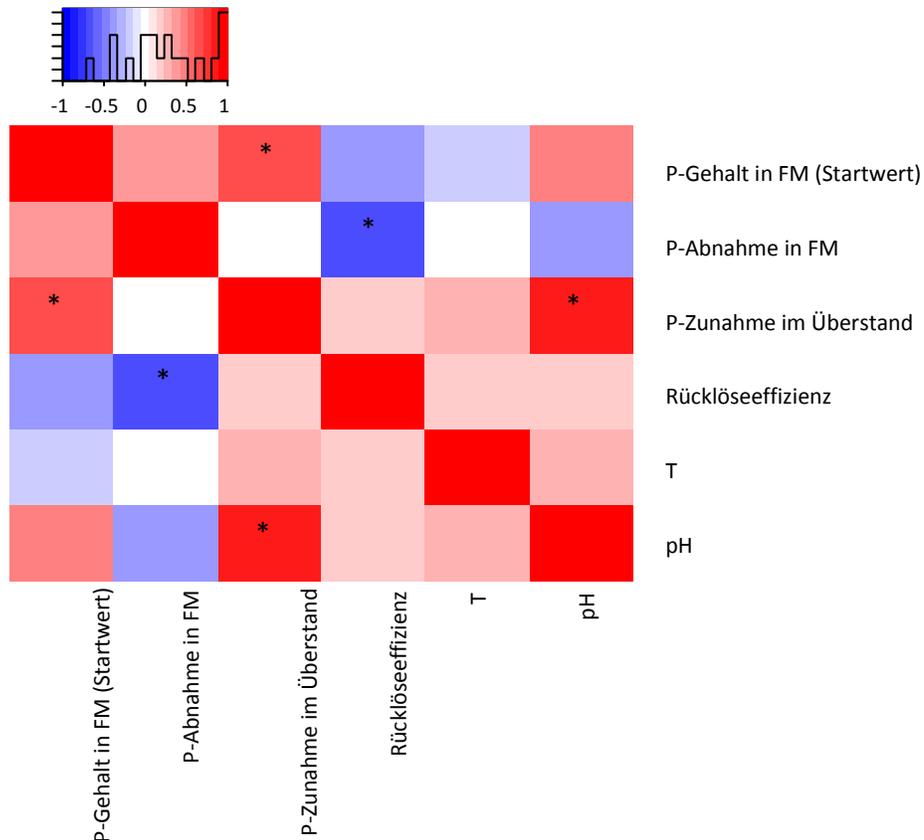


Abbildung 6. Einfluss verschiedener Parameter auf die Rücklöseeffizienz aus Überschussschlamm der Kläranlage Eilenburg. Rot deutet auf eine positive und blau auf eine negative Korrelation hin. Mit Sternen markierte Korrelationen sind statistisch signifikant ( $P$ -Wert unter 0,05). FM: Frischmasse, T: Temperatur

Wie zu erwarten war, korreliert die Rücklöseeffizienz negativ mit der Abnahme des P-Gehaltes in der Frischmasse des Überschussschlammes, denn je mehr Phosphor rückgelöst wird, desto weniger Phosphor ist in der Biomasse gespeichert. Positiv korreliert beispielsweise der Gehalt an Phosphor in der Frischmasse mit der Zunahme des rückgelösten Phosphors im Überstand (des A-Reaktors). Die Rücklösung ist auch pH-Wert abhängig. In den Versuchen wurde bei einem höheren pH auch eine erhöhte Rücklösung gemessen (pH 6-7,6). Die Temperatur hingegen hat nur einen geringen und in diesen Versuchen nicht signifikanten Einfluss auf die Rücklöseeffizienz.

#### 4.1.2 Akkumulation von Phosphor in der Biomasse verschiedener Klärstufen

Für die Untersuchung der Aktivität der polyphosphatakkumulierenden Mikroorganismen (PAOs) in den Wässern und Schlämmen der Kläranlage in Eilenburg wurden verschiedene Klärstufen beprobt. Abbildung 7 zeigt zunächst den generellen Aufbau der Kläranlage und die Führung von Prozesswässern und-schlämmen.

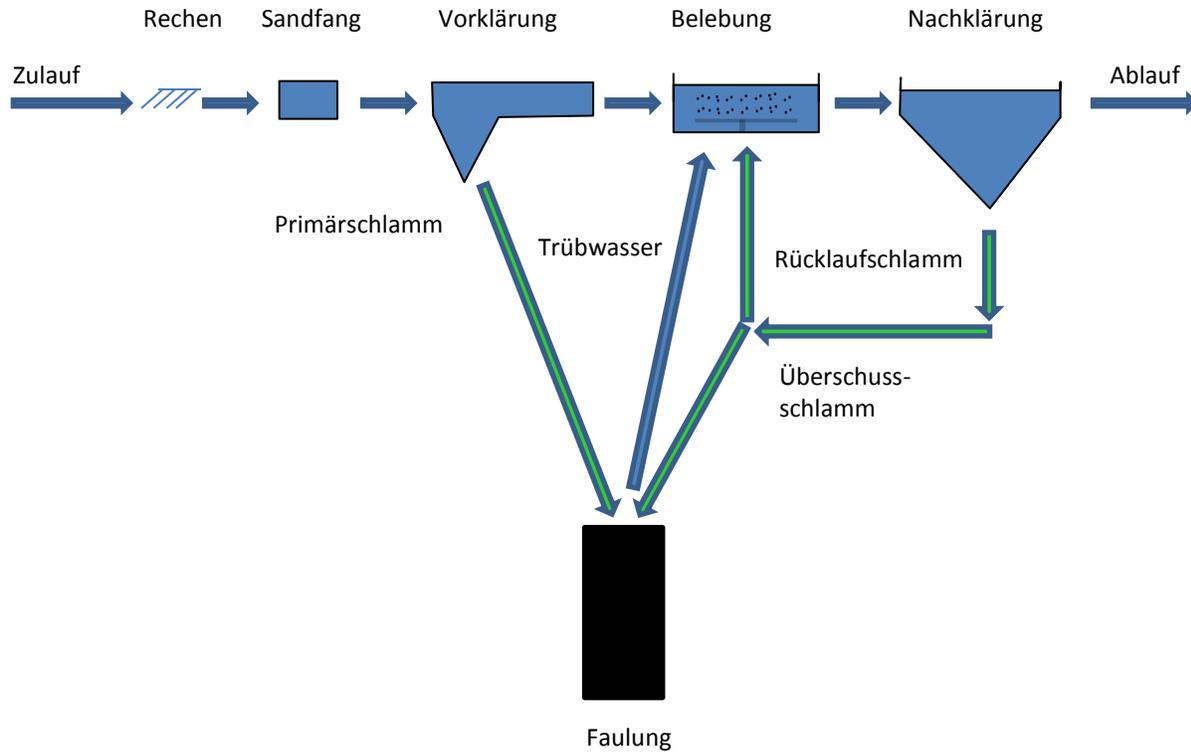


Abbildung 7. Aufbau der Kläranlage in Eilenburg. Das Belebungsbecken wird intermittierend belüftet (90 min Belüftung /90 min ohne Belüftung)

Nach der groben Reinigung des Abwassers durch Rechen und Sandfang wird das Abwasser in der Vorklärung von groben partikulären Stoffen gereinigt. Diese setzen sich ab und werden als Primärschlamm der Faulung zugeführt. Das Wasser wird in der Belebungsbecken dann von Nährstoffen gereinigt. Über das Nachklärbecken verlässt das gereinigte Wasser die Anlage, während die Mikroorganismen der Belebtschlammflocken im Nachklärbecken zurückgehalten werden. Ein Teil dieses Rücklaufschlammes wird wieder in der Belebungsbecken eingesetzt, der Rest als Überschussschlamm eingedickt und in die Faulung gegeben. Dort wird Methangas zur Energiegewinnung erzeugt. Das nach der Ausfäulung und Entwässerung des Schlammes anfallende nährstoffreiche Trübwasser wird in die Belebungsbecken zurückgeführt. Diese Fahrweise der Anlage verbunden mit der in der Belebungsstufe stattfindenden biologischen P-Eliminierung führt dazu, dass sich hohe Konzentrationen an Phosphor in der Anlage, und besonders in der Faulungsstufe befinden. Die jeweiligen Mengen an Phosphor sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1. Phosphorgehalt der Schlämme und Wässer der Kläranlage Eilenburg in den Monaten Oktober und November 2016. BTM: Biotrockenmasse, Überstand: Überstand nach Anzentrifugation, Pges.: Gesamtphosphor, Frischmasse: Pellet nach Anzentrifugation

	BTM [g/l]	BTM [kg/d]*	P in Überstand [g/l]	P in Frischmasse [g/l]	Pges. in BTM [g/kg]
Vorklärung	0,33 (± 0,26)	1.584	0,005 (± 0,002)	0,004 (± 0,001)	15,15
Belebung	4,28 (± 0,82)	34.240	0,003 (± 0,001)	0,092 (± 0,013)	21,49
Überschussschlamm	10,3 (± 0,62)	1.205,1	0,026 (± 0,009)	0,153 (± 0,013)	14,85
Faulturm	33,3 (± 2,74)	59.940	0,358 (± 0,073)	0,63 (± 0,132)	18,92
Trübwasser	0,8 (± 0,5)	41,6	0,074 (± 0,019)	0,032 (± 0,008)	40,0

\* Volumina für die Berechnung: Zulauf Vorklärung: 4800 m<sup>3</sup>/d, Volumen Belebung: 8000 m<sup>3</sup>, Anfall Überschussschlamm 117 m<sup>3</sup>/d, Volumen Faulturm: 1800 m<sup>3</sup>, Anfall Trübwasser: 52 m<sup>3</sup>/d, verwendeter Faktor Frischmasse/BTM: 10

Im Projekt sollte die Aktivität der polyphosphatakkumulierenden Organismen (PAOs) über einen längeren Zeitraum untersucht werden, um Einflüsse auf die Akkumulation untersuchen zu können. In einer vorangegangenen Studie wurde der Einfluss abiotischer Parameter auf die Anzahl bzw. Aktivität der PAOs für Sommermonate (mittlere Lufttemperatur = 18,5°C) untersucht (Günther *et al.*, 2012). In diesem Projekt wurden vor allem die Wintermonate (mittlere Lufttemperatur = 9,1°C) getestet, um auch für kalte Jahreszeiten Aussagen über die Effizienz der Akkumulation von Polyphosphaten zu bekommen. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen zunächst, dass jede beprobte Station eine unterschiedliche Anzahl an aktiven PAOs (=Zellen mit eingelagerten Polyphosphaten) aufwies (Abbildung 8). Die mit Abstand größte Zahl an Organismen mit eingelagerten Polyphosphaten befand sich im Belebungsbecken und im Überschussschlamm. Weit weniger Zellen waren dagegen im Vorklärbecken, im Trübwasser und im Faulturm vorhanden. Die geringere Anzahl z.B. im Faulturm bedeutet nicht, dass die Organismen selbst nicht mehr vorhanden sind, sondern dass die Organismen die Polyphosphate abgebaut haben.

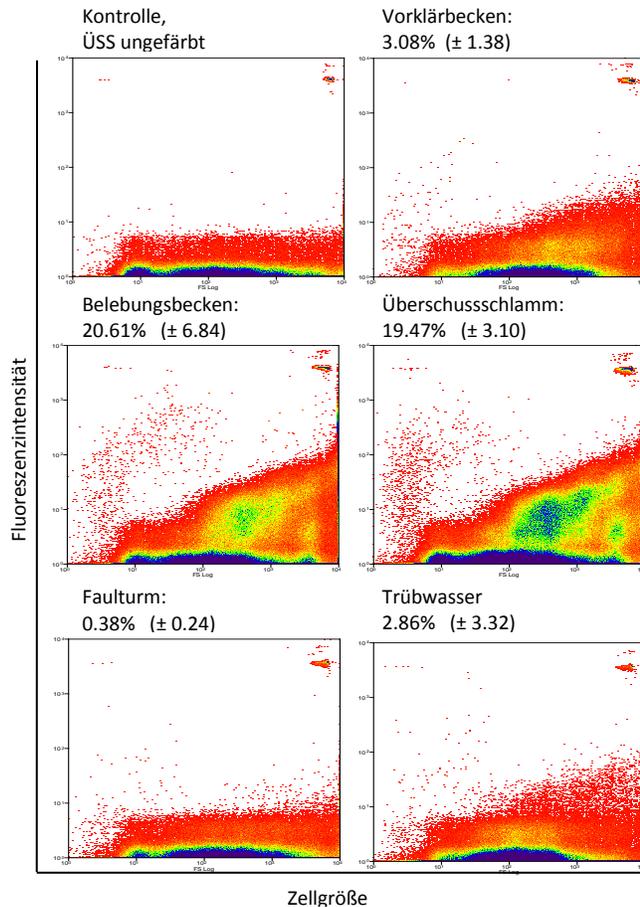


Abbildung 8. Anteile der Polyphosphatakkumulierer an unterschiedlichen Stationen der Abwasserreinigung. Die Zellen wurden mit Tetracyclin gefärbt, einem Farbstoff, der an Polyphosphate bindet und grün fluoresziert (Günther *et al.*, 2009). In der rechten oberen Ecke liegen jeweils Beads, die für die Kalibrierung der Messung erforderlich sind und als Fluoreszenzstandard dienen.

Beim Übergang vom Überschussschlamm zum Faulschlamm wird dies besonders deutlich. Aus dem aeroben Belebungsbecken kommend, haben sehr viele Mikroorganismen Polyphosphate eingelagert. Im anaeroben Faulturm werden diese unter Energiefreisetzung abgebaut. Je höher der Eintrag von Polyphosphat-akkumulierenden Organismen in den Faulturm ist, desto höher steigt dort auch der Phosphorgehalt an (Abbildung 9).

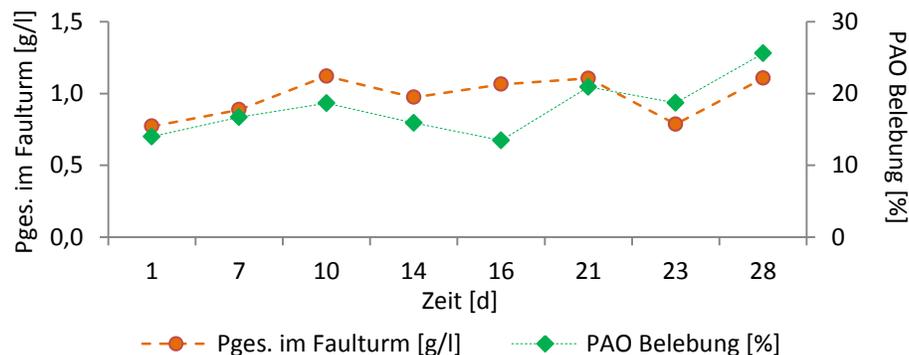


Abbildung 9. Gesamtphosphorgehalt im Faulturm und Gehalt an Polyphosphat-akkumulierenden Organismen (PAOs) in der Belebungsstufe (Oktober/November 2016).

Problematisch können diese Werte für Mikroorganismen werden, die an der Methanbildung beteiligt sind. Bei Untersuchungen der Biogasproduktion wurde ab einer Phosphorkonzentration von 0,6 g/l eine Behinderung der acetoklastischen Methanproduktion festgestellt (Conrad *et al.*, 2000).

Die Zusammenhänge und Einflüsse auf die PAOs werden in Abbildung 10 gezeigt. Dafür wurden die gemessenen Werte für PAO-Anteil, P-Gehalt in Frischmasse und Überstand und die Biotrockenmasse mit den von der Kläranlage gemessenen Daten hinsichtlich Korrelationen untersucht. Es wurde hierbei Spearmans Rang-Korrelationskoeffizient verwendet (Koch *et al.*, 2013).

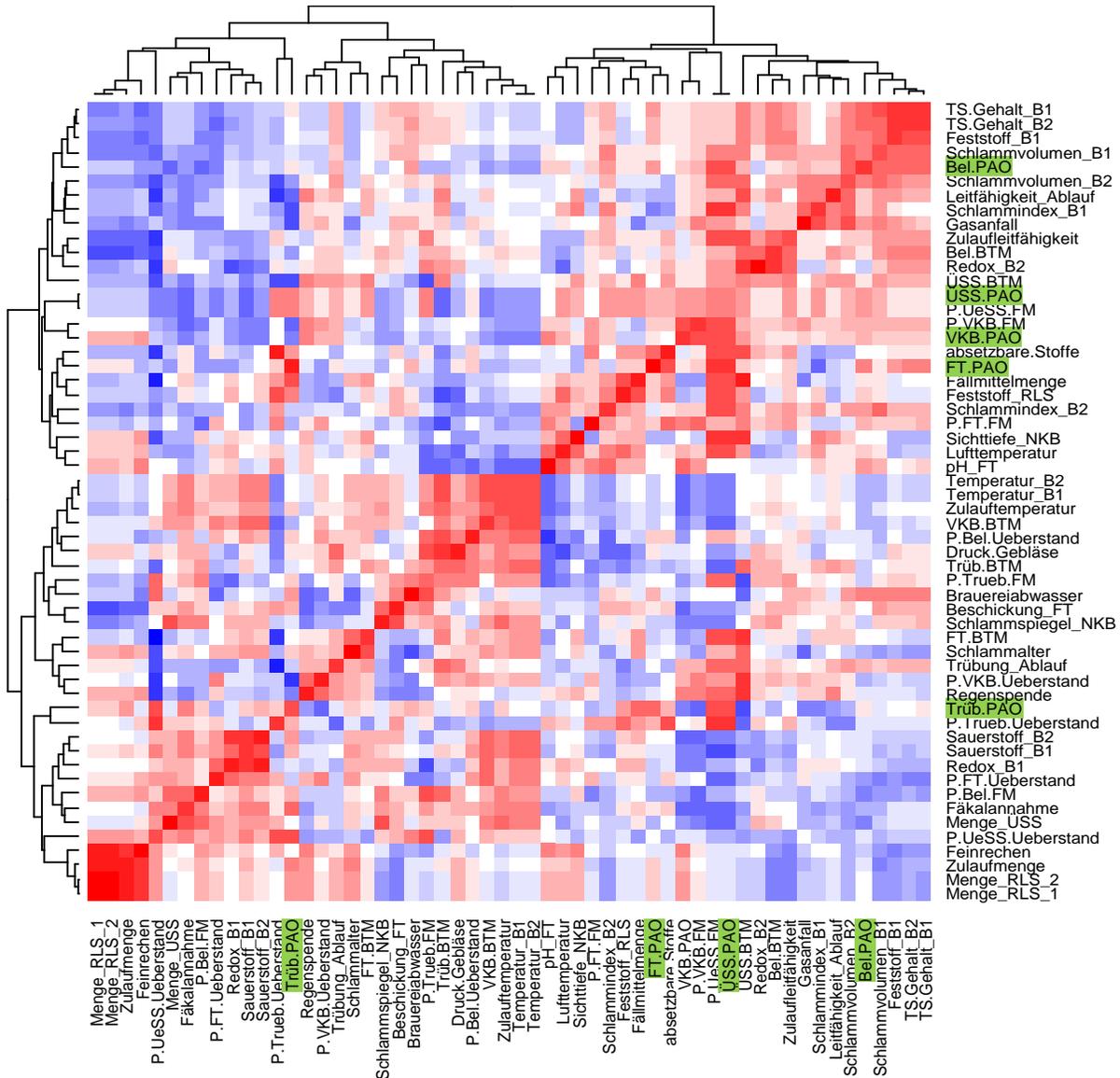


Abbildung 10. Korrelationen der PAO-Anteile (grün unterlegt) mit verschiedenen abiotischen Parametern. In rot sind positive Korrelationen dargestellt, in blau negative Korrelationen. B1/B2: Belebungsbecken 1 und 2, Bel: Belebungs, BTM: Biotrockenmasse, FM: Frischmasse, FT: Faulturm, NKB: Nachklärbecken, P: Phosphor, Redox: Redoxpotential, RLS: Rücklaufschlamm, TS: Trockensubstanz, UeSS: Überschussschlamm, VKB: Vorklärbecken

Da die PAOs im Überschussschlamm aus den Belebungsbecken stammen, werden zunächst die Einflüsse auf die PAOs des Belebungsbeckens betrachtet. Wie aus der Prozessführung zu erwarten, korreliert der PAO-Anteil im Belebungsbecken mit dem des Überschussschlammes positiv. Ebenfalls positiv korreliert der Anteil des Brauereiabwassers mit dem PAO-Gehalt. Dies wurde bereits 2012 (Günther *et al.*, 2012) gefunden und hiermit erneut bestätigt. Weitere positive Korrelationsmuster zeigen die PAO-Anteile im Überschussschlamm mit dem Gehalt an Phosphor, der über das Trübwasser in die Belebung gelangt und mit der Lufttemperatur. Obwohl die mittlere Temperatur bei nur 9°C lag, wurde die Effizienz der PAO-Akkumulation nicht beeinträchtigt. Das Schlammalter und das Redoxpotential zeigen hingegen kaum eine Korrelation zu dem PAO-Anteil im Belebungsbecken und dem daraus resultierenden Überschussschlamm. Dies ist überraschend, da beide Parameter wichtig für das Gleichgewicht zwischen PAO und GAOs (Glycogen-akkumulierende Organismen) (Whang und Park, 2006) bzw. das Redoxpotential (An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff und anderen oxidierenden Substanzen. Mulkerrins *et al.*, 2004) sind. Weitere Arbeiten sind hier notwendig. Bezüglich des Gasanfalls im Faulturm gibt es wie erwartet negative Korrelationen mit der P-Menge in der Belebungsfrischmasse (Biomasse), dem PAO-Gehalt im Faulturm und dem P-Gehalt in der wässrigen Phase des Faulschlammes. Dies zeigt die Notwendigkeit, langfristig die Rückbelastung innerhalb der Anlage zu minimieren mit dem Ziel den Gasanfall zu erhöhen. Insgesamt sind Korrelationsanalysen sehr gut geeignet, um die Phosphatakkumulation von mikrobiellen Organismen in den einzelnen Becken/Reaktoren einer Kläranlage zu verfolgen und Indizien zu möglichen Störungen zu erhalten (Günther *et al.*, 2016).

**Fazit zu Arbeitsschritt (I): Die Rücklösung des durch polyphosphatspeichernden Mikroorganismen gebundenen Phosphors ist unter anaeroben Bedingungen und einer geringen Durchmischung gut zu betreiben. Dabei macht es zwar einen quantitativen Unterschied, ob die Rücklösung in den Sommer- oder den Wintermonaten stattfindet, aber selbst unter ungünstigen Voraussetzungen (P-Gehalt im Überschussschlamm unter 0,15 g/l) können noch 0,05 g Phosphor /l Schlamm gewonnen werden. Auf die Gesamtmenge des Überschussschlammes (117 m<sup>3</sup>/d) bezogen wären das 5,6 kg P pro Tag.**

#### 4.2 (II) Akkumulation von Phosphor in Hefezellen aus dem Brauprozess

Hefen werden seit mehreren Jahrtausenden zur Produktion von Bier eingesetzt. Sie werden je nach Stamm und Brauerei mehrmals wiederverwendet, bevor sie als Reststoff entsorgt werden müssen. Diese Hefen sollten für das Projekt genutzt werden. Zwar stehen den fast 10.000 kommunalen Kläranlagen nur 1.388 eingetragene Brauereien gegenüber, aber alleine diese produzieren pro Jahr rund 185.000 t Hefe (2,1 kg Hefe pro hl Bier, Bierausstoß für Deutschland: 88.423.154 hl (2015, Angaben: Deutscher Brauer-Bund (2015) und RÜCKSTÄNDE AUS DER NAHRUNGS UND GENUSSMITTELPRODUKTION, Materialien zur Abfallwirtschaft, Auftrag des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft 2012), die für die Rückgewinnung mit dem im Bericht vorgestellten Verfahren zur Verfügung stehen könnte. Im vorangegangenen Zwischenbericht (26.01.2016, DBU Projektnummer: 32062/01-32) konnte bereits gezeigt werden, dass Hefezellen aus Endführungen von Brauereien in der Lage sind Phosphor aus der umgebenden Lösung aufzunehmen und intrazellulär zu speichern. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 11 gezeigt.

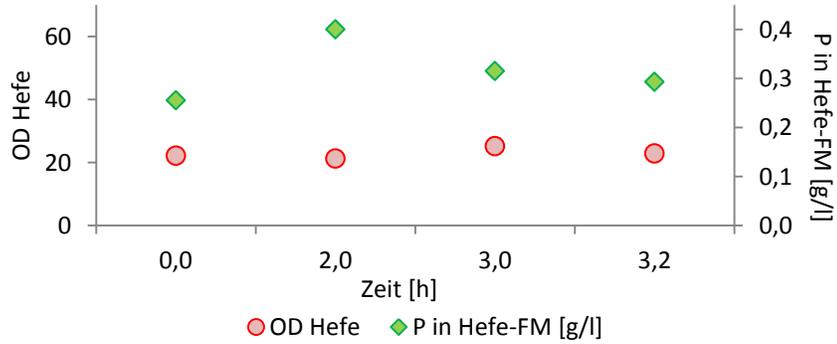


Abbildung 11. Refixierung des in der Lösung vorhandenen Phosphors durch die Hefen zwischen 0 und 3,2 h.

Unter der Voraussetzung, dass Sauerstoffeintrag durch Belüftung sichergestellt ist, wird der Phosphor des umgebenden Mediums innerhalb von 1,5-3 h von den Zellen aufgenommen und gespeichert. Die Menge des aufgenommenen Phosphors hängt von verschiedenen Faktoren ab (Abbildung 12).

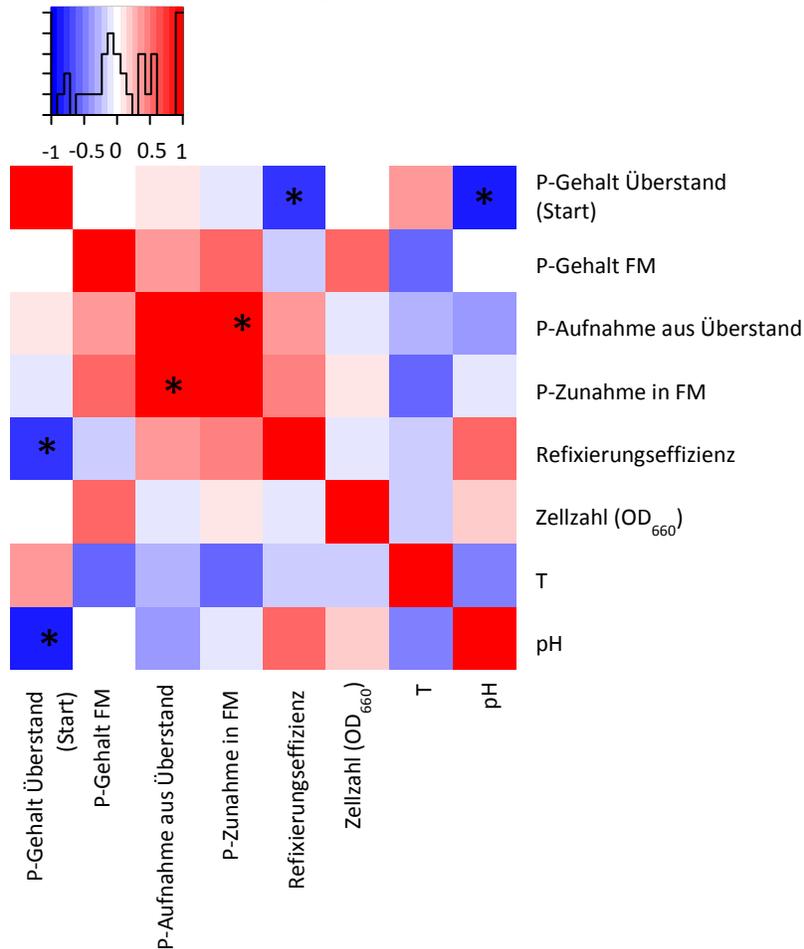


Abbildung 12. Korrelationsanalyse (Spearman) der P-Aufnahme durch Hefezellen und verschiedener abiotischer Parameter. Signifikante Korrelationen sind mit einem Stern gekennzeichnet, positive in rot und negative Korrelationen in blau.

Positiv korrelieren beispielsweise die Menge des aufgenommenen Phosphors und die Zunahme des Phosphors in der Hefebiomasse. Interessant ist die negative Korrelation des P-Wertes im Überstand mit dem pH, was andeutet, dass Überstände mit hohen P-Gehalten zumeist leicht angesäuert sind. Besonders interessant ist die negative Korrelation der Refixierungseffizienz mit der Menge des P-Gehaltes im Überstand zu Beginn des Versuches. Es scheint hier, als würde es eine Grenze geben, bis zu der die Refixierung mit hoher Effizienz abläuft. Überschreitet der P-Gehalt im Überstand diesen Wert sinkt die Effizienz (Abbildung 13).

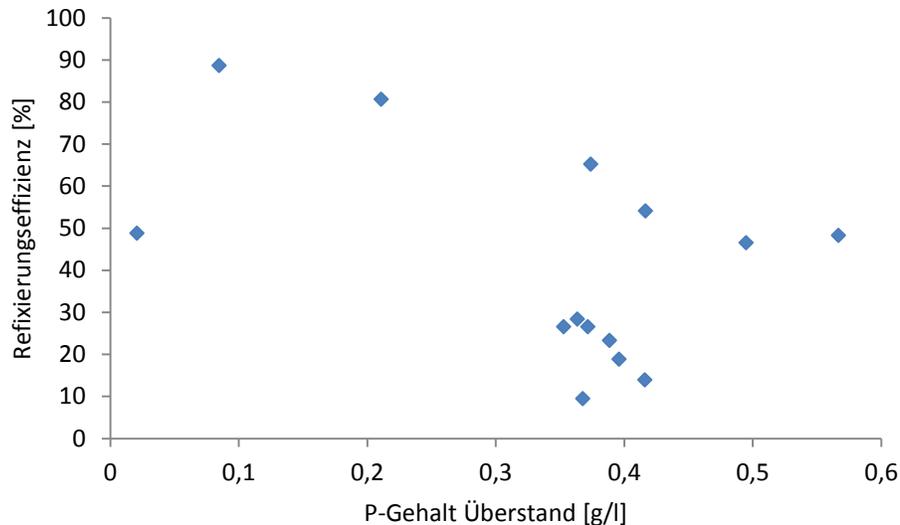


Abbildung 13. Zusammenhang zwischen Refixierungseffizienz der Hefezellen und dem P-Gehalt der Lösung.

Zwischen P-Gehalten von 0,05 und 0,2 g/l scheint es dagegen keinen Einfluss auf die Fixierungseffizienz zu geben. Eine Vermutung für diesen Zusammenhang wäre, dass die Phosphoraufnahme ab einer bestimmten extrazellulären Konzentration gehemmt wird, um die intrazelluläre  $P_i$ -Homeostase zu erhalten. Ähnliche Ergebnisse (P-Anreicherung im Medium bei einer P-Konzentration von 0,126 g/l) haben bereits Markham und Byrne 1967 publiziert. Damit ergeben sich für die Anwendung des Prozesses allerdings keine Nachteile, denn sollte der Wert des rückgelösten Phosphors den Grenzwert überschreiten, kann die Lösung auf eine weniger kritische Konzentration verdünnt werden.

**Fazit zu Arbeitsschritt (II): Die Refixierung des rückgelösten Überstandes durch Hefen aus dem Brauprozess ist erfolgreich, wenn 1. eine Belüftung erfolgt, 2. die Hefen vor Beginn der Zellvermehrung geerntet werden (max. 3 h nach Hefezugabe) und 3. der Phosphorgehalt im Überstand nicht zu hoch ist (zwischen 0,05 und 0,2 g/l werden die höchsten Effizienzen erreicht). Da die Hefeanzahl (ermittelt über die optische Dichte) keine signifikante Rolle für die Refixierungseffizienz spielt, wurden bei allen Refixierungsversuchen 10 g Hefetrockenmasse pro l eingesetzt.**

### 4.3 (III) Bestimmung der Phosphorkonzentration über Sensoren der Firma Centec (Teilprojekt 2)

Im Rahmen des Projektes wurden 2 verschiedene Ultraschallsensoren getestet (Abbildung 14). Der Ultraschallsensor mit der kurzen Schallgabel (1,5 cm) wurde zunächst eingesetzt, um die Phosphorkonzentration in der Lösung zu überwachen. Der Ultraschallsensor mit langer Schallgabel (5 cm) soll dazu dienen, die Phosphoraufnahme in die Zelle besser darstellen zu können.

Sonatec, kurze Schallgabel



Sonatec, lange Schallgabel

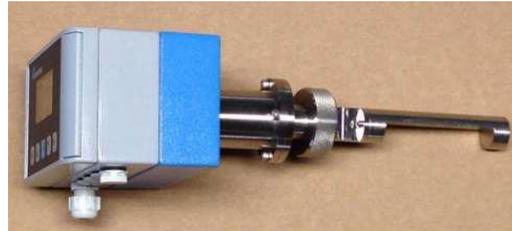


Abbildung 14. Vergleich des Ultraschallsensors Sonatec mit kurzer Schallgabel (1,5 cm; links) und dem Prototypen des neues Schallsensors mit langer Schallgabel (5 cm, rechts).

#### 4.3.1 Schallsensor mit kurzer Schallgabel

Die Firma Centec hat in diesem Projekt zunächst zwei Sensoren zur Verfügung gestellt: den Ultraschallsensor Sonatec (kurze Schallgabel) und den Dichtesensor Rhotec. Mit dem Einsatz beider Sensoren sollte getestet werden, ob es möglich ist, die Phosphorkonzentration in der Lösung zu bestimmen. Dies ist zum einen wichtig, um die Phosphorakkumulation durch die Hefen optimal steuern zu können, aber auch für die Abwasseranlagen generell sehr interessant, da es bislang keine etablierte on-line Methode gibt, um die Phosphatkonzentrationen ohne Einsatz von Chemikalien während der Phosphorakkumulation zu verfolgen. Beide Sensoren wurden über einen Bypass in die Versuchsanordnung eingebunden (siehe Abbildung 15). Der gesamte Bypass fasst ein Volumen von 0,45 l, welches durch die angeschlossene Umwälzpumpe innerhalb von 0,12 min komplett gegen den Reaktorinhalt ausgetauscht wird. Die Aufzeichnung der Werte und Weiterleitung an den Rechner erfolgt automatisch im Sekundentakt. Am Ende der Aufzeichnung liegen die Daten als Excel-Datei vor.



Abbildung 15. Versuchsanordnung mit eingebundenen Sensoren. 1: Schallsensor Sonatec, 2: Dichtesensor Rhotec, 3: Reaktorablauf, 4: Reaktorzulauf, 5: Umwälzpumpe

Beide Sensoren beinhalten Temperatursonden, da sowohl die Dichte, als auch die Schallgeschwindigkeit stark temperaturabhängige Größen sind. Die Dichte sinkt mit zunehmender Temperatur, während die Schallgeschwindigkeit unter identischen Bedingungen steigt. Aus diesem Grund wird eine Temperaturkompensation der gemessenen Werte nötig. Von der Firma Centec wurde daher im Rahmen des Projektes für Temperaturen im Bereich von Raumtemperatur folgende Kompensationsgleichungen aufgestellt:

*Dichte:*

$$0,999117+0,000594*dt+2,827825*dr+0,000083*dt^2+0,751867*dt*dr+1800,627291*dr^2$$

Dabei ist: dt=gemessene Temperatur-Tref;

dr=gemessene Dichte-Dref

Tref: 21,9865; Dref: 1,0036

*Schall:*

$$1483,165181-4,104347*St+1,509022*Sr+7,869453*St^2-5,914910*St*Sr+1,000706*Sr^2$$

Dabei ist: St=gemessene Temperatur-Tref;

Sr=gemessene Schallgeschwindigkeit-Sref

Tref: 22,0178; Sref: 1494,47

Abbildung 16 zeigt beispielhaft die Auswirkung dieser Kompensation auf destilliertes Wasser und Leitungswasser mit Phosphorzusatz (2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

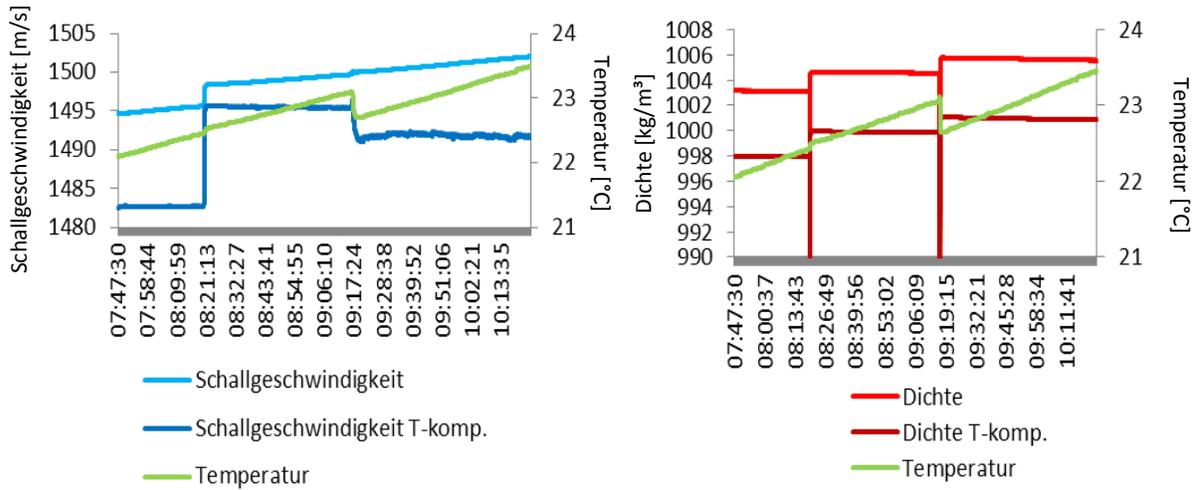


Abbildung 16. Links: Schallgeschwindigkeit, rechts: Dichte jeweils mit und ohne Temperaturkompensation. Die Temperatur der getesteten Lösungen ist in grün dargestellt. Gemessene Lösungen wie folgt: destilliertes Wasser (von 07:45 bis 08:17 Uhr) und Leitungswasser mit Phosphorzusatz (2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (08:18 bis 09:15 Uhr) und nochmals 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (09:16 bis 10:20 Uhr)

Zudem sind beide Größen stoff- und konzentrationsspezifisch. Je nachdem, welche Stoffe zu welchen Anteilen in Lösung sind verändern sich Schallgeschwindigkeit und Dichte. Während die Dichte bei gleichbleibender Temperatur eine kumulative Größe ist, steigt die Schallgeschwindigkeit bis zu einer gewissen Konzentration des Stoffes und nimmt danach ab. Abbildung 17 zeigt hierzu ein Beispiel.

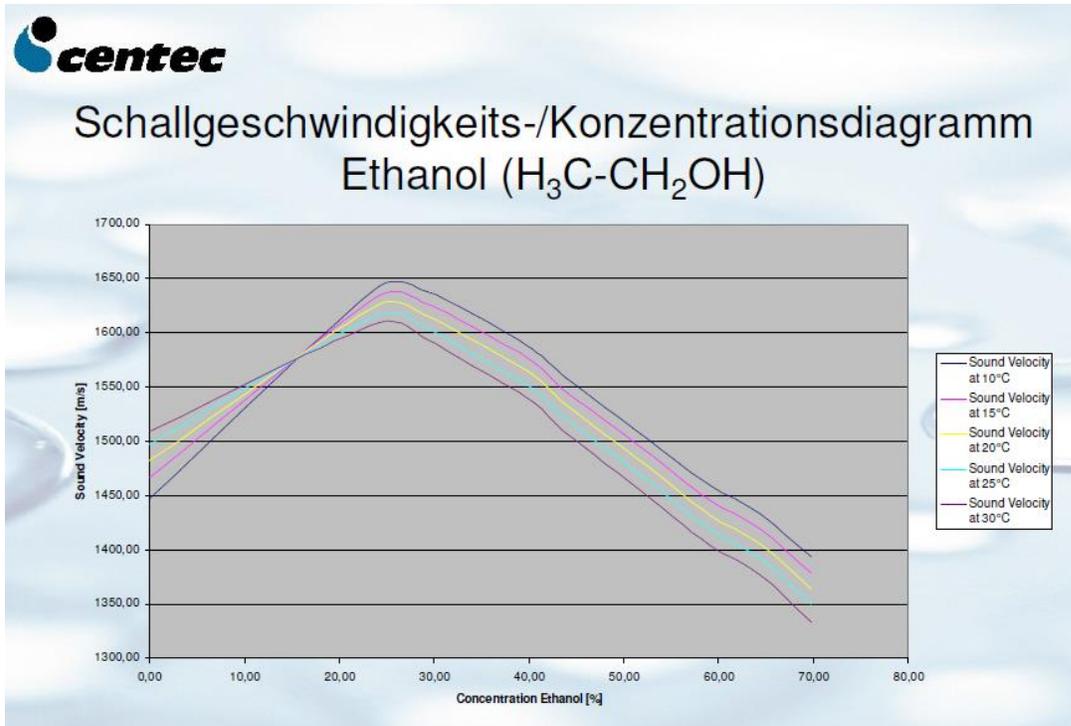


Abbildung 17. Änderung der Schallgeschwindigkeit bei Konzentrationsänderung des gelösten Stoffes am Beispiel von Ethanol.

Abbildung 18 zeigt typische Schallgeschwindigkeiten und Dichten, die bei Raumtemperatur (20-23°C) im Laborversuch gemessen worden sind.

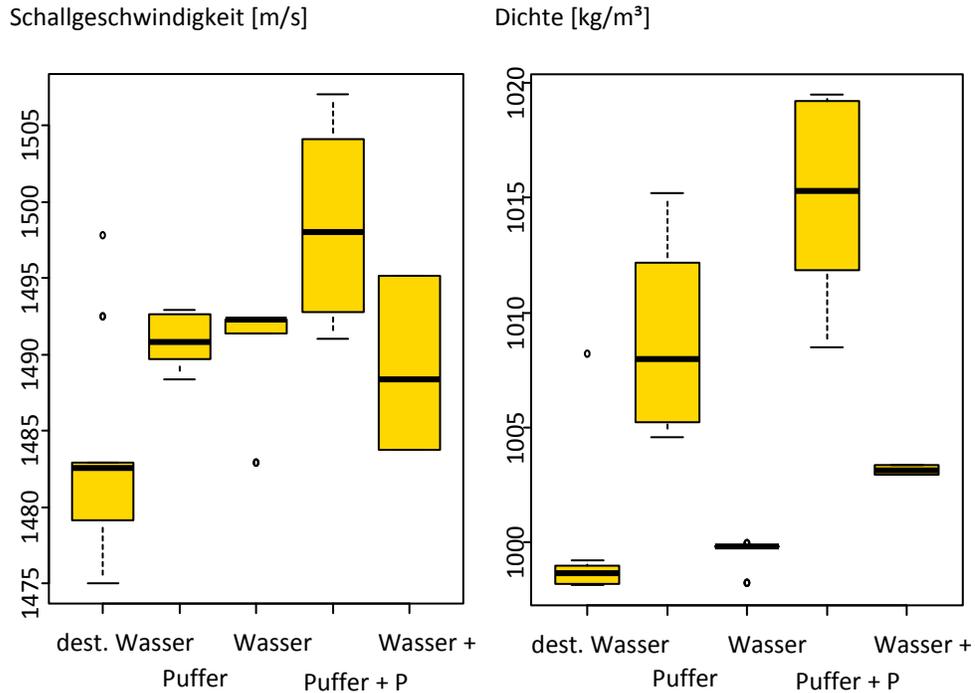


Abbildung 18. Schallgeschwindigkeit und Dichte verschiedener Lösungen. Als Phosphorquelle wurde 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  verwendet. Puffer: 25 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) mit je 10 mg/l  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$

Die unterschiedlichen Schallgeschwindigkeiten und Dichten der Lösungen sind beispielhaft in Abbildung 19 gezeigt. In diesem stufenartig aufgebauten Versuch wird zunächst destilliertes Wasser (1), dann Leitungswasser (2), dann Leitungswasser mit Phosphorzusatz (1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3), Hefen (10 g BTM /l) in Leitungswasser mit Phosphorzusatz (4a: Start, 4b: Ende) und Hefen (10 g BTM /l) in Leitungswasser ohne zusätzlichen Phosphorzusatz (5a: Start, 5b: Ende) zugegeben.

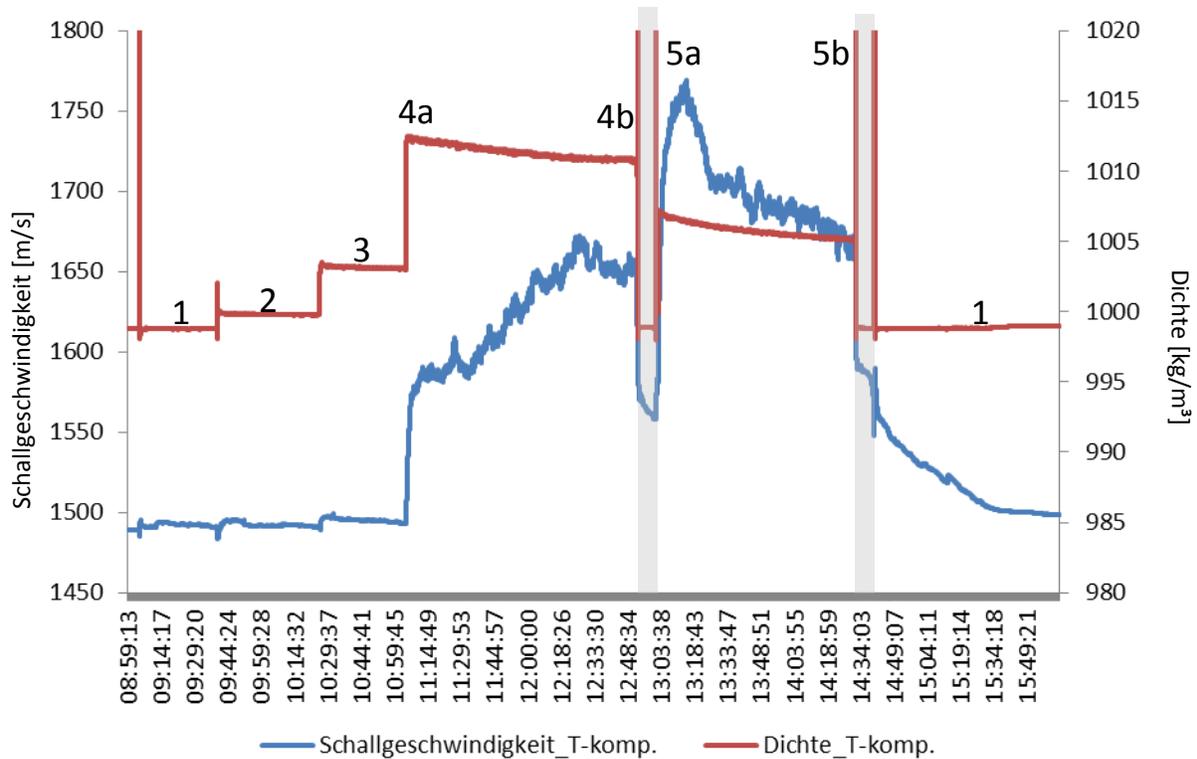


Abbildung 19. Schallgeschwindigkeit und Dichte verschiedener Lösungen. destilliertes Wasser (1), Leitungswasser (2), Leitungswasser mit Phosphorzusatz (1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3), Hefen (10 g BTM /l) in Leitungswasser mit Phosphorzusatz (4a: Start, 4b: Ende), Hefen (10 g BTM /l) in Leitungswasser ohne zusätzlichen Phosphorzusatz (5a: Start, 5b: Ende). Graue Balken: spülen mit 10 l dest. Wasser, Durchmischung: 400 rpm, Belüftung mit synthetischer Luft: 1,5 l/min.

Die mit Hefen durchgeführten Versuchsteile wurden zytometrisch begleitet, um die P-Aufnahme in die Hefezellen verfolgen zu können. Abbildung 20 zeigt beispielhaft die Veränderung der Fluoreszenzintensität der Tetrazyklinfärbung von Zeitpunkt 4a zu 4b.

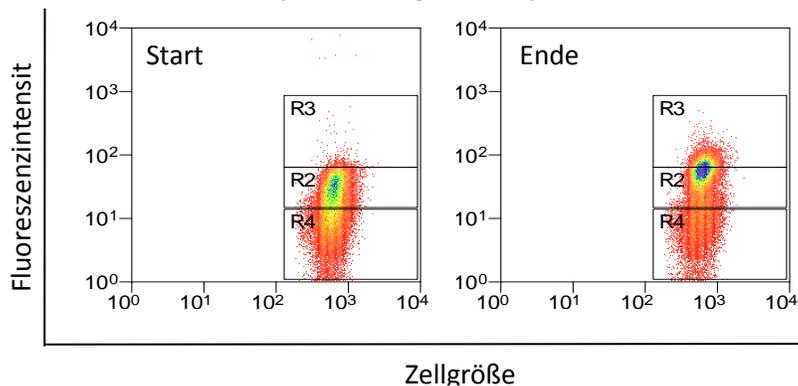


Abbildung 20. Zytometrische Messung des Polyphosphatgehaltes zum Zeitpunkt 4a und 4b. MoFlo, Beckman Coulter, USA; Anregung: 488 nm (400 mW), 355 nm (150 mW); FL1 Bandpassfilter:  $530 \pm 40$  nm; Eichbeads: 2  $\mu\text{m}$  FluoSpheres - carboxylate modified microspheres, yellow-green fluorescent; Molecular Probes; Färbung und Messung nach Günther *et al.*, 2009

Die Zellen in Abbildung 20 sind je nach Polyphosphatgehalt in 3 Gates eingeteilt: R4: Zellen ohne Polyphosphate, R2: Zellen mit wenig Polyphosphaten, und R3: Zellen mit vielen Polyphosphaten. Vom Zeitpunkt 4a zum Zeitpunkt 4b nimmt der Anteil der Zellen mit mittel bzw. hohen Polyphosphatgehalt stark zu. Alle Werte des Versuches sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. Zusammenfassung des in Abbildung 19 gezeigten Versuches. P-Gehalte wurden photometrisch bestimmt (siehe Zwischenbericht vom 26.01.2016, DBU Projektnummer: 32062/01-32), die Zellverteilung wurde zytometrisch bestimmt.

Nr.	Probe-material	P-Gehalt Lösung [mg/l]	P-Gehalt FM [mg/l]	Dichte [kg/m <sup>3</sup> ]	Schallgeschwindigkeit [m/s]	Zellverteilung [%]
1	dest. Wasser	0,677 (±0,048)		998,78 (±0,012)	1492,47 (±0,32)	
2	Wasser	0,74 (±0,018)		999,81 (±0,017)	1492,32 (±1,12)	
3	Wasser + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	374,91 (±14,45)		1003,14 (±0,026)	1495,13 (±0,23)	
4a	Wasser + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Hefe: Start	395,94 (±7,28)	96,71 (±1,38)	1012,14 (±0,08)	1585,13 (±3,44)	R2: 57,99 (±1,59) R3: 1,69 (±0,23) R4: 40,32 (±1,82)
4b	Wasser + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Hefe: Ende	321,29 (±3,15)	140,55 (±5,58)	1010,87 (±0,05)	1656,72 (±5,29)	R2: 65,89 (±2,73) R3: 19,37 (±4,67) R4: 14,74 (±1,97)
5a	Wasser + Hefe: Start	20,69 (±1,14)	97,02 (±3,01)	1006,58 (±0,11)	1751,97 (±8,71)	R2: 56,86 (±1,32) R3: 8,79 (±1,6) R4: 34,36 (±0,81)
5b	Wasser + Hefe: Ende	10,59 (±0,32)	126,46 (±2,22)	1005,19 (±0,04)	1671,49 (±6,36)	R2: 66,17 (±3,43) R3: 19,38 (±4,82) R4: 14,45 (±1,4)

Es ist klar zu erkennen, dass der Sensor über die Dichtemessungen das Phosphat in Lösung also auch die Zugabe der Hefezellen sowie die Speicherung des Phosphates in Hefen als Polyphosphat anzeigt. Die Werte für die Schallgeschwindigkeit sind dagegen nicht so eindeutig. Die Zugabe von Hefe (10 g BTM /l) und Phosphor (1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ändert beide Parameter, die Zugabe von Hefe allerdings wesentlich stärker als die Zugabe von Phosphor. Wie man bereits in Abbildung 19 sehen konnte, steigt die Schallgeschwindigkeit von Zeitpunkt 4a-b an, während die Dichte nahezu konstant bleibt. In dieser Zeit haben die Zellen Phosphor aus dem Überstand aufgenommen (74,65 mg/l, photometrische Bestimmung) und intrazellulär in Form von Polyphosphaten gespeichert (Zunahme P in Frischmasse: 43,84 mg/l,

photometrische Bestimmung). Dies zeigt sich auch an der Zunahme der polyphosphattragenden Zellen (R2 und R3: 59,68 % zu 85,26%). Im nächsten Versuchsabschnitt wurden dann lediglich Hefen in Leitungswasser zugegeben (5a-b), wobei die Hefelösung selbst rund 20 mg/l (photometrische Bestimmung) Phosphor mitbringt. Dieser Phosphor wird auch aufgenommen, wie an der Zunahme des P-Gehaltes in der Frischmasse und den gefärbten Zellen zu sehen ist. Die Zunahme ist jedoch etwas geringer. Da im Unterschied zu den Dichtemessungen die Ergebnisse bezüglich der Schalldaten uneindeutig waren, wurde der Sensor baulich so verändert, dass er eine längere Schallgabel (5 cm) bekam. Daher wurden die Experimente mit dem neuen Ultraschallsensor (lange Schallgabel; siehe Punkt 4.3.2) wiederholt. Bioinformatische Analysen bestätigen aber bereits für den Sensor mit der kurzen Schallgabel eine gute Differenzierbarkeit der Lösungen hinsichtlich Dichte und Schallgeschwindigkeit (Tabelle 3 a und b).

Tabelle 3a. *P*-Werte für die (gemittelte) Dichte nach Student's t-Test (zweiseitig, homoskedastisch). Fett gedruckte Werte sind deutlich signifikant (0,05 und kleiner). Puffer: 25 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) mit je 10 mg/l MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>

<i>P</i> -Werte Dichte	dest. Wasser	Wasser	Puffer	Wasser + P	Puffer + P	Wasser + Hefe	Puffer + Hefe	Wasser + P+ Hefe	Puffer + P+ Hefe
dest. Wasser		0,88	<b>0,000</b>	<b>0,024</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
Wasser	0,88		<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	<b>0,008</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
Puffer	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>		<b>0,05</b>	<b>0,016</b>	0,727	<b>0,036</b>	0,221	<b>0,006</b>
Wasser + P	<b>0,024</b>	<b>0,000</b>	<b>0,05</b>		0,001	0,156	0,101	0,083	0,086
Puffer + P	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,016</b>	0,001		0,108	0,639	0,354	0,182
Wasser + Hefe	<b>0,000</b>	<b>0,001</b>	0,727	0,156	0,108		0,249	0,303	0,077
Puffer + Hefe	<b>0,000</b>	<b>0,008</b>	<b>0,036</b>	0,101	0,639	0,249		0,424	0,647
Wasser + P+ Hefe	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,221	0,083	0,354	0,303	0,424		0,135
Puffer + P+ Hefe	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,006</b>	0,086	0,182	0,077	0,647	0,135	

Tabelle 3b. *P*-Werte für die (gemittelte) Schallgeschwindigkeit nach Student's *t*-Test (zweiseitig, homoskedastisch). Fett gedruckte Werte sind deutlich signifikant (0,05 und kleiner). Puffer: 25 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) mit je 10 mg/l MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>

<i>P</i> -Werte Schallgeschwindigkeit	dest. Wasser	Wasser	Puffer	Wasser + P	Puffer + P	Wasser + Hefe	Puffer + Hefe	Wasser + P+ Hefe	Puffer + P+ Hefe
dest. Wasser		0,087	<b>0,005</b>	0,182	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	<b>0,005</b>
Wasser	0,087		0,544	0,870	<b>0,043</b>	<b>0,002</b>	0,169	<b>0,000</b>	0,09
Puffer	<b>0,005</b>	0,544		0,420	<b>0,029</b>	<b>0,000</b>	<b>0,043</b>	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>
Wasser + P	0,182	0,870	0,420		0,064	0,14	0,295	0,065	0,183
Puffer + P	<b>0,000</b>	<b>0,043</b>	<b>0,029</b>	0,064		0,15	0,466	0,072	0,901
Wasser + Hefe	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	0,14	0,15		0,118	0,679	0,148
Puffer + Hefe	<b>0,002</b>	0,169	<b>0,043</b>	0,295	0,466	0,118		<b>0,019</b>	0,484
Wasser + P+ Hefe	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,065	0,072	0,679	<b>0,019</b>		0,066
Puffer + P+ Hefe	<b>0,005</b>	0,09	<b>0,004</b>	0,183	0,901	0,148	0,484	0,066	

Die einzigen Flüssigkeiten, die sich weder mit der Dichte noch mit der Schallgeschwindigkeit wirklich signifikant unterscheiden lassen sind destilliertes Wasser und Leitungswasser, da hier die Werte zu ähnlich sind. Da die Hefen während des Versuches ihre Umgebung durch die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten verändern, weisen die Kurven in Abbildung 19 steigende und sinkende Abschnitte auf. Daher resultiert auch die schlechte Signifikanz der Lösungen mit Hefen, denn für den Test wurden die Mittelwerte über den jeweiligen Versuchsverlauf verwendet. Werden statt dieser Mittelwerte der Hefelösungen die Start und Endwerte (4a/4b und 5a/5b, je 10 min Intervall) verglichen so ist der Unterschied zwischen diesen Zeitpunkten jeweils deutlich signifikant (*P*: 0,000). Ebenso deutlich signifikant ist der Unterschied in Schallgeschwindigkeit und Dichte zwischen 4a und 5a (geringere Phosphorkonzentration in 5a, siehe Tabelle 3) mit einem *P*-Wert von 0,000.

Die gute Unterscheidbarkeit der Phosphorkonzentration in der Lösung besonders über die Dichte zeigt auch Abbildung 21. In diesem Versuch wurde zu Leitungswasser (Stufe 1) zunächst 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> zugegeben (Stufe 2), dann ein weiteres Mal 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Stufe 3) und schließlich noch 3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Stufe 4), so dass die Konzentration von KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bei 0 (Stufe 1), 1 (Stufe 2), 2 (Stufe 3) und 5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Stufe 4) liegt.

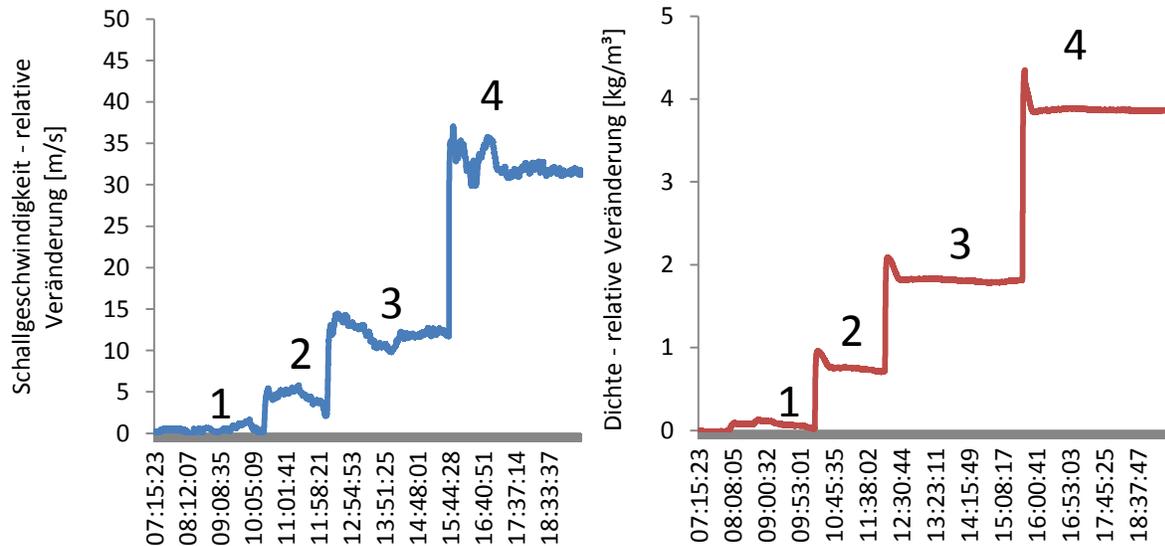


Abbildung 21. Stufenversuch mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in Leitungswasser. Sowohl bei der Schallgeschwindigkeit (links) als auch bei der Dichte (rechts) wurden die Werte für Leitungswasser abgezogen, so dass die relative Veränderung gegenüber dem Leitungswasser verbleibt. Die Konzentration von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  liegt bei 0 (Stufe 1), 1 (Stufe 2), 2 (Stufe 3) und 5 g/l (Stufe 4).

#### 4.3.2 Schallsensor mit langer Schallgabel

Um eine verbesserte Auflösung der Phosphoraufnahme in Partikeln (Hefezellen) zu erreichen, wurde der Schallsensor verändert. Statt einer Schallgabel mit einem Abstand von 1,5 cm, wurde nun eine Schallgabel mit einem Abstand von 5 cm eingesetzt. Mit dem längeren Weg, den der Schall damit im Medium zurücklegen muss, soll die Auflösung verbessert werden. Durch die neuen Eigenschaften des Sensors musste auch die Temperaturkompensation verändert werden. Die von Centec angepasste Gleichung für die Temperaturkompensation der Schallgeschwindigkeit lautet:

$$1489,177215 - 5,088251886 \cdot (\text{Temperatur} - 23,288) + 1,799626532 \cdot (\text{Schall} - 1498,69)$$

Mit dem neuen Sensor wurden mehrere Versuche durchgeführt. Einer dieser Versuche ist in Abbildung 22 gezeigt. Dieser Versuch ist ähnlich aufgebaut, wie der in Abbildung 19 gezeigte Versuch. Zunächst wurde destilliertes Wasser gemessen (Stufe 1), dann Leitungswasser (Stufe 2), dann wurde Hefe (10 g Trockenmasse pro l) dazugegeben (Stufe 3). Nach Spülung mit 10 l destilliertem Wasser (grauer Balken) wurden die Hefen in eine Lösung aus Leitungswasser mit 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gegeben (Stufe 4). Nach erneuter Spülung wurde dann Leitungswasser mit 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gemessen (Stufe 5). Alle Stufen wurden mit Belüftung (1,5 l/min synthetische Luft) und einer Rührleistung von 400 rpm gefahren. Die Werte für die Schallgeschwindigkeit sehen gänzlich anders aus als in Abbildung 19. Die Schallgeschwindigkeit ist viel höher in der Lösung, wenn die Hefen keinen Phosphor zur Verfügung haben. In der Lösung mit Phosphorzusatz ist die Schallgeschwindigkeit über den gesamten Versuchsverlauf sehr gering. Die einzelnen der Werte der Stufen sind in Tabelle 4 dargestellt.

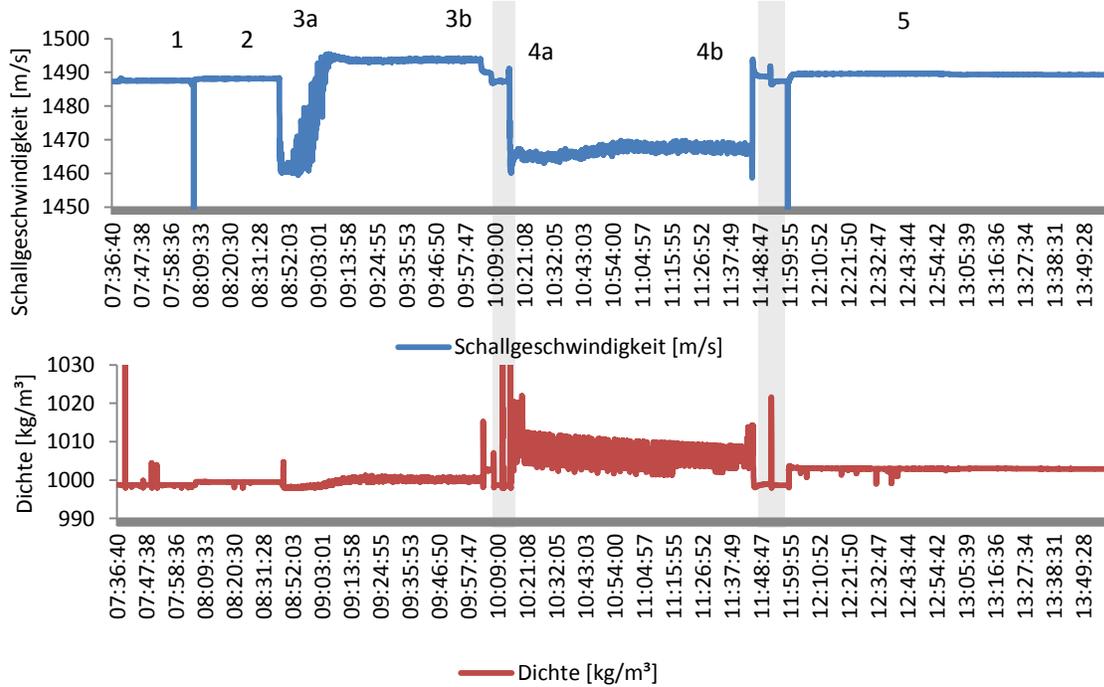


Abbildung 22. Änderungen in Schallgeschwindigkeit und Dichte von verschiedenen Lösungen: destilliertes Wasser (Stufe 1), Leitungswasser (Stufe 2), Hefe in Leitungswasser (10 g Trockenmasse pro l) (Stufe 3), Hefen in Leitungswasser mit 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Stufe 4), Leitungswasser mit 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Stufe 5). Graue Balken zeigen die Zeitpunkte, in denen das System mit 10 l destilliertem Wasser gespült wurde. Alle Stufen wurden mit Belüftung (1,5 l/min synthetische Luft) und einer Rührleistung von 400 rpm gefahren.

Tabelle 4. Zusammenfassung des in Abbildung 24 gezeigten Versuches. Die Phosphorkonzentration in Lösung und in der Biomasse wurde photometrisch, die Polyphosphatanteile in den Hefen zytometrisch bestimmt.

Nr.	Probe-material	P-Gehalt Lösung [mg/l]	P-Gehalt FM [mg/l]	Dichte [kg/m <sup>3</sup> ]	Schallgeschwindigkeit [m/s]	Zellverteilung [%]
1	dest. Wasser	0,60 (±0,039)		998,67 (±0,099)	1487,54 (±0,02)	
2	Wasser	0,65 (±0,036)		999,44 (±0,173)	1488,12 (±0,02)	
3a	Wasser + Hefe: Start	24,82 (±1,02)	97,02 (±3,01)	998,15 (±0,131)	1463,58 (±3,84)	R2: 45,85 (±0,05) R3: 23,35 (±0,55) R4: 30,80 (±0,55)
3b	Wasser + Hefe: Ende	11,36 (±0,36)	118,51 (±0)	1000,17 (±0,257)	1493,73 (±0,18)	R2: 40,72 (±5,09) R3: 39,48 (±1,8) R4: 19,8 (±6,87)

4a	Wasser + $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + Hefe: Start	387,57 (±14,39)	43,04 (±10,3)	1009,36 (±4,37)	1466,76 (±6,09)	R2: 29,54 (±0,24) R3: 26,66 (±7,66) R4: 43,80 (±7,62)
4b	Wasser + $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + Hefe: Ende	317,65 (±4,19)	99,5 (±8,8)	1006,77 (±1,65)	1467,44 (±0,64)	R2: 38,07 (±2,90) R3: 36,8 (±4,63) R4: 25,13 (±1,75)
5	Wasser + $\text{KH}_2\text{PO}_4$	262,18 (±18,46)		1003,01 (±0,115)	1489,56 (±0,03)	

Vergleicht man die Werte aus Tabelle 3 und 4 so zeigen sich deutliche Änderungen in der Schallgeschwindigkeit bei vergleichbar guter P-Aufnahme durch die Hefezellen. Die Änderung des Schallsensors hinsichtlich der Länge der Schallgabel erscheint also vielversprechend. Die Überprüfung, dass die Schallgeschwindigkeit nach wie vor korrekt die Phosphorkonzentration der Lösung angeben kann zeigt Abbildung 23 A. Dieser Versuch ist ähnlich aufgebaut, wie der in Abbildung 21 gezeigte Versuch mit der kurzen Schallgabel. Nacheinander wird Leitungswasser mit 0 (Stufe 1), 1,5 (Stufe 2), 2,5 (Stufe 3), 3 (Stufe 4) und 5 (Stufe 5) g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  gemessen und im Anschluss daran destilliertes Wasser (Stufe 6). Aus den gemessenen Werten lässt sich für Leitungswasser eine Eichgerade erstellen (Abbildung 23, B)

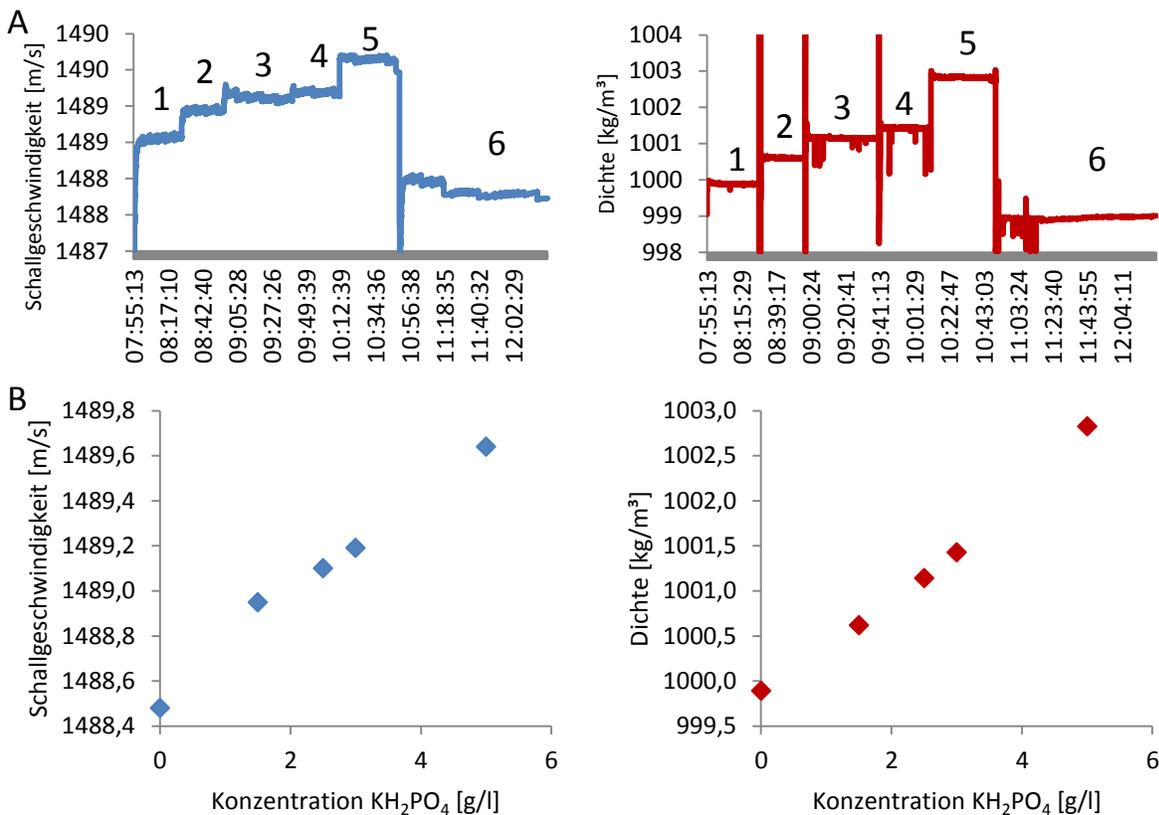


Abbildung 23. A) Stufenversuch mit Leitungswasser mit 0 (Stufe 1), 1,5 (Stufe 2), 2,5 (Stufe 3), 3 (Stufe 4) und 5 (Stufe 5) g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sowie destilliertes Wasser (Stufe 6). B) Eichgeraden für die Schallgeschwindigkeit und die Dichte für die Konzentration an  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in der Lösung.

Obwohl die Schallgeschwindigkeit mit dem veränderten Sensor wesentlich geringer ist, als mit dem ursprünglichen Sensor, kann die Phosphorkonzentration in der Lösung bestimmt werden. Die Phosphoraufnahme in die Hefezellen kann durch den veränderten Verlauf der Schallgeschwindigkeit in Abbildung 22 Stufe 3a zu 3b und 4 zu 4b vermutet werden. Nach dem Start der Stufe 3 wird der gelöste Phosphor schnell aufgenommen ( $\sim 10$  mg P/l) und dann steigt die Schallgeschwindigkeit wieder auf Normalniveau an. In Stufe 4 wird hingegen viel mehr Phosphor aufgenommen ( $\sim 70$  mg P/l) und die Schallgeschwindigkeit bleibt konstant niedrig. Um das abschließend zu verifizieren, sind weitere Versuche mit einer wesentlich engeren Probenahme nötig.

**Fazit zu Arbeitsschritt (III): Mit dem parallelen Einsatz von Dichte- und Ultraschallsensor ist es möglich auf die Zusammensetzung der Lösung zu schließen, besonders dann, wenn keine Hefen vorliegen. Wenn Hefen vorliegen, schwanken die Werte durch die von den Hefen gebildeten und mit in die Lösung abgegebenen Stoffwechselprodukte. Aussagen können in diesem Fall nicht generell, sondern nur bei Betrachtung des gesamten Versuchsablaufes getroffen werden. In jedem Fall ist jedoch die Bestimmung der P-Konzentration über die Kombination von Dichte- und Ultraschallsensor möglich.**

#### **4.4 (IV) Bewertung der Düngemittelqualität**

Für den Eignungstest der phosphatreichen Hefen als organischer Dünger gibt es eine Zusammenarbeit mit Dr. Walter Schmidt und Dr. Michael Grunert, Pflanzenbau Referat 72, Nossen, Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie. Die erste durch die oben genannte Versuchsanordnung hergestellte Düngemittelcharge wurde im 2. Quartal 2015 getestet, die zweite im 2. Quartal 2016. Die Versuchskultur war Silomais der Sorte Colisee auf Boden mit einem pH von 5,8. Die Pflanzen wurden in Töpfen kultiviert und optimal mit Wasser und allen anderen notwendigen Elementen außer P versorgt. Phosphor wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen (0,4, 0,8 und 1,6 g pro Gefäß) eingesetzt. Im darauffolgenden Nachbaujahr wurde Sommergerste angebaut, ohne den Boden nochmals zu düngen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 und 25 gezeigt.

1. Anbaujahr: Mais



K  
 0,4 g Hefe-P  
 0,4 g Super-  
 1,6 g Hefe-P  
 1,6 g Super-P

1. Nachbaujahr: Sommergerste



K  
 0,4 g Hefe-P  
 0,8 g Hefe-P  
 1,6 g Hefe-P

Abbildung 24. Überblick über das Wachstum von Mais und Sommergerste im Vergleich mit dem Mineraldünger Superphosphat ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ) und der ungedüngten Kontrolle (K). Bilder: Dr. M. Grunert

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der Wachstumsanalyse für beide Anbaujahre 2015 (links) und 2016 (rechts) mit Analyse der Wuchshöhe, des Trockengewichtes, der Inhaltsstoffe und dem Nährstoffentzug aus dem Boden. In allen Fällen sind die Werte des Hefedüngers vergleichbar mit denen des mineralischen Düngers.

1. Anbaujahr

2. Anbaujahr

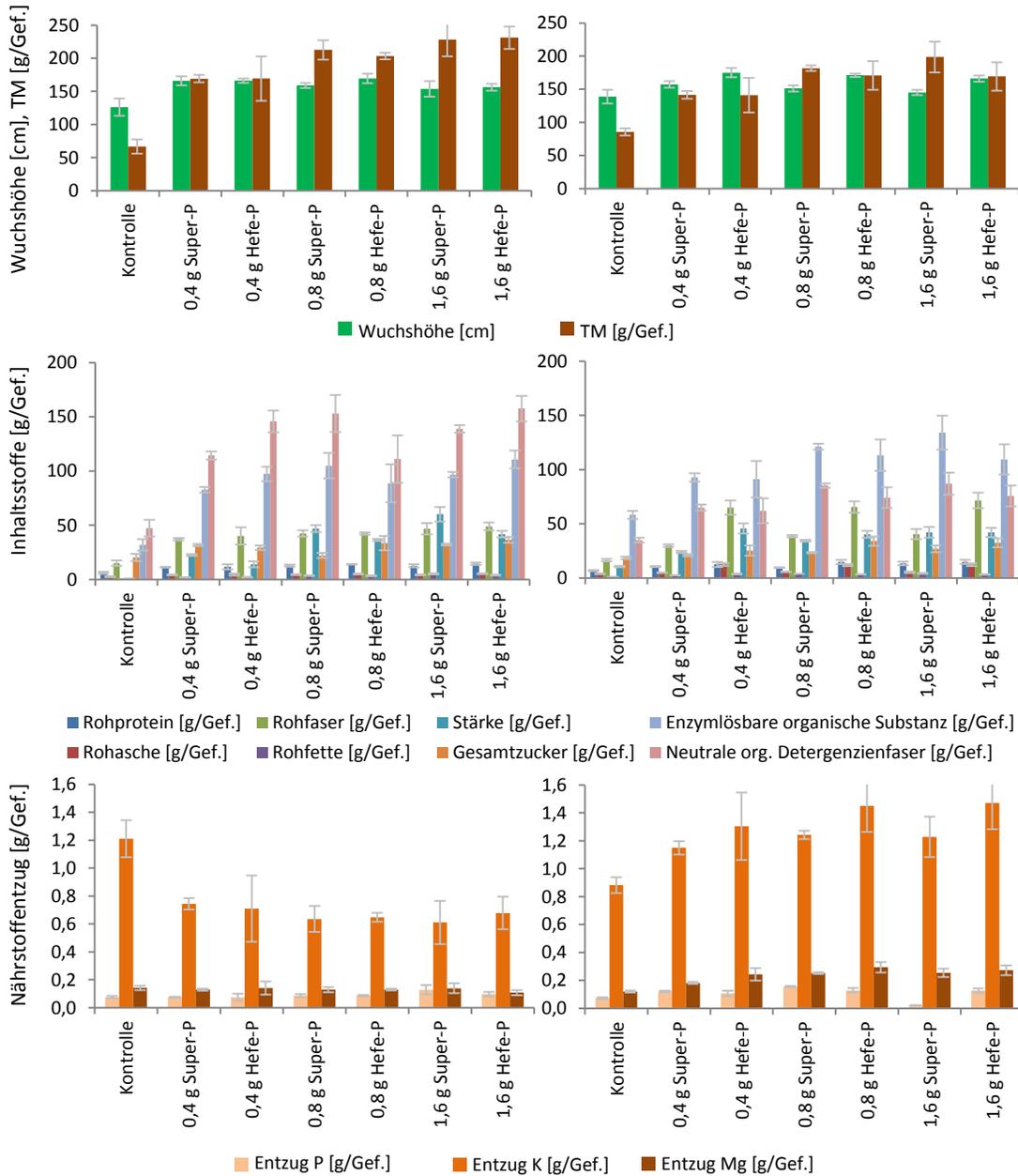


Abbildung 25. Wachstum, Inhaltsstoffe und Nährstoffentzug aus dem Boden für Mais gedüngt mit Hefedünger (Hefe-P) und Mineraldünger (Super-P) in 3 unterschiedlichen Konzentrationsstufen. Gef.: Gefäß, TM: Trockenmasse

Sowohl das Wachstum als auch die Analyse der Inhaltsstoffe zeigt bei allen 3 Phosphorkonzentrationen mit dem Mineraldünger vergleichbare Werte. Obwohl der Phosphor also zunächst intrazellulär in einer schlecht wasserlöslichen Form (Polyphosphate) vorlag, konnte durch die Tätigkeit der bodeneigenen Mikroorganismen der Phosphor offensichtlich für das Pflanzenwachstum zugänglich gemacht werden. Die gute Verfügbarkeit von ansonsten wasserunlöslichen Polyphosphaten wurden bereits in der Literatur für Algen und Cyanobakterien beschrieben (Mukherjee *et al.*, 2015). In der Studie zur Phosphatfreisetzung aus polyphosphattragenden Algen wurde gezeigt, dass die Freisetzungsraten ähnlich

der des mineralischen Superphosphatdüngers ist. Der einzige Unterschied zwischen Polyphosphaten und mineralischem Dünger besteht in der zeitverzögerten Freisetzung direkt nach Beginn der Düngung. Während die Rücklösung aus mineralischem Dünger unmittelbar nach Düngung einsetzt, verzögert sich die Rücklösungsrate des biologischen Düngers während der ersten 10 Tage, um dann ein Niveau zu erreichen, das mit dem mineralischen Dünger vergleichbar ist (Mukherjee *et al.*, 2015).

Inwiefern der Hefedünger vergleichbar mit anderen Rezyklaten ist, wird in Abbildung 26 gezeigt. Hier wurden in einem kontrollierten Wachstumsversuch unter Freilandbedingungen verschiedene P-reiche Düngemittel in unterschiedlicher Konzentration untersucht und der Ertrag der Ährentrockenmasse gemessen.

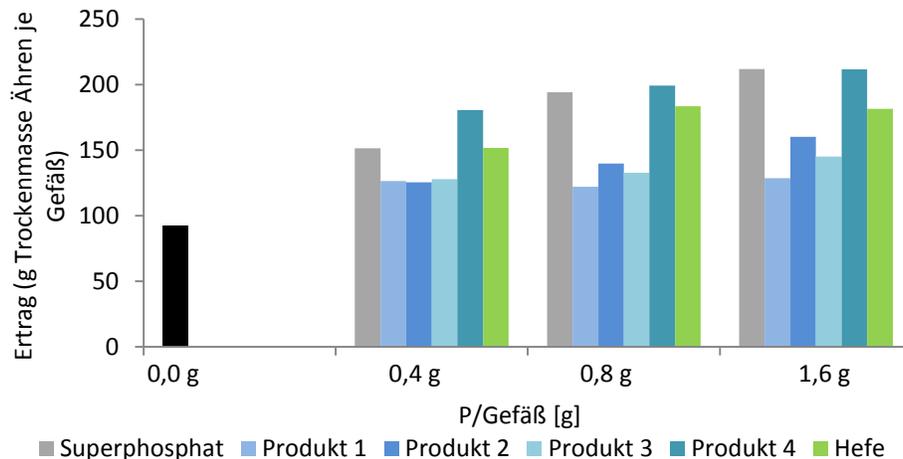


Abbildung 26. Ergebnisse des Düngeversuches mit Hefe-P auf leicht saurem Boden (pH 5,8). Vergleich des Ertrages von Hefedünger (grün) mit der ungedüngten Kontrolle (schwarz), Mineraldünger (grau) und anderen P-Rezyklaten (blau).

Die Ergebnisse zeigen, dass auch hier der Hefedünger als gleichwertig mit dem Mineraldünger Superphosphat ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ) zu betrachten ist. Lediglich ein Rückgewinnungsprodukt aus Abbildung 26 schneidet noch etwas besser ab, als der Hefedünger. Die anderen Rezyklate liegen bei jeder betrachteten Konzentration unter dem Ertrag des Hefedüngers.

Tests zur Unbedenklichkeit des Hefedüngers sollen zur Anerkennung und Nutzung des Düngers durch Anwender beitragen. Getestet wurde auf verschiedene Schwermetalle (Pb, Cd, Cr, Cu, Ni, Hg, Zn) und Pathogene (*Salmonella sp.*). Dabei wurde erwartet, dass die Gehalte an Schwermetallen und Pathogenen sehr gering sind, denn Produkte, die mit ähnlichen Technologien hergestellt werden (z.B. Crystal Green® von Ostara Nutrient Recovery Technologies Inc. in Kombination mit der WASSTRIP®-Technologie) sind im Handel als Düngemittel erhältlich. Die Konzentration an Schwermetallen ist dabei um 2-4 Größenordnungen geringer als bei mineralischen Düngern (Spec Sheet von URL: <http://crystalgreen.com/about/download/>). Pathogene Keime wurden ebenfalls bislang nicht im Produkt Crystal Green® nachgewiesen (getestet wurde auf Coliforme Keime, Salmonella, Enteroviren und Nematodeneier (Britton, 2009)). Die im Herstellungsprozess von Crystal Green® verwendete WASSTRIP®-Technologie nutzt, wie auch der im Antrag beschriebene Ansatz, die Rücklösung des zuvor in Biomasse eingelagerten Phosphors unter anaeroben Bedingungen bei neutralem pH (Schwermetalle sind bei neutralem pH nur schlecht löslich (Lohse und Gallenkemper, 2001)).

Erwartungsgemäß wurden in unseren Proben nach Analyse durch ein externes Labor (Agrolab Group, AWW-Dr. Busse GmbH - Plauen) nur sehr geringe Schwermetallkonzentrationen und Anzahlen von pathogenen Keimen gefunden (Tabelle 5).

Tabelle 5. Schadstoff- und Pathogenkonzentrationen in 3 Düngemittelproben (P1-P3) bestehend aus P-angereicherten Hefen; n.n.: nicht nachweisbar

Parameter	Einheit	Methode	P1	P2	P3
Arsen (As)	mg/kg	DIN EN ISO 17294-2 (E 29)	<2,00	<2,00	<2,00
Blei (Pb)	mg/kg	DIN EN ISO 17294-2 (E 29)	<1,00	<1,00	<1,00
Cadmium (Cd)	mg/kg	DIN EN ISO 17294-2 (E 29)	<0,20	<0,20	<0,20
Chrom (Cr)	mg/kg	DIN EN ISO 17294-2 (E 29)	<5,00	<5,00	<5,00
Nickel (Ni)	mg/kg	DIN EN ISO 17294-2 (E 29)	<5,00	<5,00	<5,00
Quecksilber (Hg)	mg/kg	DIN EN 1483 / DIN EN 1483 (E 12)	<0,050	<0,050	<0,050
Thallium (Tl)	mg/kg	DIN EN ISO 17294-2 (E 29)	<0,10	<0,10	<0,10
Fäkalcoliforme Bakterien ( <i>E. coli</i> )	KBE/g	Kapitel IV. C 3. Methodenbuch der BGK	24	9,3	2,3
Salmonellen	in 50 g	Kapitel IV. C 1. Methodenbuch der BGK	n.n.	n.n.	n.n.

Sowohl die Schadstoffkonzentrationen, als auch die Pathogenkonzentrationen lagen in einem unbedenklichen Bereich. Alle getesteten Schwermetalle lagen unter der in Tab. 5 angegebenen Nachweisgrenze. Salmonellen wurden in 50 g Probenmaterial nicht gefunden und deutlich weniger KBE an Fäkalcoliformen nachgewiesen als durch die EU-Richtlinie 86/278/EEC (mit Novelle von 10/2010) für das Ausbringen von Klärschlamm gefordert wird ( $< 5 \cdot 10^5$  KBE pro g Feuchtsubstanz).

**Fazit zu Arbeitsschritt (IV): Der in Gefäßversuchen getestete Hefedünger ist in seiner Düngewirkung mit dem Mineraldünger Superphosphat zu vergleichen. Er enthält keine signifikanten Mengen an Schwermetallen und Pathogenen und ist den meisten anderen im Gefäßversuch getesteten P-Rezyklaten in der Düngewirkung überlegen.**

#### 4.5 (V) Einschätzung der Ergebnisse aus der Refixierung und der Düngemitteluntersuchung

Sowohl die Ergebnisse der Refixierungsversuche als auch die Ergebnisse der Düngemitteluntersuchung zeigen sehr positive Ergebnisse. Die Hefen nehmen den Phosphor aus der Lösung auf und speichern ihn intrazellulär in Form von Polyphosphaten. Die Aufnahme erfolgt innerhalb kurzer Zeit und in Abhängigkeit der extrazellulären P-Konzentration, wobei ein Bereich von 0,05-0,2 g P /l optimal zu sein scheint. Die gespeicherten Polyphosphate sind trotz Trocknung des Produktes (siehe Zwischenbericht 26.01.2016, DBU Projektnummer: 32062/01-32) sehr gut verfügbar für die Pflanzen, was ins besonders für die Versuchskultur Mais wichtig ist, da Mais als Jungpflanze nur über ein geringes P-

Lösungsvermögen verfügt und daher auf leicht verfügbare P-Quellen angewiesen ist (Jost, 2008). Hinsichtlich der Produktqualität gibt es auch keine Bedenken, da in keiner der 3 untersuchten Düngemittelchargen Schwermetalle oder Pathogene gefunden wurden. Resthefen aus dem Braubetrieb sind damit bedenkenlos als Hilfsmittel zur chemikalienfreien Rückgewinnung von Phosphor aus der Kläranlage verwendbar.

## 5. Diskussion der Ergebnisse

Alle zu Beginn des Projektes gesetzten Ziele wurden erreicht. Es wurde gezeigt, dass Phosphor effizient aus dem Überschussschlamm in die flüssige Phase gebracht werden kann und dann, nach Übertrag der Flüssigkeit in einen weiteren Reaktor, die Hefen in der Lage sind, den Phosphor aufzunehmen und intrazellulär zu speichern. In Zusammenarbeit mit allen Kooperations- und Projektpartnern konnte gezeigt werden, dass das Verfahren eine gute Alternative für all die Kläranlagen bieten könnte, die eine Brauerei im Umkreis von 50 km haben. Auch die im Teilprojekt 2 getesteten Sensoren haben das Ziel (die Verfolgung der Phosphorkonzentration in der Lösung) erreicht. Es können sowohl unterschiedliche Lösungen charakterisiert, als auch deren Phosphorkonzentration bestimmt werden.

Da das Verfahren und dessen Überwachung in der Laborversuchsstation erfolgreich war, kann davon ausgegangen werden, dass es im nächsten Schritt, der Anwendung direkt auf der Kläranlage, ebenfalls erfolgreich sein wird. Da es zudem sehr variabel eingesetzt werden kann, ist es möglich, zusätzlich zum Überschussschlamm noch andere Quellen einer Abwasseranlage für die Phosphorrückgewinnung zu nutzen. Tabelle 6 zeigt die theoretisch möglichen Mengen an verfügbaren Phosphor bezogen auf die PAO-Gehalte der einzelnen Stationen. Dabei wurde folgendes vorausgesetzt: 1 l Überschussschlamm setzt 0,178 g/l frei (siehe Punkt 4.1). In 1 l Überschussschlamm sind 19,5% PAOs enthalten (siehe Abbildung 8), d.h. 1% PAOs setzen 0,009 g P/l frei.

Tabelle 6. Theoretisch verfügbarer Phosphor (gespeichert in Polyphosphat-akkumulierenden Mikroorganismen (PAOs)) an verschiedenen Stellen der Kläranlage. BTM: Biotrockenmasse, VKB: Vorklärbecken, Bel: Belebung, ÜSS: Überschussschlamm, FT: Faulturm, Trüb: Trübwasser

	VKB	Bel	ÜSS	FT	Trüb
BTM [g/l]	0,33	4,28	10,3	33,3	0,8
P in Überstand [g/l]	0,005	0,003	0,026	0,358	0,074
PAO %	3,08	20,61	19,47	0,38	2,86
BTM-Faktor (% BTM von 1000 g)	0,0	0,4	1,0	3,3	0,1
Freisetzungspotential durch vorhandene PAOs [g/l]	0,028	0,186	0,176	0,003	0,026
Freisetzungspotential durch vorhandene PAOs [g/l] bezogen auf BTM	0,000	0,074	0,176	0,010	0,003
Summe Freisetzungspotential PAOs + P in Überstand [g/l]	0,005	0,077	0,202	0,368	0,077
Menge Schlamm bzw. Wasser/Tag [m <sup>3</sup> ]*	4800	8000	117	1800	52
erreichbarer P, wenn Behandlung Gesamtvolumen [kg/d]	24	616	23,6	662,4	4,004

\* Volumina für die Berechnung: Zulauf Vorklärung: 4800 m<sup>3</sup>/d, Volumen Belebung: 8000 m<sup>3</sup>, Anfall Überschussschlamm 117 m<sup>3</sup>/d, Volumen Faulturm: 1800 m<sup>3</sup>, Anfall Trübwasser: 52 m<sup>3</sup>/d

Ein Punkt, der die Verwendung des Verfahrens jedoch einschränken könnte, ist die Zulassung als Düngemittel und der Absatz dieser Düngemittel. Die Zulassung als Düngemittel wird sich mit der Novelle der EU-Düngemittel-Verordnung vereinfachen, aber generell ist es für P-Rezyklate schwierig, unter den gegenwärtigen Marktbedingungen einen guten Preis zu erzielen, der die Kosten der Rückgewinnung rechtfertigt (Aussage A. Lengemann, Berliner Wasserbetriebe, Dez. 2016). Daher werden die Kosten der Rückgewinnung auf den Kläranlagen hauptsächlich durch die Einsparung an Betriebskosten in Polymeranschaffung und Schlammentsorgung gedeckt. Viele kleinere Anlagen können sich das Marketing und den Verkauf der Rezyklate in personeller Hinsicht nicht leisten. Ursprünglich nur auf den Verkauf von Magnesium für die Rückgewinnung von Phosphor als MAP spezialisiert, hat die Firma Lehmann & Voss & Co. mit Sitz in Hamburg die Erfahrung gemacht, dass viele Anlagen die MAP zurück gewinnen, nicht wissen, was sie mit dem Produkt machen sollen. Daher haben sie dies zum Anlass genommen, in den folgenden Jahren den Aufbau einer Verkaufsplattform für P-Rezyklate zu realisieren, wo auf regionaler Ebene die Rezyklate verkauft werden können (Aussage Herr Sven Rosemann, Lehmann & Voss & Co., Hamburg, Dez. 2016). Eine Möglichkeit die Hefen als Dünger zu verwenden, bestünde also in der Teilnahme an einer solchen regionalen Verkaufsplattform. Allerdings wäre es auch möglich, die Hefen als hochreinen Rohstoff der Phosphorindustrie zur Verfügung zu stellen.

### **6. Öffentlichkeitsarbeit**

Es ist geplant, die erhaltenen Ergebnisse in einer nationalen Zeitschrift (beispielsweise in der Zeitschrift KA Korrespondenz Abwasser, Abfall der Deutschen Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.) zu publizieren. Ebenso werden die Ergebnisse im Rahmen der Frontiers International Conference on Wastewater Treatment (21-24 Mai 2017 – Palermo, Italien) vorgestellt. Weiterhin werden die Ergebnisse in einem halb-öffentlichen Vortrag (UMB-Forschungstag) am 06.04.2017 vorgestellt. Eine Patenteinreichung wird derzeit durch die UFZ-Administration geprüft.

### **7. Fazit**

Die Ergebnisse aus dem Projekt zeigen, dass die vorgestellte Methode eine Rückgewinnung des Phosphors aus dem Wässern und Schlämmen einer Kläranlage mit biologischer Phosphatelimination ermöglicht. Der dabei gewonnene Dünger ist nachweislich gut pflanzenverfügbar und schadstofffrei. Somit bietet die Methode eine Möglichkeit die Rückgewinnung von Phosphor überall dort zu betreiben, wo es z.B. durch eine nahegelegene Brauerei kostengünstige Resthefen gibt. Zur Überwachung des Prozesses wurden die von der Firma Centec entwickelten Sensoren positiv getestet. Die Sensoren sind in der Lage auf Basis von Ultraschall und Dichte verschiedener Lösungen zu charakterisieren und den Phosphorgehalt zu bestimmen.

## 8. Literaturangaben

AbfklärV, Klärschlammverordnung vom 15. April 1992 (BGBl. I S. 912), die zuletzt durch Artikel 5 Absatz 12 des Gesetzes vom 24. Februar 2012 (BGBl. I S. 212) geändert worden ist

Bayerisches Landesamt für Umwelt. Rückholbarkeit von Phosphor aus kommunalen Klärschlämmen, Abschlussbericht, 2015.

Blackall L.L., Crocetti G.R., Saunders A.M., Bond P.L. (2002) A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 681–691.

Botha A. (2011) The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1-8.

Britton, A. (2009) Crystal Green® - Struvite fertilizer recovered from wastewater. Baltic 21 Conference, Sept 28, 2009.

Conrad R., Klose M., Claus P. (2000) Phosphate inhibits acetotrophic methanogenesis on rice roots, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 828–831.

Cordero-Bueso G., Arroyo T., Serrano A., Tello J., Aporta I., Vélez M.D., Valero E. (2011) Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 132–139.

Deutscher Brauerbund (2016) Zahl deutscher Brauereien wächst weiter. Pressemitteilung, Berlin, 8. März 2016.

Dienemann C., Utermann J. *Uran in Boden und Wasser*. UBA 2012: <http://www.uba.de/uba-info-medien/4336.html>.

DWA (2015) DWA-Stellungnahme Verordnung zur Neuordnung der Klärschlammverwertung Referentenentwurf vom 31. August 2015 Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.

Günther S., Faust K., Schumann J., Harms H., Raes J., Müller S. (2016) Species-sorting and mass-transfer paradigms control managed natural metacommunities. *Environmental Microbiology* 2016, doi: 10.1111/1462-2920.13402.

Günther S., Koch C., Hübschmann T., Röske I., Müller R.A., Bley T., Harms H., Müller S. (2012) Correlation of community dynamics and process parameters as a tool for the prediction of the stability of wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, 46: 84-92.

Günther S., Trutnau M., Kleinstüber S., Hause G., Bley T., Röske I., Harms H., Müller S. (2009) Dynamics of polyphosphate accumulating bacteria in waste water communities detected via DAPI and tetracycline labelling. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2111-2121.

Hoffmann A. (2008) Nährstoffgehalte in Klärschlämmen. LUFA Nord-West, <http://www.lufa-nord-west.de/index.cfm/nav/53/article/41.html>

Jardin N., Pöpel H.J. (1996) Behavior of waste activated sludge from enhanced biological phosphorous removal during sludge treatment. *Water Environment Research* 68(6), 965–973.

Jost J. (2008) Ein hervorragender Hofdüngerverwerter. *UFA-REVUE*, 44-46.

Koch C., Günther S., Desta A.F., Hübschmann T., Müller S. (2013) Cytometric fingerprinting for analysing microbial intra-community structure variation and identifying sub-community function *Nature Protocols* 8(1), 190-202.

Kopp J. (2009) *Theoretische Grundlagen zur Entwässerbarkeit von Schlämmen*. Fachtagung der VSA-Kommission «ARA» vom 13. März 2009, URL: <http://www.vsa.ch/publikationen/verbandsberichte/589/>.

Kulaev I.S. (1994) Inorganic polyphosphate functions at a various stages of cell evolution. *J. Biol. Phys.*, 20 (1994), pp. 255–273.

Kulakovskaya T. (2015) Phosphorus storage in Microorganisms: Diversity and Evolutionary Insight. *Biochem Physiol* 4:e130. doi: 10.4172/2168-9652.1000e130.

- Lohse M., Gallenkemper B. (2001) Schwermetalle in Abwässern von Restabfallvergärungsanlagen. Institut für Abfall- und Abwasserwirtschaft e. V. Ahlen.
- Markham E., Byrne, W. J. (1967). Uptake, storage and utilization of phosphate by yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 73: 271–273.
- Montag, D.M. (2008) Phosphorrückgewinnung bei der Abwasserreinigung – Entwicklung eines Verfahrens zur Integration in kommunale Kläranlagen. Dissertation der Fakultät für Bauingenieurwesen der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.
- Moreno S.N.J., Docampo R. (2013) Polyphosphate and Its Diverse Functions in Host Cells and Pathogens. *PLoS Pathog* 9(5): e1003230. doi:10.1371/journal.ppat.1003230.
- Mukherjee C., Chowdhury R., Ray K. (2015) Phosphorus recycling from an unexplored source by polyphosphate accumulating microalgae and cyanobacteria—a step to phosphorus security in agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 6:1421.
- Mulkerrins D., Dobson A.D.W., Colleran, E. (2004) Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. *Environment International*, 30: 249–259.
- Shalaby M.E., El-Nady M.F. (2008) Application of *Saccharomyces cerevisiae* as a biocontrol agent against *Fusarium* infection of sugar beet plants. *Acta Biologica Szegediensis*, 52:271-275.
- Urech K., Dürr M., Boller T., Wiemken A., Schwencke J. (1978) Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, Volume 116, Issue 3, pp 275-278.
- Vagabov, V.M., Trilisenko, L.V., Kulaev, I.S. (2000) Dependence of inorganic polyphosphate chain length on the orthophosphate content in the culture medium of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry Moscow*, 65: 349–355.
- Whang L.M., Park J.K. (2006) Competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in enhanced-biological-phosphorus-removal systems: effect of temperature and sludge age. *Water Environ Res.* 78(1):4-11.

## Anlagen

## Kooperationsvereinbarung UFZ-Centec und assoziierte Partner