

Verbesserung der Klärschlammmentwässerung durch den Abbau der extrazellulären polymeren Substanzen (SpaltEPS)

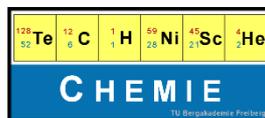
Az. 32909/01

Prof. Dr. M. Bertau (TU Freiberg), Dipl.-Ing. B. Simbach (POLL), Dr. I. Auel,
Dipl.-Chem. R. Kiehle, Dipl.-Chem. D. Kaiser, Dipl.-Nat. R. Tröbs

Institut für Technische Chemie, TU Bergakademie Freiberg

sowie

POLL Umwelt- und Verfahrenstechnik GmbH



Projektbeginn: 01.03.2016

Laufzeit: 18 Monate

Freiberg, 12. Januar 2018

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az.	32909 01	Referat	Fördersumme	93.731 €
Antragstitel	Verbesserung der Klärschlammmentwässerung durch den Abbau der extrazellulären polymeren Substanzen (SpaltEPS)			
Stichworte	Extrazelluläre Substanzen, Klärschlammmentwässerung, enzymatische Depolymerisation			
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)	
18 Monate	01.03.2016	31.08.2017		
Zwischenbericht	28.02.2017			
Bewilligungsempfänger	Prof. Dr. M. Bertau	Tel	03731/39-2384	
	Technische Universität Bergakademie Freiberg	Fax	03731/39-2324	
	Institut für Technische Chemie	Projektleitung	Prof. Dr. M. Bertau	
	Leipziger Str. 29	Bearbeiter	I. Aabel	
	09599 Freiberg			
Kooperationspartner	POLL Umwelt- und Verfahrenstechnik GmbH; Lünener Straße 2c; 59379 Selm			

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Die maschinelle Entwässerung kommunaler Klärschlämme ist einer der wichtigsten Verfahrensschritte innerhalb der Klärschlammbehandlung. Die erreichbaren Trockenrückstandsgehalte in der Feststofffraktion werden vor allem durch die Wassereinlagerungen im Klärschlamm bestimmt, wobei zwischen freiem und gebundenem Wasser unterschieden wird. Bisher werden große Teile der anfallenden Klärschlammengen landwirtschaftlich (stofflich) genutzt oder im Rahmen der Mitverbrennung in Kohlekraftwerken oder Müllverbrennungsanlagen entsorgt. Durch die Änderung in der Gesetzgebung ist die Ausbringung von Klärschlamm und somit eine landwirtschaftliche Nutzung nur noch möglich, wenn die Klärschlämme die Grenzwerte der Düngemittelverordnung einhalten. Durch politische Entscheidungen nimmt die Bedeutung der Klärschlammverwertung durch Verbrennung zu. Da gleichzeitig der stofflichen gegenüber der energetischen Verwertung eine höhere Bedeutung eingeräumt wird, wird zwangsläufig eine Zunahme von Klärschlamm-Monoverbrennungsanlagen zu verzeichnen sein. Um die Monoverbrennung aus wirtschaftlichen und ökologischen Gesichtspunkten sinnvoll zu gestalten, ist die Steigerung der Entwässerungsleistung bei der Klärschlammbehandlung entscheidend. Die heute gängigen Trenntechniken greifen dabei ausschließlich das freie Wasser und nicht das gebundene Wasser an, was zu großen Teilen in Mikroorganismen und deren extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet ist. Da die EPS den Anteil des gebundenen Wassers maßgeblich bestimmen, soll im Rahmen des Projektes die enzymatische Spaltung der EPS zur Freisetzung des bisher für die Entwässerung nicht zugänglichen, gebundenen Wassers eingesetzt werden. Sollte es gelingen, die EPS gezielt zu spalten, so ist eine deutliche Steigerung der Entwässerungsleistung von Klärschlämmen (Steigerung TR-Gehalt) zu erwarten. Daraus ergeben sich Vorteile sowohl aus ökologischer als auch ökonomischer Sicht bei der Klärschlammverwertung. In SpaltEPS wird an den folgenden Zielsetzungen mit Wirksamkeit im Sinne des vorbeugenden Umweltschutzes gearbeitet:

- Höhere Entwässerung von Klärschlämmen durch den enzymatischen Angriff auf die EPS – Zugang zu bisher für die Trennung unzugänglichen Wasseranteilen
- Screening nach Enzymen und Enzymgemischen, die ein optimales Wasserabgabeverhalten ermöglichen
- Einsparung von Energie in Form von Treibstoff und Verringerung des CO₂-Footprints beim Transport und bei Trocknungsprozessen vor der Verbrennung von Klärschlämmen durch die bessere Entwässerung.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Aufgrund des vielseitigen strukturellen Aufbaus der EPS wird am Anfang des Projektes ein Enzymscreening durchgeführt, um den Einfluss unterschiedlicher Enzyme (z.B.: Lipasen, Esterasen, Proteasen) auf das Wasserabgabeverhalten von Klärschlämmen zu untersuchen. Im Rahmen dessen werden bei geeigneten Enzymen Untersuchungen zu Verweilzeiten, Enzymbeladungen sowie weiteren Prozessparametern (T, p, pH) durchgeführt. (AP2) Begleitend zu den Screeningversuchen werden Filtrationsuntersuchungen zur Bestimmung des Wasserabgabeverhaltens und Beurteilung der Trennleistung für die ökonomische und ökologische Bewertung vorgenommen. (AP3) Des Weiteren wird in Kooperation mit der Firma POLL der Einfluss der enzymatischen Behandlung auf den Einsatz von polymeren Flockungsmitteln im Bereich der Klärschlamm-Entwässerung untersucht. Für eine technische Bewertung werden ausgewählte Versuche in den kleintechnischen Maßstab übertragen und die Separation an einem Labordekanter auf die technische Übertragbarkeit überprüft. (AP4) Für die wissenschaftliche Bewertung der enzymatischen Spaltung von EPS werden über die gesamte Projektzeit umfangreiche Analysen (AP1) hinsichtlich der EPS-Zusammensetzung durchgeführt. Zudem wird der Einfluss der Behandlungsschritte auf die Zusammensetzung der Schlammfraktion sowie der Flüssigphase auf Basis der Methoden aus den DWA-Regelwerken durchgeführt. Generell stehen für die technische Bewertung der enzymatischen Spaltung von EPS am Institut für Technische Chemie (GC, HPLC beide mit MS-Kopplung; HT-TG/DSC/MS, IR, UV-VIS etc.) umfangreiche Analysemethoden zur Verfügung. Durch die Firma POLL wird der Zugang zu Klärschlammproben von unterschiedlichen Anlagen (auch mit jahreszeitlichen Einflüssen) sichergestellt (AP5).

Ergebnisse und Diskussion

Durch die Entwicklung bzw. Anpassung verschiedener Methoden der EPS-Analytik (AP 1) und der damit einhergehenden Analyse verschiedener Klärschlämme konnten wichtige regionale und jahreszeitliche Einflüsse für die Klärschlamm-Entwässerung herausgearbeitet werden. Die enzymatische Hydrolyse von Klärschlämmen konnte für Proteasen, Lipasen und Cellulasen nachgewiesen werden (AP 2). Dabei konnte für Proteasen ein Einfluss auf die Partikelgröße sowie ein Proteineintrag in die Flüssigphase nachgewiesen werden. Für die Lipasen und Cellulasen konnten ebenfalls aufgrund der zu erwartenden Reaktionen vornehmlich Lipide bzw. Zucker als Spaltprodukte der EPS im Überstand nachgewiesen werden. Die Spaltung der EPS gelang dabei ohne pH-Wertregulation und bei einer Prozesstemperatur von 37 °C, die aufgrund der zu erwartenden Restwärme des Klärschlammes einer technischen Anwendung entgegenkommt sowie einer geringen Inkubationszeit von nicht mehr als 4 h.

In vergleichenden Filtrationsuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die enzymatische Hydrolyse mit Lipasen, Cellulasen und Proteasen Einfluss auf das Entwässerungsverhalten der Klärschlämme hat. Im Besonderen konnten durch den Einsatz von Lipasen eine Steigerung der TS-Gehalte in der Feststofffraktion von 6,7 auf 10 % (Vergleich mit der Blindprobe) erzielt werden. (AP 3/4)

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Ergebnisse, die innerhalb des Projektes gewonnen wurden, sind im Rahmen von Tagungen, wie der TerraTec und den DWA Klärschlammtagen präsentiert worden. Darüber hinaus gab es einen Fachartikel „Phosphorrückgewinnung aus Klärschlamm“ in der Zeitschrift W&A Wasser und Abwasser Technik in der Ausgabe Oktober 2017 von B. Simbach (<https://wasser-abwasser-technik.com/phosphorrueckgewinnung-aus-klaerschlamml/>). Des Weiteren erfolgten viele Fachgespräche zum EPS-Abbau und Schlamm-Entwässerung mit zum Beispiel: WVER (Wasserverband Eifel-Rur), Düren;

EG/LV (Emschergenossenschaft / Lippeverband), Dinslaken; hanseWasser GmbH, Bremen; Institut für Siedlungswasserwirtschaft, Ruhr-Universität Bochum.

Fazit

Die Spaltung von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) in Klärschlämmen ist mittels enzymatischer Hydrolyse unter dem Einsatz von Lipasen, Proteasen und Cellulasen möglich. Durch die Spaltung werden Lipide, Proteine, Huminstoffe und Zucker, welche Bestandteile der EPS sind, in die Flüssigphase eingetragen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Hydrolyse ohne pH-Wertregulation und Temperaturkontrolle zu einer ausreichend starken ESP-Spaltung führt sowie Veränderungen im Entwässerungsverhalten der Klärschlämme nachweisbar sind. Dabei wird der Einsatz von Lipasen am vielversprechendsten eingeschätzt, da eine Steigerung der TS-Gehalte in der Feststofffraktion um $\approx 3\%$ erzielt wurde. Zudem zählen Lipasen zu kommerziell gut zugänglichen Enzymen und sind somit verhältnismäßig kostengünstig zu erwerben. Die Erhöhung der Trockensubstanz im Feststoff nach der Klärschlammmentwässerung durch die enzymatische Behandlung kann sich positiv auf den CO₂-Footprint im Bereich der Klärschlammbehandlung auswirken. Die Energieeinsparung im Bereich des Klärschlammtransportes sowie der Trocknung und Verbrennung haben zudem erheblichen Einfluss auf die Wirtschaftlichkeit im Bereich der Klärschlammverwertung.

Inhaltsangabe

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	IX
1 Anlass und Zielsetzung des Projektes	1
2 Material und Vorgehensweise	3
2.1 Probenmaterial	3
2.2 Analysenmethoden	3
2.2.1 Trockenrückstand	3
2.2.2 Glührückstand	3
2.2.3 Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs	4
2.2.4 Bestimmung des Kjeldahl-Stickstoffs	4
2.2.5 Bestimmung von Kationen und Anionen.....	4
2.2.6 Bestimmung von TC, TIC, TOC und TNb	5
2.2.7 Analyse der Gesamtheit aller reduzierender Zucker.....	5
2.2.8 Bestimmung von Protein- und Huminstoffgehalt	5
2.2.9 Proteinbestimmung – Bradford.....	6
2.2.10 EPS-Extraktion	7
2.3 Enzymaktivität.....	7
2.3.1 Protease-Aktivitätstest	7
2.3.2 Lipase-Aktivitätstest	8
2.3.3 Cellulase-Aktivität.....	9
2.3.4 Pektinase/ Polygalacturonase-Aktivität	10
2.3.5 Amylase-Aktivität.....	10
2.3.6 Lipid-Bestimmung.....	11
2.4 Hydrolyse von Klärschlammproben	11
2.4.1 Enzymatische Hydrolyse des Faulschlammes – Enzymscreening	11

2.4.2	Enzymatische Hydrolyse des Faulschlammes – Filtration	12
2.5	Flockungsuntersuchungen – Partikelgrößenuntersuchung	12
2.5.1	Partikelgrößenbestimmung	12
2.5.2	In-situ-Partikelgrößenbestimmung	12
2.6	Filtrationsversuche	13
2.7	Rheometer	13
2.8	In-situ Verfolgung der enzymatischen Hydrolyse	13
2.9	EPS-Extraktion	13
2.9.1	Zentrifugation	13
2.9.2	Extraktion der EPS im Gärprodukt	14
2.9.3	Ultraschall-Extraktion	14
2.9.4	Alkalische Extraktion	14
2.9.5	Abtrennung und Bestimmung von EPS unter Verwendung von Kationenaustauscharzen	15
3	Ergebnisse und Diskussion	16
3.1	Charakterisierung der Faulschlämme	16
3.2	Methodenentwicklung/-weiterentwicklung (AP1)	17
3.2.1	Lipidanalytik	18
3.2.2	EPS-Extraktion	19
3.2.3	Vorbehandlung für die Extraktion	20
3.2.4	Ultraschall-Extraktion	20
3.2.5	Alkalische Extraktion	22
3.2.6	Abtrennung von EPS mittels Kationenaustauscharzen	24
3.2.7	Vergleich der angewendeten Extraktionsmethoden	25
3.3	Enzymscreening (AP2)	25
3.3.1	Lipasen	26
3.3.2	Proteasen	32
3.3.3	Cellulase	35
3.4	Einfluss der enzymatischen Behandlung der Faulschlämme auf die Partikelgrößenverteilung	40

3.5	Fest-Flüssig-Separation – Einfluss von polymeren Flockungsmittel (AP3/4)...	44
4	Öffentlichkeitsarbeit	52
5	Fazit und Ausblick.....	53
	Literaturverzeichnis	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Bestimmung der Protein- und Huminstoffkonzentration in Abhängigkeit vom Leistungseintrag bei gleichbleibender Versuchszeit von 5 min unter Einsatz der 2-stufigen Extraktionsmethode.....	21
Abbildung 3-2: Bestimmung der Protein- und Huminstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer bei konstanter Leistung von 320 W.....	22
Abbildung 3-3: Bestimmung der Protein- und Huminstoffkonzentration im Extrakt nach der alkalischen Extraktion	23
Abbildung 3-4: Bestimmung der Protein- und Huminstoffkonzentration im Extrakt mit Kationenaustauscherharz Dowex 50 W x 8	24
Abbildung 3-5: Untersuchungen zu EPS-Spaltung unter Einsatz der Lipase aus <i>Thermomyces lanuginosus</i> in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bzw. Aktivität; bei 37 °C; für 24 h.....	27
Abbildung 3-6: Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels der Lipase aus <i>Thermomyces lanuginosus</i> ; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von 56.000 U/g _{oTS}	28
Abbildung 3-7: Untersuchungen zu EPS-Spaltung unter Einsatz der Lipase CalA aus <i>Candida sp.</i> in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bzw. Aktivität; bei 37 °C; für 24 h.....	29
Abbildung 3-8: Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels der Lipase CalA aus <i>Candida sp.</i> ; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von $87 \cdot 10^6$ U/g _{oTS}	30
Abbildung 3-9: Untersuchungen zu EPS-Spaltung unter Einsatz der Lipase Fe-01 von ASA Spezialenzyme in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bzw. Aktivität; bei 37 °C; für 24 h.....	31
Abbildung 3-10: Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels Protease aus <i>Bacillus licheniformis</i> ; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von 3.000 U/g _{oTS}	33

Abbildung 3-11: Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels Protease aus <i>Bacillus sp.</i> ; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von 3.000 U/g _{oTS}	34
Abbildung 3-12: Untersuchungen zu EPS-Spaltung unter Einsatz einer Protease aus <i>Bacillus licheniformis</i> in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bzw. Aktivität; bei 37 °C; für 24 h.....	35
Abbildung 3-13: Einfluss der enzymatischen Hydrolyse mit Cellulasen (50 U/g _{oTS}) auf die Abgabe von Zucker, Huminstoffen, Proteinen und Lipiden in die flüssigen Phase von Faulschlamm.....	36
Abbildung 3-14: Einfluss der Behandlung der Schlämme mit Cellulasen auf die Färbung der wässrigen Phase.....	37
Abbildung 3-15: Einfluss der Cellulasekonzentration auf die Spaltung der EPS anhand der Freisetzung von Zuckern, Proteinen und Huminstoffen.....	38
Abbildung 3-16: Untersuchungen hinsichtlich der Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels Cellulasen aus <i>Penicillium veruculosum</i> ; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von 50 FPU/g _{oTS}	39
Abbildung 3-17: Summarische Auftragung der Partikelgrößenverteilung von unbehandelten und enzymatisch-behandelten Faulschlamm.....	41
Abbildung 3-18: Summarische Darstellung der Partikelgrößenverteilung von autoklavierten und enzymatisch-behandelten Gärresten.....	42
Abbildung 3-19: in-situ-Aufzeichnung der Partikelgrößenverteilung bei enzymatischen Hydrolyse von Faulschlamm mit einer Lipase von <i>Thermomyces lanuginosus</i>	43
Abbildung 3-20: Flockungsuntersuchungen unter Einsatz eines Flockulator; Vergleich unterschiedlicher Flockungsmittelkonzentration auf Klärschlammproben.....	45
Abbildung 3-21: Auswirkungen auf die Filtrationsleistungen durch den Einsatz unterschiedlicher Polymerdosierungen.....	46
Abbildung 3-22: Vergleich der gewonnenen Permeatmengen in Abhängigkeit von der Polymerdosierung nach 200 s und 360 s.....	47
Abbildung 3-23: Einfluss der Polymerkonzentration auf die Trübung des Permeats sowie TS-Gehalt der flüssigen sowie festen Phase nach der Filtration.....	48

Abbildung 3-24: Darstellung der Filtrationskurven in Abhängigkeit von der enzymatischen Hydrolyse bei einer Polymerdosierung von 1 % bezogen auf die Trockensubstanz des Faulschlammes 49

Abbildung 3-25: Einfluss der enzymatischen Hydrolyse sowie der Polymerdosierung auf die TS-Gehalt in der flüssigen sowie festen Fraktion nach der Filtration 50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Geräteparameter zur Bestimmung der Kationen und Anionen mittels Ionenchromatographie	4
Tabelle 2-2: Zusammenstellung der Kalibrierlösungen für die Bestimmung der Protease-Aktivität.....	8
Tabelle 3-1: Zusammenfassung wichtiger Kennwerte für ausgefaulten Klärschlamm ..	16
Tabelle 3-2: Zusammenstellung der optimalen pH-Werte und Temperaturen der getesteten Lipasen.....	26
Tabelle 3-3: Zusammenstellung der optimalen pH-Werte und Temperaturen der getesteten Lipasen.....	32
Tabelle 3-4: Einfluss der Behandlungsmethode auf den Anteil von Partikel < 10 µm ...	43

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
aTS	Anorganische Trockensubstanz
BSA	Rinderserumalbumin
C.	<i>Candida</i>
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
dest.	destilliert
DNS	3,5-Dinitrosalicylsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
EW	Einwohner
FS	Faulschlamm
IC	Ionenchromatographie
IR	Infrarotspektroskopie
konz.	konzentriert
oTS	Organische Trockensubstanz
P.	<i>Penicillium</i>
PET	Polyethylenterephthalat
PP	Polypropylen
rpm	Umdrehung pro Minute
sp.	species
TC	Gesamter Kohlenstoffgehalt
TIC	Gesamter anorganischer Kohlenstoffgehalt
TNb	Gesamter gebundener Stickstoffgehalt
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoffgehalt
TR	Trockenrückstand
U	Unit

Zusammenfassung

Ziel des Projektes ist die enzymatische Spaltung extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) zur Verbesserung der Klärschlamm entwässerung. EPS sind biologische Polymere bestehend u.a. aus Sacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden. Es ist bekannt, dass aufgrund ihrer Struktur die EPS einen großen Anteil des Wassers der Klärschlämme binden und somit bei der mechanischen Entwässerung nur eine unzureichende Entwässerung erreicht wird. Durch eine gezielte enzymatische Spaltung der EPS soll es gelingen, dieses gebundene Wasser freizusetzen und somit die Entwässerung zu verbessern.

In der ersten Projekthälfte wurden am Institut für Technische Chemie der TU Bergakademie Freiberg in Zusammenarbeit mit der POLL Umwelt- und Verfahrenstechnik GmbH umfassende Untersuchungen zur enzymatischen EPS-Spaltung durchgeführt. Anfänglich wurde eine umfassende Charakterisierung der Faulschlämme vorgenommen. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen deutliche jahreszeitliche Schwankungen der Zusammensetzung, weswegen bei vergleichenden Untersuchungen zur Bestimmung von Effekten der enzymatischen Hydrolyse immer Proben der gleichen Kläranlagen und aus der gleichen Charge mit identischen Lagerungsbedingungen genutzt wurden.

Bei der Behandlung der Faulschlämme mit Proteasen, Lipasen und Cellulasen konnten Veränderungen der Faulschlammstruktur nachgewiesen werden. Beim Einsatz von Proteasen konnte die Freisetzung von Proteinen sowie eine Verringerung der Partikelgrößen beobachtet werden. Dies deutet auf eine erfolgreiche Spaltung der EPS hin. Bei den Untersuchungen mit Lipasen zeigte sich, dass bei Verwendung verschiedener Lipasen nicht immer Lipide freigesetzt wurden aber dennoch strukturelle Änderungen der EPS aufgetreten sind. Bei der Behandlung mit Cellulase konnten Zucker als Spaltprodukte der EPS nachgewiesen werden und zwar auch unter den vom Faulschlamm bestimmten pH-Wert-Bedingungen sowie einer Prozesstemperatur von 37 °C. Generell führten alle enzymatischen Hydrolysen mit den untersuchten Enzymen ohne pH-Wertkontrolle und bei 37 °C, was im mesophilen Bereich liegt und der Rest-

/Eigenwärme des Faulschlammes nach der Faulung entspricht, zur teilweisen Spaltung der EPS. Im Rahmen der Prozessoptimierung zeigte sich, dass Inkubationszeiten von mehr als 4 h nicht sinnvoll sind, da dann auch wieder Konkurrenzreaktionen auftreten können.

In vergleichenden Filtrationsuntersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die enzymatische Hydrolyse mit Lipasen, Cellulasen und Proteasen einen Einfluss auf das Entwässerungsverhalten der Klärschlämme hat. Im Besonderen konnten durch den Einsatz von Lipasen eine Steigerung der TS-Gehalte in der Feststofffraktion von 6,7 auf 10 % (Vergleich mit der Blindprobe) erzielt werden. Dies ist auch für den technischen Einsatz einer möglichen enzymatischen Hydrolyse interessant, da Lipasen im Vergleich zu vielen anderen Enzymen kostengünstig erworben werden können.

1 Anlass und Zielsetzung des Projektes

Im Rahmen des Projektes sollten Möglichkeiten zur Steigerung der Entwässerung von Klärschlämmen durch die enzymatische Spaltung von extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS) eruiert werden.

Aufgrund neuer Richtlinien (Novellierung der AbfKlärV, Kreislaufwirtschaftsgesetz, Düngemittelverordnung) wird die bisherige stoffliche Nutzung von Klärschlämmen in der Landwirtschaft stark eingeschränkt, sodass neue Verwertungsstrategien für Klärschlämme entwickelt werden müssen. Eine weitdiskutierte Option stellt die energetische Verwertung dar, in deren Anschluss die erhaltenen Klärschlammaschen wieder einer stofflichen Verwertung zugeführt werden sollen. Dabei hängt eine wirtschaftliche sowie ökologisch tragbare Verbrennung der Klärschlämme von der Leistungsfähigkeit der vorgeschalteten mechanischen Entwässerung ab. Durch mechanische Entwässerungsverfahren mittels Dekanter, Schnecken-, Siebband- oder Band- oder Kammerfilterpressen wird eine erhebliche Volumenreduzierung des Klärschlammes mit variierenden Trockenrückständen von 20 – 40 %, ^[1] wobei die heutzutage technisch erreichbare obere Grenze bei ca. 28 % Trockenrückstand (TR) liegt, ^[2] erzielt. Durch eine effiziente Volumenreduzierung sowie Entwässerung können dabei erhebliche Einsparungen bei den Kosten sowie den Energieträgern für den Klärschlammtransport sowie die Klärschlamm Trocknung genutzt werden. ^[3,4]

Dabei haben die Schlammeigenschaften eine besondere Bedeutung für die Entwässerbarkeit und diese werden im erheblichen Maße durch die Prozessführung der biologischen Reinigungsstufe, die Behandlung des Überschussschlammes und die Art der Phosphorelimination bestimmt, denn diese Verfahrensstufen haben Einfluss auf die Bildung extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), welche wiederum Auswirkung auf die Entwässerung haben, da sie die Wasserverteilung im Klärschlamm und den Anteil des gebundenen Wassers ^[2] maßgeblich bestimmen. Das gebundene Wasser kann dabei durch heutige Trenntechniken nicht dem Klärschlamm entzogen werden und bei der heutigen Schlammkonditionierung mit polymeren Flockungsmitteln kann allein die Wasserabgabegeschwindigkeit beeinflusst werden. ^[5]

Das Ziel der Arbeit bestand darin, Informationen zu gewinnen, ob es technisch möglich ist, durch eine gezielte Veränderung der EPS die Entwässerbarkeit von Klärschlämmen zu verbessern. Die EPS sollten durch den Einsatz von Enzymen aufgespalten werden, um das bisher nicht zugängliche gebundene Wasser bei der mechanischen Trennung aus der Schlammfracht entfernen zu können.

Folgende Fragen sollten im Rahmen des Projektes im Sinne des vorbeugenden Umweltschutzes betrachtet werden:

- 1) Können durch den enzymatischen Angriff der EPS bisher bei der Trennung unzugängliche Wasseranteile angegriffen werden?
- 2) Existieren Enzyme, die ein optimales Wasserabgabeverhalten ermöglichen bzw. begünstigen?
- 3) Inwiefern könnte ein enzym-basiertes Verfahren positiven Einfluss auf die Einsparung von Energie in Form von Treibstoff sowie zu einer Verringerung des CO₂-Footprints (!) beitragen?

2 Material und Vorgehensweise

2.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde von unterschiedlichen Kläranlagen zur Verfügung gestellt. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse und Untersuchungen sicherzustellen, wurden alle Screening-Versuche, Methodenentwicklungen sowie Optimierungen an Proben der Freiberg Kläranlage durchgeführt. Aufgrund der räumlichen Nähe konnte der Probenzugang sowie die Kühlung der Proben sichergestellt werden.

Probenmaterial wurde bis zur Versuchsdurchführung bei 4 °C gelagert, um eine Veränderung durch weitere mikrobielle Abbau- bzw. Umsetzungsreaktionen gering zu halten.

2.2 Analysenmethoden

2.2.1 *Trockenrückstand*

Der Trockenrückstand wurde mittels Halogen-Feuchtebestimmer HB 43 von Mettler Toledo bei 105 °C bestimmt.

2.2.2 *Glührückstand*

Zur Bestimmung des Glührückstandes wurden 0,5 bis 1 g des Trockenrückstandes in einen Keramiktiegel (vorher 2 h bei 550 °C gegläht; über Nacht im Exsikkator abgekühlt) eingewogen und danach bei 550 °C für 2 h im Muffelofen gegläht. Anschließend wurde der Tiegel über Nacht im Exsikkator abgekühlt und ausgewogen. Die Bestimmung erfolgte als Vierfachmessung.

Der Rückstand im Keramiktiegel ist die anorganische Trockensubstanz. Die Differenz zwischen Einwaage (Trockenrückstand) und anorganischer Trockensubstanz entspricht der organischen Trockensubstanz.

2.2.3 Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs

Die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) erfolgte nach DIN 38409 (41-2).

2.2.4 Bestimmung des Kjeldahl-Stickstoffs

Der organische Stickstoff wurde nasschemisch als Kjeldahl-Stickstoff nach DIN EN 25 663 (H11) bestimmt.

2.2.5 Bestimmung von Kationen und Anionen

Die Probe wurde zweimal bei 13.000 rpm für je 15 min zentrifugiert und anschließend mittels Polyethersulfon-Spritzenaufsatzfilter (0,2 µm) filtriert. Danach erfolgte die Verdünnung der Probe mit dest. Wasser (1:5) und die Analyse mittels Ionenchromatographie (IC). Auf diese Weise wurden der Gehalt an Phosphat-, Nitrat-, Sulfat- und Chlorid-Ionen bzw. Na⁺, K⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺ als Kationen bestimmt.

Zur Analyse wurde der ICS-1100 von Thermo Fisher verwendet, wobei folgende Einstellungen Anwendung fanden:

Tabelle 2-1: Geräteparameter zur Bestimmung der Kationen und Anionen mittels Ionenchromatographie

	Anionen	Kationen
Vorsäulen	IonPac AG22	IonPac CG16
Hauptsäulen	IonPac AS22	IonPac CS16
Injektionsvolumen	10 µL	10 µL
Eluent	3 mM NaHCO ₃ / 3 mM Na ₂ CO ₃	30 mM Methylsulfonsäure (MSA)
Fluss	1,2 mL/min	1,2 mL/min
Detektion	Leitfähigkeitsdetektor mit vorgeschaltetem Supressor (ASRS 300)	Leitfähigkeitsdetektor mit vorgeschaltetem Supressor (CERS 300)

2.2.6 *Bestimmung von TC, TIC, TOC und TN_b*

Für die Bestimmung des TC, TIC, TOC, sowie TN_b der Flüssigproben wurde der multi N/C 2100 von Analytik Jena AG verwendet. Die Messungen erfolgten unter Verwendung der vom Hersteller erstellten Standardmethoden.

2.2.7 *Analyse der Gesamtheit aller reduzierender Zucker*

Die Konzentration reduzierender Zucker wurde mittels DNS-Methode bestimmt. Dafür wurde 1 mL Probe mit 3 mL DNS-Reagenz (7,5 g/L 3,5-Dinitrosalicylsäure; 14 g/L NaOH; 290,2 g/L Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat) versetzt und 5 min in siedendem Wasser inkubiert. Nach Abkühlen der Probe wurden 10 mL dest. Wasser hinzugefügt und die Probe bei 540 nm mittels UV/Vis-Spektrometer vermessen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels Standardadditionsmethode. Dafür wurden zusätzlich zur eigentlichen Probe zwei weitere Proben vermessen, zu denen einmal 5 µL und einmal 10 µL einer 0,1 M Glucoselösung gegeben wurden. Die Behandlung dieser Proben erfolgt analog zu den Ursprungsproben.

2.2.8 *Bestimmung von Protein- und Huminstoffgehalt*

Zur Bestimmung des Protein- und Huminstoffgehalts wurde die nach Frølund et al. ^[6,7] modifizierte Lowry-Methode unter Verwendung folgender Lösungen durchgeführt:

Lowry **A**: 143 mM Natriumhydroxid (5,7 g/L)
 270 mM Natriumcarbonat-Decahydrat (38,6 g/L)

Lowry **B**: 57 mM Kupfersulfat-Pentahydrat (14,3 g/L)

Lowry **C**: 124 mM Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat (35 g/L)

Am Tag der Analyse wurden aus den Stammlösungen folgende Reagenzien frisch hergestellt:

Proteine – Lowry **1**: Lowry **A** 9,8 mL + Lowry **B** 0,1 mL + Lowry **C** 0,1 mL
 (100:1:1)

Huminstoffe – Lowry **2**: Lowry **A** 9,8 mL + H₂O 0,1 mL + Lowry **C** 0,1 mL (100:1:1)

Folin-Ciocalteus-Reagenz 1:2 Verdünnung des 1 mol/L Phenolreagenz mit dest. Wasser

Dabei wurde zunächst Lowry **B** mit **C** versetzt und im Anschluss Lowry **A** hinzugefügt, um das Ausfällen von Kupfer zu vermeiden.^[8] Zu 500 µL der 1:50 verdünnten Probelösung wurden 700 µL Lowry **1** gegeben, geschüttelt und 10 – 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte unter Schütteln die Zugabe von 100 µL des Folin-Ciocalteus-Reagenz. Nach erneuter Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 – 35 min erfolgte eine photometrische Bestimmung bei 750 nm. Nach gleicher Prozedur wurde der Huminstoffgehalt nur unter Einsatz der Lösung Lowry **2** durchgeführt.

Da die Bestimmung der Absorptionswerte jeweils durch die Proteine und Huminstoffe beeinflusst sind, werden die Absorptionswerte über folgende Gleichungen berechnet:

$$A(\text{Lowry 1}) = A(\text{Protein}) + A(\text{Humin})$$

$$A(\text{Lowry 2}) = 0,2 * A(\text{Protein}) + A(\text{Humin})$$

$$A(\text{Protein}) = 1,25 * (A(\text{Lowry 1}) - A(\text{Lowry 2}))$$

$$A(\text{Humin}) = A(\text{Lowry 2}) - 0,2 * A(\text{Protein})$$

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen sowie Huminstoffen erfolgt über Kalibriergeraden, die mittels unterschiedlicher Konzentrationen von BSA und Huminsäure erstellt wurden.

2.2.9 Proteinbestimmung – Bradford

Nach Zor und Selinger^[9] werden 100 mg Coomassie-Brilliant-Blau G 250 in 50 mL 96 %igem Ethanol gelöst, 100 ml 85 %iger Phosphorsäure hinzugefügt und auf 1 L mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Danach wird das Reagenz mit einem Cellulosefilter (Typ 389, Filtrak Brandt) zweimal filtriert. Das Reagenz wird im Kühlschrank (etwa 4 °C) und dunkel gelagert.

2.2.10 EPS-Extraktion

Zentrifugation

Für die Untersuchung des Einflusses der Zentrifugation auf die EPS wurden 20 ml der Klärschlammproben in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei verschiedenen Geschwindigkeiten (3.500 bis 13.000 x g) sowie Zeiten (20, 30 und 40 min), stets bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Phasentrennung bestimmt und von den verschiedenen Phasen wurden die Protein- und Huminstoffkonzentrationen bestimmt.

Ultraschall-Extraktion der EPS

Die Proben wurden bei 14.000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und das gewonnene Feststoffpellet wurde in 35 mL Phosphatpuffer nach Frølund^[6] (0,76 g/L Trinatriumphosphat-Dodecahydrat; 0,48 g/L Natriumdihydrogenphosphat; 0,526 g/L Natriumchlorid; 0,075 g/L Kaliumchlorid; pH = 7) resuspendiert. Anschließend erfolgte der EPS-Aufschluss mittels Ultraschallsonotrode UP 200S von Hielscher für 10 min bei einer Amplitude von 100 % und einer Pulsrate von 0,5. Die behandelten Proben wurden erneut zentrifugiert und der Überstand für die Analyse im Kühlschrank gelagert.

2.3 Enzymaktivität

2.3.1 Protease-Aktivitätstest

Für die Aktivitätsbestimmung nach dem Protokoll von Sigma^[10] wurden 5 mL einer 0,65 % (w/v) Caseinlösung (Casein in 50 mM Dikaliumhydrogenphosphatpuffer, pH 7,5) vorgelegt sowie bei 37 °C für 5 min vortemperiert. Nach Zugabe von 1 mL der Enzymlösung wurden die Proben für exakt 10 min bei 37 °C inkubiert (ZA). Um die Reaktion abzubrechen wurde die Lösung mit 5 mL einer 110 mM Trichlooessigsäure-Lösung (in dest. H₂O) versetzt (Volumen des Assays (VA)).

Diese Proben wurden nach 30 min bei 30 °C mit einem Polyethersulfonspritzenfilter (PES 0,45 µm) filtriert. Im Anschluss wurden 2 mL der Lösung (VF) mit 5 mL einer 0,5 M Na₂CO₃-Lösung sowie 1 mL eines 0,5 M Folin-Ciocalteus-Reagens versehen und erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert. Alle Proben wurden filtriert (PES 0,45 µm) und bei 660 nm am Photometer vermessen. Zur Aktivitätsbestimmung wurden immer eine Blindprobe

sowie 3 unterschiedlichen Enzymkonzentrationen parallel vermessen. Für die Kalibrierung wurden folgende L-Tyrosin-Lösungen eingesetzt.

Tabelle 2-2: Zusammenstellung der Kalibrierlösungen für die Bestimmung der Protease-Aktivität

V(Tyrosinstandard) in mL	n(Tyrosin) in μmol
0,05	0,055
0,1	0,111
0,2	0,221
0,4	0,442
0,5	0,553

Aus der Kalibriergerade wurde die Menge an freigesetztem Tyrosin in μmol berechnet und die Enzymaktivität über folgende Berechnung bestimmt.

$$\text{Aktivität} \left(\frac{U}{\text{ml}} \right) = \frac{\mu\text{mol}_{\text{freigesetzte Tyrosinäquivalente}} * TA}{E * ZA * VF}$$

TA... Totalvolumen des Assays in mL

ZA... Zeit des Assays in min

E... Enzymvolumen in mL

VF... verwendetes Volumen bei der Farbenreaktion in mL

$$\text{Aktivität} \left(\frac{U}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Aktivität} (U/\text{mL})}{\text{mg}_{\text{Feststoff}}/\text{mL}}$$

2.3.2 Lipase-Aktivitätstest

Die Lipase-Aktivität wurde anhand des Umsatzes von p-Nitrophenylpalmitat zu p-Nitrophenol nachgewiesen.^[11] Dabei wurden 100 μL der Enzymlösung mit 900 μL Phosphatpuffer (100 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0,5 % (v/v) Triton X-100, pH 7,2) in eine Quarzglaszuvette überführt und bei 37 °C im Photometer inkubiert bis ein stabiler Absorptionswert bei 400 nm erzielt wurde. Danach wurden 10 μL des Substrates (50 mM p-Nitrophenylpalmitat in Acetonitril) hinzugegeben und der Anstieg der

Adsorption bei 400 nm über 5 min verfolgt und die Aktivität mittels folgender Berechnung bestimmt.

$$\text{Aktivität} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\Delta A_{\lambda} / \text{min Probe} * V_A * V_f}{\epsilon_{p\text{-Nitrophenol}, \lambda} * V_E * d}$$

- V_A... Volumen des Ansatzes in der Küvette
 V_f... Verdünnungsfaktor
 ε... Extinktionskoeffizient (0,0148 mL/(μmol*cm))
 V_E... Volumen der Enzymlösung
 d... Schichtdicke der Küvette

2.3.3 Cellulase-Aktivität

Die Cellulase-Aktivität erfolgt über die enzymatische Freisetzung von reduzierenden Zuckern, welche mittels DNS-Methode nachgewiesen werden können.^[12] Dafür wurde 1 mL 50 mM Citratpuffer mit 0,5 mL Enzymlösung versetzt, auf 50 °C temperiert und Watmann No.1 Filterpapier (1 cm x 6 cm) zugeführt. Nach 60 min bei 50 °C wurden 3 mL DNS-Reagenz (7,5 g/L 3,5-Dinitrosalicylsäure; 14 g/L NaOH; 290,2 g/L Kalium-Natriumtartrat-tetrahydrat) dazugegeben und die Proben für 5 min in kochendem Wasser belassen. Nachdem die Probe abgekühlt war, wurden 10 mL dest. Wasser hinzugefügt und die Probe bei 540 nm mittels UV/Vis-Spektrometer vermessen. Um den Blindwert der variierenden Proben berücksichtigen zu können, erfolgte die Konzentrationsberechnung über die Standardadditionsmethode. Dafür wurden neben der Originalprobe zwei weitere Proben vermessen, die zusätzlich mit 5 μL bzw. 10 μL einer 0,1 M Glucoselösung versetzt wurden. Über folgende Gleichung kann mittels der berechneten Glucose-Konzentration die Enzymaktivität berechnet werden.

$$\text{Aktivität} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{n_{Glc} [\mu mol]}{V_E [mL] * t_A}$$

- V_E... Volumen des eingesetzten Enzyms vor der Verdünnung
 t_A... Reaktionszeit = 60 min

2.3.4 Pektinase/ Polygalacturonase-Aktivität

Die Pektinase/ Polygalacturonase-Aktivität wird ebenfalls über die Freisetzung reduzierender Zucker und der anschließenden Farbreaktion mit dem DNS-Reagenz bestimmt.^[13] Dafür wurden 100 µL Enzymlösung mit 900 µL Polygalacturonsäure (5 g/L in 0,1 M Natriumcitratpuffer; pH 4,8) bzw. Citruspektinlösung (5 g/L in 0,1 M Natriumcitratpuffer; pH 4,8) zusammengegeben und bei 50 °C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 3 mL DNS-Reagens (10 g/L 3,5-Dinitrosalicylsäure; 16 g/L NaOH) gestoppt und 10 min aufgekocht. Die abgekühlte Probe wird mit dest. Wasser auf 20 mL aufgefüllt und im Photometer bei 540 nm vermessen.

Für die Bestimmung der Polygalacturonase-Aktivität wurde eine Kalibrierung unter Verwendung von D-Galacturonsäure im Konzentrationsbereich bis 1 g/L erstellt und die Aktivität über folgende Gleichung berechnet:

$$\text{Aktivität} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\mu g \text{ freigesetzte GA}}{E * M_{GA} * RZ}$$

E... Enzymmenge in mL

M_{GA}... Molare Masse von Galacturonsäure

RZ... Reaktionszeit in min

Für die Bestimmung der Pektinase-Aktivität wurden hingegen verschiedene Verdünnungen der Enzymlösung angesetzt, dabei sollten mindestens zwei Proben Zucker im Konzentrationsbereich von 0,2 – 0,6 g/L während der Reaktion freisetzen. Aus den gewonnenen Daten wurde ein Verdünnungsfaktor für eine freigesetzte Zuckerkonzentration von 0,4 g/L bestimmt und über folgende Gleichung die Pektinase-Aktivität bestimmt.

$$\text{Aktivität} \left(\frac{U}{mL} \right) = \text{Verdünnungsfaktor} * 0,687 \text{ U/ml}$$

2.3.5 Amylase-Aktivität

Die Amylase-Aktivität wurde nach der Methode von Bernfeld^[14] (übernommen von Worthington Biochemical Corporation) durchgeführt. Zunächst wurden 0,5 mL Enzymlösung auf 25 °C vortemperiert und dann mit 0,5 mL Stärkelösung (1 % (w/v) in

16 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,8) versetzt. Nach 3minütiger Inkubation wurde die Reaktionslösung 3 mL DNS-Reagens (10 g/L 3,5-Dinitrosalicylsäure; 16 g/L NaOH) ergänzt und für 5 min in siedendem Wasser erhitzt. Die abgekühlten Proben wurden anschließend mit 10 mL dest. Wasser verdünnt und bei 540 nm photometrisch vermessen. Zu Berechnung der freigesetzten Zucker wurde eine Kalibriergerade unter Verwendung von Maltose im Konzentrationsbereich von 0,3 – 5 mM erstellt. Mit Hilfe der bestimmten Maltosekonzentration kann über folgende Gleichung die Amylase-Aktivität berechnet werden:

$$\text{Aktivität} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\mu\text{mol}_{\text{freigesetzte Maltose}}}{RZ * E}$$

E... Enzymmenge in mg

RZ... Reaktionszeit in min

2.3.6 Lipid-Bestimmung

Lipidgehalte wurden nach der Methode von Frings et al.^[15] unter Verwendung des Phosphovanillin-Reagenz (350 mL Vanillinlösung (6 g/L); 600 mL konz. Phosphorsäure; 50 mL dest. Wasser) bestimmt. Dafür wurden zunächst 20 µL Probe mit 200 µL konz. Schwefelsäure vermischt und für 10 min in siedendem Wasser inkubiert. Nach dem Abkühlen der Probe (bei 37 °C im Wasserbad für 5 min) erfolgt die Zugabe von 10 mL des Phosphovanillin-Reagenz. Die Probe wurde danach erneut bei 37 °C für 5 min inkubiert. Nach dem Abkühlen an der Luft (5 min) wurde die Probe bei 540 nm photometrisch vermessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Kalibriergerade, wobei als Standardsubstanz Olivenöl gelöst in absolutem Ethanol eingesetzt wurde.

2.4 Hydrolyse von Klärschlammproben

2.4.1 Enzymatische Hydrolyse des Faulschlammes – Enzymscreening

Zur Hydrolyse des Faulschlammes wurden 200 g Faulschlamm in einen Schikanekolben vorgelegt mit variierenden Enzymen sowie -konzentrationen versetzt und bei 37 °C bzw.

50 °C ohne eine pH-Wertanpassung im Inkubationsschüttler für bis zu 72 h bei 130 rpm inkubiert.

Für die Analyse der hydrolysierten Faulschlammproben, wurden in einem ersten Schritt 35 mL für 20 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Gelphase im Gefäß verbleibt, und erneut für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Von dieser Probe wurde erneut der Überstand abgenommen und bis zur Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.^[16]

2.4.2 Enzymatische Hydrolyse des Faulschlammes – Filtration

Zur Hydrolyse des Faulschlammes wurden 1.000 g Faulschlamm in einen Schikanekolben überführt und mit Proteasen, Lipasen oder Cellulasen in variierenden Konzentrationen versetzt und für 3 Stunden bei 37 °C bei 130 rpm im Inkubationsschüttler behandelt.

2.5 Flockungsuntersuchungen – Partikelgrößenuntersuchung

2.5.1 Partikelgrößenbestimmung

Die Partikelgrößen wurden mit dem Partikelgrößenmessgerät LS13320 von Beckman Coulter gemessen. Die Probe lag in wässriger Phase vor und wurde während der Messung mit Ultraschall behandelt. Bei der Auswertung kam das Fraunhofermodell zum Einsatz.

2.5.2 In-situ-Partikelgrößenbestimmung

Die in-situ-Partikelgrößenbestimmung bei der Hydrolyse als auch im Rahmen von Flockungsuntersuchungen erfolgt unter Verwendung der Partikelsonde G400 von Mettler-Toledo GmbH, die auf Basis der FBRM-Technik (Focused Beam Reflectance Measurement) arbeitet. Bei den Flockungsuntersuchungen wurden 150 g behandelte/unbehandelte Faulschlamm vorgelegt und schrittweise mit 5 mL Flockungsmittel (kationisches Polymer CP62-K der Firma SNF, mit 0,3 Gew.-% in dest. Wasser) versetzt.

2.6 Filtrationsversuche

Für die Filtrationsuntersuchungen stand ein Taschenmessgerät der Firma BHS Sonthofen zur Verfügung. Das Taschenmessgerät wurde mit einem Bandfiltertuch aus PET bzw. PP mit einer Porengröße von 120 µm bestückt. Bei der Filtration wurden 250 mL Klärschlamm eingesetzt und gegebenenfalls mit verschiedenen Konzentrationen von Flockungsmittel vorbehandelt. Eingesetzt wurde ausschließlich das kationische Polymer CP62-K der Firma SNF in einer frisch hergestellten Gebrauchslösung mit 0,3 Gew.-% in dest. Wasser. Zur Bestimmung der Filtrationsleistung wurde die Permeatbildung zeitaufgelöst mit Hilfe von Wägetechnik aufgezeichnet.

2.7 Rheometer

Rheologische Untersuchungen wurden mit dem Rheotest RN 4.1 (Rheotest Medingen GmbH) durchgeführt. Die Messungen wurden mit dem Zylindersystem HS bei konstanter Scherrate von 100 s^{-1} bzw. 200 s^{-1} durchgeführt. Zur Bestimmung der Viskositätsänderung durch enzymatische Hydrolyse wurden 30 g Klärschlamm mit 1 mL Enzymlösung in variierenden Konzentrationen versetzt. Die Messungen verliefen unter konstanten Temperaturbedingungen (30 °C) für bis zu 5 Stunden.

2.8 In-situ Verfolgung der enzymatischen Hydrolyse

Um den enzymatischen Abbau der EPS während des Prozesses zu verfolgen, wurde das ReactIR™ 15 von Mettler-Toledo mit der DiComp ATR-Fasersonde eingesetzt. Die Messungen mittels IR-Sonde wurden im Rahmen der standardmäßigen enzymatischen Hydrolysen durchgeführt.

2.9 EPS-Extraktion

2.9.1 Zentrifugation

Für die Untersuchungen zum Einfluss der Zentrifugation auf die EPS wurden 20 mL Faulschlamm in ein Zentrifugationsgefäß überführt und bei Geschwindigkeiten von 3.500 – 13.000 x g, für 20, 30 oder 40 min, stets bei 4 °C zentrifugiert. Die ausgebildeten

Schichten (bis zu 3: Klarphase, Feststoffpellet, Zwischenschicht (gel-schleimartig)) wurden entnommen und auf Protein- und Huminstoffkonzentrationen hin untersucht. Zudem wurde im Überstand die Saccharidkonzentration bestimmt.

2.9.2 Extraktion der EPS im Gärprodukt

Für die EPS-Extraktion wurde die Feststofffraktion der Faulschlammproben benötigt, daher wurden die Proben bei 14.000 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Die abgenommene Flüssigphase wurde im Anschluss zur vollständigen Feststoffabtrennung erneut bei 10.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert.

Für die Untersuchungen unterschiedlicher EPS-Extraktionsverfahren wurden die Feststoffpellets in einem Phosphatpuffer, wie durch Frølund et al.^[7] beschrieben, aufgenommen und resuspendiert.

2.9.3 Ultraschall-Extraktion

Die Ultraschall-Extraktion wird mit einem Ultraschallprozessor mit 400 W (UP 400S; Hielscher Ultrasonics GmbH) und einer Frequenz von 24 kHz durchgeführt. Bei den Untersuchungen wurden unterschiedliche Prozessorleistungen zwischen 40 – 100 % getestet. Pro Versuch wurden 30 mL der Probe für 5, 8 bzw. 10 min mit konstantem Pulsbetrieb von 0,5 s behandelt und auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Proben, wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben, zentrifugiert und Protein-, Huminstoff- und Saccharidkonzentrationen bestimmt.

2.9.4 Alkalische Extraktion

Die alkalische EPS-Extraktion basierte auf der Methode von Liu und Fang.^[17] Zur Extraktion wurden 50 mL Faulschlamm mit 0,3 mL Formaldehyd (35 %) versetzt und bei 4 °C mit 600 rpm für 1 h im Schüttelkolben inkubiert. Zu dieser Lösung wurden 20 mL einer 1 M Natriumhydroxidlösung hinzugegeben und für weitere 3 h bei 600 rpm und 4 °C inkubiert.

2.9.5 *Abtrennung und Bestimmung von EPS unter Verwendung von Kationenaustauschharzen*

Zur Abtrennung von EPS aus Faulschlamm wurde das Harz Dowex 50 W x 8 mit 60 bzw. 70 g_{Harz}/g_{oTS} der Probe eingesetzt.^[17-20] Das Harz wurde zunächst in 100 – 150 mL Phosphatpuffer (Extraktionspuffer, pH 7) für 1 h unter Rühren und bei etwa 4 °C gewaschen und abfiltriert (Cellulosefilter, Typ 389, Filtrak Brandt).^[6] Die Proben wurden mit der entsprechenden Dowex sowie 50 mL Phosphatpuffer versetzt, die Lösung auf pH 7 mit einer 1 M Natriumhydroxidlösung eingestellt und für 1 h bei 600 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (siehe Kapitel 2.9.1).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Faulschlämme

Um die Abbau-Prozesse im Rahmen der enzymatischen Hydrolyse besser beurteilen zu können, sind die Faulschlämme hinsichtlich einer Vielzahl unterschiedlicher Bestandteile untersucht worden. In Tabelle 3-1 sind die wichtigsten Kennwerte der untersuchten ausgefaulten Klärschlämme (vor der Entwässerung) zusammengetragen.

Tabelle 3-1: Zusammenfassung wichtiger Kennwerte für ausgefaulten Klärschlamm

Kennwert	Messwerte
Trockenrückstand	1,9 – 2,9 %
oTS	47 – 51 %
aTS	49 – 53 %
pH-Wert	7,2 - 7,5
CSB	11 – 19 g/L
Kjeldahl-Stickstoff	0,13 – 0,51 %
Phosphat	68 – 252 mg/L
Nitrat	4 – 22 mg/L
Sulfat	< 1 – 7 mg/L
Chlorid	60 – 286 mg/L
Natrium	121 – 270 mg/L
Kalium	270 – 1.840 mg/L
Magnesium	2 – 33 mg/L
Calcium	23 – 62 mg/L

Die in der Tabelle 3.1 dargestellten Kennwerte stammen hauptsächlich aus den Untersuchungen des Faulschlammes aus der Kläranlage Freiberg. Aus den gewonnenen Daten lassen sich einige wichtige Informationen direkt ablesen. Zum Beispiel belegt der relativ stabile Anteil für die organische Trockenmasse (oTS), dass für die Untersuchungen ausgefaulte Faulschlämme bereitgestellt wurden, was für die

Untersuchungen zur Entwässerung wichtig ist. Wie aus der Tabelle 3-1 hervorgeht, handelt es sich bei Faulschlamm um einen heterogenen Ausgangstoff, der gerade jahreszeitlichen Schwankungen unterlegen ist. Besonders auffällig waren die Änderungen im Bereich der Phosphat- und Nitratgehalt, die vor allem in Zeiten der nach der Ernte deutlich erhöht waren, was auf einen landwirtschaftlichen Ursprung hindeutet. In den Wintermonaten konnte hingegen ein Anstieg der Salzgehalte beobachtet werden, wodurch sich die hohen Spannbreiten bei Chlorid sowie Sulfat, als auch Natrium, Kalium und Calcium erklären lassen. Dieser Anstieg in den Wintermonaten, der so deutlich in der Freiburger Region zu beobachten war, ist vermutlich durch den Einsatz von Streusalzen zu erklären. Die eingesetzten Streusalze können über die Kanalisation als gelöste Salze in die Kläranlage gelangen und werden während der Abwasserbehandlung auch im Faulschlamm eingelagert. Die Salzgehalte können dabei direkten Einfluss auf die bisher technisch relevanten Entwässerungsleistungen haben, aber natürlich auch auf den Ansatz der enzymatischen Hydrolyse der EPS zur Steigerung der Entwässerungsleistung, denn hohe Chloridgehalte können z.B. zur Inaktivierung der Enzyme führen. Die besondere Bedeutung der Anwesenheit einwertiger und zweiwertiger Kationen liegt am großen Einfluss auf die Flockenbildung, die zur Filtration essentiell ist.^[21]

Die jahreszeitlichen Schwankungen/ Änderungen der Faulschlämme sind keine neue Erkenntnis und lassen sich durch eine Anpassung auf der Kläranlage auch nicht vollständig eliminieren. Jedoch ist das Wissen über die Zusammensetzung der Faulschlämme für die Entwässerung von besonderer Bedeutung. Bekannt ist auch, dass die Zusammensetzung der EPS im Faulschlamm aufgrund verringerter biologischer Abbauprozesse in den Wintermonaten verändert ist.^[21] Bei der Entwicklung bzw. Veränderung der Entwässerungstechnik/-methodik sind diese Änderungen zu beachten, jedoch sollten die Verfahren robust gegen solche Schwankungen sein.

3.2 Methodenentwicklung/-weiterentwicklung (AP1)

Für die Bewertung der Spaltung der EPS ist eine umfangreiche Charakterisierung der Schlämme, Reaktionsmedien und Enzyme notwendig. Demzufolge kamen eine Vielzahl von Analysemethoden zum Einsatz, die zum einen auf bekannte Methoden aus der

Literatur beruhen und zum anderen für die durchgeführten Untersuchungen angepasst bzw. optimiert wurden. Die Zusammenstellung der eingesetzten Methoden ist dem Kapitel 2 zu entnehmen. Jedoch sind im Rahmen des Projektes tiefergehende Erkenntnisse gewonnen bzw. Anpassungen vorgenommen worden, so dass im folgenden Abschnitt näher auf die Lipidanalytik sowie die EPS-Extraktion eingegangen wird.

3.2.1 Lipidanalytik

Für die Bewertung der Spaltung der EPS ist eine Analytik der Lipide unerlässlich. Dafür ist eine Vielzahl von Methoden bekannt, die mehr oder weniger gut auf die Faulschlämme anpassbar sind.

Raunkjær et al.^[22] haben zwei Methoden aufgezeigt: gravimetrisch und mittels IR-Spektroskopie. Die gravimetrische Methode ist nur für hohe Konzentrationen von mind. 10 mg/L geeignet und damit für die Abwasseranalytik kaum nutzbar. Für die IR-Messung muss zunächst eine Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel erfolgen. Dabei werden CH-, CH₂- und CH₃-Gruppen detektiert, wodurch neben Lipiden, auch andere Moleküle, die diese Gruppen beinhalten und durch das organische Lösungsmittel extrahiert werden, erfasst werden. Insbesondere bei Anwesenheit hoher organischer Anteile, wie bei Faulschlämmen, ist die Methode nicht geeignet.

Goodwin und Forster^[23] verwendeten dagegen eine Methode, die Frings und Dunn^[24] für die Lipidanalytik in Seren entwickelt hatten. Für die Kalibrierung verwendeten sie allerdings nicht Olivenöl wie Frings und Dunn, sondern extrahierten Lipide aus Belebtschlamm, indem sie diesen in einem ersten Schritt mit einer Mischung von Hexan und Isopropanol im Verhältnis 3:2 und in einem zweiten Schritt mit Diethylether extrahierten. Beide organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel entfernt.

Diese Methode wurde durch Frings et al.^[25] weiter verbessert, sodass sie mit weniger Probe (20 µL statt 100 µL) auskommt und vor allem in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden kann. Dadurch entfällt zum Teil das Pipettieren von konz. Säuren, was den Arbeitsaufwand etwas verringert. Die Durchführung dieser verbesserten Methode ist im Methodenteil beschrieben. Bisher sind die chemischen Reaktionen, die hinter dieser Methode stehen, noch nicht vollständig verstanden. Aber es wird

angenommen, dass Kohlenstoff-Doppelbindungen notwendig für die Reaktion sind. Dadurch können Nebenreaktionen mit anderen, sich im Faulschlamm befindenden Substanzen, ausgeschlossen werden, da natürlich vorkommende C-C-Doppelbindungen sehr selten sind und nur in sehr geringen Mengen vorkommen.

Um die Methode zu testen, wurde nach der ursprünglichen Methode von Frings und Dunn^[13] eine Kalibriergerade mit Olivenöl gelöst in abs. Ethanol als Standard aufgenommen. Dabei konnte eine Linearität im Bereich von 0 bis 10 g/L beobachtet werden. Zucker führen in höheren Konzentrationen zu Fehlbestimmungen. Bei geringen Konzentration (< 1 g/L) treten keine Störungen auf. Diese Nebenreaktionen müssen bei der Durchführung der Analysen beachtet werden.

3.2.2 EPS-Extraktion

EPS sind organische Polymerstrukturen biologischen Ursprungs, die aus verschiedenen Arten von Makromolekülen wie beispielsweise Polysaccharide, Proteine, Lipide oder Huminstoffe bestehen.^[26,27] EPS bestimmen die Bildung und dem Zusammenhalt von mikrobiellen Aggregaten wie Biofilmen, Flocken oder Granula sowie deren Struktur, Erscheinungsbild sowie Festigkeit.^[26-28] Prokaryotische und eukaryotische Mikroorganismen sekretieren EPS als Membranvesikel spontan (z.B. durch gram-negative Bakterien) oder durch Zellyse.^[26,27] Die mechanische Stabilität der EPS-Matrix basiert auf Dispersionskräften, elektrostatischen Wechselwirkungen (ionischen- oder Dipol-Dipol- Wechselwirkungen), Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen.^[29] Je nach Position im Agglomerat werden unterschiedliche EPS unterschieden: 1) gebundene EPS, locker und eng (an Zelloberfläche adsorbiert) und 2) lösliche EPS (keinen Kontakt zur Zelloberfläche, frei beweglich).^[30]

Die Wahl des Extraktionsverfahren ist auf Basis der spezifischen Anforderungen und Bedingungen des Versuchsziels zu treffen.^[30] Für die Analysen im Projekt SpaltEPS wurden folgende Anforderungen definiert: 1) keine bzw. max. geringfügige Zellyse beim Extraktionsprozess, 2) möglichst vollständige EPS-Freisetzung, um auch geringe Änderungen durch die enzymatische Hydrolyse nachweisen zu können, und 3) geringer methodischer Aufwand.

3.2.3 Vorbehandlung für die Extraktion

Für die Extraktion der EPS ist die Abtrennung der Feststofffraktion des Klärschlammes nötig, um die Extraktionsmittel hinzufügen zu können. In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Angaben hinsichtlich der Zentrifugationsparameter (2.000 – 15.000 x g; 5 – 20 min; 4 °C). Aufgrund dieser Variationen und der Unsicherheit, dass EPS schon durch den Schritt der Zentrifugation beeinflusst werden, wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch eine Steigerung der Zentrifugalkraft ein stärkeres Absinken der suspendierten Partikel und damit eine bessere Trennung von gelösten und suspendierten Bestandteilen erfolgte. Durch die Steigerung der wirkenden Kräfte konnte keine zusätzliche Freisetzung von EPS und somit keine mögliche Zelllyse nachgewiesen werden. Zudem konnte durch die Variation der Dauer der Zentrifugation kein Einfluss auf die EPS-Extraktion festgestellt werden. Auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse wurden die Zentrifugationsparameter auf 14.000 x g und 20 min bei 4 °C festgelegt.

3.2.4 Ultraschall-Extraktion

Eine Ultraschallbehandlung zur Extraktion von EPS aus Klärschlämmen wurde bereits durch verschiedene Forschergruppen publiziert.^[17,18,31,32] Um die Anforderungen des Projekts sowie auch die Vergleichbarkeit zu anderen Untersuchungen von biogenen Reststoffen in unserem Institut zu ermöglichen, wurden Anpassungen bzw. Kombinationen von Extraktionsprotokollen anderer Forscher auf Tauglichkeit hin untersucht. Untersucht wurden Parameter wie Behandlungsdauer (Literatur: bis 10 min)^[31] und Leistungsdichte (Literatur: bis 48 W/mL),^[17,18,31,32] dabei konnte aufgrund der vorhandenen Ultraschallsonde maximal eine Leistungsdichte von 13 W/mL (400 W) eingesetzt werden. Zudem wurde die stufenweise Extraktion wie von Ras et al.^[33] untersucht.

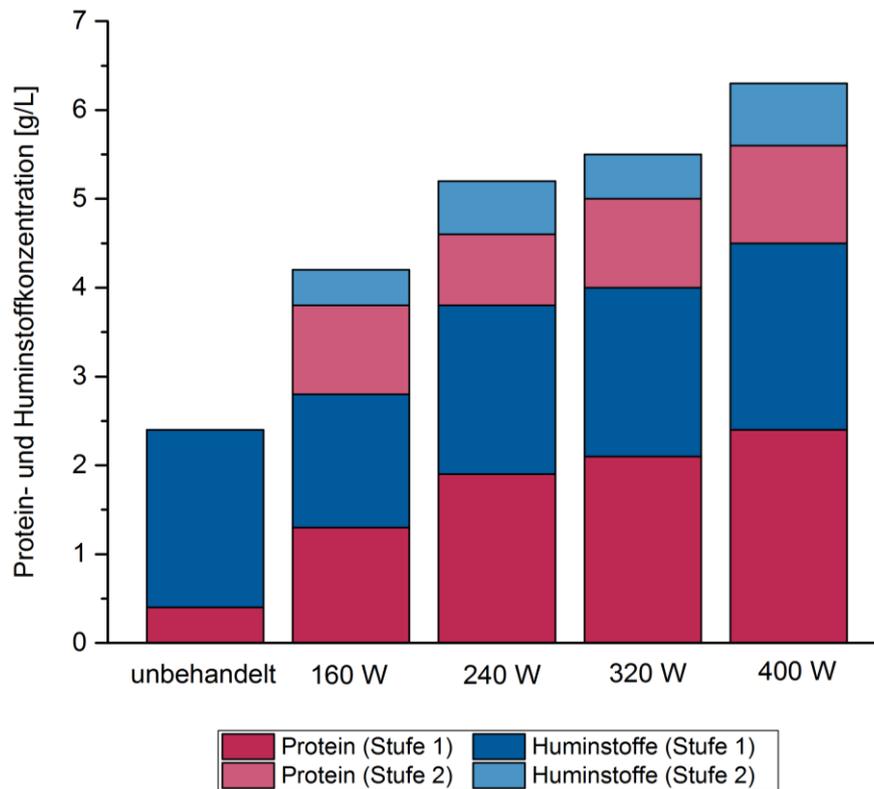


Abbildung 3-1: Bestimmung der Protein- und Huminstoffkonzentration in Abhängigkeit vom Leistungseintrag bei gleichbleibender Versuchszeit von 5 min unter Einsatz der 2-stufigen Extraktionsmethode

Wie aus Abbildung 3-1 hervorgeht, ist bei Erhöhung des Leistungseintrages auch eine Steigerung der Protein- und Huminstoffkonzentration im Extrakt nachweisbar. Die Extraktion des Proteinanteils der EPS wird dabei stärker durch die Steigerung der Ultraschallsonde beeinflusst als die Extraktion der Huminstoffe. Aufgrund der vorhandenen Ultraschallsonde konnte der Einfluss auf eine weitere Steigerung der Extraktionsleistung durch eine Erhöhung des Energieeintrags untersucht werden. Bei der Analyse der freigesetzten Zucker in der Extraktionslösung zeigte sich eine Konzentrationssteigerung mit der Leistungserhöhung bis 320 W. Eine Steigerung des Energieeintrags auf 400 W führt nicht zur Einlösung weiterer EPS-Bestandteile.

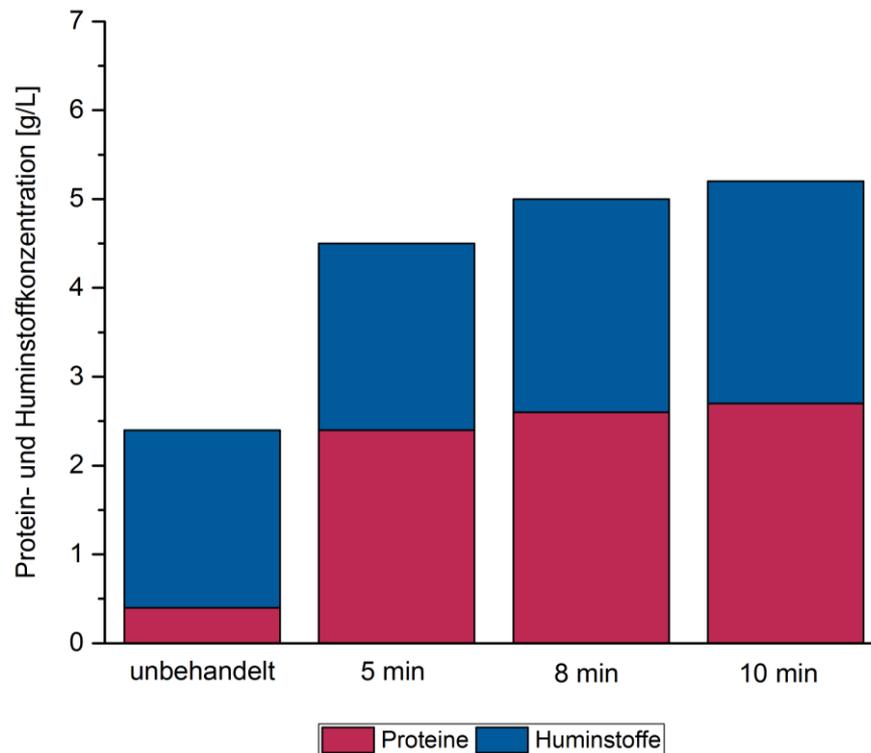


Abbildung 3-2: Bestimmung der Protein- und Huminstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer bei konstanter Leistung von 320 W

Bei der Untersuchung der Reaktionsdauer konnte ebenfalls ein Einfluss nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3-2 zu erkennen ist, werden mit Verlängerung der Reaktionsdauer vermehrt Proteine und Huminstoffe in die Extraktionslösung abgegeben. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Freisetzung von Zuckern festgestellt. Der Anteil der extrahierten Zuckerfraktion liegt jedoch bei maximal 150 mL. Der Vergleich des Einflusses der Reaktionszeit und des Leistungseintrags auf die EPS-Extraktion zeigte, dass beide Parameter entscheidenden Einfluss auf die EPS-Extraktion haben. Im Rahmen der Untersuchungen konnte keine zusätzliche Zelllyse nachgewiesen werden, was mit einer künstlichen Erhöhung der Protein-, Huminstoff- und Zuckerkonzentrationen aus den EPS einhergehen würde.

3.2.5 Alkalische Extraktion

Eine Alternative stellt die alkalische Extraktion der EPS dar, die auf die saurefunktionellen Gruppen der EPS abzielt und zur Abstoßung zwischen den deprotonierten Gruppen führt.^[34] Für Vergleichszwecke wurden die Methode von Liu und Fang^[17]

genutzt, dabei kommen für die Extraktion Natriumhydroxid ($0,4 \text{ mL/mL}_{\text{Schlamm}}$) und Formaldehyd ($6 \mu\text{L/mL}_{\text{Schlamm}}$) zum Einsatz.

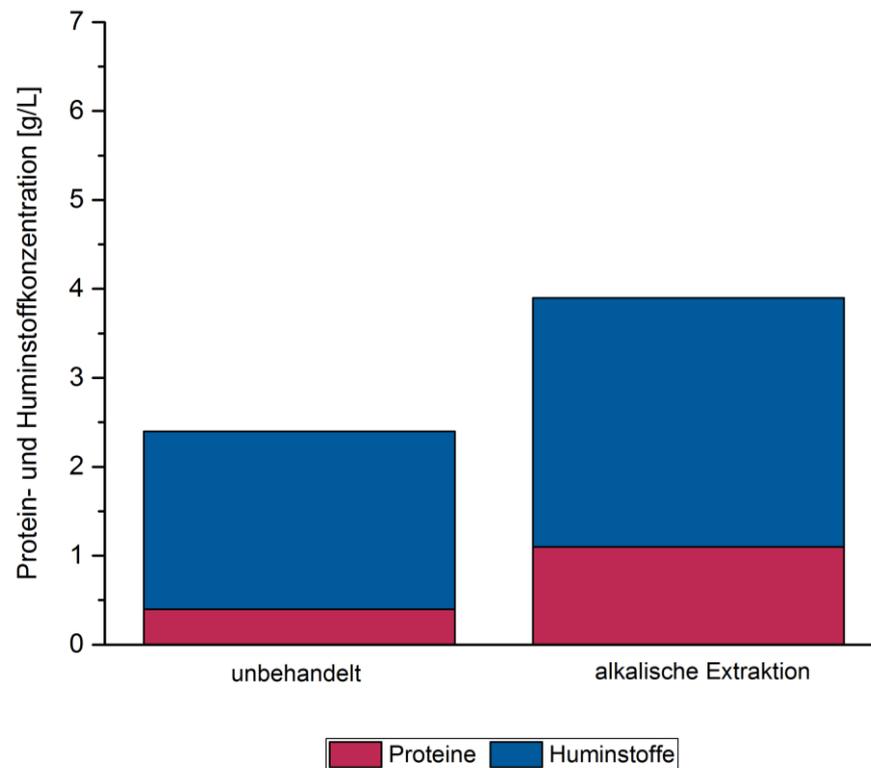


Abbildung 3-3: Bestimmung der Protein- und Huminstoffkonzentration im Extrakt nach der alkalischen Extraktion

Durch die alkalische Extraktion konnten ebenfalls die wichtigen Bestandteile der EPS wie Proteine, Huminstoffe und Zucker extrahiert werden. Jedoch wurde nur eine geringe Steigerung der Konzentration der Huminstoff- und Proteinkonzentrationen aus den EPS im Extraktionsmedium nachgewiesen (siehe Abbildung 3-3). Beim Vergleich der alkalischen Extraktion (Abbildung 3-3) mit der Ultraschallextraktion (Abbildung 3-2) zeigte sich, dass zwar vergleichbare Konzentrationen an Huminstoffen durch die alkalische Extraktion für die Analyse zugänglich werden, aber die Proteinfraction der EPS nicht hinreichend stark freigesetzt werden. Da beim Einsatz der alkalischen Extraktionsmethode zum einen die Extraktionsleistung geringer ist und zum anderen durch den chemischen Angriff auf die EPS-Struktur ein möglicher negativer Einfluss nicht vollständig auszuschließen ist, wurde der Ultraschallmethode der Vorzug gegeben.

3.2.6 Abtrennung von EPS mittels Kationenaustauschharzen

Die Abtrennung von EPS aus Klärschlamm unter Einsatz des Kationenaustauschers Dowex-Harz 50 W x 8 (in Natrium-Form) wurde in der Literatur vielfach beschrieben.^[7,17,19,20] Da viele der Literaturbeispiele auf die Methode von Frølund et al.^[7] abgeleitet wurden, haben wir uns entschlossen, dieses Verfahren zum Vergleich heranzuziehen.

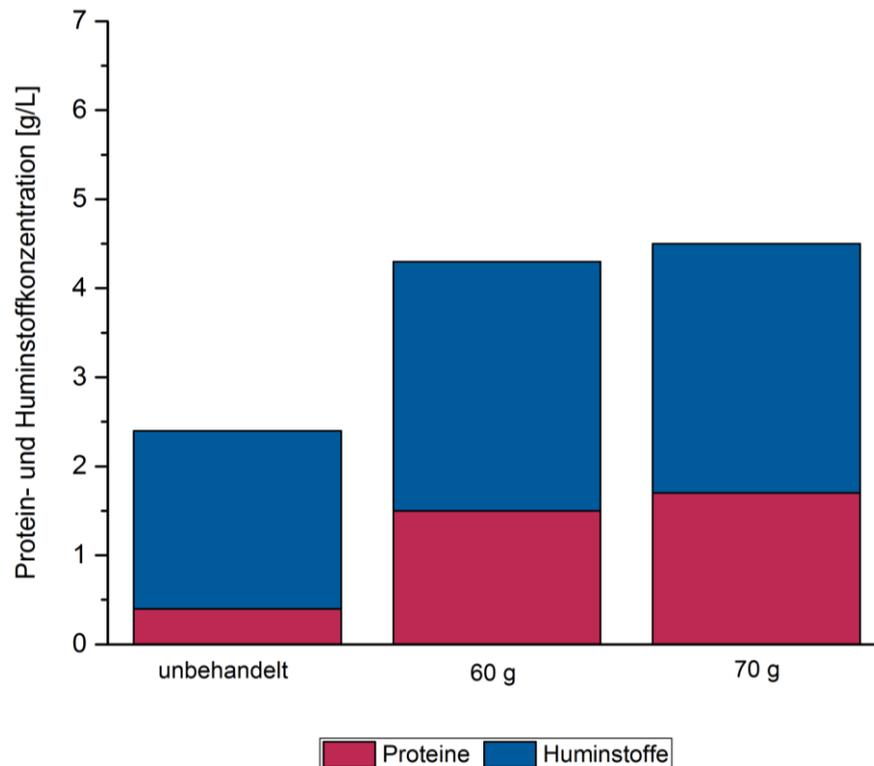


Abbildung 3-4: Bestimmung der Protein- und Huminstoffkonzentration im Extrakt mit Kationenaustauscherharz Dowex 50 W x 8

Mit der in der Literatur beschriebenen Methode zur Abtrennung von EPS mit Kationenaustauscherharzen, war eine Gewinnung und Bestimmung der EPS-Bestandteile möglich. Entsprechend der Literatur wurden Dowex-Konzentrationen von 60 bzw. 70 g_{Harz}/g_{oTS-Klärschlamm} eingesetzt. Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Güte der EPS-Abtrennung stark vom pH-Wert^[20] und der Reaktionsdauer^[7,35] abhängt, wurde die Abtrennung mit Dowex-Harz bei pH 7 und für eine Reaktionsdauer von 1 h durchgeführt. Durch eine Steigerung der Menge des Kationenaustauscherharzes konnte nur eine geringe Steigerung der Extraktionsleistung erzielt werden (siehe Abbildung 3-4)

und im Vergleich zur Ultraschallbehandlung konnten nur geringere Menge der EPS für die Analytik zugänglich gemacht werden.

3.2.7 Vergleich der angewendeten Extraktionsmethoden

Beim Vergleich der getesteten Methoden zur EPS-Freisetzung für die Analyse der Zusammensetzung zeigte sich, dass mit allen drei Methoden die wichtigen Fraktionen – Proteine, Huminstoffe und Zucker – extrahiert werden konnten. Bei der Ultraschallextraktion konnten dabei die höchste Ausbeute an EPS erzielt werden. Die eingesetzten Methoden weisen dabei nur geringe Unterschiede bei der Freisetzung der Huminstoffe und der Zucker auf. Jedoch wird durch die Ultraschallbehandlung die Proteinfraction für die Analyse der EPS besser zugänglich.

Da die Methode der EPS-Extraktion vor allem zum Nachweis von durchaus geringen Änderungen in der EPS-Struktur entwickelt werden sollte und die chemische Zusammensetzung der Proben möglichst nur in geringem Maße durch die Extraktionsmethode beeinflusst werden sollte, wurde die Ultraschallmethode für weitere Untersuchungen favorisiert. Diese Methode erzielte die höchste EPS-Ausbeute ohne zusätzlichen Einsatz von Chemikalien sowie einem geringen methodischen und zeitlichen Aufwand.

3.3 Enzymscreening (AP2)

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes sollten verschiedene Enzyme auf ihre Anwendung zur Spaltung der EPS mit dem Ziel der Verbesserung der Klärschlammwässerung untersucht werden. Dazu erfolgte nach umfangreicher Literaturrecherche eine Auswahl möglicher Kandidaten, die anschließend umfassend charakterisiert wurden. Um die enzymatische Spaltung in die Praxis überführen zu können, sollte eine Spaltung der EPS mit den Enzymen bei pH 7 – 8, 30 – 40 °C und einer möglichst geringen Reaktionszeit ablaufen. Diese Bedingungen ergeben sich aus den Eigenschaften des Faulschlammes, dessen EPS ohne die Zugabe weiterer Chemikalien zum Beispiel zur pH-Wertanpassung sowie mit der vorhandenen Restwärme gespalten werden sollten. Diese Bedingungen ergeben sich zum einen aus den hohen Kosten und zum anderen aus dem apparativen

Aufwand einer pH-Wertanpassung, da Faulschlamm eine hohe Pufferkapazität besitzt. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus dem Enzymscreening vorgestellt.

3.3.1 Lipasen

Für die Untersuchungen zum möglichen Abbau von EPS durch die enzymatische Hydrolyse durch Lipasen standen folgende Enzyme zur Verfügung:

- Lipase FE-01 von ASA Spezialenzyme GmbH
- Lipase *Thermomyces lanuginosus* von SigmaAldrich
- Lipase CalA und CalB *Candida sp.* von SigmaAldrich

Die im Rahmen des Enzymscreening untersuchten Lipasen wiesen nach Angaben der Hersteller alle ihr pH-Wertoptimum im neutralen bis leicht basischen Bereich (pH 7-10) auf. Diese Bereiche konnten im Rahmen von Optimierungsuntersuchungen bestätigt werden (siehe Tabelle 3-2) und aufgrund dessen wurde Abstand von der pH-Wertkontrolle bzw. Regulierung genommen. Zudem konnte gezeigt werden, dass der optimale Temperaturbereich für die Lipasen im Bereich der Reaktionstemperatur von der mesophilen Faulung von Klärschlämmen liegt. Demzufolge sollte die Restwärme des Schlammes für eine enzymatische Behandlung ausreichen.

Tabelle 3-2: Zusammenstellung der optimalen pH-Werte und Temperaturen der getesteten Lipasen

Enzym	pH-Wert	Temperatur
Fe-01	pH 10	30 °C
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	pH 8 – 10	60 °C
<i>Candida sp. CalA & CalB</i>	pH 8	50 °C

Dies einzige Ausnahme stellt die Lipase aus *Thermomyces lanuginosus* da, denn diese weist die höchste Aktivität bei Temperaturen von 60 °C auf. Jedoch ist schon eine hinreichend hohe Aktivität bei geringeren Temperaturen nachweisbar gewesen.

Um den Einfluss von Lipasen auf die EPS-Struktur zu untersuchen wurden enzymatische Hydrolysen bei 37 °C im Schikanenkolben über 24 h für die unterschiedlichen Lipasen durchgeführt und die Überstände auf den Eintrag der wichtigsten Strukturbestandteile

der EPS hin untersucht. Zunächst wurden im Rahmen der Untersuchungen unterschiedliche Enzymkonzentrationen zur Bestimmung des Einflusses auf die EPS eingesetzt und dabei ging es zunächst darum, einen Beweis zu führen, dass durch den Einsatz unterschiedlicher Enzymklassen einzelne spezielle Bindungstypen in der EPS-Struktur angegriffen werden.

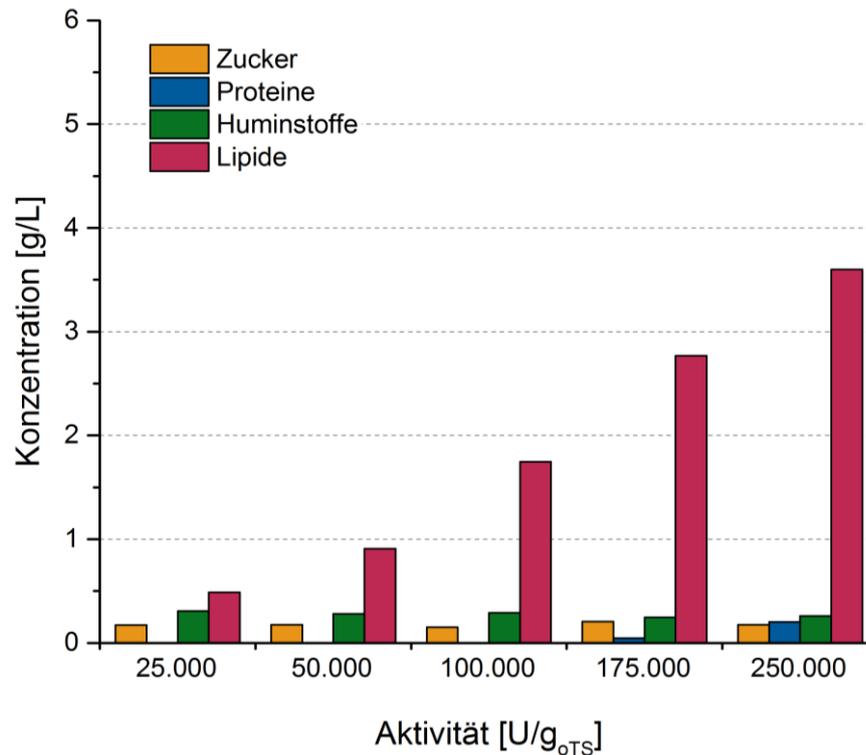


Abbildung 3-5: Untersuchungen zu EPS-Spaltung unter Einsatz der Lipase aus *Thermomyces lanuginosus* in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bzw. Aktivität; bei 37 °C; für 24 h

Wie aus Abbildung 3-5 ersichtlich, gelingt es mit steigender Enzymaktivität der Lipase von *Thermomyces lanuginosus* Lipide aus dem Faulschlamm freizusetzen. Bei genauer Betrachtung kann auch ein Anstieg der Proteinkonzentration nachgewiesen werden, welcher jedoch nicht zweifelsfrei auf die alleinige Spaltung der EPS zurückzuführen ist, da mit steigender Enzymkonzentration der Proteingehalt in der wässrigen Phase automatisch ansteigen sollte. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass durch den Einsatz der Lipase aus *Thermomyces lanuginosus* eine Spaltung der EPS möglich ist und eine Freisetzung von Lipiden in die flüssige Phase erfolgt.

Neben den Untersuchungen hinsichtlich der EPS-Spaltung in Abhängigkeit von der Enzymaktivität wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen ein zeitlicher

Reaktionsverlauf abgetastet wurde, um einen Rückschluss auf die nötige Reaktionszeit zu ermöglichen. In Abbildung 3-6 wurden die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse über den Verlauf von 48 h dargestellt. Dabei wurden zunächst in den ersten Stunden vermehrt Proben genommen, da in einer Vielzahl von Tastversuchen nachgewiesen wurde, dass die größten Änderungen in diesem Zeitbereich stattfinden.

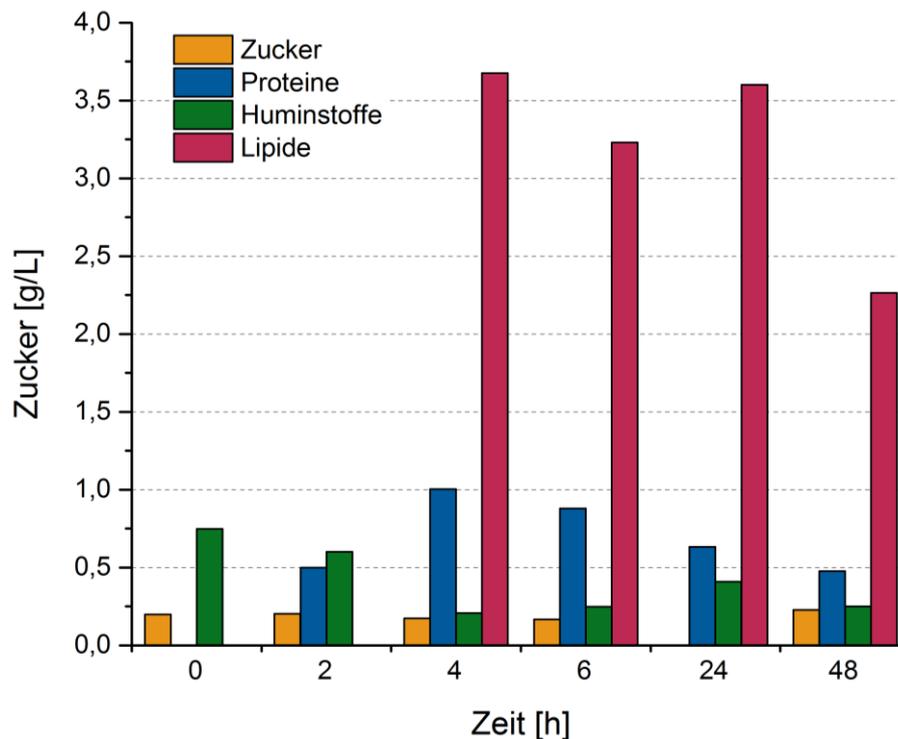


Abbildung 3-6: Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels der Lipase aus *Thermomyces lanuginosus*; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von 56.000 U/g_{oTS}

Bei dem Versuch konnte erneut gezeigt werden, dass eine enzymatische Hydrolyse der EPS möglich ist. Nach 4 h konnte ein erheblicher Anstieg der Lipidkonzentration in der flüssigen Phase nachgewiesen werden. Zudem konnte auch in diesem Versuch eine Steigerung der Proteinkonzentration in der Flüssigphase nachgewiesen werden, der nicht alleinig aus der Enzymzugabe resultiert. Im Gegensatz zu den Proteinen und Lipiden wurden bei den Zuckern keine signifikanten Änderungen aufgezeichnet. Die Huminstoffe im Überstand nahmen über den Zeitverlauf ab. Betrachtet man die Protein- und Lipidkonzentrationen über den Zeitraum der 48 h ist auch hier eine Abnahme zu beobachten. Dieses Verhalten der Spaltprodukte wurde immer wieder beobachtet und ist höchstwahrscheinlich auf die bakterielle Aktivität, die im Faulschlamm zwangsläufig

vorhanden ist, zu erklären. Im Lauf der Reaktionsführung ist es möglich, dass die Organismen, die durch die Probenlagerung (Kühlschrank 4 °C) die metabolische Aktivität zurückgefahren haben, die metabolische Aktivität wieder gesteigert haben und durch die Freisetzung von Nährstoffen aus den EPS auch Zellteilungsprozess wieder angelaufen sein können.

Zum Vergleich mit der Lipase aus *Thermomyces lanuginosus* wurden Untersuchungen mit Lipase CalA aus *Candida sp.* durchgeführt. In Abbildung 3-7 wurden die Änderungen der Lipid-, Huminstoff-, Protein- und Zuckerkonzentrationen in der flüssigen Phase des Faulschlammes in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration bzw. Aktivität dargestellt.

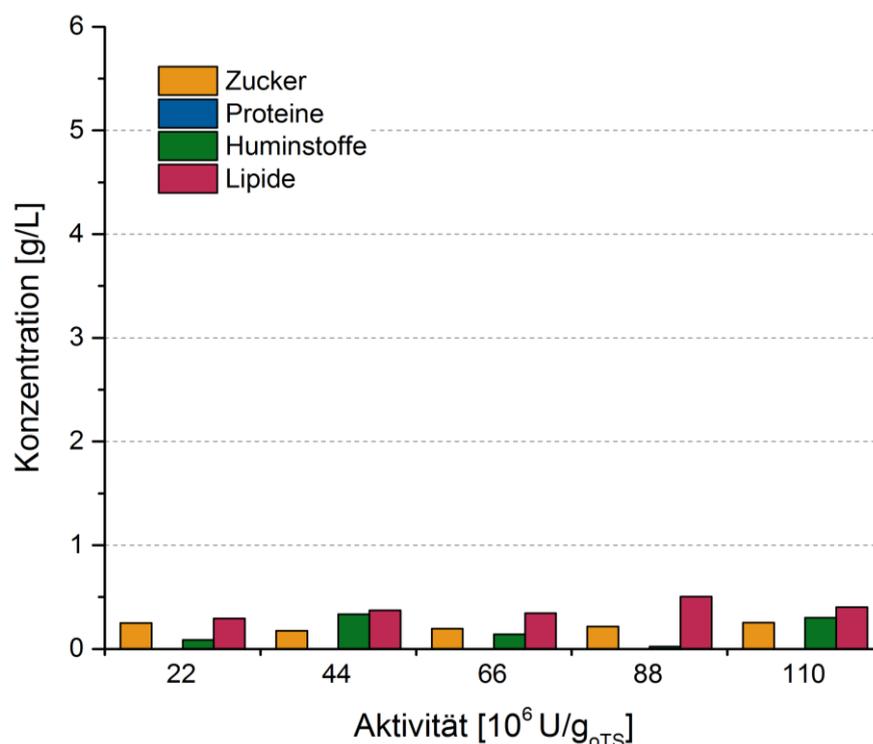


Abbildung 3-7: Untersuchungen zu EPS-Spaltung unter Einsatz der Lipase CalA aus *Candida sp.* in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bzw. Aktivität; bei 37 °C; für 24 h

Durch die enzymatische Hydrolyse mit der Lipase aus *Candida sp.* ergab sich ein weniger klares Bild hinsichtlich der Abhängigkeit von der Enzymkonzentration, wie bei der Lipase aus *Thermomyces lanuginosus*. Zwar konnten durch den Einsatz der Lipase geringe Lipidkonzentrationen in der flüssigen Phase nachgewiesen werden, aber es konnte keine Steigerung mit steigender Enzymkonzentration nachgewiesen werden, wie es aus den

anderen Versuchen zu vermuten war. Auch bei den anderen Bestandteilen wie Huminstoffen, Proteinen und Zucker zeigte sich keine klare Tendenz. Bei der Durchführung der Untersuchungen hinsichtlich einer zeitlichen Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolysen wurden zudem sehr widersprüchliche Ergebnisse erhalten wie aus Abbildung 3-8 hervorgeht.

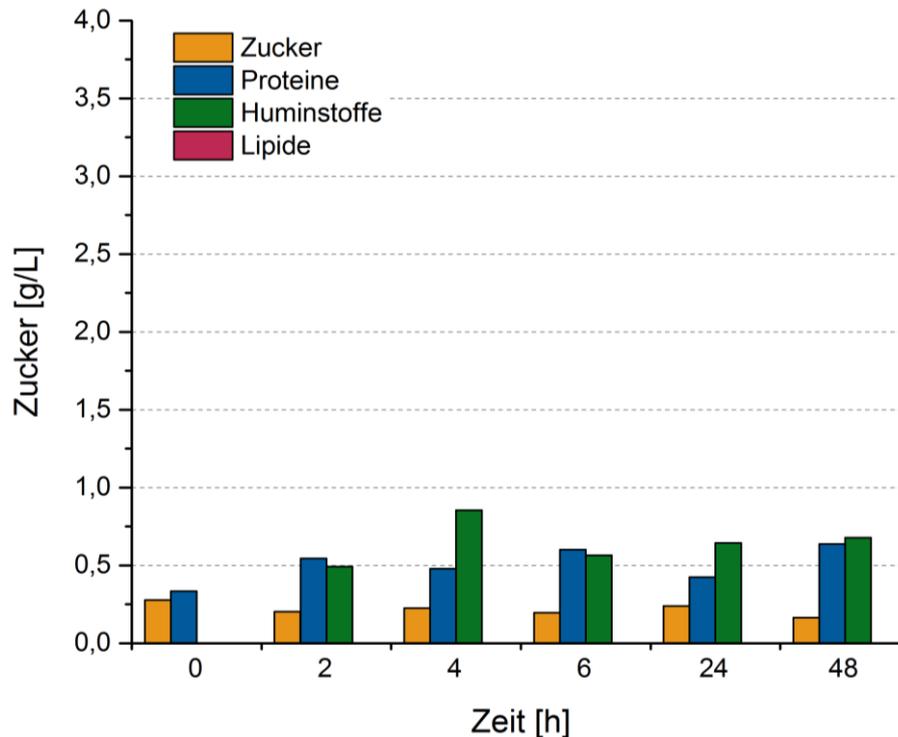


Abbildung 3-8: Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels der Lipase CalA aus *Candida sp.*; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von $87 \cdot 10^6$ U/g_{OTS}

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte nämlich keine Freisetzung von Lipiden durch den Einsatz der Lipase aus *Candida sp.* nachgewiesen werden. Im Laufe der enzymatischen Hydrolyse werden zwar Proteine und Huminstoffe freigesetzt, jedoch sind nach einer Reaktionszeit von 4 h kaum noch merkliche Änderungen zu verzeichnen. Eine zusätzliche Freisetzung von Zuckern durch die Lipase konnte nicht nachgewiesen werden, war aber aufgrund der zu erwartenden Spaltungsreaktionen durch die Lipase auch nicht zwangsläufig zu vermuten. Welchen Einfluss diese geringen Änderungen auf die Filtration haben konnten, war aus den Untersuchungen jedoch nicht alleinig abzuschätzen und wurde daher durch Filtrations- und Flockungsuntersuchungen eruiert (siehe Kapitel 3.5).

Aus den oben gezeigten Ergebnissen ergab sich kein klares Bild über die mögliche Spaltung von EPS durch den Einsatz von Lipasen. Daher wurden noch weitere kommerziell erhältliche Enzyme hinsichtlich der Spaltung von EPS getestet. Die Ergebnisse eines weiteren Beispiels sind in Abbildung 3-9 abgebildet.

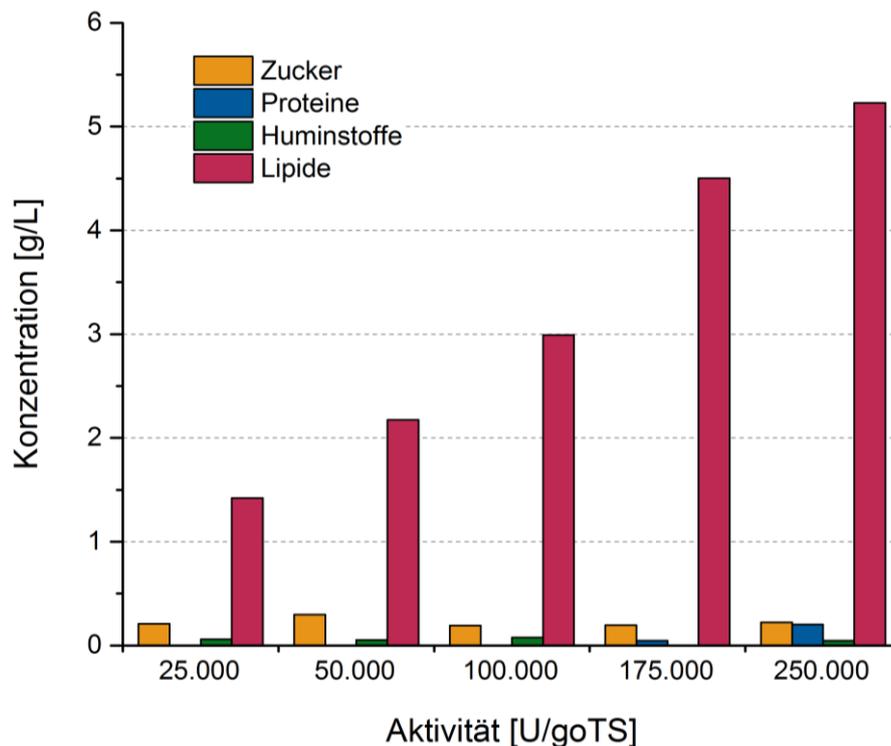


Abbildung 3-9: Untersuchungen zu EPS-Spaltung unter Einsatz der Lipase Fe-01 von ASA Spezialenzyme in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bzw. Aktivität; bei 37 °C; für 24 h

Der Einfluss der Lipase Fe-01 auf die EPS im Faulschlamm wurde in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration/-aktivität untersucht. Wie aus Abbildung 3-9 ersichtlich, konnte eine erhebliche Steigerung der freigesetzten Lipide in der Flüssigphase mit Steigerung der Enzymkonzentration nachgewiesen werden. Die Änderungen der Zucker-, Protein- und Huminstoffkonzentration mit steigender Enzymmenge war hingegen vernachlässigbar. Das Verhalten der Lipase Fe-01 bei der enzymatischen Spaltung von EPS ist somit vergleichbar mit der Lipase aus *Thermomyces lanuginosus*. Die Spaltung der EPS konnte auch mit anderen Lipasen wie der CalB aus *Candida sp.* nachgewiesen werden. Somit konnte im Rahmen der Untersuchungen nachgewiesen werden, dass Lipasen eine grundlegende Spaltung der EPS ermöglichen, was aber stark von der Enzymkonzentration und auch Art der Lipase abhängig ist. In wie weit die Spaltung auch

einen Einfluss auf die Partikelgröße, Flockung und Fest-Flüssig-Trennung hat wird in den Kapiteln 3.4 und 3.5 erläutert.

3.3.2 *Proteasen*

Für die Untersuchungen zum möglichen Abbau von EPS durch die enzymatische Hydrolyse durch Proteasen standen folgende Enzyme zur Verfügung:

- Protease *Bacillus licheniformis* von Sigma Aldrich
- Protease *Bacillus sp.* von Sigma Aldrich

Die im Rahmen des Enzymscreening untersuchten Proteasen sind aus der Literatur bekannt und werden bei sehr unterschiedlichen Anwendungen zur Spaltung von Proteinen eingesetzt.^[36,37] Laut Herstellerangaben liegen das pH-Wertoptimum bei 6,5–8,5 und das Temperaturoptimum bei 60 °C für die Protease von *Bacillus licheniformis*. Die optimalen Bedingungen für die Protease aus *Bacillus sp.* sollen nach Herstellerangaben bei pH 5–6 liegen. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden unter Verwendung des Substrates Casein die in Tabelle 3-3 zusammengetragenen Optima ermittelt.

Tabelle 3-3: Zusammenstellung der optimalen pH-Werte und Temperaturen der getesteten Lipasen

Enzym	pH-Wert	Temperatur
<i>Bacillus licheniformis</i>	pH 9	60 °C
<i>Bacillus sp.</i>	pH 9 – 10	60 °C

Für *Bacillus sp.* wurde mittels dem verwendeten Aktivitätstest ein abweichendes pH-Wertoptimum bestimmt. Im Rahmen der Aktivitätsuntersuchungen zeigte sich, dass auch in pH-Wertbereich von 7 – 8 schon hinreichend hohe Aktivitäten detektiert werden konnten, so dass von der pH-Wertregulierung Abstand genommen wurde. Ein größerer Einfluss wurde für beide Enzyme bei der Temperaturabhängigkeit vermutet, da aber eine Temperierung auf 60 °C aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten keine Anwendung finden würde, wurden die enzymatischen Hydrolyse bei 37 °C durchgeführt.

Für den Nachweis, dass die gewählten Enzyme die EPS in Faulschlämmen enzymatisch spalten können wurden zunächst Reaktion mit hohen Enzymkonzentrationen (3.000 U/g_{oTS}) durchgeführt. Wie aus Abbildung 3-10 hervorgeht, wurde die Spaltung der EPS erfolgreich nachgewiesen.

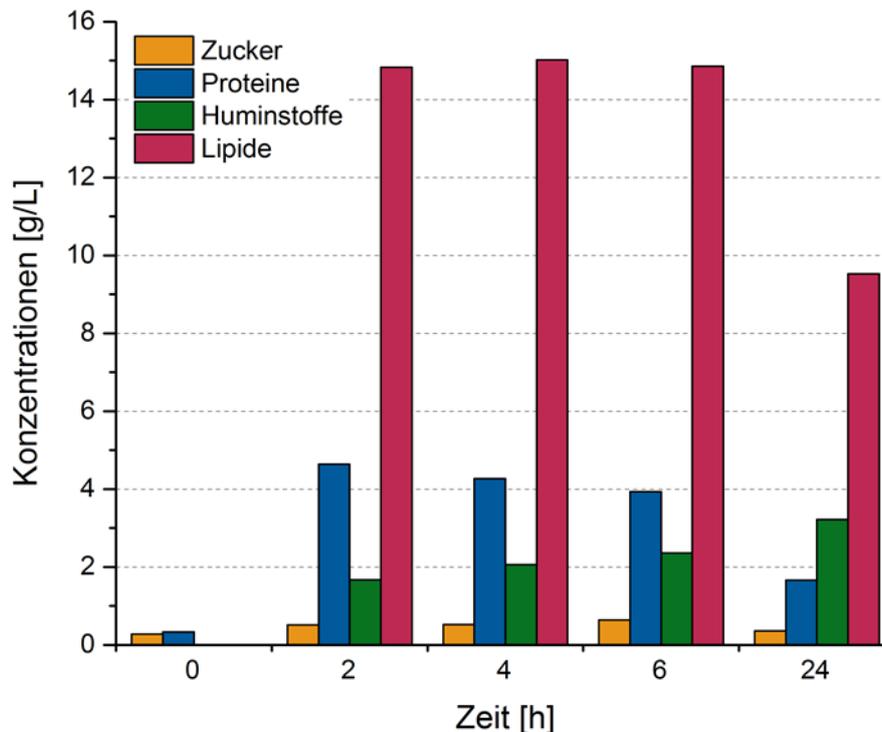


Abbildung 3-10: Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels Protease aus *Bacillus licheniformis*; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von 3.000 U/g_{oTS}

Durch den Einsatz der von *Bacillus licheniformis* gelang es sehr hohe Mengen von Lipiden in die Flüssigphase freizusetzen. Des Weiteren konnten auch Proteine und Huminstoffe anfänglich in steigender Konzentration im Überstand nachgewiesen werden. Mit fortschreitender Reaktionsdauer konnte eine Abnahme der Lipidkonzentration um 36 % und Proteinkonzentration um 70 % beobachtet werden. Diese Abnahmen wurden mit zunehmender Reaktionsdauer wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, bei den unterschiedlichsten enzymatischen Hydrolysen beobachtet und wird der steigenden metabolischen Aktivität des Faulschlamms zugeschrieben, denn die freigesetzten Lipide, Zucker und Proteine können als Nährstoffe für die enthaltenen Organismen dienen. Ein weiteres Indiz für die mikrobiologische Aktivität ist, dass die für Mikroorganismen leichter zugänglichen organischen Bestandteile (Lipide und Proteine) abgebaut werden,

aber die Huminstoffkonzentration im Überstand nicht abnimmt und somit auch kein Abbau nachweisbar ist. Würden alle Bestandteile im Überstand abnehmen, würde viel mehr für z.B. Agglomeration, Sedimentation oder erneutes Binden der EPS-Bestandteile an anderen organischen Bestandteilen sprechen. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der enzymatischen Hydrolyse von Faulschlamm mit der Protease aus *Bacillus sp.* nachgewiesen (siehe Abbildung 3-11).

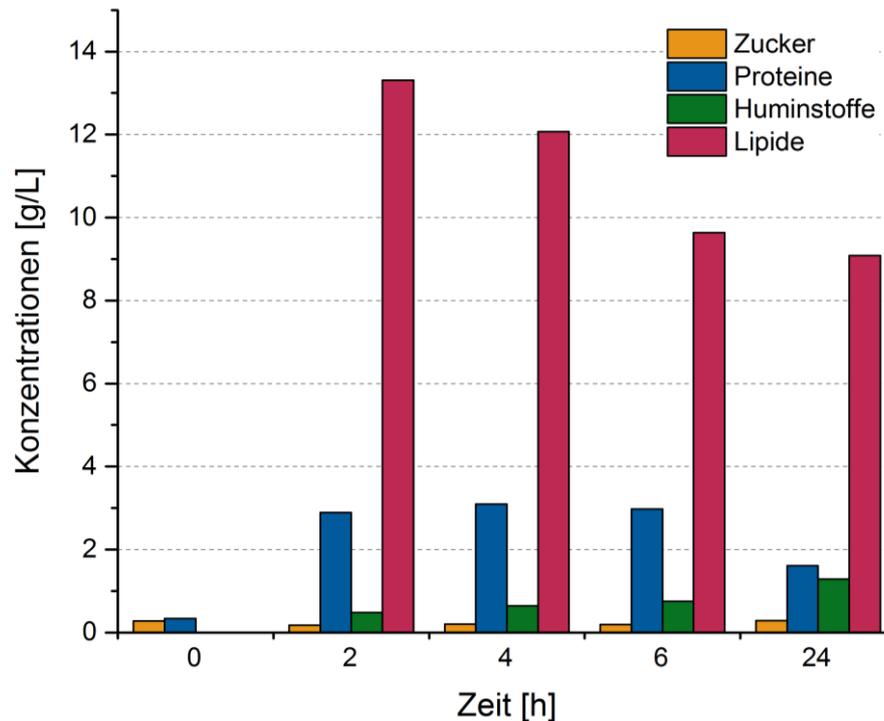


Abbildung 3-11: Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels Protease aus *Bacillus sp.*; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von 3.000 U/g_{oTS}

Jedoch gelang es bei gleicher Aktivität bezogen auf die Feststofffraktion (zu der auch der größte Anteil der EPS gezählt werden) einen höheren Anteil an Proteinen von 48 % und Lipiden von 31 % freizusetzen.

Unter Berücksichtigung wirtschaftlicher Gesichtspunkte ist der Einsatz so hoher Enzymkonzentrationen nicht vertretbar und demzufolge wurden Versuche zur EPS-Spaltung in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration durchgeführt, um eine mögliche Spaltung der EPS unter Einsatz geringer Enzymkonzentrationen nachzuweisen (siehe Abbildung 3-12).

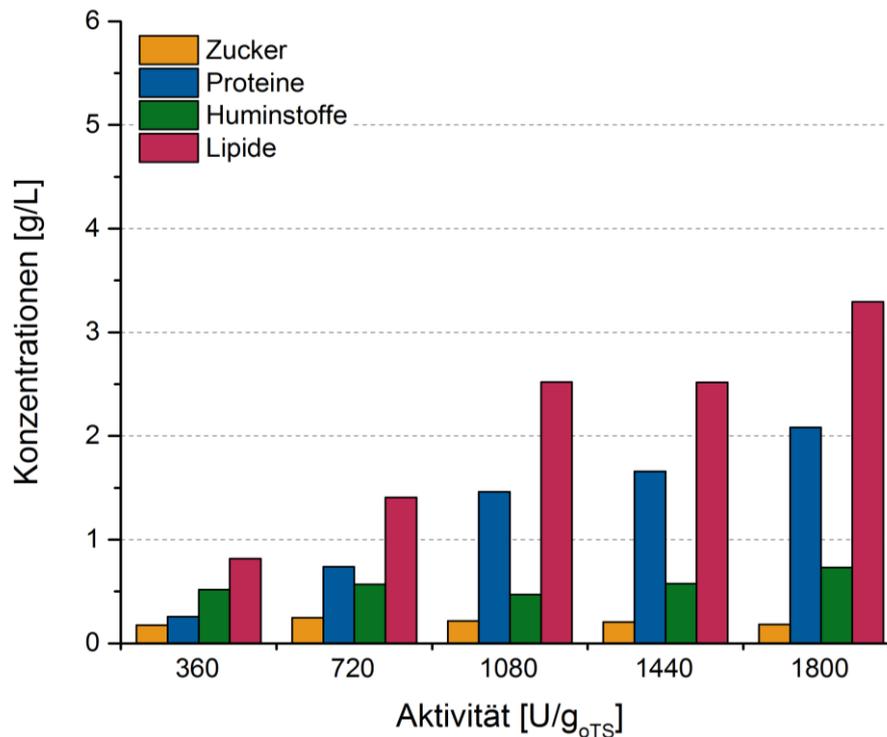


Abbildung 3-12: Untersuchungen zu EPS-Spaltung unter Einsatz einer Protease aus *Bacillus licheniformis* in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bzw. Aktivität; bei 37 °C; für 24 h

Für die Abhängigkeit der enzymatischen Hydrolyse des Faulschlammes von der Proteasekonzentration konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung der Proteine sowie Lipide stark von der eingesetzten Enzymkonzentration abhängig ist. So konnten wesentlich höhere Konzentrationen der Spaltprodukte im Überstand bei höheren Enzymkonzentrationen nachgewiesen werden. Inwieweit die EPS-Spaltung sowie die Enzymkonzentration einen Einfluss auf die Fest-Flüssig-Trennung des Faulschlammes haben, wurde im Rahmen von Flockungs- und Filtrationsversuchen untersucht (siehe Kapitel 3.5).

3.3.3 Cellulase

Für die Hydrolyse des Faulschlammes stand der Cellulase-Enzymkomplex aus *Penicillium verruculosum* zur Verfügung. Dieser Enzymkomplex weist ein pH-Optimum von 4 und ein Temperaturoptimum von 50 °C auf. Allerdings konnten Untersuchungen am Institut für Technische Chemie der TU Bergakademie Freiberg bereits zeigen, dass mit diesem Enzymkomplex bei 37 °C erfolgreich Bioethanol produziert werden kann.^[38] Dieses legt nahe, dass der Enzymkomplex auch Reaktionen katalysieren kann, wenn nur

die Restwärme des Faulschlammes genutzt werden kann. Ein Nachteil dieses Komplexes ist jedoch das pH-Optimum von 4, was eine pH-Werteinstellung notwendig macht. Aufgrund des hohen Carbonatanteils im Schlamm, ist diese jedoch mit einer starken Schaumbildung verbunden. Zudem werden vergleichsweise große Säuremengen benötigt, die die Wirtschaftlichkeit negativ beeinflussen.

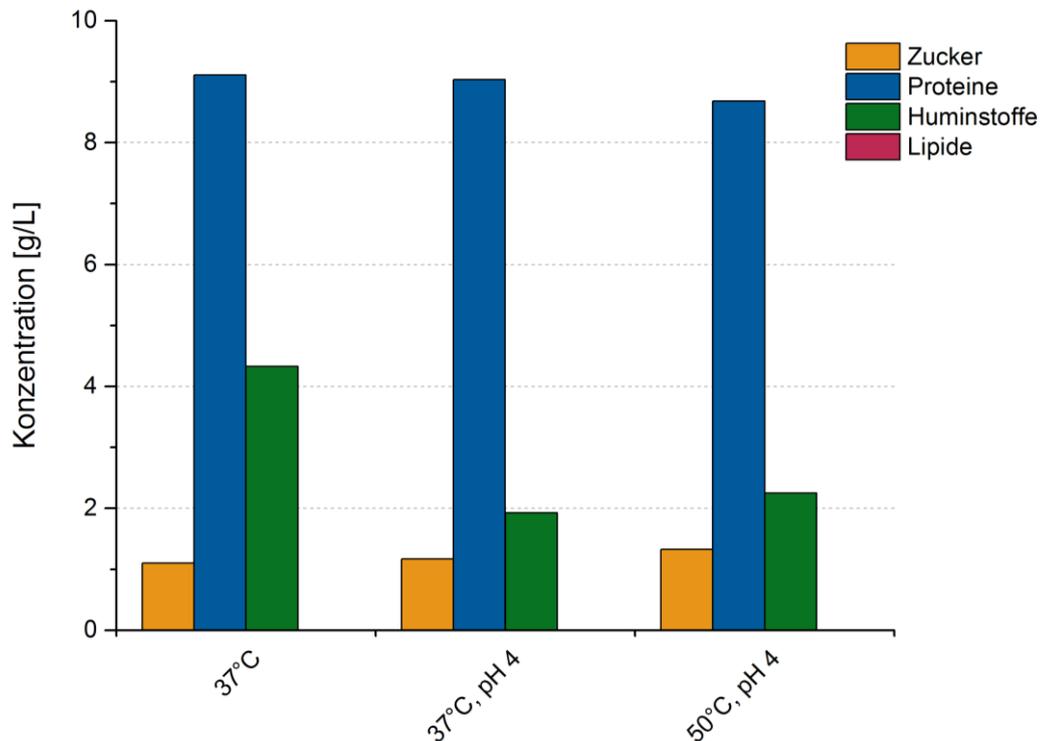


Abbildung 3-13: Einfluss der enzymatischen Hydrolyse mit Cellulasen (50 U/g_{OTS}) auf die Abgabe von Zucker, Huminstoffen, Proteinen und Lipiden in die flüssige Phase von Faulschlamm

Bei der Behandlung des Faulschlammes mit Cellulase (Abbildung 3-13) konnte der Eintrag von Zuckern, Proteinen und Huminstoffen in die Flüssigphase nachgewiesen werden. Bei pH-Wertkontrolle und Temperaturkontrolle konnten nur geringe Änderungen bzw. Steigerungen bei der Zuckerfreisetzung, wie $\approx 0,06$ g/L bei 37 °C/pH 4 und $\approx 0,15$ g/L bei 50 °C/pH 4, nachgewiesen werden. Vergleichbar geringe Änderungen wie bei der Zuckerfreisetzung konnten für die Proteine nachgewiesen werden. Ein anderes Verhalten ist bei den Huminstoffen zu beobachten. Durch die pH-Wertregulation sind geringe Konzentrationen an Huminstoffen nach der enzymatischen Hydrolyse in der flüssigen Phase nachgewiesen. Dies kann auch anhand der Färbung der Filtrate beobachtet werden (siehe Abbildung 3-14).

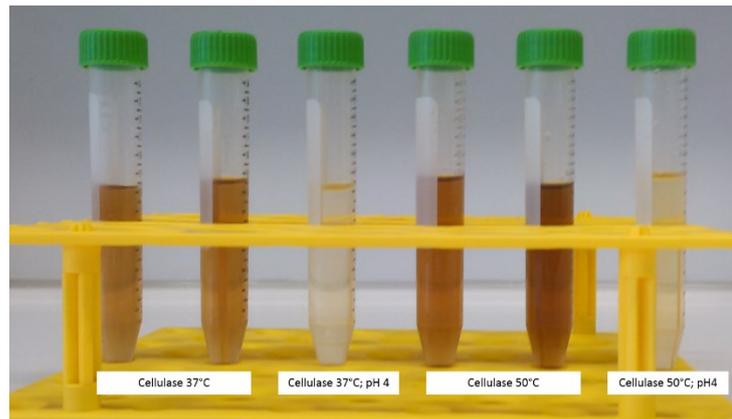


Abbildung 3-14: Einfluss der Behandlung der Schlämme mit Cellulasen auf die Färbung der wässrigen Phase

Dabei wird die Entfärbung hauptsächlich auf die Lösungseigenschaften der farbgebenden Huminstoffe zurückgeführt, die durch die pH-Wertänderung stark beeinflusst wird. Eine pH-Wertanpassung sowie Temperaturkontrolle, welche einen ökonomischen und ökologischen Nachteil für einen möglichen Prozess bedeuten würde, scheinen aufgrund den Nachteile und den nur geringen Änderungen bei der EPS-Spaltung nicht sinnvoll.

Zudem sollten möglichst geringe Mengen an Enzym bzw. Cellulase zur Spaltung von EPS eingesetzt werden. Daher wurden Untersuchungen zur EPS-Spaltung in Abhängigkeit von der Enzymzugabe durchgeführt. Da durch die Temperaturerhöhung nur geringe Steigerungen bei der EPS-Spaltung erzielt wurden, wurden die Reaktionen ausschließlich bei 37 °C ausgeführt.

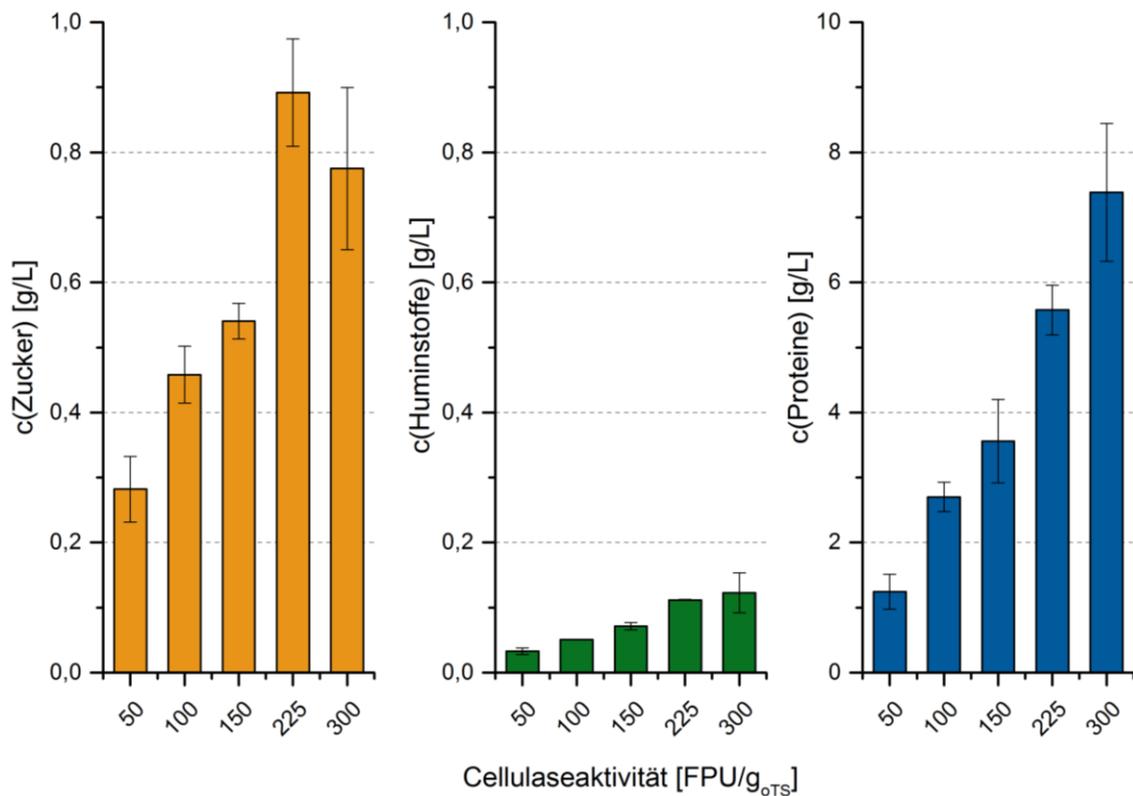


Abbildung 3-15: Einfluss der Cellulasekonzentration auf die Spaltung der EPS anhand der Freisetzung von Zuckern, Proteinen und Huminstoffen

In Abbildung 3-15 sind die freigesetzten Zucker, Huminstoffe und Proteine in Abhängigkeit von der Cellulasekonzentration aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass alle 3 Spaltprodukte mit steigender Enzymkonzentration vermehrt in die flüssige Phase eingebracht werden. Die stärksten Änderungen wurden dabei bei der Zunahme der Proteinkonzentration beobachtet. Neben der Bestimmung der Zucker, Huminstoffe und Proteine werden eigentlich auch Lipide für die Güte der Spaltung der EPS herangezogen aber bei der enzymatischen Hydrolyse mit Cellulasen konnte keine Freisetzung von Lipiden in die Flüssigphase nachgewiesen werden. Neben der Untersuchung hinsichtlich der Enzymkonzentration wurden auch Versuche zur Bestimmung der Reaktionslänge untersucht. In Abbildung 3-16 wurde die Freisetzung von Zuckern, Huminstoffen, Proteinen und Lipiden bei der enzymatischen Hydrolyse von Faulschlamm über 48 h, ohne pH-Wertregulierung und einer Reaktionstemperatur von 37 °C durchgeführt.

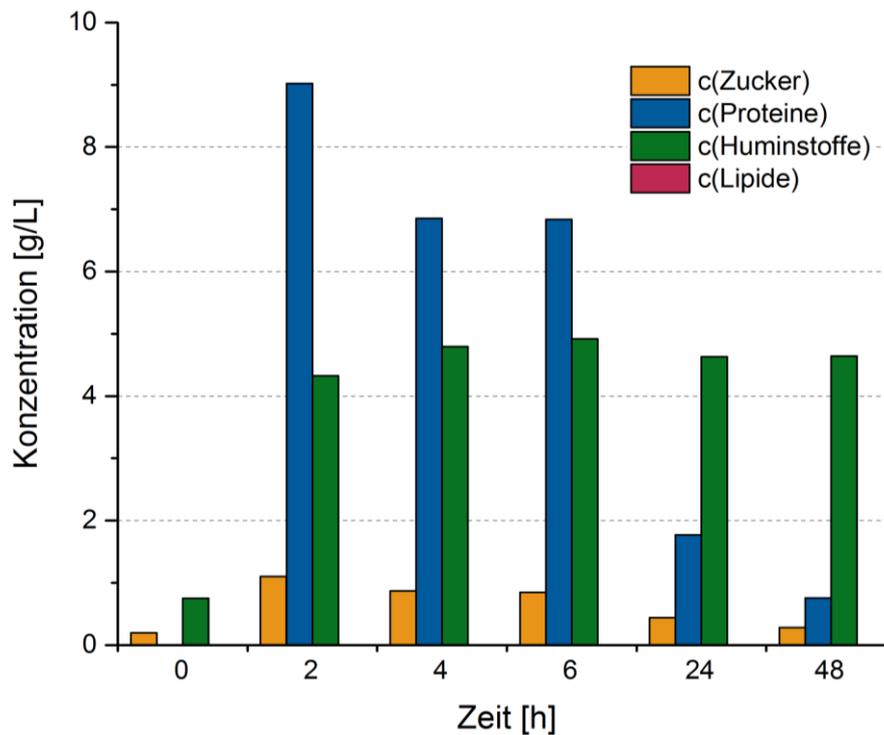


Abbildung 3-16: Untersuchungen hinsichtlich der Reaktionszeit zur Spaltung der EPS mittels Cellulasen aus *Penicillium veruculosum*; ohne pH-Wertregulation; bei 37 °C; Aktivität von 50 FPU/g_{oTS}

Wie aus Abbildung 3-16 hervorgeht, konnte schon innerhalb der ersten 2 h der größte Anteil an Huminstoffen, Proteinen und Zuckern nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Versuche wurde eine erhebliche Abnahme der Proteine und Zucker nachgewiesen, während bei den Huminstoffen keine bedeutenden Veränderungen detektiert wurden. Die Abnahme der Spaltprodukte wurde wie schon in Kapitel 3.3.1 beschrieben bei einer Vielzahl der Versuche beobachtet und deutet daraufhin, dass die Abnahme mit der steigenden mikrobiellen Aktivität im Faulschlamm zusammenhängt. Durch die Probenlagerung im Kühlschrank bei 4 °C wird die mikrobielle Aktivität der Organismen im Faulschlamm herabgesetzt und sie benötigen einige Zeit um bei den gegebenen Reaktionsbedingungen Stoffwechselprozesse durchzuführen. Die Aktivierung der mikrobiellen Aktivität wird natürlich auch durch die Freisetzung leicht zugänglicher Nährstoffe wie den Zuckern und Proteinen begünstigt. Für die Theorie des mikrobiellen Abbaus spricht auch, dass die Huminstoffe, die in der Regel nicht so einfach für Mikroorganismen zugänglich sind, von der Abnahme über den Reaktionsverlauf auch nicht betroffen sind. Inwieweit die nachgewiesene Spaltung der EPS eine Veränderung

beim Entwässerungsverhalten mit sich zieht wurde durch umfangreiche Filtrationsversuche bestimmt (siehe Kapitel 3.5).

3.4 Einfluss der enzymatischen Behandlung der Faulschlämme auf die Partikelgrößenverteilung

Zur Quantifizierung der Einflüsse der enzymatischen Hydrolyse von Faulschlamm wurden unterschiedliche Analysemethoden in Betracht gezogen. Da durch den Einsatz der Enzyme verschiedene Bestandteile der EPS gespalten werden sollten, lag die Vermutung nahe, dass diese Änderung über die Bestimmung der Partikelgrößen vor und nach der enzymatischen Hydrolyse bzw. auch in-situ durch den Einsatz einer Partikelsonde nachweisbar sind. Das Wissen über die Partikelgrößenverteilung ist für die Auslegung des Trennverfahrens von großer Bedeutung, da eine übermäßige Verkleinerung erheblichen Einfluss auf die Filtrierbarkeit der Proben hat.

Sowohl bei der enzymatischen Behandlung als auch bei der Inkubation der Faulschlämme bei 37 °C konnte ein Zerfall der Partikel beobachtet werden. Von ausgewählten Faulschlammproben wurden daher die Partikelgrößenverteilungen bestimmt. Dies ist in Abbildung 3-17 und Abbildung 3-18 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der geringste Anteil an Partikeln kleiner 10 µm von 9 % unbehandelter Faulschlamm besitzt. Erfolgt eine Inkubation des Faulschlammes bei 37 °C ohne Enzymzugabe, erhöht sich der Anteil der kleineren Partikel leicht auf 10,7 %. Vergleichbare Werte von 10,1 und 10,6 % wurden auch für die Faulschlämme nach der Behandlung mit Lipasen erhalten. Der mit der Protease *Bacillus licheniformis* inkubierte Faulschlamm weist einen Anteil an Partikeln kleiner 10 µm von 11,4 % auf.

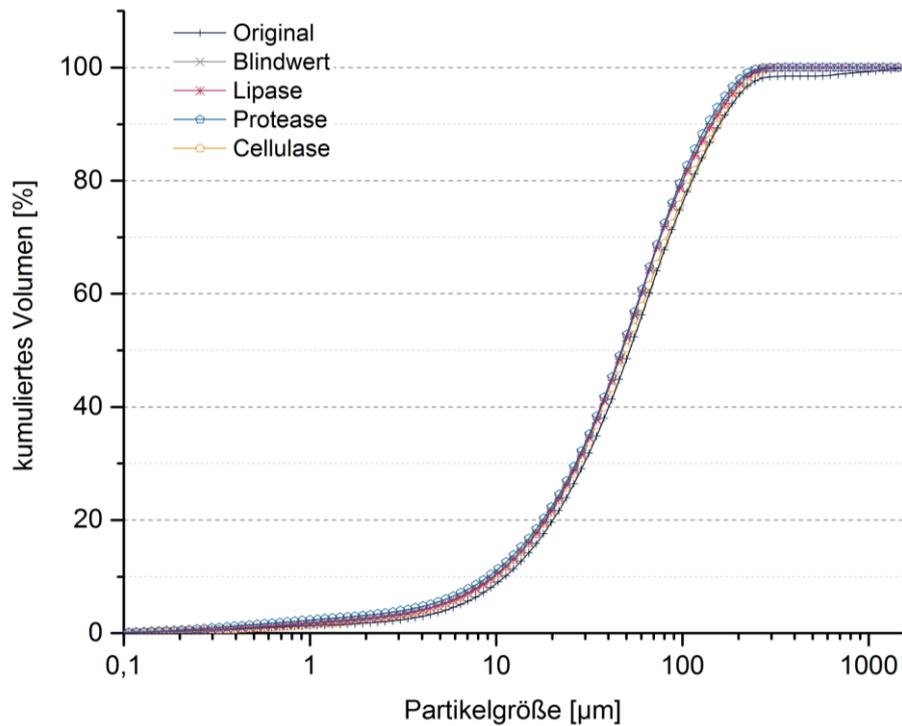


Abbildung 3-17: Summarische Auftragung der Partikelgrößenverteilung von unbehandelten und enzymatisch-behandelten Faulschlamm

Diese leichte Erhöhung des Anteils kann im Fall der Lipasen nicht auf eine Wirkung der Enzyme zurückgeführt werden, da bei diesen Werten der Anteil der Partikel kleiner 10 µm vergleichbar ist mit dem der Blindprobe (Probe bei 37 °C inkubiert ohne Zugabe von Enzymen). Die Protease hingegen scheint die Partikel anzugreifen, wodurch Proteine freigesetzt werden und gleichzeitig die Partikel kleiner werden. Dieser Effekt ist jedoch marginal, wird aber auch in der Arbeit von Pei et al. beschrieben.^[4]

Auch von autoklavierten Proben wurden die Partikelgrößenverteilungen bestimmt und sind in Abbildung 3-18 dargestellt. Zum einen ist zu erkennen, dass der Anteil der Partikel < 10 µm sind bei unbehandeltem Faulschlamm bei 9,1 % und bei inkubierten Faulschlamm ohne Enzymzugabe bei 10,7 % liegen.

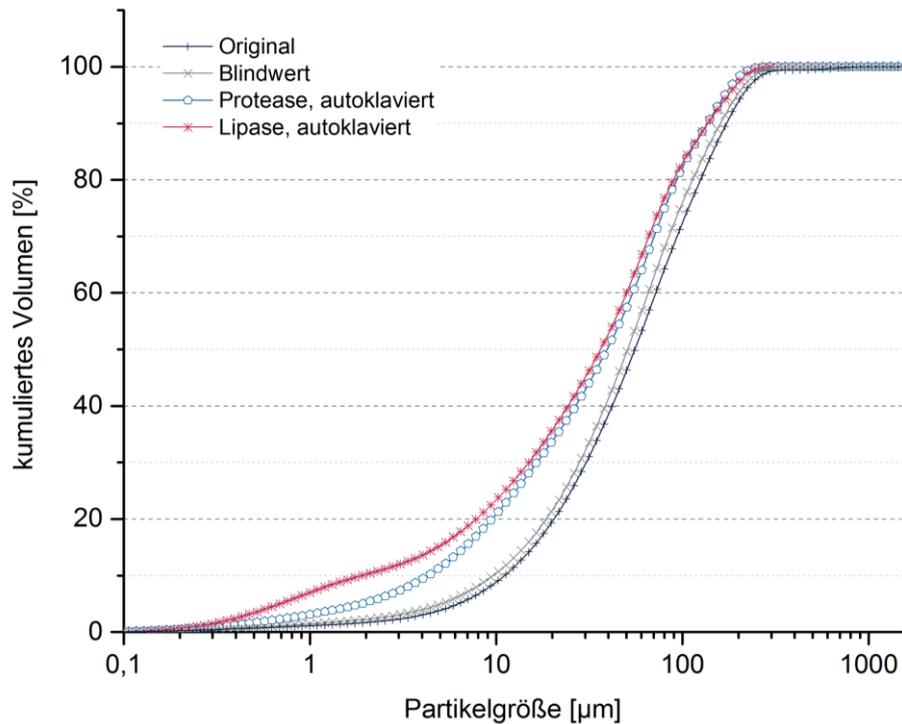


Abbildung 3-18: Summarische Darstellung der Partikelgrößenverteilung von autoklavierten und enzymatisch-behandelten Gärresten

Zum anderen ist durch den Einsatz von Cellulase keine weitere Änderung im Vergleich zur Partikelgrößenverteilung der Blindprobe (bei 37°C inkubiert ohne Enzymzugabe) zu erkennen. Der Anteil von Partikeln < 10 µm ist bei beiden Proben vergleichbar 10,7 % beim Blindwert und 10,6 % Cellulase-behandelten Probe. Diese Spricht dafür, dass die größte Änderung innerhalb dieses Versuchsaufbaus allein durch die Inkubation bei 37 °C und nicht durch die enzymatische Hydrolyse hervorgerufen wird. Ein weiteres interessantes Phänomen wird bei Betrachtung der Partikelgrößenverteilungen der autoklavierten Proben sichtbar. Für diese Proben wurde der Faulschlamm, bevor er mit Enzym versetzt und inkubiert wurde, autoklaviert. Dies führt dazu, dass der Anteil der Partikel kleiner 10 µm stark zunimmt: auf 21,3 % bei Verwendung der Protease und auf 23,4 % bei Verwendung der Lipase. Die starke Änderung der Partikelgrößenverteilung erfolgt durch den Abbau bzw. Austrag der Carbonate (als CO₂) durch die Temperaturerhöhung und Druckveränderungen während des Autoklavierens.

Zusammenfassend ist in Tabelle 3-4 der Einfluss der Behandlungsmethoden auf den Anteil der Partikel kleiner 10 µm dargestellt. Unabhängig vom Enzym wird nach Zugabe von Pepton eine Zunahme der Feinstfraktion beobachtet. Den höchsten Anteil konnte mit autoklavierten Faulschlamm nach Behandlung mit Lipase und Pepton erzielt werden.

Tabelle 3-4: Einfluss der Behandlungsmethode auf den Anteil von Partikel < 10 µm

Behandlungsmethode	< 10 µm
Unbehandelter Faulschlamm	9 %
Inkubiert bei 37 °C	10,7 %
Lipase	10,1 - 10,6 %
Protease	11,4 %
Cellulase	10,6 %
Autoklavierter FS + Protease	21,3 %
Autoklavierter FS + Lipase	23,4 %

Um die Partikelgrößenveränderung weiter verifizieren zu können, wurden weitere Untersuchungen mit der in-situ-Partikelsonde FBRM400 von Mettler Toledo durchgeführt. In Abbildung 3-19 ist ein Beispiel für die Online-Überwachung der Partikelgrößenverteilung während der enzymatischen Hydrolyse von Faulschlamm mit einer Lipase von *Thermomyces lanuginosus* abgebildet. Die Hydrolyse wurde bei 37 °C unter Rühren durchgeführt.

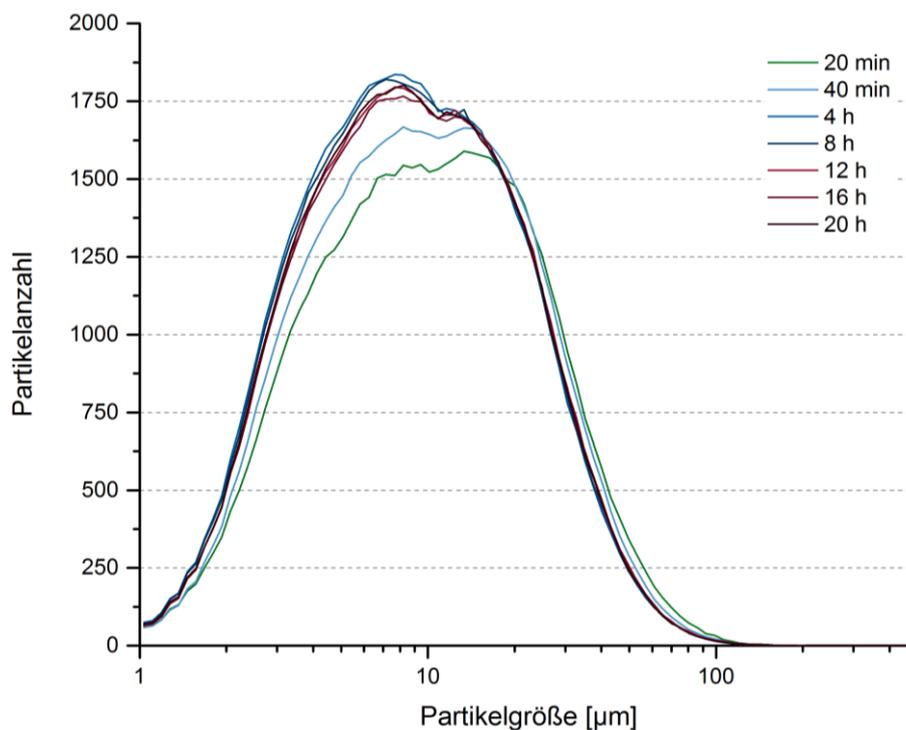


Abbildung 3-19: in-situ-Aufzeichnung der Partikelgrößenverteilung bei enzymatischen Hydrolyse von Faulschlamm mit einer Lipase von *Thermomyces lanuginosus*

Wie zu erkennen ist, konnten deutliche Änderungen in der Partikelgrößenverteilung über den Reaktionszeitraum aufgezeichnet werden. So zeigt sich eine Verschiebung der Partikelgröße hin zu Partikeln mit $< 10 \mu\text{m}$ innerhalb der ersten 4 h. Im Anschluss an die Reaktionszeit von mehr als 4 h können keine signifikanten Änderungen der Partikelgröße nachgewiesen werden. Diese deutliche Verschiebung konnte jedoch nicht bei allen enzymatischen Hydrolysen messtechnisch nachgewiesen werden. Dabei konnte aber keine Systematik hinsichtlich Enzymklasse oder Enzymmenge nachgewiesen werden. Zudem konnte auch nicht immer eine Partikelgrößenveränderung nachgewiesen werden, wenn nachweislich durch die enzymatische Hydrolyse EPS-Bestandteile nachgewiesen werden. Dennoch gibt der Einsatz der in-situ-Messung einen ersten Anhaltspunkt ob die enzymatische Hydrolyse einen Einfluss auf die Strukturen des Faulschlammes besitzt und ist aufgrund des geringen methodischen Aufwandes im Labormaßstab eine sinnvolle Ergänzungsmethode neben den analytischen Methoden, die den Nachweis der einzelnen EPS-Fragmente ermöglichen.

3.5 Fest-Flüssig-Separation – Einfluss von polymeren Flockungsmittel (AP3/4)

Die Optimierung der Fest-Flüssig-Trennung von Faulschlamm wird in der Praxis individuell für jede Anlage und damit jeden Klärschlamm durchgeführt. Um den Einfluss der enzymatischen Hydrolyse der unterschiedlichen Enzymklassen nachweisen zu können, mussten im Rahmen der Untersuchungen einige Grundbedingungen festgelegt werden.

- 1) Alle Faulschlammproben werden mit dem gleichen polymeren Flockungsmittel behandelt.
- 2) Vergleiche werden nur zwischen Faulschlamm der gleichen Charge und damit vergleichbaren Eigenschaften bemüht.

Um optimale Vergleichsbedingungen zu schaffen, wurden zunächst Untersuchungen hinsichtlich der optimalen Flockenbildung und somit der Fest-Flüssig-Trennung von Faulschlamm durchgeführt, um eine solide Basis zu schaffen, die Aussagen über den Einfluss der enzymatischen Hydrolyse auch bei geringsten Änderungen erlaubt.

In der Praxis werden auf Kläranlagen meist Kammerfilterpressen oder auch Dekanterzentrifugen eingesetzt. Um einen hinreichend gute Fest-Flüssig-Separation zu

ermöglichen werden polymere Flockungsmittel (meist kationische) eingesetzt. Im Rahmen des Projektes wurde das polymere Flockungsmittel CP62-K von der Firma SNF eingesetzt. Das polymere Flockungsmittel wird als verdünnte Lösung zum Faulschlamm hinzudosiert, so dass in der Regel die eingesetzte Konzentration weniger als 1 % bezogen auf die Trockensubstanz des Faulschlammes beträgt. In Abbildung 3-20 ist der apparative Aufbau für die Optimierung der Flockungsmittelkonzentration abgebildet. Während der Untersuchungen wurden unterschiedliche Polymerkonzentrationen im Bereich von 0,3 – 1,5 % bezogen auf die Trockensubstanz eingesetzt.

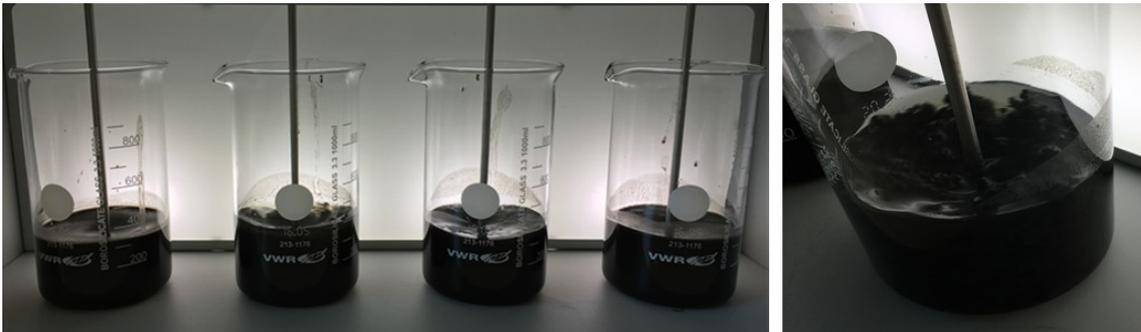


Abbildung 3-20: Flockungsuntersuchungen unter Einsatz eines Flockulator; Vergleich unterschiedlicher Flockungsmittelkonzentration auf Klärschlammproben.

Um die optimale Polymerdosierung für die Untersuchungen zu validieren, wurden neben den optischen Faktoren (Flockenbildung, Stabilität) auch Parameter wie Partikelbildung, Partikelgrößenverteilung sowie Filtrationseigenschaften (Permeatabgabe, Trübung, TS-Gehalte) bestimmt. Die Überprüfung der Qualität der Flockung erfolgte mittels Filtration. Ab einer Polymerkonzentration von 0,6 % konnte die Flockenbildung beobachtet werden und durch Filtrationsversuche ein klares Filtrat gewonnen werden. Wie aus Abbildung 3-21 ersichtlich konnten jedoch nur geringe Mengen der Flüssigphase des Faulschlammes durch die Filtration abgetrennt werden. Erst bei Polymerkonzentrationen ab 1 % konnte eine effiziente Fest-Flüssig-Separation erzielt werden. Die Filtrationen wurden dabei immer in zwei Stufen durchgeführt: 1) Drucklose Filtration und 2) Aufbringung eines Gewichts, zum Abpressen weiterer Flüssigkeit.

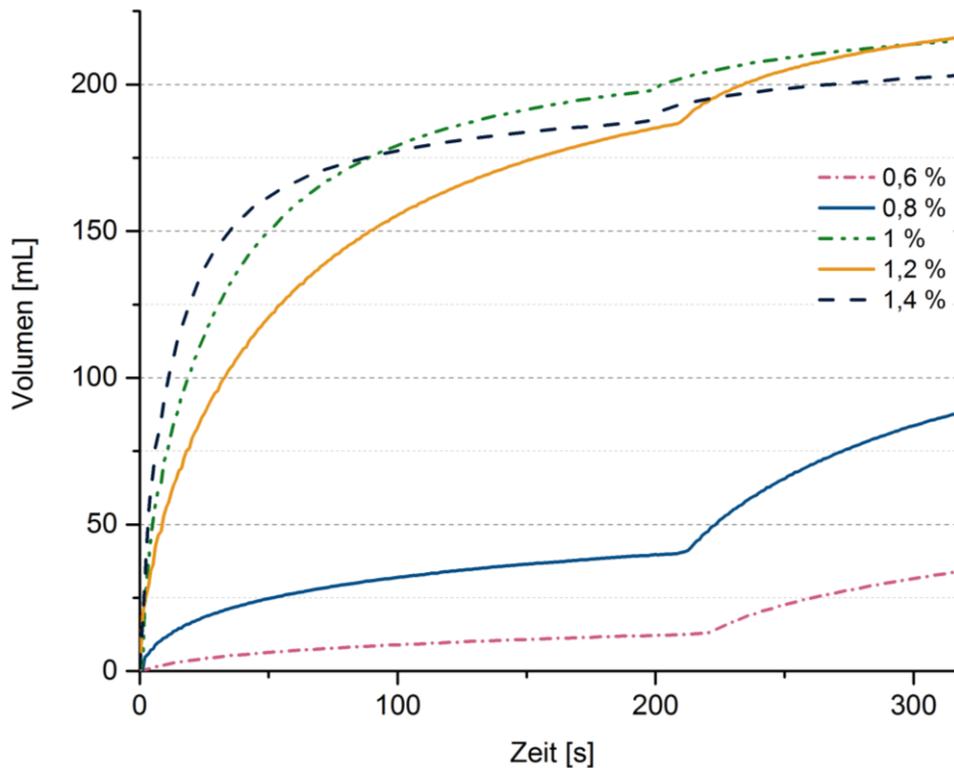


Abbildung 3-21: Auswirkungen auf die Filtrationsleistungen durch den Einsatz unterschiedlicher Polymerdosierungen

Aus dem Verlauf der Filtrationskurven ist zu erkennen, dass die Polymerkonzentrationen von 1 %, 1,2 % und 1,4 % nur geringe Abweichungen in der maximal gewonnenen Filtratmenge aufweisen (siehe auch Abbildung 3-22). Jedoch sind Unterschiede bei der Geschwindigkeit der Filtratabgabe bei den Polymerkonzentrationen von 1 %, 1,2 % und 1,4 % zu erkennen. So ist bei einer Polymerdosierung von 1,4 % die Filtratabgabe zunächst besser (Anstieg der Filtratkurve 0 – 30 s) aber die Entwässerungsleistung ist bei Polymerkonzentration von 1 % und 1,2 % besser, da ein höheres Gesamtpermeatvolumen erzielt (ca. 5 %) wird. Zudem ergibt sich beim Einsatz von einer Polymerkonzentration von 1 %, dass die Permeatabgabe fast vollständig ohne den Einsatz des zusätzlichen Gewichts auskommt (siehe auch Abbildung 3-22).

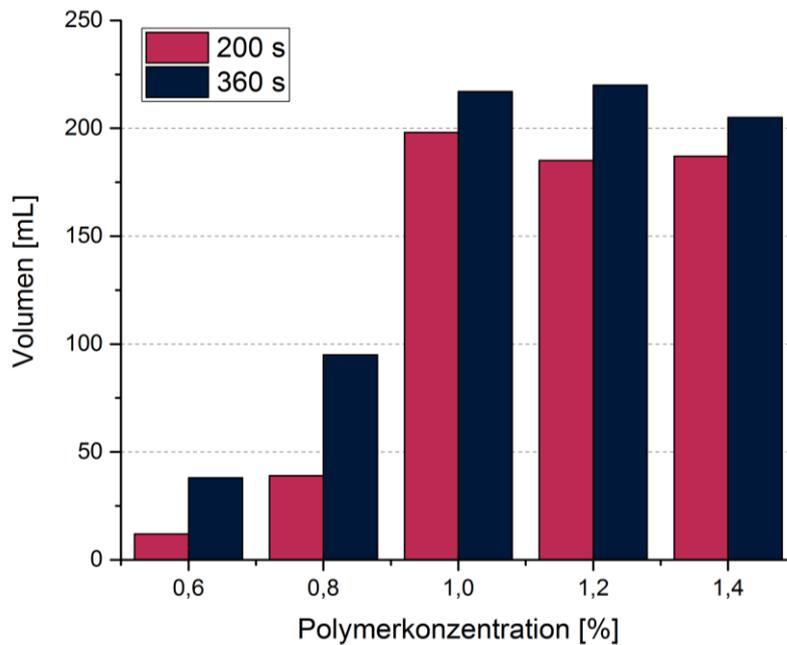


Abbildung 3-22: Vergleich der gewonnenen Permeatmengen in Abhängigkeit von der Polymerdosierung nach 200 s und 360 s

Im Anschluss der Filtration wurden die Filterkuchen auf Restfeuchte, die Flüssigphase auf den TS-Gehalt und die Trübung hin untersucht. Ziel war dabei, einen möglichst TS-reichen Filterkuchen bei gleichzeitig TS- und Trübstoff-armen Filtraten zu erhalten. Wie aus Abbildung 3-23 hervorgeht, gelingt es mit steigender Polymerdosierung die Trübung des Permeats zu verringern. Mit der Verringerung der Trübung nimmt auch der TS-Gehalt in der flüssigen Phase von anfänglich 0,28 % auf 0,18 % ab. Die Änderungen der TS-Gehalte ab einer Polymerdosierung von 1 % der Trockensubstanz des Faulschlammes weist jedoch nur noch marginale Veränderungen auf. Somit führen Dosierungen von > 1 % nicht zu einer deutlichen Steigerung der Permeatqualität. Bei der Betrachtung der TS-Gehalte (siehe Abbildung 3-23) ist auffällig, dass für die Polymerdosierung 0,6 % und 0,8 % kein Filterkuchen unter den gewählten Filtrationsbedingungen gewonnen werden konnte. Wie schon aus den Filtrationskurven ersichtlich, konnte nur ein geringer Teil der Flüssigphase bei diesen beiden Polymerdosierungen gewonnen werden. Der höchste TS-Gehalt, der Nachweis für die geringste Restfeuchte ist, konnte bei einer Polymerdosierung von 1,2 % gemessen werden und liegt 0,6 % höher als bei einer Polymerdosierung von 1 %. Auffällig ist, dass ab einer Polymerdosierung von 1,4 % der positive Effekt der besseren Entwässerbarkeit abnimmt und die Restfeuchte im Filterkuchen wieder zunimmt, dies spricht für Überflockung des Faulschlammes.

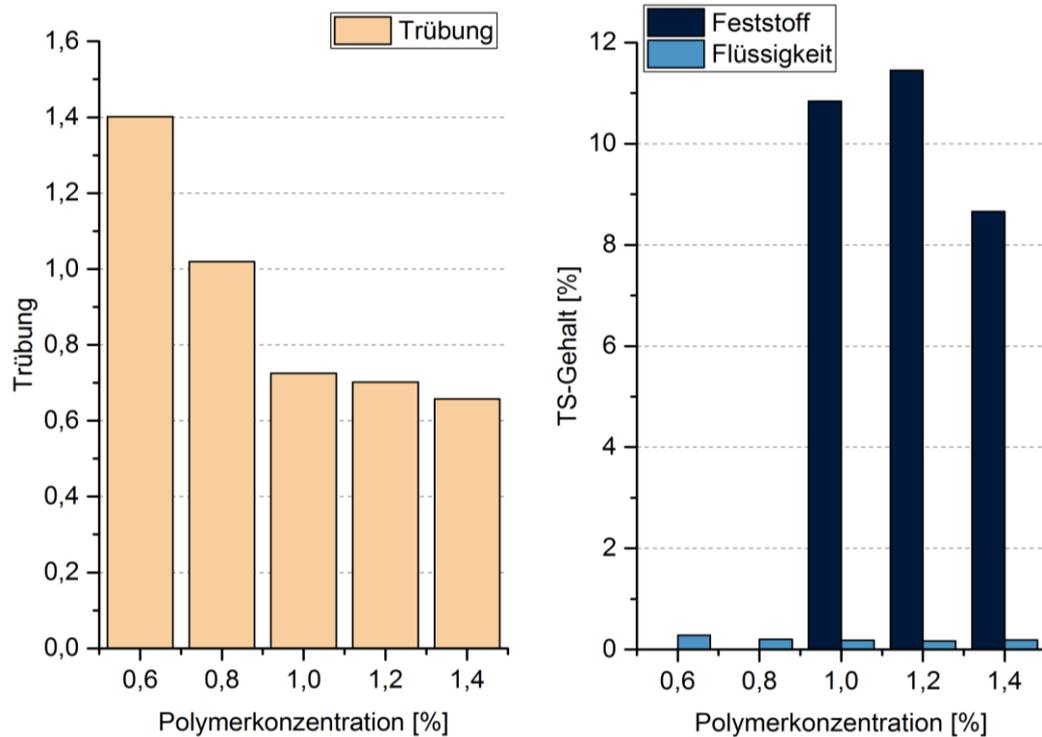


Abbildung 3-23: Einfluss der Polymerkonzentration auf die Trübung des Permeats sowie TS-Gehalt der flüssigen sowie festen Phase nach der Filtration

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass eine Filtration des Faulschlammes in Kombination mit dem eingesetzten Polymer nur ab einer Dosierung von 1 % des TS-Gehaltes des Faulschlammes möglich ist. In Bezug auf die Parameter Trübung, TS-Gehalt in Filtrat und Feststoff sowie Filtrationsleistung ist eine Steigerung der Polymermenge auf 1,2 % bzw. 1,4 % nicht erforderlich.

Bei den Flockungs- und Filtrationsuntersuchungen von Faulschlamm nach enzymatischer Hydrolyse wurden in Abhängigkeit von der Enzymklasse aber auch der Enzymkonzentrationen sehr unterschiedliche Verhaltensweisen beobachtet. Unabhängig von der Enzymklasse konnten Faulschlämme, die behandelt wurden, ebenso wie unbehandelte Faulschlämme mit vergleichbaren Polymerdosierungen geflockt werden und damit eine Fest-Flüssig-Separation durchgeführt werden. In Abbildung 3-24 wurden die Filtrationskurven von Faulschlammproben, die mit der Lipase CalA ($87 \cdot 10^6 \text{ U/g}_{\text{OTS}}$), der Cellulase aus *Penicillium veruculosum* ($50 \text{ U/g}_{\text{OTS}}$) und der Protease aus *Bacillus licheniformis* ($3.000 \text{ U/g}_{\text{OTS}}$) behandelt wurden, aufgetragen, sowie die Kurven der Originalprobe als auch der Blindprobe (ohne Enzymzugabe aber für 4 h bei 37 °C inkubiert). Bei Vergleich der Originalprobe mit den Inkubierten Proben

fällt auf, dass die Reaktionsbedingungen einen erheblichen Einfluss auf die Filtrationseigenschaften des Faulschlammes haben. Durch die Inkubation wird die Filtrationsleistung stark herabgesetzt, denn es können bei gleichbleibender Polymerdosierung nur sehr geringe Filtratmengen gewonnen werden. Zudem haben die enzymatischen Hydrolysen mit Cellulase und Protease in der ersten Filtrationsstufe einen negativen Einfluss selbst im Vergleich mit der Blindprobe.

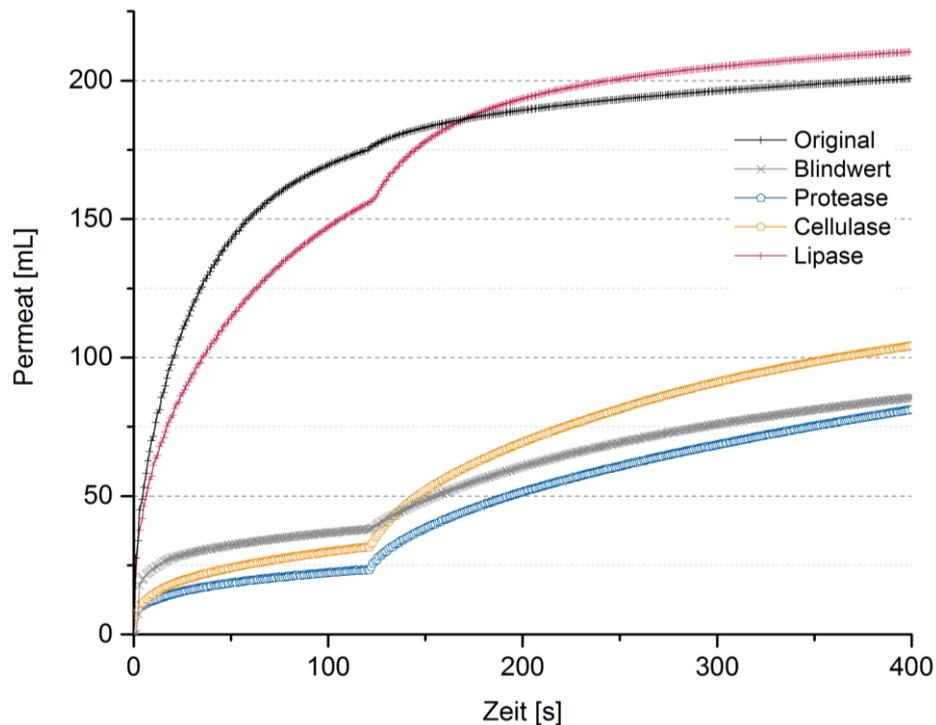


Abbildung 3-24: Darstellung der Filtrationskurven in Abhängigkeit von der enzymatischen Hydrolyse bei einer Polymerdosierung von 1 % bezogen auf die Trockensubstanz des Faulschlammes

Durch die Behandlung mit der Lipase konnte eine enorme Steigerung von der Filtrationsleistung im Vergleich zur Blindprobe (Filtratvolumen nach 100 s von ≈ 40 mL auf ≈ 110 mL) erzielt werden. Zudem konnten durch die enzymatische Hydrolyse mit Lipase sogar Steigerungen bei der gewonnenen Filtratmenge erzielt werden. Zwar verläuft die Filtratabgabe unter gewählten Filtrationsbedingungen etwas langsamer ab aber innerhalb der zweiten Filtrationsstufe (mit Gewicht) können höhere Entwässerungsleistungen beobachtet werden. Im Gegensatz zu Untersuchungen von Pei et al.^[4] konnte hier mit Cellulase eine bessere Entwässerung erzielt werden. Bei der zitierten Studie wurden Cellulase und Protease auf deren Einfluss auf die Entwässerung untersucht, wobei eine deutliche Verbesserung beim Einsatz mit Proteasen beobachtet

wurde.^[4] Die erzielten Unterschiede resultieren vermutlich aus der unterschiedlichen Struktur der enthaltenen EPS. Um abschätzen zu können, ob die richtige Polymerdosierung für die Filtration der enzymatisch behandelten Proben gewählt wurde, erfolgte die Aufzeichnung von Filtrationskurven bei Polymerdosierung von 0,8 % und 1,2 % bezogen auf die Trockensubstanz des Faulschlamm. In Abbildung 3-25 wurden die Einflüsse der enzymatischen Behandlung sowie der Polymerdosierung auf die TS-Gehalte in der flüssigen und festen Phase nach der Filtration der Proben aufgetragen.

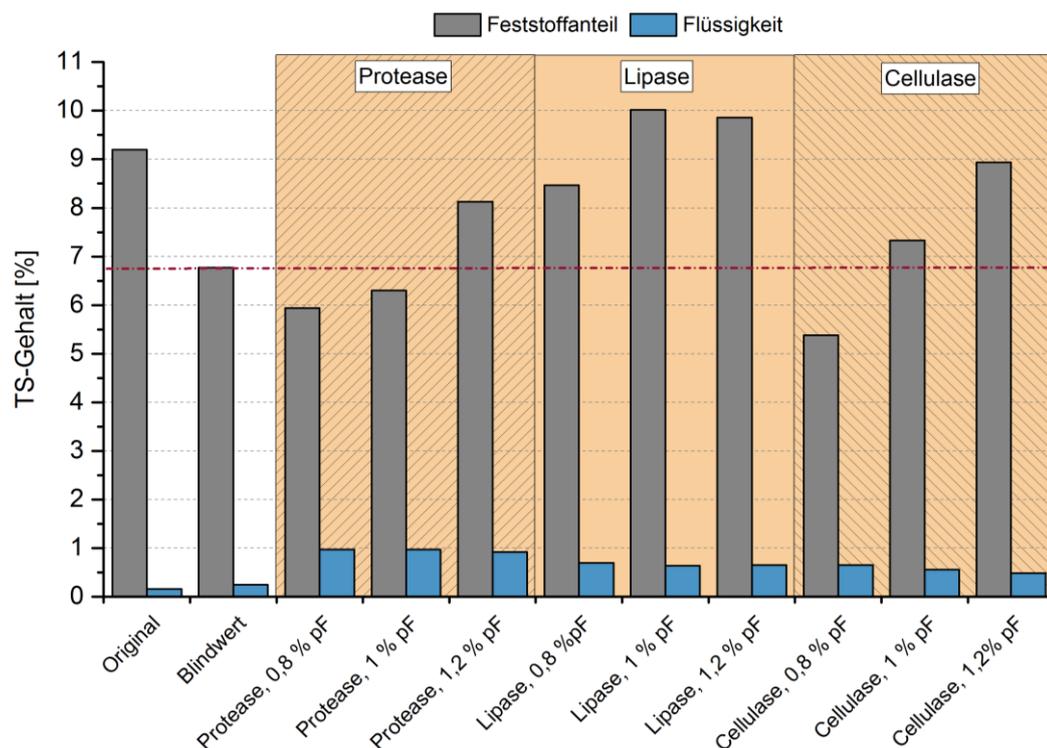


Abbildung 3-25: Einfluss der enzymatischen Hydrolyse sowie der Polymerdosierung auf die TS-Gehalt in der flüssigen sowie festen Fraktion nach der Filtration

Wie zu erkennen ist, steigen bei allen Behandlungsformen die TS-Gehalte in der Flüssigphase in Vergleich zu Original aber auch Blindprobe an. Dies ist auf die Spaltung der EPS zurückzuführen und hat durchaus eine wichtige Bedeutung für eine technische Umsetzung, da die Rückbelastung mit CSB aus den Wässern der Fest-Flüssig-Trennung auf einer Kläranlage möglichst gering ausfallen sollte. Positive Effekte sind hingegen bei der Feststofffraktion gemessen worden, denn so gelingt es bei allen drei enzymatischen Behandlungen bei ausreichender Polymerdosierung, dass die Feststofffraktion einen geringen Wasseranteil aufweist und somit ein höherer Entwässerungsgrad bei gleichen

Versuchsbedingungen erreicht wurde. Bei der Behandlung des Faulschlammes mit der Lipase CalA konnte sogar die Entwässerungsleistung im Vergleich zum Originalschlamm um 1 % an TS-Gehalt im Feststoff gesteigert werden. Diese Ergebnisse belegen, dass die grundlegende Annahme, dass sich eine gezielte Spaltung der EPS positiv auf die Entwässerbarkeit von Faulschlämmen auswirken kann, richtig ist.

4 Öffentlichkeitsarbeit

In einer Vielzahl von Gesprächen der Firma Poll Umwelt- und Verfahrenstechnik GmbH mit Wasser- und Abwasserverbänden (z.B. Emschergenossenschaft/Lippeverband, Wasserverband Eifel-Rur, hanseWasser Bremen GmbH, Institut für Siedlungswasserwirtschaft, Ruhr-Universität Bochum) wurde die Problematik der Verbesserung der Klärschlammwässerung diskutiert. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse wurden und werden genutzt, um das bestehende Konzept zu verbessern und ggf. zu erweitern.

Ergebnisse die innerhalb des Projektes gewonnen wurden, sind im Rahmen von Tagungen, wie beim TKoR-Netzwerktreffen in Leipzig sowie den DWA Klärschlammstage in Würzburg präsentiert und diskutiert worden. Des Weiteren wurden die Ergebnisse in einem Vortrag von Herrn Dipl. Ing. B. Simbach (POLL Umwelt- und Verfahrenstechnik GmbH) auf der TerraTec (5.-7.4.2017; Leipzig) vorgestellt. Zudem wurde ein Fachartikel in der Zeitschrift W & A Wasser und Abwasser Technik mit dem Themenschwerpunkt Klärschlammbehandlung sowie Phosphorrückgewinnung veröffentlicht.

Darüber hinaus erfolgt die Einbindung der Ergebnisse in dem NEWS-Bereich der Homepage der Firma POLL Umwelt- und Verfahrenstechnik.

5 Fazit und Ausblick

Durch enzymatische Behandlung der Faulschlämme können extrazelluläre polymere Substanzen gespalten werden. Der Einfluss der Spaltung auf die Entwässerung konnte nachgewiesen werden. Die Spaltung der EPS ist sowohl mit Lipasen, Proteasen und Cellulasen möglich gewesen und konnte anhand der in die Flüssigphase eingetragenen EPS-Bestandteile Lipide, Proteine, Huminstoffe und Zucker zweifelsfrei nachgewiesen werden. Die Zusammensetzung der Spaltprodukte ist dabei abhängig von der Enzymklasse aber auch dem eingesetzten Enzym. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die enzymatische Hydrolyse der Faulschlämme mit den getesteten Enzymen ohne pH-Wertanpassung sowie bei mesophilen Temperaturbedingungen mit Erfolg durchgeführt werden können. Dies entsprach zwar nur im Einzelfall den Temperatur- und pH-Wertoptima der Enzyme, aber die unter den Bedingungen vorliegenden Enzymaktivitäten haben zur Spaltung der EPS ausgereicht. Zudem konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Enzymklasse eine enzymatische Behandlung von mehr als 4 h unnötig ist, da keine weitere Spaltung der EPS nachgewiesen werden konnte. Eine Verlängerung der Reaktionszeit erscheint aus verfahrenstechnischer Sicht somit nicht sinnvoll. Durch den Einsatz der Enzyme gelang es, die Entwässerung des Faulschlammes bei allen Enzymen zu steigern, wobei der Einsatz von Lipasen die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte und eine Steigerung der TS-Gehalte in der Feststofffraktion von 6,7 auf 10 % (Vergleich mit der Blindprobe) erzielt wurde. Der Einsatz von Lipasen ist dabei auch aus technischer Sicht sehr interessant, da sie kommerziell im Vergleich zu vielen anderen Enzymen kostengünstig erworben werden können. Dennoch bleiben für die technische Anwendbarkeit der enzymatischen Behandlung von Faulschlammern noch einige Fragen unbeantwortet, die im Rahmen des Projektes nicht hinreichend genau adressiert werden konnten. Ein Problem stellt zum Beispiel die Probenlieferung und –lagerung dar, denn technisch sollte die enzymatische Behandlung direkt im Anschluss an die Faulung vor der Entwässerung stattfinden. Für die Laboruntersuchungen müssen die Proben aber entnommen und gekühlt werden, um eine weitere Faulgasbildung zu unterdrücken. In den Laborversuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung und Verhaltensweisen der

Faulschlammproben stark unterscheiden (Vergleiche Originalproben und Blindproben) und dies einen Einfluss auf die Fest-Flüssig-Trennung hat. Daher sollten im Folgenden Untersuchungen on-site möglichst als Teilstrom auf einer Kläranlage durchgeführt werden. Weitere Fragen, die in weiteren Untersuchungen adressiert werden sollten: 1) eine mögliche Verbesserung der Entwässerungsleistung durch die Anpassung des polymeren Flockungsmittels, 2) Verringerung der einzusetzenden Enzymkonzentration zur denkbaren Kostenreduktion, 3) technische Umsetzung und Verfahrensführung auf Kläranlagen angepasst, und 4) die tatsächliche Bedeutung einer möglichen höheren Rückbelastung mit CSB in der Flüssigphase nach der Fest-Flüssig-Trennung.

Abschließend bleibt festzustellen, dass durch den Einsatz von Lipasen, Cellulasen und Proteasen eine Spaltung der EPS möglich ist. Zudem gelingt es, das Wasserabgabeverhalten zu beeinflussen und damit Feststoffe mit einer geringeren Restfeuchte zu erhalten, was somit unter den Gesichtspunkten der weiteren Klärschlammbehandlung einen positiven Einfluss auf den CO₂-Footprint hat. Die Klärschlämme werden immer häufiger über lange Strecken transportiert sowie für die Verbrennung vorgetrocknet. Eine geringere Restfeuchte der Feststofffraktion von Faulschlämmen bedeutet somit eine direkte Einsparung von Energie in Form von Treibstoff.

Literaturverzeichnis

- [1] B. Wiechmann, C. Dienemann, C. Kabbe, S. Brandt, I. Vogel, A. Roskosch, *Klärschlamm Entsorgung in der Bundesrepublik Deutschland*, **2013**.
- [2] *Maschinelle Schlamm entwässerung*, DWA, Dt. Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V, Hennef, **2013**.
- [3] J.-J. Fu, C.-J. Xia, Y. Wang, S.-N. Li, L.-H. Yan, L.-H. Lu, *Journal of Chemical Engineering of Japan* **2010**, *43*, 238–246.
- [4] H.-Y. Pei, W.-R. Hu, Q.-H. Liu, *Journal of hazardous materials* **2010**, *178*, 397–403.
- [5] *Aufbereitung von synthetischen polymeren Flockungsmitteln zur Klärschlammkonditionierung. Merkblatt DWA*, DWA, Hennef, **2014**.
- [6] B. Frølund, T. Griebe, P. H. Nielsen, *Applied microbiology and biotechnology* **1995**, *43*, 755–761.
- [7] Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH, *Water Research* **1996**, *30*, 1749–1758.
- [8] Y.-X. Shen, K. Xiao, P. Liang, Y.-W. Ma, X. Huang, *Applied microbiology and biotechnology* **2013**, *97*, 4167–4178.
- [9] T. Zor, Z. Selinger, *Analytical biochemistry* **1996**, *236*, 302–308.
- [10] C. Cupp-Enyard, *Journal of visualized experiments: JoVE* **2008**.
- [11] A. Gessesse, T. Dueholm, S. B. Petersen, P. H. Nielsen, *Water Research* **2003**, *37*, 3652–3657.
- [12] T. K. Ghose, *Pure and Applied Chemistry* **1987**, *59*.
- [13] Q. Li, A. M. Coffman, L.-K. Ju, *Enzyme and microbial technology* **2015**, *72*, 42–48.
- [14] P. Bernfeld, *Methods in Enzymology*, *1*, 149–158.
- [15] C. S. Frings, T. W. Fendley, R. T. Dunn, C. A. Queen, *Clinical chemistry* **1972**, *18*, 673–674.

- [16] S. Krejcik, *Masterarbeit*, Technische Universität Bergakademie Freiberg, Freiberg, **2015**.
- [17] H. Liu, H. H. Fang, *Journal of Biotechnology* **2002**, *95*, 249–256.
- [18] S. Comte, G. Guibaud, M. Baudu, *Enzyme and microbial technology* **2006**, *38*, 237–245.
- [19] C. Park, J. T. Novak, *Water Research* **2007**, *41*, 1679–1688.
- [20] J. Wawrzynczyk, E. Szewczyk, O. Norrlöw, E. S. Dey, *Journal of Biotechnology* **2007**, *130*, 274–281.
- [21] R. Denkert, Y. Reza-Tehrani, *KA - Korrespondenz Abwasser, Abfall* **2017**, 42–50.
- [22] K. Raunkjær, T. Hvitved-Jacobsen, P. H. Nielsen, *Water Research* **1994**, *28*, 251–262.
- [23] J. Goodwin, C. F. Forster, *Water Research* **1985**, *19*, 527–533.
- [24] C. S. Frings, R. T. Dunn, *American journal of clinical pathology* **1970**, *53*, 89–91.
- [25] C. S. Frings, T. W. Fendley, R. T. Dunn, C. A. Queen, *Clinical chemistry* **1972**, *18*, 673–674.
- [26] J. W. Morgan, C. F. Forster, L. Evison, *Water Research* **1990**, *24*, 743–750.
- [27] J. Wingerder, K.-E. Jaeger, H.-C. Flemming in *Microbial Extracellular Polymeric Substances* (Eds.: J. Wingerder, T. R. Neu, H.-C. Flemming), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1999**.
- [28] V. Urbain, J. C. Block, J. Manem, *Water Research* **1993**, *27*, 829–838.
- [29] C. Mayer, R. Moritz, C. Kirschner, W. Borchard, R. Maibaum, J. Wingerder, H. C. Flemming, *International journal of biological macromolecules* **1999**, *26*, 3–16.
- [30] P. H. Nielsen, A. Jahn in *Microbial Extracellular Polymeric Substances* (Eds.: J. Wingerder, T. R. Neu, H.-C. Flemming), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1999**.
- [31] R. Monique, G.-N. Elisabeth, P. Etienne, L. Dominique, *Bioresource technology* **2008**, *99*, 7464–7471.
- [32] Z. Liang, W. Li, S. Yang, P. Du, *Chemosphere* **2010**, *81*, 626–632.

- [33] R. Monique, G.-N. Elisabeth, P. Etienne, L. Dominique, *Bioresource technology* **2008**, *99*, 7464–7471.
- [34] P. D’Abzac, F. Bordas, E. van Hullebusch, P. N. L. Lens, G. Guibaud, *Applied microbiology and biotechnology* **2010**, *85*, 1589–1599.
- [35] B.-B. Wang, X.-T. Liu, J.-M. Chen, D.-C. Peng, F. He, *Water Research* **2017**, *129*, 133–142.
- [36] D. Y. Koseoglu-Imer, N. Dizge, I. Koyuncu, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2012**, *92*, 334–339;
- [37] R. Jha, T. A. Woyengo, J. Li, M. R. Bedford, T. Vasanthan, R. T. Zijlstra, *Journal of animal science* **2015**, *93*, 1039–1051;
- [38] D. Steffien, C. Roßberg, R. Kiehle, M. Bremer, S. Fischer, M. Bertau, *Chemie Ingenieur Technik* **2016**, *88*, 183–191.