

# Schlussbericht

zum Verbundvorhaben

## BioTon

**„Entwicklung neuer Aufbereitungstechnologien für tonmineralische Rohstoffe durch gezielte Nutzung und Steuerung mikrobiologischer Reaktionen“**



**Bewilligungs- und Berichtszeitraum: 01.02.2007 – 31.03.2011**

**Förderkennzeichen: 01RI0626 A-F**

**Datum: 08.12.2011**

**Teilvorhaben 1:** „Keramtechnologische Untersuchungen von mikrobiologisch aufbereiteten Rohstoffen“

**Teilvorhaben 2:** „Analyse autochthoner Mikroflora, Amplifikation nutzbarer Reaktionen und Erarbeitung mikrobiologischer Prozessschritte, sowie mineralogische Aspekte der mikrobiologischen Aufbereitung tonmineralischer Rohstoffe“

**Teilvorhaben 3:** „Amplifikation und verfahrenstechnische Prozessoptimierung zur Produktion mikrobiologisch aufbereiteter Tone“

**Teilvorhaben 4:** „Pilotversuche zur Produktion mikrobiologisch aufbereiteter eisenarmer Tone“

**Teilvorhaben 5:** „Pilotversuche zur Produktion mikrobiologisch plastifizierter Tone“

**Teilvorhaben 6:** „Isolierung und Charakterisierung metallsolubilisierender Mikroorganismen zur Eliminierung von Eisen“



## Projektpartner im Verbundvorhaben

Teilvorhaben: Projektleitung: Projektbearbeitung: Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen
<b>Teilvorhaben 1:</b> „Keramotechnologische Untersuchungen von mikrobiologisch aufbereiteten Rohstoffen“ Dr. Ralf Diedel Dipl.-Ing. (FH) Miriam Peuker Forschungsinstitut für anorganische Werkstoffe, Glas/Keramik GmbH - FGK; Heinrich-Meister-Strasse 2; 56203 Höhr-Grenzhausen	<b>01RI0626A</b>
<b>Teilvorhaben 2:</b> „Analyse autochthoner Mikroflora, Amplifikation nutzbarer Reaktionen und Erarbeitung mikrobiologischer Prozessschritte, sowie mineralogische Aspekte der mikrobiologischen Aufbereitung tonmineralischer Rohstoffe“ Dr. Katja Emmerich; Dipl. Biol. Peter Krolla-Sidenstein Dipl. Min. Kerstin Petrick; Dipl. Biol. Rene Kaden Karlsruher Institut für Technologie – KIT Institut für Funktionelle Grenzflächen – IFG Kompetenzzentrum Materialfeuchte – CMM Hermann-von-Helmholtz Platz 1; 76344 Eggenstein-Leopoldshafen	<b>01RI0626B</b>
<b>Teilvorhaben 3:</b> „Amplifikation und verfahrenstechnische Prozessoptimierung zur Produktion mikrobiologisch aufbereiteter Tone“ Dr. Andreas Zehnsdorf Dipl. Ing. (FH) Daniel Beyer Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ; Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum – UBZ Permoserstrasse 15; 04318 Leipzig	<b>01RI0626C</b>
<b>Teilvorhaben 4:</b> „Pilotversuche zur Produktion mikrobiologisch aufbereiteter eisenarmer Tone“ Dr. Stefan Huber Amberger Kaolinwerke, Eduard Kick GmbH & Co. KG; Georg-Schiffer-Strasse 70; 92242 Hirschau	<b>01RI0626D</b>
<b>Teilvorhaben 5:</b> „Pilotversuche zur Produktion mikrobiologisch plastifizierter Tone“ Matthias Dieterle; Paul Kuch Sibelco Deutschland GmbH; Am Sportplatz 1; 56412 Ruppach-Goldhausen	<b>01RI0626E</b>
<b>Teilvorhaben 6:</b> „Isolierung und Charakterisierung metallsolubilisierender Mikroorganismen zur Eliminierung von Eisen“ Dr. Heike Fischer G.E.O.S. Ingenieurgesellschaft mbH; Gewerbepark „Schwarze Kiefern“; 09633 Halsbrücke	<b>01RI0626F</b>
<b>Koordination:</b> Die Koordination des Gesamtvorhabens lag zunächst beim FGK und später beim KIT. Koordinatoren: Dr. Dirk Penner (FGK); Dipl. Biol. Peter Krolla-Sidenstein (KIT)	



## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>I Kurze Darstellung</b>	<b>I</b>
1. <b>Aufgabenstellung</b>	<b>I</b>
2. <b>Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde</b>	<b>I</b>
3. <b>Planung und Ablauf</b>	<b>III</b>
4. <b>Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde</b>	<b>X</b>
5. <b>Zusammenarbeit mit anderen Stellen:</b>	<b>X</b>
<b>II Schlussbericht Projektstrang „Verbesserung des Weißgrads – Matallspezies-Solubilisierung</b>	
<b>III Schlussbericht Projektstrang „Verbesserung der Plastizität“</b>	



## **I Kurze Darstellung**

Der gemeinschaftliche Abschlussbericht zu dem Verbundvorhaben „Entwicklung neuer Aufbereitungstechnologien für tonmineralische Rohstoffe durch gezielte Nutzung und Steuerung mikrobiologischer Reaktionen - BioTon“ wurde aufgrund der intensiven Verknüpfung der jeweiligen Kernkompetenzen der beteiligten Institutionen über die gesamte Laufzeit des Vorhabens erstellt. So werden die wichtigsten Ergebnisse und Erkenntnisse aus dem Vorhaben in Form eines fachübergreifenden und auch für die praktischen Anwender nutzbaren Berichts verfügbar gemacht.

Dem einleitenden Teil des Koordinators über die allgemeinen Aspekte des Vorhabens folgen zwei separat erstellte Einzelberichte zu den beiden Schwerpunkten „Verbesserung des Weißgrads“ und „Verbesserung der Plastizität“. Diese beiden Berichtsteile stellen solitär die wichtigsten Arbeiten und Ergebnisse der Schwerpunkte dar und enthalten jeweils ein eigenes Inhalts- und Literaturverzeichnis, sowie Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.

### **1. Aufgabenstellung**

Ziel des Verbundvorhabens war es, durch die gezielte Nutzung von geomikrobiologischen Prozessen nachhaltige, innovative und kostengünstigere Verfahren für die Verbesserung der technologischen Eigenschaften von tonigen Rohstoffen zu entwickeln. Im Fokus standen die Verbesserung der Plastizität und der Eigenfärbung der Rohstoffe sowie die Entwicklung eines Rohstoffbewertungssystems auf der Basis physikalisch-mineralogischer, keramischer und mikrobiologischer Parameter.

Die tonmineralproduzierende und -verarbeitende Industrie sieht in der Einbeziehung biotechnologisch gesteuerter Prozesse ein zukunftsweisendes Potenzial in einer erweiterten Nutzbarmachung von natürlichen Ressourcen sowie in einer Qualitätssteigerung tonmineralischer Produkte.

Das Vorhaben wurde als Pilotprojekt für die Einführung der Biotechnologie in die mineralische Rohstoffe verarbeitende Industrie gesehen. Durch bereits zu Beginn des Vorhabens eingebundene Industrieunternehmen der Branche, wurde die Verwertung der Vorhabensergebnisse aktiv vorangetrieben und in den Betrieben bereits umgesetzt.

### **2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Ein für die tonverarbeitende Industrie interessanter geomikrobiologischer Prozess ist die mikrobiologisch induzierte Erhöhung des Weißgrades von industriell genutzten Tonen. Etwa 50 % des weltweit abgebauten Kaolins wird in der Papierindustrie verarbeitet. Ein weiterer beträchtlicher Anteil dient als Füllstoff in der Kunststoffindustrie. Färbende Metallspezies, wie z.B. Eisenverbindungen, die im Kaolin im Promillebereich noch vorhanden sind, beeinträchtigen den Weißgrad des Tonminerals und damit die Eigenfärbung der

Endprodukte. Bisher werden diese Eisenanteile durch Magnetseparation und chemische Bleichung eliminiert, wodurch hohe Energiekosten bzw. anfallende, teuer zu entsorgende Abfallchemikalien neue Schwierigkeiten aufwerfen.

Bei Tonen, die in formgebenden keramischen Verfahren verwendet werden, wird eine gleichbleibende Qualität der Tonrohstoffe, die letztendlich die Verarbeitbarkeit und Bildsamkeit sowie die Qualität der Endprodukte beeinflussen, gewünscht.

Die natürlich verfügbare Menge von Tonrohstoffen, deren Qualitäten diesen Ansprüchen gerecht werden, ist jedoch sehr begrenzt, sodass zur Sicherung des Bedarfs an derartigen Rohstoffen neue Wege beschritten werden müssen. Gezielt in die Prozessketten der Rohstoffaufbereitung eingesetzte mikrobiologische Prozesse können den beteiligten Unternehmen neue Wege aufzeigen, die Zugabe chemischer Additive zu vermeiden, Abfallstoffe zu reduzieren und, durch diese optimierte Rohstoffnutzung, letztendlich die Nutzungsdauer bestehender Lagerstätten zu verlängern.

Zu diesem Zweck hat sich ein interdisziplinär arbeitendes Konsortium aus den Bereichen Tonmineralogie, Mikrobiologie und den Industriebereichen Papier/Kunststoff und Keramik zusammengefunden, um naturnahe mikrobiologische Prozesse in nachhaltig geprägte Prozesse einzubinden (Abb. A).

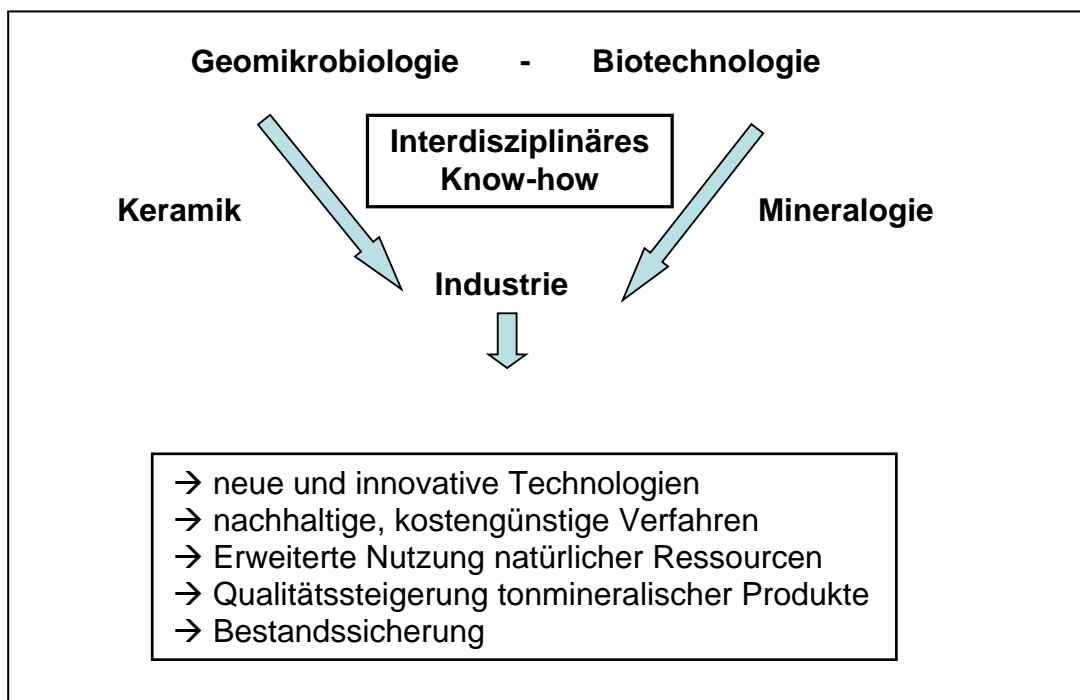


Abbildung A: Grafische Darstellung des interdisziplinär zusammenarbeitenden Konsortiums im Projekt BioTon



Mit diesem Zusammenschluss konnten erstmals, mit einem breit gefächerten Methodenspektrum, natürliche Rohstoffe und ihre Aufbereitungsprodukte hinsichtlich ihrer mikrobiologischen, mineralogischen, physikalischen und keramtechnischen Eigenschaften fachübergreifend analysiert werden. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die Implementierung ausgewählter mikrobiologischer Prozesse an potenziellen Schnittstellen der industriellen Aufbereitung exemplarisch durchgeführt.

### **3. Planung und Ablauf**

Die Themenkomplexe „Verbesserung der Plastizität“ und „Verbesserung des Weißgrades“ toniger Rohstoffe wurden während der Projektlaufzeit parallel bearbeitet. Im Themenschwerpunkt „Verbesserung des Weißgrades“ waren die Projektpartner die Amberger Kaolinwerke - AKW, die G.E.O.S. Ingenieurgesellschaft, das Umwelt- und Biotechnologische Zentrum – UBZ des UFZ, das KIT mit dem Institut für Funktionelle Grenzflächen - IFG und dem Kompetenzzentrum Materialfeuchte – CMM beteiligt. Im Bereich „Verbesserung der Plastizität“ waren die Projektpartner die Fa. Sibelco Deutschland, das Forschungsinstitut für Anorganische Werkstoffe, Glas/Keramik – FGK, das Umwelt- und Biotechnologische Zentrum – UBZ des UFZ, das KIT mit dem Institut für Funktionelle Grenzflächen - IFG und dem Kompetenzzentrum Materialfeuchte – CMM beteiligt.

Die durchzuführenden Arbeiten und die entsprechenden Zeitrahmen waren in beiden Schwerpunkten in Arbeitspaketen (A x) strukturiert und sind im Balkenplan dargestellt (s. Abb. A). Am Balkenplan ist der interdisziplinäre Ansatz des Vorhabens zu erkennen.

Zu Beginn der Arbeiten wurden gemeinsam mögliche Schnittstellen mikrobiologischer Prozesse in den spezifischen Aufbereitungsprozessen der Industriebetriebe analysiert. Aufbauend darauf wurden jeweils Prototyp-Rohstoffe definiert und aufbereitet, die allen beteiligten Projektpartnern über die gesamte Projektlaufzeit für ihre Analysen zur Verfügung standen (A 2). Im Arbeitspaket (A 3) „Basis-Charakterisierung“ wurden diese Referenzrohstoffe kleintechnisch aufbereitet und anwendungstechnisch charakterisiert. Damit standen für die darauffolgenden mikrobiologischen Aufbereitungsprozesse detaillierte Basisdaten der Rohstoffe zur Verfügung.

Arbeitspaket 4 „Laborphase Basisforschung“ hatte zum Ziel, Methoden zur Charakterisierung der autochthonen Mikroflora an tonhaltige Rohherden zu adaptieren, wobei mikro- und molekularbiologische Arbeitsmethoden zur Kultivierung relevanter Organismen, deren biochemische Eigenschaften sowie molekularbiologische Identifizierung typischer Vertreter im Vordergrund standen.

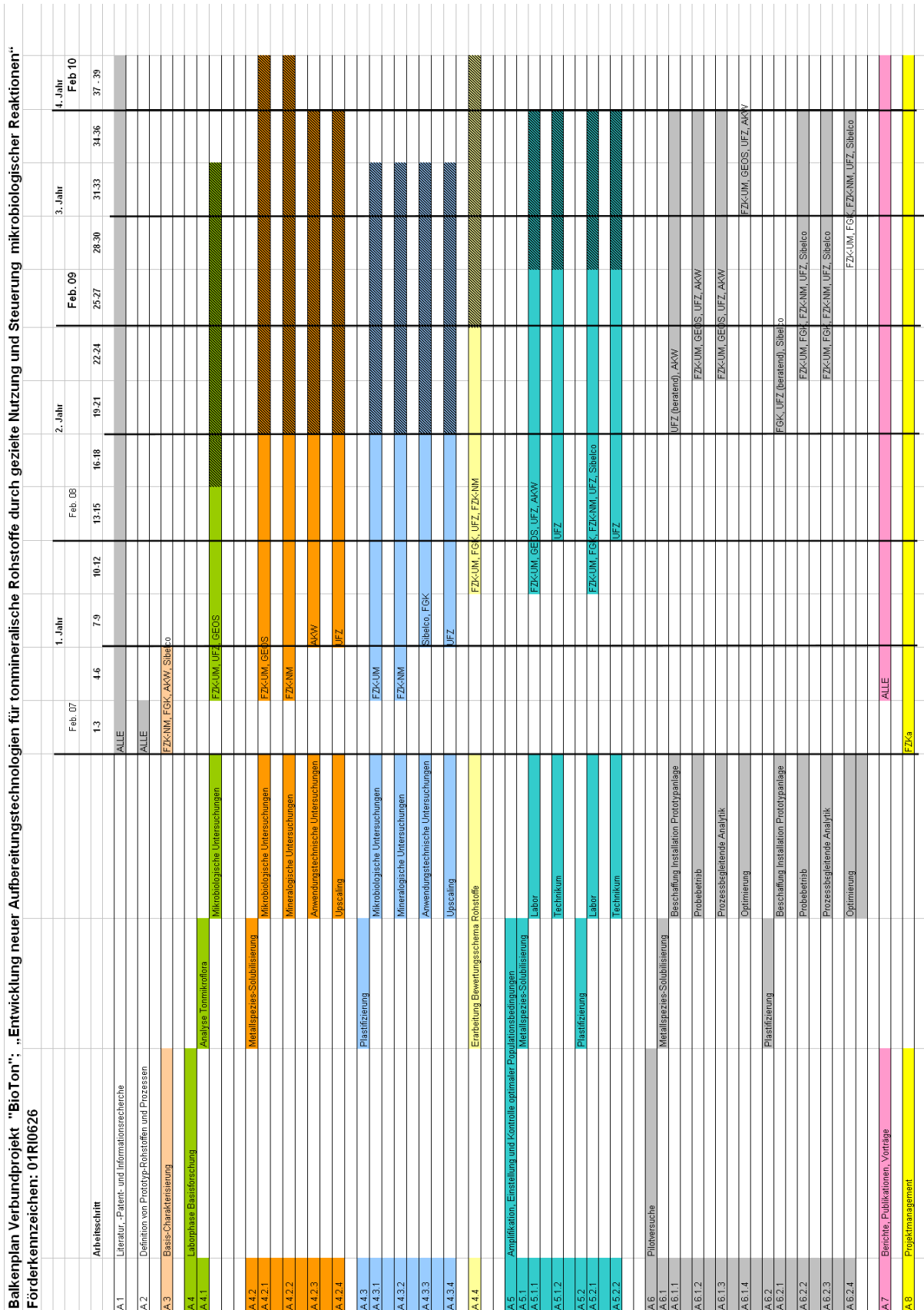


Abbildung A: Balkenplan zum Verbundvorhaben „BioTon“: Darstellung der Arbeitspakete im zeitlichen Verlauf. Schraffierte Felder zeigen Phasen der Verlängerung von Arbeitspaketen im Vergleich zur ursprünglichen Planung

In beiden Schwerpunkten wurden die Referenzproben hinsichtlich geeigneter mikrobiologischer Prozesse und mineralogischer Eigenschaften analysiert. Dabei stand im Schwerpunkt Weißgraderhöhung die Isolierung und Charakterisierung metallsolubilisierender Mikroorganismen und deren Wachstums- und Prozessbedingungen im Vordergrund, sowie die mineralogischen Bestimmungen des qualitativen und quantitativen Phasenbestandes und die Ermittlung von Gesamteisen- und eisenhaltigen Mineralphasen. Begleitet wurden diese Arbeiten von ersten Versuchen zur technischen Behandlung tonhaltiger Suspensionen in Bioreaktoren. Im Schwerpunkt „Verbesserung der Plastizität“ wurden in dieser Phase des Vorhabens die Untersuchungen zum Einfluss mikrobieller Stoffwechselprodukte wie z.B. EPS (extrazelluläre-polymere Substanzen) auf die plastischen Eigenschaften von Tonmassen anwendungstechnisch untersucht. Weiterhin wurden in Upscaling-Versuchen die Kultivierung EPS bildender Mikroorganismen, sowohl in Kulturmedien als auch in tonhaltigen Schlickern bzw. plastischen Massen für die Technikumsphase getestet. Mineralogische Analysen zum qualitativen und quantitativen Phasen- bzw. Tonmineralbestand wurden zum Verständnis der rheologischen Eigenschaften der Rohstoffe durchgeführt. Um die natürliche Alterung von Tonen (Mauken) und die damit verbundene Verbesserung der plastischen Eigenschaften zu erforschen, wurde das vorhandene Methodenspektrum in so genannten Maukversuchen eingesetzt. Ziel war es, die ablaufenden Prozesse der Tonalterung in einem zeitlichen Ablauf zu erfassen.

Parallel dazu wurde das Bewertungsschema für tonmineralische Rohstoffe aufgebaut und bei den regelmäßig stattfindenden Arbeitstreffen durch die letzten Erkenntnisse stetig erweitert.

Im Fokus des Arbeitspakets 5 stand die Überführung der Ergebnisse aus Arbeitspaket 4 in den Technikumsmaßstab. Im Schwerpunkt „Weißgraderhöhung“ konnte, auch aufgrund der vorliegenden Verteilung färbender Metallspezies in den Rohstoffen, während der Projektphase kein autochthoner Mikroorganismus isoliert und charakterisiert werden, der entscheidend den Weißgrad der Referenzproben verbessern konnte. Damit war ein kontrollierbarer Einsatz eines autochthonen Organismus in der Technikums- und später in der Pilotphase nicht möglich. Daher wurde ein bekannter Modellorganismus ausgewählt und dessen Kultivierung im Technikumsmaßstab optimiert.

Ebenso wurde im Schwerpunkt „Verbesserung der Plastizität“ ein EPS-bildender Modellorganismus eingesetzt, dessen Stoffwechselprodukt Alginat in einem vom Anmischprozess der Rohstoffe getrennten Technikumsverfahren produziert und aufbereitet wurde. Die Optimierung der Alginatausbeute und die Produktion ausreichender Mengen für die Pilotphase standen im Vordergrund der Arbeiten.

Im Arbeitspaket 6 konnten in beiden Schwerpunkten die Pilotversuche in industrienahen Prozessen durchgeführt werden. Zur Erhöhung des Weißgrads wurde hier *Shewanella putrefaciens* in einem 100 Liter Ansatz biotechnisch prozessiert und in einer Pilotanlage mit einer Kaolinsuspension über 14 Tage unter den vorgegebenen Bedingungen behandelt. Die Suspensionen wurden in definierten Zeitintervallen mikrobiologisch, mineralogisch und anwendungstechnisch analysiert.

Ebenso wurde in einem großtechnischen Ansatz mit *Azotobacter vinelandii* Alginat aufbereitet und in einer Mischanlage des Industriepartners im Tonnenbereich in eine Produktionsmasse eingearbeitet. Vergleichsweise dazu wurden weitere Ansätze mit kommerziell erhältlichem Algen-Alginat sowie ohne Zusatz angesetzt. Die plastischen Massen wurden anschließend mit anwendungstechnischen Methoden charakterisiert.

Die Pilotphase konnte erst im Rahmen einer kostenneutralen Verlängerung bearbeitet werden, da zu Beginn des Vorhabens Verzögerungen bei Stellenbesetzungen eintraten, zeitaufwendige Adaptationen des mikro- und molekularbiologischen Methodenspektrums an tonigen Rohstoffen sowie Verzögerungen bei den arbeitsintensiven, mineralogischen Analysen den vorgesehenen Zeitplan beeinflussten. Diese Versuche konnten jedoch in einer kostenneutralen Verlängerungsphase des Vorhabens durchgeführt werden. Die praktischen Arbeiten des Vorhabens wurden zum 31.03.2011 abgeschlossen.

#### Halbjahrestreffen:

Auf den regelmäßig stattfindenden Halbjahrestreffen wurden aktuelle Daten und Ergebnisse der Projektpartner vorgestellt und diskutiert. Hierbei wurden auch die bisherigen Arbeiten im Vergleich zum vorgesehenen Zeit- und Arbeitsplan dargestellt. Weiterhin wurden die weiterführenden Arbeitspläne in den beiden Schwerpunkten zeitlich und inhaltlich geplant. Daneben fanden mehrere zusätzliche Arbeitstreffen statt, bei denen anstehende Projektphasen von den jeweils beteiligten Projektpartnern in der konkreten Planung gezielt diskutiert wurden.

#### Übersicht über regelmäßige Projekttreffen:

Treffen	Datum	Institution	Ort
Kick-Off Meeting	22.02.2007	FGK	Höhr-Grenzhausen
1. Halbjahrestreffen	12.07.2007	KIT	Karlsruhe
2. Halbjahrestreffen	21.02.2008	G.E.O.S.	Freiberg
3. Halbjahrestreffen	28. - 29.10.2008	AKW	Hirschau
4. Halbjahrestreffen	18. – 19.03.2009	UFZ - UBZ	Leipzig
5. Halbjahrestreffen	25.09.2009	KIT	Karlsruhe
6. Halbjahrestreffen	24. – 25.06.2010	FGK	Höhr-Grenzhausen
7. Halbjahres- und Abschlusstreffen	09. – 10.06.2011	KIT	Karlsruhe

#### Präsentationen:

Das Gesamtprojekt sowie Ergebnisse zu den Teilbereichen wurden während der Projektlaufzeit in nationalen und internationalen Fachjournalen veröffentlicht und auf Tagungen in Form von Vorträgen und Posterpräsentationen vorgestellt. Weiterhin konnten mit diesem Vorhaben zwei Dissertationen, mehrere Diplom- und Bachelorarbeiten und studienbegleitende Praxisarbeiten angefertigt werden.

#### Veröffentlichungen:

K. Emmerich et al.: Umfassende Materialcharakterisierung von tonmineralischen Rohstoffen zur Entwicklung mikrobiologischer Aufbereitungstechnologien - Ergebnisse des laufenden BMBF geförderten BIOTON-Projektes; cfi/Ber. DKG; 86, No 3, D22 – D26; 2009

Emmerich, K., Schuhmann, R., Petrick, K., Menger-Krug, E., Kaden, R., Obst, U., Dieterle, M., Kuch, P., Diedel, R., Peuker, M., Huber, S., Fischer, H., Beyer, D., Zehnsdorf, A., Krolla-Sidenstein, P. (2009): „Comprehensive material characterization of clay mineral raw materials for the development of microbiological processing technologies“. In: Ceramic Forum International, 86 (2009), 3, 22-26

Kerstin Petrick, Ralf Diedel, Miriam Peuker, Matthias Dieterle, Paul Kuch, René Kaden, Peter Krolla-Sidenstein, Rainer Schuhmann, and Katja Emmerich  
Character and amount of I-S mixed-layer minerals and physical-chemical Parameters of two ceramic clays from Westerwald, Germany: Implications for processing properties  
Clays and Clay Minerals, February 2011, v. 59, p. 58-74

Kerstin Petrick, Daniel Beyer, Andreas Zehnsdorf, Stefan Huber, Peter Krolla-Sidenstein, Friedrich Wagner, Rainer Schuhmann, Katja Emmerich: Mechanisms of brightness enhancement of kaolins: Effects of microbial treatment with *Shewanella putrefaciens* on mineralogy.  
Chemical Engineering Journal, submitted.

#### Promotionen:

How does mineralogy control the technical properties of paper kaolines and ceramic clays?  
Dissertation, Fakultät Bauingenieur-, Geo- und Umweltwissenschaften, KIT. Kerstin Petrick (2011)

Mikrobiologische Charakterisierung von Tonrohstoffen unter Berücksichtigung des Alterationsprozesses „Mauken“  
Dissertation, Fakultät für Physik und Chemie, Technische Universität Bergakademie Freiberg. Rene Kaden (2010)

#### Diplomarbeiten:

Optimierung der Kultivierung von *Azotobacter vinelandii* unter Berücksichtigung der Bildung „Extrazellulärer polymerer Substanzen – EPS  
Diplomarbeit, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ; Leipzig  
Jeanette Fahrner (2007)

Biologische Prozesse während der Tonalterung  
Diplomarbeit, Fakultät für Bauingenieur-, Geo- und Umweltwissenschaften, KIT.  
Eve Menger-Krug (2008)

#### Bachelorarbeiten:

Aufbereitungsstrategien für tonige Rohstoffe: Möglichkeiten der Gewinnung verschiedener Tonfraktionen  
Bachelorarbeit, KIT, Karlsruhe  
Andrea Buer (2010)

#### Praxisarbeiten:

Mikrobielle Eisenentfernung aus Kaolin im Rührreaktor  
Praxisarbeit, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ; Leipzig  
Madlen Rockmann (2008)

Untersuchung der Veränderung rheologischer Toneigenschaften und molekulare Analytik beim Mauken (Tonalterung)  
Praxisarbeit, Forschungszentrum Karlsruhe; Karlsruhe  
Linglan He (2009)

#### Vorträge:

Krolla-Sidenstein P., Emmerich K., Petrick, K., Kaden R., Diedel R., Peuker M., Dieterle M., Kuch P., Zehnsdorf A., Beyer D., Fischer H., Huber, S. (2007) "Mikrobiologische Aufbereitung von Tonen"; 3. Hör-Grenzhäuser Keramik Symposium; 26/27.2009.; Hör-Grenzhäuser

Petrick, K., Emmerich, K., Menger-Krug, E., Kaden, R., Dieterle, M., Kuch, P., Diedel, R., Peuker, M., Krolla-Sidenstein, P. (2008): „Why do two apparently similar German ceramic clays display different rheological properties during maturation?“. In: 4<sup>th</sup> Mid-European Clay Conference, Vol. 33 (ed. A. Skowronski), pp. 128. Mineralogia-Special Papers

Menger-Krug E., Kaden R., Krolla-Sidenstein P., Emmerich K., Petrick K., and Obst U. (2008) Biological processes during maturation. In: 4<sup>th</sup> Mid-European Clay Conference, Vol. 33 (ed. A. Skowronski), pp. 113. Mineralogia-Special Papers

Petrick K., Emmerich K., Kaden R., Menger-Krug E., Diedel R., Peuker M., Kuch P., Dieterle M., and Krolla-Sidenstein P. (2008) Mikrobiologische Aufbereitung von keramischen Tonen. Deutsche Keramische Gesellschaft e.V. Jahrestagung 2008

Petrick, K., Diedel, R., Peuker, M., Dieterle, M., Kuch, P., Kaden, R., Krolla-Sidenstein, P., Emmerich, K. (2009): „Do I/S mixed-layer minerals influence the workability of two ceramic clays from Westerwald, Germany?“. In: 14th International Clay Conference, Castellana Marina, Italien, 14.-20. Juni, 2009

Peuker, M., Diedel, R., Petrick, K., Menger-Krug, E., Kaden, R., Emmerich, K., Schuhmann, R., Dieterle, M., Kuch, P., Huber, S., Fischer, H., Beyer, D., Zehnsdorf, A., Krolla-Sidenstein, P. (2009): „Investigation of the clay maturing process as basis for property-enhancing utilization and control of microbiological reactions“. In: Fiore, S., Belviso, C., Giannossi, M.L. (2009): 14th International Clay Conference, Castellaneta Marina, Italien, 14.-20. Juni, 2009

Peuker, M., Diedel, R., Petrick, K., Menger-Krug, E., Kaden, R., Emmerich, K., Schuhmann, R., Dieterle, M., Kuch, P., Huber, S., Fischer, H., Beyer, D., Zehnsdorf, A., Krolla-Sidenstein, P. (2009): „Investigation of the clay maturing process as basis for property-enhancing utilization and control of microbiological reactions“. In: Fiore, S., Belviso, C., Giannossi, M.L. (2009): European Ceramic Society – ECERS; 21.-25.6.2009; Krakau; Polen

Petrick, K., Emmerich, K., Schuhmann, R., Menger-Krug, E., Kaden, R., Dieterle, M., Kuch, P., Peuker, M., Diedel, R., Huber, S., Fischer, H., Beyer, D., Zehnsdorf, A., and Krolla-Sidenstein, P. (2009) „Umfassende Materialcharakterisierung von tonmineralischen Rohstoffen zur Entwicklung mikrobiologischer Aufbereitungstechnologien. In: Schuhmann, R. (Ed.), Innovative Feuchtemessung in Forschung und Praxis - Materialeigenschaften und Prozesse, Karlsruhe, pp. 228

Petrick, K., Beyer, D., Huber, S., Wagner, F., and Emmerich, K. (2011) Mechanisms of brightness enhancement of kaolins by microbial treatment with *shewanella putrefaciens*. *Annual Meeting of the Clay Minerals Society*, Lake Tahoe, USA.

#### Posterpräsentationen:

Beyer, D., Krolla-Sidenstein, P., Zehnsdorf, A.; „Entwicklung neuer Aufarbeitungstechnologien für tonmineralische Rohstoffe durch gezielte Nutzung und Steuerung mikrobiologischer Reaktionen“; Stand des BMBF; Biotechnica, 07–10.10.2008; Hannover, 2008

Kaden, R., Menger-Krug, E., Krolla-Sidenstein, P., Emmerich, K., Petrick, K., Obst, U. (2008): “Monitoring shifts in microbial community composition in clayey sediments by culture-dependent and culture-independent approaches”; Biofilms III; München, Deutschland, 06.-08.10.2008

Menger-Krug, E., Kaden, R., Krolla-Sidenstein, P., Emmerich, K., Petrick, K., Obst, U.; „Biological Processes during Clay Maturation“; Mideuropean Clay Confernece - MECC; 22-25.09.2008; Zakopane; Polen, 2008

Krolla-Sidenstein, P., Kaden, R., Emmerich, K., Petrick, K., He, L., Gliemann, H. (2009): „Methods characterising microbial community composition during clay aging“. In: 14th International Clay Conference, Castellaneta Marina, Italien, 14.-20. Juni, 2009

Petrick, K., Emmerich, K., Schuhmann, R., Menger-Krug, E., Kaden, R., Obst, U., Dieterle, M., Kuch, P., Peuker, M., Diedel, R., Huber, S., Fischer, H., Beyer, D., Zehnsdorf, A., Krolla-Sidenstein, P. (2008): „Mineralogical characterization of clays for the development of microbial driven processing technologies“. In: 3. DTTG-Workshop, ETH Zürich, Zürich, Schweiz, 9.-13. Februar, 2009

Kaden, R., Menger-Krug, E., Krolla-Sidenstein, P., Emmerich, K., Petrick K., Obst, U. “Shifts in Microbial Community Composition in Clayey Sediments by Culture-dependent and Culture-independent Approaches ”; International Symposium for Subsurface Microbiology – ISSM; 16. – 21.09.2008; Shizuoka; Japan, 2008

#### **4. Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde**

Die mikrobiologischen Eisenabtrennungsprozesse beruhen auf der mikrobiellen Oxidation oder Reduktion von Eisen im neutralen, der mikrobiellen Oxidation im sauren pH Bereich und auf der mikrobiellen Mobilisierung von schwerlöslichen Eisenverbindungen durch extrazellulär ausgeschiedene Produkte bzw. Primär- und Sekundärmetabolite [s. z.B. Cotter-Howells, Lee et al.]. Der Einsatz einer mikrobiell gesteuerten Metallentfernung kann schließlich zur Recyclierung der bakteriellen Massen und einer Weiterverwertung der anfallenden Metalle führen. Die bei der mikrobiellen Enteisung anfallenden Kosten werden nach der Einführungsphase deutlich geringer sein, als die Kosten für Magnetseparation oder chemische Bleichung (s.a. Kap. 4 des Schwerpunktes „Verbesserung der Eigenfärbung“).

Des Weiteren haben mikrobiologische Prozesse Einfluss auf das plastische bzw. rheologische Verhalten von Tonen und Kaolinen [Mörtel und Heimstädt]. Diese mikrobiologischen Einflüsse im Fertigungsprozess sind auf Grund alltäglicher Veränderungen der keramischen Produktionsmassen bekannt, wenn auch nicht kontrollierbar. Zur Steuerung und Nutzung der mikrobiellen Eigenschaften fehlt bisher jegliche Grundlage. Durch Einsatz von Konservierungsmitteln werden mikrobielle Prozesse sogar unterdrückt, darunter auch solche, die sich positiv auf die keramische Formgebung auswirken. Daneben werden zunehmend chemische Additive wie Carboxymethylcellulose (CMC) zur Verbesserung der rheologischen Toneigenschaften und zur Zeitverkürzung des Reifungsprozesses zugesetzt. Der Einsatz biofilmbildender Mikroorganismen im Rohstoff trägt zur Kostenvermeidung und der Reduzierung der Abfall- und Abwasserproduktion bei. Der Verbleib der Mikroorganismen im Ton wirft bei keramischen Prozessen keinerlei Schwierigkeiten auf, da sie beim Brennprozess rückstandslos verbrennen.

Bisherige Untersuchungen betrachten nur herausgelöst einzelne potenzielle Einflussfaktoren von meist nicht näher identifizierten Mikroorganismen auf die rheologischen Eigenschaften, den Weißegrad oder den mineralogischen Phasenbestand [Berthelin et al., Friedrich et al., Kämpfer]. Aus anderen Industriezweigen wie der Lebensmittelindustrie, dem Bergbau und der Schadstoffdekontamination sind bereits erfolgreiche mikrobielle Prozessführungen bekannt und können als Vorbild/zur Orientierung dienen [Glombitza et al., Löser et al., Seidel et al.].

#### **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen:**

keine







# **„Entwicklung neuer Aufbereitungstechnologien für tonmineralische Rohstoffe durch gezielte Nutzung und Steuerung mikrobiologischer Reaktionen“**

Projektnummer: 01 RI 0626

## **Schlussbericht zum Projektstrang**

### **„Verbesserung des Weißgrads“ – „Metallspezies-Solubilisierung“**

Beteiligte Partner:

- Karlsruher Institut für Technologie - KIT
- Institut für Funktionelle Grenzflächen (IFG)
- Kompetenzzentrum für Materialfeuchte (CMM)
  
- Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ
- Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum (UBZ)
- Forschungsinstitut für Anorganische Werkstoffe –  
Glas/Keramik - GmbH (FGK)
- G.E.O.S. Ingenieurgesellschaft mbH
- Amberger Kaolinwerke Eduard Kick GmbH Co.KG (AKW)
- SIBELCO Deutschland GmbH (WBB)

Halsbrücke, den 27.10.2011



## Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Auswahl und Basischarakterisierung der Proben</b> .....	<b>5</b>
2.1	Auswahl der Proben.....	5
2.2	Sequenzielle Extraktion.....	9
2.3	Bleichversuche und Eisenabreicherung.....	9
2.4	Säurelaugung.....	12
2.5	Mineralogische Untersuchungen.....	13
<b>3</b>	<b>Laborphase Basisforschung</b> .....	<b>19</b>
3.1	Analyse Tonmikroflora.....	19
3.2	Selektion und Anreicherung eisensolubilisierender Mikroorganismen.....	21
3.3	Metallspezies-Solubilisierung.....	24
3.3.1	Autochthone Mikroorganismen.....	24
3.3.2	Spezialisten.....	26
3.3.3	Komplexbildner.....	29
3.3.4	Vorversuche in Bioreaktoren.....	34
3.3.5	Erhöhung des Weißgrades von Kaolin durch Klassierung einer Suspension mit definierter Leitfähigkeit.....	37
<b>4</b>	<b>Amplifikation</b> .....	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Pilotphase</b> .....	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Nährmedien</b> .....	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>53</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>56</b>



# 1 Einleitung

Das Ziel des Projektes bestand darin, durch eine gezielte Nutzung von mikrobiologischen Prozessen nachhaltige und kostengünstige Verfahren für die Verbesserung der technologischen Eigenschaften von tonigen Rohstoffen zu entwickeln. Im Mittelpunkt des Teilvorhabens Metallspezies-Solubilisierung stand die Verbesserung der Eigenfärbung der Rohstoffe auf Grundlage von Vertretern der autochthonen Bodenmikroflora sowie die Entfernung färbender Metallspezies aus den Tonen. Für das Teilvorhaben wurden die geplanten Arbeitspakete bearbeitet. Sie umfassten die Definition von Prototyp-Rohstoffen und Prozessen (A 2), die Basischarakterisierung der Proben (A 3), die Analyse der Tonmikroflora und die Isolierung und Charakterisierung metallsolubilisierender Mikroorganismen zur Eliminierung von Eisen (A 4.1) im Rahmen der Laborphase Basisforschung (A 4), Untersuchungen und die Optimierung von mikrobiellen Prozessen im Labor- und Miniplantmaßstab (A 4.2, A 5) und die Umsetzung der Resultate im Pilotmaßstab (A 6).

## 2 Auswahl und Basischarakterisierung der Proben

### 2.1 Auswahl der Proben

#### ***Aufbereitung und Identifikation prozesstechnischer Knotenpunkte zur späteren potenziellen Implementierung mikrobiologischer Prozessschritte***

Die sedimentäre Kaolinlagerstätte in Hirschau-Schnaittenbach besteht zu 10-25 % aus Kaolinit, 2-12 % Feldspat (vorwiegend Kalifeldspat) und ca. 75 % Quarzsand. Durch mehrstufige und komplexe Prozessschritte werden die Minerale getrennt und veredelt. Ein wichtiger Prozess ist die Hydrozyklonaufbereitung, durch die die Hauptmenge des Kaolinitis abgetrennt wird. Hieraus ergibt sich die Unterscheidung in Roherdeproben (siehe die spätere Bezeichnung „LA...“ und die S2 Proben „B...“).

*Aufbereitungsschema:*

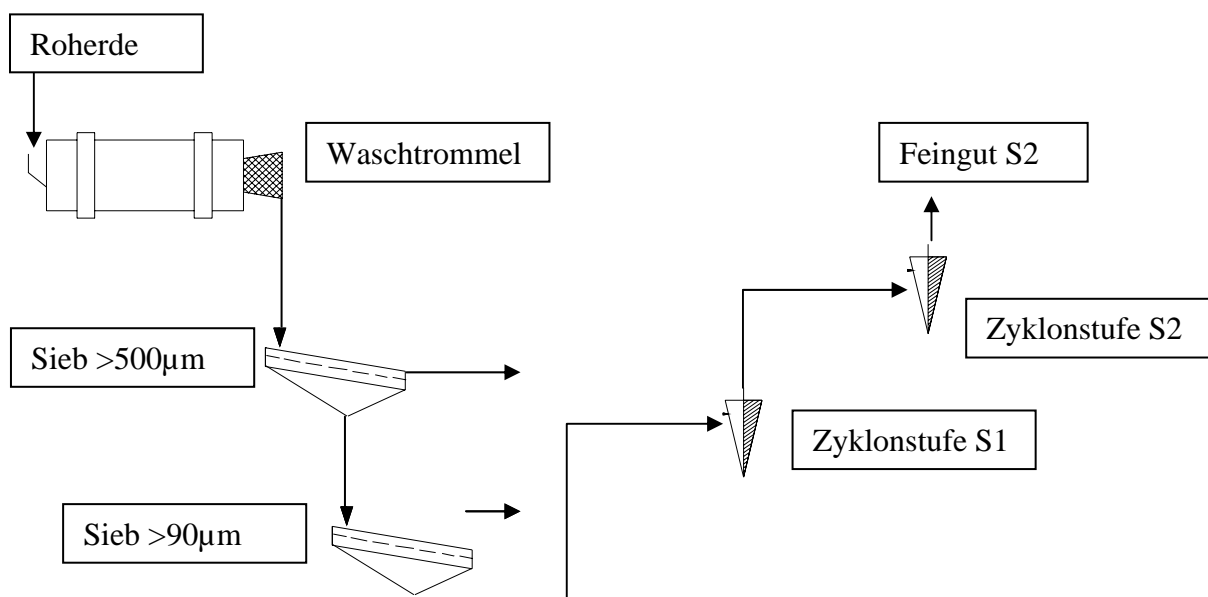


Abbildung 1 Aufbereitungsschema

Der Überlauf der zweiten Stufe kann entweder als Papierfüllstoff oder für die Sanitärkeramikherstellung verwendet werden.

Nach der Klassierung werden als Feingut S2 Produkte erhalten, die in der Feinheit im Bereich  $55-60\% < 2\ \mu\text{m}$  liegen. Mit zunehmender Feinheit steigt der Eisengehalt an.

Um den Weißgrad zu erhöhen, werden zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt, die Magnetscheidung und die reduktive Bleiche. Beide wurden an den kleintechnisch aufbereiteten Proben angewendet. Nur mit der Magnetscheidung wird der Eisengehalt merklich verringert, bei der Bleiche bleibt er aber konstant, obwohl der Weißgrad um ca. 2%-Punkte zunimmt.

Die Kaolinaufbereitung findet hauptsächlich in wässrigen Suspensionen statt, die unterschiedliche Feststoffgehalte besitzen und verschieden lang in gerührten Behältern zwischengelagert werden. Insofern wäre eine Zugabe von Bakterien in diese Lagertanks (Bütten) durchaus denkbar. Probleme bereiten die notwendigen Reaktionsraten bzw. die benötigten Lager-Volumina. Diese sind direkt von der Umsatzgeschwindigkeit und der Eisenaufnahmefähigkeit der Mikroorganismen abhängig. Selbst bei einer Teilstrombehandlung müssten einige Tonnen pro Stunde mikrobiell „gebleicht“ werden.

Eine Alternative wäre die Behandlung der Halden (Haldenlaugung), da hier leichter ausreichende Reaktionszeiten geschaffen werden könnten. Die Bakterien können ohne Feststoff in Bioreaktoren kultiviert und „geerntet“ werden. Anschließend werden sie zusammen mit dem Rohkaolin auf die Halden gegeben, in denen die Eisenlaugungsprozesse ablaufen können.

### **Basischarakterisierung**

Für die Bestimmung der autochthonen Mikroflora wurden im Rahmen der Betriebsbesichtigung am Standort Hirschau Proben genommen. Diese stammten aus verschiedenen Stufen des Prozesses (Roherde aus dem Tagebau – Zwischenprodukte aus der Kaolinaufbereitung – Fertigprodukte). Die beteiligten Partner G.E.O.S. und FZK-UM führten daran die ersten Versuche zur Charakterisierung der bakteriellen Population durch. Auf Basis der Ergebnisse mineralogischer Untersuchungen erfolgte die Festlegung der Proben für die Basischarakterisierung (A 3) bzw. die Laborphase der Basisforschung (A 4).

Die vier beprobten Roherden sind über das Lagerstättenmodell definierten Qualitätsstufen zugeordnet, die jederzeit problemlos in größeren Mengen aus dem Tagebau erhalten werden können. Im Lagerstättenmodell ist auf Basis von Bohrlochanalysen (Raster  $50\text{m} \times 50\text{m}$ ) der gesamte Rohstoffkörper in seiner Qualitätsverteilung dargestellt. Für jeden interessierenden Parameter (z. B. Weißgrad und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) existieren dreidimensionale Verteilungen, die für die Abbauplanung und Qualitätsbestimmung entscheidend sind.

Bei der Selektion der vier Qualitäten war das Hauptauswahlkriterium der Eisengehalt der Proben, v. a. in der Kaolinfraktion  $< 25\ \mu\text{m}$ , der entsprechend im Lagerstättenmodell abgebildet ist. Der Eisengehalt ist mit dem Parameter „Weißgrad“ (R457) verknüpft, d. h. je höher der Eisengehalt, desto niedriger ist der Weißgrad des Kaolins. Bis zu einem gewissen Grad ist die Korrelation annähernd linear ( $R^2 = 0,7$ ), wie in Abbildung 2 zu sehen ist.

Andere Parameter, wie z. B. der Gehalt an glimmerähnlichen Tonmineralen oder der Anteil Organik, beeinflussen den Weißgrad zusätzlich. Durch eine umfassende mineralogische Charakterisierung sollte der Zusammenhang aufgeklärt werden.



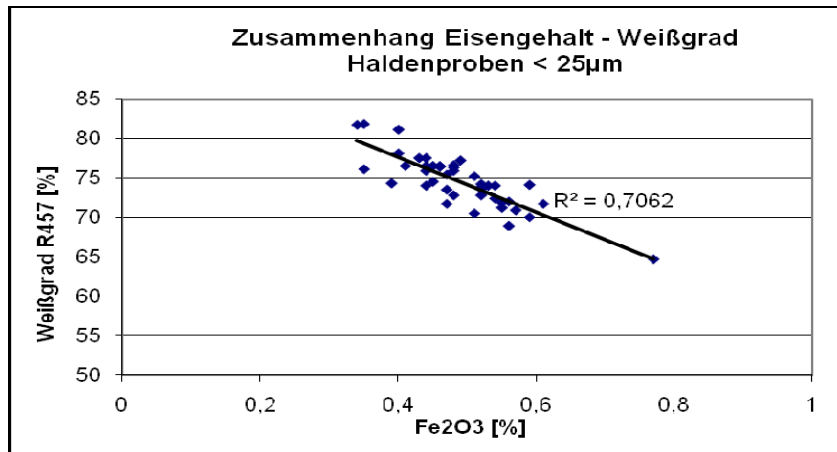


Abbildung 2 Zusammenhang Eisengehalt – Weißgrad der Haldenproben mit Korngrößen < 25 µm

Die Proben stammten aus dem Ostfeld II Schnaittenbach des Industriepartners AKW. Die in diesem Gebiet abgebauten Roherden werden sowohl für die Papier- als auch für die Keramikkaolinproduktion verwendet. Eine Senkung des Eisengehaltes und damit eine Erhöhung des Weißgrades wäre somit für die kaolinverarbeitende Industrie von Vorteil.

Aus dem Lagerstättenmodell kann errechnet werden, dass ca. 30% der Roherden eine Weiße von < 73 % besitzen, verbunden mit Eisengehalten von > 0,6 %. Diese Roherden können somit nicht allein in die Aufbereitung gegeben werden. Es müssen Roherden mit entsprechend höherem Weißgrad zugemischt werden, um gleichbleibende Eingangsqualitäten in der Aufbereitung zu erhalten und zusätzlich eine möglichst lange Lebensdauer des Tagebaus zu erzielen.

Dennoch bleibt ein Anteil von 5-10% an nicht verwertbaren Roherden (interner Abraum), der mit hohem Aufwand abgebaggert und an anderer Stelle im Tagebau wieder deponiert werden muss. Wird z. B. durch neue Laugungsprozesse die Menge an internem Abraum reduziert, verringern sich entsprechend die spezifischen Kosten für den Tagebau.

### Referenzproben

Für die ersten Referenzmuster wurden vier Proben ausgesucht, die in der Fraktion < 25 µm verschiedene Eisengehalte aufweisen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Eisengehalte der Referenzproben

Probe	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%] Roherde	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%] Fraktion < 25µm
LA540 (ALA001)	0,194	0,990
LA550 (ALA002)	0,095	0,460
LA570 (ALA003)	0,097	0,450
LA580 (ALA004)	0,130	0,640



Abbildung 3 Geschlammte Roherden; von links: LA 570, LA 550, LA 540, LA 580

Die Probe LA 540 (ALA001) besitzt einen sehr hohen Eisengehalt, gehört also in die Klasse  $> 0,8 \text{ \% Fe}_2\text{O}_3$ . Die Probe LA 580 (ALA004) hat einen leicht erhöhten Eisengehalt aber einen relativ niedrigen Weißgrad. Die zwei weiteren Proben LA 550 (ALA002) und LA 570 (ALA003) sind als „normal“ zu bezeichnen. Diese dienen als Vergleich, zeigen aber in der weiteren Aufbereitung (Bleiche und Magnetscheidung) unterschiedliches Verhalten, dessen Ursachen durch die Charakterisierung der Probe, v. a. der Mineralogie, aufgeklärt werden sollte (A3). Die Analysenergebnisse der Proben sind im Anhang in Tabelle A 1 enthalten.

Um den Ansatz „Haldenlaugung“ zu verfolgen, wurde bei G.E.O.S. die Roherdeprobe LA 540 verwendet, für Versuche kam die Fraktion  $< 2 \text{ mm}$  zum Einsatz.

### **Proben für Versuche mit verschiedenen Mikroorganismen und reduktiver Bleiche**

Um die bereits in der Roherde vorhandenen Mikroorganismen anzuzüchten und zu analysieren, wurde auf Basis LA 540 eine größere Menge an Roherde im Technikum aufbereitet. Das Produkt war das Feingut der 2. Hydrozyklonstufe (Probe S2). Dieses wurde bei G.E.O.S. für die Versuche zur mikrobiellen Metallspezies-solubilisierung verwendet, die Daten sind in Tabelle A 1 enthalten.

### **Proben für die mikrobielle Bleiche im Labormaßstab**

Für die weiterführenden Versuche mit *Shewanella putrefaciens* (Arbeitspakete 4 und 5) wurde eine Bandbreite von Kaolinen mit unterschiedlichem Eisengehalt respektive Weißgrad mit Hydrozyklonen aufbereitet. An diesen Kaolinproben wurde bei der Aufarbeitung im UFZ festgestellt, dass durch Dispergierung in entionisiertem Wasser und Zentrifugation der färbende Feinanteil vom Kaolin abgetrennt werden kann. Dieses Phänomen wurde sozusagen als „Nebenprodukt“ der Projektarbeit beschrieben und zum Patent angemeldet (Abschnitt 3.3.5).

Aus dieser Serie wurden zwei Proben ausgewählt, B4914 und B4915, die zwar unterschiedlichen Weißgrad aber vergleichbare Eisengehalte hatten. Beide Roherden stammen aus dem Westfeld Hirschau. An diesen beiden Kaolinen fanden die Sondierungs- und Optimierungsversuche der mikrobiellen Bleiche beim UFZ Leipzig statt.

Tabelle 2 Weißgrad und Eisengehalt der Proben für die mikrobielle Bleiche am UFZ

Probe-Nr.		B4914	B4915
R 457 Weißgrad	%	76,5	67,9
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	%	0,65	0,73

### Proben für Pilotversuch

Für den Pilotversuch wurde eine größere Menge Kaolin benötigt. Dazu wurde in einem Betriebsversuch mit ca. 200 t bei den Amberger Kaolinwerken Roherde mit ähnlichen Daten wie B4915 (niedriger Weißgrad) auf eine Produktionslinie aufgegeben und das Kaolin als Feingut der Hydrozyklonstufen gewonnen. Das Kaolin wurde nach der Flockung und Eindickung filtriert und getrocknet. Die Daten sind im Anhang unter B51061 in der Tabelle A 2 zu finden.

## 2.2 Sequenzielle Extraktion

Das sequenzielle Extraktionsverfahren ist eine Möglichkeit, die Mobilität und die Bindungsformen der Metalle zu ermitteln. Grundlage dafür ist die Zunahme der Acidität und/oder Komplexierungsstärke der verwendeten Extraktionsmittel mit ansteigender Extraktionsfolge. Durchgeführt wurden chemische Extraktionen der Roherde LA 540 und der Probe S2 nach dem Extraktionsverfahren nach Zeien und Brümmer [1989].

Die Proben, jeweils 5 g Material, wurden zunächst bei einer Temperatur von 40 °C getrocknet und auf eine Korngröße < 2 mm gesiebt. Es wurden stets Doppelversuche durchgeführt.

Die Analysenergebnisse zeigen, dass Eisen in beiden Proben hauptsächlich residual gebunden und in kristallinen Eisenoxiden okkludiert vorkommt.

Tabelle 3 Laugungsraten nach der sequenziellen Extraktion

Laugungsrate %	LA 540/1	LA 540/2	S 2/1	S 2/2
Fe	12,77	12,64	15,11	15,86
Ti	0,45	0,46	0,15	0,17
Ca	40,11	36,38	63,22	64,71
Mg	20,83	20,83	7,31	7,18

Mangan und Titan wurden fast gar nicht gelöst. Dagegen sind Kalzium und Magnesium sehr mobil. Aus den Analysenergebnissen geht hervor, dass Eisen in der Roherde LA 540 nur bis zu 12 % und in der Probe S2 bis zu 15 % gelöst werden kann.

## 2.3 Bleichversuche und Eisenanreicherung

### Bleichversuche am Kaolin für Vorversuche G.E.O.S. und UFZ

In Bleichversuchen sollte ermittelt werden, wie viel Eisen bei dem Standardverfahren der chemischen Bleiche mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> in Lösung geht und wie sich dies auf den Weißgradanstieg auswirkt. Dies soll die Referenz für die mikrobielle Bleiche darstellen.

Als Basis diente der aufbereitete Kaolin S2 (G.E.O.S.), der auch für die mikrobielle Laugung mit verschiedenen Organismen verwendet wurde.

Die Bleichmittelmenge und -art wurden variiert. Im normalen industriellen Produktionsprozess ist eine Dosierung von 0,2 % Na- dithionit für die meisten Kaoline ausreichend. Als Ergänzung wurde untersucht, wie viel Eisen sich überhaupt aus dem Kaolin lösen lässt.

Dazu wurde die Kaolinprobe mit 6M HCl 2h gekocht, anschließend filtriert und der Filterkuchen mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

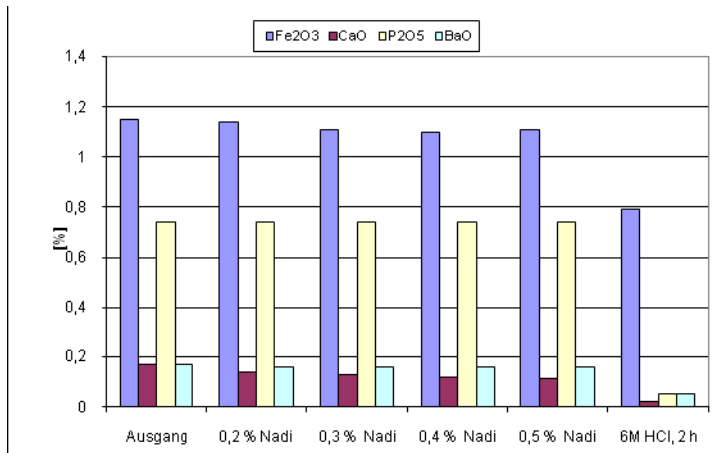


Abbildung 4 Analysenergebnisse nach der chemischen Bleiche mit Natriumdithionit und Salzsäure

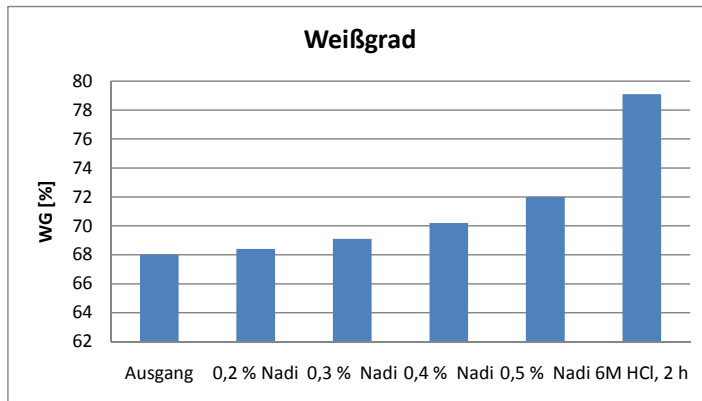


Abbildung 5 Weißgrade nach der chemischen Bleiche mit Natriumdithionit und Salzsäure

Im Vergleich zum Ausgangsmaterial fand man in der chemischen Zusammensetzung des mit Na-dithionit gebleichten Kaolins nahezu keine Reduzierung des Eisengehalts, trotzdem stieg der Weißgrad an, vor allem bei hoher Dosierung von Bleichmittel (Abbildung 4, Abbildung 5).

Nur durch die HCl- Behandlung ließ sich der Eisenanteil merklich von 1,10 auf 0,79 % senken. Damit war ein deutlicher Weißgradanstieg auf 79 % verbunden. Somit wird ein verkaufsfähiges Produkt erhalten. Die Elemente Ca, P und Ba nehmen stark ab.

Deswegen war es sehr wichtig zu analysieren, in welchen Mineralen diese Elemente neben Eisen eingebaut sind und ob diese löslich sind, wenn auch nur unter extremen Bedingungen. Wenn es gelingt, diese Spezies mikrobiell abzubauen, könnte der geforderte Weißgradanstieg erreicht werden.

Tabelle 4 Konzentrationen nach der chemischen Bleiche mit Natriumdithionit und Salzsäure

Probe	Ausgang	0,2 % Nadi	0,3 % Nadi	0,4 % Nadi	0,5 % Nadi	6M HCl, 2h	
<b>R 457</b>	<b>%</b>	<b>68,0</b>	<b>68,4</b>	<b>69,1</b>	<b>70,2</b>	<b>72</b>	
						<b>79,1</b>	
SiO <sub>2</sub>	%	52,69	52,7	52,71	52,76	52,84	54,66
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	%	30,49	30,48	30,56	30,53	30,52	30,16
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>%</b>	<b>1,15</b>	<b>1,14</b>	<b>1,11</b>	<b>1,1</b>	<b>1,11</b>	<b>0,79</b>
TiO <sub>2</sub>	%	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,53
<b>CaO</b>	<b>%</b>	<b>0,17</b>	<b>0,14</b>	<b>0,13</b>	<b>0,12</b>	<b>0,11</b>	<b>0,02</b>
MgO	%	0,53	0,53	0,52	0,51	0,51	0,41
Na <sub>2</sub> O	%	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,06
K <sub>2</sub> O	%	2,78	2,78	2,77	2,78	2,78	2,74
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>%</b>	<b>0,74</b>	<b>0,74</b>	<b>0,74</b>	<b>0,74</b>	<b>0,74</b>	<b>0,05</b>
<b>BaO</b>	<b>%</b>	<b>0,17</b>	<b>0,16</b>	<b>0,16</b>	<b>0,16</b>	<b>0,16</b>	<b>0,05</b>
GV	%	10,5	10,54	10,5	10,53	10,43	10,32
TS ber.	%	75,2	75,5	75,2	75,4	74,7	73,9
Na - FS	%	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,5
K - FS	%	16,4	16,4	16,4	16,4	16,4	16,2
Ges. - FS	%	17,1	17,1	17	17,1	17,1	16,7

### Bleichversuche am Kaolin für den Pilotversuch

Um die Weißgraderhöhung der geplanten mikrobiellen Bleiche im Pilotversuch einschätzen zu können, wurde das Probenmaterial zuvor klassisch magnetgeschieden, mit Na-dithionit gebleicht und der Weißgrad bestimmt.

Mit der Probe aus dem Pilotversuch wurden bei der reduktiven Bleiche unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Mit Na-dithionit und dem Ablauf: zuerst pH-Wert-Einstellung auf 3,0 und dann Zugabe des Bleichmittels (BM), war der Anstieg der Weiße relativ gering (+ 1,4 %). Bei Einsatz eines alternativen Reagenzienregimes (NaBH<sub>4</sub>/Na-bisulfit) war der Anstieg deutlich ausgeprägter (+ 6,6 %). Der Unterschied lag in der pH-Wert-Führung während der Bleiche. Mit der Borhydrit-Lösung musste der pH-Wert durch Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> länger auf 3,0 gehalten werden. Wurde die Reihenfolge der Zugabe für Na-dithionit (also zuerst Zugabe Bleichmittel, dann Ansäuern) verändert, wurde auch hier der große Anstieg um + 8,4 % erreicht.

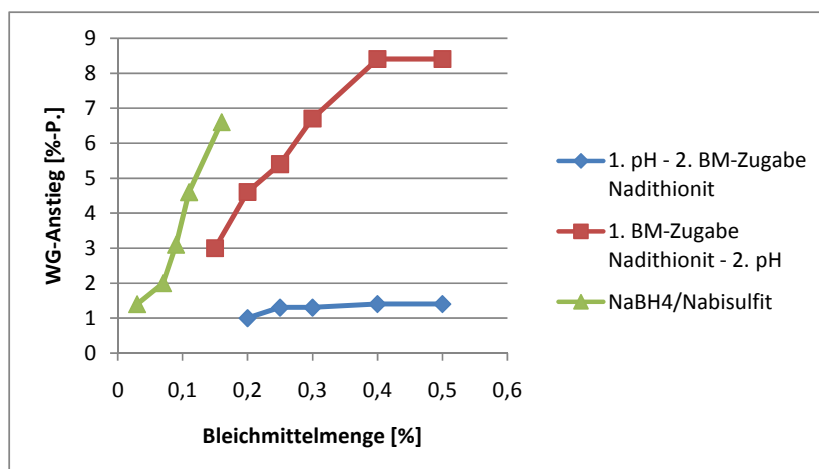


Abbildung 6 Weißgrade nach der chemischen Bleiche mit unterschiedlichen Verfahren

Die Reduzierung des Eisengehalts im Kaolin durch Magnetscheidung und reduktive Bleiche betrug 0,19 %, d. h. der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt betrug dann nur noch 0,62 %. Der Rückgang war bei beiden Verfahren in etwa gleich: Magnetscheidung -0,11 %.; Bleiche -0,08 %.

Durch die mikrobielle Bleiche mit *Shewanella putrefaciens* wurde der Weißgrad um 4,2 % auf 70,8 % angehoben, der Anteil an  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  im Kaolin sank von 0,81 auf 0,71 % ab.

D. h. die Lösung von Eisen durch die beiden Bleichverfahren war relativ ähnlich, nur war der Weißgradanstieg bei der chemischen Bleiche fast doppelt so hoch. Die Ursache hierfür ist nicht geklärt.

Wurde zusätzlich zur Magnetscheidung und Bleiche ein Mahlschritt in die Aufbereitung des Kaolins integriert, ließ sich der Anstieg bei der Bleiche auf fast 10 % steigern. Es entstand ein Kaolin mit einem verkaufsfähigen Weißgrad von >80 %. Der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt blieb mit 0,61% aber gleich.

Hier wurde deutlich, dass die mikrobielle Bleiche noch nicht das Niveau der chemischen Bleiche erreicht, eine Optimierung ist notwendig, aber auch möglich.

## 2.4 Säurelaugung

Laugungen mit Säuren wurden durchgeführt, um Möglichkeiten der chemischen Laugung zu untersuchen und Vergleiche zu mikrobiell gelaugten Proben ziehen zu können. 15 g der Probe B51061 wurden mit je 100 ml Schwefelsäure, Salpetersäure, Salzsäure, Phosphorsäure und Oxalsäure versetzt. Die Laugungen erfolgten bei pH-Werten von 6 / 4,5 / 3 / 1,5 und dauerten 1 bzw. 7 Tage an. Die Konzentrationen von Eisen wurden nach Beendigung in der Lösung gemessen, die abzentrifugierten und getrockneten Rückstände im Labor der AKW Hirschau analysiert.

Die Erhöhung des Weißgrades durch die verschiedenen Säuren und pH-Werte nach nur einem Laugungstag ist zusammenfassend in der Abbildung 7 zu sehen. Die rote Linie markiert den Weißgrad der Ausgangsprobe.

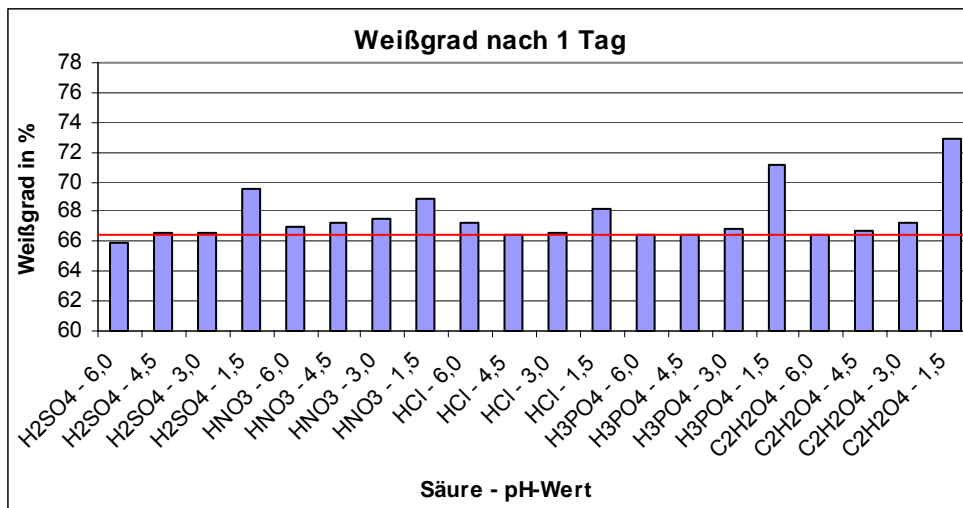


Abbildung 7 Weißgrad nach 1 Tag Laugung mit Säuren

Die Laugungsergebnisse der einzelnen Säuren zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Die Laugungsraten von Eisen und der Weißgrad konnten in allen Fällen nur bei pH=1,5 deutlich verbessert werden.

In Abbildung 8 ist der Weißgrad nach siebentägiger Laugung zu erkennen.

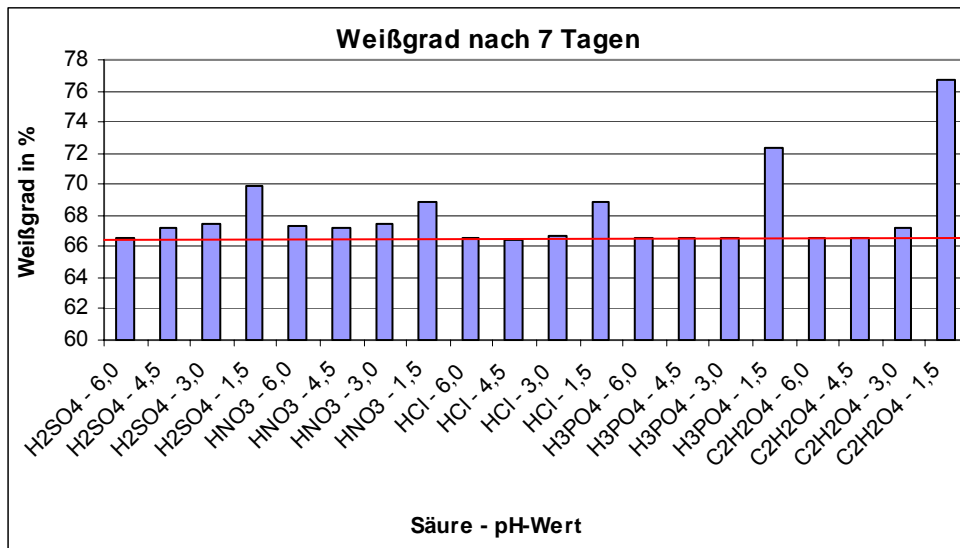


Abbildung 8 Weißgrad nach 7 Tagen Laugung mit Säuren

Eine wesentliche Erhöhung des Weißgrades wurde mit Oxalsäure bei einem pH-Wert von 1,5 nachgewiesen. Er konnte nach einem Tag um 6,30 % und nach 7 Tagen um 10,10 % auf 76,70 % erhöht werden. Mit Phosphorsäure stieg der Weißgrad nach 1 Tag um 4,50 %, nach 7 Tagen um 5,80 %. Die Laugungsraten waren bei pH-Werten von 1,5 am höchsten. Nach 7 Tagen konnte mit Phosphorsäure 5,60 % des in der Probe vorhandenen Eisens gelöst werden, mit Oxalsäure nach 1 Tag schon 6,43 %, nach 7 Tagen bis zu 19,06 %. Durch die komplexierende Wirkung des Oxalatanions konnte mehr gelöstes Eisen in Lösung gehalten werden als mit den anderen getesteten Säuren. Alle anderen Säuren hatten nur einen geringen Einfluss auf den Weißgrad und auf die Laugungsrate von Eisen. Die Laugungsdauer spielte nur in einzelnen Versuchen eine bedeutende Rolle.

Der Anteil an Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> im Rückstand sank nur bei der Laugung mit Oxalsäure, pH-Wert von 1,5, um 0,10 % auf 0,70 %. Dagegen war bei allen Laugungsversuchen mit einem pH-Wert von 1,5 ein deutlicher Abfall der Gelbwerte zu verzeichnen, von 14,26 % auf Werte von ca. 11 % mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und Werte von 6,73 % mit Oxalsäure. Bei diesem pH-Wert sanken die Anteile von CaO um durchschnittlich 0,40 %, während die Anteile von TiO<sub>2</sub> und BaO unverändert blieben.

Die Laugungsrate von Eisen und der Weißgrad konnten weiterhin erhöht werden, wenn 0,5M Oxalsäure mit einem pH-Wert von 0,94 verwendet, die Laugungsdauer auf 14 Tage verlängert und das entstandene Pellet nach der Zentrifugation von der Oberfläche entfernt wurde. Auf diese Weise stieg die Laugungsrate von Eisen innerhalb von 14 Tagen auf 31,16% an. Das machte sich deutlich im Weißgrad bemerkbar. Dieser konnte schon in 4 Tagen um 11,50 %, nach 14 Tagen um 12,10 % erhöht werden. Durch das Auswaschen der Probe nach der Zentrifugation war eine nochmalige Verbesserung um bis zu 2,50 % bis auf 82,10 % zu erreichen. Analysen zeigten, dass sich im Pellet u.a. färbende Bestandteile anreicherten. Die Anteile von Fe, Ti, Ca, Mg, Na, K wurden erhöht.

## 2.5 Mineralogische Untersuchungen

Als Ausgangsmaterialien für die mineralogischen Untersuchungen wurden drei Kaoline ausgewählt. Jeweils zwei der Proben variierten im Weißgrad (B4914, B4915) oder im Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Gehalt (LA540, B4915). Eine phänomenologische Beschreibung der drei Kaoline sowie ihre prozessrelevanten Eigenschaften (Weißgrad und Fe-Gehalt) sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Phänomenologische Beschreibung und prozessrelevante Parameter der Papierkaoline

Probe	LA540	B4915	B4914
Farbe	crème-weiß	crème-weiß	helles crème-weiß
Durchschnittliche Aggregatsgröße [ $\mu\text{m}$ ]	<25 $\mu\text{m}$	<25 $\mu\text{m}$	<25 $\mu\text{m}$
Weißgrad R457 [%]	68.2	67.9	76.5
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%]	1.46	0.95	0.78

Umfassende mineralogische Untersuchungen fanden im Zusammenhang mit den Vorversuchen mit Hilfe von *Shewanella putrefaciens* im Bioreaktor statt (siehe Abschnitt 3.3.4)

Die mineralogischen Wassergehalte der Kaolinproben vor und nach der Behandlung mit *Shewanella putrefaciens* waren mit rund 1% sehr ähnlich.

Die Korngrößenverteilung, die jeweils vor und nach der mikrobiellen Behandlung detektiert wurde, zeigte Unterschiede sowohl zwischen den Proben als auch in Abhängigkeit von der mikrobiellen Behandlung (

Abbildung A 1).

Die Summe der Massenanteile aller unbehandelten Tonfraktionen (<2  $\mu\text{m}$ ) stieg in der Reihenfolge B4914 < B4915 < LA540. Für alle Proben lag das Verteilungsmaximum in der Grobtonfraktion (0.6-2  $\mu\text{m}$ ). Deutliche Unterschiede ergaben sich für die Fraktion >20  $\mu\text{m}$ , die massenmäßig stark angereichert in den Proben B4914 und B4915 war und fast abwesend im Fall der Probe LA540.

pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit  $\sigma$  wurden jeweils vor und nach der mikrobiellen Behandlung aufgezeichnet (Tabelle 6).

Tabelle 6 pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit  $\sigma$  und Weißgrad der Kaolinproben vor und nach (MO) der Behandlung mit *Shewanella putrefaciens*

Probe	pH	$\sigma$ [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]	Weißgrad R457 [%]
LA540	7.2	6.5	68.2
LA540 MO	7.4	47.8	72.1
B4914	7.5	3.5	76.5
B4914 MO	6.8	58.9	79.2
B4915	7.0	7.3	67.9
B4915 MO	7.0	58.1	76.6

Alle Proben waren durch pH-Werte dicht am Neutralpunkt sowie durch einen Anstieg der elektrischen Leitfähigkeit nach der mikrobiellen Behandlung und einer Erhöhung des Weißgrades nach dem mikrobiellen Laugen charakterisiert. Probe B4915, die den geringsten Weißgrad vor der mikrobiellen Behandlung aufwies, zeigte mit 8.7 % die größte Weißgradsteigerung. Diese war mit einer geringen Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Abnahme von lediglich 0.13 % verbunden. Die größte Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Abnahme von 0.41 % zeigte die Probe mit dem höchsten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Anfangswert (LA540), deren Weißgrad um 3.9 % gesteigert werden konnte. Die Probe mit dem niedrigsten Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Anfangswert (B4914 mit 0.78 %) war durch die geringste Weißgradsteigerung von 2.7 %, bei nahezu gleichbleibendem Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Gehalt, gekennzeichnet.



## **Quantitativer Phasenbestand**

Der mineralogische Phasenbestand des Gesamtmaterials der drei Kaoline als auch des fraktionierten Materials wurde mit Hilfe eines Multi-Methoden Ansatzes bestimmt (Kapitel 3.1.2 im Bericht Verbesserung der Plastizität), der die Auswertung von Röntgendiffraktogrammen (XRD) mittels Rietveld-Analyse sowie eindimensionaler Modellierung (ODPF), Röntgenfluoreszenz-Analyse (XRF), Simultane Thermische Analyse (STA), die Bestimmung der Kationenaustauschkapazität (CEC), mikroskopische Untersuchungen (Lichtmikroskopie und ESEM) und Mößbauer-Spektroskopie beinhaltete. Die Kombination verschiedener Analyseverfahren, die in Analogie zu den mineralogischen Untersuchungen der keramischen Tone (Abbildung 6 im Bericht Verbesserung der Plastizität) durchgeführt wurden, ermöglicht eine quantitative Annäherung des mineralogischen Phasenbestandes.

Die mittels XRF bestimmte chemische Zusammensetzung zeigte Unterschiede zwischen dem Gesamtmaterial der drei Proben (Tabelle A 3). Im Vergleich zu den anderen beiden Proben ist die unbehandelte Probe LA540, als auch die mikrobiell behandelte Probe LA540 MO, durch den höchsten  $\text{SiO}_2$ - und den niedrigsten  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Gehalt charakterisiert. Bezüglich der färbenden Elementoxide zeigte LA540 mit 1,46 % den höchsten  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt, der nach der Behandlung am stärksten sank, während die niedrigeren Ausgangsgehalte von B4914 und B4915 nur leicht abnahmen. Der  $\text{TiO}_2$ -Gehalt war ebenfalls für die Probe LA540 am größten, blieb mit der mikrobiellen Behandlung aber unverändert, wie auch im Fall von B4914 und B4915.

Der Phasenbestand wurde röntgendiffraktometrisch bestimmt (Tabelle A 4). Das Gesamtmaterial aller Proben enthielt Kaolinit, Illit, Muskovit, K-Feldspat, Quarz, Ti-Oxide und Crandallit.

Die Anwesenheit von I-S-Wechselagerungsmineralen wurde separat über die eindimensionale Modellierung von Röntgendiffraktogrammen (ODPF) der jeweiligen Röntgendiffraktogramme der tonmineralangereicherten Fraktionen  $< 0.6 \mu\text{m}$  detektiert (Tabelle A 5). Die beste Anpassung zwischen gemessenen und berechneten Röntgendiffraktogrammen wurden für die Proben LA540 und LA540 MO mit einer physikalischen Mischung aus Kaolinit, Illit und einem Wechselagerungsmodell erhalten, das 80 % Illit und 20 % Smectit enthielt ( $R1\text{I}(0.8)/\text{S}$ ). Für die Proben B4914 und B4915 -sowie für ihre mikrobiell behandelten Analoga- wurde die beste Anpassung unter Verwendung der gleichen physikalischen Mischung erzielt, allerdings mit einem Wechselagerungsmodell, das einen geringeren Smectit-Anteil enthielt ( $R3\text{I}(0.9)/\text{S}$ ).

Eventuell stattfindende Veränderungen des strukturellen Ordnungsgrades des in den Proben enthaltenen Kaolinites mit der mikrobiellen Behandlung wurde über PA-Kurven anhand von STA-Messungen detektiert (Abbildung A 2). Zum Vergleich wurden die Daten eines als gut-geordnet geltenden Kaolinites (Mesa Alta) und eines stark fehlgeordneten Kaolinites (Franterre) aus Symkatz-Kloss [1974] entnommen. Die relativen Positionen der gemessenen PA-Kurven zeigte, dass der strukturelle Fehl Ordnungsgrad von LA540  $<$  B4914  $<$  B4915 zunahm, wobei alle Proben dichter an der gut-geordneten Vergleichsprobe Mesa Alta plotteten. Die PA-Kurven der entsprechenden behandelten Proben lagen sehr dicht bei denen der unbehandelten. Die scharfen und intensiven Rekrystallisationspeaks der DSC deuteten ebenfalls auf eine gut-geordnete Struktur der Kaolinite hin.

Die Fe-Speziesverteilung wurde mittels Mößbauer-Spektroskopie bestimmt. Das oxidisch-gebundene Fe wurde für alle Proben als Goethit identifiziert. Die absolute Fe-Verteilung wurde ermittelt, indem die relative Fe-Verteilung auf den Gesamteisengehalt aus den XRF-Messungen bezogen wurde (Tabelle A 5). Die Fe-Verteilungscharakteristika wurden durch das Verhältnis aus silikatisch-gebundenem zu oxidisch-gebundenem (Goethit) Fe ausgedrückt. Für alle Proben wurde ein Verteilungsverhältnis  $> 1$  erhalten, d.h., dass das Fe vorwiegend silikatisch-gebunden vorliegt. Allerdings wurden deutliche Unterschiede zwischen den Proben beobachtet. Der Vergleich des Gesamtmaterials zeigte das niedrigste Fe-Verteilungsverhältnis für die Probe LA540, das nach der mikrobiellen Behandlung leicht anstieg. Mit einem 250-fach höherem Fe-Silikatverhältnis zeigte die Probe B4914 das größte

Verteilungsverhältnis, das stark nach der mikrobiellen Behandlung abnahm. Eine starke Zunahme wurde hingegen für die Probe B4915 verzeichnet.

Zur vereinfachten Erkennbarkeit des Einflusses der mikrobiellen Behandlung auf die Fe-Speziesverteilung wurden die jeweiligen Verteilungsverhältnisse einer jeden Probe in Relation gesetzt und als relative Fe-Verarmung  $\Psi$  ausgedrückt. Für LA540 und B4915 war  $\Psi < 1$ , was bedeutet, dass die Fe-Verarmung vornehmlich auf Kosten des Goethits stattgefunden hat. Für B4914 war  $\Psi > 1$ , was anzeigt, dass die Fe-Verarmung über das silikatisch-gebundene Fe stattgefunden hat.

Der Einfluss der mikrobiellen Behandlung auf die Partikelmorphologie, ausgedrückt anhand der Parameter Partikelform, Partikelgröße und Aggregatstruktur, wurde mittels SEM untersucht (Abbildung 9). Das Gesamtmaterial aller Proben enthielt hauptsächlich Kaolinit und geringe Gehalte an Quarz und K-Feldspat. Lediglich LA540 und LA540 MO zeigten höhere Quarz- und K-Feldspatanteile, was dem mittels Röntgendiffraktometrie bestimmten quantitativen Phasenbestand entspricht. Die Anwesenheit nadeliger Goethit-Kristalle wurde bei einer 20000-fachen Vergrößerung anhand ihres Habitus und durch EDX-Messungen bestätigt.

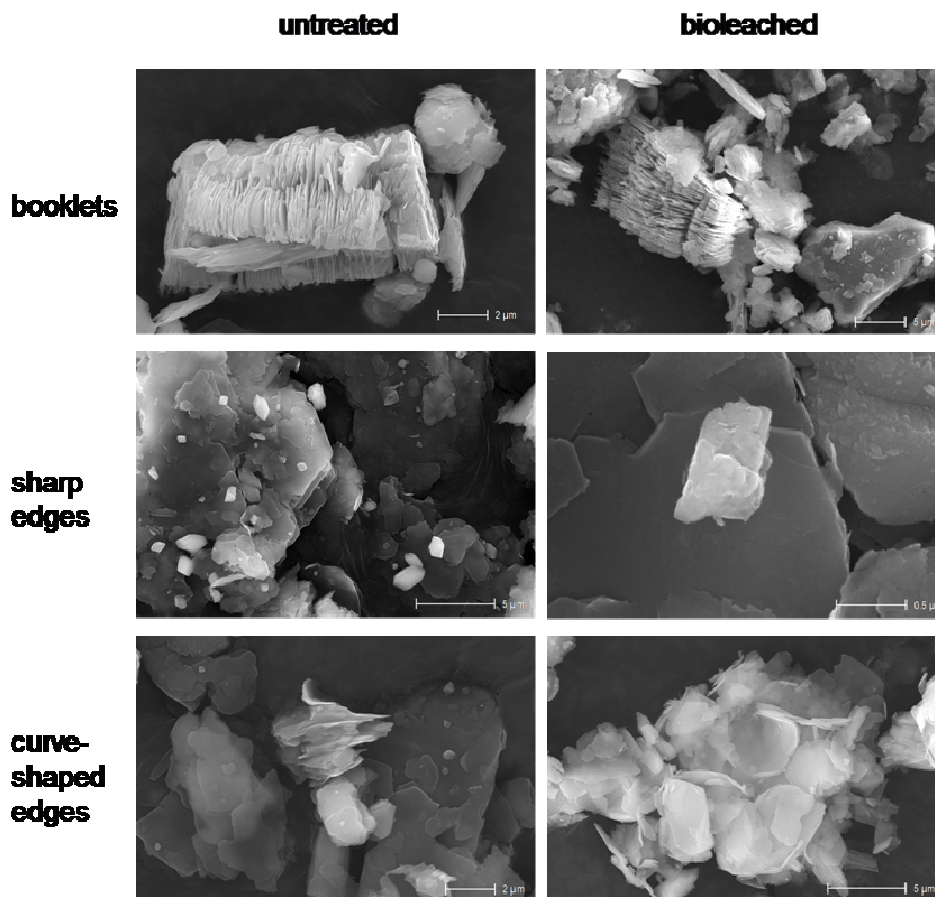


Abbildung 9 SEM-Aufnahmen zur Untersuchung der Partikelmorphologie der Kaoline vor und nach der Behandlung mit *Shewanella putrefaciens*

Unabhängig von der Behandlung wurden innerhalb aller Proben variierende Partikelformen des Kaolinitis beobachtet, die von hexagonal und pseudo-hexagonal bis zu stark zerrütteten Kristalliten mit unregelmäßigen Kanten reichte. Einige Kaolinit-Kristalle zeigten kurvig-vertiefte Oberflächen mit leicht eingerollten Rändern. Die Oberflächen der K-Feldspäte waren sowohl vor als auch nach der Behandlung durch Risse und Lösungsporen charakterisiert, was auf eine intensive Verwitterung während der Kaolinisierung der Ausgangsgesteine hindeutet. Ebenfalls keine Veränderung wurde bezüglich der durchschnittlichen Partikelgröße beobachtet, die sowohl vor als auch nach der Behandlung bei 20 µm lag. Unterschiedliche Aggregatstrukturen des Kaolinitis wurden in allen Proben unabhängig vom

Behandlungszustand beobachtet. Diese variierten von Fläche-zu-Fläche orientierten Anordnungen größerer Schichtstapel („Geldröllchenstapel“) bis hin zu chaotisch orientierten Agglomeraten kleiner Partikel.

### **Zusammenfassung und Beschreibung der Bewertungskriterien**

Die anhand der verschiedenen Methoden erhaltenen Ergebnisse werden in Hinblick auf die folgenden „bioleaching-relevanten“ Parameter bewertet (Tabelle A 7):

- initialer  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt: mittels XRF gemessener  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt vor der mikrobiellen Behandlung
- Ausmaß der Fe-Reduzierung: prozentualer Anteil der Fe-Abnahme nach der mikrobiellen Behandlung berechnet über  $(1 - \text{Fe}_2\text{O}_3 \text{ final} / \text{Fe}_2\text{O}_3 \text{ initial}) * 100\%$
- initialer Weißgrad: Weißgrad R457 vor der Behandlung
- Weißgraderhöhung  $\Delta$ : Differenzbetrag zwischen dem Weißgrad vor und nach der Behandlung
- Fe-Verarmung  $\Psi$ : Ort der Fe-Verarmung in Hinblick auf silikatisch- ( $\Psi > 1$ ) oder oxidisch-gebundenes ( $\Psi < 1$ ) Fe
- Fe-Eliminierungseffizienz: Verhältnis zwischen Ausmaß der Fe-Reduzierung und Weißgraderhöhung  $\Delta$ .

Beim Vergleich der für jeden Parameter aufgestellten Probenreihenfolge ergeben sich folgende Zusammenhänge: (1) eine starke positive Korrelation zwischen dem initialen  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt und dem Ausmaß der Fe-Reduzierung; (2) eine direkte Korrelation zwischen dem initialen Weißgrad und  $\Psi$ , d.h., die Probe mit dem geringsten Weißgrad (B4915) zeigte die größte Verarmung an oxidisch-gebundenem Fe; eine inverse Korrelation zwischen  $\Psi$  und (3) dem initialen  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt und (4) dem Ausmaß der Fe-Reduzierung, da die Probe mit dem höchsten silikatisch-gebundenen Fe-Anteil (B4914) für jeweils beide Parameter die geringsten Werte zeigte; (5) eine starke Korrelation zwischen  $\Delta$  und  $\Psi$ , da die größte Weißgraderhöhung für B4915 erzielt wurde, die Probe mit dem höchsten oxidisch-gebundenen Fe-Anteil, wohingegen die Weißgraderhöhung für die Probe mit dem höchsten silikatisch-gebundenen Fe-Anteil am geringsten ausfiel; eine inverse Korrelation zwischen der Fe-Eliminierungseffizienz und (6) dem initialen  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt und somit auch mit (7) dem Ausmaß der Fe-Reduzierung; eine schwache inverse Korrelation zwischen dem initialen Weißgrad und (8) dem initialen  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt als auch (9) dem Ausmaß der Fe-Reduzierung, da die Probe (B4914) mit den für beide Vergleichsparameter geringsten Werten den höchsten initialen Weißgrad zeigte, die beiden anderen Proben diesem Trend allerdings nicht folgten; (10) eine inverse Korrelation zwischen dem initialen Weißgrad und der Weißgraderhöhung der Proben B4914 und B4915.

Die physiko-chemischen und mineralogischen Parameter werden in der Dissertation von K. Petrick [2011] ausführlich diskutiert.

Es ergeben sich folgende Zusammenhänge:

- (1) Die Erhöhung des Weißgrades  $\Delta$  hängt in erster Linie vom Ort der Fe-Verarmung  $\Psi$  ab und nicht vom  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt, da die einzelnen Fe-Verarmungsquellen in unterschiedlichem Maß zum Weißgrad beitragen. Die Reduzierung des Goethits erhöht im Allgemeinen den Weißgrad der Kaoline, wohingegen dieser durch die Reduzierung des im Smectit gebundenen Fe negativ beeinflusst werden sollte, da der Smectit sich von gelb nach dunkelgrün oder blau verfärbt [Kostka et al., 1996; O'Reilly et al., 2006]. Im Gegensatz dazu sollte die Reduktion des in der Illit-Struktur gebundenen Fe(III) eine positive Auswirkung auf den Weißgrad haben, da diese mit Farbveränderungen von dunkelgrau zu weiß einhergehen [Shen und Stucki, 1994]. Farbigkeit ist jedoch nicht nur eine Funktion des Fe-Oxidationszustandes, sondern hängt von komplexen Lichtbrechungs- und Absorptionsphänomenen ab, die eine

Funktion der Partikelgröße, Fe-Verteilung im Gitter, Fe-Clustering und anderen Faktoren sind [Stucki, 2011].

- (2) Hinsichtlich der Fe-Verteilung der untersuchten Kaolinproben ist die Erhöhung des Weißgrades vor allem auf die Reduktion des oxidisch-gebundenen Fe und weniger auf die des silikatisch-gebundenen Fe zurückzuführen, da die größte Weißgraderhöhung für die Probe mit der stärksten Fe-Oxidverarmung (B4915) erzielt wurde, während für die Probe mit dem höchsten silikatisch-gebundenen Anteil (B4914) die Weißgraderhöhung am geringsten ausfiel. Für die Kaolinprobe LA540, die beide Arten der Fe-Verarmung zeigte, lag die Weißgraderhöhung zwischen den Werten von B4914 und B4915.
- (3) Die unterschiedliche Fe-Eliminierungseffizienz, die hoch für B4914 und B4915, aber niedrig für LA540 war, können dadurch erklärt werden, dass das silikatisch-gebundene Fe nach der Reduktion überwiegend in der Struktur verbleibt [Lee et al., 2006; Ribeiro et al., 2009]. Diese Annahme steht im Einklang mit der Beobachtung für Probe B4914, für die Fe-Verarmung exklusiv in der Silikatstruktur stattfand, sowie für LA540, die eine „gemischte“ Fe-Verarmung zeigte. Andererseits wurde für Probe B4915 gezeigt, dass die Fe-Verarmung überwiegend über die Reduktion des Goethit stattfand, was im Gegensatz zur oben beschriebenen Annahme steht. Allerdings scheint eine „gemischte“ Fe-Verarmung im Fall der Probe B4915 als sehr wahrscheinlich, da die Probe nur geringe Mengen Goethit enthielt, aber das größte Ausmaß an Fe-Reduzierung zeigte.
- (4) Die Reduktion silikatisch-gebundenen Fe sollte auf die 2:1-Schichtsilikate beschränkt sein, da keine strukturellen Veränderungen bezüglich des Kaolinit mit der mikrobiellen Behandlung beobachtet wurden.
- (5) Der Zusammenhang zwischen dem Anteil smectitischer Komponenten und dem Ausmaß der Fe-Reduzierung legt nahe, dass die Reduktion zu Fe(II) vorwiegend in der Struktur der quellfähigen Komponenten der I-S Wechsellagerungsminerale stattfindet. Andererseits sprechen die färbenden Eigenschaften reduzierter Smectite eher für eine im Illit stattfindende Reduktion, da dieser seine färbenden Eigenschaften in der reduzierten Form verliert und so zur Erhöhung des Weißgrades beiträgt, wie für Probe B4914 beobachtet.

### **Schlussfolgerungen mineralogischer Untersuchungen**

Die Entfernung Fe-haltiger Verunreinigungen aus Papierkaolinen unterschiedlicher Weißgrade unter Verwendung einer Fe-reduzierenden Kultur von *Shewanella putrefaciens* wurde auf der Basis einer umfassenden mineralogischen Charakterisierung untersucht. Die Kombination verschiedener Methoden zur Quantifizierung des Phasenbestandes verdeutlichte Unterschiede zwischen den Proben hinsichtlich ihres Charakters und Gehalts an I-S Wechsellagerungen, die eine positive Korrelation mit dem Ausmaß der Fe-Reduzierung zeigten. Die Bestimmung der Fe-Verteilung vor und nach der mikrobiellen Behandlung zeigte, dass

- (1) *Shewanella putrefaciens* in der Lage ist, sowohl oxidisch-gebundenes als auch silikatisch-gebundenes Fe zu reduzieren;
- (2) eine Weißgraderhöhung hauptsächlich durch die Reduktion oxidisch-gebundenen Fe und weniger durch die Reduktion silikatisch-gebundenen Fe beeinflusst wird. Die Weißgraderhöhung von Kaolinen ist somit eine Funktion des Ortes der Fe-Verarmung;
- (3) die mikrobiell-induzierte Entfernung silikatisch-gebundenen Fe in der Struktur der 2:1-Schichtsilicate stattfindet;
- (4) die allgemein angenommene Korrelation von Weißgrad und  $Fe_2O_3$  nicht streng gültig ist und immer im Zusammenhang mit der Fe-Verteilung, sprich Verhältnis oxidisch- zu silikatisch-gebundenem Fe bzw. Fe(II)/Fe(III), zu sehen ist;

- (5) *der Einfluss des TiO<sub>2</sub>-Gehalts auf den Weißgrad unklar bleibt, da keine konsistente Beziehung zwischen den Parametern gefunden wurde;*
- (6) *die mikrobielle Behandlung Veränderungen in den rheologischen Eigenschaften der Kaolinitdispersionen hervorruft, die sich in einer Verschiebung der Massenanteile während der Korngrößenfraktionierung äußern.*

Allerdings sind noch weitere Studien zur Quantifizierung der Einflussnahme eines jeden Parameters auf den Weißgrad bzw. auf dessen Erhöhung nötig. Die Anwendung einer Kombination unterschiedlicher analytischer Methoden zur mineralogischen Charakterisierung hat gezeigt, dass sowohl die Fe-Verteilung als auch die Anwesenheit quellfähiger Silikatschichten einen starken Einfluss auf den Weißgrad von Papierkaolinen haben. Die Quantifizierung quellfähiger Schichtanteile stellt nach wie vor eine besondere analytische Herausforderung dar, da diese aufgrund der meist geringen Gehalte in komplexen Mineralgemischen und durch das Fehlen geeigneter Strukturmodelle innerhalb der Rietveld-Methodik schwer zu erfassen sind.

### 3 Laborphase Basisforschung

#### 3.1 Analyse Tonmikroflora

Ziel des Arbeitspaketes war es, die bakterielle Vielfalt der Populationen in den Rohstoffen bzw. in speziellen Anreicherungskulturen mit geeigneten Kultivierungstechniken und molekulargenetischen Arbeitsmethoden zu erfassen.

Die in den Rohherden (WF hell, OF, WF Tonlinse) und in den Proben verschiedener Stellen der Prozessaufbereitung (Susp. 2.2, Flockung, Flotation, Slurry mit Disp.) der Amberger Kaolinwerke (AKW) und Sibelco vorhandenen allochthonen Mikroorganismen wurden analysiert. Es wurde eine Übersicht über aerobe und anaerobe Mikroorganismen, Hefen, Pilze und sulfatreduzierende Mikroorganismen erarbeitet. Dazu wurden die nachfolgend aufgeführten Nährmedien und Methoden eingesetzt:

Tabelle 7 Nährmedien und Methoden zur Analyse der im Rohstoff vorhandenen Mikroorganismen

Lebendkeimzahl	Nährmedium	Methode
-aerob	R2A	Spatelplattenverfahren
-anaerob	Schae	Spatelplattenverfahren
-anaerob: Sulfatreduzierer	Postgate's	MPN- Flüssigkeitsanreicherung
- Hefen, Pilze	SGM	Spatelplattenverfahren

#### **Proben AKW**

Die in der folgenden Abbildung 10 aufgeführten Keimzahlen (Koloniebildende Einheiten pro g Trockensubstanz = KbE/gTS für das Spatelplattenverfahren bzw. Keime pro g Trockensubstanz für das MPN-Verfahren) wurden ermittelt.

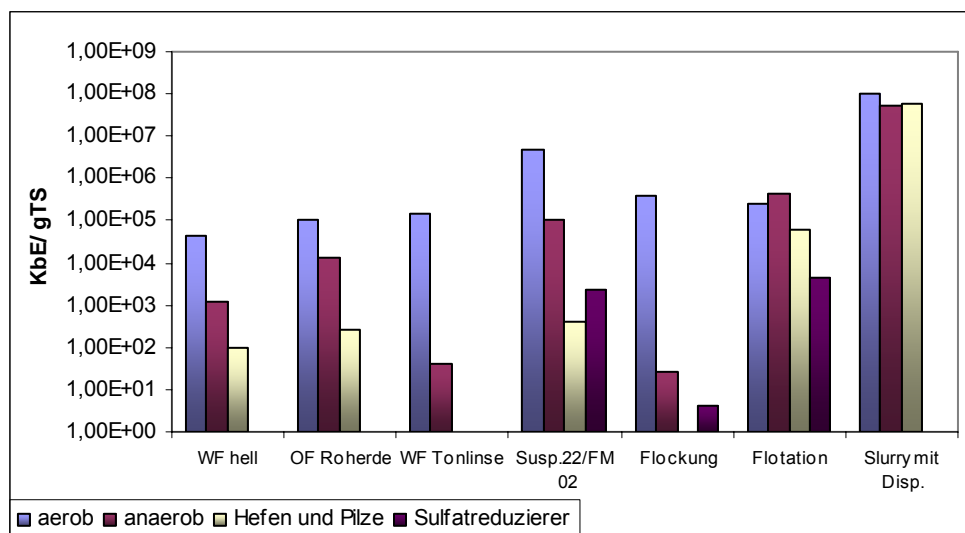


Abbildung 10 Lebendkeimzahlen der Proben AKW vom 08.03.2007

In den Roherden konnten aerobe und anaerobe Mikroorganismen und, außer in der Tonlinse, Hefen und Pilze nachgewiesen werden. Die aeroben Mikroorganismen überwogen. Die Zusammensetzung der Mikroorganismenpopulation sowie deren Anzahl änderten sich im Prozessverlauf. In den Proben, die aus den einzelnen Prozessstufen der Aufbereitung entnommen wurden, waren die Lebendkeimzahlen im Vergleich zu den Roherden erhöht. Hier könnten Keime durch Prozesswässer oder andere Pfade eingetragen worden sein, bzw. konnten die autochthonen Mikroorganismen Bedingungen vorfinden, die zu einem verstärkten Wachstum führten. Sulfatreduzierende Mikroorganismen wurden erst im Aufbereitungsprozess vorgefunden.

Die Ergebnisse der Proben SIBELCO sind im Abschlussbericht G.E.O.S. zu finden.

### **Molekularbiologische Methoden**

Übergreifend über die beiden Schwerpunkte Weißgraderhöhung und Verbesserung der Plastizität wurden mehrere Rohstoffe ausgewählt und die bakterielle DNA mit käuflich erwerblichen Extraktionskits oder klassischen Extraktionsmethoden extrahiert und auf Qualität und Quantität charakterisiert. Die Ergebnisse, sowie die Festlegung der geeigneten Methoden, sind sowohl im Abschnitt 3.2.2 im Bericht „Verbesserung der Plastizität“ als auch in der Dissertation von R. Kaden [2010] zu finden.

Alle in diesem Arbeitspaket angewandten Methoden konnten die Erwartungen einer hinreichenden Widerspiegelung bakterieller Vielfalt in den Tonrohstoffen dahingehend erfüllen, dass auch nicht kultivierbare Bakterienspezies in den Proben detektiert werden konnten und somit eine wichtige Zusatzinformation zu den Befunden aus Kultivierungsverfahren darstellten. Neben den DNA-Sequenzen, die einer bestimmten Spezies zugeordnet werden konnten, sind jedoch auch DNA-Sequenzen detektiert worden, die bisher unbekannt und nicht kultivierbaren Bakterien zuzuordnen sind. Auch hierzu wird auf die Ergebnisse im Schwerpunkt Verbesserung der Plastifizierung eingegangen.

Aufgrund der frühen Festlegung einer Zugabe und Inkubation eines angereicherten eisenreduzierenden Organismus zu Kaolinschlickern (autochthoner Organismus bzw. *Shewanella putrefaciens*), wurden weitere molekulargenetische Arbeiten zur Charakterisierung der bakteriellen Populationen in den Roherden und Proben aus der Prozesskette von AKW nicht weiter vorangetrieben und durchgeführt.

### 3.2 Selektion und Anreicherung eisensolubilisierender Mikroorganismen

Vorhandene standortspezifische eisenoxidierende und –reduzierende Mikroorganismen der Proben von AKW und Sibelco wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

- oxidierend, heterotroph, pH neutral (het. FeOB)
- oxidierend, autotroph, pH neutral (aut. FeOB)
- oxidierend, heterotroph, pH sauer (het. SOB)
- oxidierend, autotroph, pH sauer (aut. SOB)
- reduzierend, heterotroph, pH neutral (het. FeRB)
- reduzierend, autotroph, pH neutral (aut. FeRB).

Die im sauren pH-Bereich lebenden Mikroorganismen sind in der Lage, sowohl Eisen als auch Schwefelverbindungen zu oxidieren.

Die Nährmedien und Methoden zur Analyse der im Rohstoff vorhandenen Eisenspezies gehen aus der Tabelle 8 hervor.

Tabelle 8 Nährmedien und Methoden zur Analyse der im Rohstoff vorhandenen Eisenspezies

Lebendkeimzahl	Nährmedium	Methode
-oxidierend, heterotroph, pH neutral	DSMZ 803	Flüssigkeitsanreicherung
-oxidierend, autotroph, pH neutral	Gallionella-Medium	Flüssigkeitsanreicherung
-oxidierend, heterotroph, pH sauer	SJH flüssig	Flüssigkeitsanreicherung
-oxidierend, autotroph, pH sauer	9K	Flüssigkeitsanreicherung
-reduzierend, heterotroph, pH neutral	DSMZ 579	Flüssigkeitsanreicherung
-reduzierend, autotroph, pH neutral	DSMZ 579 ohne Fe, ohne Citrat	Flüssigkeitsanreicherung

Anschließend erfolgten Anreicherungen aller eisenoxidierenden und –reduzierenden Mikroorganismen auf Nährmedien ohne Probenzusatz.

#### **Proben AKW**

Die Keimzahlen der Eisen- und Schwefelbakterien können der Abbildung 11 entnommen werden.

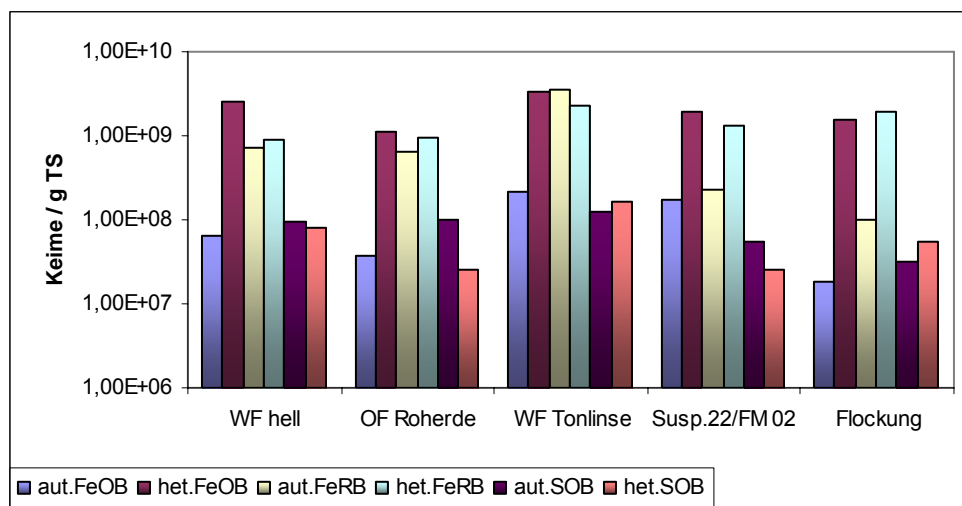


Abbildung 11 Keimzahlen der Eisen- und Schwefelbakterien der Proben AKW vom 08.03.2007

In allen Proben konnten entsprechend der Ansätze Bakterien nachgewiesen werden. Es überwogen heterotrophe eisenoxidierende, sowie autotrophe und heterotrophe eisenreduzierende Mikroorganismen in den Roherden. In den Proben aus dem Aufbereitungsprozess Susp.22 und Flockung waren im Gegensatz zu den Roherden weniger autotrophe eisenreduzierende Organismen vorhanden.

Die Keimzahlen der Eisenbakterien, die in den Proben SIBELCO analysiert wurden, können im Abschlussbericht G.E.O.S. eingesehen werden.

Ausgewählte eisenreduzierende und –oxidierende Anreicherungskulturen wurden weiter kultiviert und für Untersuchungen zur Eignung einer potenziellen mikrobiellen Laugung von Kaolinschlickern weiter untersucht.

### **Molekularbiologische Populationsanalyse ausgewählter Anreicherungskulturen**

An ausgewählten Anreicherungskulturen verschiedener Proben wurden Populationsanalysen durchgeführt:

Kaoline Hirschau:

- 1 aut. FeOB - Gallionella Nährmedium
- 2 aut. FeOB - Gallionella Nährmedium sauer
- 3 het. FeOB - DSMZ 803
- 4 aut. FeOB - DSMZ 579 autotroph mit Fe im Medium
- 5 het. FeOB - DSMZ 579 heterotroph ohne Fe im Medium
- 6 aut. FeOB - 9K-Medium sauer

Tone Westerwald:

- 7 het. FeOB - DSMZ 803
- 8 aut. FeOB - DSMZ 579 autotroph mit Fe im Medium
- 9 het. FeOB - DSMZ 579 heterotroph ohne Fe im Medium
- 10 aut. FeOB - Gallionella

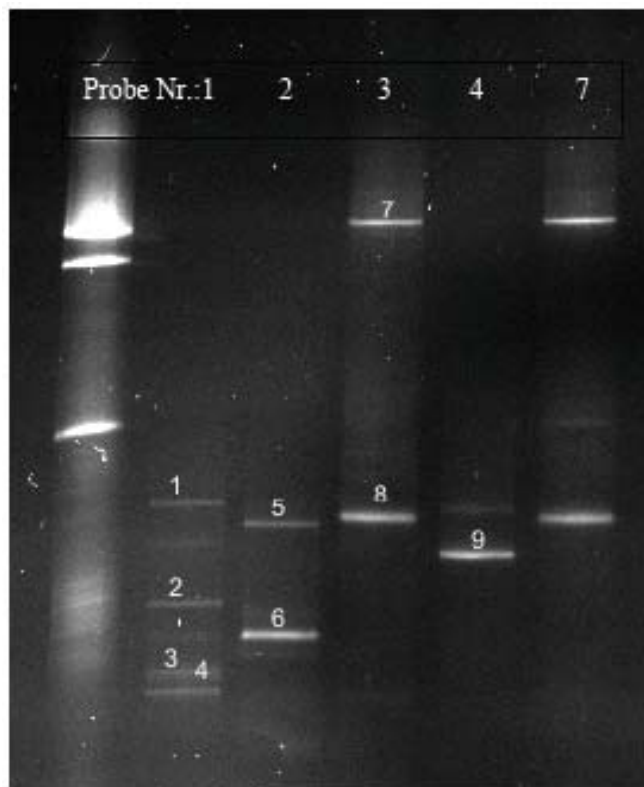
Diese Anreicherungskulturen wurden mit dem „Soil Microbe DNA-Kit“ nach den Vorgaben der Herstellerfirma (Zymo Research) extrahiert. Von den Proben 5 und 6 der Flüssiganreicherungen konnte auch unter Anwendung eines weiteren DNA-Extraktionskits („DNA-Stool-Mini-Kit“, Qiagen) keine weiter verwendbare bakterielle DNA gewonnen werden. Von der extrahierten DNA der verbleibenden Proben wurde mit der Primerkombination GC27f und 517r (Primersequenzen finden sich im Berichtsteil „Verbesserung der Plastizität“)



ein Abschnitt der 16s-rDNA mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. Diese DNA wurden auf ein 40 % - 70 % Gel einer Denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) aufgetragen und bei 1000Vh nach ihren Nukleotidsequenzen getrennt. Ausgewählte Banden (s.Bandenummerierung in Abbildung 12) wurden zur Sequenzanalyse aus diesem Gel ausgeschnitten und in Eppendorfgefäßen mit 50 µL hochreinem H<sub>2</sub>O über Nacht eluiert. Dabei trat die in der Gelmatrix festgehaltene DNA in die wässrige Phase über. Durch eine weitere angeschlossene PCR mit der Primerkombination 27f und 517r wurde die spezifische DNA aus den einzelnen Banden nochmals reamplifiziert. Nach verschiedenen Schritten der Beseitigung überschüssiger Primer, Nukleotidketten und Enzyme wurde die verbleibende DNA weiter aufgereinigt, in Ethanol gefällt und getrocknet.

Zur Sequenzierung der Nukleotidsequenzen wurden die DNA Proben in 3 µL Wasser und 9 µL einer HiDi-Lösung aufgenommen und im DNA-Sequenzier (ABI PRISM® GenetC Analyser 310, Applied Biosystems) sequenziert. Die ausgewerteten DNA-Sequenzen wurden auf der NCBI-Blast Homepage mit den Datenbanken abgeglichen. Weitere Angaben zur Methode und Durchführung sowie softwarespezifische Einzelheiten weiterer molekularbiologischer Populationsanalysen finden sich in der Dissertation von R. Kaden [2010].

Die aus den Proben 1 bis 4 und 7 gewonnene DNA konnte ausgewertet werden. Die folgenden Ergebnisse der Sequenzierung wurden erreicht:



Probe 1:Kaolin AKW auf aut. FeOB-Medium

1. *Acidithiobacillus (ferrooxidans)*
2. *Burkholderia sp.*
- 3., 4. *Thiomonas sp.*

Probe 2:Kaolin AKW auf aut. FeOB-Medium  
pH sauer

5. *Thiomonas sp.*
6. *Acidisoma sp.*

Probe 3:Kaolin AKW auf het. FeOB-Medium

7. nicht auswertbar
8. *Brevundimonas sp.*

Probe 4:Kaolin AKW auf aut. FeRB-Medium

9. *Alcaligenes (faecalis)* bzw.  
*Achromobacter (xylosoxidans)*

Probe 7:Ton Sibelco auf het. FeOB-Medium

8. *Brevundimonas sp.*

Abbildung 12 Separationsmuster

Alle aufgefundenen Mikroorganismen sind Bodenorganismen.

In den Kaolinen wurden autotrophe und heterotrophe eisen- und schwefeloxidierende Organismen molekularbiologisch nachgewiesen und näher identifiziert. ***Acidithiobacillus (ferrooxidans)*** oxidiert reduzierte Metallverbindungen, wie Eisen, aber auch Schwefel, und bildet dabei Schwefelsäure. Es ist ein chemolithotroph lebendes Stäbchen [Silverman, Lundgren, 1959]. ***Thiomonas sp.*** kann autotroph (oxidiert Schwefelverbindungen), heterotroph (nutzt z.B. Glucose oder Hefeextrakt) oder mixotroph (Hefeextrakt als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle) leben. Es ist stäbchenförmig und kommt im gemäßigt acidophilen Milieu vor [Morera; Amils, 1997]. ***Acidisoma sp.*** gehört zur Gruppe der *Acetobacteraceae*, der Essigsäurebakterien, ist stäbchenförmig und obligat aerob [Belova et

al. 2009]. Weitere Bodenbakterien, wie *Alcaligenes sp.*, ein aerober, stäbchenförmiger Nitratatmer, sowie *Achromobacter sp.*, wurden aufgefunden. Letzteres ist chemoorganotroph, nutzt verschiedene organische Verbindungen, z.B. Aminosäuren, z.T. aber auch Wasserstoff und Sauerstoff und ist damit fakultativ chemolithotroph [Hendrie et al., 1974]. Weiterhin sind in den Proben obligat aerobe stäbchenförmige Boden- und Wasserbakterien, wie *Burkholderia sp.* [Yabuuchi et al., 1992], analysiert worden. Im Ton konnten keine Eisenbakterien nachgewiesen werden. Es sind, wie in den Kaolinen, *Brevundimonas sp.*, aerobe, chemoorganotrophe Stäbchen vorhanden [Abraham et al., 1999].

### 3.3 Metallspezies-Solubilisierung

#### 3.3.1 Autochthone Mikroorganismen

##### *Aktivierung der autochthonen Mikroorganismen mit Nährmedium*

Die Laugung der Probe S2 wurde im Schüttelkolben in Batch-Ansätzen verfolgt, die wöchentlich analysiert wurden. Unter anaeroben Bedingungen wurden je 4 Ansätze mit Wasser, 4 Ansätze mit Eisenreduktionsmedium DSMZ 579 und 2 sterile Ansätze mit autoklavierter Probe und gleichem Medium inkubiert. Im Überstand wurde die Konzentration an Eisen ermittelt, die Rückstände chemisch analysiert.

Die Eisenkonzentrationen in den Eluaten und die berechneten Laugungsraten dienten dem Vergleich der einzelnen Versuche. Das nachfolgende Diagramm stellt die Laugungsraten von Eisen des jeweiligen abgebrochenen Versuches dar.

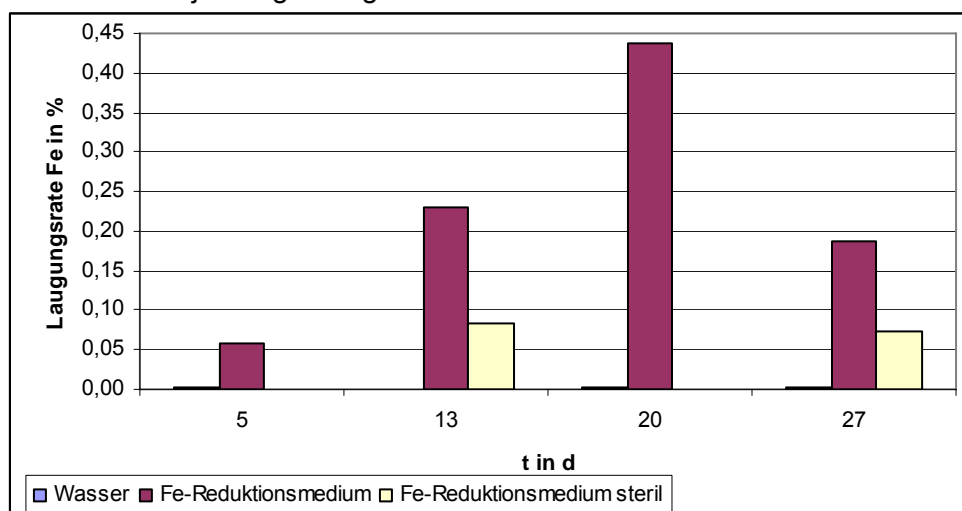


Abbildung 13 Laugungsraten Fe mit Wasser und Nährmedium DSMZ 579

Wasser ist als Elutionsmittel ungeeignet. Innerhalb von 7 Tagen konnten nur 0,03 mg/l Eisen gelöst werden.

Das Eisenreduktionsmedium fördert die Elution von Eisen aus der Probe. Mit 5,1 mg/l Eisen wurde 170 mal mehr Eisen gelöst als mit Wasser. Durch dieses Medium wurden den in der Probe vorhandenen eisenreduzierenden Mikroorganismen Nährstoffe zur Verfügung gestellt, um ihre Stoffwechselforgänge zu aktivieren. Die Keimzahlen stiegen auf  $1,50E+05$  Keime/ml an. Die Probe mit Wasser enthielt nur  $2,00E+01$  Keime/ml.

Als Vergleich diente der sterile Ansatz mit Eisenreduktionsmedium. Im Unterschied zum nicht sterilen Ansatz wurden mit 0,97 mg/l wesentlich weniger Eisen in Lösung gebracht.

Die Beschleunigung der Laugung mit Hilfe des Nährmediums und damit die Aktivität der Mikroorganismen wurden in der Erhöhung des Weißgrades um 1,80 % und der Erniedrigung des Gelbwertes um 2,05 % deutlich.

Da die Laugungsraten von Eisen und die Erhöhung des Weißgrades noch nicht befriedigten, wurden in nachfolgenden Versuchen angereicherte autochthone Mikroorganismen eingesetzt.

### **Untersuchungen mit angereicherten autochthonen Mikroorganismen**

Mit den aus den Proben der AKW Hirschau angereicherten Eisenspezies wurden in Säulenversuchen die Probe LA 540 und in Schüttelversuchen zusätzlich die Probe S2 beimpft.

Säulenversuche wurden durchgeführt, um eine Haldenlaugung des Rohmaterials zu simulieren. Eine Serie zur Abtrennung des Eisens aus der Roherde LA 540 wurde mit autotrophen und heterotrophen eisenreduzierenden Bakterien unter anaeroben Bedingungen vorgenommen.

Die Ansätze umfassten:

Füllhöhe der Säulen: 14 cm

Durchmesser der Säulen: 5,5 cm

Probenmenge: 596 g TS

Korndichte: 2,61 g/cm<sup>3</sup>

gefülltes Volumen: 332,45 cm<sup>3</sup>

errechnetes Porenvolumen: 104 cm<sup>3</sup>

Die Säule 1 wurde mit autotrophen eisenreduzierenden Bakterien, Säule 2 mit heterotrophen eisenreduzierenden Bakterien, beaufschlagt. Säule 3 wurde zu vergleichenden Untersuchungen mit destilliertem Wasser betrieben. Nach dem Abbruch des Versuches in Säule 1 erfolgte ein neuer Ansatz. Dieser (Säule 4) wurde mit heterotrophen eisenreduzierenden Bakterien, die Acetat statt Citrat wie in Säule 2, als Kohlenstoffquelle zur Verfügung hatten, beimpft. Im Säulenablauf wurden der pH-Wert, die Leitfähigkeit, die Konzentration von Sauerstoff und Eisen<sub>ges.</sub> und die Keimzahl bestimmt.

Die Gegenüberstellung der Elution von Eisen in den 4 Säulenversuchen erfolgt in der Abbildung 14.

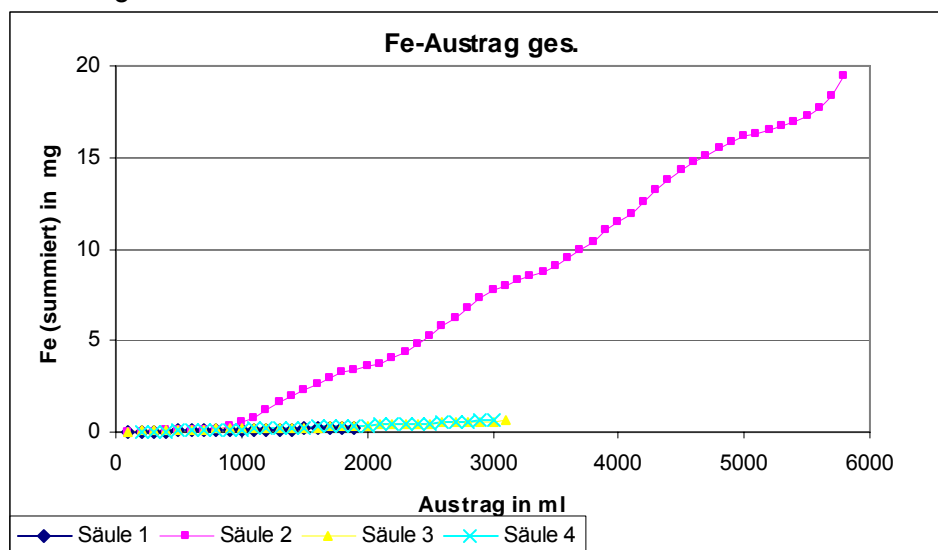


Abbildung 14 Fe-Austrag der Säulen 1 bis 4

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass nur die heterotrophen eisenreduzierenden Bakterien eine sichtbare Eiseneliminierung bewirkten. Mit 5.800 ml Elutionsmittel wurden innerhalb von 281 Tagen 19,47 mg des in der Probe vorhandenen Eisens gelöst, was 2,40 % entsprach.

Durch die Zugabe eines Nährmediums mit verwertbarer organischer Kohlenstoffquelle konnte das Wachstum der Bakterien gefördert und damit die Laugungsrate des Eisens gesteigert werden.

Um eine Intensivierung der Laugung zu erreichen, wurden weitere Proben in Schüttelkolben behandelt. Verwendet wurden heterotrophe eisenreduzierende Bakterien, auch an die Proben adaptierte, zum Vergleich steriles, unbeimpftes Nährmedium und Wasser. Untersuchungen zum Einsatz von NTA und EDTA als Chelatoren erfolgten zusätzlich. Nach Štyriaková, Lovács (2007), kann ein geringer Zusatz von Chelatoren die bakterielle Lösung von Eisen (III) stimulieren und damit den Biolaugungsprozess unterstützen. Die Laugungszeiten wurden entsprechend praxisnaher Bedingungen auf 7 bis 14 Tage verkürzt. Die Ergebnisse zeigten, dass in der überwiegenden Anzahl der Versuche eine 14-tägige Laugungsdauer höhere Laugungsraten von Eisen aufwies als eine Laugungszeit von 7 Tagen. Der Weißgrad konnte in dieser Zeit auf 69-70 % gesteigert werden. Durch Entfernen der ockerfarbenen Ausfällungen auf den Proben, die nach der Zentrifugation entstanden, war eine Weißgraderhöhung auf über 71 % möglich. Dass mit dieser Schicht eine erhebliche Menge Eisen entfernt wurde, ließ sich an den  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Konzentrationen der Rückstände ablesen, die um 0,26 % sanken. NTA und EDTA hatten auf die Laugungsergebnisse und auf die Erhöhung des Weißgrades keinen maßgeblichen Einfluss.

### 3.3.2 Spezialisten

Da die Laugungsergebnisse und die erzielten Weißgrade noch nicht befriedigten, wurden verschiedene Spezialisten, wie *Geobacter metallireducens* und silikatsolubilisierende Bakterien, aber auch Komplexbildner getestet.

#### *Geobacter metallireducens* DSM 7210

Zu vergleichenden Untersuchungen zu den Laugungen mit angereicherten autochthonen eisenreduzierenden Bakterien wurde der Stamm DSM 7210 aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig bezogen. *Geobacter metallireducens* ist ein obligat anaerober Eisenreduzierer, der Fe (III) als Elektronenakzeptor und einfache organische Verbindungen als Elektronendonator nutzt. [Coates et. al, 1996; Childers et. al, 2002]. Für die Versuche wurden 15 g TS der Proben S2 und LA 540 mit dem Nährmedium DSMZ 579 versehen und mit *Geobacter metallireducens* DSM 7210 beimpft. Jeweils nach 7 und 14 Tagen erfolgte der Abbruch eines Versuchsansatzes. Es wurden die Konzentrationen von  $\text{Fe}_{\text{ges.}}$ , Ti, Mn, Ca, Mg, Si, Al im Überstand analysiert, die pH- und Redoxwerte gemessen und die Anzahl der Zellen mikroskopisch bestimmt.

Die errechneten Laugungsraten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 9 Laugungsraten der Proben S2 und LA 540 mit *Geobacter metallireducens* DSM 7210 in %

	Fe	Ti	Ca	Mg	Si	Al
<b>S2 -7 d</b>	0,39	0,01	52,32	4,77	0,09	0,23
<b>S2 - 14d</b>	1,18	0,02	56,62	5,26	0,38	0,37
<b>LA 540 - 7d</b>	0	0,02	28,79	26,75	0,01	0,11
<b>LA 540 - 14d</b>	0	0,01	27,83	26,75	0,01	0,10

Die Laugungsrate von Fe der Probe S2 konnte mit *Geobacter metallireducens* DSM 7210 innerhalb von 14 Tagen um das 2,6-fache gegenüber der Laugung mit autochthonen Mikroorganismen gesteigert werden, während aus der Probe LA 540 kein Fe solubilisiert werden konnte. Die Analyse der Rückstände der Probe S2 ließ eine Erhöhung des Weißgrades um 0,70 % und eine Erniedrigung des Gelbwertes um 1,78 % erkennen, aber

keine Verringerung der Konzentration von  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ - Konzentration der Probe LA 540 sank dagegen leicht.

### **Silikatsolubilisierende Bakterien**

Für die Zerstörung von Silikatmineralen mit gleichzeitiger reduktiver Lösung von Eisen (III) sind Silikatbakterien zuständig [Štyriaková, 2007]. Für diesen Vorgang werden in der Literatur verschiedene Bacillus-Arten beschrieben, u.a. *Bacillus cereus* [Štyriaková, 2007] und ein Gemisch aus *Bacillus cereus* und *Bacillus pumilus* [Štyriaková, 2007; Štyriaková, Lovás, 2007; Mockovčiaková et. al, 2008]. Da *Bacillus cereus* zu den Bakterien der Risikogruppe 2 gehört und damit für einen vorgesehenen industriellen Einsatz ungeeignet ist, wurden für Untersuchungen der Proben der Amberger Kaolinwerke *Bacillus pumilus* (DSM 27) und *Bacillus licheniformis* (DSM 13) verwendet. Beide gehören der Risikogruppe 1 an. [BG Chemie, 2002]

In Vorversuchen wurde das Wachstum von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus pumilus* in verschiedenen Nährmedien, wie DSMZ 1 und unterschiedlichen Minimalmedien mit Glucose und Citrat als Kohlenstoffquelle und teilweise mit Hefeextraktzusatz, getestet. Die Bakterien wuchsen auch in den Minimalmedien sehr gut und erreichten wie in der Nährbouillon (DSMZ 1) Zellzahlen bis  $E+09$  Zellen/ml. Sehr große Abweichungen gab es in den erreichten pH-Werten der Kulturmedien. Während in Minimalmedien mit Glucose die pH-Werte bei ca. 4 lagen, erreichten diese in der Nährbouillon und in Minimalmedien mit Citrat Werte  $> 8$ . Die optimalen Wachstumstemperaturen werden für *Bacillus licheniformis* mit  $40^\circ\text{C}$  und für *Bacillus pumilus* mit  $30^\circ\text{C}$  angegeben.

Es erfolgten Untersuchungen in Schüttelkulturen mit jeweils 15 g TS der Proben S2 und LA 540 unter Verwendung der verschiedenen Nährmedien, mit Zusatz der Komplexbildner NTA und EDTA, mit an die Proben adaptierten Bakterien und mit auf pH-Wert 7 geregelten pH-Werten. Es wurden Abbruchversuche durchgeführt, die jeweils nach 7 und 14 Tagen beendet wurden.

Die umfangreichen Analysenergebnisse zeigen, dass mit silikatsolubilisierenden Bakterien die Laugung besonders von LA 540 durchgeführt werden kann. Im Medium DSMZ 1 laugte *Bacillus licheniformis* aus der Probe LA 540 bis zu 3,12 % Eisen. Mit Komplexbildnern konnte die Laugungsrate auf 4 % gesteigert werden.

Die Probe S2 konnte von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus pumilus* bevorzugt im Minimalmedium gelaugt werden (0,14 bzw. 0,09 % Fe). Der Zusatz von Komplexbildnern, besonders EDTA, förderte die Laugung. Es wurden bis zu 0,79 % des Eisens gelöst.

### **Hefe**

Die Laugung von Eisen aus Oxidmineralen mit Hilfe heterotropher Mikroorganismen untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen. Die besten Ergebnisse wurden unter Verwendung von Mikroorganismen, die organische Säuren, hauptsächlich Oxalsäure, bilden, erzielt [Groudev, Groudeva, 2001]. *Debaromyces hansenii* (früher *Candida famata*) ist ein weit verbreiteter Kontaminant der Luft, der in der Lage ist, Oxalsäure zu produzieren. Vermutlich wird von ihm auf enzymatischem Weg Milchsäure gebildet. Aus Mangel an Zymase kann diese nicht weiter zu Alkohol und  $\text{CO}_2$  zerlegt werden, sondern wird zu Oxalsäure oxidiert. Die produzierte Oxalsäure reagiert mit wasserunlöslichen Eisen(III)-oxiden zu wasserlöslichen Trioxalatoferrat(III)-ionen [Schlegel, 2006].

Die Kultur *Debaromyces hansenii* DSM 70238 wurde im Medium DSMZ 186, einem Universalmedium für Hefen, bei  $20^\circ\text{C}$  kultiviert.

Für die Untersuchungen wurden 7,5 g der Probe S2 mit 50 ml zentrifugiertem Überstand der Kultur aus der exponentiellen Wachstumsphase beimpft und bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Anfangs-pH-Wert betrug 4,51. Die Versuche wurden nach 5 Stunden bzw. 3

Tagen abgebrochen. Die Proben wurden zentrifugiert, 2 mal gewaschen, das entstandene dunkle Pellet abgetrennt und getrocknet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Ergebnisse der Laugung mit Kulturlösung von *Debaryomyces hansenii* DSM 70238, Versuch 1

Zeit		5 h	3 d
Fe <sub>ges.</sub>	%	0,013	0,035
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	%	1,03	0,94
Weißgrad	%	67,7	70,2

Mit zunehmender Laugungszeit konnte die Laugungsrate gesteigert werden. Der Weißgrad erhöhte sich auf über 70 %. Der Vergleich zur chemischen Laugung mit Oxalsäure (s. Abschnitt 2.4) zeigt, dass chemisch bei diesem pH-Wert keine Weißgradsteigerung erreicht werden konnte. Erst bei einem pH-Wert von 1,5 war eine deutliche Steigerung auf 76,70 % zu verzeichnen. Die Lösung von Eisen ist mit mikrobiell erzeugten organischen Säuren und anderen Metaboliten, die als komplexe Agenzien fungieren [Berthelin, Kogblevi, 1974], in weniger sauren Lösungen möglich.

In weiteren Versuchsserien wurden unterschiedliche Laugungszeiten getestet. Es stellte sich heraus, dass eine Erweiterung auf 14 Tage zu keiner weiteren Erhöhung der Laugungsrate oder des Weißgrades führt.

### ***Shewanella putrefaciens***

Der Organismus *Shewanella putrefaciens* (früher *Alteromonas putrefaciens*) ist bekannt für seine Eigenschaft unter anaeroben Bedingungen Eisen(III) zu reduzieren und gleichzeitig ein breites Spektrum an Elektronendonatoren zu oxidieren [Lovley et al., 1989]. Das Bakterium wurde bereits in verschiedensten Habitaten isoliert, z. B. in Gewässersedimenten [Myers & Nealson, 1988]. Der fakultativ anaerobe Organismus ist in der Lage, unter aeroben Bedingungen zu wachsen, was höhere Stoffwechselraten verspricht als das Wachstum bei Sauerstoffausschluss. Der Organismus wurde erfolgreich zur Reduktion von verschiedenen Eisenoxiden eingesetzt [Kostka, Nealson, 1995; Royer et al., 2002], auch im Hinblick auf die speziellen Bedingungen bei Verwendung von Tonmineralen [Kostka et al., 1996 & 2002; Jaisi et al., 2005]. *Shewanella putrefaciens* benötigt wahrscheinlich zur Reduktion von Eisen direkten Zellkontakt [Kostka et al., 1996], auch wenn aktuellere Untersuchungen Gegenteiliges behaupten [Jaisi et al., 2005]. Durch Royer et al. [2002] wurden verschiedene Strategien zur Verbesserung der jeweiligen Reduktionsleistung getestet. Unter anderem wurde der Kulturlösung Anthraquinon-2,6-disulfonat (AQDS) als chemischer Elektronentransmitter zugesetzt, wodurch die Reduktion von Hämatit deutlich gesteigert wurde. Die gleichzeitige Komplexierung des entstehenden Eisen(II) durch das Reagenz Ferrozin verbesserte das Ergebnis nochmals. Als eine logische Schlussfolgerung wurde auf der Goldschmidt Conference 2008 [Zegeye et al., 2008] das Prinzip der Eisenreduktion durch *Shewanella putrefaciens* mit einer Erhöhung des Weißgrads von Kaolin in Verbindung gebracht.

Um die Anwendbarkeit dieses Prinzips und die mögliche praktische Überführung zu testen, wurde ein Versuch im Screeningmaßstab durchgeführt. In zwei 500 ml-Flaschen wurden je 35 g Kaolin (LA540, R457 ~ 68 %) in insgesamt 200 ml Medium (siehe Tabelle 11) dispergiert, wovon 50 ml Volumenanteil durch das Inoculum zugeführt wurden.

Tabelle 11 Zusammensetzung des verwendeten Reduktionsmediums zur Aufhellung von Kaolin mit *Shewanella putrefaciens* B622/T

Substanz (gelöst in Leitungswasser)	g/l
Mg-L-Lactate x H <sub>2</sub> O	1,28
KCl	0,42
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,99
NH <sub>4</sub> Cl	1,07
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,1764
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,24
AQDS	0,021

Im Versuchsansatz (VA) wurden 50 ml gewaschene Biomasse in physiologischer NaCl-Lösung als Inoculum eingesetzt (OD<sub>600</sub> 21,6), während im Kontrollansatz (KA) 50 ml reine NaCl-Lösung verwendet wurde. Die 15 %ige Kaolinsuspension wurde auf pH 7 eingestellt, mit Stickstoff über mehrere Stunden unter Rühren begast und anschließend luftdicht verschlossen. Dieser Vorgang wurde täglich wiederholt. Dabei fiel auf, dass der beimpfte Versuchsansatz unter Gaszufuhr zu schäumen begann und sich ein fauliger Geruch bemerkbar machte. Nach sieben Tagen wurde der Versuch beendet. Die Suspension wurde auf zwei Proben aufgeteilt. Den Proben VA1 und KA1 wurden 1 ml 1 M Schwefelsäure hinzugefügt, um vorliegendes Eisenoxid in der Lösung zu stabilisieren. Die Proben VA2 und KA2 wurden unverändert weiter aufgearbeitet. Alle Proben wurden zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Kaolinpellet in Leitungswasser gewaschen. Nach Trocknung und Mahlen wurden die Proben dem AKW zur Analyse übergeben.

Bereits die Bestimmung der Lactat-Konzentration im Überstand der Proben deutete auf eine mikrobiologische Aktivität während des Versuchs hin. Das Lactat im Versuchsansatz war nach sieben Tagen vollständig verbraucht, während die Konzentration im Kontrollansatz unverändert blieb. Die Weißgradbestimmung bestätigte die Beeinflussung des Weißgrades des Kaolins durch die eingebrachten Mikroorganismen. Der Weißgrad des Versuchsansatzes lag durchschnittlich zwei Prozentpunkte über dem Kontrollansatz, bei identischer Korngrößenverteilung. Überraschenderweise hat sich die mineralogische Zusammensetzung praktisch nicht verändert. Die erwartete Auswaschung von Eisenverbindungen konnte nicht festgestellt werden. Lediglich bei der angesäuerten Probe liegt der Gehalt an Eisenoxid im Rückstand unterhalb des Startwerts. Sehr wahrscheinlich wurden verschiedenste farbgebende Oxide wie erwartet reduziert. Ähnlich der chemischen Bleiche in der industriellen Kaolinaufbereitung wird dadurch eine reversible Erhöhung des Weißgrades erzielt. Aufgrund des Verbleibs des reduzierten, silikatisch gebundenen Eisens im Mineral kann das Eisen nicht aus dem Gesamtansatz entfernt werden, der Effekt einer Weißgraderhöhung ist jedoch durch diese Reduktion des Eisens gegeben. Daher bleibt die Gesamtbilanz des Eisens bei verändertem Weißgrad gleich. Dieser Umstand birgt natürlich die Möglichkeit, dass bei Exposition des Kaolins eine Rückoxidation durch den einwirkenden Luftsauerstoff stattfindet, das silikatisch gebundene Eisen oxidiert wird und sich der Weißgrad anschließend wieder verringert.

### 3.3.3 Komplexbildner

Komplexbildner sind in der Lage Metallionen zu binden. Sie stellen eine chemische Verbindung dar, die aus einem Zentralatom besteht, an das sich infolge von Lücken in dessen Elektronenkonfiguration ein oder mehrere Moleküle oder Ionen, die Liganden, anlagern können. Die Liganden können aufgrund der Anzahl der Koordinationsstellen ein- oder mehrzählig sein. Mehrzählige Liganden, bei denen ein Metallkation von einem organischen Molekül an mindestens zwei Stellen gebunden ist, werden als Chelatoren bezeichnet. Chelate sind hinsichtlich ihrer Thermodynamik und Kinetik sehr stabile Komplexverbindungen. Zu ihnen gehören z. B. das sechszählige EDTA und das vierzählige NTA [Holleman, Wiberg, 1995]. EDTA ist ein starker Komplexbildner, besitzt eine gute

Wasserlöslichkeit und eine geringe Adsorptionsleistung. Da es aber nur schwer biologisch abbaubar ist, wird es zunehmend durch andere Stoffe, wie z. B. NTA, ersetzt. NTA ist besser biologisch abbaubar, besitzt gute Komplexbildungseigenschaften, aber nicht so stark wie EDTA, wird für Bäder zur Entmetallisierung eingesetzt. Andere Ersatzstoffe sind Citrate oder Gluconate, die biologisch leicht abbaubar sind, aber deutlich schwächere Komplexbildner darstellen [Umweltbundesamt, 2011].

Zu den biologisch erzeugten Komplexbildnern zählen Siderophore, große Eisenträger. Diese werden von Bakterien, Pilzen und verschiedenen Pflanzenwurzelzellen gebildet. Sie werden von der Zelle in die Umgebung abgegeben, um Eisen zu binden und durch die Zellmembran in die Zelle zu transportieren [Müller-Graf, 2005]. Von den gegenwärtig ca. 200 bekannten natürlichen Siderophoren [Kaim, Schwederski, 2005] wurden Enterobactin und Desferrioxamin für Untersuchungen ausgewählt. Enterobactin ist als stärkster Chelatbildner bekannt. Es besitzt eine hohe Affinität zu Eisen. Desferrioxamin wird für industrielle Anwendungen eingesetzt, wie zur Entrostung von Metallteilen, bzw. zur Herstellung von Entrostungstauchbädern. Geprüft wurden Desferrioxamin E und Bio-Derosta® 3-L, die von der ASA Spezialenzyme GmbH Wolfenbüttel bezogen wurden. Desferrioxamin E ist ein Gemisch aus Siderophoren, das fermentativ von *Streptomyces olivaceus* produziert und teilgereinigt wird. Der Siderophorgehalt ist > 85 %. Es ist in der Lage, Eisen (III)-Ionen durch sehr stabile Chelatkomplexe zu binden. Bio-Derosta® 3-L ist ein biologischer Komplexbildner, der industriell zur Entrostung eingesetzt wird [Produktinformation asa-enzyme].

Hintergrund ist ein potenzieller Einsatz stark siderophobildender Mikroorganismen zur Erhöhung des Weißgrades in industriellen Prozessen.

### **Bio-Derosta® 3-L**

Verschiedene Versuche wurden mit den Proben S2 und LA 540 durchgeführt.

Serie 1 umfasste Vorversuche in denen 5g Probe mit 50 ml Bio-Derosta® 3-L im Verhältnis 1:6 jeweils 5 bzw. 24 Stunden geschüttelt wurden. In Serie 2 erfolgten Versuche mit 5g Probe und 50 ml Bio-Derosta® 3-L im Verhältnis 1:3 und 1:6. Von den jeweils 6 Ansätzen wurde nach 2, 5, 7, 9, 12 und 14 Tagen ein Ansatz abgebrochen und analysiert. In einer weiteren Serie, der Serie 3, wurde die Probemenge erhöht. Je 5, 10, 15, 20 und 25 g Probe mit 100 ml Bio-Derosta® 3-L im Verhältnis 1:6 wurden getestet. Untersuchungen, ob eine Steigerung der Laugungsrate mit Bio-Derosta® 3-L bei einer erhöhten Temperatur (40 °C) möglich ist, fanden in der 4. und 5. Serie statt. Nach Abbruch der Versuche erfolgte die Analyse der Laugelösung hinsichtlich der Konzentration an Eisen und die Untersuchung der getrockneten Rückstände.

Eine zusammenfassende Übersicht über die Laugungsergebnisse mit Bio-Derosta® 3-L zeigt die folgende Tabelle:

Tabelle 12 Zusammenfassung der Laugungsergebnisse mit Bio-Derosta® 3-L

Serie	Ansätze	Zeit in d	Laugungsrate Fe in %		Weißgrad %	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in %	
			S2	LA 540	S2	S2	LA 540
1	5g TS + 50ml 1:6	1	0,23	0,55	68,60	1,00	0,18
2	5g TS + 50ml 1:6	14	0,61	1,65	71,00	0,88	0,18
	5g TS + 50ml 1:3	14	0,52	1,21	69,70	0,94	0,15
3	5g TS + 100ml 1:6	14	0,34	0,59	67,40	1,12	-
	10g TS + 100ml 1:6	14	0,29	0,41	67,40	1,12	0,20
	15g TS + 100ml 1:6	14	0,28	0,33	67,80	1,11	0,17
	20g TS + 100ml 1:6	14	0,27	0,32	67,70	1,12	0,18
	25g TS + 100ml 1:6	14	0,27	0,34	67,30	1,07	0,19
4	10g TS + 100ml 1:6	7	0,30	0,23	70,30	1,23	0,17
	10g TS + 100ml 1:6	14	0,36	0,43	69,10	1,09	0,15
	15g TS + 100ml 1:6	7	0,27	0,20	71,30	1,02	0,18
	15g TS + 100ml 1:6	14	0,37	0,30	69,30	1,08	0,17
	10g TS + 100ml 1:6 40°C	7	0,55	0,43	70,70	1,12	0,17
	10g TS + 100ml 1:6 40°C	14	1,21	0,69	68,90	1,11	0,18
	15g TS + 100ml 1:6 40°C	7	0,79	0,40	69,60	1,06	0,17
	15g TS + 100ml 1:6 40°C	14	1,08	0,64	69,60	1,13	0,18
5	10g TS + 100ml 1:6	14	0,48	0,43	72,30	0,81	0,80
	10g TS + 100ml 1:6 40°C	14	1,19	0,60	71,60	0,41	0,17



Es wird deutlich, dass der Weißgrad der Probe S2 in den Serien 1, 2, 4 und 5 erhöht werden konnte. Die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Konzentration sankt in diesen Versuchen leicht. Die Rückstände der Probe LA 540 zeigten in allen Versuchen einen Rückgang der  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Konzentration. Die  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Konzentrationen der Probe S2 in den Serien 3 und 4 waren noch größer, in Serie 5, nach dem Entfernen der Niederschläge, lagen sie wesentlich darunter. Damit ist bewiesen, dass in den ockerfarbenen Niederschlägen ein großer Teil des Eisens vorhanden ist. Die besten Laugungsraten wurden mit 10 g Probe S2 in 100 ml Laugungslösung bei 40 °C mit 1,21 bzw. 1,19 % und bei Probe LA 540 bei Raumtemperatur mit 1,21 % erreicht. Eine Anhebung des Weißgrades bei der Probe S2 um 4,30 % konnte bei Raumtemperatur mit 10 g Probe und 100 ml Medium erreicht werden.

### **Desferrioxamin E**

Für die Untersuchungen wurden 30 mg der Probe S2 (Charge 2) mit 0,8 bzw. 2,3 mg Desferrioxamin E und 10 ml Wasser versetzt. Es fanden Doppelversuche statt, die nach 1, 7 und 14 Tagen abgebrochen wurden. Zusätzlich wurden 0,8 und 2,3 mg Desferrioxamin E mit 10 ml Wasser ohne Probenzusatz behandelt, um zu sehen, wie viel Eisen im Desferrioxamin selbst vorhanden ist. Die Probenflaschen wurden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Mengen Desferrioxamin E beziehen sich auf die Gesamteisenkonzentration der Probe und auf den maximalen Gelöstanteil an Eisen.

Die im Desferrioxamin selbst vorhandenen Mengen an Eisen von 0,016 mg/l und 0,028 mg/l wurden von den jeweiligen Laugungsergebnissen mit Probenmaterial subtrahiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Laugungsraten mit der Laugungsdauer erhöhen. Mit 0,8 mg Desferrioxamin E konnten bis zu 1,45 % Fe, mit 2,3 mg bis zu 3,34 % des in der Probe vorhandenen Eisens gelöst werden. Eine Analyse der Rückstände war wegen der geringen Probemenge nicht möglich.

Nach den Vorversuchen wurden Laugungsversuche mit 15 g S2 (Kaolin für Pilotversuch), 1g Desferrioxamin E und 100 ml Wasser bei einer erhöhten Temperatur von 40°C durchgeführt. Parallelversuche wurden nach 1, 7 und 14 Tagen abgebrochen. Nach dem Abbruch wurde je eine Probe zentrifugiert, das entstandene dunkle Pellet entfernt, der Überstand und der getrocknete Rückstand, sowie das Pellet analysiert. Bei einer weiteren Probe erfolgte nach dem Zentrifugieren ein erneuter Waschvorgang mit 30 ml Wasser, ein wiederholtes Zentrifugieren, Entfernen des entstandenen Pellets und die Analyse der Probe.

Tabelle 13 enthält die ermittelten Laugungsraten.

Tabelle 13 Laugungsraten mit Desferrioxamin E in %

Zeit in d	nach Waschen	Fe	Ti	Ca	Mg	Si	Al
a	1	0,35	0,01	6,32	0,98	0,08	0,03
b	1	0,38	0,01	6,74	1,11	0,08	0,04
a	7	0,88	0	8,71	1,35	0,17	0,06
b1	7	0,75	0,01	8,71	1,35	0,18	0,06
b2	7	x	0	0,53	0,10	0,01	0
b1+b2	7	0,80	0,01	9,24	1,45	0,19	0,07
a	14	0,94	0,01	10,37	1,76	0,2	0,07
b1	14	0,98	0,01	10,37	1,72	0,2	0,07
b2	14	x	0	0,53	0,11	0,01	0
b1+b2	14	1,04	0,01	10,90	1,83	0,21	0,08

a und b = Doppelversuch

Die Laugungsraten von Fe, Ca, Mg stiegen mit der Zeit. In 7 Tagen wurde Fe um das 2,3-fache und in 14 Tagen um das 2,47-fache gelaugt. Si und Al wurden nur geringfügig gelöst, Ti gar nicht. Durch den Waschvorgang wurde nur wenig zusätzliches Fe in Lösung gebracht, etwas mehr Ca und Mg.

Tabelle 14 Ergebnisse der Laugung der Proben S2 mit Desferrioxamin E

Zeit in d	nach Waschen	Weißgrad %	Gelbwert %	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in %
a	1	63,0	16,50	0,71
b	1	62,7	16,61	0,68
a	7	65,8	14,56	0,69
b2	7	x	14,83	0,66
a	14	64,9	14,90	0,69
b2	14	x	14,62	0,65

Obwohl Fe in Lösung gegangen war, konnte der Weißgrad nicht erhöht werden. Nach dem Zentrifugieren war auf der Probenoberfläche ein rostroter Niederschlag zu sehen. Dieser Fe-Anteil löste sich nicht, sondern verblieb in der Probe und verfärbte diese noch stärker. Das war auch in der Erhöhung des Gelbwertes um 0,36 (nach 14 Tagen) bis 2,35 % (nach 1 Tag) zu beobachten. Im Rückstand sank der Anteil an Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in allen Versuchen um 0,09 bis 0,15 %.

Weiterhin war eine Senkung von TiO<sub>2</sub> um 0,07 % zu verzeichnen. Die Ausfällungen nach dem Zentrifugieren der Proben lassen sich in den folgenden Abbildungen deutlich erkennen:



Abbildung 15 a, b Probe S2 nach 1 Tag Laugung mit Desferrioxamin E nach Zentrifugation und Trocknung (a) und nach 14 Tagen Laugung nach Zentrifugation (b)

Schon nach einem Tag waren rostrote Ausfällungen von Fe zu beobachten (Abbildung 15 a). Nach 14 Tagen war nach der Zentrifugation ein deutlich ockerfarbener, eisenhaltiger Überstand zu sehen (Abbildung 15 b), während sich auf dem Rückstand eine rostrote Oberfläche bildete.

Die Analyse der Pellets ergab, dass sich der Glühverlust gegenüber dem Glühverlust des Rückstandes mehr als verdoppelt hatte. Ein Großteil des Organikanteiles des Desferrioxamins fand sich im Pellet wieder. Angereichert wurden außerdem Fe, Ti, Ca, Mg, P.

### **Enterobactin**

Für diesen Versuch wurde ein Kolben mit 30 mg S2 (Charge 3), 1 mg Enterobactin und 10 ml Wasser gefüllt. Nach 7 Tagen Schüttelung bei Raumtemperatur wurde der Versuch abgebrochen. Die ermittelten Laugungsraten der einzelnen Elemente sind in Tabelle 15 ersichtlich.

Tabelle 15 Laugungsraten mit Enterobactin in %

Fe	Ti	Ca	Mg	Si	Al
0,04	0,01	0,07	0,06	0,01	0

Aus den Laugungsergebnissen geht hervor, dass eine Laugung mit Enterobactin zur Lösung des Fe nicht geeignet ist. Es wurden nur 0,04 % des in der Probe vorhandenen Fe gelöst.

### Natriumcitrat

15 g der Probe S2 (Charge 3) wurden mit 0,28 g Natriumcitrat und 100 ml Wasser in Doppelversuchen (a und b) jeweils 7 und 14 Tage gelaugt. Nach dem Zentrifugieren wurde Probe b 1x gewaschen.

Die im Überstand ermittelten Laugungsraten sind in Tabelle 16 dargestellt:

Tabelle 16 Laugungsraten der Probe S2 mit Natriumcitrat in %

Zeit in d	nach Waschen	Fe	Ti	Ca	Mg	Si	Al
a	7	0,19	0	62,21	9,42	0,03	0,03
b1	7	0,68	0,04	64,28	10,24	0,14	0,11
b2	7	x	0,26	0,02	1,46	0,34	0,04
b1+b2	7	0,94	0,06	65,74	10,58	0,18	0,14
a	14	0,18	0	63,25	9,42	0,04	0,04
b1	14	0,20	0	63,25	9,42	0,04	0,04
b2	14	x	0,05	0	1,52	0,17	0
b1+b2	14	0,25	0	64,77	9,59	0,04	0,04

Aus den Laugungsraten wird erkenntlich, dass eine Zeit von 7 Tagen ausreichend ist. Mit zunehmender Versuchsdauer trat kaum eine erhöhte Laugungsrate auf. Die Laugungsraten von Fe waren gering, Ca ging zu über 60 % in Lösung, Mg zu 10 %.

Die Rückstände nach der Zentrifugation zeigten einen starken ockerfarbenen Niederschlag auf der Oberfläche der Probe. Dieser Niederschlag wurde entfernt und als Pellet analysiert.

Die Analyse der Rückstände brachte folgende Ergebnisse:

Tabelle 17 Ergebnisse der Laugung der Probe S2 mit Natriumcitrat, Rückstände

Zeit in d	nach Waschen	Weißgrad %	Gelbwert %	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in %	TiO <sub>2</sub> in %	CaO in %	MgO in %
a	7	69,4	12,48	0,63	0,43	0,03	0,19
b2	7	x	69,7	0,62	0,45	0,03	0,18
a	14	68,9	12,64	0,63	0,43	0,03	0,18
b2	14	x	70,2	11,51	0,58	0,43	0,16

Der Weißgrad konnte innerhalb von 7 Tagen Laugung um bis zu 3,10 % gesteigert werden, innerhalb von 14 Tagen um 3,60 %. In dieser Zeit sanken die Gelbwerte um 2,02 bzw. 2,75%. Die Anteile an Fe, Ti, Ca, Mg in den Rückständen sanken deutlich.

Tabelle 18 Ergebnisse der Laugung der Probe S2 mit Natriumcitrat, Pellets in %

Zeit in d	nach Waschen	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	TiO <sub>2</sub>	CaO	MgO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	BaO
a	7	46,74	34,61	1,62	0,90	0,07	0,59	0,12	2,82	0,35	0,17
b2	7	x	46,93	34,48	1,67	0,85	0,61	0,12	2,84	0,31	0,15
a	14	47,21	34,69	1,40	0,81	0,06	0,50	0,11	2,59	0,34	0,18
b2	14	x	46,86	35,34	1,44	0,76	0,06	0,10	2,53	0,31	0,15

Die Analyse der Pellets zeigte, dass sich besonders Fe (2,5-fache des Fe im Rückstand), Ti (2-fache), Ca, Mg und P angereichert haben.

### 3.3.4 Vorversuche in Bioreaktoren

#### ***Eisenreduzierende Bakterien***

Das Ziel des Versuches im Arbeitspaket A 5 lag in der Reduktion des unlöslichen Eisen(III), als maßgeblicher farbgebender Bestandteil des verwendeten Kaolins (LA540 NMS) Feingut nach Magnetscheidung, siehe Tabelle A1, durch eisenreduzierende Mikroorganismen und der anschließenden Auswaschung des entstehenden Eisen(II) in die lösliche Phase. Dadurch sollte eine Erhöhung des Weißgrads und somit eine Verbesserung der Produktqualität erreicht werden. Als Organismen kamen dabei autochthone, anaerobe, heterotrophe Eisenreduzierer (*Geobacter* spez.) zum Einsatz, die in einer vorangegangenen Arbeitsphase isoliert und angereichert wurden. Im Rahmen des Versuchs wurden vier Bioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von je ca. 2 l über vier Wochen betrieben und zweimal wöchentlich beprobt. Die Bioreaktoren wurden im Vorfeld an die speziellen Bedingungen der anaeroben Kultivierung von Metallreduzierern angepasst. Sämtliche Bauteile, die mit der Kulturlösung in Kontakt kamen, bestanden aus Glas bzw. Kunststoff. Die Begasung wurde angepasst, sodass eine diskontinuierliche Anaerobisierung ohne Diffusion von Sauerstoff möglich war.

Folgende Versuchsansätze und -parameter kamen zum Einsatz:

- Ansätze:
- M1 Kaolinschlicker unbehandelt + Leitungswasser
  - M2 Kaolinschlicker autoklaviert + Leitungswasser
  - M3 Kaolinschlicker unbehandelt + Mikroorganismen
  - M4 Kaolinschlicker unbehandelt + Mikroorganismen + Nährmedium

- Parameter:
- Feststoffgehalt 15 %
  - pH 6,7 bis 7,3
  - Temperatur 25°C
  - diskontinuierliche Begasung mit N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gemisch für anaerobe Bedingungen

Die versuchsbegleitende Analytik zeigte eine kontinuierliche Abnahme des Gesamteisenanteils in der Feststofffraktion des beimpften Versuchsansatzes M4 um 0,1 % innerhalb der vier Versuchswochen. In den unbeimpften Bioreaktoren M1 und M2 blieben diese Werte konstant. Wie aus der Abbildung 16 zu entnehmen ist, bestätigt sich diese Messung nicht in einer Abnahme des Anteils an unlöslichen Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> im Feststoff. Es ist daher anzunehmen, dass oberflächliche, leicht zugängliche eisenhaltige Verschmutzungen reduziert wurden, die jedoch kaum zur Farbgebung des Kaolins beitragen. Dies bestätigt sich bei der Auswertung des Hellbezugswertes und Gelbwertes, welche über die gesamte Versuchsdauer annähernd konstant blieben. Im Reaktor M4 wurde bereits bei der ersten Probennahme ein um 1 % erhöhter Weißgrad festgestellt, der sich jedoch über die restliche Versuchsdauer nicht veränderte. Die Ursache für diese Schwankung könnte eine heterogene Verteilung innerhalb des Rohstoffs bei der Einwaage zur Herstellung der Suspensionen sein, aber auch ein Einfluss der Mikroorganismen kann nicht endgültig ausgeschlossen werden.

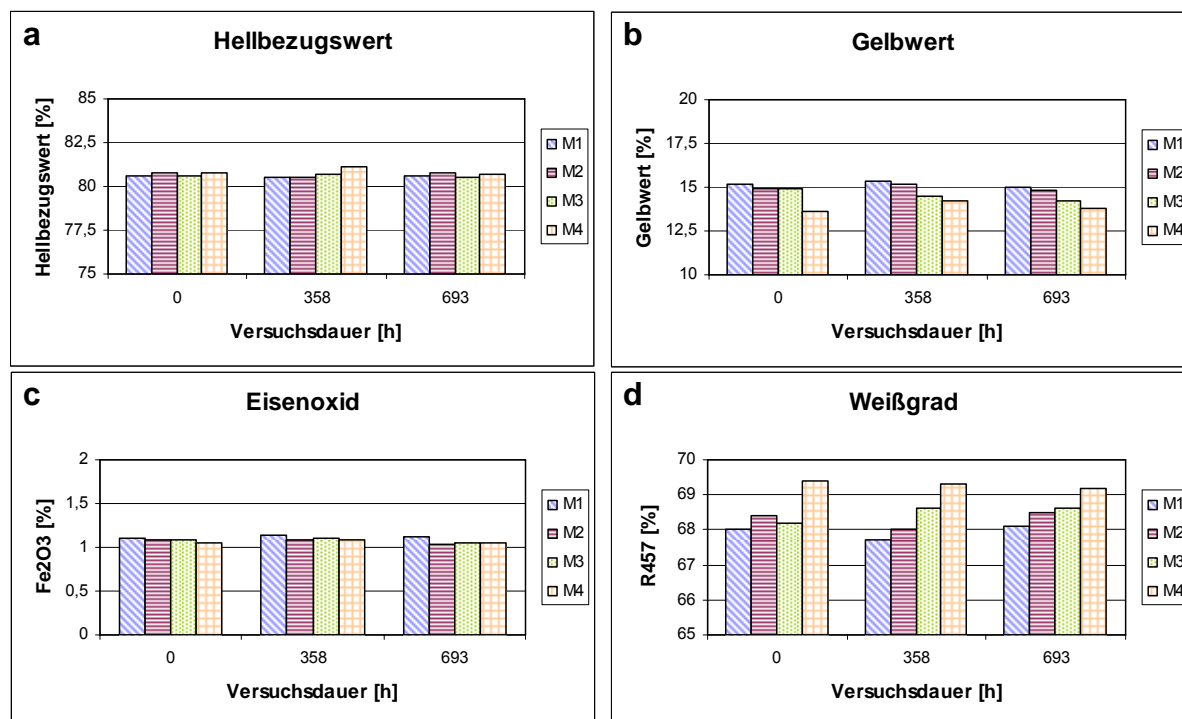


Abbildung 16 Hellbezugswerte (a), Gelbwerte (b), Anteile an unlöslichen Eisenoxid (c) und Weißgrade (R457) während des Versuchs mit *Geobacter spez.*

Im Resultat konnte keine signifikante Verbesserung der Rohstoffqualität von Kaolin durch den Einsatz autochthoner Eisenreduzierer festgestellt werden. Die ausgewählte Mischkultur von Bakterien zeigte ein normales Wachstum, die Biomasseausbeute im Bezug zur eingesetzten Kaolinmenge war jedoch sehr gering. Die festgestellten Schwankungen im Gesamteisen Gehalt sind somit wahrscheinlich auf physikalische Effekte im Zusammenhang mit dem eingesetzten Nährmedium im Bioreaktor M4 zurückzuführen. Die Schwankungen im Weißgrad lagen größtenteils innerhalb der Fehlergrenzen der Analytik und können nicht eindeutig auf die Stoffwechsellistung der Organismen zurückgeführt werden.

Die natürlichen Stoffwechselraten der autochthonen Organismen, insbesondere der anaerob lebenden, sind für eine effektive und wirtschaftliche Behandlung von Kaolin sehr gering. Die erreichbaren Effekte bezüglich Reduktion farbgebender Metalloxide und Erhöhung des Weißgrades sind zu klein, um mit wirtschaftlich vertretbarem Aufwand eine Verbesserung der Rohstoffqualität zu erreichen. Eine sichtbare Verbesserung der Produktqualität sollte für eine industrielle Umsetzung des Verfahrens bereits innerhalb weniger Tage eintreten.

Viele reduzierende Organismen besitzen ein hohes Potenzial zur Reduktion von gebundenem Eisen(III), benötigen jedoch für die Reaktion direkten Kontakt zwischen Zelloberfläche und Eisenpartikel bzw. bilden Zellauswüchse, sog. Pili, um diesen Kontakt über kurze Distanz herzustellen. Die Spezies *Geobacter* z.B. besitzt diese Eigenschaft [Reguera et al., 2005], wodurch Eisenpartikel reduziert werden können, die für den Zellkörper nicht erreichbar sind. Der Zugänglichkeit sind aufgrund der Ausmaße der Pili trotzdem Grenzen gesetzt. Insbesondere, wenn die geringe Größe und die inhomogene Oberflächenbeschaffenheit der Kaolinpartikel betrachtet werden.

### ***Shewanella putrefaciens***

Die Vorversuche mit dem Spezialisten *Shewanella putrefaciens* zeigten bereits die Eignung des Organismus als mikrobiologischer Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Verfahrens zur biotechnologischen Weißgraderhöhung von Kaolin. Es wurden mehrere Versuche

durchgeführt, bei dem sich das positive Ergebnis bestätigen und eine kontinuierliche Beprobung erfolgen sollte.

Einer der ersten Versuche im 2 l-Maßstab (Versuch MK3) diente der Reproduktion der Ergebnisse des Vorversuchs unter kontinuierlicher Beprobung. Die benötigte Biomasse wurde im 2-l-Bioreaktor kultiviert und anschließend durch Zentrifugation und mehrmaliges Waschen aufkonzentriert. Als Rohstoff wurde erneut die Kaolin-Charge B4915 verwendet und jede Probe einmal ohne zusätzliche Aufarbeitung und einmal mit Schwefelsäure versetzt analysiert.

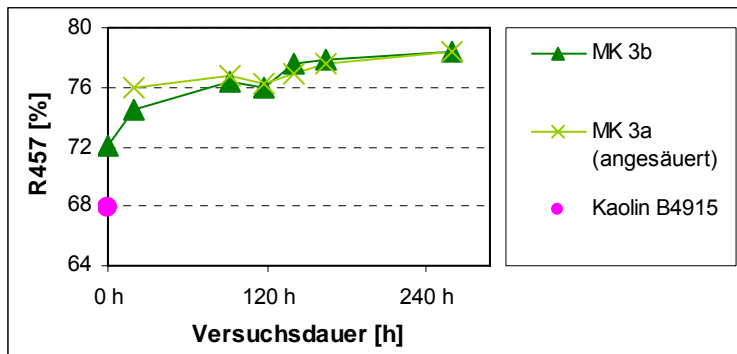


Abbildung 17 Entwicklung des Weißgrads während des Versuchs MK 3

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, konnte der Weißgrad während des elftägigen Versuchs von ca. 68 % auf über 78 % gesteigert werden. Die von Kostka et al. [1996] beschriebene schnelle und sprunghafte Reaktion von *Shewanella putrefaciens* konnte in diesem Versuch bestätigt werden. Bereits die erste Probe zeigte mit ca. 72 % einen deutlich höheren Weißgrad als das verwendete Ausgangsmaterial. Nach weniger als 20 Stunden erhöhte sich der Weißgrad des Kaolins auf 74,5 %, was einer Steigerungsrate von ca. 0,3 % pro Stunde entspricht. Der Anteil an Eisenoxid ist, ähnlich dem Weißgrad, bereits vor der ersten Beprobung sprunghaft um ca. 0,05 % abgefallen, bleibt anschließend allerdings relativ konstant. Die durchschnittliche Korngröße der Proben blieb relativ konstant, wodurch eine unbeabsichtigte Klassierung während der Beprobung ausgeschlossen werden kann.

In einem weiteren Versuch (Versuch MK 4) sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die inoculierte Biomasse für die erreichte Weißgradsteigerung verantwortlich ist. Ein Bioreaktor (Reaktor 2) wurde mit 15 % (TS) Kaolin B4915 in Reduktionsmedium befüllt und anschließend mit gewaschener Biomasse inoculiert. Ein weiterer Bioreaktor (Reaktor 1) diente als Kontrollansatz, bei dem das Inoculum durch eine 0,6 g/l NaCl-Lösung ersetzt wurde.

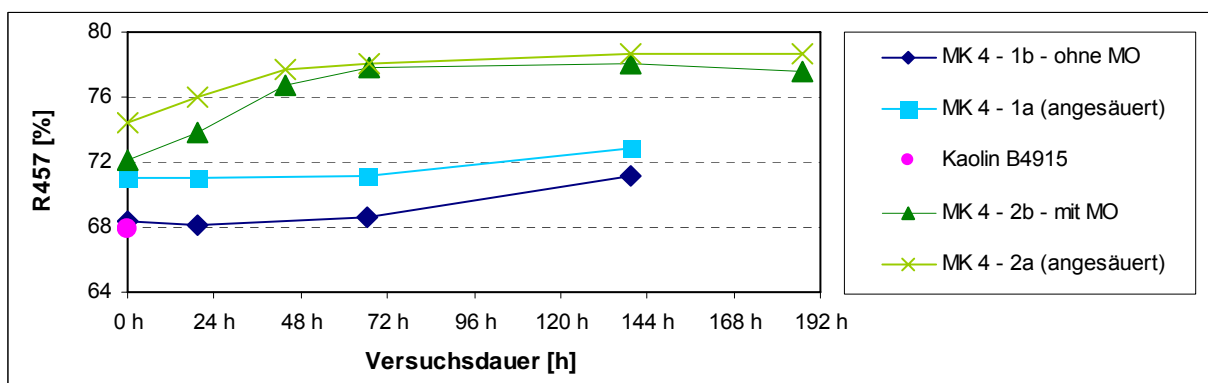


Abbildung 18 Versuch MK 4: Verlauf des Weißgrads (R457) im beimpften und unbeimpften Reaktor

Der Verlauf des Weißgrades in Abbildung 18 beweist den direkten Zusammenhang zwischen inoculierter Biomasse und der hohen Weißgradsteigerung. Sowohl der Weißgrad als auch der Eisen- und Titanoxidanteil im Kontrollreaktor 1 blieben relativ stabil, im Gegensatz zum beimpften Reaktor 2. Hier konnte der Weißgrad des eingesetzten Kaolins ohne Säurezugabe in 20 h von 68 % auf ca. 74 % erhöht werden. Nach 70 h Versuchslaufzeit stagnierte der

Weißgrad bei ca. 78 %. Der KBE-Vergleich zwischen Reaktor 1 und 2 deutet darauf hin, dass ein Großteil der anfänglich vorhandenen Mikroorganismen autochthonen Ursprungs ist und ein hoher Anteil der inoculierten Biomasse den Animpfprozess nicht überlebt. Bei einer optimierten Beimpfung müsste demnach deutlich weniger Biomasse angezchtet werden, um den gleichen Effekt zu erzielen. Zusätzlich konnte im Kontrollreaktor eine leichte Erhöhung des Weißgrads, vermutlich durch Einflussnahme der autochthonen Flora, verzeichnet werden.

Zur Überprüfung des generellen Aufhellungseffektes durch Behandlung mit *Shewanella putrefaciens* bei Kaolinen mit unterschiedlichem Weißgrad wurden weitere Versuche unter identischen Bedingungen durchgeführt. Das Kaolin B4914 mit einem Weißgrad von über 76 % unterschied sich dabei stark von dem bisherigen Standardrohstoff B4915 hinsichtlich des Weißgrads. Die Unterschiede zwischen B4915 und LA 540 waren sehr gering was den Weißgrad angeht, jedoch besaßen beide unterschiedliche chemische Zusammensetzungen. Trotzdem konnte mit den Rohstoffen B4914 und LA540 nur ein Bruchteil der Aufhellung von Kaolin B4915 erreicht werden. Im Unterschied zu der ca. 10 %igen Weißgradsteigerung im Versuch MK 3 wurde mit dem helleren Kaolin B4914 lediglich eine Steigerung um ca. 3 % erzielt. Der Rohstoff LA 540 wurde auf 70,5 % R457 aufgehellt. Trotz der geringeren Weißgradsteigerung lag das Ergebnis immer noch über der, zur weiteren Verwendung, gesetzten Schwelle von 70%. Aus prozesstechnischer Sicht bleibt festzuhalten, dass eine pauschale Aussage über den Grad der Wirksamkeit des Verfahrens nicht möglich ist und das Ergebnis für jeden individuellen Rohstoff unterschiedlich ist.

### **3.3.5 Erhöhung des Weißgrades von Kaolin durch Klassierung einer Suspension mit definierter Leitfähigkeit**

Im Vorfeld von Versuchen zur Erhöhung des Weißgrads im Rührreaktor mit Eisen reduzierenden Bakterien wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem unterschiedliche Methoden zur Probenaufbereitung getestet werden sollten. Bei der Filtration von Kaolin in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) zeigte sich überraschenderweise ein Klassierungseffekt, bei dem sich dunklere Bestandteile des Kaolins auf der Oberfläche des Filterkuchens sammelten. Nach anschließender Abtrennung der dunklen Filterkuchenschicht konnte eine Aufhellung des Kaolins von 68,2 % auf 73,1 % beobachtet werden. Dieser Effekt wurde bisher nicht beschrieben und könnte die zukünftige Analytik und Evaluierung von Versuchen zur mikrobiellen Bleichung von Kaolinen beeinflussen, weshalb man sich entschied diesen Effekt näher zu untersuchen.

Eine Versuchsreihe, bei der mehrere Möglichkeiten der Prozessführung mit VE-Wasser und Prozesswasser gegenübergestellt wurden bestätigte, dass der beobachtete Effekt auf die Art des Dispersionsmediums zurückzuführen ist. Die resultierende Klassierung nach Zentrifugation des Kaolinschlickers in VE-Wasser lieferte die besten Ergebnisse. Innerhalb von drei Waschsritten konnte das verwendete Kaolin mit einem Weißgrad von 68,2 % um 10,1 % auf 78,3 % aufgehellt werden. Deutlich war hierbei die Abhängigkeit des resultierenden Weißgrads von der Abnahme bestimmter Oxide zu sehen, besonders  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$  und  $\text{MgO}$  (siehe Abbildung 19). Diese Oxide sind somit maßgeblich an der Verfärbung des Kaolins beteiligt. Sie sammelten sich während des Prozesses in der oberen Fraktion der Pellets und konnten anschließend vom eigentlichen Rohstoff abgetrennt werden, was zu einer optischen Qualitätsverbesserung führte.

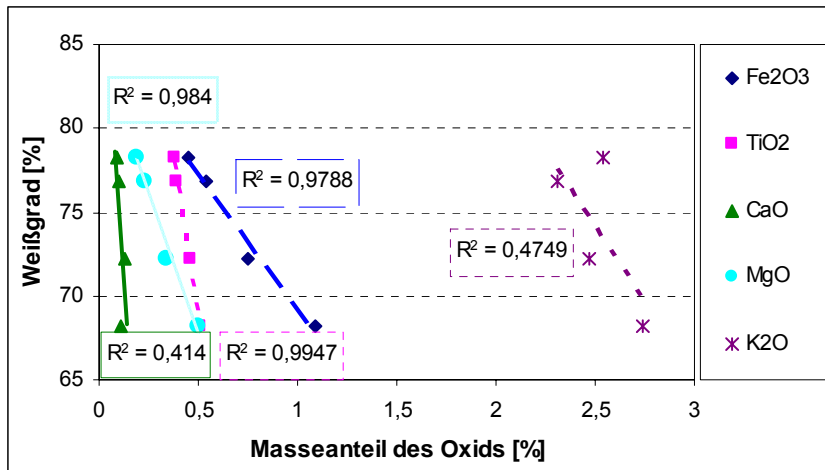


Abbildung 19 Abhängigkeit des Weißgrads der behandelten Kaoline vom prozentualen Masseanteil verschiedener Oxide

Zur Aufklärung des bei der Zentrifugation entstehenden Klassierungseffektes und zur Analyse der entstehenden Sedimentschichten wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem 600 g getrocknetes Kaolin LA 540 NMS in 1400 g VE-Wasser mit einer Leitfähigkeit von  $0,8 \mu\text{S}/\text{cm}$  dispergiert wurden. Nach Zentrifugation des resultierenden Schlickers bei  $3000 \times G$  wurde eine Klassierung des Pellets in unterschiedlich gefärbte Schichten deutlich, welche anschließend in fünf Fraktionen aufgeteilt und analysiert wurden. Die Elementaranalyse bestätigt, dass sich in den oberen Schichten, mit abnehmendem Weißgrad, ein Großteil der färbenden Metalloxide wie  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  und  $\text{TiO}_2$  akkumulieren. Bei Betrachtung der durchschnittlichen Korngrößenverteilung wird deutlich, dass durch die Klassierung ein starkes Partikelgrößengefälle entsteht. Ein Großteil der färbenden Bestandteile ist in der Fraktion mit einem Durchmesser  $< 0,2 \mu\text{m}$  gebunden. Durch die Abtrennung dieser Fraktion entsteht ein helleres Kaolin mit einem höheren durchschnittlichen Partikeldurchmesser. Dies beeinflusst auch die rheologischen Eigenschaften des Kaolins und somit die möglichen Anwendungsgebiete. Aus den Beobachtungen ging hervor, dass die gelösten Ionen im Dispergiermedium und somit die Leitfähigkeit einen erheblichen Einfluss auf die Trennbarkeit von Kaolinpartikeln und den farbgebenden Verunreinigungen im Korngrößenbereich  $< 0,2 \mu\text{m}$  haben.

Bei einer Versuchsreihe, bei der jeweils 15 g des Kaolinrohstoffs LA 540 NMS in 35 g Wasser mit unterschiedlichen Leitfähigkeiten dispergiert wurde, konnte der direkte Einfluss der Leitfähigkeit des Dispergiermediums beobachtet werden. Mit steigender Ionenkonzentration im Dispergiermedium verringert sich auch der Klassierungseffekt und somit der erreichte Grad der Aufreinigung des Kaolins. Es konnte gezeigt werden, dass eine Klassierung von Kaolinsuspensionen mit definierter Leitfähigkeit  $< 600 \mu\text{S}/\text{cm}$  zu der Trennung von eisenhaltigen Fraktionen mit niedrigem Weißgrad und Fraktionen mit höherem Weißgrad führt. Die Fraktionen mit höherem Weißgrad besitzen eine höhere durchschnittliche Korngröße als die Fraktionen mit niedrigerem Weißgrad.



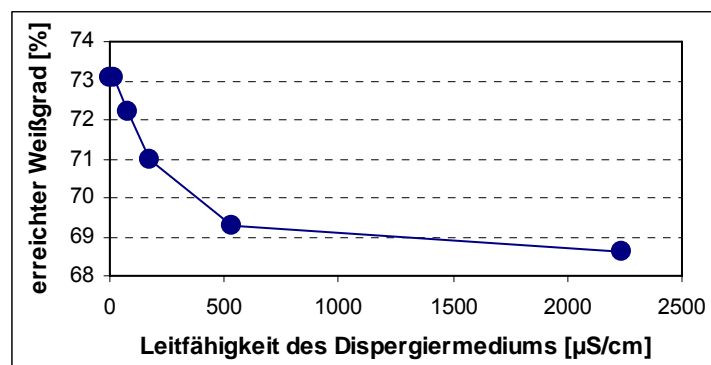


Abbildung 20 Abhängigkeit des erreichten Weißgrads (LA 540 NMS) von der Leitfähigkeit des verwendeten Dispergiermediums

Das beschriebene Verfahren wurde an vier weiteren Rohstoffen mit Weißgraden von 66 % bis 81 % getestet. Die Auswertung des Weißgrades zeigt, dass der Grad der möglichen Aufhellung von der Qualität des Rohstoffs abhängig ist. Die durch das Verfahren abtrennbaren Verschmutzungen sind nur ein Teil aller möglichen farbgebenden Komponenten innerhalb des Kaolinrohstoffs. Bei einem steigenden Weißgrad über 70 % sinkt der prozentuale Anteil dieser Verunreinigungen und somit auch die Effektivität einer Klassierung bei definierter Leitfähigkeit.

## 4 Amplifikation

Der Verfahrensansatz zur Aufhellung von Kaolin durch anaerobe Kultivierung von *Shewanella putrefaciens* in Kaolinsuspensionen zeigte in den Voruntersuchungen die besten Gesamtergebnisse und hatte nach Evaluierung durch das Projektkonsortium die besten Voraussetzungen hinsichtlich einer möglichen Implementierung in den industriellen Produktionsablauf. Das Verfahren wurde im Folgenden in einen größeren Maßstab übertragen und hinsichtlich eines industriellen Pilotversuchs optimiert.

Für eine industrielle Verwertung des Prozesses unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten ist es notwendig, die Prozessführung so simpel wie möglich zu gestalten und die verwendeten Materialien auf ein Mindestmaß zu reduzieren. Auf eine strikte Regulierung von Parametern wie Temperatur oder pH-Wert wurde deshalb von Beginn an verzichtet. In Vorbereitung auf einen Pilotversuch sollten zusätzlich der Aufwand für Versuchsmedium und Animpfprozess verringert werden. Im Rahmen der Medienoptimierung wurden Versuche durchgeführt, bei denen der Einfluss des Elektronenträgers AQDS näher untersucht werden sollte und eine Reduktion der Mineralsalzkomponenten des Reduktionsmediums angestrebt wurde. Als Ergebnis der Versuchsreihe bleibt festzuhalten, dass Anthraquinon-2,6-disulfonat (AQDS) unter den gegebenen Versuchsbedingungen, keinen sichtbaren Einfluss auf die Aufhellung von Kaolin durch *Shewanella putrefaciens* hatte und dass eine Reduktion aller weiteren eingesetzten Medienkomponenten um 50% keine sichtbare Reduktion des erzielten Aufhellungseffektes bewirkte.

Die Biomasse wurde in den vorangegangenen Versuchen im Laborbioreaktor gezüchtet und anschließend mit einer NaCl-Lösung gewaschen, bevor sie zum Start der Reaktion in den Mikrokosmos überführt wurde. Für den angestrebten Pilotmaßstab wäre diese Prozedur aufgrund der benötigten Menge an Biomasse sehr aufwendig, weshalb in einem folgenden Versuch die reine Kulturbrühe aus dem Bioreaktor, ohne weitere Aufarbeitung, als Animpfmasse verwendet werden sollte. Das Experiment wurde im 1,5 Liter Maßstab mit dem Standardreduktionsmedium durchgeführt. Als Vorkultur dienten 25 % (350 ml) einer Kulturbrühe, nach 24 Stunden Kultivierung im Laborbioreaktor. Da für den späteren Pilotversuch ein geringeres Animpfvolumen angestrebt wurde, wurde die Konzentration an Lactat im Vorkulturmedium auf 25 g/l und die Peptonkonzentration auf 15 g/l erhöht, um die

Biomasseausbeute zu steigern. Der Versuch wurde, abgesehen von der Biomassekultivierung, unter identischen Bedingungen wie MK 4 durchgeführt. Die optische Dichte der Vorkultur von MK 8 lag mit einem Wert von 16,4 deutlich unter dem Wert von MK 4 mit 23.

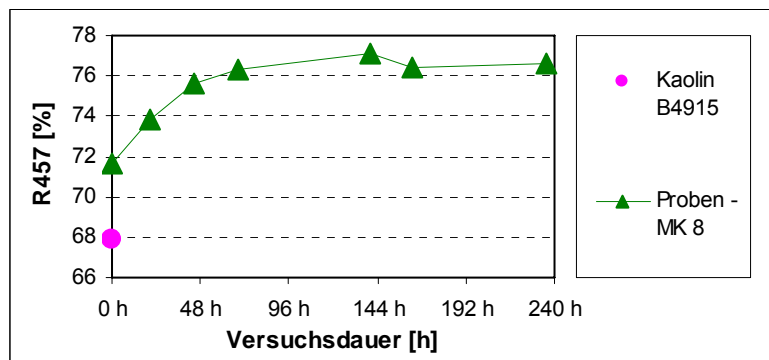


Abbildung 21 Versuch MK 8: Verlauf des Weißgrads (R457)

Im direkten Vergleich zum Versuch MK 4 wird ersichtlich, dass die Methode zur Überführung der Biomasse und die Reduktion der Biomassedichte lediglich einen geringen Einfluss auf die Aufhellung des Kaolins haben. In beiden Versuchen wurde nach ca. 3 Tagen die maximale Aufhellung erreicht. Der Weißgrad im MK 4 lag dabei um ca. 1 % höher als beim Versuch MK 8. Dieser Unterschied könnte jedoch auch andere Ursachen haben und liegt innerhalb der bisher festgestellten Messschwankungen.

## 5 Pilotphase

### Pilotversuch

Für eine Abschätzung der Maßstabsübertragung und der möglichen Übertragbarkeit in den Produktionsbereich wurde ein Pilotversuch durchgeführt, bei dem die bisher im Labormaßstab gewonnen Erkenntnisse mit deutlich größerem Reaktionsvolumen von 600 Litern erprobt werden sollten.

Bei der Konzeption der Pilotanlage stand die Praxisnähe in Vordergrund. Es sollte ein System eingesetzt werden, welches möglichst einfach aufgebaut ist, aber trotzdem das benötigte Reaktionsvolumen besitzt und die Anforderungen des Verfahrens erfüllt. Als Reaktionsgefäß kam ein modifizierter Standard-IBC-Container mit einem Miseco Disc Container-Rührwerk zum Einsatz. Die Anlage wurde so modifiziert, dass die zu rührende Suspension mit Stickstoff begast werden konnte, um eine quasi anaerobe Umgebung zu schaffen. Die Pilotanlage wurde vor Beginn des Versuchs mit Leitungswasser, Kaolin und weiteren Medienkomponenten befüllt (siehe Tabelle 19) und zur Homogenisierung 24 Stunden bei 25 rpm gerührt. Angestrebt wurden ein Feststoffanteil von 15 % und ein Arbeitsvolumen von 600 Litern. Bei einem Verhältnis von Gewicht = 1,1 \* Volumen in einer 15 %igen Kaolinsuspension ergab dies eine Einwaage von 99 kg Kaolin in 561 Litern Wasser. Um ein möglichst anaerobes Milieu zu generieren, wurde die Anlage konstant mit ca. 190 Liter/h Stickstoff begast. Da die Ergebnisse der Untersuchung zum Einfluss von AQDS (Anthraquinon-2,6-disulfonat) zum Start des Pilotversuchs noch nicht vollständig vorlagen, wurde die bisherige Standardkonzentration eingesetzt.

Tabelle 19 Im Pilotversuch mit *Shewanella putrefaciens* eingesetztes Reduktionsmedium

Komponente	Endkonzentration	Menge
Wasser		465 Liter
Kaolin B 51061	15 % TS	99 Kg
Mg-L-Lactate xH <sub>2</sub> O	1,28 g/l	718,1 g
KCl	0,21 g/l	117,81 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/l	561,00 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,53 g/l	297,33 g
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0,09 g/l	50,49 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,12 g/l	67,32 g
AQDS	0,021 g/l	11,78 g

Zum Start des Pilotversuchs wurden ca. 100 Liter (entspricht einem Inoculum von ca. 17 %) der Biomasselösung (10,1 g/l) aus einem 100 Liter-Bioreaktor (ISF 300, Fa. Infors) in die Pilotanlage überführt. Die Zugabe des Inoculums erfolgte in vier Stufen von jeweils 25 Litern im Abstand von ca. 45 Minuten. Die Begasung wurde anschließend auf 60 Liter/h Stickstoff reduziert und über den gesamten Versuch aufrecht gehalten. Lediglich zur Probennahme wurde die Begasungsrate kurzzeitig erhöht, um ein Einströmen von Luft-Sauerstoff zu verhindern. Die Temperatur im Versuchsansatz wurde nicht reguliert, aber täglich gemessen. Eine Abweichung von der Umgebungstemperatur konnte nicht festgestellt werden. Die Versuchstemperatur lag somit konstant bei 19,6 °C (+/- 0,3). Der pH-Wert der Kaolinsuspension lag zum Versuchsstart im neutralen Bereich, bei pH 7,4.

Die Standardbeprobung wurde in Anlehnung an die Vorversuche durchgeführt. Der Zeitpunkt  $t_0$  entsprach dem Versuchsstart, ca. 30 Minuten vor Zugabe der ersten Inoculum-Stufe. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach dem Schema in Abbildung 22. Zusätzlich wurden, zu vorher festgelegten Zeitpunkten, mehrere Proben speziell für mineralogische Untersuchungen aufgearbeitet. Zu jedem Beprobungszeitpunkt wurde dem Reaktor ca. 1,5 Liter der Suspension entnommen. Davon wurde ein Liter direkt bei -20 °C als Rückstellprobe eingefroren. Die restliche Probenmenge wurde aufgeteilt in die Proben A, B und C. Die Proben A und C wurden durch Titration mit 20 %iger Schwefelsäure angesäuert, wobei sich der Sollwert von pH 2,5 für Probe A aus den Vorversuchen ergab, um eine entsprechende Vergleichbarkeit zu realisieren. Der Sollwert für Probe C, pH 3,5, wurde nach Absprache mit dem Praxispartner festgelegt. Dieser Wert wird nach gängiger industrieller Praxis bei der Aufarbeitung von Kaolinschlickern erreicht. Der Probenteil B und die Proben für mineralogische Untersuchungen wurden ohne Absenkung des pH-Wertes aufgearbeitet.

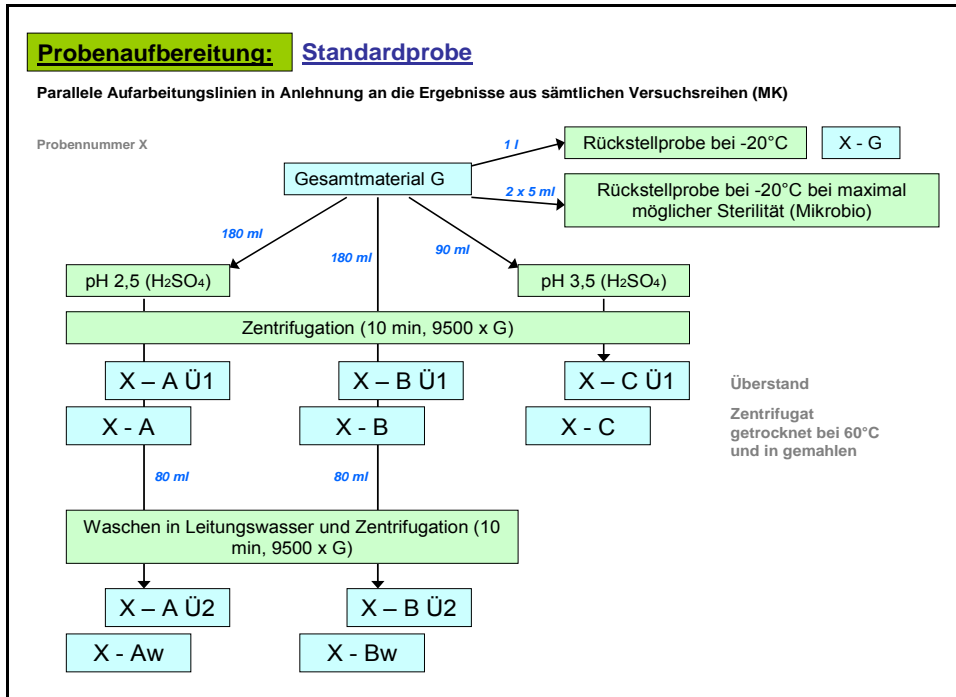


Abbildung 22 Schema zur Aufarbeitung einer Standardprobe des Pilotversuchs mit *Shewanella putrefaciens*

Der Weißgrad R457 des eingesetzten Kaolins B51061 (R457 66,6 %) erreichte im Pilotversuch nach 15 Tagen einen durchschnittlichen Wert von 70,8 % (Mittelwert R457 der Standardproben A, B, C, Aw und Bw). Dies entspricht einer Aufhellung um 4,2 %. Somit wurde das Ziel, den Weißgrad über einen Wert von 70 % zu steigern, erreicht. Der absolute Weißgradanstieg liegt damit unter den Ergebnissen, welche mit dem Rohstoff B4915 erreicht wurden. Die Vorversuche zeigten jedoch, dass eine pauschale Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Rohstoffen nicht möglich ist. In Abbildung 23 sind die Weißgrade sämtlicher Proben des Pilotversuchs grafisch dargestellt.

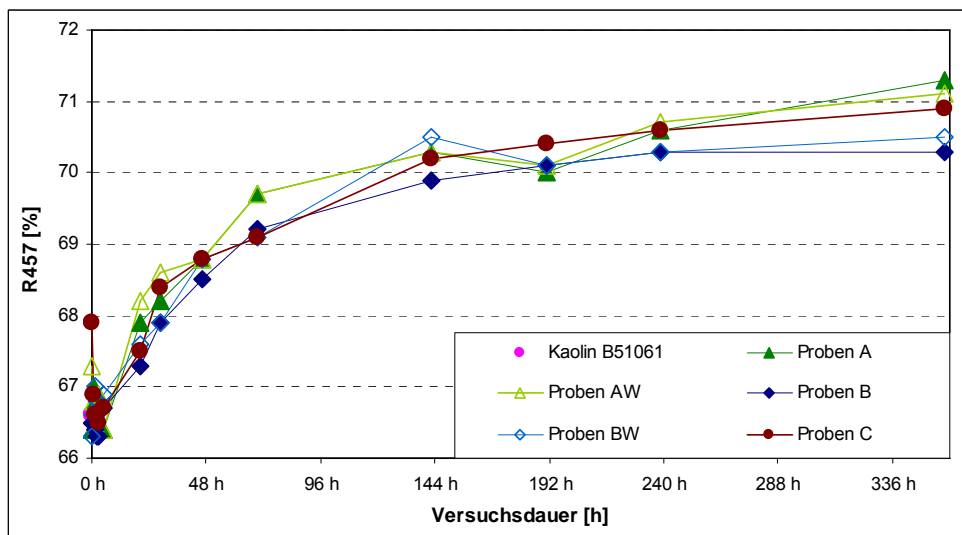


Abbildung 23 Verlauf der Weißgrade (R457) der verschiedenen Proben während des Pilotversuchs zur Aufhellung von Kaolin mit *Shewanella putrefaciens*

Die Messwerte der angesäuerten Proben A liegen durchschnittlich 0,3 % über denen der nicht angesäuerten Probe B. Die Weißgrad-Differenz zwischen den Proben A - C, zwischen A - Aw und B - Bw ist vernachlässigbar und liegt innerhalb der Messtoleranz. Die Werte

zeigen, dass sowohl ein zusätzliches Waschen des Kaolins, als auch ein weiteres Absenken des pH-Werts der Suspension unter pH 3,5 nicht in einer nennenswerten Steigerung des Weißgrads resultiert. Ein generelles Absenken des pH-Werts als einleitender Aufarbeitungsschritt erwies sich jedoch als sinnvoll, da gerade zum Ende des Versuchs die Weißgraddifferenz zwischen den Proben C und den Proben B leicht ansteigt.

Die durchschnittliche Aufhellungsrate beträgt 0,28 % pro Tag über die gesamte Versuchslaufzeit. Bei Vernachlässigung der starken Messwertstreuung zu Beginn des Versuchs wurde die maximale Aufhellungsrate nach 28,5 h mit 1,34 % R457 pro Tag bei einem erreichten Weißgrad von 68,2 % ermittelt. Danach sinkt die Geschwindigkeit, mit der der Weißgrad des Kaolins zunimmt und somit die Aufhellungsrate, stetig. Möglicherweise verliert die Biomasse an Aktivität, was vielfältige Ursachen haben kann, oder es werden zunehmend Reaktionsendprodukte akkumuliert, welche in steigender Konzentration hemmend auf den Prozess wirken. Die Kolonie bildenden Einheiten blieben über die gesamte Versuchslaufzeit relativ konstant mit einer leicht ansteigenden Tendenz. Dies spricht weder für einen Aktivitätsverlust noch für ein Absterben der Organismen. Die Lactat-Konzentration im Versuchansatz war nach ca. 6 Tagen verbraucht. Die Stagnation der Weißgradsteigerung aufgrund einer zu geringen Substratkonzentration erscheint nach Auswertung der gesamten Vorversuche unwahrscheinlich. Für eine Akkumulation von Reaktionsendprodukten spricht hingegen die steigende Pufferkapazität der Suspension. Die während der Aufarbeitung benötigte Menge an Schwefelsäure, um den pH-Sollwert der Probenfraktionen A und C zu erreichen, stieg im Laufe des Versuches drastisch an. Für die Proben nach 15 Tagen wurde die 4fache Menge Schwefelsäure als zum Zeitpunkt t0 eingesetzt. Letztendlich ist jedoch nicht garantiert, dass die Bildung von Stoffwechselendprodukten auch eine inhibierende Wirkung entfaltet.

Die maßgeblich für die Färbung von Kaolin verantwortlichen Anteile an Titanoxid blieben bei allen analysierten Proben konstant. Der prozentuale Anteil an Eisenoxid nahm hingegen mit zunehmenden Weißgrad bei den Proben A und C ab (siehe Abbildung 24). Die Eisenoxidkonzentration in der nicht angesäuerten Probe B fällt ebenfalls bis zum sechsten Versuchstag ab, steigt danach aber wieder leicht an. Diese Beobachtung spiegelt sich nicht in der Weißgradanalytik wider, welche nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen vermuten lässt.

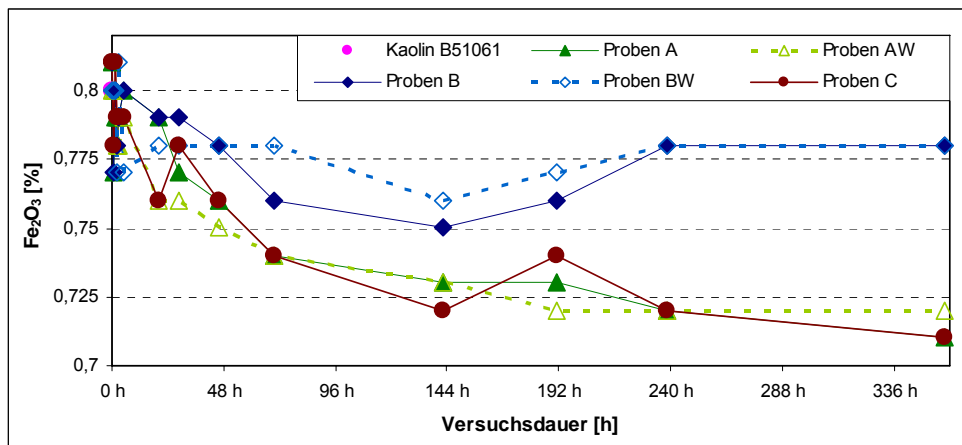


Abbildung 24 Eisenoxidgehalte der Standardproben während des Pilotversuchs zur Aufhellung von Kaolin mit *Shewanella putrefaciens*

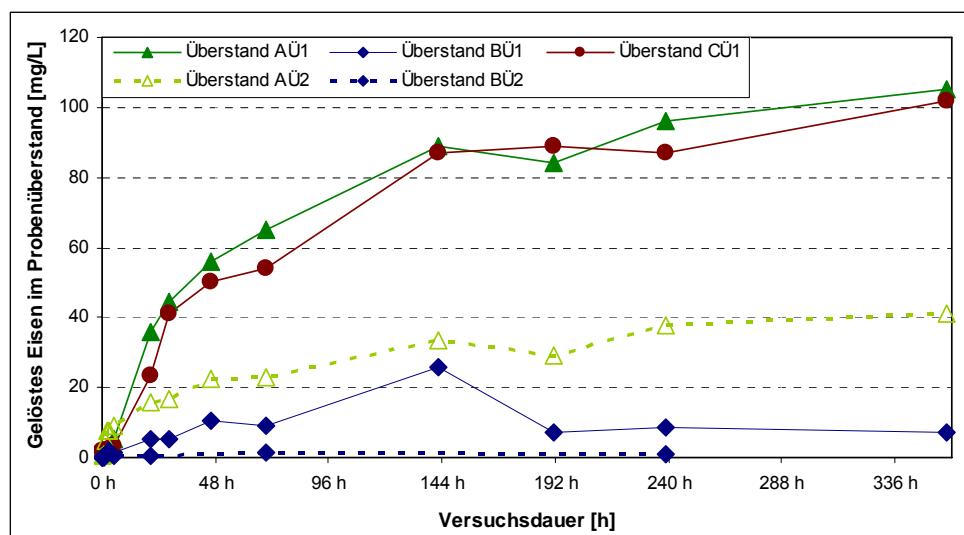


Abbildung 25 Gelöstes Eisen im Überstand nach Zentrifugation der Standardproben während des Pilotversuchs zur Aufhellung von Kaolin mit *Shewanella putrefaciens*

Die Konzentration an gelöstem Eisen in den Überständen impliziert weitere Fragestellungen. Oberflächlich betrachtet korrelieren die Werte aus Abbildung 24 mit den Eisenoxidgehalten der entsprechenden Probenfraktionen. Die Werte der Probenfraktion B sind dabei deutlich geringer als die Eisenoxidanteile im Kaolin vermuten lassen, was mit dem neutralen pH-Wert und der schlechteren Löslichkeit des Eisens zu erklären ist. Laut Versuchsansatz wurden in einem Liter Wasser 176 g Kaolin suspendiert. Nach 240 h Versuchslaufzeit wurden im Überstand der Probe B eine Eisenkonzentration von 8,8 mg/l bestimmt, welche sich im Anschluss nur noch minimal änderte. Dies entspricht der Menge von 12,6 mg  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  in 176 g suspendiertem Kaolin, also einem Anteil von 0,0072 %. Nach chemischer Analyse wurden zu diesem Zeitpunkt aber 0,03 %  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  aus dem Kaolin herausgelöst. Es fehlen laut Analytik ca. 0,023 % des Eisenoxids, welches augenscheinlich bei der Aufarbeitung der Proben als unlösliches kolloidales Eisen, zu sehen als rötlicher Niederschlag im Zentrifugationsüberstand, abgetrennt wurde. Anders verhält es sich bei den angesäuerten Probenfraktionen A und C. Nach 240 h Versuchslaufzeit wurde 96 mg/l Eisen im Überstand der Probe A detektiert. Dies würde einem Masseanteil von 0,078 %  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  des suspendierten Kaolins entsprechen. Laut Analyse wurden 0,09 %  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  aus dem Kaolin herausgelöst. Das zeigt, dass annähernd das komplette aus dem Kaolin heraus gelöste Eisen nach Ansäuerung der Suspension in löslicher Form vorlag.

### Nachweis von *Shewanella putrefaciens*

Im Zuge des Pilotversuchs wurde die molekularbiologische Nachweismethode mittels realtime-PCR weiter adaptiert, so dass sich der eingesetzte Organismus *Shewanella putrefaciens* neben anderen Eubakterien in Proben aus dem Pilotversuch nachweisen lässt. Damit sollten die sich unter den Versuchsbedingungen entwickelnde, spezifische Population weiter charakterisiert werden. Extrahierte und aufgereinigte DNA aus Proben des Pilotversuchs wurden mit dem Primerpaar (27f; 517r) für Eubakterien und dem spezifischen Primerpaar für *Shewanella putrefaciens* in einer realtime-PCR amplifiziert. Mit dem Primerpaar (SP1-f: GAGCGGCAGCACAAGGGAGTTTAC; SP1-r: GCGGCTGCTGGCACGGAGTTA) für *Shewanella putrefaciens* wird während der realtime-PCR ein 465 Basenpaare langes Fragment der 16S-rDNA amplifiziert, wobei die Temperatur der Primerextension bei 63 °C lag (weitere Angaben zur Durchführung der realtime-PCR sind unter 3.2.2 im Teilbericht Verbesserung der Plastizität zu finden).

Da dieser spezifische Nachweis des Testorganismus während des Pilotversuchs erstmals an realen Proben durchgeführt wurde, konnten die aus der realtime-PCR gewonnenen Daten

nur teilweise erfasst werden. So konnte von allen Probenzeitpunkten bakterielle DNA gewonnen werden. Die zu Beginn im Abstand von 45 min zugegebene *Shewanella*-Kultur (je 25 L) ließ sich anhand der Zunahme des DNA-Gehaltes aufzeigen (s. Abbildung 27), ebenso der stetige Rückgang des DNA-Gehaltes über den Zeitraum der Versuchsdauer. Der drastische Anstieg am Anfang spiegelte sich jedoch nicht in einer entsprechenden Verringerung des Ct-Wertes wider. Hierzu wären weitere Versuchsansätze mit geringeren DNA-Gehalten im PCR-Ansatz nötig gewesen, die im Rahmen der Arbeiten und auch aufgrund der Probenlagerung nicht mehr wiederholt werden konnten. Von einem wesentlichen Zeitraum des Pilotversuchs (46 h; 69 h; 142 h und 191 h) konnten keine Ct-Werte mittels realtime-PCR detektiert werden, so dass keine quantitativen Aussagen zum Testorganismus möglich waren.

Dennoch ist mit dieser Methode ein Nachweis von spezifischen Mikroorganismen in tonhaltigen Schlickern mit einer Extraktion und Weiterverarbeitung der bakteriellen DNA möglich und auch auf andere Systeme übertragbar.

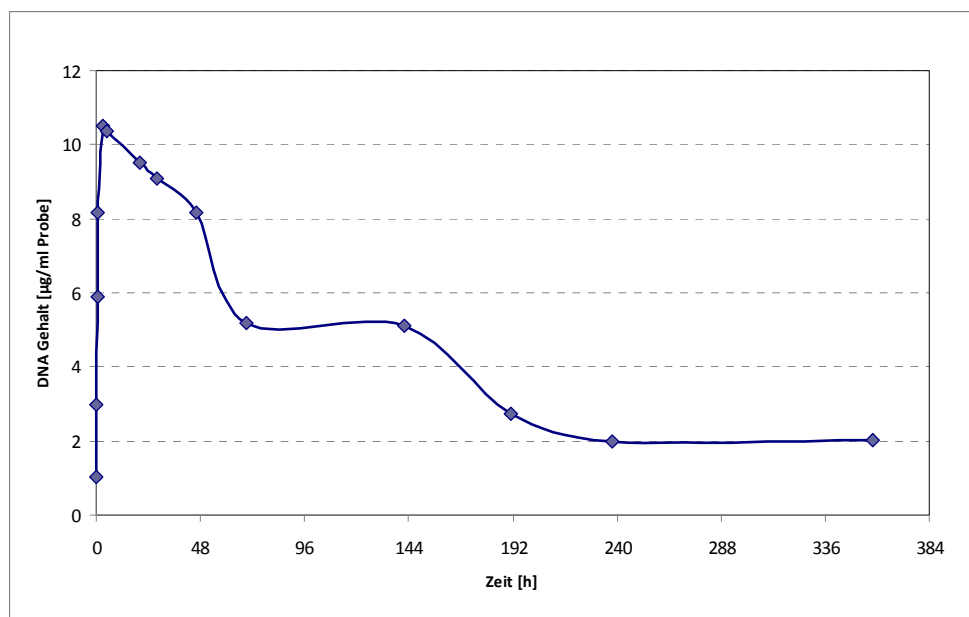


Abbildung 26 DNA-Gehalte zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten des Pilotversuchs [µg/mL]

### **Mineralogische Untersuchungen**

Die mineralogischen Untersuchungen wurden an der Kaolinprobe B51061 zu vier verschiedenen Probenahmezeitpunkten durchgeführt. Die Proben der zeitlich aufgelösten Betrachtung erhielten folgende Bezeichnungen:

- AKW\_P0: Kaolinprobe vor der mikrobiellen Behandlung
- AKW\_P4: Kaolinprobe nach einer Behandlungszeit von 2 h
- AKW\_P6: Kaolinprobe nach einer Behandlungszeit von 24 h
- AKW\_P9: Kaolinprobe nach einer Behandlungszeit von 72 h

Das jeweilige Gesamtmaterial wurde anschließend korngößenfraktioniert und das Gesamtmaterial als auch die einzelnen Kornfraktionen wurden den in Kapitel 2.5 beschriebenen Untersuchungsmethoden unterzogen.

Das Gesamtmaterial aller Proben enthielt Kaolinit, Illit, Muskovit, K-Feldspat, Quarz, Ti-Oxide und Goethit (Tabelle 20). Im Vergleich zu den in Kapitel 2.5 charakterisierten Kaolinen, enthielt die Kaolinprobe B51061 keine quellfähigen Anteile. Wie in Tabelle 20 gezeigt, wurde keine Veränderung des mineralogischen Phasenbestandes während der mikrobiellen Behandlung beobachtet.



Tabelle 20 Quantitativer Phasenbestand des Kaolins B51061 zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten mit *Shewanella putrefaciens*

	AKW_P0	AKW_P4	AKW_P6	AKW_P9
	[%]	[%]	[%]	[%]
Kaolinit	75	76	75	74
Illit	11	10	10	11
K-Feldspat	10	10	11	10
Quarz	4	4	4	5
Ti-Oxide	<1	<1	<1	<1
Goethit	<1	<1	<1	<1

Die Fe-Speziesverteilung wurde mittels Mößbauer-Spektroskopie bestimmt. Das oxidisch-gebundene Fe wurde für alle Proben als Goethit identifiziert. Die absolute Fe-Verteilung wurde ermittelt, indem die relative Fe-Verteilung auf den Gesamteisengehalt aus den XRF-Messungen bezogen wurde (Tabelle A 8). Die Fe-Verteilungscharakteristika wurden durch das Verhältnis aus silikatisch-gebundenem zu oxidisch-gebundenem Fe (Goethit) ausgedrückt. Für alle Proben wurde ein Verteilungsverhältnis >1 erhalten, d.h., dass das Fe vorwiegend silikatisch-gebunden vorliegt. Allerdings ergaben sich Unterschiede in den Fe-Verteilungscharakteristika für die zeitlich aufgelöste Betrachtung der Proben und ihrer jeweiligen Fraktionen.

Zur vereinfachten Erkennbarkeit des Einflusses der mikrobiellen Behandlung auf die Fe-Speziesverteilung wurden die jeweiligen Verteilungsverhältnisse einer jeden Probe in Relation gesetzt und als sequenzielle relative Fe-Verarmung  $\Psi$  ausgedrückt (Abbildung 5.1). Sequenziell bedeutet, dass das Fe-Verteilungsverhältnis auf den jeweilig zeitlichen Vorgänger bezogen wurde.

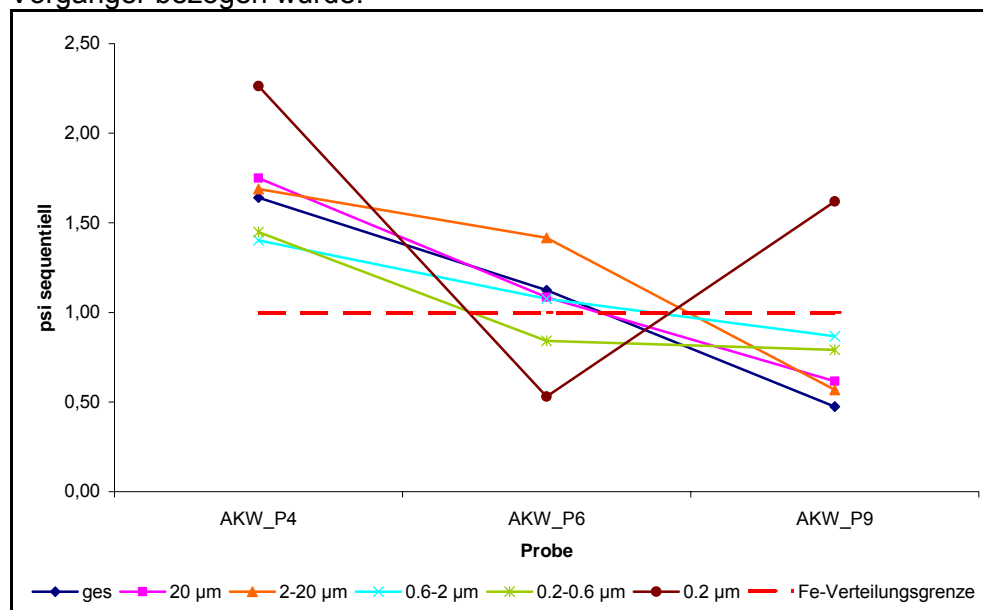


Abbildung 27 Sequenzielle relative Fe-Verarmung  $\Psi$  der Kaolinprobe B51061 und des korngößenfraktionierten Materials hervorgerufen durch die Behandlung mit *Shewanella putrefaciens*. Fe-Verarmung  $\Psi$ : Ort des Fe-Verarmung in Hinblick auf silikatisch- ( $\Psi > 1$ ) oder oxidisch-gebundenes ( $\Psi < 1$ ) Fe.

Abbildung 27 zeigt, dass die Fe-Verarmung für Probe AKW\_P4 in Bezug auf die Ausgangsprobe AKW\_P0 über die Abnahme des silikatisch-gebundenen Fe erfolgte, sowohl für das Gesamtmaterial als auch für alle Fraktionen ( $\Psi > 1$ ). Eine stärkere Abnahme des silikatisch-gebundenen Fe gegenüber des oxidisch-gebundenen Fe wurde auch für das Gesamtmaterial und die Fraktionen > 0.6 µm des nächsten Beprobungszeitpunktes (AKW\_P6) beobachtet. Die Tonfraktionen < 0.6 µm zeigten hingegen eine stärkere Fe-



Verarmung in Bezug auf Goethit ( $\Psi < 1$ ). Mit Ausnahme der kleinsten Tonfraktion ( $< 0.2 \mu\text{m}$ ) erfolgte die Fe-Abnahme für den Endzeitpunkt (AKW\_P9) vorwiegend über das oxidisch-gebundene Fe ( $\Psi < 1$ ).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die mikrobiell-induzierte Fe-Abnahme zunächst über eine Verarmung des silikatisch-gebundenen Fe erfolgte und nach einer Behandlungszeiten  $> 24 \text{ h}$  eine Reduzierung des oxidisch-gebundenen Fe stattfand. Wird die in Kapitel 2.5 gemachte Beobachtung einer weißgradsteigernden Wirkung durch die Abnahme des oxidisch-gebundenen Fe-Anteils zugrunde gelegt, sind Behandlungszeiten  $> 24 \text{ h}$  nötig, um eine Erhöhung des Weißgrades zu erzielen.

## 6 Zusammenfassung

Um das Ziel des Projektes, nachhaltige und kostengünstige Aufbereitungstechnologien für tonmineralische Rohstoffe durch gezielte Nutzung und Steuerung mikrobiologischer Reaktionen zu erreichen, wurden umfangreiche chemische und mikrobiologische Versuche im Labormaßstab, in Vorversuchen im Rührreaktor und schließlich im Pilotmaßstab durchgeführt. Parallel dazu erfolgte die Analyse der Tonmikroflora, die Selektion und Anreicherung der autochthonen metallsolubilisierenden Mikroorganismen, die Auswahl geeigneter spezieller Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte, sowie eine umfassende Untersuchung der mineralogischen Eigenschaften der Proben vor und nach der mikrobiellen Behandlung.

Der Großteil der Untersuchungen befasste sich mit dem durch Nassklassierung abgetrennten Kaolinanteil (S2), da dieser in Suspensionen vorliegt. Hier ist die Anbindung an mikrobiologische Prozesse technisch am günstigsten. Auch aufgrund des geringen Kaolinanteils von maximal 20 % in der Roherde ist es sinnvoll, erst nach der Abtrennung von Feldspat und Quarz mit alternativen Laugungsverfahren anzusetzen. Als Musterrohstoff wurden Partien mit sehr hohen Eisengehalten und damit korrelierenden niedrigen Weißgraden ausgewählt. Diese repräsentieren einen nicht unerheblichen Anteil von bis zu 10 % der gesamten Rohstoffmenge. Eine Senkung des Eisengehaltes würde für die Produzenten von Papier- und Keramikkaolin erhebliche Vorteile bringen.

Die Ergebnisse der chemischen Bleiche des aufbereiteten Kaolins S2 zeigen, dass mit einer hohen Dosierung von Bleichmittel (0,5 % Natriumdithionit) der Weißgrad um 4 % auf 72 % erhöht werden kann. Laugungen mit verschiedenen anorganischen Säuren und Oxalsäure führen dazu, dass deutliche Erhöhungen des Weißgrades nur bei pH-Werten von 1,5 oder noch niedriger, erreicht werden können. So konnte der Weißgrad mit Oxalsäure um 10,1 % auf 76,7 %, mit Phosphorsäure um 5,8 % innerhalb von 7 Tagen gesteigert werden. Verschiedene Bleichverfahren, zusätzliche Verfahrensschritte, wie das Aufmahlen oder die Verwendung stärkerer Säuren, wie 6 M Salzsäure mit 2-stündigem Kochen oder 0,5 M Oxalsäure führen zu Weißgraden, die über 80 % liegen können.

Aus der bakteriellen Vielfalt der in den Rohstoffen vorhandenen Mikroorganismen konnten eisenreduzierende Mikroorganismen isoliert und kultiviert werden, die zu mikrobiologischen Laugungszwecken eingesetzt wurden. Es stellte sich heraus, dass autochthone heterotrophe eisenreduzierende Bakterien für die Laugung von Eisen geeignet sind. Innerhalb von 14 Tagen konnte aus Kaolinschlickern mit einem Weißgrad von 68 % ein Weißgrad von 71 % erreicht werden. Vorversuche mit diesen Bakterien in Bioreaktoren führten nur zu einer geringfügigen Erhöhung des Weißgrades von 1 %. Da die mikrobiellen Laugungsergebnisse in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht befriedigen konnten, wurden andere Mikroorganismen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) und verschiedene kommerziell erhältliche organische und anorganische Komplexbildner getestet.

Mit *Geobacter metallireducens* DSM 7210 konnte die Laugungsrate von Eisen gegenüber der Laugung mit autochthonen eisenreduzierenden Bakterien mehr als verdoppelt werden, die Weißgradsteigerung betrug aber nur 0,7 %.

Eine Erhöhung der Laugungsrate von Eisen versprach der Einsatz der silikatsolubilisierenden Bakterien *Bacillus pumilus* DSM 27 und *Bacillus licheniformis* DSM 13. Der Weißgrad konnte innerhalb von 14 Tagen maximal um 2,2 %, mit Zusatz des Komplexbildners NTA um 3,3 % erhöht werden. Dabei wurden bis zu 0,79 % des in der Probe vorhandenen Eisens gelöst. Für die Laugung der Roherdeprobe LA 540 eigneten sich silikatsolubilisierende Bakterien besser. *Bacillus licheniformis* laugte bis zu 3,12 % des Eisens, mit Zusatz von Komplexbildnern bis zu 4 %.

Die organische Säuren produzierende Hefe *Debaromyces hansenii* DSM 70238 erhöhte den Weißgrad auf über 70 % bei einem pH-Wert von 4,5. Bei diesem pH-Wert kann chemisch mit Oxalsäure noch kein Eisen gelaugt werden.

Untersucht wurde weiterhin der Zusatz von biochemisch herstellbaren Komplexbildnern EDTA, NTA, Citrat, Desferrioxamin E, Bio-Derosta<sup>®</sup>-3-L und Enterobactin. EDTA und NTA können durch das Komplexbilden und damit das in Lösung Halten von Eisen das Entfernen des Eisens erleichtern und damit z.T. für bessere Laugungsergebnisse sorgen. Der Weißgrad konnte mit Bio-Derosta<sup>®</sup>-3-L um 4,3 % erhöht werden. Mit Desferrioxamin E war eine Abnahme des Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Anteiles, aber keine Erhöhung des Weißgrades zu verzeichnen. Mit Enterobactin wurde nur sehr wenig Eisen gelöst. Auf einen Weißgrad von über 70 % führte die Laugung mit Natriumcitrat.

Ein weiterer spezieller Mikroorganismus, *Shewanella putrefaciens*, wurde in Vorversuchen auf seine Eignung zur Laugung von Eisen getestet. Im Schüttelkolben konnte der Weißgrad um 2 % angehoben werden. Bei Verwendung unterschiedlicher Kaolinchargen wurden im 2 l -Bioreaktor für jeden Rohstoff andere Ergebnisse erzielt. LA 540 konnte auf 70,5 % (+ 3,9 %) aufgehellt werden, B4915, der einen ähnlichen Weißgrad aber eine andere chemische Zusammensetzung besaß, ließ eine Weißgraderhöhung um ca. 10 % auf 78 % zu. Es war ein sprunghafter Anstieg in den ersten Tagen zu verzeichnen. Dagegen war mit dem Kaolin B4914, der schon einen ursprünglichen Weißgrad von 76,5 % aufwies, nur noch ein Anstieg um 3 % zu beobachten. Die Amplifikation der Versuche mit B4915 mit einer geringeren Animpfdichte zeigte ähnliche Ergebnisse.

Um die Ergebnisse in den Produktionsbetrieb überführen zu können, wurde ein Pilotversuch im 600 l – Maßstab mit der Probe B51061 durchgeführt. Der Weißgrad dieser Probe stieg innerhalb von 15 Tagen um 4,2 % auf 70,8 % bei neutralem pH-Wert an.

Bei Untersuchungen unterschiedlicher Methoden zur Probenaufbereitung wurde bei der Filtration von Kaolin (LA 540NMS) in vollentsalztem Wasser ein Klassierungseffekt beobachtet. Dunklere Bestandteile des Kaolins lagerten sich auf der Oberfläche des Filterkuchens ab. Die Entfernung dieser Schicht bewirkte eine Aufhellung des Kaolins um 4,9% auf 73,1 %. Nähere Untersuchungen dieses Effektes führten zu der Erkenntnis, dass dieser von der Art des Dispersionsmediums abhängig ist. Überzeugende Ergebnisse lieferte die Klassierung nach der Zentrifugation des Kaolinschlickers in vollentsalztem Wasser. Nach drei Waschschrritten wird eine Erhöhung des Weißgrades um 10,1 % auf 78,3 % registriert. In weiteren Versuchen wurde der direkte Einfluss der Leitfähigkeit des Dispergiermediums deutlich. Der Klassierungseffekt verringert sich mit steigender Ionenkonzentration. Außerdem wird durch die Klassierung die Korngrößenverteilung stark beeinflusst. Der Hauptanteil der färbenden Bestandteile findet sich in der Fraktion mit einem Teilchendurchmesser <0,2 µm. Mit der Entfernung dieser Fraktion entsteht ein Kaolin, das einen höheren Weißgrad aber auch einen höheren durchschnittlichen Partikeldurchmesser besitzt. Damit werden die rheologischen Eigenschaften des Kaolins, evtl. auch die Anwendungsmöglichkeiten des entstehenden Produktes beeinflusst

Mineralogische Untersuchungen zeigen, dass das Eisen in allen Proben oxidisch in Form von Goethit und silikatisch gebunden vorliegt. Es überwiegt der silikatisch gebundene Anteil. Es stellte sich heraus, dass die Erhöhung des Weißgrades nicht nur vom Eisengehalt, sondern hauptsächlich vom Ort der Eisenverarmung abhängt. Die Reduzierung des Goethits führt allgemein zur Erhöhung des Weißgrades der Kaoline, aber die Reduktion des im Smectit gebundenen Eisens beeinflusst diesen negativ, während die Reduktion des im Illit gebundenen Eisens diesen positiv beeinflusst. Die Reduktion und Lösung des oxidisch gebundenen Eisens, sowie die Auswaschung der gelösten Eisenverbindungen aus dem Medium bewirkt eine stärkere Weißgraderhöhung als die Reduktion des silikatisch

gebundenen Eisens. Letzteres verbleibt nach der Reduktion vermutlich überwiegend in der Struktur. Die mikrobielle Entfernung des silikatisch gebundenen Eisens findet in der Struktur der 2:1-Schichtsilikate statt. Die durchgeführten Versuche beweisen, dass die Weißgraderhöhung in der Probe mit dem höchsten Anteil oxidisch gebundenen Eisens (B4915) am deutlichsten ausfällt. Es wird festgestellt, dass die Korrelation von Weißgrad und  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  immer im Zusammenhang mit der Verteilung des Eisens, dem Verhältnis des oxidisch-zum silikatisch gebundenen Eisens und vom Verhältnis Fe(II) zu Fe(III) zu betrachten ist. Chemische Laugungen, oft unter extremen, für die Produktion wenig geeigneten Bedingungen, vor allem bei sehr niedrigen pH-Werten, können zu einer erheblichen Steigerung des Weißgrades führen. Da das gelöste Eisen dabei oft die maximal lösliche Konzentration des residual gebundenen Eisens übersteigt, müssen auch Anteile des in den kristallinen Eisenoxiden okkludierten Eisens gelöst werden. Inwieweit sich diese Zerstörung auf die Eigenschaften der Kaoline auswirkt, ist noch nicht geklärt. Mikrobiologisch induzierte Laugungen haben den Vorteil, dass sie überwiegend im neutralen pH-Wert-Bereich oder moderat sauren stattfinden, bei denen eine chemische Laugung zur Weißgradsteigerung nicht möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mikroorganismengruppen in der Lage sind, den Weißgrad der hauptsächlich untersuchten Probe des aufbereiteten Kaolins S2 aus LA 540 um 3 bis 4 % zu erhöhen. Mineralogische Untersuchungen der Proben nach der Laugung mit *Shewanella putrefaciens* lassen keine Veränderungen des mineralogischen Phasenbestandes erkennen.

Das Ziel des Teilvorhabens, die Eigenfärbung der Rohstoffe zu verbessern, konnte mit unterschiedlichen Methoden erreicht werden. Geomikrobiologische Prozesse sind grundsätzlich möglich und einsetzbar, jedoch noch zu langsam und nicht wirtschaftlich. Um mikrobiologisch induzierte Behandlungsmethoden zur Weißgradsteigerung im Produktionsprozess nutzen zu können, müssen weitere Untersuchungen und Optimierungen der Laugungsprozesse erfolgen.

Als Nebenergebnis dieser Arbeiten wurden Erkenntnisse gewonnen, die in die Aufbereitungsprozesse einfließen können. An der technischen Umsetzung für bestimmte Rohherden muss noch gearbeitet werden. Auch hier ist die Wirtschaftlichkeit zu betrachten. Zusätzlich haben die interdisziplinären Methoden der mineralogischen Analysen dem Industriepartner neue Wege zur Charakterisierung von kaolinhaltigen Rohherden zur Hand gegeben, die eine Einordnung der Rohstoffe aufgrund ihrer spezifischen Verteilung von färbenden Eisenphasen ermöglicht. Folglich ist bereits im Vorfeld der Entwicklung von Rohstoffaufbereitungsstrategien bzw. bei der Erstellung von Lagerstättenmodellen das Potenzial einer Weißgraderhöhung abschätzbar.

So können zukünftig standortspezifische Aufbereitungsstrategien für eine Verarbeitung von bisher nicht nutzbaren Rohherden aufgestellt werden und folglich die Potenziale der Tagebaue hinsichtlich eines nachhaltigen und längerfristigen Abbaus optimal genutzt werden. Letztendlich werden die in den Tagebauen anfallenden Rohstoffe für spezifische Produkte besser genutzt und eingesetzt und die Ressourcen für längere Zeiträume verfügbar bleiben.

Mit den Kenntnissen über die Bleichbarkeit spezifischer Rohstoffe lässt sich eine optimierte Herstellung hochweißer Kaolinprodukte erreichen, die als Premiumprodukte auch international vermarktet werden können.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen muss die Auswahl spezifischer Mikroorganismen für eine mikrobielle Laugung eisenhaltiger Rohstoffe auf die Verteilung der spezifischen Eisenphasen ausgerichtet sein. Zielführend hierbei ist eine enge Verknüpfung und Vorarbeit von wissenschaftlichen und technischen Disziplinen, die eine Analyse molekularer Tonmineralstrukturen über die potenziell erreichbaren Effekte der Weißgraderhöhung, die Einsetzbarkeit von Mikroorganismen, Implementierung in technische Anlagen, bis hin zur Charakterisierung technisch aufbereiteter Endprodukte für den Verbraucher betrachtet.

## 7 Literaturverzeichnis

Abraham, W.-R.; Srrömpl, C.; Meyer, H.; Lindholst, S.; Moore, E.R.B.; Christ, R.; Vancanneyt, M.; Tindall, B.J.; Bennisar, A.; Smit, J.; Tesar, M.; 1999: Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 1053-1073.

Belova, S.E.; Pankratov, T.A.; Detkova, E.N.;Kaparullina, E.N.; Dedysh, S.N.; 2009: *Acidisoma tundrae* gen. nov., sp. nov. and *Acidisoma sibiricum* sp. nov., two acidophilic, psychrotolerant members of the *Alphaproteobacteria* from acidic northern wetlands. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 2283-2290.

Berthlin, J.; Kogblevi, A.;1974: Rev. Ecol. Biol. Sol., 11(4), 499-509.

BG Chemie; 2002: Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie. Merkblatt B 006, 10/2002, BGI 633, Einstufung biologischer Arbeitsstoffe: Bakterien.

Childers, S.E.; Ciufu, S.;Lovely, D.R.; 2002: *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. Nature, 416, 767-769.

Coates, J.D.; Phillips, E.J.P.; Lonergan, D.J.; Jenter, H.; Lovely, D.R.: 1996: Isolation of *Geobacter* Species from Diverse Sedimentary Environments. Appl. Environ. Microbiol., 62, 5, 1531-1536

Groudev, St.; Groudeva, V.; 2001: Biobenification of mineral raw materials. In: ed. Kujumdzieva, A.: Vocational Training in Biotechnology Innovation and Environment Protection, Sofia 2001, 65-89.

Hendrie, M.S.; Holding, A.J.; Shewan, J.M.; 1974: Emended descriptions of the genus *Alcaligenes* and of *Alcaligenes faecalis* and proposal that the generic name *Achromobacter* be rejected: Status of the named species of *Alcaligenes* and *Achromobacter*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1974, 5534-550.

Hollemann, A.F.; Wiberg, E.;1995: Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 101. Auflage, Walther de Gruyter-Verlag, Berlin, 1205-1211, 1218-122.7

Jaisi, D.P.; Kukkadapu, R.K.; Eberl, D.D.; Dong, H.; 2005: Control of Fe(III) site occupancy on the rate and extent of microbial reduction of Fe(III) in nontronite. Geochimica et Cosmochimica Acta 69, 5429–5440.

Kaden, R.; 2010: Mikrobiologische Charakterisierung von Tonrohstoffen unter Berücksichtigung des Alterationsprozesses „Mauken“. Freiberg, TU Bergakademie, Dissertation.

Kaim, W.; Schwederski, B.; 1995: Bioanorganische Chemie. Teubner Verlag Stuttgart, 160-168.

Kostka, J.E.; Dalton, D.D.; Skelton, H.; Dollhopf, S.; Stucki, J.W.; 2002: Growth of Iron(III)-Reducing Bacteria on Clay Minerals as the Sole Electron Acceptor and Comparison of Growth Yields on a Variety of Oxidized Iron Forms. Appl Environ Microbiol, 68, 6256–6262.

Kostka, J.E.; Nealson, K.H.; 1995: Dissolution and Reduction of Magnetite by Bacteria. Environ Sci Technol, 29, 2535-2540.

Kostka, J.E.; Stucki, J.W.; Nealson, K.H.; Wu, J.; 1996: Reduction of structural Fe(III) in Smectite by a pure culture of *Shewanella putrefaciens* Strain MR-1. *Clays and Clay Minerals*, 44, 522-529.

Lee, K.; Kostka, J.E.; Stucki, J.W.; 2006: Comparisons of structural Fe reduction in smectites by bacteria and dithionite. An infrared spectroscopic study. *Clay and Clay Minerals*, 54, 195-208.

Lovley, D.R.; Phillips, E.J.P.; Lonergan, D.J.; 1989: Hydrogen and Formate Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese by *Alteromonas putrefaciens*. *Appl Environ Microbiol*, 55, 700–706.

Mockovčiaková, A.; Štyriaková, I.; Škvarla, J.; Kozáková, I.; 2008: Characterization of changes of low and high defect kaolinite after bioleaching. *Science Direct, Applied Clay Science*, 39, 202-207.

Moreira, D.; Amils, R.; 1997: Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic *Thiobacilli*: Proposal for *Thiomonas* gen. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 522-528.

Myers, C.R.; Nealson, K.H.; 1988: Bacterial Manganese Reduction and Growth with Manganese Oxide as the Sole Electron Acceptor. *Science*, 240, 1319-1321.

Müller-Graf, K.; 05: Siderophore – Fe<sup>3+</sup> Aufnahme durch Bakterien, Pilze und Pflanzenwurzeln. Vortrag im Rahmen des Anorganisch Chemischen Fortgeschrittenen Praktikum, gehalten am 06.05.2005 Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

O'Reilly, S.E.; Furukawa, Y.; Newell, S.W.; 2006: Dissolution and microbial Fe(III) reduction of nontronite (NAU-1). *Chemical Geology*, 235, 1-11.

Produktinformation [www.asa-enzyme.de](http://www.asa-enzyme.de)

Petrick, K.; 2011: Identification of mineral phases influencing the properties of paper kaolins and ceramic clays. PhD thesis, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), pp. 262.

Ribeiro, F.R.; Fabris, J.D.; Kostka, J.E.; Komadel, P.; Stucki, J.W.; 2009: Comparisons of structural iron reduced in smectites by bacteria and dithionite. II. A variable-temperature Mössbauer spectroscopic study of Garfield nontronite. *Pure Applied Chemistry*, 81, 1499-1509.

Royer, R.A.; Burgos, W.D., Fisher, A.S.; Unz, R.F.; Dempsey, B.A.; 2002: Enhancement of Biological Reduction of Hematite by Electron Shuttling and Fe(II) Complexation. *Environ Sci Technol*, 36, 1939-1946.

Shen, S.; Stucki, J.W.; 1994: Effects of iron oxidation state on the fate and behavior of potassium in soils. In: Havlin, J.L.; Jacobson, J.S. (eds.). *Soil Testing: Prospects for Improving Nutrient Recommendations*. Soil Science of America, SSSA Special Publication, Madison, Wisconsin, 173-185.

Schlegel, H.G.; 2006: *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart.

Silverman, M. P.; Lundgren, D. G.; 1959: Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans* I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J. Bacteriol.* 77, 642-647.

Stucki, J.W.; 2011: A review of the effects of iron redox cycles on smectite properties. C.R. Geoscience 343, 199-209.

Štyriaková, I.; 2007: Influence of chelators on iron solubilization from quartz and feldspars by bioleaching. In: Advances Materials res. Vol. 20-21, 87-90.

Štyriaková, I.; Lovás, M.; 2007: Influence of chelators on iron solubilization from quartz and feldspars by bioleaching. In: Advances Materials res. Vol. 20-21, 209-212.

Symkatz-Kloss, W.; 1974: Differential Thermal Analysis. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 185.

Umweltbundesamt Dessau-Roßlau © 2011.

<http://www.umweltbundesamt.de/chemikalien/waschmittel/information>

Yabuchi, E.; Kosako, Y.; Oyaizu, H.; Yano, I.; Hotta, H.; Hashimoto, Y.; Ezaki, T.; Arakawa, M.; 1992: Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov.. Microbiol. Immunol., 36(12), 1251-1275.

Zegeye, A.; Fialips, C.I.; White, M.; Manning, D.A.C.; Gray, N.; 2008: Refinement of kaolin and silica sand by microbial removal of iron impurities. Geochimica et Cosmochimica Acta, 72, A1072.

Zeien, H.; Brümmer, G.W.; 1989: in: Kleber, A.; Mailänder, R.A.: Quantifizierung der Schwermetallbelastung im oberflächennahen Untergrund.

<http://www.tu-dresden.de/fghgig/lehrstuhl/meuropa/akl/schwermetalle.htm>

## 8 Nährmedien

DSMZ 1 (=NB 1); DSMZ 186; DSMZ 579; DSMZ 803; DSMZ 830 (=R2A);

[http://www.dsmz.de/microorganisms/media\\_list.php](http://www.dsmz.de/microorganisms/media_list.php)

Schae

Schaedler, R. W.; Dubos, R.; Costello, R.; The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. J. Exp. Med., 122, 59, 1965.

Postgate`s

Postgate, J. R.: The sulphate-reducing bacteria. 2. Auflage Cambridge University Press, Cambridge 1984.

Jain, D. K.: Journal of Microbiological Methods, 22, 27-38, 1995.

SGM

Sabbouraud, R.: Contribution a l'etude de la trichophylie humaine; Etude clinique micro scopique et bacteriologique sur la pluralité des trichophytens de l'homme. Ann. Dermatol. Syphil. 3:1061-1087, 1892.

Gallionella-Medium

Kucera, S.; Wolfe, R.S.; zitiert in: Ehrlich, H. L.; Geomicrobiology. Marcel Dekker Inc. 1996.

SJH

Johnson, D. B.; Mc Guinness, St.: A highly efficient and universal solid medium for growing mesophilic and moderately thermophilic iron-oxidizing, acidophilic bacteria. Journal of microbiological Methods, Vol. 13, 2, 113-122, June 1991.

9K

Silverman, M. P.; Lundgren, D. G.: Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans* I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. J. Bacteriol. 77, 642-647, 1959.

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

Abbildung 1	Aufbereitungsschema .....	5
Abbildung 2	Zusammenhang Eisengehalt – Weißgrad der Haldenproben mit Korngrößen < 25 µm .....	7
Abbildung 3	Geschlämmte Roherden; von links: LA 570, LA 550, LA 540, LA 580 .....	8
Abbildung 4	Analysenergebnisse nach der chemischen Bleiche mit Natriumdithionit und Salzsäure .....	10
Abbildung 5	Weißgrade nach der chemischen Bleiche mit Natriumdithionit und Salzsäure .....	10
Abbildung 6	Weißgrade nach der chemischen Bleiche mit unterschiedlichen Verfahren	11
Abbildung 7	Weißgrad nach 1 Tag Laugung mit Säuren .....	12
Abbildung 8	Weißgrad nach 7 Tagen Laugung mit Säuren .....	13
Abbildung 9	SEM-Aufnahmen zur Untersuchung der Partikelmorphologie der Kaoline vor und nach der Behandlung mit <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	16
Abbildung 10	Lebendkeimzahlen der Proben AKW vom 08.03.2007 .....	20
Abbildung 11	Keimzahlen der Eisen- und Schwefelbakterien der Proben AKW vom 08.03.2007 .....	22
Abbildung 12	Separationsmuster.....	23
Abbildung 13	Laugungsraten Fe mit Wasser und Nährmedium DSMZ 579 .....	24
Abbildung 14	Fe-Austrag der Säulen 1 bis 4 .....	25
Abbildung 15 a, b	Probe S2 nach 1 Tag Laugung mit Desferrioxamin E nach Zentrifugation und Trocknung (a) und nach 14 Tagen Laugung nach Zentrifugation (b).....	32
Abbildung 16	Hellbezugswerte (a), Gelbwerte (b), Anteile an unlöslichen Eisenoxid (c) und Weißgrade (R457) während des Versuchs mit <i>Geobacter spez</i> .....	35
Abbildung 17	Entwicklung des Weißgrads während des Versuchs MK 3.....	36
Abbildung 18	Versuch MK 4: Verlauf des Weißgrads (R457) im beimpften und unbeimpften Reaktor.....	36
Abbildung 19	Abhängigkeit des Weißgrads der behandelten Kaoline vom prozentualen Masseanteil verschiedener Oxide .....	38
Abbildung 20	Abhängigkeit des erreichten Weißgrads (LA 540 NMS) von der Leitfähigkeit des verwendeten Dispergiermediums .....	39

Abbildung 21	Versuch MK 8: Verlauf des Weißgrads (R457).....	40
Abbildung 22	Schema zur Aufarbeitung einer Standardprobe des Pilotversuchs mit <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	42
Abbildung 23	Verlauf der Weißgrade (R457) der verschiedenen Proben während des Pilotversuchs zur Aufhellung von Kaolin mit <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	42
Abbildung 24	Eisenoxidgehalte der Standardproben während des Pilotversuchs zur Aufhellung von Kaolin mit <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	43
Abbildung 25	Gelöstes Eisen im Überstand nach Zentrifugation der Standardproben während des Pilotversuchs zur Aufhellung von Kaolin mit <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	44
Abbildung 26	DNA-Gehalte zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten des Pilotversuchs [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].....	45
Abbildung 27	Sequenzielle relative Fe-Verarmung $\Psi$ der Kaolinprobe B51061 und des korngroßenfraktionierten Materials hervorgerufen durch die Behandlung mit <i>Shewanella putrefaciens</i> . Fe-Verarmung $\Psi$ : Ort des Fe-Verarmung in Hinblick auf silikatisch- ( $\Psi > 1$ ) oder oxidisch-gebundenes ( $\Psi < 1$ ) Fe. ....	46

### Abbildungen Anhang

Abbildung A 1 a-c	Korngroßenverteilung der Kaolinproben (a) LA540, (b) B4914, und (c) B4915 vor (hellgraue Balken) und nach der Behandlung mit <i>Shewanella putrefaciens</i> (schwarze Balken).....	56
Abbildung A 2	PA-Kurven zur Abschätzung des strukturellen Ordnungsgrades der Kaolinproben LA540, B4914 und B4915 vor (geschlossene Figuren) und nach der mikrobiellen Behandlung (offene Figuren).....	57

### Tabellen

Tabelle 1	Eisengehalte der Referenzproben .....	7
Tabelle 2	Weißgrad und Eisengehalt der Proben für die mikrobielle Bleiche am UFZ..	9
Tabelle 3	Laugungsraten nach der sequenziellen Extraktion .....	9
Tabelle 4	Konzentrationen nach der chemischen Bleiche mit Natriumdithionit und Salzsäure .....	11
Tabelle 5	Phänomenologische Beschreibung und prozessrelevante Parameter der Papierkaoline .....	14
Tabelle 6	pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit $\sigma$ und Weißgrad der Kaolinproben vor und nach (MO) der Behandlung mit <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	14
Tabelle 7	Nährmedien und Methoden zur Analyse der im Rohstoff vorhandenen Mikroorganismen .....	19
Tabelle 8	Nährmedien und Methoden zur Analyse der im Rohstoff vorhandenen Eisenspezies.....	21
Tabelle 9	Laugungsraten der Proben S2 und LA 540 mit <i>Geobacter metallireducens</i> DSM 7210 in % .....	26
Tabelle 10	Ergebnisse der Laugung mit Kulturlösung von <i>Debaryomyces hansenii</i> DSM 70238, Versuch 1.....	28
Tabelle 11	Zusammensetzung des verwendeten Reduktionsmediums zur Aufhellung von Kaolin mit <i>Shewanella putrefaciens</i> B622/T.....	29



Tabelle 12	Zusammenfassung der Laugungsergebnisse mit Bio-Derosta® 3-L .....	30
Tabelle 13	Laugungsraten mit Desferrioxamin E in %.....	31
Tabelle 14	Ergebnisse der Laugung der Proben S2 mit Desferrioxamin E .....	32
Tabelle 15	Laugungsraten mit Enterobactin in % .....	32
Tabelle 16	Laugungsraten der Probe S2 mit Natriumcitrat in %.....	33
Tabelle 17	Ergebnisse der Laugung der Probe S2 mit Natriumcitrat, Rückstände .....	33
Tabelle 18	Ergebnisse der Laugung der Probe S2 mit Natriumcitrat, Pellets in %.....	33
Tabelle 19	Im Pilotversuch mit <i>Shewanella putrefaciens</i> eingesetztes Reduktionsmedium .....	41
Tabelle 20	Quantitativer Phasenbestand des Kaolins B51061 zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten mit <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	46

### Tabellen Anhang

Tabelle A 1	Charakterisierung der Referenzproben.....	57
Tabelle A 2	Charakterisierung der Proben für den Pilotversuch .....	59
Tabelle A 3	Chemische Zusammensetzung der Kaoline LA540, B4914 und B4915 vor und nach der Behandlung mit <i>Shewanella putrefaciens</i> (MO). Die Werte sind auf den Glühverlust normiert (LOI).....	60
Tabelle A 4	Quantitativer Phasenbestand der Kaoline LA540, B4914 und B4915 vor und nach der Behandlung mit <i>Shewanella putrefaciens</i> (MO).....	60
Tabelle A 5	Quantifizierungsergebnisse mittels ODPF der Tonfraktionen von (a) LA540, (b) B4914 und (c) B4915, sowie der mikrobiell behandelten Analoga (MO) .....	60
Tabelle A 6	Fe-Speziesverteilung der Kaolinproben LA540, B4914 und B4915 vor und nach (MO) der Behandlung mit <i>Shewanella putrefaciens</i> .....	61
Tabelle A 7	Zusammenfassung der Weißgrad-relevanten Parameter vor und nach der mikrobiellen Behandlung der Papierkaoline mit <i>Shewanella putrefaciens</i> .61	
Tabelle A 8	Fe-Speziesverteilung der Kaolinprobe B51061 und ihrer Fraktionen zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten mit <i>Shewanella putrefaciens</i> : (a) unbehandelte Ausgangsprobe; (b) nach 2 h; (c) nach 24 h und (d) nach 72 h .....	62

## 10 Anhang

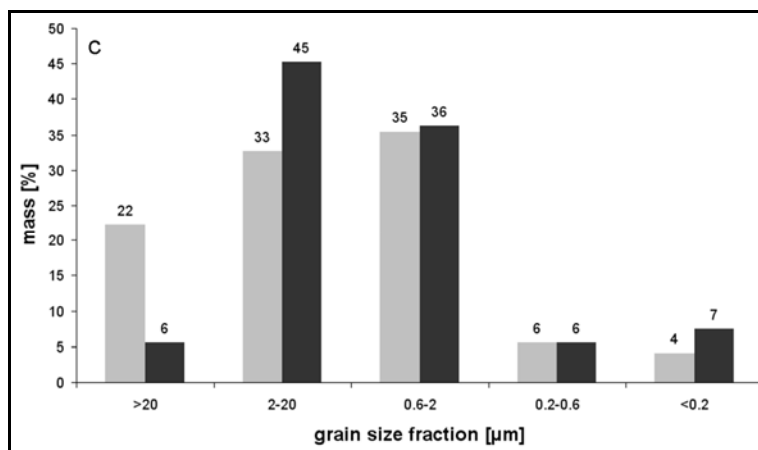
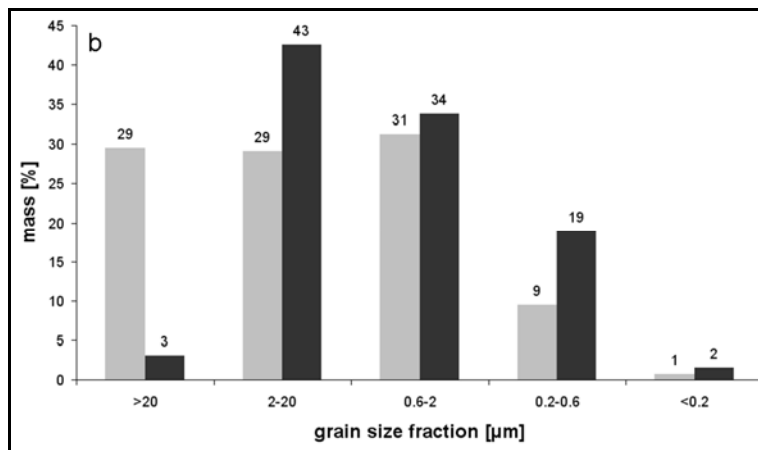
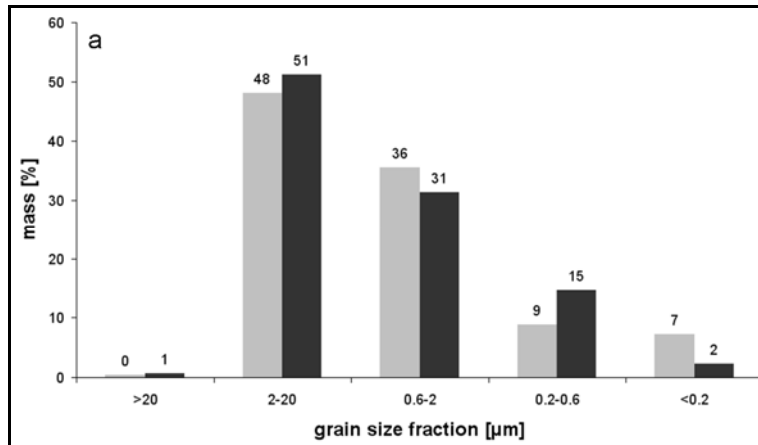


Abbildung A 1 a-c Korngrößenverteilung der Kaolinproben (a) LA540, (b) B4914, und (c) B4915 vor (hellgraue Balken) und nach der Behandlung mit *Shewanella putrefaciens* (schwarze Balken)

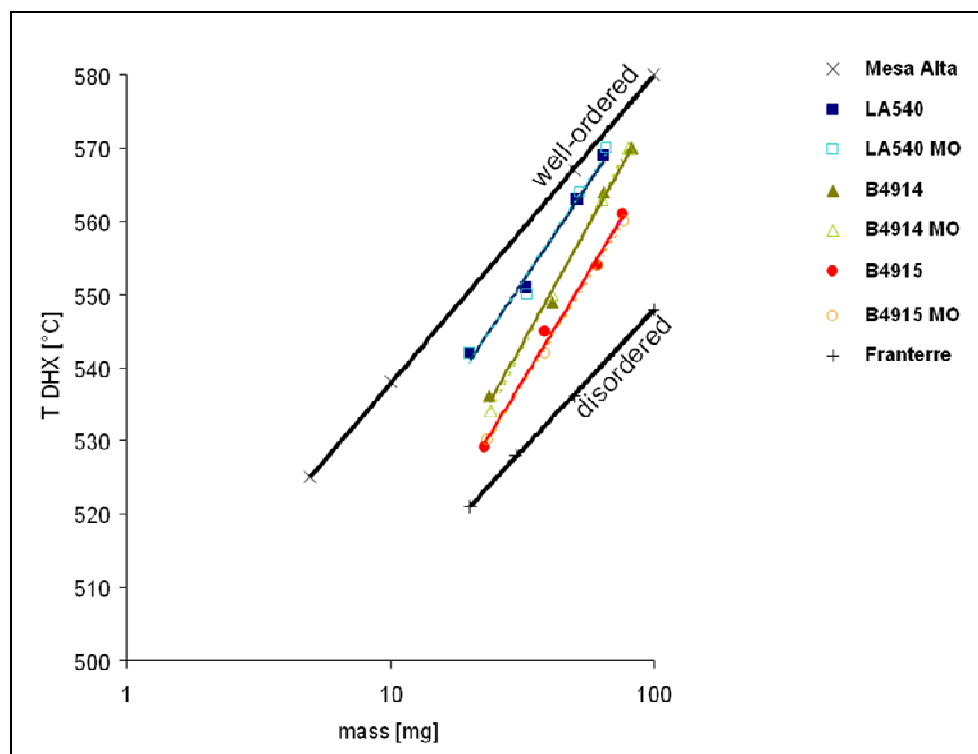


Abbildung A 2 PA-Kurven zur Abschätzung des strukturellen Ordnungsgrades der Kaolinproben LA540, B4914 und B4915 vor (geschlossene Figuren) und nach der mikrobiellen Behandlung (offene Figuren)

Tabelle A 1 Charakterisierung der Referenzproben

Halde	LA570	LA550	LA580	LA540	LA540 <2mm	S2 GEOS
<b>Feingut S2</b>						
<b>R 457</b>	<b>76</b>	<b>78,5</b>	<b>69,1</b>	<b>67,2</b>		<b>68,00</b>
Farbton	1,6	1,65	1,69	1,71		1,64
Sättigung	0,54	0,48	1,1	0,97		1,05
Hellbezugswert A	82,7	84,5	82,9	78,7		80,7
L*	92,88	93,65	92,96	91,1		91,98
a*	-0,19	-0,39	-0,73	-0,59		-0,85
b*	5,64	4,98	11,64	10,11		10,96
Gelbwert ECC	7,75	6,86	16,64	13,73		15,18
< 15 µm	100	100	98	100		99
< 12 µm	99	98	98	100		99
< 10 µm	98	97	97	99		99
< 8 µm	97	95	96	98		97
< 6 µm	92	90	90	93		92
< 5 µm	87	86	86	89		87
< 4 µm	81	80	79	82		80
< 3,5 µm	76	76	74	78		75
< 3 µm	71	70	69	73		69
< 2,5 µm	65	64	63	67		62
< 2 µm	57	56	55	59		53
< 1,5 µm	47	47	46	51		44

< 1 µm	36	36	35	41		33
< 0,8 µm	30	30	30	36		29
< 0,6 µm	22	23	23	30		24
< 0,4 µm	12	13	13	24		20
< 0,2 µm	4	7	5	22		14
NSR >45µm	0,005	0,0052	0,0064	0,0128		
NSR >25µm	0,0437	0,0458	0,07	0,0704		
SiO <sub>2</sub>	47,53	47,79	48,17	52,17	86,15	52,18
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	36,14	36,21	35,47	30,77	8,00	30,53
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>0,54</b>	<b>0,52</b>	<b>0,81</b>	<b>1,43</b>	<b>0,20</b>	<b>1,10</b>
<b>TiO<sub>2</sub></b>	<b>0,48</b>	<b>0,51</b>	<b>0,51</b>	<b>0,69</b>	<b>0,14</b>	<b>0,51</b>
CaO	0,11	0,11	0,09	0,18	0,03	0,16
MgO	0,21	0,22	0,22	0,66	0,02	0,51
Na <sub>2</sub> O	0,05	0,06	0,06	0,07	0,01	0,07
K <sub>2</sub> O	1,8	1,98	2,11	2,79	3,18	2,75
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,27	0,21	0,21	0,39	0,05	0,72
BaO	0,16	0,12	0,13	0,17	0,12	0,16
GV	12,35	12,07	11,96	10,46	1,89	10,71
TS ber.	88,5	86,5	85,7	74,9	13,5	76,7
Na - FS	0,4	0,5	0,5	0,6	0,1	0,6
K - FS	10,6	11,7	12,5	16,5	18,8	16,2
Ges. - FS	11,1	12,2	13	17,1	18,9	16,8
<b>S2Feingut n.NMS</b>						
<b>R 457</b>	<b>78</b>	<b>80,2</b>	<b>70,9</b>	<b>68,8</b>		
Farbton	1,68	1,51	1,63	1,65		
Sättigung	0,53	0,48	1,04	0,95		
Hellbezugswert A	84,7	86,3	84,2	80,1		
L*	93,75	94,44	93,52	91,75		
a*	-0,38	-0,59	-0,88	-0,74		
b*	5,55	5,07	11,06	9,88		
Gelbwert ECC	7,68	7,05	15,94	13,52		
SiO <sub>2</sub>	47,8	47,73	48,25	52,41		
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	36,28	36,23	35,49	30,87		
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>0,5</b>	<b>0,49</b>	<b>0,75</b>	<b>1,3</b>		
<b>TiO<sub>2</sub></b>	<b>0,41</b>	<b>0,43</b>	<b>0,46</b>	<b>0,62</b>		
CaO	0,11	0,11	0,09	0,17		
MgO	0,2	0,21	0,21	0,63		
Na <sub>2</sub> O	0,05	0,05	0,06	0,07		
K <sub>2</sub> O	1,8	1,97	2,09	2,72		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,25	0,2	0,18	0,34		
BaO	0,15	0,11	0,1	0,15		
GV	12,26	12,14	11,91	10,51		
TS ber.	87,8	87	85,3	75,3		
Na - FS	0,4	0,4	0,5	0,6		
K - FS	10,6	11,6	12,3	16,1		
Ges. - FS	11,1	12,1	12,9	16,7		

Tabelle A 2 Charakterisierung der Proben für den Pilotversuch

Probe-Nr.		<b>B4914 Sondierung</b>	<b>B4915 Sondierung</b>	<b>B51061 Pilotversuch</b>
<b>R 457</b>	%	<b>76,5</b>	<b>67,9</b>	<b>66,6</b>
Farbton		1,56	1,85	1,73
Sättigung		0,53	0,87	1,01
Hellbezugswert				
A	%	83	78,1	78,5
L*		93,02	90,83	91,02
a*		-0,57	-0,18	-0,57
b*		5,48	9,02	10,5
Gelbwert ECC	%	7,45	12,07	14,26
< 15 µm	%	99	100	96
< 12 µm	%	99	100	94
< 10 µm	%	98	98	91
< 8 µm	%	96	96	87
< 6 µm	%	90	90	79
< 5 µm	%	84	85	73
< 4 µm	%	78	78	65
< 3,5 µm	%	73	73	61
< 3 µm	%	67	67	56
< 2,5 µm	%	60	59	50
<b>&lt; 2 µm</b>	<b>%</b>	<b>51</b>	<b>50</b>	<b>43</b>
< 1,5 µm	%	42	41	36
< 1 µm	%	31	30	26
< 0,8 µm	%	25	25	22
< 0,6 µm	%	18	18	16
< 0,4 µm	%	11	11	11
< 0,2 µm	%	5	5	4
d 50	µm	1,95	1,99	2,49
SiO <sub>2</sub>	%	47,79	47,94	49,87
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	%	35,93	35,92	33,76
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>%</b>	<b>0,65</b>	<b>0,73</b>	<b>0,8</b>
<b>TiO<sub>2</sub></b>	<b>%</b>	<b>0,41</b>	<b>0,43</b>	<b>0,51</b>
CaO	%	0,1	0,1	0,09
MgO	%	0,27	0,27	0,27
Na <sub>2</sub> O	%	0,06	0,06	0,09
K <sub>2</sub> O	%	2,02	2,04	3,06
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	%	0,18	0,15	0,17
BaO	%	0,11	0,09	0,14
GV	%	12,24	12,04	11,04
TS ber.	%	87,7	86,3	79,1
Na - FS	%	0,5	0,5	0,8
K - FS	%	11,9	12,1	18,1
Ges. - FS	%	12,4	12,6	18,8

Tabelle A 3 Chemische Zusammensetzung der Kaoline LA540, B4914 und B4915 vor und nach der Behandlung mit *Shewanella putrefaciens* (MO). Die Werte sind auf den Glühverlust normiert (LOI).

	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	LOI
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
LA540	58.83	34.65	1.46	0.71	0.19	0.08	3.05	0.70	0.34	11.20
LA540 MO	59.42	34.72	1.05	0.35	0.11	0.00	2.87	0.52	0.96	10.98
B4914	54.67	41.34	0.78	0.17	0.13	0.00	2.22	0.47	0.21	12.34
B4914 MO	54.64	41.32	0.75	0.25	0.08	0.00	2.23	0.47	0.25	12.95
B4915	54.60	40.99	0.95	0.31	0.11	0.07	2.33	0.49	0.15	12.04
B4915 MO	54.75	40.91	0.82	0.32	0.08	0.08	2.37	0.48	0.19	13.06

Tabelle A 4 Quantitativer Phasenbestand der Kaoline LA540, B4914 und B4915 vor und nach der Behandlung mit *Shewanella putrefaciens* (MO)

	LA540	LA540 MO	B4914	B4914 MO	B4915	B4915 MO
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Kaolinit	61	62	81	80	76	76
Illit	8	9	8	10	12	13
I-S*	7	3	0	3	1	2
K-Feldspat	10	11	7	5	6	5
Quarz	11	12	2	1	4	3
Ti-Oxide	1	1	0	0	0	0
Crandallit	1	1	1	0	0	0
Fe Phasen	1	1	1	1	1	1

\*I-S: Illite-Smectit-Wechselagerungsminerale bestimmt mit ODPF.

Tabelle A 5 Quantifizierungsergebnisse mittels ODPF der Tonfraktionen von (a) LA540, (b) B4914 und (c) B4915, sowie der mikrobiell behandelten Analoga (MO)

(a)	LA540			LA540 MO		
	0.6-2 µm	0.2-0.6 µm	<0.2 µm	0.6-2 µm	0.2-0.6 µm	<0.2 µm
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Kaolinit	64	11	12	86	61	42
I-S	4	72	82	4	18	49
-Reichweite	R1	R1	R1	R1	R1	R1
-W <sub>a</sub>	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Illit	32	17	6	10	21	9

(b)	B4914			B4914 MO		
	0.6-2 µm	0.2-0.6 µm	<0.2 µm	0.6-2 µm	0.2-0.6 µm	<0.2 µm
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Kaolinit	86	81	76	74	84	83
I-S	0	8	10	16	2	4
-Reichweite	R3	R3	R3	R3	R3	R3
-W <sub>a</sub>	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Illit	14	11	14	10	14	13

(c)	B4915			B4915 MO		
	0.6-2 $\mu\text{m}$	0.2-0.6 $\mu\text{m}$	<0.2 $\mu\text{m}$	0.6-2 $\mu\text{m}$	0.2-0.6 $\mu\text{m}$	<0.2 $\mu\text{m}$
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Kaolinit	84	63	84	90	88	74
I-S	3	18	13	5	6	19
-Reichweite	R3	R3	R3	R3	R3	R3
-W <sub>a</sub>	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Illit	13	19	3	5	6	7

Reichweite: Ordnungsprinzip innerhalb der Wechsellagerung nach Jadgozinski [1949]; W<sub>a</sub>: Anteil der im Wechsellagerungsmineral zuerst genannten Komponente.

Tabelle A 6 Fe-Speziesverteilung der Kaolinproben LA540, B4914 und B4915 vor und nach (MO) der Behandlung mit *Shewanella putrefaciens*

Probe	relative Fe-Verteilung			absolute Fe-Verteilung		
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	silikatisch-gebundenes Fe/Goethite
LA540	1.46	13.0	87.0	0.19	1.27	7
LA540 MO	1.05	9.7	90.3	0.10	0.95	9
B4914	0.78	0.4	99.6	0.003	0.77	250
B4914 MO	0.75	1.2	98.8	0.01	0.74	82
B4915	0.95	5.5	94.5	0.05	0.90	17
B4915 MO	0.82	0.8	99.2	0.01	0.81	124

Tabelle A 7 Zusammenfassung der Weißgrad-relevanten Parameter vor und nach der mikrobiellen Behandlung der Papierkaoline mit *Shewanella putrefaciens*

Parameter	LA540	B4914	B4915	Reihenfolge
initialer Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Gehalt [%]	1.46	0.78	0.95	B4914 < B4915 < LA540
Ausmaß Fe-Reduzierung [%]	28	4	14	B4914 < B4915 < LA540
initialer Weißgrad [%]	68.2	76.5	67.9	B4915 < LA540 < B4914
Weißgraderhöhung $\Delta$ [%]	3.9	2.7	8.7	B4914 < LA540 < B4915
Fe-Verarmung $\Psi$	0.72	3.02	0.14	B4915 < LA540 < B4914
Fe-Eliminierungseffizienz	-0.1051	-0.0111	-0.0149	LA540 < B4915 < B4914

Tabelle A 8 Fe-Speziesverteilung der Kaolinprobe B51061 und ihrer Fraktionen zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten mit *Shewanella putrefaciens*: (a) unbehandelte Ausgangsprobe; (b) nach 2 h; (c) nach 24 h und (d) nach 72 h

(a) AKW_P0	relative Fe-Verteilung			absolute Fe-Verteilung		
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	silikatisch-gebundenes Fe/Goethite
gesamt	0.93	12.8	87.2	0.12	0.81	7
>20 µm	0.58	14.8	85.2	0.09	0.49	6
2-20 µm	0.70	10.0	90.0	0.07	0.63	9
0.6-2 µm	1.24	13.3	86.7	0.17	1.08	7
0.2-0.6 µm	1.67	17.1	82.9	0.29	1.38	5
<0.2 µm	2.53	14.6	85.4	0.37	2.16	6

(b) AKW_P4	relative Fe-Verteilung			absolute Fe-Verteilung		
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	silikatisch-gebundenes Fe/Goethite
gesamt	0.94	19.4	80.6	0.18	0.76	4
>20 µm	0.62	23.3	76.7	0.14	0.47	3
2-20 µm	0.71	15.8	84.2	0.11	0.60	5
0.6-2 µm	1.17	17.7	82.3	0.21	0.97	5
0.2-0.6 µm	1.92	23.0	77.0	0.44	1.48	3
<0.2 µm	2.45	27.9	72.1	0.68	1.77	3

(c) AKW_P6	relative Fe-Verteilung			absolute Fe-Verteilung		
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	silikatisch-gebundenes Fe/Goethite
gesamt	0.91	21.3	78.7	0.19	0.72	4
>20 µm	0.70	24.8	75.2	0.17	0.52	3
2-20 µm	0.78	21.0	79.0	0.16	0.62	4
0.6-2 µm	1.24	18.8	81.2	0.23	1.01	4
0.2-0.6 µm	1.62	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.d.
<0.2 µm	2.38	17	83.0	1.97	1.97	5

(d) AKW_P9	relative Fe-Verteilung			absolute Fe-Verteilung		
	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	Goethit [%]	silikatisch-gebundenes Fe [%]	silikatisch-gebundenes Fe/Goethite
gesamt	0.84	11.4	88.6	0.10	0.75	8
>20 µm	0.62	16.9	83.1	0.10	0.51	5
2-20 µm	0.72	13.1	86.9	0.09	0.62	7
0.6-2 µm	1.11	16.7	83.3	0.18	0.92	5
0.2-0.6 µm	1.47	16.6	83.4	0.24	1.22	5
<0.2 µm	2.41	24.9	75.1	0.60	1.81	3







**„Entwicklung neuer Aufbereitungstechnologien für tonmineralische Rohstoffe durch gezielte Nutzung und Steuerung mikrobiologischer Reaktionen“**

Projektnummer: 01 RI 0626

**Bericht zum Projektstrang**

**„Verbesserung der Plastizität“**

Beteiligte Partner:

- Karlsruher Institut für Technologie – KIT
- Institut für funktionelle Grenzflächen (IFG)
- Kompetenzzentrum für Materialfeuchte (CMM)
- Forschungsinstitut für Anorganische Werkstoffe  
- Glas/Keramik - GmbH (FGK)
- Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ
- Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum (UBZ)
- SIBELCO Deutschland GmbH (WBB)
- Amberger Kaolinwerke Eduard Kick GmbH Co.KG (AKW)
- G.E.O.S. Ingenieurgesellschaft mbH (GEOS)



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Definition von Rohstoffen und Prozessen.....</b>	<b>7</b>
2.1	Definition Projekt-Rohstoffe .....	7
2.2	Prozesstechnik .....	8
2.3	Basischarakterisierung der ausgewählten Rohstoffe .....	12
<b>3</b>	<b>Laborphase Basisforschung .....</b>	<b>16</b>
3.1	Mineralogische Analysen .....	17
3.1.1	Korngrößenverteilung und verarbeitungsrelevante Eigenschaften .....	17
3.1.2	Quantitativer Phasenbestand.....	18
3.1.3	Diskussion .....	25
3.1.4	Schlussfolgerungen zu mineralogischen Analysen .....	28
3.2	Mikrobiologische Untersuchungen .....	29
3.2.1	Mikrobiologische Basischarakterisierung der Tone.....	29
3.2.2	DNA-Extraktion .....	32
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion PCR .....	35
3.2.4	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese DGGE.....	36
3.2.5	Sequenzierung und Datenbankrecherche .....	36
3.2.6	Sequenzassembling und taxonomische Analysen .....	37
3.2.7	Charakterisierung kultivierbarer Mikroorganismen.....	40
3.2.8	Gesamt-DNA-Untersuchung .....	42
3.2.9	Zusammenfassung zur mikrobiellen Basischarakterisierung .....	44
3.3	Anwendungstechnische Untersuchungen.....	46
3.3.1	Charakterisierungsprogramm „Verarbeitungseigenschaften“.....	47
3.3.2	Basistests mit mikrobiellen Stoffwechselprodukten in Tonrohstoffen....	59
3.3.3	Schlussfolgerungen aus anwendungstechnischen Untersuchungen ....	65

<b>4</b>	<b>Maukversuche zur Untersuchung der Prozesse bei der Reifung von Tonmassen.....</b>	<b>66</b>
4.1	Zielsetzung .....	66
4.2	Versuchsdurchführung.....	66
4.3	Mineralogische Analysen .....	68
4.4	Mikrobiologische Analysen .....	68
4.4.1	Dynamisches Kultivierungssystem (DCS).....	69
4.4.2	Biochemische Methoden.....	70
4.4.3	Maukversuch I .....	71
4.5	Anwendungstechnische Untersuchungen.....	85
4.6	Diskussion .....	88
<b>5</b>	<b>Laborversuch zur mikrobiellen Aufbereitung von Tonen: „Alginatbakterienversuch“ .....</b>	<b>90</b>
5.1	Zielsetzung .....	90
5.2	Versuchsdurchführung.....	90
5.3	Mikrobiologische Analysen .....	92
5.4	Anwendungstechnische Untersuchungen.....	95
5.5	Diskussion .....	97
<b>6</b>	<b>Plastifizierung durch Zugabe biotechnisch hergestellter Additive: „Additivversuche“ .....</b>	<b>99</b>
6.1	Zielsetzung .....	99
6.2	Versuchsdurchführung.....	99
6.3	Anwendungstechnische Untersuchungen.....	102
6.4	Diskussion .....	106
<b>7</b>	<b>Pilotphase.....</b>	<b>107</b>
7.1	Kleiner Pilotversuch .....	108
7.2	Großer Pilotversuch .....	111
7.3	Industriemaukversuch.....	116
7.4	Diskussion der Ergebnisse aus der Pilotphase.....	120
<b>8</b>	<b>Bewertungsschema Rohstoffe „Plastifizierung“ .....</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>129</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>136</b>

## 1 Einleitung

Das Mauken, d.h. das Reifenlassen von Tonmassen über mehrere Tage und Wochen bis hin zu Jahren, ist ein seit Jahrhunderten bekannter und angewandter Prozessschritt zur Verbesserung der plastischen Verarbeitungseigenschaften von keramischen Massen. Dabei ist bis heute noch nicht eindeutig aufgeklärt, welche Mechanismen die Ursache für die überdies meist schwer quantifizierbare Veränderung der Plastizität sind.

Verschiedene Quellen (vgl. Ditz und Mörtel, 1986; Staley et al. (1992), Ernst (2007)) untersuchen positive und negative Effekte von mehr oder weniger gezielt eingebrachten Mikroorganismen und mikrobiellen Stoffwechselprodukten auf die plastischen und rheologischen Eigenschaften von keramischen Rohstoffen und Massen.

Heitz et al. (1996) beschreiben Prozessstörungen bei der Produktion von Geschirr- und Sanitärkeramik, die auf Kontamination von Prozesswasser, Schlickern und Filterkuchen mit Mikroorganismen in Kombination mit Verweilzeiten in Leitungen und Lagerbottichen etc. zurückgeführt werden konnten.

Aus Arbeiten zur Eisensolubilisierung (siehe auch Berichtsteil Eiseneliminierung) ist ein mineralogieverändernder Effekt von mikrobiellen Stoffwechselprodukten bekannt. Dong et al. (2003) konnten beispielsweise die Auflösung von Smectit durch *Shewanella oneidensis* nachweisen.

Aus Anwendersicht der Keramikproduzenten spielt außerdem der Grad der Homogenisierung des in der Masse verfügbaren Wassers eine entscheidende Rolle für die Prozesseigenschaften und Plastizität von Schlickern und bildsamen Massen und wird als Effekt des Maukens bzw. der Tonreifung betrachtet.

Diese Phänomene und Beobachtungen sind noch nicht ausreichend und abschließend geklärt. So besteht noch immer Forschungsbedarf zur Aufklärung der genauen und prozessrelevanten Veränderungen der chemisch-mineralogischen und keramtechnischen Eigenschaften von tonmineralischen Rohstoffen durch Einwirkung von Mikroorganismen und/oder durch Homogenisierungseffekte des im System vorhandenen Wassers. Außerdem besteht die Fragestellung, ob und wie im nächsten Schritt positive Effekte gefördert sowie negative Auswirkungen der plastizitätsbeeinflussenden Faktoren vermindert oder ganz vermieden werden können.

Im Teilprojekt „Plastifizierung“ des Bioton Projekts wurde daher untersucht, ob und wie mikrobielle Prozesse zu Plastizitätsmechanismen von tonmineralischen Rohstoffen beitragen und wie diese gegebenenfalls gezielt industriell genutzt werden könnten. Neben der Untersuchung der ursächlichen Plastizitätsmechanismen liegt so der Projektschwerpunkt auf entsprechender Entwicklung neuer Aufbereitungstechnologien zur Verbesserung der Prozesseigenschaften plastischer, keramischer Tonrohstoffe.

Aus diesen Fragestellungen zu Plastizität und Reifung von tonmineralischen Rohstoffen heraus wurden nun im Rahmen des Bioton-Projekts verschiedene Forschungsansätze bearbeitet, die zur Übersicht in folgender Grafik dargestellt sind.



**Abbildung 1: Übersicht zum Bioton-Projektstrang Plastifizierung**

In der Laborphase Basisforschung wurde ein genau auf den Rohstoff Ton abgestimmtes Analysemethodenprogramm zur Charakterisierung der exakten Mineralogie, der Mikroflora und der anwendungstechnisch wichtigen Eigenschaften der Tonmassen erarbeitet. Dieses wurde in der folgenden Forschungsphase angewendet und verfeinert.

Hierbei wurde zum einen im Rahmen mehrerer Maukversuche versucht, die Prozesse bei der Tonreifung weiter aufzuklären. Zum anderen wurde die direkte Beimpfung von ausgewählten Tonmassen mit Bakterienkulturen, die durch Produktion von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eine Verbesserung der plastischen Eigenschaften erwarten lassen, getestet. Als dritter Ansatzpunkt wurden in externen Reaktoren biotechnisch hergestellte EPS sowie mikrobielle Stoffwechselprodukte als Additive zur direkten Plastifizierung den Massen zugesetzt und diese charakterisiert und bewertet.

Die Ergebnisse aus der Forschungsphase wurden schließlich bewertet und in mehreren Pilot- bzw. Großversuchen umgesetzt und auf ihre technische Machbarkeit hin getestet.





## 2 Definition von Rohstoffen und Prozessen

Zur Untersuchung der Faktoren Mikrobiologie und Wasserhomogenisierung auf die plastischen Eigenschaften von Tonrohstoffen sowie zur Methodenentwicklung ihrer biotechnologischen Modifizierung wurden durch den Projektpartner und Rohstoffproduzenten WBB geeignete Rohstoffe ausgewählt. Zusammen mit den Mikrobiologen und Biotechnologen von KIT und UFZ wurden weiterhin passende Lager- bzw. Vorhaltungskonzepte für die Rohstoffe über die Projektlaufzeit definiert und außerdem die Prozessabläufe der Aufbereitung nach idealen Implementierungspunkten für biotechnische Masseveredelungsprozesse analysiert.

### 2.1 Definition Projekt-Rohstoffe

Der Projektpartner WBB wählte für die Untersuchungen im Bioton-Projekt zwei Tonsorten aus, die signifikant unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Plastizität bzw. rheologischem Verhalten sowie verschieden hohe Anteile an Kohlenstoff („Organik“) aufweisen. Auch wurden die Tone im Hinblick auf Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Tonsorten ausgewählt.

**Tabelle 1: Vergleichende Übersicht der beiden Tonsorten für das Bioton-Projekt**

<b>Bioton-Probe W1</b>	<b>Bioton-Probe W2</b>
	
Tertiärer, illitischer, halbfetter Blauton	Tertiärer, illitischer, halbfetter Cremeton
Grube Geigenflur/ Vielbach im Siershahner Becken	Grube Petschmorgen/ Moschheim
Hoher Anteil organischer Verunreinigung	Geringer Anteil organischer Bestandteile
Begleitminerale: Pyrit, Markasit, Siderit	Begleitminerale: Hämatit und Goethit
Plastisch	Unplastisch

Für beide Tonsorten wurden für den Projektzeitraum klar definierte Abbaubereiche der jeweiligen Lagerstätte abgesteckt und reserviert, um jederzeit eine vergleichbare Probenahme zu ermöglichen. Weiterhin wurden zusammen mit den Mikrobiologen verschiedene Lagerkonzepte erarbeitet, um jeweils vergleichbare und konstante Probenahmebedingungen zu gewährleisten. Insbesondere für die Maukversuche ist es von Bedeutung, zum Startzeitpunkt der Versuchsreihen möglichst unverändertes Tonmaterial im völlig nicht gemaukten „Urzustand“ für die Referenz-Analyse zur Verfügung stellen zu können.

Für die Basischarakterisierung wurde zunächst jeweils ca. 1 t Material aus klar definierten Abbaubereichen der jeweiligen Lagerstätte gefördert und dieses in der Zerkleinerungsanlage zu geschnitzeltem Ton von ca. < 3cm Stückgröße aufbereitet. Die beiden Tonsorten wurden anschließend nach Entnahme von Teilmengen für die Projektpartner in Big-Bags abgefüllt und sauber und trocken gelagert. Das Material ist somit vergleichsweise homogen, allerdings können Veränderungen der Mikroflora während der Lagerung im Big-Bag nicht ausgeschlossen werden.

Für die Maukversuche sowie die Versuchsreihe zur Direktbeimpfung mit Bakterienkulturen wurden daher jeweils 5 t Material entsprechend frisch abgebaut und direkt zum Start der Versuchsdurchführung aufbereitet.

Da es bei der Versuchsreihe zur Wirkungsweise und zum Vergleich von mikrobiellen Stoffwechselprodukten als Additiven in plastischen Massen besonders auf Homogenität und stets gleichbleibende Eigenschaften ankommt, wurden die beiden Projekttonne hier als Mahltone eingesetzt.

## **2.2 Prozesstechnik**

In den folgenden Grafiken sind übliche Prozessabläufe der Tonaufbereitung am Beispiel des Projektpartners WBB als Übersicht dargestellt. Dies umfasst die Produktion von Grubenton, die nasse Prozessroute der Herstellung von Sprühgranulaten sowie die Produktion plastischer Fertigmassen. Anhand dieser wurden mögliche Implementierungspunkte für in Frage kommende biotechnologische Tonveredelungsmaßnahmen identifiziert.

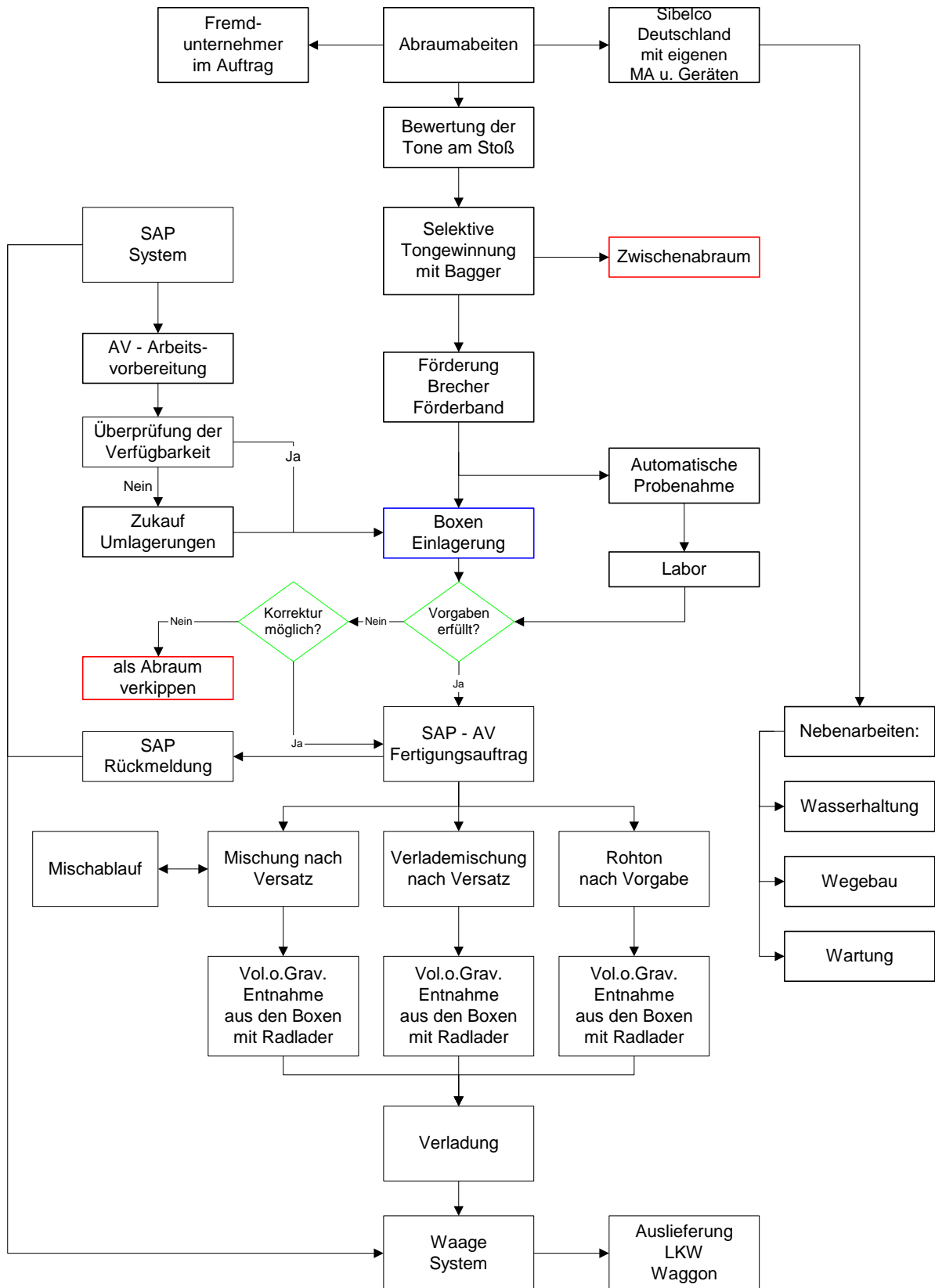
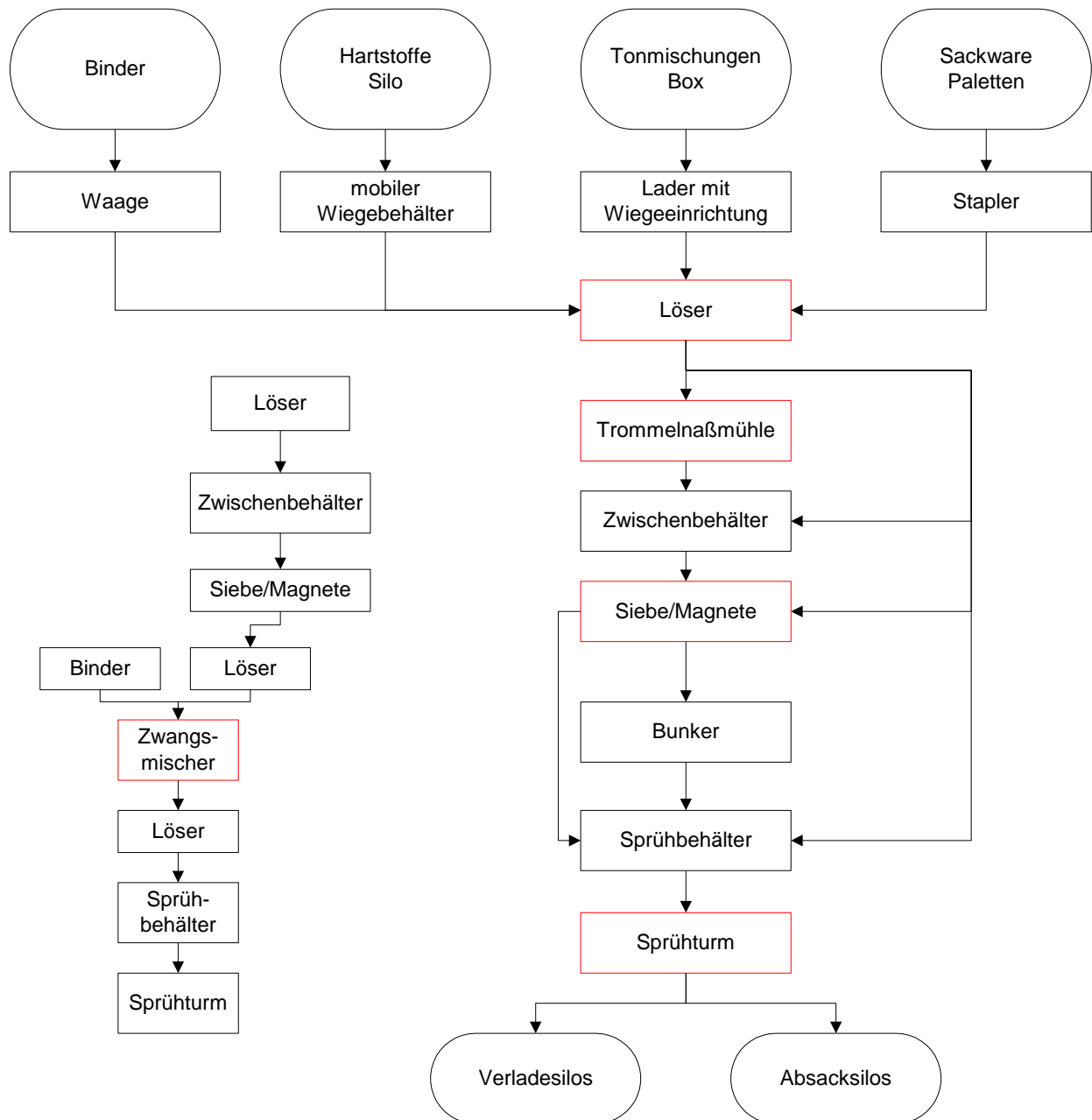
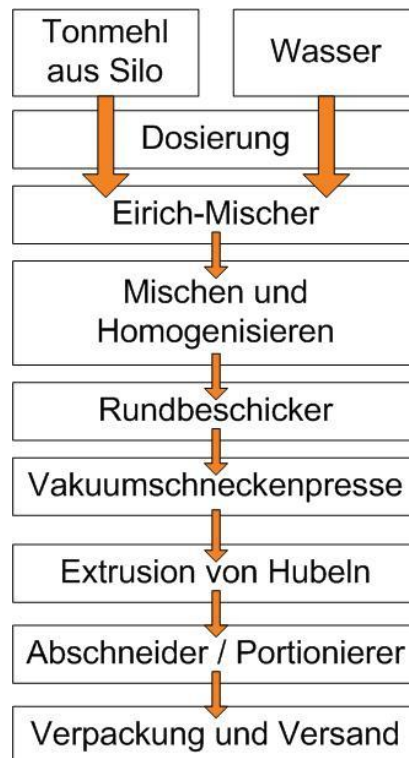


Abbildung 2: Produktionsablauf Grubenton



**Abbildung 3: Produktionsablauf Sprühgranulat Aufbereitungsanlage KBL**



**Abbildung 4: Produktionsablauf Aufbereitungsanlage Fertigmassenherstellung**

Als Einsatzstellen zur Implementierung biotechnischer Prozesse sind folgende Prozessknotenpunkte denkbar:

- Direktes Beimpfen von Lagerstätten (einbringen durch Bohrlöcher) mit passenden Mikroorganismenkulturen
- Besprühen von geförderten Rohstoffen mit Kulturen oder Additiven in der Lagerbox, beim Zerkleinern oder während des Aufbaus einer Mischhalde
- Einbringen von Kulturen oder mikrobiellen Produkten bei der Verarbeitung zu plastischer Masse, z.B. im Tonschnitzler, Sumpfhäuser, Walzwerk, Siebrundbeschicker, oder in der Vakuumstrangpresse zur Hubelherstellung der Fertigmassen
- Einbringen von Kulturen oder Additiven bei der Herstellung von nassaufbereiteten Rohstoffen im Löser, Rührbehältern, oder Bunkern
- Verwendung von biotechnisch präpariertem Prozesswasser zum Ansetzen von plastischen Fertigmassen

Eine sinnvolle Auswahl dieser Einbringungsmethoden wurde in der Forschungsphase des Bioton-Projekts behandelt. Die verschiedenen, ausgewählten Möglichkeiten und die entsprechenden Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln des vorliegenden Berichts beschrieben und bewertet.

## 2.3 Basischarakterisierung der ausgewählten Rohstoffe

Im Rahmen der Basischarakterisierung wurden die beiden ausgewählten Tonrohstoffe W1 und W2 von den Partnern mit deren zur Verfügung stehenden etablierten Standardmethoden analysiert.

Dies umfasst die Standardcharakterisierungen wie z.B. Korngrößenverteilung, chemische Zusammensetzung und ausgewählte Parameter zur Einstufung der Verarbeitungseigenschaften, wie sie auch z.B. im Rahmen der Qualitätssicherung bei WBB durchgeführt werden. In folgenden Tabellen sind die entsprechenden Analyseergebnisse der beiden Projekt-Tone vergleichend gegenübergestellt.

**Tabelle 2: Chemische Analyse der beiden Projekttonne**

		<b>W 1 (Bio Ton Geigenflur)</b>	<b>W 2 (Bio Ton Petschmorgen)</b>
<b>Chem. Analyse XRF</b>			
SiO <sub>2</sub>	[Masse %]	75,2	69,0
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[Masse %]	19,1	24,4
TiO <sub>2</sub>	[Masse %]	1,3	1,4
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[Masse %]	1,5	1,5
CaO	[Masse %]	0,3	0,2
K <sub>2</sub> O	[Masse %]	2,1	2,9
MgO	[Masse %]	0,2	0,4
Na <sub>2</sub> O	[Masse %]	n.n.	n.n.
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[Masse %]	0,0	0,0
MnO	[Masse %]	< 0,01	< 0,01
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[Masse %]	0,0	0,0
SO <sub>3</sub>	[Masse %]	0,1	0,0
ZnO	[Masse %]	< 0,01	< 0,01
ZrO <sub>2</sub>	[Masse %]	0,1	0,1
Summe	[Masse %]	99,9	99,9
Glühverlust	[Masse %]	5,2	6,4

Bemerkenswert ist, dass die beiden Tonsorten eine recht ähnliche chemische Zusammensetzung zeigen, bezüglich ihrer Plastizität jedoch völlig unterschiedlich sind.

**Tabelle 3: Lösliche Salze und Kohlenstoff/Stickstoff/Schwefel-Analyse der beiden Projekttonne**

		<b>W 1 (Bio Ton Geigenflur)</b>	<b>W 2 (Bio Ton Petschmorgen)</b>
<b>Lösliche Salze</b>			
Na	[mg/kg]	65,94	50,78
K	[mg/kg]	23,34	5,6
Mg	[mg/kg]	11,67	3,85
Ca	[mg/kg]	38,52	11,09
Cl	[mg/kg]	67,23	47,39
SO <sub>4</sub>	[mg/kg]	181,84	13,07
NO <sub>3</sub>	[mg/kg]	< 6	< 6

**CNS-Analyse**

N-Gehalt	[Masse-%]	0,1	0,1
	STABW [%]	12	23
S <sub>ges</sub> -Gehalt	[ppm]	381	90
	STABW [%]	15	16
C <sub>ges</sub> -Gehalt	[Masse-%]	0,17	0,05
	STABW [%]	3	9
C <sub>carbonatfrei</sub>	[Masse-%]	0,17	0,04
	STABW [%]	0,5	4,3
C <sub>Carbonat</sub>	[Masse- %]	0,00	0,01

**Tabelle 4: Plastizitätsbeschreibende Parameter und Trockenbiegefestigkeit der beiden Projekttonne**

		<b>W 1 (Bio Ton Geigenflur)</b>	<b>W 2 (Bio Ton Petschmorgen)</b>
<b>Plastizitätsbeschreibende Parameter (WBB)</b>			
Pfefferkorn 3.3	[%]	27,6	29
Pfefferkorn 2.5	[%]	26,1	27,4
Pfefferkorn 2.0	[%]	24,5	25,7
Bowmakerwert		523	572
TBF	[N/mm <sup>2</sup> ]	7,5	5,4

**Tabelle 5: Korngrößenverteilung der beiden Projekttone**

	<b>W 1 (Bio Ton Geigenflur)</b>	<b>W 2 (Bio Ton Petschmorgen)</b>
--	-----------------------------------------	-------------------------------------------

**Korngrößenverteilung Sedimentationsanalyse (WBB)**

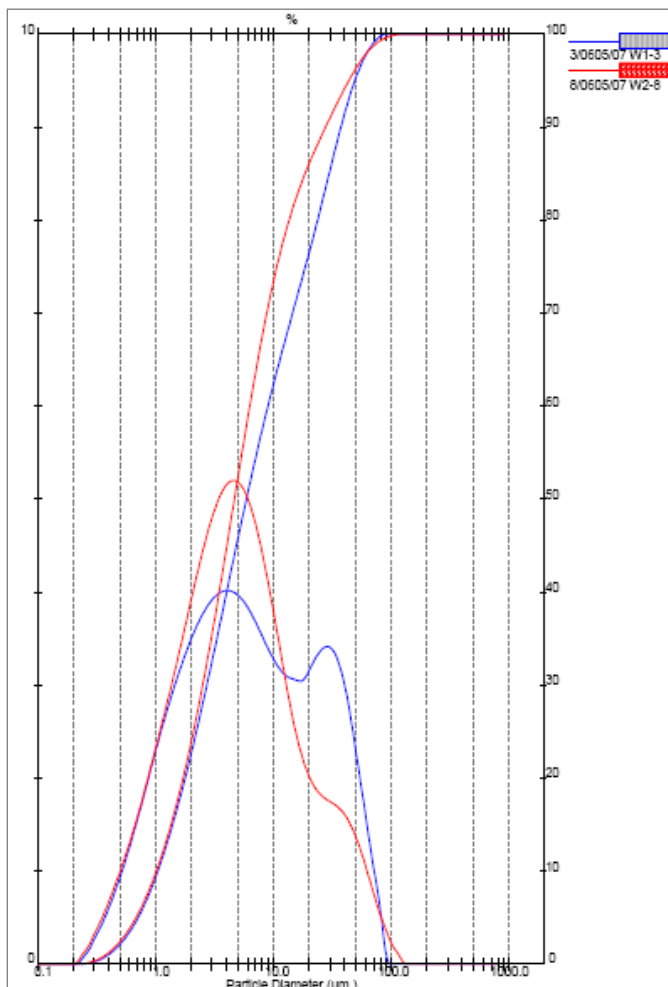
> 63 µm	[%]	1	3,2
< 20 µm	[%]	90	87
< 6,3 µm	[%]	79	77
< 2 µm	[%]	67	63
< 0,63 µm	[%]	56	48

**Nasssiebung (WBB)**

Rückstand > 63 µm	[%]	0,7	1,8
-------------------	-----	-----	-----

**Korngrößenverteilung Lasergranulometrie**

D10-Wert	[µm]	1,04	1,01
D50-Wert	[µm]	5,86	4,64
D90-Wert	[µm]	37,17	27,53



**Abbildung 5: Korngrößenverteilung (Lasergranulometrie; Probe dispergiert in 0,1 %-iger Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-Lösung) von W1 (blaue Kurve) und W2 (rote Kurve)**



Weiterhin wurde der Mineralphasenbestand der Proben W1 und W2 ermittelt. Beide Proben enthalten Kaolinit, Illit, Feldspäte,  $\text{TiO}_2$ , Quarz und Wechsellagerungsminerale mit quellfähigen Anteilen. Der Bestimmung der Art und Anteile quellfähiger Tonminerale kommt eine besondere Bedeutung zu, da diese in hohem Maße das rheologische Verhalten der Tonrohstoffe beeinflussen (Kaufhold und Penner, 2006). Die intensive Charakterisierung dieser Mineralphasen wird in Kapitel 3.1 näher beschrieben.

Aus der Rietveldanalyse geht hervor, dass der Kaolinit in beiden Proben fehlgeordnet ist, wobei Unterschiede zwischen beiden Proben beobachtet wurden. Die Rietveldanalytik führte zur Überbestimmung des Anteils quellfähiger Tonminerale in der Probe hinsichtlich der ermittelten Kationenaustauschkapazität sowie des Hydratwassergehaltes.

Beim Abgleich der XRF-Daten mit den Ergebnissen der Rietveldanalytik wurden unter Verwendung eines fehlgeordneten Strukturmodells für den Kaolinit bessere Übereinstimmungen erzielt.

Die Kationenaustauschkapazität beider Proben ist gering, weist aber deutlich auf quellfähige Tonminerale (5-10%) hin. In Übereinstimmung mit dem bestimmten Hydratwassergehalt enthält die Probe W1 die doppelte Menge quellfähige Tonminerale gegenüber W2. Mittels Rietveldanalyse wurden deutlich erhöhte Gehalte an quellfähigen Tonmineralen von 11-18% bestimmt.

### 3 Laborphase Basisforschung

Der Rohstoff Ton bringt aufgrund seiner speziellen Eigenschaften bezüglich Mineralogie und Lebensbedingungen für Mikroorganismen extrem hohe Anforderungen an Analysemethoden mit sich. Für die mikrobiologische Charakterisierung sind bislang kaum Standardmethoden verfügbar und auch die Untersuchung und Quantifizierung der vorliegenden Mineralogie ist von erheblicher Komplexität geprägt. Ebenfalls ist es sehr anspruchsvoll, Eigenschaften wie Plastizität und Prozessfähigkeit quantifiziert greifbar zu machen.

Im Rahmen der Laborphase Basisforschung (Arbeitspaket 4) wurden nun vorhandene Analysemethoden zur Mikrobiologie, Mineralogie und Verarbeitbarkeit getestet und für eine optimierte Charakterisierung der Tonmatrix angepasst und weiterentwickelt.

Mit dem so zusammengestellten Werkzeugkasten wurden die Projekttonne einer umfassenden und interdisziplinären Intensiv-Analyse unterzogen.

Dies beinhaltete die qualitative und quantitative Analyse der vorliegenden Mineralphasen. Tone sind durch ihren Phasenbestand (Tonminerale und andere mineralische sowie nichtmineralische Phasen) und ihr Gefüge (räumliche Anordnung aller Phasen) charakterisiert. Die Tonminerale sind Hauptbestandteil von Tonen und damit eigenschaftsbestimmend. Tonminerale unterscheiden sich aufgrund ihrer Struktur (1:1 Schichtsilicate und 2:1 Schichtsilicate) auch in der Morphologie bzw. in der Ladungsverteilung. Sowohl Struktur als auch Ladungsverteilung und Morphologie sind entscheidend für die rheologischen Eigenschaften. Ebenfalls ist das Verhältnis von 1:1 und 2:1 Mineralen hierfür ausschlaggebend. Deshalb ist eine konsistente quantitative Phasenanalyse unter Kombination der Röntgenbeugungsanalyse (Rietveldanalytik) mit weiteren mineralogischen Verfahren (u.a. RFA und Simultane Thermische Analyse) unerlässlich.

Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen wurden relevante biochemische und mikrobiologische Eigenschaften gemessen und vorhandene mikrobielle Populationen erfasst. Es wird angenommen, dass vor allem Mikroorganismen, die EPS (Extrazelluläre Polymere Substanzen) bilden, die plastischen Eigenschaften von Tonen beeinflussen können. Daher wurde der Schwerpunkt insbesondere auf eine Charakterisierung mikrobieller Populationen verschiedener Tone bezogen auf die Eigenschaft der EPS-Bildung gelegt.

Gleichzeitig wurden im Rahmen der keramtechnischen Charakterisierung anwendungsbezogene Untersuchungen durchgeführt. Diese beinhalteten unter anderem Tests zum Einfluss verschiedener mikrobieller Stoffwechselprodukte und EPS auf Rheologie und Plastizität von Tonschlickern und –Massen sowie auf die Trockenbiegefestigkeit stranggepresster Probekörper.

Die Arbeiten der Basisforschung bilden die Grundlage für die weiteren Versuchsreihen zur Untersuchung mikrobieller Effekte auf Tonmassen und deren Möglichkeiten zu einer gezielten Nutzung.

## 3.1 Mineralogische Analysen

### 3.1.1 Korngrößenverteilung und verarbeitungsrelevante Eigenschaften

Die beiden Proben zeigten im bergfeuchten Zustand sehr ähnliche durchschnittliche mineralogische Wassergehalte, die aus jeweils sechs Versuchsreihen in Doppelbestimmung erhalten wurden: W1=13.4% (s=0.4%) und W2=13.7% (s=1.0%).

Zur Detektierung des Einflusses des Dispergiermediums auf die Korngrößenverteilung wurde die Fraktionierung auf zwei Arten durchgeführt: zum einen, wie bei der industriellen Rohstoffcharakterisierung üblich, unter Verwendung einer 0.01-molaren Na-Pyrophosphatlösung und, zum anderen, unter Verwendung von VE-Wasser.

Die in Tabelle 6 dargestellten Korngrößenverteilungen zeigen deutliche Unterschiede sowohl hinsichtlich der Art des Dispergiermediums als auch zwischen den beiden Proben. Die Verwendung von Na-Pyrophosphat führte bei beiden Proben zu einer Massenverschiebung in Richtung kleinerer Fraktionen, die besonders stark ausgeprägt in der Fraktion <0.6 µm für beide Proben war.

Unabhängig von der Dispergierungsart, zeigte die Probe W1 einen insgesamt größeren Massenanteil innerhalb der Tonfraktionen <2 µm.

**Tabelle 6: Korngrößenverteilung der Proben W1 und W2 mit und ohne Na-Pyrophosphat als Dispergierhilfsmittel**

Korn- größenfraktion	mit		ohne	
	Na-Pyrophosphat		Na-Pyrophosphat	
	W1	W2	W1	W2
[µm]	[wt%]	[wt%]	[wt%]	[wt%]
>63	2	5	2	5
20-63	18	17	19	21
2-20	27	28	31	31
0.6-2	10	21	24	39
<0.6	43	29	24	4

Tabelle 7 verdeutlicht, dass die im Vergleich zu W2 als “plastischer” geltende Probe W1 sowohl durch einen höheren Anmachwasserbedarf als auch durch einen größeren Druck beim Extrudieren gekennzeichnet ist.

**Tabelle 7: Phänomenologische Beschreibung und verarbeitungsrelevante Eigenschaften der keramischen Tone**

<b>Probe</b>	<b>W1</b>	<b>W2</b>
Farbe	grau	crèmefarben
Durchschnittliche Aggregatgröße des Ausgangsmaterials im bergfeuchten Zustand	1-1.5 cm	≈0.5 cm
Dispersibilität in Wasser	leicht dispergierbar	schwererer dispergierbar unter Bildung eines zähen Bodensatzes
Verarbeitungseigenschaften	plastisch	weniger plastisch
- Extrusion	37 bar	23 bar
- Anmachwasserbedarf	28.0 %	26.5 %

Die aus sechs Versuchsläufen in Doppelbestimmung gemittelten pH-Werte von W1 und W2 waren sehr ähnlich innerhalb der Standardabweichung: 6.1 (s=0.8) für W1 und 6.9 (s=0.7) für W2. Die Konzentration löslicher Salze, gemessen anhand der Anionenkonzentration von  $\text{SO}_4^{2-}$  und  $\text{Cl}^-$  betrug 479 mg/kg (s=171 mg/kg) und 116 mg/kg (s=13 mg/kg) für W1 und 37 mg/kg (s=8 mg/kg) und 79 mg/kg (s=5 mg/kg) für W2. Die insgesamt höhere Konzentration löslicher Salze der Probe W1 spiegelte sich auch in der größeren elektrischen Leitfähigkeit  $\sigma$  wider, die mit 400  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (s=99  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) rund achtfach höher war im Vergleich zu W2 (51  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , s=11  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

### 3.1.2 Quantitativer Phasenbestand

Der mineralogische Phasenbestand des Gesamtmaterials von W1 und W2 als auch deren Tonfraktionen wurde mit Hilfe eines Multi-Methoden Ansatzes bestimmt, der die Auswertung von Röntgendiffraktogrammen (XRD) mittels Rietveld-Analyse sowie eindimensionaler Modellierung (ODPF), Röntgenfluoreszenz-Analyse (XRF), Simultane Thermische Analyse (STA), die Bestimmung der Kationenaustauschkapazität (CEC), mikroskopische Untersuchungen (Lichtmikroskopie und ESEM) und Mößbauer-Spektroskopie beinhaltet. Die Kombination verschiedener Analyseverfahren, die in Abbildung 6 dargestellt sind, ermöglicht eine quantitative Annäherung des mineralogischen Phasenbestandes. Eine detaillierte Beschreibung des Quantifizierungsverfahrens ist in Petrick et al. (2011) zu finden.

Die Untersuchung des Gesamtmaterials mittels XRF und XRD zeigte, dass die Proben W1 und W2 durch eine sehr ähnliche chemische (Tabelle 8) und mineralogische Zusammensetzung charakterisiert sind.

Beide Proben enthalten Quarz, Kaolinit, Illit, quellfähige Komponenten (vorliegend als I-S Wechsellagerungsminerale und/oder als Smectit), Feldspäte, Rutil und geringe Anteile an Fe-haltigen Phasen.

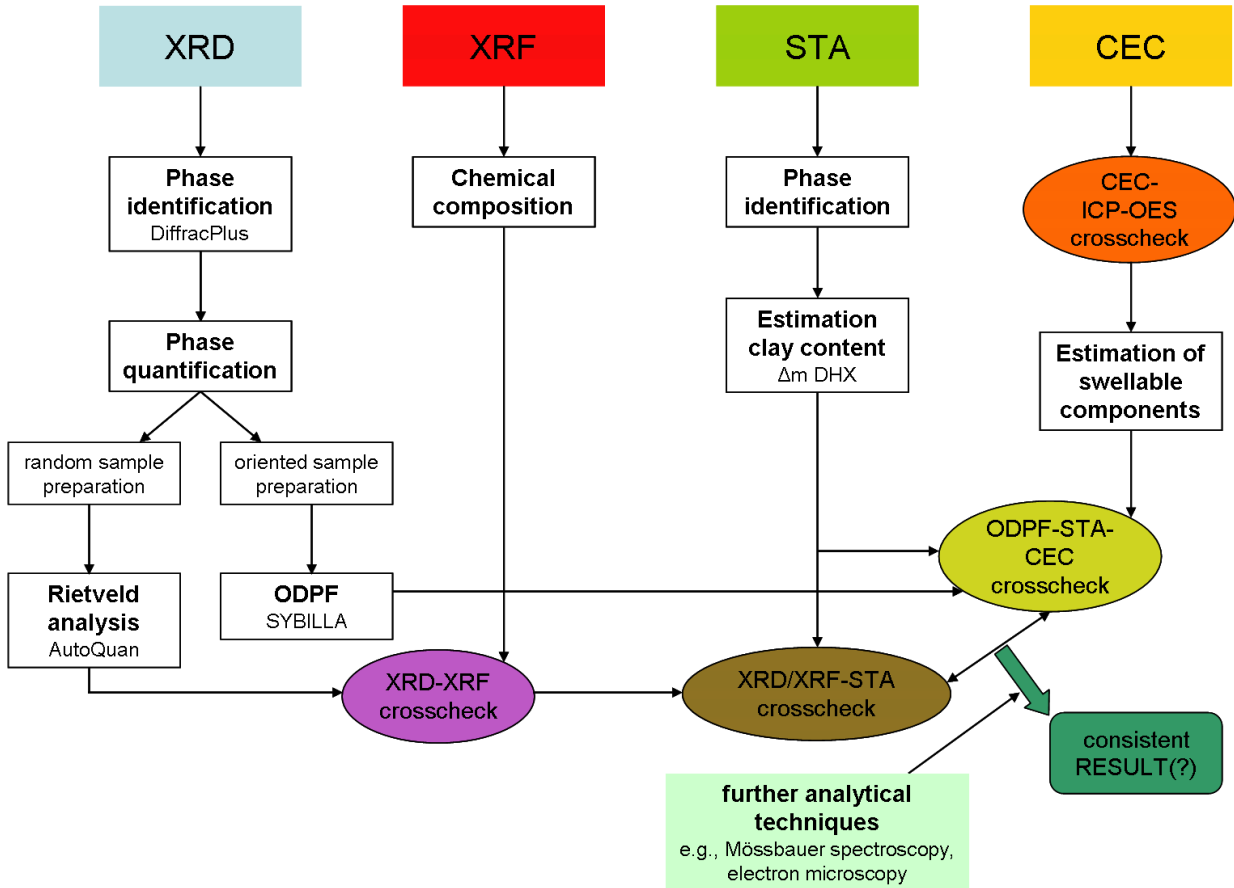


Abbildung 6: Fließschema der analytischen Methoden zur mineralogischen Charakterisierung der keramischen Tone

**Tabelle 8: Chemische Zusammensetzung des Gesamtmaterials von W1 und W2 und der Tonfraktionen <2 µm. Die Werte sind auf den Glühverlust bei 1000 °C (LOI) normiert**

	Chemische Zusammensetzung [%]					
	W1 gesamt	W2 gesamt	W1 0.6-2 µm	W2 0.6-2 µm	W1 <0.6 µm	W2 <0.6 µm
SiO <sub>2</sub>	74.79	75.27	57.24	53.86	52.93	52.66
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	19.40	18.94	33.12	36.55	38.50	39.33
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.54	1.44	1.99	2.24	2.71	1.95
MgO	0.43	0.45	0.72	0.81	0.79	0.89
CaO	0.28	0.22	0.37	0.36	0.61	0.63
Na <sub>2</sub> O	0.12	0.09	0.28	0.21	0.25	0.24
K <sub>2</sub> O	2.11	2.34	4.14	4.33	3.30	3.99
TiO <sub>2</sub>	1.32	1.25	2.15	1.65	0.93	0.31
LOI	6.25	5.63	9.42	10.30	12.70	12.24

Anhand eindimensionaler Modellierung von Röntgendiffraktogrammen unter Verwendung des Modellierungsprogramms SYBILLA konnten die Anteile an I-S-Wechselagerungen, Illit, Smectit und Kaolinit innerhalb der Tonfraktionen <2 µm quantifiziert werden (Tabelle 9). Unterschiede zwischen W1 und W2 wurden im intrinsischen Illit-Smectit-Verhältnis der Wechselagerungen, ihrem Ordnungsprinzip (Reichweite), als auch im Smectit-Anteil beobachtet.

**Tabelle 9: Quantitativer Phasenbestand der Fraktionen <2 µm ermittelt durch eindimensionale Modellierung von Röntgendiffraktogrammen. W<sub>a</sub>: Anteil der zuerst genannten Komponente in der Wechselagerung**

	W1 0.6-2 µm [%]	W2 0.6-2 µm [%]	W1 <0.6 µm [%]	W2 <0.6 µm [%]
Kaolinit	44	48	57	63
Smectit	4	2	4	0
I-S	31	19	32	22
-Reichweite	R3	R1	R3	R1
-W <sub>a</sub>	0.90	0.85	0.90	0.80
Illit	21	31	7	15

Anhand der aus der Korngrößenfraktionierung gewonnen Massenanteile und unter der Annahme einer korrekten Quantifizierung des Verhältnisses Tonmineral/Nicht-Tonmineral mittels Rietveld-Analytik wurde der Phasenbestand des Gesamtmaterials von W1 und W2 berechnet (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Phasenbestand der keramischen Tone W1 und W2**

Mineral	W1 [%]	W2 [%]
Quarz	43	46
Feldspat	3	3
Rutil	<1	<1
Tonminerale	53	50
- Kaolinit	27	25
- Illit	7	15
- Smectit	2	0
- I-S Wechselagerungsminerale	17	10
- smectitische Komponenten*	4	2

\* Σ(Smectit; smectitischer Anteil in den I-S Wechselagerungen)

Die Kationenaustauschkapazität (CEC) wurde mittels Cu-Trien-Methode bei pH 7 bestimmt. Die aus der Doppelbestimmung gemittelten Werte des Gesamtmaterials betragen 9 meq/100g für W1 und 7 meq/100g für W2. Die Werte nahmen mit kleiner werdender Fraktion (0.6-2 µm, <0.6 µm) von 10 meq/100g auf 19 meq/100g für W1 und von 12 meq/100g auf 18 meq/100g für W2 zu.

Der Anteil quellfähiger Komponenten (Summe aus Smectit und Smectit in den I-S Wechsellagerungen) wurde gemäß der in Petrick et al. (2011) beschriebenen Methode berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Der Vergleich der mittels ICP-OES bestimmten Gehalte austauschbarer Kationen in der Austauschlösung mit den Werten der CEC zeigte, dass die Zwischenschichten der quellfähigen Komponenten durch  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  dominiert sind. Die mittels ICP-OES bestimmte Summe ausgetauschter Kationen ( $\Sigma$ ) lag für beide Probensätze im Wertebereich der mittels CEC bestimmten Ergebnisse.



**Tabelle 11: Gehalt austauschfähiger Kationen und gemessener CEC (CEC meas) des Gesamtmaterials und der Fraktionen 0.6-2 µm und <0.6 µm. %CEC: Verhältnis der Summe ausgetauschter Kationen ( $\Sigma$ ) zu gemessener CEC. CEC corr: korrigierte CEC gemäß Petrick et al. (2011).  $w_{sc}$ : Anteil quellfähiger Komponenten gemäß CEC-Messung**

Kation	W1 bulk [meq/100g]	W2 bulk [meq/100g]	W1 0.6-2 µm [meq/100g]	W2 0.6-2 µm [meq/100g]	W1 <0.6 µm [meq/100g]	W2 <0.6 µm [meq/100g]
Na <sup>+</sup>	0	0	0	0	0	0
Mg <sup>2+</sup>	3	2	2	3	5	4
K <sup>+</sup>	0	0	1	0	1	1
Ca <sup>2+</sup>	7	5	6	6	12	12
$\Sigma$	10	7	9	9	18	17
CEC meas	9	7	10	12	19	18
percentage CEC [%]	111	100	90	76	95	97
CEC korr.	6	4	6	7	13	12
$w_{sc}$ [%]	8	5	7	9	17	15

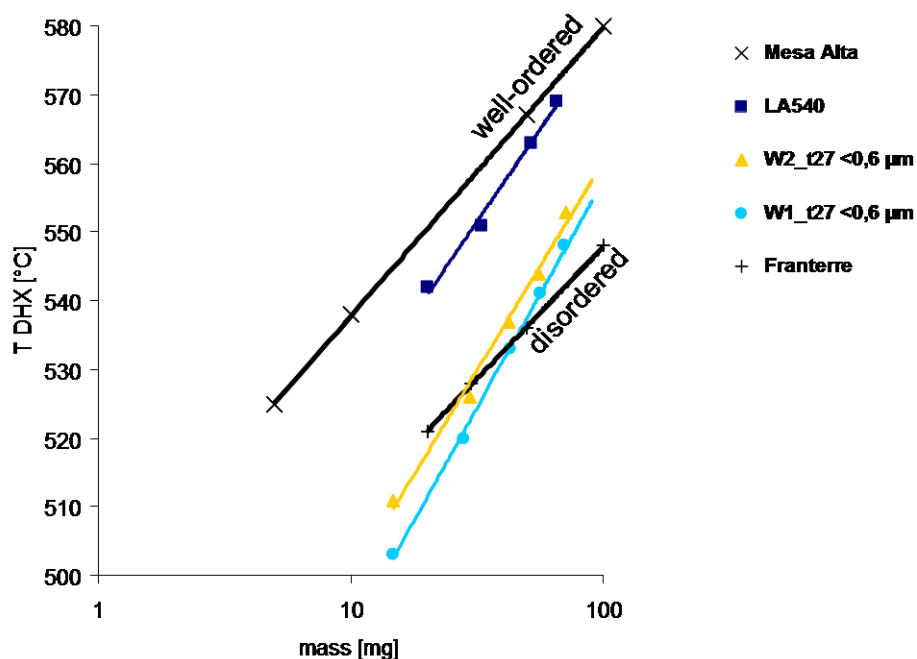
Die Untersuchung der größten Kornfraktion  $>63 \mu\text{m}$  mittels Lichtmikroskopie zeigte das Vorhandensein größerer Agglomerate, die durch gelblich-braune Fe-Überzüge verkittet waren. Diese Agglomerate wurden häufig in W2 detektiert, wohingegen W1 nur geringe Mengen enthielt. Untersuchungen mit ESEM-EDX bestätigten den hohen Fe-Gehalt der Überzüge. W1 zeigte vereinzelte kristalline Überzüge mit flachem, tabularen Habitus, wie er typisch für das "hahnenkammartige" Wachstum von Markasit ist (Rösler, 1991).

Die Fe-Verteilung wurde durch Mößbauer-Spektroskopie bestimmt (Tabelle 12). Das Gesamtmaterial von W2 enthielt viermal mehr oxidisch-gebundenes Fe als das von W1. Für W1 blieb das Verhältnis von silikatisch zu oxidisch-gebundenem Fe mit abnehmender Korngröße nahezu konstant, während sich das Verhältnis für W2 erhöhte.

**Tabelle 12: Durch Mößbauer-Spektroskopie bestimmte Fe-Verteilung des Gesamtmaterials und der Fraktion  $<0.6 \mu\text{m}$  der Proben W1 und W2**

Probe	silikatisch- gebundenes Fe	oxidisch- gebundenes Fe
	[%]	[%]
W1 gesamt	88	12
W1 $<0.6 \mu\text{m}$	90	10
W2 gesamt	49	51
W2 $<0.6 \mu\text{m}$	77	23

Die Bestimmung des Fehl Ordnungsgrades der Kaolinit-Struktur wurde durch die Aufnahme von PA-Kurven mittels STA erbracht (Smykatz-Kloss, 1974). Hierzu wurden PA-Kurven der Fraktion  $<0.6 \mu\text{m}$  beider Proben detektiert und mit Proben bekannten Fehl Ordnungsgrades verglichen (Abbildung 7). Als Schwellenwerte dienten ein geordneter Kaolinit (Mesa Alta) und eine stark fehlgeordneter Kaolinit (Franterre), deren Daten aus Symkatz-Kloss (1974) entnommen wurden. Als weiterer Vergleich und zur Detektion gerätespezifischer Effekte, wurde die im Projektteil Metallspeziessolubilisierung untersuchte Probe LA540 mit einbezogen. Die PA-Kurven von W1 und W2 plotteten beide nah an der stark fehlgeordneten Probe Franterre, was auf hohe Fe-Gehalte in der Kaolinit-Struktur beider Proben schließen lässt.



**Abbildung 7: PA-Kurven zur Abschätzung des strukturellen Fehl Ordnungsgrades des Kaolinitis. Fette Linien: PA-Kurven eines geordneten und eines fehlgeordneten Kaolinitis als Vergleichsproben nach Symkatz-Kloss (1974). LA540: Vergleichsprobe aus dem Bioton-Projekt (Projektteil Metallspezieslöslichkeit)**

### 3.1.3 Diskussion

Wie in Tabelle 6 gezeigt, hängt die Korngrößenverteilung stark von der Dispergierungsmethode ab. Die Verwendung von Na-Pyrophosphat führt zu einer Massenverschiebung in Richtung kleinerer Fraktionen, welche durch die Zerstörung größerer Aggregate und zur Bildung diskreter Partikel bewirkt wird. Die Absorption von Pyrophosphat-Anionen an den positiv geladenen Mineraloberflächen erhöht ihre Abstoßung und somit ihr Dispersionsvermögen in Wasser (Jeanroy and Guillet, 1981).

Da die Proben allerdings unterschiedlich auf die Behandlung mit Na-Pyrophosphat reagierten, kann der oben beschriebene elektrostatische Teilchenstabilisierungseffekt nicht den alleinigen Grund der Massenverschiebung darstellen.

Mikroskopische Untersuchungen und Mößbauer-Spektroskopie haben gezeigt, dass sich beide Proben hinsichtlich der Fe-Verteilung unterscheiden. W1 enthält vornehmlich silikatisch gebundenes Fe, wobei das Fe in der Probe W2 hauptsächlich oxidisch gebunden vorliegt, erkennbar an den gelblich-braunen Goethit-reichen Überzügen, die kleinere Partikel zu größeren verkitten und größere Aggregate „vortäuschen“.

Der Einfluss verschiedener Fe-Oxidspesies auf das Aggregationsverhalten von Tonen ist ein bekanntes Phänomen (Colombo und Torrent, 1991; Cornell und

Schwertmann, 2003). Ebenso bekannt ist, dass Pyrophosphat die Fähigkeit besitzt, schwach kristallisierten Goethit zu lösen (Bascomb, 1968). Durch die Entfernung verkittender Fe-Überzüge kann die –im Vergleich W1- starke Anreicherung der Probe W2 innerhalb der Fraktion  $<0.6 \mu\text{m}$  erklärt werden.

Gemäß Ongley et al. (1981), führen die unterschiedlichen Behandlungsarten zu einer absoluten (dispergierte Partikel) und einer effektiven (Agglomerate vorhanden) Korngrößenverteilung. Diese gegensätzlichen Zustände spielen eine wichtige Rolle hinsichtlich der rheologischen Eigenschaften von Tonen, nicht nur für keramische Anwendungen, sondern auch in der Papierindustrie (Grafton, 1968).

Signifikante Unterschiede zwischen W1 und W2 sind in der Konzentration löslicher Salze zu beobachten. Die Freisetzung von  $\text{SO}_4^{2-}$  ist rund 12-fach gegenüber W2 erhöht, was sich auch in einer größeren elektrischen Leitfähigkeit manifestiert. Die Sulfat-Freisetzung ist auf die Oxidation von Markasit zurückzuführen (Rimstidt and Vaughan, 2003), da Markasit das einzige Sulfat-führende Mineral innerhalb der mineralogischen Zusammensetzung beider Proben ist. Die höhere  $\text{SO}_4^{2-}$ -Konzentration von W1 steht in Einklang mit dem Nachweis von Markasit mittels ESEM. Sowohl die sehr geringe  $\text{SO}_4^{2-}$ -Konzentration, wie auch die Ergebnisse der Mößbauer-Spektroskopie und die Beobachtung gelblich-brauner Fe-Überzüge, deuten darauf hin, dass das Fe in W2 hauptsächlich oxidisch gebunden vorliegt, höchstwahrscheinlich als Goethit.

Die größere Konzentration löslicher Salze von W1 erklärt die höhere Dispersibilität der Probe in Wasser. Penner und Lagaly (2001) haben gezeigt, dass mehrwertige Anionen einen stark verflüssigenden Effekt auf Kaolinit-reiche Dispersionen ausüben. Dies ist auf die Kantenumladung, die eine Aufhebung der Kanten(+)/Flächen(-)-Wechselwirkung bedingt, zurückzuführen (Rand und Melton, 1977) und resultiert in einer geringeren Viskosität.

Der Einfluss des pH-Wertes kann nicht zur Erklärung der unterschiedlichen Verarbeitungseigenschaften von W1 und W2 herangezogen werden, da dieser – innerhalb der Standardabweichung- für beide Proben gleich ist.

Kromer und Rose (1994) haben festgestellt, dass die Zunahme quellfähiger Komponenten einer Verflüssigung tonmineralhaltiger Dispersionen entgegenwirkt. Die unterschiedlichen Verarbeitungseigenschaften von W1 und W2 hinsichtlich ihres Anmachwasserbedarfs und Extrusionsverhaltens sind, neben den eben diskutierten physikalisch-chemischen Parametern, auch im mineralogischen Phasenbestand zu suchen.

Für das Gesamtmaterial von W1 und W2 lagen die Abweichungen zwischen den mittels XRF gemessenen Elementoxidkonzentrationen und die in Elementoxid-konvertierte Gehalte aus der Rietveld-Analyse für alle Elementoxide unterhalb von 0.5%. Etwas größere Abweichungen wurden für  $\text{SiO}_2$  und  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , sowie  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  verzeichnet. Die Abweichungen im  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -Gehalt erklärt sich daraus, dass die Konzentration Fe-führender Minerale für beide Proben unterhalb der Nachweisgrenze für XRD liegt (Bland et al., 2004).

Wie mittels Mößbauer-Spektroskopie gezeigt, ist das Fe in beiden Proben zu einem Teil strukturell in den Silicaten gebunden, was den XRD-detektierbaren Fe-Anteil nochmals reduziert. Ein weiterer Hinweis für das Vorhandensein strukturell-gebundenem Fe wurde anhand von PA-Kurven erbracht, die auf einen hohen Fehl Ordnungsgrad des Kaolinitis in beiden Proben schließen lassen. Der hohe Fehl Ordnungsgrad spiegelt sich auch in den schwachen, niedrigtemperierten Rekrystallisationsreaktionen beider Proben wider, die bereits als ein Charakteristikum Westerwälder Tone von Lippmann (1960) beschrieben worden sind.

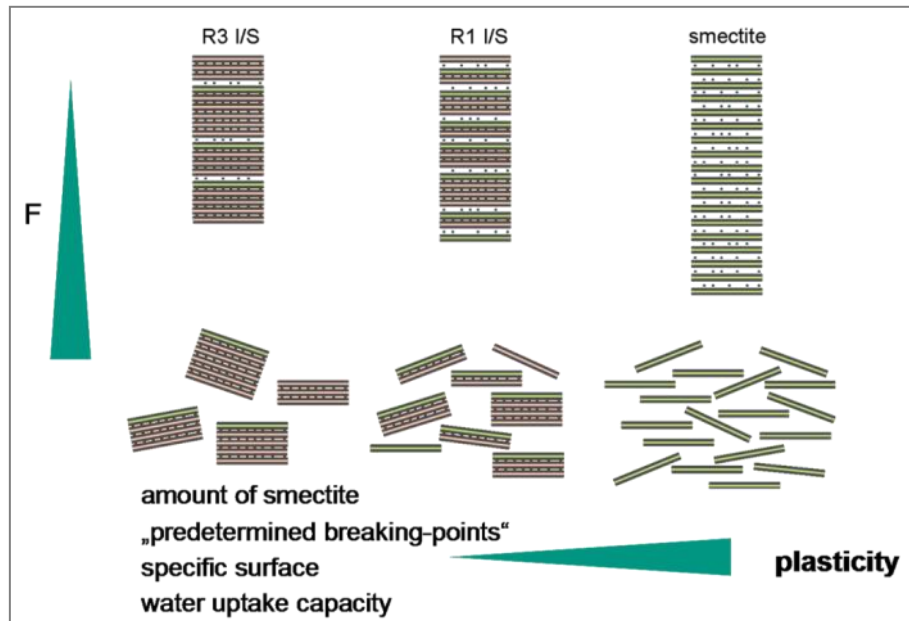
Abweichungen im  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ -Verhältnis werden durch das Fehlen eines kristallographischen Strukturmodells zur Beschreibung von I-S-Wechselagerungsmineralen innerhalb der Rietveld-Analytik verursacht. Die ungeeignete Anpassung macht sich vor allem in den tonmineralreichen Fraktionen  $<2 \mu\text{m}$  bemerkbar, in denen der  $\text{SiO}_2$ -Gehalt konsistent über- und der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Gehalt unterbestimmt wurde.

Mit der zur Überwindung dieses Problems angewandten eindimensionalen Modellierung (ODPF) wurden bessere Übereinstimmungen mit den anderen Quantifizierungsmethoden erzielt. Unterschiede von W1 und W2 sind vor allem durch Anteil und Ordnungsprinzip quellfähiger Komponenten bedingt.

Sowohl die Struktur als auch der Anteil quellfähiger Tonminerale in keramischen Tönen beeinflusst das Wasserbindevermögen, die Größe delaminierter Partikel und deren räumliche Anordnung während der Verarbeitung. Aufgrund ihrer geringeren Schichtladung, im Vergleich zu Illit, kann man sich die quellfähigen Komponenten als seine Art "Sollbruchstellen" vorstellen. Abbildung 8 verdeutlicht das Delaminationsverhalten und die damit verbundene Wasserzugänglichkeit der entstehenden Oberflächen am Vergleich eines R1 und eines R3 I-S-Wechselagerungsmineral mit den Delaminationscharakteristika eines reinen Smectits. Das Stattfinden von Delamination wird nicht nur im suspendierten Zustand erwartet, sondern auch in keramischen Massen bei der Applizierung ausreichend hoher Drücke, wie sie bei der Extrusion vorkommen.

Gemäß des Delaminationsmodells ist die höhere Plastizität von W1 durch die Anwesenheit von Smectit bedingt, der als "Schmierfilmbildner" das geringere Delaminationspotential der R3 I-S-Wechselagerungspartikel kompensiert. Im Gegensatz dazu bilden die R1 I-S Wechselagerungspartikel der Probe W2 dickere 2:1-Schichten bei der Delamination aus, die nicht oder nur erschwert in die interpartikulären Hohlräume passen, was zu einer geringeren Plastizität bei gleichem Kraftaufwand führt.

Die höhere Plastizität von W1 resultiert in einer größeren Trockenbiegefestigkeit als auch in einem höheren Anmachwasserbedarf und Extrusionsdruck. Diese Eigenschaften bedingen wiederum einen höheren Energiebedarf bei der plastischen Formgebung und bei der Trocknung der Keramik.



**Abbildung 8: Qualitatives Delaminationsmodell zur Veranschaulichung der Verarbeitungseigenschaften keramischer Tone: Beziehung zwischen Struktur und Ordnungsprinzip von 2:1 Schichtsilikaten und Delaminationsverhalten. F: externe Kraft**

### 3.1.4 Schlussfolgerungen zu mineralogischen Analysen

Die Verarbeitungseigenschaften keramischer Tone werden durch die Interaktion verschiedener Materialparameter beeinflusst. Die durchgeführte Studie hat gezeigt, dass sich die untersuchten Tone in den folgenden Parametern unterscheiden:

- (1) effektive Korngrößenverteilung
- (2) Konzentration löslicher Salze
- (3) Agglomerationsverhalten der Partikel bezüglich Fe-haltiger Überzüge
- (4) Anwesenheit von Smectit
- (5) Anteil und Ordnungsgrad der I-S-Wechselagerungsminerale.

Das aus den strukturellen Informationen abgeleitete qualitative Delaminationsmodell veranschaulicht, auf welche Weise der Anteil quellfähiger Komponenten die Verarbeitungseigenschaften keramischer Tone beeinflusst. Mit steigendem Anteil quellfähiger Komponenten nimmt auch der Anteil an "Sollbruchstellen" zu, was zur Folge hat, dass der Anteil an wasserzugänglichen Oberflächen zunimmt. Daraus ergibt sich, dass mikrostrukturelle Modifikationen für tonhaltige Systeme mit zunehmendem Anteil quellfähiger Komponenten leichter zu bewerkstelligen sind, was in einer größeren Plastizität resultiert.

Unter der besonderen Berücksichtigung quellfähiger Komponenten müssen allerdings weitere Studien durchgeführt werden, die die Quantifizierung der verarbeitungsrelevanten Parameter ermöglichen.

## 3.2 Mikrobiologische Untersuchungen

### 3.2.1 Mikrobiologische Basischarakterisierung der Tone

Zur mikrobiologischen Charakterisierung der Rohstoffe W1 und W2 wurden zunächst die Basisparameter KbE auf Sabouraud Agar und R2A nach aerober und anaerober Inkubation für 8 Tage bei 20°C ermittelt (Tabelle 13). Statistische Abweichungen um den Faktor 10 wurden beobachtet.

**Tabelle 13: KbE auf R2A Agar aerob/anaerob und Sabouraud Agar aerob**

	W1	W2
Bakterien je g FM aerob (R2A 8d)	$5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^6$
Bakterien je g FM anaerob (R2A 8d)	$8 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$
Pilze je g FM (Sabouraud 8d)	$2 \cdot 10^3$	0

Aufgrund der statistischen Abweichungen kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der auf R2A kultivierbaren Bakterien für beide Tone unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit  $10^5$  bis  $10^6$  Zellen je g Frischmasse betrug. Die Anzahl kultivbarer Mikroorganismen lag etwas unter dem erwartenden Bereich. Bei der Untersuchung von Tonen aus Iowa wurden in Rohstoffen aus 3 m Tiefe auf R2A  $10^7$  Bakterien je g Trockenmasse mittels Kultivierung nachgewiesen (Taylor et al. 2002). Bei einer Untersuchung diverser Böden in Tschechien und Frankreich wurden von Sagova-Mareckova et al. (2008) sogar eine Bakteriendichte von  $2 \cdot 10^9$  1/gTM bis  $5 \cdot 10^9$  1/gTM in tonigen Erden ermittelt. Allerdings wurde dieser Wert mittels direkter Zählung erhoben und berücksichtigt auch nicht kultivierbare Organismen. Unter Auswertung der Ergebnisse von Taylor et al. (2002) kann bezüglich der Abweichung zwischen kultivierbaren und direkt zählbaren Organismen in Tonrohstoffen jedoch grob ein Faktor von 100 angenommen werden. Dies kommt auch den Arbeiten von Torsvik et al. (1990) nahe, in welchen für die kultivierbaren Mikroorganismen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in Böden ein Wert von 0,3% angegeben wurde.

Aus den verdünnten Proben von W1 konnten auf Sabouraud Agar überwiegend Pilze in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^3$  Kolonien pro g Frischmasse kultiviert werden. Es ist allerdings zu beachten, dass dem Sabouraud Agar keine antibakteriellen Substanzen zugesetzt wurden und die Begünstigung des Pilzwachstums gegenüber den Bakterien durch den niedrigen pH-Wert und die hohe Glukosekonzentration erreicht werden sollte. Es war daher zu erwarten, dass auch säuretolerante Bakterien auf Sabouraud Agar kultiviert werden können. Deshalb wurde in der molekularbiologischen Analytik versucht, die DNA aus den Organismen, welche auf

Sabouraud Agar wachsen konnten, mit einem 16S rDNA-spezifischen Primerpaar zu amplifizieren.

Aus den Proben von Ton W2 konnte kein Wachstum von Mikroorganismen auf Sabouraud Agar nachgewiesen werden. Taylor et al. (2002) konnten ebenfalls kein Pilzwachstum in den Tönen aus Iowa ab einer Tiefe von 3 m beobachten. Bei diesen Untersuchungen wurden in den oberen Bodenschichten bis 30 cm Tiefe Pilz-KbE von  $10^4$  festgestellt.

Die im Verhältnis zu den Tonpartikeln großen Pilzsporen können mit dem Sickerwasser nicht in die Tiefe transportiert werden. Weiterhin ist das Tiefenwachstum der Hyphen physiologisch begrenzt sowie, aufgrund der höheren Nährstoffverfügbarkeit in den oberen Bodenschichten, nährstoffmoduliert.

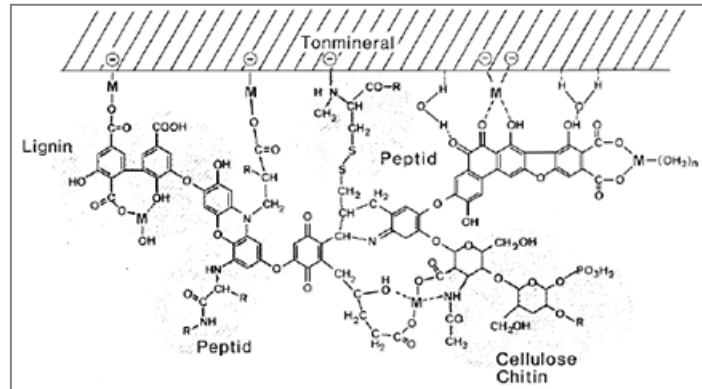
Um Mikroorganismen die Nährstoffe zu bieten, welche in ihrem natürlichen Lebensraum vorkommen, kann dem Agar Substrat aus dem ursprünglichen Habitat beigemischt werden. Sollen Organismen angezüchtet werden, deren natürliches Habitat Flüssigkeiten darstellen, können diese Flüssigkeiten unverdünnt mit Agar verfestigt und als Kulturmedium genutzt werden (Kaden 2009). Da dieses Vorgehen bei festen Substraten nicht möglich ist, wurden zur Anfertigung von Tonagar-Platten 50 g Tonpulver mit 15 g Agar und 1 l VE-Wasser vermischt, homogenisiert, autoklaviert und in Petrischalen ausgegossen.

Ausgespatelt wurden jeweils Verdünnungsstufen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  bezogen auf die Frischmasse der Tone. Die Inkubation erfolgte 8 Tage bei 20°C im Dunkeln. Ein Auszählen der Tonagarplatten war nur bedingt möglich, da das Medium nicht transluzent ist und die Kulturen einen relativ kleinen Koloniedurchmesser von bis zu 1 mm, in Ausnahmefällen bis 2 mm aufwiesen (Mikrokolonien). Daher wurden die Biomasse der Tonagarplatten nach dem Abwaschen der 1 ml PBS ausschließlich für molekularbiologische Analysen eingesetzt.

Neben der Analyse der kultivierbaren Mikroorganismen eignen sich die nachfolgenden molekularbiologischen Arbeitsmethoden auch für die Charakterisierung der Roherde. Damit können auch nicht kultivierbare Organismen, die in natürlichen Habitaten die überwiegende Zahl der bakteriellen Populationen darstellt ohne eine kulturelle Anreicherung analysiert werden.

Mittels der Nukleinsäureanalytik ist es möglich, den Genbestand einer Probe vollständig zu analysieren. Dem sind jedoch durch methodische Einschränkungen, wie zum Beispiel der Primerspezifität, Grenzen gesetzt. Das größte Problem bei der molekularen Analytik der Tonrohstoffe ist jedoch die Tatsache, dass die DNA bei der Nukleinsäureextraktion direkt nach der Freisetzung über mehrwertige Kationenbrücken oder organische Verbindungen an die Tonpartikel gebunden wird und somit für Analysen nicht mehr verfügbar ist (Abbildung 9). Inhibierend auf molekularbiologische Methoden, wie zum Beispiel die Polymerase Kettenreaktion (PCR), wirken sich auch organische Substanzen, vor allem Huminstoffe (Tebbe & Vahjen 1993) aus, welche in unterschiedlichen Gehalten in Tönen vorkommen können.

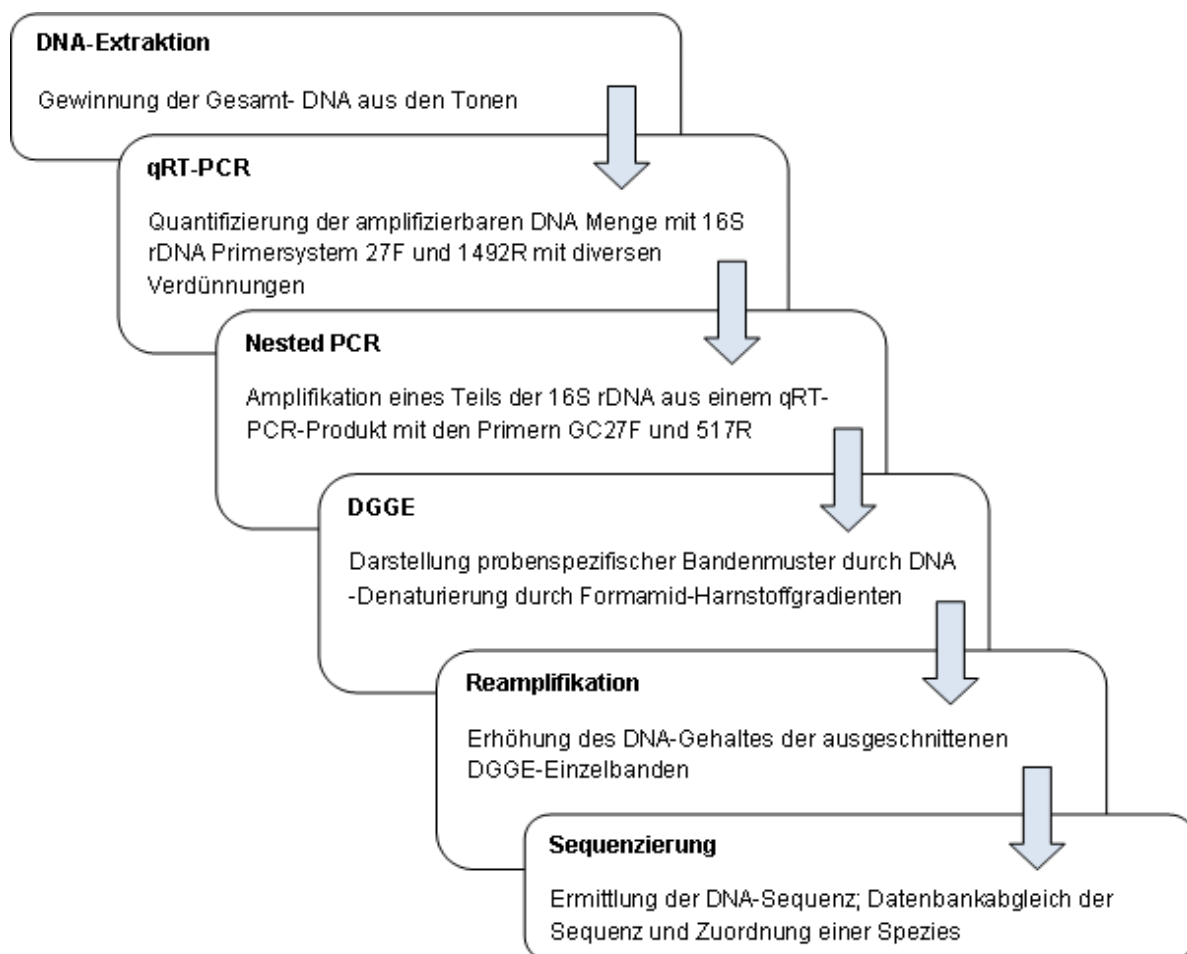




**Abbildung 9: Schema der Bindung der DNA durch Kationenbrücken und organische Moleküle an Tonminerale (Blume et al. 2002)**

In Abbildung 10 ist der Ablauf der Nukleinsäureanalytik für Tonrohstoffe dargestellt, nach welchem alle molekularanalytischen Untersuchungen der Basischarakterisierung der Tonrohstoffe sowie des Maukversuchs durchgeführt wurden. Ein wesentliches Ergebnis der Vorarbeiten war, dass der dargestellte Ablauf in allen Fällen für die Tone W1 und W2 reproduzierbar war.

Einzelheiten zur Adaptation und Optimierung der Methoden sind in der Dissertation von Herrn Kaden (Kaden, 2010) wiedergegeben.



**Abbildung 10: Fließschema zur molekularbiologischen DNA-Analytik der Tone W1 und W2**

### **3.2.2 DNA-Extraktion**

Die Auswahl und Optimierung der nachfolgenden Arbeiten wurden zunächst nur an dem Referenzmaterial W2 durchgeführt. Nach Abschluss der Adaptation wurde mit beiden Referenzproben (W1 und W2) die eigentliche Basischarakterisierung durchgeführt.

Der einleitende Schritt einer kultivierungsunabhängigen Analytik der Tone ist die Extraktion der Gesamt-DNA. In Vorversuchen zeigte sich, dass eine Verwendung der vorhandenen Extraktionsmethode keine DNA extrahieren konnte. Anspruch der Basisarbeiten war es daher, die Methoden hinsichtlich der DNA-Ausbeute und Reinheit, sowie der Eignung der Extrakte für die weitergehenden Analysen zu optimieren. Da dies aufgrund der negativen Ladung der DNA und der Kantenladung der Tonpartikel in Kombination mit mehrwertigen Kationen nur sehr schwer zu realisieren ist, wurden zunächst diverse Methoden miteinander verglichen sowie Verfahren optimiert. Um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten wurde Probematerial von W2 mit einem Wassergehalt von 50% homogenisiert, aliquotiert und die Aliquote bei -20 °C eingefroren. Für die Untersuchung jeder DNA-Extraktionsmethode wurde ein neues Aliquot genutzt, so dass mehrfaches Auftauen und Einfrieren vermieden wurde. Die Durchführung und Modifikation der 8 verglichenen Methoden werden im Folgenden dargestellt. Im Folgenden wird die Auswahl der angewandten Extraktionsmethoden angegeben, die explizite Angabe zur Durchführung findet sich in der Dissertation von Herrn Kaden (Kaden, 2010).

#### **Phenol-Chloroform-Extraktion**

Zur Extraktion der DNA wurden 1 g Ton, 50 µl Lysozym mit einer Konzentration von 100 mg/ml, 100 µl Proteinase K mit einer Konzentration von 20 mg/ml zu 2 ml Extraktionspuffer in ein Reaktionsgefäß mit einem Gesamtvolumen von 15 ml gegeben.

#### **MP Biomedicals “Fast DNA spin kit for soil”**

Die DNA-Extraktion erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

#### **Analytik Jena “Innu speed soil DNA kit”**

Die Nukleinsäureextraktion erfolgte ausschließlich nach Herstellerangaben.

#### **PeQLab “Precellys soil DNA kit”**

Die DNA-Extraktion wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

#### **Qiagen “QIAamp DNA mini kit”**

Im Protokoll des Herstellers wurde darauf hingewiesen, dass Zelltrümmer und Fremdstoffe vor der DNA-Extraktion abzentrifugiert werden müssen.

#### **Qiagen “QIAamp DNA stool kit”**

In Hinblick auf die Elimination von Huminstoffen, welche inhibitorisch in der PCR wirken können, wurde versucht, eine bessere Reinheit der Proben durch Nutzung eines Kits zur DNA-Extraktion aus Stuhlproben zu erreichen.

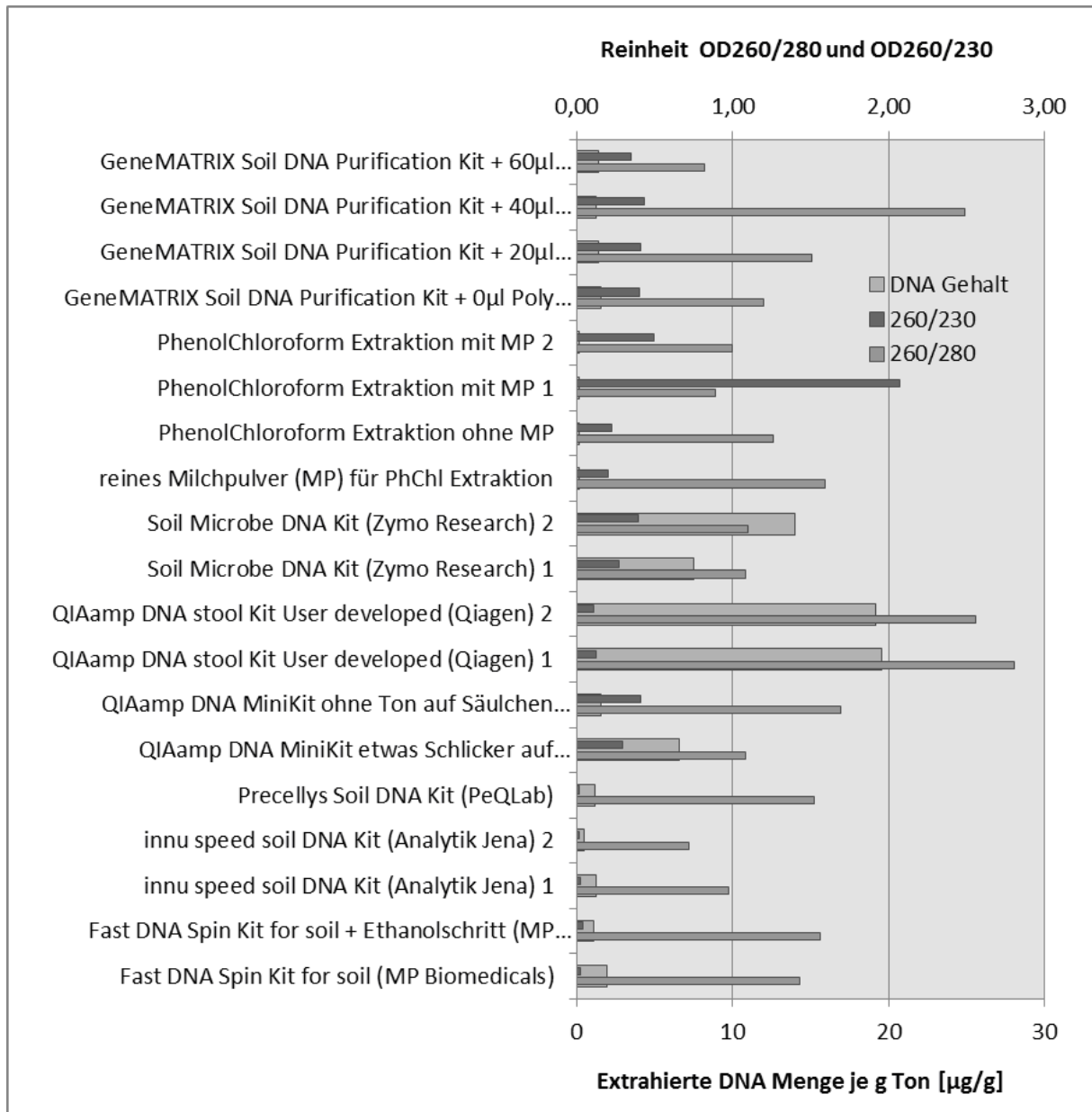
**Zymo Research “Soil microbe DNA kit”**

Die Nukleinsäureextraktion erfolgte ausschließlich nach Herstellerangaben. Auch diese Methode folgte dem Grundprinzip der Bindung der freigesetzten DNA an ein Säulchen und der folgenden Aufreinigung der gebundenen DNA.

**EURx “Gene MATRIX soil DNA purification kit”**

Neben der DNA-Extraktion entsprechend des Protokolls des Herstellers wurde versucht, die durch Tonpartikel verursachten Ladungen vor der Zellyse mit Oligonukleotiden abzusättigen, welche in der weiteren Nukleinsäureanalytik nicht relevant sind. Dazu wurden zu 3 Proben vor Beginn der Extraktion 20 µl, 40 µl bzw. 60 µl Poly A mit einer Konzentration von 100 pmol/µl zugegeben. Dabei handelt es sich um ein Nukleotid mit einer Basenabfolge von 16 miteinander verbundenen Adeninmolekülen. Die Synthese des Nukleotides erfolgte bei der Firma Sigma Genosys.

Die Menge und Reinheit der extrahierten DNA wurde für alle Methoden mittels Nanodrop ND1000 Software Version 3.3.0 von peQLab bestimmt. Zur Messung wurden jeweils 2 µl DNA eingesetzt. Die Bewertung der verschiedenen Extraktionskits und -methoden erfolgte zusammen mit der Analyse den Bandenmustern der DGGE nach Amplifikation und Aufreinigung der jeweils extrahierten DNA.



**Abbildung 11: Vergleich aller Extraktionskits hinsichtlich Gesamt-DNA-Ausbeute und Reinheit mittels Quotienten der OD260/280 und OD260/230**

Extraktionskits werden teilweise mit hohen Ausbeuten bei der Effizienz der DNA-Extraktion aus Tonen beworben. Der Tongehalt der von den Herstellern untersuchten Proben lag bei allen getesteten Produkten weit unter der denen von W1 und W2. Die Ergebnisse waren daher nicht auf die hier vorgestellten Arbeiten übertragbar. Weiterhin ist für Populationsanalysen nicht die absolute DNA-Ausbeute, sondern die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA und somit die Identifikation der bakteriellen Spezies mittels Nukleinsäureanalytik relevant. Von den 14 Methoden mit 8 getesteten DNA-Extraktionskits konnten nur drei diese Anforderung erfüllen. Mit dem „Precellys Soil DNA Kit“ von PeQLab und dem „innu speed soil DNA Kit“ von der Firma Analytik Jena war es möglich, die meisten unterschiedlichen Spezies nachzuweisen. Aufgrund der guten Repräsentation des Artenspektrums und dem geringen Zeitaufwand zur Durchführung der Methode wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem „Fast DNA spin kit for soil“ von der Firma MP Biomedicals

durchgeführt. Eine Zusammenfassung der erhobenen Parameter dieses Kapitels ist in der Dissertation von Herrn Kaden (Kaden, 2010) dargestellt.

### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion PCR

Die PCR wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt (Löffler 2003) und dient der Amplifikation bestimmter Genregionen, welche durch die Primer festgelegt werden. Die meisten Untersuchungen erfolgten auf Basis der Amplifikation der rDNA. Dabei handelt es sich im Falle der 16S rDNA um eine, für Bakterien spezifische Region mit konservierten und variablen Bereichen. In Tabelle 14 sind die genutzten Primer mit Angabe der Sequenz, der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) und der Referenz dargestellt. Die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte mit Hilfe der Software Oligo Analyzer online auf der Internetseite der Firma Integrated DNA Technologies (Idt 2010).

**Tabelle 14: Primer mit zugehöriger Sequenz; Angabe der Bindungsstelle analog E. coli**

Primer	Sequenz 5' - 3'	$T_m$	Referenz
27f*	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	53,2°C	(Schuppler <i>et al.</i> 1995)
517f	CAG CMG CCG CGG TAA TWC	58,1°C	(Funke <i>et al.</i> 2004)
907f	AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG	48,6°C	(Funke <i>et al.</i> 2004)
1492R	GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	50,6°C	(Cho & Giovannoni 2003)
907R	CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT	48,6°C	(Funke <i>et al.</i> 2004)
517R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	58,7°C	(Gotz <i>et al.</i> 2002)
NS7	GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC	58,0°C	(White <i>et al.</i> 1990)
NS8	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	60,6°C	(White <i>et al.</i> 1990)
SRB	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	64,8°C	(Amann <i>et al.</i> 1990)

NS...nuclear small (Pilze); SRB...Sulfatreduzierende Bakterien

\*Die PCR für die DGGE wurde mit dem Primer GC27f mit GC- Klammer am 5'- Ende durchgeführt (CGC CCG CCG CGC CCCGCG CCC GCT CCG CCGCCG CCC CCG CCC C)

M...A oder C; W...A oder T; Y...C oder T; R...A oder G; K...G oder T

### Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR ist es möglich, mittels der Intensität eines Fluoreszenzsignals, welches bei der Interkalation von Sybr Green an doppelsträngige DNA entsteht, die Menge der synthetisierten PCR-Produkte zu quantifizieren. Als Ergebnis wird ein Ct-Wert ermittelt, der einer Fluoreszenz

entspricht, welche genau dann ausgesandt wird, wenn ein festgelegter Schwellenwert erreicht wird. Die Anzahl der benötigten Zyklen bis zum Erreichen des Ct-Wertes hängt davon ab, wie viel DNA sich im Testansatz befindet und welche Reinheit die Nukleinsäure aufweist. Damit ist die qRT-PCR nicht dazu geeignet, die absolute, sondern vielmehr die amplifizierbare Menge DNA im Ansatz zu ermitteln. Weitere Einschränkungen sind auch durch die Primerspezifität bedingt.

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde ein Mastermix aus 10 µl „Power Sybr Green“ (Applied Biosystems), 0,25 µl je Primer (Tabelle 2.3) und 12 µl nukleasefreiem Wasser (VWR) je Reaktion angefertigt. Entsprechend der Anzahl der Proben wurde der Mastermix zu je 22,5 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte „Api Prism“ (Applied Biosystems) pipettiert. Danach wurde in jede Vertiefung 2,5 µl DNA gegeben und die Platte mittels selbstklebender transluzenter Folie „Micro Amp“ (Applied Biosystems) verschlossen. Für die Durchführung der qRT-PCR wurde ein Cycler „Abi Prism 7000“ (Applied Biosystems) eingesetzt.

### **3.2.4 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese DGGE**

Das Prinzip der DGGE beruht darauf, dass bei gleicher Länge der Fragmente jedes DNA-Molekül entsprechend seiner Basenabfolge bei einer definierten Formamid-/Harnstoffkonzentration denaturiert. Dadurch ist eine Auftrennung gemischter DNA-Moleküle mit gleicher Länge aber unterschiedlichen Sequenzen in einem Gel mit Harnstoffgradienten möglich. Im Idealfall repräsentiert dabei eine Bande im DGGE-Gel eine Spezies. Variationen im Genom oder PCR-Produkte mit unterschiedlicher Länge können auch multiple Bandenbildung ausgehend von einer Spezies verursachen. Die für die DGGE genutzten PCR-Produkte dürfen daher nicht schon auf dem Agarosegel Doppelbanden aufweisen. Der Vorteil der Nutzung der DGGE gegenüber der Klonierung zur Sequenzseparation besteht darin, dass unterschiedliche Sequenzen sofort erkannt werden können. Damit wird die kosten- und zeitintensive mehrfache Sequenzierung von DNA gleicher Organismen nahezu verhindert.

### **3.2.5 Sequenzierung und Datenbankrecherche**

Mittels der Sequenzierung ist es möglich, die Basenabfolge der DNA zu ermitteln. Voraussetzung für diese Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977) ist eine spezielle Sequenzier-PCR, bei welcher fluoreszenzmarkierte ddNTPs zum Kettenabbruch des PCR-Produktes führen. Da der Einbau der ddNTPs zufällig erfolgt, werden unterschiedlich lange PCR-Fragmente gebildet. Bei der Sequenzierung wird dieses Fragmentgemisch elektrophoretisch aufgetrennt, so dass die Basenabfolge anhand der Fluoreszenzsignale der ddNTPs mit einem Laser und Detektionseinheit ermittelt werden kann. Voraussetzung für ein verwertbares Ergebnis ist, dass die DNA nur von einer Spezies stammt. Die Separation von Misch-DNA wurde für alle Arbeiten mittels DGGE realisiert.

Für die Zuordnung der Sequenzen zu existierenden Datenbankeinträgen wurde die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) genutzt (Altschul et al. 1990). Es wurden jeweils der erste Datenbankeintrag und die erste beschriebene Spezies mit 16S rDNA Übereinstimmungswahrscheinlichkeit, e-value und score in die entsprechenden Tabellen dieser Arbeit übernommen. Da Sequenzen beim Übertragen zu NCBI nicht validiert werden, sind die angegebenen Zuordnungen nie absolut, sondern nur mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen.

### **3.2.6 Sequenzassembling und taxonomische Analysen**

Die Bewertung, und falls notwendig, die Korrektur von Sequenzen erfolgte im Programm „Chromas lite“ Version 2.01 von der Firma Technelysium Pty Ltd.

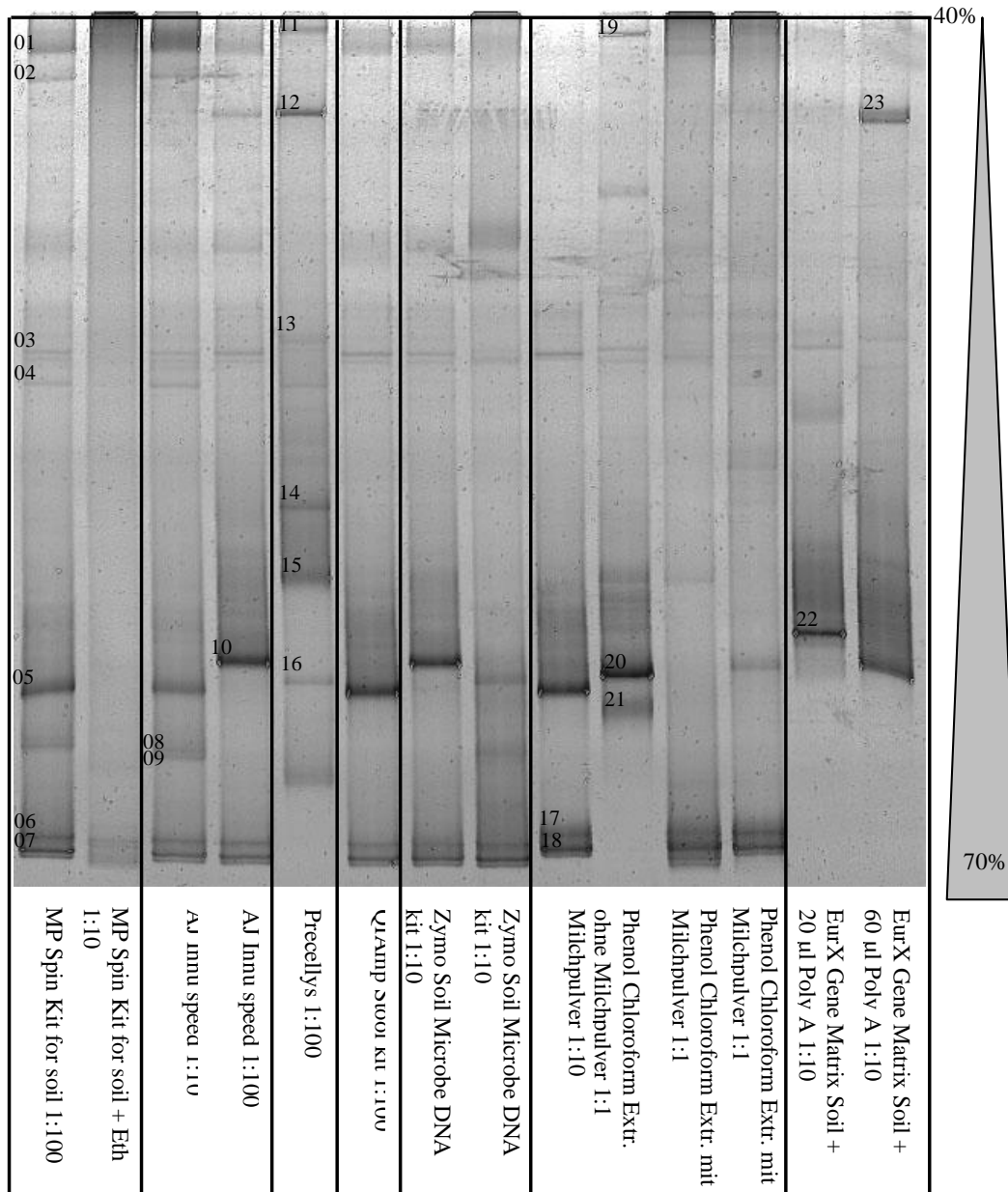
Das Sequenzassembling wurde mit der Software „SeqManPro“ des Softwarepaketes „DNA Star® Lasergene“ Version 8.0.2 realisiert.

Aus dem gleichen Softwarepaket wurde das Programm „MegAlign“ genutzt, um die Sequenzen abzugleichen und phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse darzustellen. Dazu wurde die „Clustal W“ Methode (Higgins & Sharp 1988) genutzt und jeweils ein Bootstrap mit 100 Nukleotidaustauschen und 1000 Berechnungen durchgeführt.

Zum Übermitteln von Sequenzen zur Datenbank von NCBI wurde das Programm SeqIn Version 9.00 genutzt.

Am Beispiel des Referenzmaterials W2 wurden die oben genannten Methoden an die tonhaltigen Rohstoffe adaptiert. Zusammenfassend ergab sich für die Nukleinsäureanalytik aus Tonrohstoffen folgendes Arbeitsschema:

1. DNA-Extraktion mittels „Fast DNA Spin Kit for Soil“ (MP Biomedicals)
2. qRT-PCR: Primer 27f-1492R; Tm=58°C; 40 Zyklen
3. Semi-nested-PCR: GC27f-517R; Tm=58°C; 27 Zyklen



**Abbildung 12: DGGE der Proben der DNA- Extraktionsmethoden und Variationen; Gradient 40%-70%; unterschiedliche Banden sind nummeriert**

Die mittels DGGE produzierten 16S rDNA Fragmente von W2 repräsentierten die Artenvielfalt im Ton in einem guten, jedoch nicht idealen Umfang. Die Grenzen der Methoden liegen zum Einen darin, dass zum Beispiel Mycobakterien, welche im Boden zu erwarten sind, aufgrund der komplexen und extrem widerstandsfähigen Mycolsäurezellwand bereits bei der Extraktion nicht mit erfasst werden (Kaden 2009) und zum Anderen jeder Primer nur eine Bindungsspezifität aufweist, die ausschließt, dass die DNA von allen im System vorkommenden Bakterien amplifiziert werden kann.

Von jeder Methode wurde die Probe mit dem geringsten Ct-Wert reamplifiziert und in der DGGE elektrophoretisch nach unterschiedlichen Sequenzen aufgetrennt. Für Populationsanalysen ist es sinnvoll, die Methode zur Extraktion von Nukleinsäuren zu



nutzen, welche die höchste Artenzahl im System abbilden kann. Das Dokumentationsbild der DGGE ist in Abbildung 12 dargestellt.

Die meisten Banden sind in den Gelspuren der Proben des „Innu speed soil DNA kit“ (8 und 9 Banden) und des „Fast DNA Spin kit for Soil“ (8 Banden) vorhanden. Bei der letzteren Methode bewirkt der zusätzliche Reinigungsschritt mit Ethanol eine Verringerung der Bandenanzahl auf zwei. Nur drei Banden wurden bei Verwendung der Proben des „Gene MATRIX Soil purification kit“ abgebildet. Bei den Produkten der Phenol-Chloroform-Extraktion waren 4 bis 5 unterschiedliche Sequenzen je Spur nachweisbar, wobei die Banden 17 und 18 (Abbildung 12) durch das Milchpulver verursacht wurden. Da Banden auf gleicher Höhe potenziell gleiche Spezies repräsentieren, wurde von diesen jeweils eine ausgewählt und weiter analysiert. Die nummerierten Banden in der DGGE entsprechen den Produkten, welche nach dem Ausschneiden aus dem Gel und dem Reamplifizieren sequenziert wurden. Die per Datenbankanalyse des NCBI (Altschul et al. 1998) ermittelten Organismen sind mit Angabe der Wahrscheinlichkeit der Bestimmung in Tabelle 15 zusammengefasst. Es wurde jeweils der erste Eintrag einer beschriebenen Spezies ausgewählt. Eine ausführliche Auflistung aller Ergebnisse unter Berücksichtigung der statistischen Parameter score und e-value sowie die Angabe des ersten bei NCBI gelisteten Treffers für jede Sequenz sind in der Dissertation von Herrn Kaden (Kaden, 2010) dargestellt.

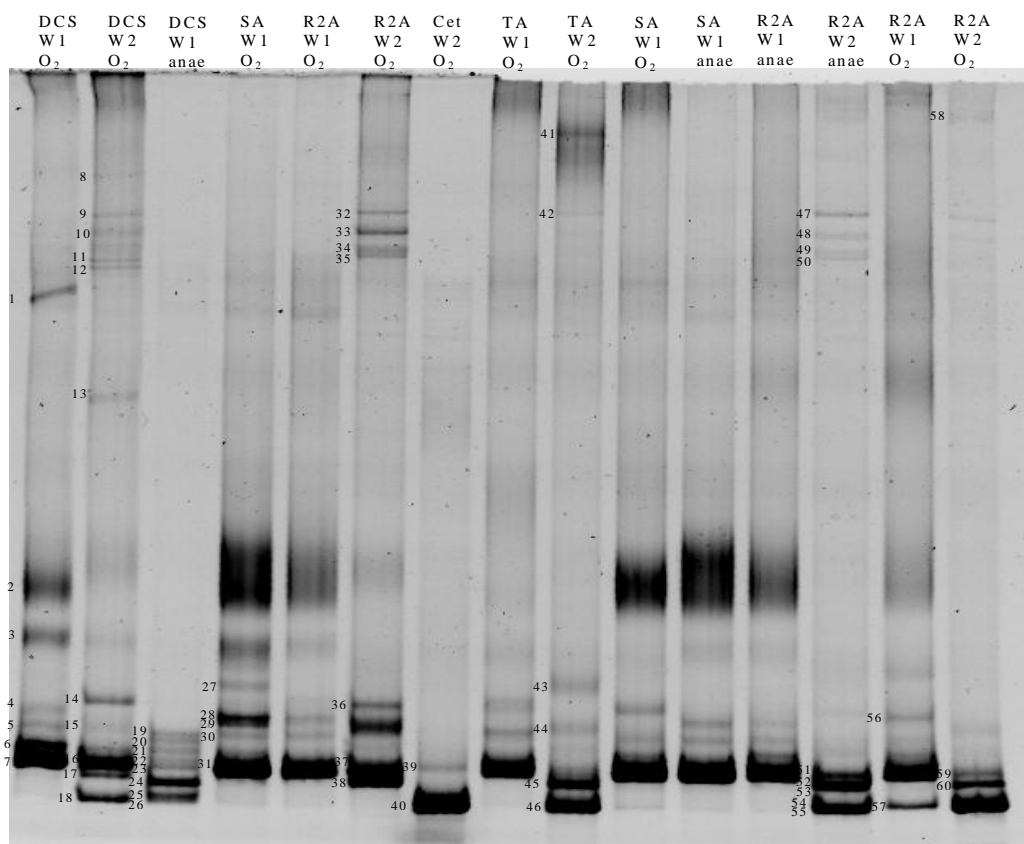
**Tabelle 15: Zuordnung der DGGE Banden zu Organismen mit Angabe der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (NCBI); Referenzton W2**

Nr.	Name	Übereinstimmung
2	<i>Sphingomonas melonis</i>	81%
	<i>Mitsuria chitosanitabida</i> bzw. <i>Pelomonas</i>	
3	<i>puraquae</i>	71%
4	<i>Sphingomonas melonis</i>	88%
5	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	99%
6	<i>Propionibacterium acnes*</i>	99%
7	<i>Propionibacterium acnes</i>	100%
8	<i>Caulobacter leidyi</i>	98%
9	<i>Caulobacter leidyi</i>	96%
10	<i>Pelomonas aquatica</i>	100%
11	<i>Streptococcus pneumoniae</i> bzw. <i>Str. mitis</i>	89%
12	<i>Streptococcus pneumoniae</i> bzw. <i>Str. mitis</i>	95%
13	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	88%
14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	67%
15	<i>Streptococcus mitis</i>	99%
16	<i>Aquabacterium cummune</i>	91%
17	<i>Thermus thermophilus</i>	100%
18	<i>Thermus thermophilus</i>	100%
20	<i>Aquabacterium cummune</i>	96%
21	<i>Propionibacterium acnes*</i>	99%
22	<i>Comamonas denitrificans</i>	99%
23	<i>Clostridium thiosulfatireducens</i>	80%

\*Zuordnung unter ersten 10.000 Treffer nur unter Ausschluss von "Umweltproben" möglich

### 3.2.7 Charakterisierung kultivierbarer Mikroorganismen

Um die Unterschiede der kultivierbaren bakteriellen Populationen aus W1 und W2 darzustellen, welche auf unterschiedlichen Kulturmedien aerob und anaerob angezüchtet wurden, erfolgte nach der DNA-Extraktion und PCR der Mischkulturen eine Populationsanalyse mittels DGGE (Abbildung 13). Es wurden, um unabhängige Ergebnisse zu erhalten, einige Kultivierungen doppelt aber zeitlich versetzt durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Ansätze zwar Großteils gleiche Banden, jedoch keine identischen Fingerprints bedingen. Dies könnte auf inhomogenes Probenmaterial zurückzuführen sein. Hinsichtlich der nachgewiesenen Spezies entsprechend der DGGE-Muster unterscheiden sich W1 und W2 grundlegend (Kaden, 2010).

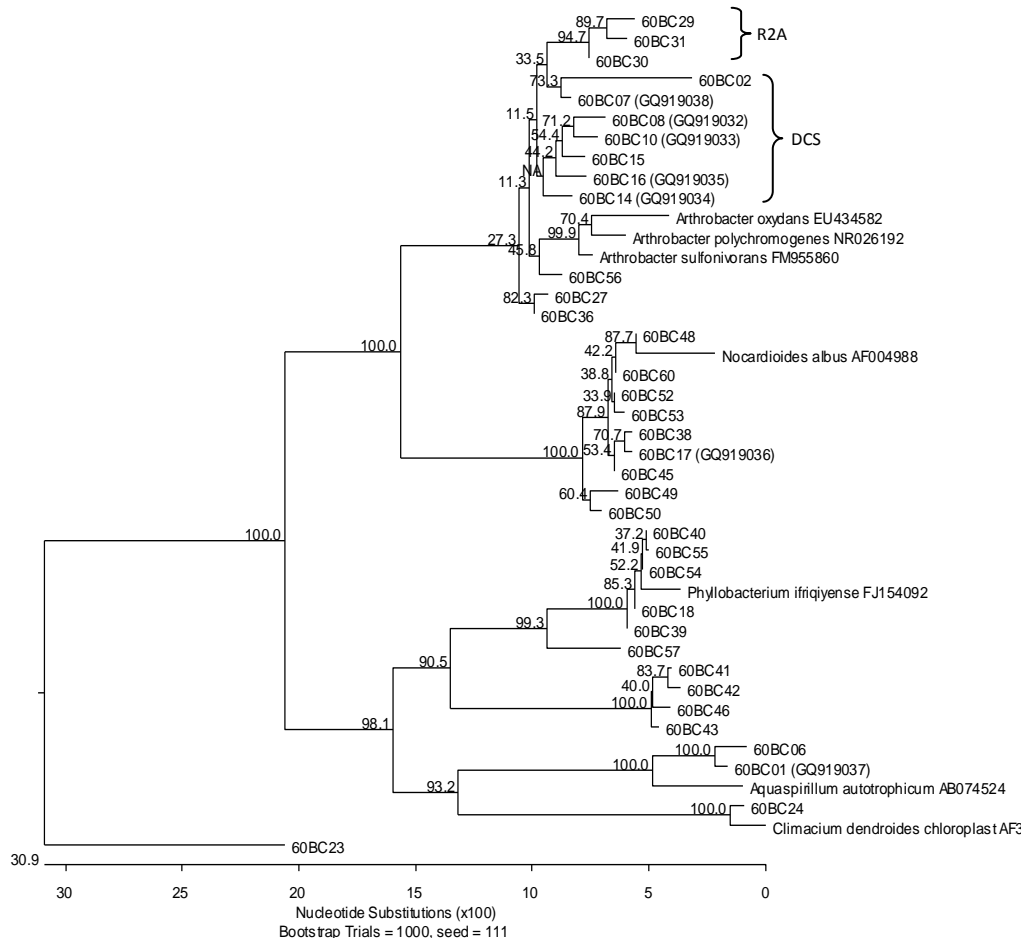


**Abbildung 13: Basischarakterisierung DGGE der PCR-Produkte der Kulturen; SA: Sabouraud Agar, Cet: Cetrimid Agar, TA: Tonagar, O2: aerob, anae: anaerob**

Einen kompletten taxonomischen Überblick über die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen ermöglicht Abbildung 14, in welcher unabhängig von der Kultivierungsart und dem Ton alle Sequenzen der kultivierten Arten dargestellt sind. Die letzten beiden Ziffern der Probennummern im Dendrogramm entsprechen denen der Nummerierung der DGGE. Die entsprechenden Sequenzen der nächstverwandten Typstämme sind mit Angabe der NCBI Nummer in die Abbildung integriert.

Sehr gute Sequenzen, welche potentiell neu kultivierte Spezies repräsentieren, wurden bei NCBI publiziert (Kaden & Krolla-Sidenstein 2009a). Diese Sequenzen

sind im Dendrogramm mit der entsprechenden NCBI Nummer in einer Klammer hinter der Probenbezeichnung aufgeführt.



**Abbildung 14: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse aller kultivierten und bestimmten Spezies auf Basis der 16S rDNA unter Berücksichtigung nah verwandter Typstämme**

**Tabelle 16: Aus W1 und W2 kultivierte Organismen mit Angabe der Bestimmungswahrscheinlichkeit der Datenbank NCBI (Altschul et al. 1998)**

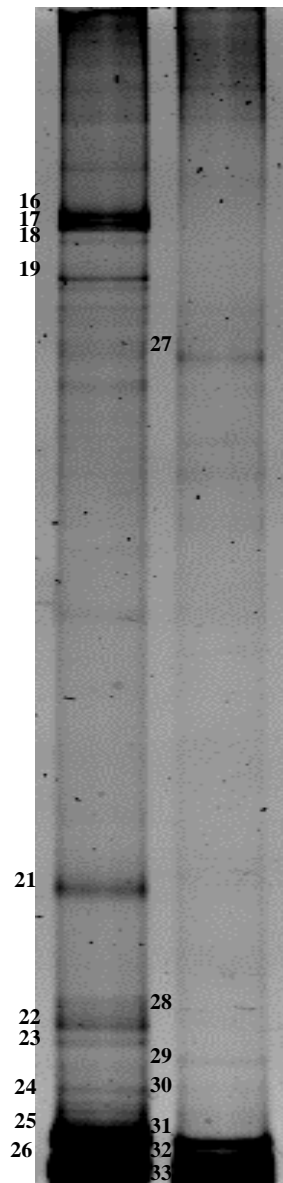
Spezies	Bestimmungswahrscheinlichkeit	
	W1	W2
<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	98%	
<i>Arthrobacter oryzae</i>	99%	
<i>Arthrobacter globiformis</i>	98%	
<i>Mesorhizobium amorphae</i> bzw. <i>M. loti</i>	99%	
<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	95%	
<i>Arthrobacter oxydans</i>	94%	99%
<i>Nocardioides albus</i>	98%	99%
<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i>		100% <sup>1</sup>
<i>Sphingomonas melonis</i>		100%
<i>Nocardioides fulvus</i> bzw. <i>N. flavus</i>		91%
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>		97%

<sup>1</sup>Kultivierung auf Cetrimid Agar und Sequenzierung ohne vorherige DDGE  
Bedingungen: gute Sequenz ohne „N“; e-value = 0; Grau...Abweichung >3%

Aus den Tönen konnten die in Tabelle 16 dargestellten Spezies oder nahe Verwandte dieser Arten kultiviert und mit hoher Sicherheit bestimmt werden. In dieser Tabelle sind von den 60 Proben nur die mit einer sehr guten Sequenz und einem e-value von 0 berücksichtigt. Von mehrfach bestimmten Spezies wurde jeweils nur diese mit der höchsten Sequenzübereinstimmung mit dem Datenbankeintrag von NCBI BLAST berücksichtigt.

### 3.2.8 Gesamt-DNA-Untersuchung

Nach der Betrachtung der aus den Tönen W1 und W2 kultivierten Spezies werden nachfolgend noch die Ergebnisse der Gesamt-DNA-Analysen vorgestellt. Eine Auflistung aller mittels DGGE (siehe Abbildung 15) separierten Sequenzen befindet sich in der Dissertation von Herrn Kaden. So konnte auch in der Gesamt-DNA aus W1 *Nocardioides albus* mit einer Übereinstimmung von 98% mit dem NCBI Datenbankeintrag nachgewiesen werden.



**Abbildung 15: DGGE der Gesamt-DNA von W1 (links) und W2 (rechts)**

Bei 9 von 11 Banden aus W1 mit einer maximalen Übereinstimmung von 95% und 2 von 7 Banden aus W2 mit maximal 94% Sequenzhomologie konnte eine nah verwandte Spezies von *Acidithiobacillus plumbophilus* bestimmt werden. Durch die hohen Abweichungen zum entsprechenden Datenbankeintrag kann angenommen werden, dass es sich bei diesem nachgewiesenen Bakterium um eine bisher unkultivierte Spezies der Gattung *Acidithiobacillus* handelt. Alle bisher bekannten Arten dieser Gattung sind acidophil und wachsen nur bei pH-Werten unter 4. Für *Acidithiobacillus thiooxidans* liegt dieser Wert zum Beispiel zwischen pH 0,5 und 3,0. In den untersuchten Proben betrug der pH-Wert 4,5. Für das autotrophe Wachstum werden von allen Vertretern dieser Gattung reduzierte Schwefelverbindungen genutzt. Die notwendige Energie wird aus der Oxidation von Metallsulfiden generiert (Kelly & Wood 2000). Im Falle von *Acidithiobacillus plumbophilus* handelt es sich dabei sogar um die Schwermetallverbindung Galenit, PbS (Drobner et al. 1992).

### 3.2.9 Zusammenfassung zur mikrobiellen Basischarakterisierung

Von den 60, aus den Tönen W1 und W2 kultivierten Bakterien, konnten nur 2 Spezies mit einer Übereinstimmungsgenauigkeit von 100% mit Datenbankeintrag bei NCBI ermittelt werden. Es konnten also nur 2 Spezies sicher bestimmt werden. Ein entscheidender Grund dafür war der Einsatz des DCS, durch welches sich viele, bisher unkultivierte Spezies anzüchten ließen. Die Zuordnung einer Sequenz zu einem Datenbankeintrag mit < 3% Abweichung ist auch nicht in allen Fällen richtig, da sich manche Spezies oder sogar Gattungen, wie im Falle von Rhodoferax und Albidoferax um weniger als 2% unterscheiden. Große Probleme bei der Betrachtung der Relevanz eines Organismus für das Habitat stellt auch der Umstand dar, dass selbst von den beschriebenen Spezies nicht alle Stoffwechselwege bekannt sind. Teilweise fehlen in den Spezies- und Gattungsbeschreibungen sogar grundlegende Parameter. Ein weiteres Problem ist das zusätzliche Kontaminationsrisiko durch den Abbau, die Lagerung und Aufbereitung der Referenzproben durch eingetragene Mikroorganismen. Für viele nachgewiesene Spezies konnte allerdings die Möglichkeit zu einem anoxischen Stoffwechsel gezeigt werden, was ein Hinweis darauf ist, dass diese Arten tatsächlich aus den untersuchten Systemen stammen. Es wurden auch Spezies identifiziert, welche in der Lage sind, Schwefelverbindungen, welche in den Tönen vorhanden sind, für ihren Stoffwechsel zu nutzen. Die Kultivierungsversuche konnten durch einen Wiederholungsversuch weitgehend bestätigt werden.

Weitere Ergebnisse und methodische Charakterisierungen der Referenzproben auch hinsichtlich biochemischer Analysen zu potenziellen Substratumsätzen und damit zur Bewertung der Stoffwechselleistungen, sind in der Dissertation von Herrn Kaden angegeben.

In der Phase der Basischarakterisierung konnten auf der Basis von Anreicherungskulturen aus Agarmedien und der Analyse der direkt aus den Roherden isolierten Gesamt-DNA, molekularbiologische Methoden adaptiert werden. Diese Methoden eignen sich zur Charakterisierung von bakteriellen Populationen und können für weitere Arbeiten eingesetzt werden.

Mit der Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen auf Agarmedien sollten Vertreter der natürlichen Populationen für eine Eignung zur biotechnologischen Beeinflussung der Verarbeitbarkeit der Roherden ausgewählt werden. Aufgrund der intensiven Einarbeitungsphase und der Entscheidung, mit *Azotobacter vinelandii* einen Modellorganismus als Alginat bildenden Organismus einzusetzen, wurde eine weitere Verwendung isolierter, autochthoner Mikroorganismen nicht weiter verfolgt.

Die Beschreibung potenzieller Stoffwechselprozesse bzw. die notwendig werdende Analyse möglicher EPS-Substanzen, sowie letztendlich eine Eignung für ein prozessrelevantes Upscaling, war im Rahmen dieses Vorhabens nicht möglich.

Angewandt wurden diese Methoden an den beiden Referenzproben W1 und W2. Neben den keramtechnischen und mineralogischen Unterschieden zwischen den beiden Roherden, konnten auch bei der Charakterisierung der bakteriellen

Populationen Unterschiede mit verschiedenen Methoden dargestellt werden. Bei allen identifizierten Vertretern handelte es sich um typische Vertreter von Böden und Sedimenten. Dennoch konnte eine weitaus größere Anzahl an Mikroorganismen mit molekularbiologischen Methoden entdeckt, aber nicht weiter identifiziert werden. Diese nicht identifizierbaren Vertreter sind durch ihre Nukleotidsequenzen charakterisiert, jedoch als „unkultivierbar“ in den Tabellenanhängen gekennzeichnet. Teilweise konnten sie bis zum Gattungsnamen bestimmt werden.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse zeigen die Möglichkeiten und Grenzen der bakteriellen Charakterisierung von Tonrohstoffen auf, die eine Basis für weitere Arbeiten auf dem Gebiet der Rohstoffbewertung darstellen.

### 3.3 Anwendungstechnische Untersuchungen

Die anwendungstechnischen Untersuchungen der Laborphase Basisforschung umfassen keramtechnische Charakterisierungen und Parameter, die das verarbeitungsrelevante Verhalten der Tonrohstoffe beschreiben. Abbildung 16 zeigt eine Übersicht zu Standardmethoden, die in Rohstoff- und keramischer Industrie zur Grundcharakterisierung bereits eingesetzt werden. Im Rahmen der Basisforschung im Bioton-Projekt wurden außerdem ergänzende Methoden zusammengestellt bzw. weiterentwickelt, die die Verarbeitungseigenschaften und Plastizität von Tonrohstoffen und –Massen beschreiben können.



**Abbildung 16: Übersicht der keramtechnischen Charakterisierungsmethoden (Standard und Bioton; grau hinterlegt: Standardmethoden, die aber nicht bei allen Rohstoff- bzw. Masseproduzenten eingesetzt werden)**

Zum Untersuchungsbereich der Basisforschung gehörten weiterhin erste Tests zu den Effekten mikrobieller Stoffwechselprodukte und extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) auf die Rheologie von Tonschlickern und plastischen Tonmassen. Außerdem wurde eine erste Auswahl von Additiven auf ihre Wirkung auf die Trockenbiegefestigkeit getestet. Die Ergebnisse der Basisforschung werden nun im Folgenden beschrieben.



### 3.3.1 Charakterisierungsprogramm „Verarbeitungseigenschaften“

Um die Massen und ihre Veränderungen unter Mauk- bzw. Additiveinfluss im Hinblick auf die Anwendung und Prozesse in der Keramik zu bewerten, wurde im Rahmen der Laborphase Basisforschung ein umfangreiches Charakterisierungsprogramm zusammengestellt und durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Methoden kurz dargestellt.

#### 3.3.1.1 Charakterisierung der Verarbeitungseigenschaften der Massen im Laborextruder

Zur anwendungsnahen Bewertung der Massen und ihrer Veränderungen während des Maukens wurden ihre Verarbeitungseigenschaften in einer Laborstrangpresse untersucht. Dazu wurde ein speziell für die Datenerfassung (Drehzahlmessung der Schnecke, Radialdruck- und Temperatursensor im Presskopf, Stromaufnahme beim Verpressen über Stromzange) und Untersuchung von Versuchsmassen konzipierter Laborvakuumextruder (VAR 50A/50 Fa. ECT Händle) eingesetzt. Unterschiedliche Mundstücksgeometrien liefern die entsprechenden Proben sowohl für die Spezifikation von Verarbeitungsaufwand und -Eigenschaften, als auch für weiterführende Charakterisierungen.

**Rundstrang,  $\varnothing$  33 mm:** Plastizität nach Pfefferkorn; Rheologische Charakterisierung; Frostproben zur qualitativen Beurteilung der Texturbildungsneigung der Masse; semiquantitative Beurteilung der Produktqualität anhand eines Bewertungsbogens;

**Flachstrang, 40 x 67,5 mm:** Rheologische Charakterisierung; Frostproben zur qualitativen Beurteilung der Texturbildungsneigung der Masse; semiquantitative Beurteilung der Produktqualität anhand eines Bewertungsbogens; Trockenschwindung, Brennschwindung sowie Wasseraufnahme und Porosität des gebrannten Produktes

**Trapezstrang, 22 x 20 x 15 mm:** semiquantitative Beurteilung der Produktqualität anhand eines Bewertungsbogens; Bestimmung der Trockenbiegefestigkeit

Mit jedem Mundstück werden bei der Massencharakterisierung zur Probenproduktion und Datenaufnahme jeweils ca. 2 kg plastische Masse verarbeitet und dabei Schneckendrehzahl, Radialdruck im Presskopf, Temperatur sowie Stromaufnahme beim Verpressen aufgezeichnet und ausgewertet. Aufgrund der diskontinuierlichen Extruderbetriebsweise werden dazu jeweils Mittelwerte der Messdaten aus je 5 Plateau-Phasen (Phasen laufender Presse zwischen den Befüllungsvorgängen) gebildet.



**Kennzahlen der VAR 50A/50:**

Zylinderdurchmesser 50 mm  
Max. Pressdruck 50 Bar  
Max. Durchsatz 50 dm<sup>3</sup>/Stunde  
Stufenlos regelbarer Antrieb von 6,6 bis 65 U/Min  
Temperierbar von 5 – 50 °C

**Abbildung 17: Der VAR 50A/50 Laborextruder im Einsatz**

**3.3.1.2 Beurteilung der Verarbeitungs- und Produkteigenschaften**

Da die messbaren Parameter an der Strangpresse (Radialdruck und Stromaufnahme) alleine noch nicht zur umfassenden Beurteilung des Strangpressverhaltens der jeweiligen Versuchsmasse ausreichen, wurden das Pressverhalten der Massen und die frisch extrudierten Produkte anhand eines Fehlerkatalogs und eines Bewertungsbogens eingestuft und so semiquantitativ bewertet.



**Abbildung 18: Beispiele für Pressfehler (Ausschnitt aus dem Fehlerkatalog): Oben von links nach rechts: Drachenzähne (leicht und stark), Laminierungen und Schuppen in der Oberfläche, unten links: Instabilität und Rissbildung, unten rechts: Blasen im Strang**

Ein gestufter Bilder-Fehlerkatalog (siehe Abbildung 18) sowie die lange Erfahrung der Mitarbeiter an der Laborstrangpresse ermöglichen anhand des Bewertungsbogens (siehe Abbildung 19) eine verhältnismäßig objektive Beurteilung der Versuchsmassen.

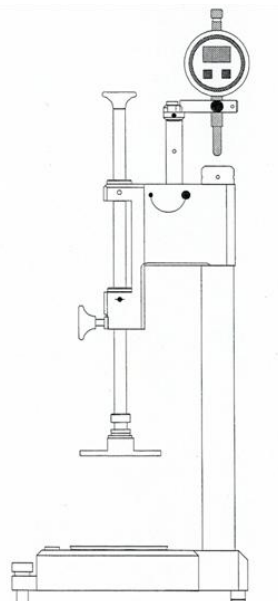
<b>Parameternaufnahme Flachstrang</b>						
Vakuum:	Drehzahl:					
Pressverhalten gesamt:	sehr gut	gut	ok	mäßig	schlecht	sehr schlecht
	1	2	3	4	5	6
Stabilität frisches Produkt:	sehr gut	gut	mittel		schlecht	
	1	2	3	4	5	6
Drachenzähne:	nein	leicht	mittel		stark	
	1	2	3	4	5	6
Laminierungen, Texturen:	nein	leicht	mittel		stark	
	1	2	3	4	5	6
Regulierungsbedarf: (Gegenhalten)	nein	leicht	mittel		stark	
	1	2	3	4	5	6
Schuppige oder ungleichmäßige Oberfläche	nein	leicht	mittel		stark	
	1	2	3	4	5	6
Blasen im Strang	nein	leicht	mittel		stark	
	1	2	3	4	5	6
Andere Fehler	Masse zu hart		Masse zu weich		Masse klebt	
	4	5	4	5	4	5
Sonstige Bemerkungen:						

**Abbildung 19: Auszug aus Bewertungsbogen, Beispiel Flachstrang, zur semiquantitativen, möglichst objektiven Beurteilung der Verarbeitungseigenschaften**

Zusammen mit den Auswertungen der Daten aus Radialdruck- und Stromaufnahmeaufzeichnung kann mit dem Bewertungsbogen das Verarbeitungsverhalten von plastischen Massen gut untersucht und bewertet werden.

### 3.3.1.3 Plastizität nach Pfefferkorn

Bei der Bestimmung der Plastizität nach Pfefferkorn wird ein definierter, zylindrischer Masseprüfkörper (hier: Größe der Stauchkörper:  $\varnothing = 33 \text{ mm}$ ,  $h = 40 \text{ mm}$ ) mittels eines konstanten, definierten Gewichts (1,2 kg) aus festgelegter Fallhöhe (185 mm) gestaucht (siehe Abbildung 20).



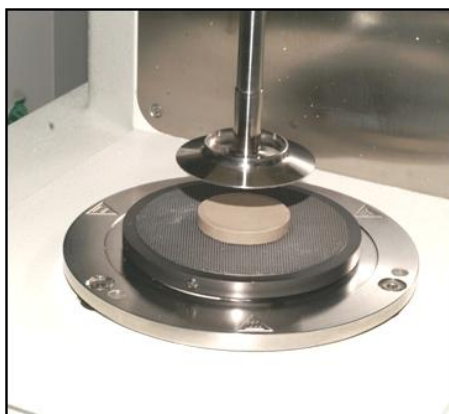
**Abbildung 20: Plastizitätsprüfer M-1192**

Um die Probenvorbereitung möglichst gleichmäßig und repräsentativ zu gestalten, wurde die FGK-Standardmethode (FGK (2008)) zur Prüfkörperherstellung modifiziert und zur Präparation der Formlinge Rundstrangproben verwendet. Die Strangstücke, die bereits den geforderten Durchmesser besitzen, wurden auf die erforderliche Länge geschnitten. Der Probekörper wird auf der Unterplatte des Plastizitätsprüfers platziert und durch das Fallgewicht gestaucht. Die Stauchhöhe zusammen mit der Massenfeuchte wird in der betrieblichen Praxis als Information zur Einstellung der für die Verarbeitung optimalen Bildsamkeit bzw. Massenfeuchte verwendet. Das Verfahren ist zwar aufgrund zahlreicher Fehlerquellen umstritten, wird aber hier als industriell etabliertes Verfahren zum Vergleich einbezogen.

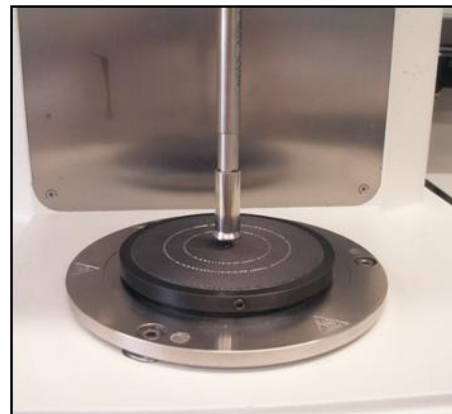
### 3.3.1.4 Rheologische Massencharakterisierung

Im Forschungsvorhaben kommt die Charakterisierung der Rohstoffe und Arbeitsmassen mit und ohne Modifikation durch Prozesshilfsmittel mithilfe von rheometrischen Messverfahren zum Einsatz. Mit den ausgewählten Messroutinen (Kriechversuch, Amplitudensweep) können Informationen zum elastischen/viskosen Deformationsverhalten und zur Strukturstärke der Massen bzw. Stabilität der frisch-Produkte gewonnen werden, die wichtige Hinweise zur Prozessfähigkeit der Massen für das Extrusionsverfahren geben.

Zur Durchführung der Kriechversuche bzw. der Amplitudensweeps wurde das Rotationsviskosimeter MCR 300 der Firma Anton Paar, Platte–Platte-Messsystem PP50 bzw. PP12, eingesetzt (Abbildung 21). Messstempel und Bodenplatte sind dabei mit profilierter Oberfläche versehen, um ein Abgleiten der im Falle plastischer Massen vergleichsweise festen Proben von der Messmitteloberfläche zu verhindern.



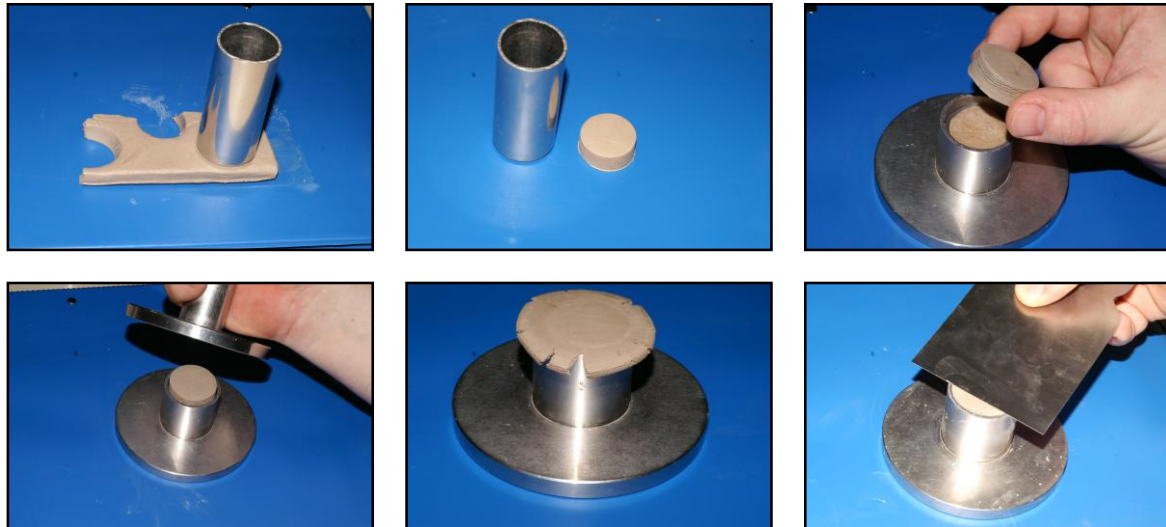
PP50 Messsystem ( $\varnothing = 50$  mm)



PP12 Messsystem ( $\varnothing = 12$  mm)

**Abbildung 21: Verschiedene, eingesetzte Platte–Platte Messsysteme; AP MCR 300 Rheometer**

Die scheibenförmigen, planparallelen Proben wurden aus den mit dem Laborextruder hergestellten Flach- und Rundsträngen (durch Ausstanzen bzw. Abschneiden) mithilfe eines Vorbereitungswerkzeugs angefertigt (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Probenvorbereitung für die rheologische Messung;**  
Für die Messungen mit PP12 werden aus den präparierten Scheiben nochmals kleinere Proben im passenden Durchmesser ausgestanzt.

Im Folgenden sollen die beiden angewendeten rheologischen Messmethoden näher beschrieben werden.

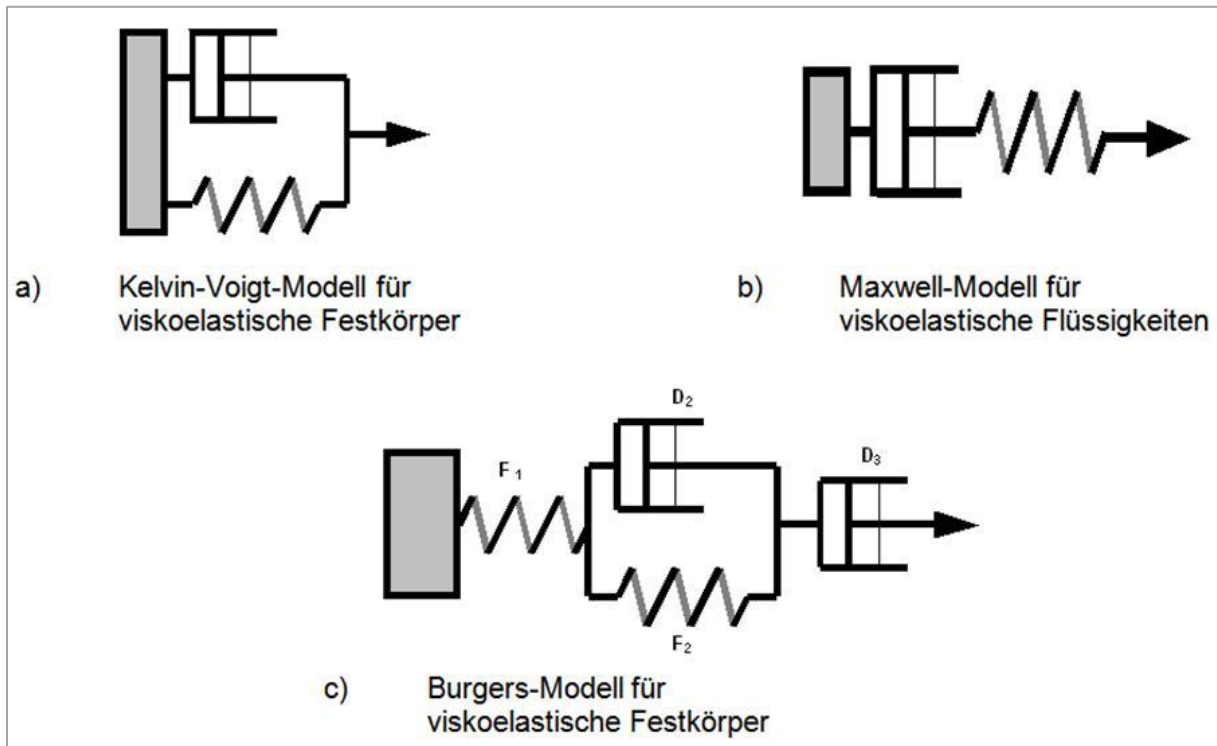
### **Methode 1: Kriechversuche**

Für die Beschreibung des Verhaltens der keramischen Masse als viskoelastische Substanz hat sich die Kombination zweier Grundmodelle als anwendbar erwiesen (Liu (2007); Mazzeo (2001); Mezger (2006); Schulle, Schmidt, (1997)):

- Das Kelvin-Voigt-Modell für den viskoelastischen Festkörper, beschrieben durch die Parallelschaltung eines Dämpfers und einer Feder, die mit einer reversiblen Verformung auf Belastung reagiert. Der Dämpfer wirkt sich hierbei in einer Verzögerung der Reaktion aus.
- Das Maxwell-Modell für eine viskoelastische Flüssigkeit, beschrieben durch die Serienschaltung eines Dämpfers und einer Feder, die mit einer reversiblen (Feder) und einer irreversiblen Deformation (Dämpfer) auf Belastung reagiert.

Die Kombination im sogenannten Burgers-Modell (Abbildung 23) beschreibt das Deformationsverhalten bei Kriech- und Kriecherholungsversuchen an viskoelastischen Substanzen, in denen physikalische Inter-Partikel Kräftewirkungen eine Rolle spielen. Dabei ist folgendes zu beachten: die wissenschaftlichen Grundlagen der Mathematik und Physik können plastisches Verhalten nicht eindeutig beschreiben, da es ein inhomogenes Verhalten darstellt: eine Probe mit plastischem Verhalten wird auf Grund des Stoffbestandes unter Belastung mehr oder weniger inhomogen unter Ausbildung eines Schergefälles geschert. Daher lässt sich dieses Verhalten nur mit Hilfe sensibler Messgeräte und definierter, für Vergleichsmessungen identischer Messroutinen in Relativwerten darstellen.





**Abbildung 23: Rheologische Modelle für viskoelastische Substanzen**

Das Burgers-Modell verwendet sowohl eine Feder  $F_2$  und einen Dämpfer  $D_2$  in Parallelschaltung, als auch die Kombination einer Feder  $F_1$  und eines Dämpfer  $D_3$  in Reihe dazu geschaltet. Die Kriechversuche basieren auf der Erfassung einer Deformation bei einer zeitlich begrenzten, sprunghaft aufgegebenen Minimalbelastung und einer anschließenden, ebenfalls sprunghaft eingeleiteten Erholungsphase. Dabei werden die Deformationskennzahlen in Deformation pro Schubspannungseinheit umgerechnet und lassen sich als „Komplianz“ (Nachgiebigkeit der Masse) in  $\text{Pa}^{-1}$  beschreiben. In der Kriechphase wird die Probe bis zum Erreichen einer konstanten Deformationsgeschwindigkeit belastet (viskose Deformation). In der Erholungsphase ist dann abhängig von der Probe sowohl die elastische Rückdehnung als auch die bleibende, plastische Verformung der Probe messbar.

Der Versuchsablauf des Kriechversuches ist wie folgt definiert (Abbildung 24):

**Schritt 1** ist der Schubspannungssprung von  $\tau = 0$  auf  $\tau_0 = \text{konstant}$ . Dieser Belastungsabschnitt dauert von  $t_0$  bis  $t_2$ , und umfasst einen instationären ( $t_0$  bis  $t_1$ ) und einen stationären ( $t_1$  bis  $t_2$ ) Fließzustand.

**Schritt 2** ist der Sprung von  $\tau_0$  zurück auf  $\tau = 0$ , die so genannte Entlastungsphase. Sie dauert von  $t_2$  bis  $t_4$ .

Im Verlauf des Versuches wird die resultierende zeitabhängige Deformation  $\gamma(t)$  gemessen. Bei der Darstellung der Deformationskurve im Diagramm (Abbildung 24) werden die Parameter Zeit ( $t$ ) und Deformation ( $\gamma$ ) üblicherweise linear aufgetragen. Die Kurve lässt sich dann in zwei Abschnitte unterteilen. Abschnitt 1 von  $t_0$  bis  $t_2$  wird als Kriech- oder auch Deformationskurve bezeichnet. Abschnitt 2 von  $t_2$  bis  $t_4$  stellt

die Kriecherholungs- oder auch Rückdeformationskurve sowie die am Ende bleibende Deformation dar.

Die Rückdeformation ( $\gamma_e$ ) und die bleibende Deformation ( $\gamma_v$ ) repräsentieren den elastischen, beziehungsweise den viskosen Anteil des viskoelastischen Verhaltens der Probe.  $\gamma_1$  stellt eine sprunghafte, rein elastische Deformation dar, die sofort nach Versuchsbeginn ohne zeitliche Verzögerung stattfindet. Im Schaltbild des Burgers-Modells wird dieses Verhalten durch die Feder  $F_1$  symbolisiert.  $\gamma_2$  repräsentiert die verzögerte viskoelastische Deformation, im Schaltbild durch die Feder  $F_2$  kombiniert mit Dämpfer  $D_2$  dargestellt.  $\gamma_3$  ist die rein viskose, kontinuierlich ansteigende Deformation, im Schaltbild durch Dämpfer  $D_3$  dargestellt;  $\beta$  ist der Steigungswinkel der Deformationskurve nach Erreichen des stationären Kriechzustandes mit einer konstanten Deformationsgeschwindigkeit (Scherrate) bis hin zur maximalen Deformation am Ende der Belastungsphase.

Sobald diese konstante Deformationsgeschwindigkeit erreicht ist, wird die Probe entlastet, wonach die Feder  $F_1$  direkt reagiert, die Kombination der Feder  $F_2$  kombiniert mit Dämpfer  $D_2$  verzögert rückdehnt (beides als elastische Erholung) und letztendlich der Dämpfer  $D_2$  ausgelenkt bleibt (die viskose, bleibende Deformation).

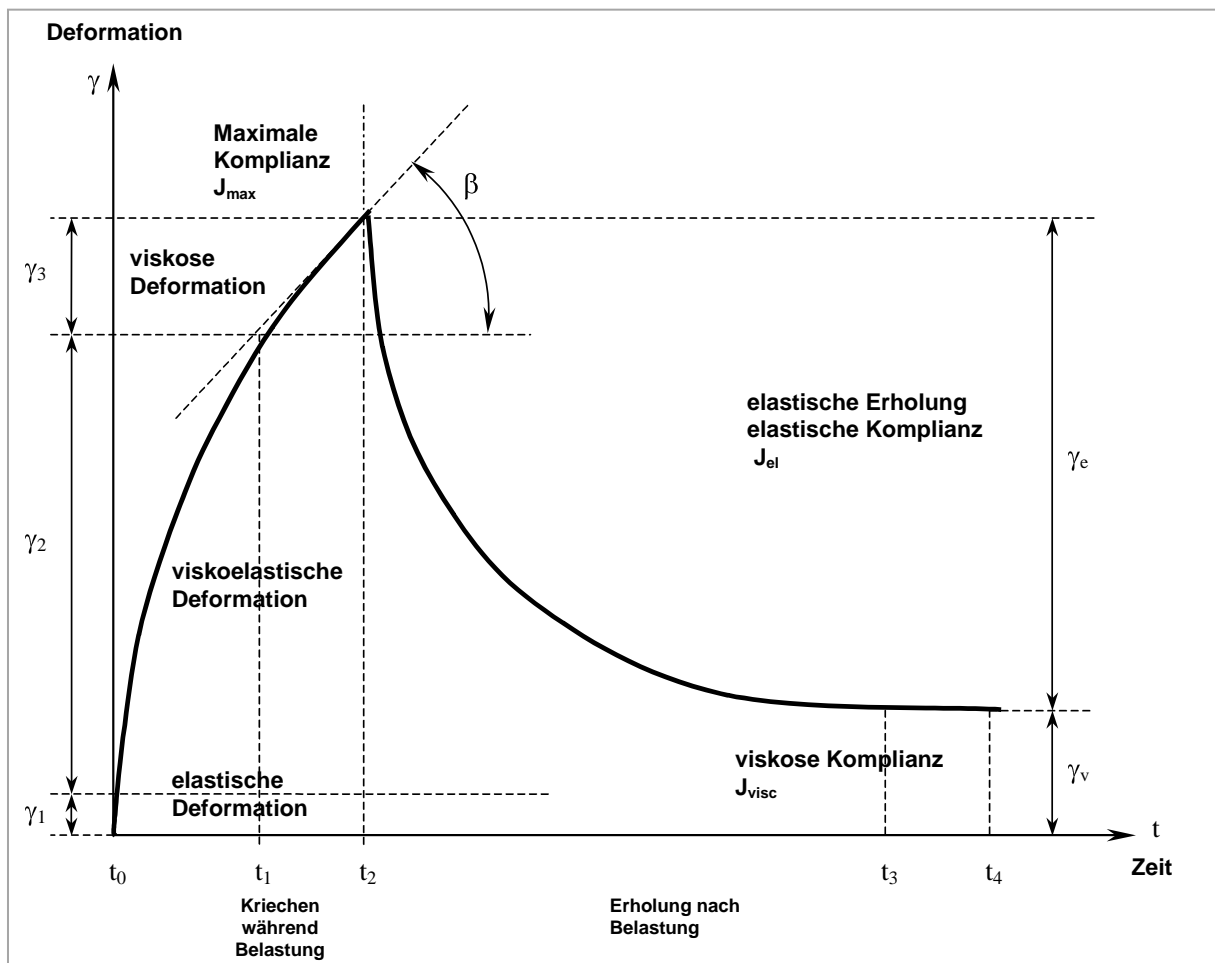


Abbildung 24: Der Verlauf des Kriechversuches nach dem Burgers-Modell

Der Verlauf der Kurven wird durch folgende Funktionen beschrieben:

Kriechfunktion:

$$\gamma(t) = \gamma_1 + \gamma_2(t) + \gamma_3(t) = \left(\frac{\tau_0}{G_1}\right) + \left(\frac{\tau_0}{G_2}\right) \cdot [1 - \exp(-t / \Lambda)] + \frac{(\tau_0 \cdot t)}{\eta_0}$$

Kriecherholungs –Funktion:

$$\gamma(t) = \gamma_{\max} - \gamma_1 - \gamma_2(t) = \gamma_{\max} - \left(\frac{\tau_0}{G_1}\right) + \left(\frac{\tau_0}{G_2}\right) \cdot [1 - \exp(-t / \Lambda)]$$

mit:	<b>G</b>	=	Schubmodul [Pa]
	$\gamma(t)$	=	Deformation in Abhängigkeit der Zeit
	$\gamma_{\max}$	=	maximale Deformation
	$\gamma_1$	=	sprungartige, rein elastische Deformation
	$\gamma_2$	=	verzögerte viskoelastische Deformation
	$\tau_0$	=	Anfangsschubspannung [Pa]
	$\Lambda$	=	Retardationszeit [s]

Die Messung dieser Eigenschaften erfordert einen hochdynamischen Rheometerantrieb, um diese schnellen Sprünge bei niedrigsten Deformationen zu erfassen. Für die meisten viskoelastischen Dispersionen liegt die Maximaldeformation  $\gamma_{\max}$  im Bereich von 1% und kleiner, da hier sonst das Risiko besteht den Grenzwert des linear- viskoelastischen Bereiches zu überschreiten, womit der Geltungsbereich des Burgers-Modells verlassen wird.

Diese Grundlage wurde in den bisherigen Ansätzen zur Charakterisierung der Deformationseigenschaften in den Arbeiten des FGK (Engels (2006); Engels; Diedel (2006)) eingesetzt.



## Methode 2: Oszillationskurven

Mit dynamisch-mechanischer Analyse lassen sich alle Arten von viskoelastischen Substanzen bis hin zu Festkörpern untersuchen: die Substanzen reagieren zeitverzögert auf Belastungen. Für die Erklärung des Oszillationsversuches (Mezger (2006)) kann das Zwei-Platten-Modell als Modellvorstellung gut eingesetzt werden. In diesem Fall wird die obere Platte rein mechanisch durch ein sich drehendes Rad angeregt, das mittels einer exzentrisch befestigten Schubstange mit der Platte verbunden ist (Abbildung 25). So wird eine Auslenkung  $\pm s$  mit Auslenkwinkel  $\pm \varphi$  verursacht.

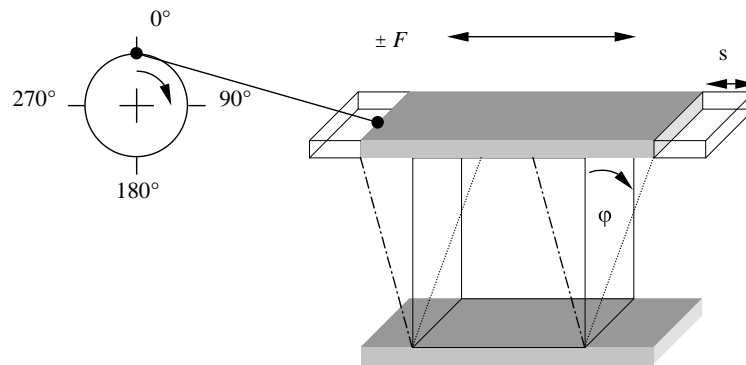


Abbildung 25: Zwei-Platten-Modell für Oszillationsversuche

Die untere Platte wird weiterhin als unbeweglich angesehen, während die obere Platte mit der Scherfläche  $A$  durch die Scherkraft  $\pm F$  hin- und hergeschoben wird. Dies führt zur Scherung der sich zwischen den Platten befindlichen Messprobe. Vorausgesetzt, dass an beiden Platten Wandhaftung herrscht und es nicht zu einem Abrutschen oder Gleiten kommen kann sowie dass die Probe im gesamten Messspalt homogen verformt wird, ist die Schubspannung ( $\tau$ ) und die Deformation ( $\gamma$ ) mathematisch wie folgt definiert:

Mathematische Definition der Schubspannung:

$$\pm \tau = \frac{\pm F}{A}$$

Mathematische Definition der Deformation:

$$\pm \gamma = \frac{\pm s}{h} = \tan \varphi$$

Bei idealelastischen Substanzen, also vollständig starren Festkörpern, gilt das Hookesche Gesetz in komplexer Form:

$$G^* = \frac{\tau(t)}{\gamma(t)}$$

mit dem **komplexen Schubmodul** ( $G^*$ ) und den zeitabhängigen Sinusfunktionen von  $\tau$  und  $\gamma$ .

Es repräsentiert die Steifigkeit der Messsubstanz und somit den Widerstand, den diese der Verformung entgegensetzt. Bei viskoelastischen Substanzen entsteht eine Verzögerung zwischen der  $\gamma$ -Kurve und der  $\tau$ -Kurve mit dem Phasenverschiebungswinkel  $\delta$  zwischen der Vorgabe und der Ergebniskurve der Oszillation (Abbildung 26).

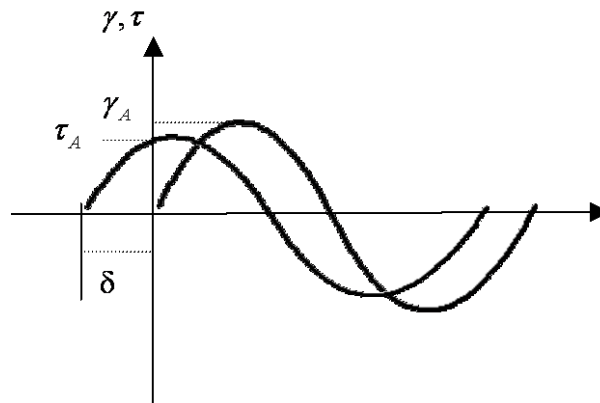


Abbildung 26: Der Phasenverlauf der  $\gamma$ -Kurve und der  $\tau$ -Kurve

Als Maß für die während des Scherprozesses in der Substanz gespeicherte Deformationsenergie gilt der Speichermodul  $G'$ . Diese Energie steht nach dem Entlasten der Rückdeformation, welche die vorangegangene Deformation vollständig ausgleicht, zur Verfügung.  $G'$  repräsentiert das elastische Verhalten der Messprobe. Mathematisch gilt:

$$G' = \left( \frac{\tau_A}{\gamma_A} \right) \cdot \cos \delta$$

Für die während des Scherprozesses verbrauchte und damit für die Substanz verlorene Energie (Deformationsenergie) gilt der Verlustmodul  $G''$  als Maß. Diese Energie wird entweder zur Veränderung der Probenstruktur aufgebraucht, oder an die Umgebung, zum Beispiel in Form von Wärme, abgegeben. Demzufolge repräsentiert  $G''$  das viskose Verhalten der Messsubstanz. Mathematisch gilt:

$$G'' = \left( \frac{\tau_A}{\gamma_A} \right) \cdot \sin \delta$$

Der Verlust- oder Dämpfungsfaktor  $\tan \delta$  wird als Quotient der verlorenen und der gespeicherten Deformationsenergie berechnet. Er gibt also das Verhältnis zwischen dem viskosen und dem elastischen Anteil des Deformationsverhaltens an. Mathematisch gilt:

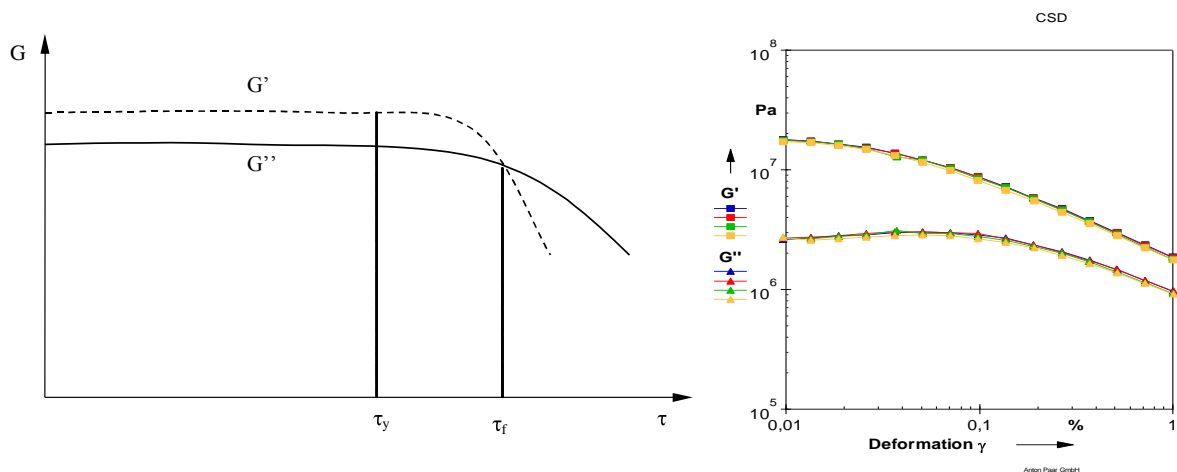
$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

Bei viskoelastischen Feststoffen ist der  $\tan \delta < 1$  (da  $G' > G''$ , das elastische Verhalten des Festkörpers ist ausgeprägter als das viskose Verhalten).

Als Grundlage der Messung der viskoelastischen Substanzen kommt vielfältig der Amplitudentest oder Amplituden-Sweep, mit einer über die Messzeit ansteigenden

Deformationsamplitude bei gleichbleibender Frequenz, zum Einsatz, um das Ende des linear-viskoelastischen Bereiches (den „LVE“-Bereich) und im weiteren Belastungsverlauf die Fließgrenze verschiedener plastischer Massen und Rohstoffe zu bestimmen. Dazu werden die Messkurven als  $G'(\tau)$  und  $G''(\tau)$  oder als  $\tan(\tau)$  - Funktion dargestellt. Im linear viskoelastischen Bereich, bei sehr kleinen Amplituden, weisen beide Funktionen einen jeweils konstanten Plateauwert auf, meistens auf unterschiedlicher Höhe (Bei viskoelastischen Feststoffen  $G' > G''$ ). Die Ermittlung der Nachgebegrenze  $\tau_y$ , die den Beginn des Strukturverlustes des Systems beschreibt, erfolgt auf Grund der ersten Abweichung einer der Messkurven vom Plateauwert nach definierten Vorgaben: eine definierte prozentuale Abweichungstoleranz oder alternativ ein Abknicken der Kurve, ermittelt mithilfe einer eingezeichneten Plateautangente deutet auf das Verlassen des linear-viskoelastischen Bereichs und somit auf den Strukturverlust der Probe hin.

Diese Nachgebegrenze ist ein Maß für das Festkörperverhalten oder Strukturstärke einer Substanz. Dabei ist zu beachten, dass dieser Wert sich von der Fließgrenze, dem  $\tau_f$ -Wert, unterscheidet, bei der die beiden Funktionen sich kreuzen und wo der Strukturverlust in ein Fließen übergeht, die Probe also Flüssigkeitsverhalten zeigt. Dieser Fließwert wird als definierter, eindeutiger Wert für die keramischen Massen allerdings nicht erreicht (Abbildung 27). Bei größeren Deformationsvorgaben kommt es trotz profilierter Messsysteme zu einem Abrutschen oder Abreißen der Probe, so dass hier keine sinnvoll auswertbaren Messwerte generiert werden können. Im LVE-Bereich, also bis zum Erreichen der Nachgebegrenze und auch noch etwas darüber, können die Messkurven einwandfrei und reproduzierbar ausgewertet und zum Vergleich der Masseneigenschaften herangezogen werden.



**Abbildung 27:  $G'(\tau)$  und  $G''(\tau)$  mit Nachgebegrenze  $\tau_y$  und Fließgrenze  $\tau_f$  aus der Modellbeschreibung (links) und entsprechende Messkurven einer keramischen Masse (rechts,  $\gamma = 0,01 - 1 \%$ ,  $FN = 5 \text{ N}$ ; Messung von vier Proben, die aus dem extrudierten Flachstrang einer Masse präpariert wurden).**

### 3.3.1.5 Frostversuch

Formgebungstexturen im Produkt stellen oft ein Problem für Produktfestigkeit und – Qualität dar und sollten möglichst vermieden werden. In der Praxis kann hier durch gezielte Massezusammensetzung und Einstellung des Formgebungsaggregates Einfluss genommen werden. Im Projekt wurde der Versuch unternommen, eine generelle Texturbildungsneigung der untersuchten Massen einzuschätzen. Dazu wurden von den verpressten Massen jeweils Flach- und Rundstrangproben direkt nach der Extrusion über mindestens 12 h bei  $-18\text{ °C}$  eingelagert. Durch die Volumenzunahme des Wassers beim Gefrieren werden vorhandene Texturen deutlich aufgeweitet, damit sichtbar gemacht und können anhand von fotografischen Aufnahmen qualitativ bewertet werden.



**Abbildung 28: Beispiel für Frostproben zur Visualisierung von Texturen**

### 3.3.1.6 Trockenbiegefestigkeit

Als für die Praxis wichtiger Parameter zur Beurteilung der Masseeigenschaften wurde die Trockenbiegefestigkeit (TBF, bestimmt im 3-Punkt-Biegeversuch) herangezogen. Im Produktionsprozess keramischer Produkte ist eine ausreichend hohe Grünfestigkeit von essentieller Bedeutung, um Bruch beim Probenhandling im Prozess und damit Ausschuss zu minimieren. Die Trockenbiegefestigkeit ist bei Rohstofflieferanten und Keramikproduzenten Teil der Basischarakterisierung von Tonmineralrohstoffen und Massen. Im Projekt wurde neben der Grundcharakterisierung der Projekt-Tone untersucht, welchen Einfluss das Mauken sowie ausgewählte bakterielle Stoffwechselprodukte auf die Trockenbiegefestigkeit der verwendeten Einzeltone und Projektmassen haben.

Die Bestimmung der TBF wird nach am FGK optimierter Methode (FGK, 2006) prozessnah an stranggepressten Trapez-Proben im 3-Punkt-Biegeversuch durchgeführt. Die Proben wurden zur Prüfung bei  $110\text{ °C}$  bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und vor dem Bruchtest im Exsikkatorschrank abgekühlt. Zur statistischen Absicherung wurden je Versuchsmasse 15 Proben getestet.

### 3.3.1.7 Sonstige Untersuchungen am getrockneten bzw. gebrannten Produkt

Zur weiteren Charakterisierung und zum Vergleich der Versuchsrohstoffe und -Massen wurden ergänzend an extrudierten Probekörpern Trocken- und Brennschwindung sowie Wasseraufnahme und Porosität bestimmt.

### 3.3.2 Basistests mit mikrobiellen Stoffwechselprodukten in Tonrohstoffen

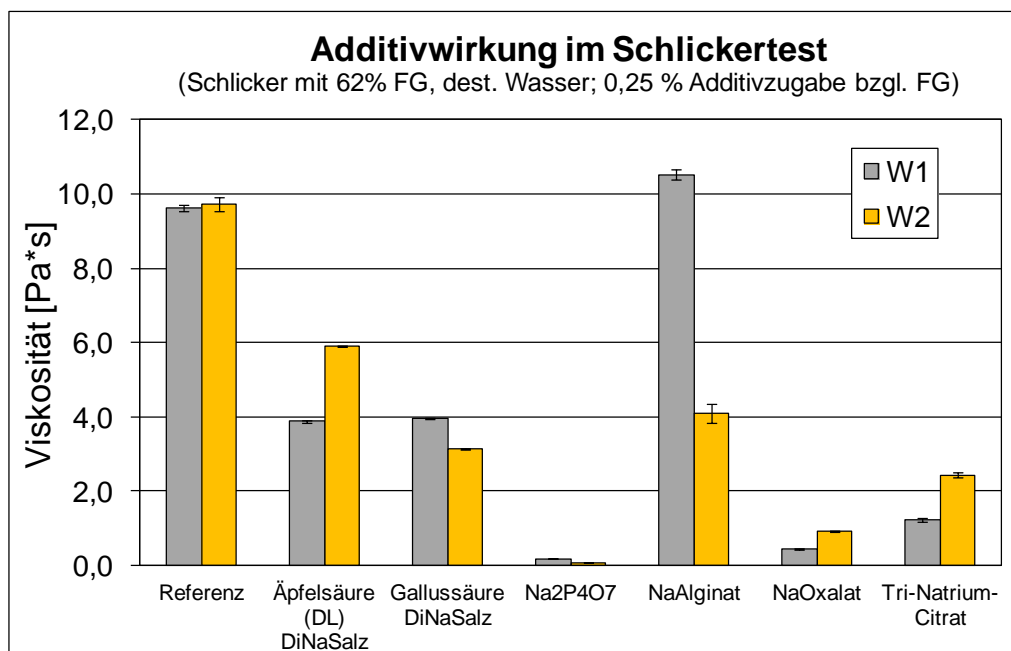
Zunächst wurden verschiedene, potentiell mikrobiell herstellbare Substanzen und Stoffwechselprodukte ausgewählt und in ersten Versuchen auf Ihre Wirkung bezüglich der Rheologie von Tonschlickern untersucht. Die hierzu ausgewählten Substanzen sind in Abbildung 29 aufgelistet.

Zur Präparation der Schlicker wurden die erforderlichen Mengen an Wasser, Tonmehl und ggf. Additiven abgewogen. Für die Schnelltests entsprach dies einem Feststoffgehalt von 62 % und 0,25 % Additiv bzgl. Feststoffeinwaage. Die Additive wurden vor Feststoffzugabe direkt im Wasser gelöst. Das Tonmehl wurde unter langsamem Rühren (ca. 1 min bei 100 U/min) in die vorbereitete Additivlösung eingestreut und der Schlicker anschließend 10 min bei 1000 U/min dispergiert, wobei darauf geachtet wurde, dass ein klumpenfreier und homogener Schlicker entstand. Die Schlicker wurden bis zur Viskositätsbestimmung bei Raumtemperatur luftdicht aufbewahrt und vor den Messungen nochmals von Hand für 1 min mit dem Spatel aufgerührt. Die Schlicker wurden sowohl frisch nach der Herstellung, als auch zur Beurteilung der zeitlichen Stabilität der Additivwirkung nach 1 Woche vermessen. Die Messungen erfolgten an einem Rotationsviskosimeter MCR 300 der Firma Anton Paar im Zylindermesssystem (CC27) bei einer Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  und einer Temperatur von  $20 \text{ °C}$ , Messdauer 50 sec bei Aufnahme von 10 Messwerten unter Auswertung des Mittelwertes.

Organische Säuren	Entsprechende Salze	(Poly-) Saccharide	Sonstiges
Äpfelsäure	Äpfelsäure- (DL)-DiNaSalz (di-Na-DL-Malat)	Fructose	Natriumpyrophosphat $\text{Na}_2\text{P}_4\text{O}_7$
Bernsteinsäure	Bernsteinsäure DiNaSalz	Dextran	NaOH
Citronensäure	Tri-Natrium-Citrat	NaAlginat	NaCl
Essigsäure	Natriumacetat	Xanthan	
Maleinsäure	Natriummaleat		
Milchsäure	Natriumlactat		
Oxalsäure	Natriumoxalat		
Glutaminsäure	Natriumglutamat		
	Brenztraubensäure DiNaSalz		
	Fumarsäure DiNaSalz		
	Gallussäure DiNaSalz		
	Natriumformiat		
	Natriumgluconat		

**Abbildung 29: Übersicht zu Substanzen, die auf ihre Wirkung in Schlickern und/ oder plastischen Massen getestet wurden**

Generell konnte beobachtet werden, dass die getesteten organischen Säuren eine geringer verflüssigende bis hin zu eher verdickender Wirkung in den Schlickeransätzen als ihre entsprechenden Salze zeigten. Natriumpyrophosphat als klassischer, kommerziell verfügbarer Verflüssiger zeigte als Referenzadditiv wie erwartet eine entsprechend starke Verflüssigung. In Abbildung 30 ist eine Auswahl an Ergebnissen aus den Schlickertests dargestellt.



**Abbildung 30: Viskosität (bei Scherrate  $50\text{s}^{-1}$ ) von Schlickern aus W1 bzw. W2, mit ausgewählten Additiven versetzt**

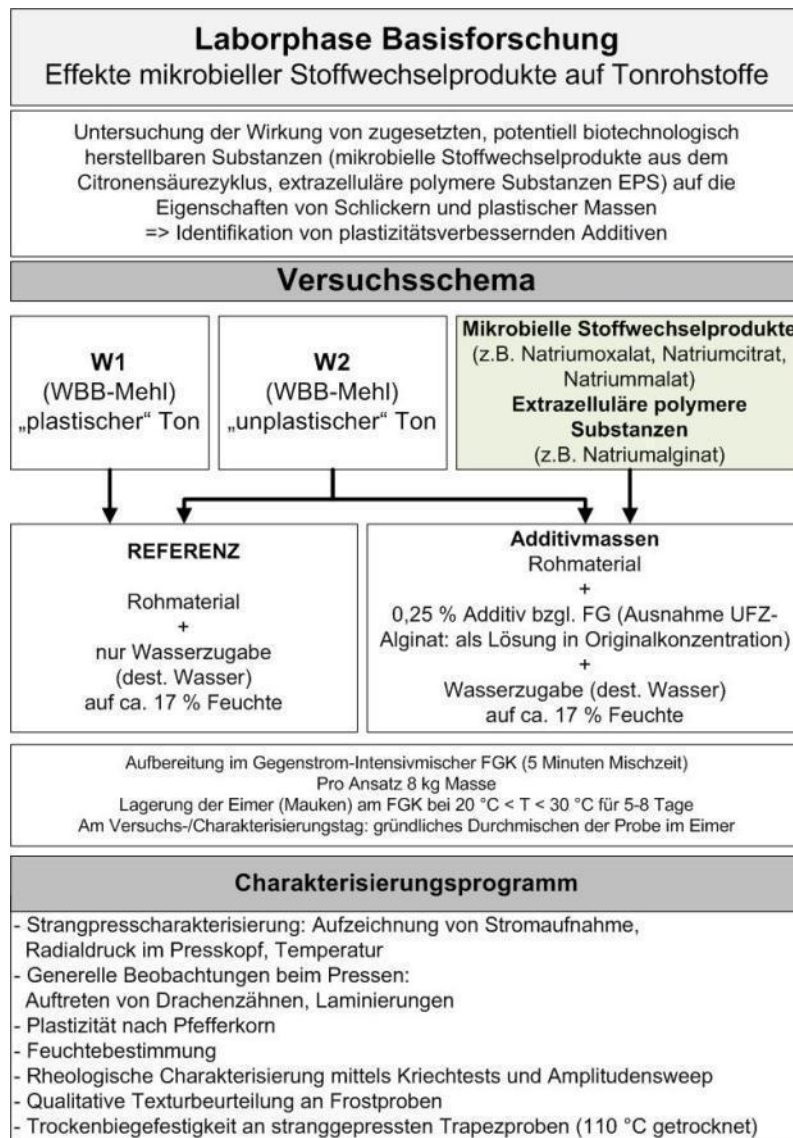
Im Rahmen der Untersuchungen an Schlickersystemen wurden alle in Abbildung 29 aufgelisteten Substanzen im beschriebenen Rheologie-Scan einem Schnelltest bezüglich ihrer generellen Wirkung auf Ton-Wasser-Dispersionen getestet.

Im nächsten Schritt wurden basierend auf den Ergebnissen Substanzen ausgewählt, die in diesen Schlickerversuchen vielversprechende Ergebnisse bzgl. verflüssigender Eigenschaften und zeitstabiler Wirksamkeit gezeigt hatten. Diese Additive wurden nun zusätzlich in plastischen Massen auf ihre Effekte getestet. Auch wurde für die Auswahl der Substanzen der Aspekt der Umsetzbarkeit für eine biotechnische Nutzung mit einbezogen. Eine verflüssigende Wirkung wurde deshalb ausgewählt, da angenommen wird, dass hierbei Gleiteigenschaften zwischen den Tonpartikeln auch bei den reduzierten Wassergehalten einer plastischen Masse verbessert werden können.

Das Alginat zeigte in den Schlickertests bei Ton W1 zwar verdickende Wirkung. Diese hochwertige Tonsorte soll jedoch unter dem Aspekt der Nachhaltigkeit durch einen mithilfe von Mikroorganismen bzw. Additiven plastifizierten W2 ersetzt werden. Bei diesem Ton W2 konnte im Schlickerversuch eine positive, verflüssigende Wirkung des Alginats beobachtet werden. Das Polysaccharid wurde somit für die Untersuchungen an plastischen Massen ausgewählt. Auch Ernst (2007) und Staley (1992) beschreiben eine viskositätsbeeinflussende Wirkung von Alginaten in Ton- und Aluminiumoxidschlickern. Alginat sind statische Copolymere aus den Monosacchariden Mannuronat und Guluronat (Sutherland, 1994) und können aus Algen gewonnen werden, sind aber auch Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Mit *Azotobacter vinelandii* sind alginatbildende Bakterien bekannt (Pindar und Bucke, 1975), was die Forderung nach einer potentiellen biotechnischen Nutzbarkeit erfüllt. Der Unterschied zwischen bakteriellem Alginat und Algenalginat liegt in der Anwesenheit von Acetylgruppen an den Mannuronatresten der Bakterienalginat (Wloka, 2006). Das relative Verhältnis der beiden Uronsäuren sowie die Anordnung der Uronsäuren im Polysaccharid variiert von Alginat zu Alginat und ist ein Hauptfaktor für die spezifischen Eigenschaften dieser Polysaccharide (Emmerichs, 2004). Durch den molekülstrukturellen Unterschied der Alginat aus Braunalgen bzw. Mikroorganismen können unterschiedlich starke/wirkende Effekte auf die Tonmassen möglich sein, die im Rahmen der Additivtests ebenfalls untersucht werden.

Zur Untersuchung der verarbeitungsrelevanten Eigenschaften von plastischen Tonmassen unter Additiveinfluss wurde nach dem in der folgenden Abbildung 31 dargestellten Versuchsschema vorgegangen.

Die im Versuchsschema beschriebene Vorgehensweise der Masseherstellung gilt für die ersten Versuche im Rahmen der Laborphase Basisforschung, wurde aber ebenfalls bei den weiterführenden Additivtests (siehe Kapitel 6) angewendet.

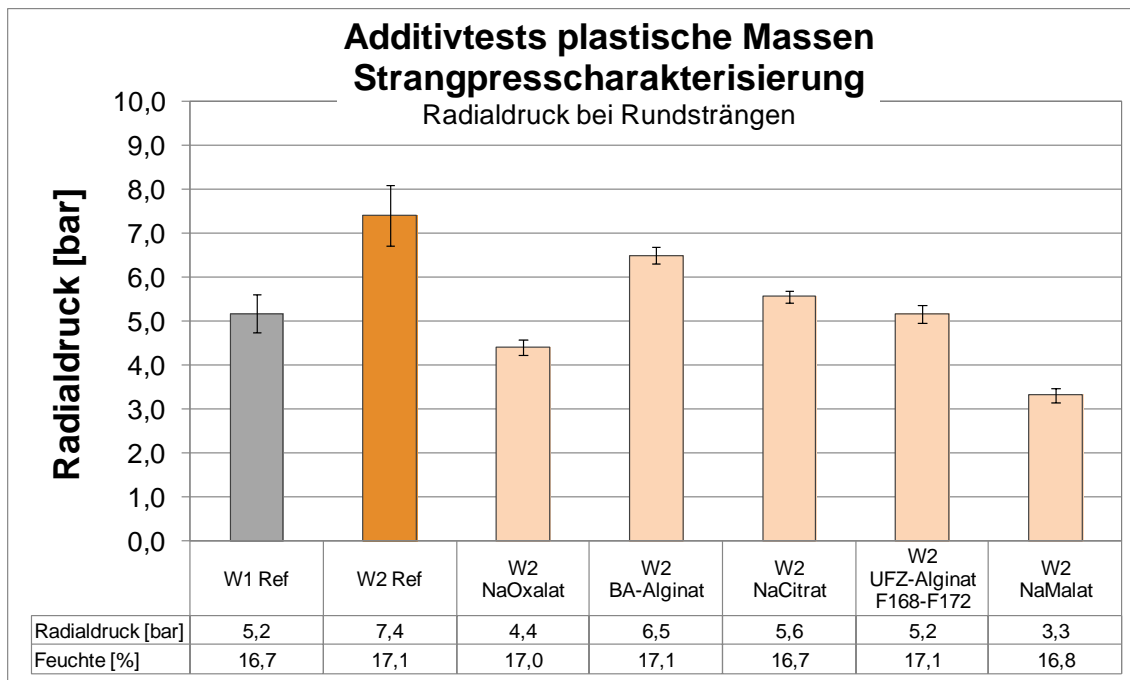


**Abbildung 31: Versuchsschema der Basistests zum Einfluss von mikrobiellen Stoffwechselprodukten auf anwendungstechnische Eigenschaften von Tonrohstoffen**

Mit Hilfe des umfassenden Charakterisierungsprogramms konnten Änderungen der Massen unter Additivzugabe im Vergleich zur Referenz beobachtet werden. Die getestete Auswahl vielversprechender mikrobieller Stoffwechselprodukte in Schlickern bzw. plastischen Massen zeigte einen deutlichen Einfluss auf Viskosität bzw. Verarbeitungsverhalten, Produktqualität und Trockenbiegefestigkeit.

In Abbildung 32 ist der Verarbeitungsaufwand als Radialdruck im Presskopf beim Verpressen verschiedener Massenansätze als Rundstrangproben dargestellt.

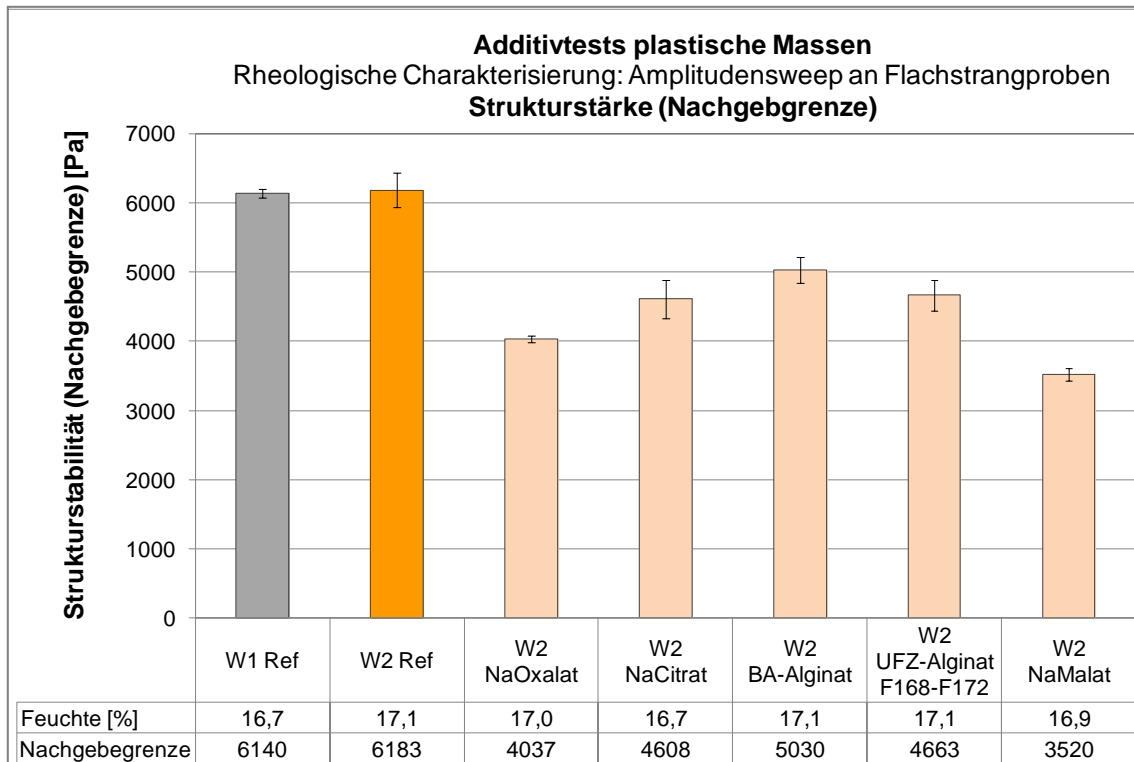




**Abbildung 32: Effekte von verschiedenen Additiven auf den Verarbeitungsaufwand beim Verpressen plastischer Massen (Beispiel Rundstrang)**

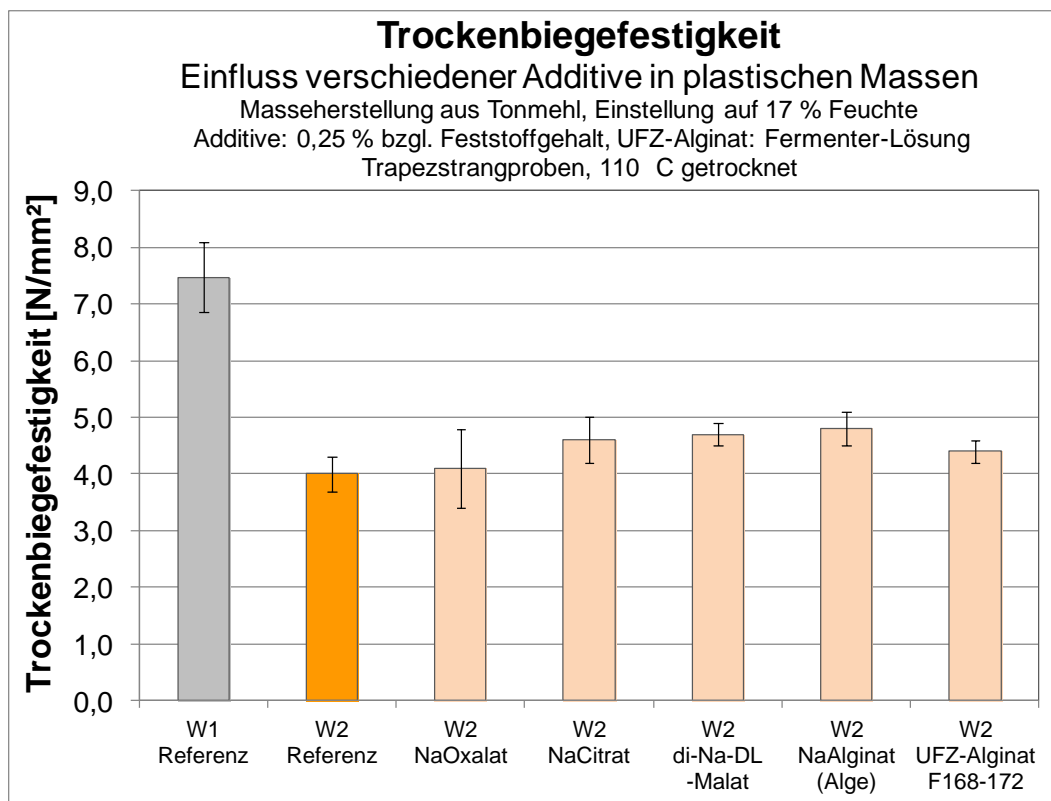
Weiterhin wurde beobachtet, dass die positive Wirkung mancher Additive im Schlicker nicht unbedingt auch auf die Anforderungen an plastische Massen übertragbar ist. Natriumoxalat und Natriumcitrat als Additive in der plastischen Masse verringerten beispielsweise zwar deutlich den Verarbeitungsaufwand (Abbildung 32), führten allerdings beide zu starker Texturierung und Delamination der Stränge sowie zu extremen Drachenzähnen. Das Natriumsalz der Äpfelsäure (Natriummalat) zeigte sowohl niedrigen Verarbeitungsaufwand als auch gute Produkteigenschaften. Auch bei Einsatz des Braunalgen-Alginats wurde eine positive Wirkung auf Verarbeitungseigenschaften beobachtet. Basierend auf bereits vorhandenen Ergebnissen und Erfahrungen aus Vorversuchen am KIT (vgl. Ernst (2007) und interne Vorarbeiten) wurde entschieden, die weitere Projektarbeit und biotechnologische Produkt- und Verfahrensentwicklung auf das Polysaccharid zu fokussieren. Ein erstes Fermenter-Produkt des Projektpartners UFZ konnte im Rahmen der Laborphase Basisforschung bereits in die Tests einbezogen werden und wirkte sich ebenfalls positiv auf Verarbeitungseigenschaften und –Aufwand aus. Dabei muss insbesondere berücksichtigt werden, dass die Fermenterlösung im Vergleich zu den anderen eingesetzten Additivilösungen nur einen Wirkstoffgehalt von 0,06 % berechnet auf den Feststoffgehalt einbrachte und trotzdem bereits Effekte zeigte. Im weiteren Projektverlauf wurde daher ein Versuch zur Direktbeimpfung von Tonmassen mit alginatbildenden Bakterien durchgeführt (siehe Kapitel 5). Alternativ wurde außerdem die biotechnische Alginatproduktion aufgrund der bereits bei niedriger Produktkonzentration vielversprechenden Ergebnisse optimiert (siehe Kapitel 6).

Anhand der Ergebnisse der Rheologiemessungen (Amplitudensweep an Flachstrangproben) ist zu erkennen, dass die Proben unter Additivzusatz leichter verformbar werden (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 33: Rheologische Charakterisierung an Flachstrangproben, Strukturstärke aus Amplitudensweep**

Abbildung 34 illustriert die Ergebnisse der Trockenbiegefestigkeitstests an den verschiedenen Masseversätzen.



**Abbildung 34: TBF einer Auswahl von mit verschiedenen Additiven versetzten Massen**

Zum schnellen Überblick wurden die Ergebnisse aus den anwendungstechnischen Untersuchungen an plastischen Massen in eine Bewertungsmatrix (siehe folgende Abbildung 35) übertragen.

Massen aus W2 (WBB-Mehl), eingestellt auf ca. 17 % Feuchte, Ansatz mit dest. Wasser, Additivzugabe bzgl. Feststoffgehalt	Verarbeitungseigenschaften Strangpresse			Pfefferkorn	Rheologie Produktstabilität	TBF	Textur im Frosttest	Fazit
	Radialdruck und Stromaufnahme	Produktqualität	Pressverhalten		Strukturstärke			
W2 (Mehl) Referenz	6	gut	gut	5	1	Referenzwert	fein texturiert	Referenz
W2 (Mehl) + 0,25 % NaOxalat	2	starke Laminierungen, starke Drachenzähne	schlecht	4	5	Verschlechterung	texturiert	stark negative Wirkung
W2 (Mehl) + 0,25% NaCitrat	3	Laminierungen, Drachenzähne	schlecht	3	4	Verbesserung	stark texturiert	negative Wirkung
W2 (Mehl) + 0,25 % di-Na-DL-Malat	1	gut	gut	1	6	Verbesserung	sehr fein texturiert	positive Wirkung
W2 (Mehl) + 0,25 % NaAlginat (Braunalge)	5	gut, sehr leichte Drachenzähne	befriedigend	6	2	Verbesserung	fein texturiert	positive Wirkung
W2 (Mehl) + Alginatlsg. UFZ F168-F172*	4	gut	gut	2	3	Verbesserung	fein texturiert	positive Wirkung
* Eingesetzt als Fermentationslösung in Originalkonzentration, Alginatkonzentration ca. 0,06 % Alginat bzgl. Feststoffgehalt	geordnet nach: 1 (niedrigste Strom- und Radialdruckwerte) bis 6 (höchste Werte)			geordnet nach: 1 (niedrigste Pfefferkornstauchhöhe) bis 6 (höchste Werte)	Messung im Amplitudensweep PP12; geordnet nach: 1 (höchste Strukturstärke) bis 6 (geringste Strukturstärke)		je feiner die Texturen, desto positiver für die Produktqualität	

**Abbildung 35: Beispiel für Auswertung von ersten Additivtests in plastischen Massen im Rahmen der Laborphase Basisforschung**

Die kombinierten Ergebnisse aus den Charakterisierungen erlauben nun eine aussagekräftige Bewertung der verschiedenen Additive und Masseansätze.

### 3.3.3 Schlussfolgerungen aus anwendungstechnischen Untersuchungen

Generell kann von den Wirkweisen der Additive im Schlickerschnelltest noch nicht vollständig auf ihr Verhalten in plastischen Massen geschlossen werden.

Durch Testen der Massen auf der instrumentierten Laborstrangpresse mit gleichzeitiger Probenherstellung für weitere Versuche können Verarbeitungsaufwand sowie Verarbeitungseigenschaften im Labormaßstab beurteilt werden. Die stranggepressten Prüfkörper werden für weitere Tests (z.B. Rheologie, Trockenbiegefestigkeit, Schwindung, Wasseraufnahme etc.) eingesetzt. Somit wurde im Rahmen der Laborphase Basisforschung ein für die weiteren im Projekt geplanten Arbeiten geeignetes Charakterisierungsprogramm zusammengestellt. Die Ergebnisse der Laborphase Basisforschung konnten zeigen, dass die anwendungstechnische Charakterisierung von Tonrohstoffen und Tonmassen sehr komplex ist und stets mit mehreren Methoden durchgeführt werden sollte um aussagekräftig zu sein.

In den Basis-Tests zu Effekten verschiedener mikrobieller Stoffwechselprodukte in Schlickern und plastischen Massen wurde das extrazelluläre Polysaccharid Alginat als Substanz mit positiver Wirkung auf Plastizität und Trockenbiegefestigkeit identifiziert und für die biotechnischen Versuche im Projekt ausgewählt. Erste Produkte aus Fermenterversuchen am UFZ zeigen bereits bei geringer Zugabemenge von Wirksubstanz positive Effekte auf Verarbeitungseigenschaften plastischer und Trockenbiegefestigkeit der Produkte.

## **4 Maukversuche zur Untersuchung der Prozesse bei der Reifung von Tonmassen**

Wie bereits eingangs zur Projektvorstellung des Forschungsstrangs „Plastifizierung“ beschrieben, ist das Mauken ein Jahrhunderte alter Prozessschritt, der zum Aufschluss und zur Verbesserung der plastischen Eigenschaften von tonmineralischen Rohstoffen eingesetzt wird. Im Rahmen verschiedener Maukversuche wurde untersucht, welche messbaren Effekte und Veränderungen das klassische Lagern von Tonmassen über einen bestimmten Zeitraum erzielt.

### **4.1 Zielsetzung**

Zielsetzung der Maukversuche war es, zur Aufklärung der Vorgänge bei der oft traditionell eingesetzten, gezielten Lagerung von Tonrohstoffen oder Fertigmassen beizutragen. Bei der zur Plastizitätsverbesserung eingesetzten Tonreifung über Tage bis hin zu mehreren Wochen ist noch weitgehend ungeklärt, welche genauen Effekte das Mauken tatsächlich mit sich bringt. Es sollen die beiden Grundtheorien erforscht werden, ob die oft beschriebene Plastizitätsverbesserung ihre Ursache in mikrobiellen Reaktionen und/oder in Wasserhomogenisierung innerhalb der Masse hat.

- Welche Veränderungen am Tonrohstoff sind mit den zusammengestellten Messmethoden, dem interdisziplinären Analysewerkzeugkasten, detektierbar?
- Können daraus Empfehlungen für Rohstoff-/Keramikbetriebe getroffen werden, die das Mauken oft noch traditionell bedingt einsetzen?
- Ist das Mauken tatsächlich ein unverzichtbarer Prozessschritt, der die Plastizität signifikant verbessert?
- Wenn es ein mikrobieller Effekt ist, kann das Mauken beschleunigt bzw. gezielt durch Mikroorganismen angeregt werden?

### **4.2 Versuchsdurchführung**

Um die Mechanismen und Effekte beim Mauken zu untersuchen, wurden die beiden Projekttonne W1 und W2 im Maßstab von jeweils mehreren Tonnen Material abgebaut und direkt zu Tonschnitzeln aufbereitet. Diese wurden im bergfeuchten Zustand (ca. 6 % Feuchte) zusätzlich mit Prozesswasser versetzt, um eine für die keramtechnische Charakterisierung erforderliche Mindestfeuchte von ca. 15 % zu erreichen. Die so behandelten Tonschnitzel wurden im Schnitzler mehrfach homogenisiert und die Proben anschließend in Eimer abgefüllt (siehe Abbildung 36).

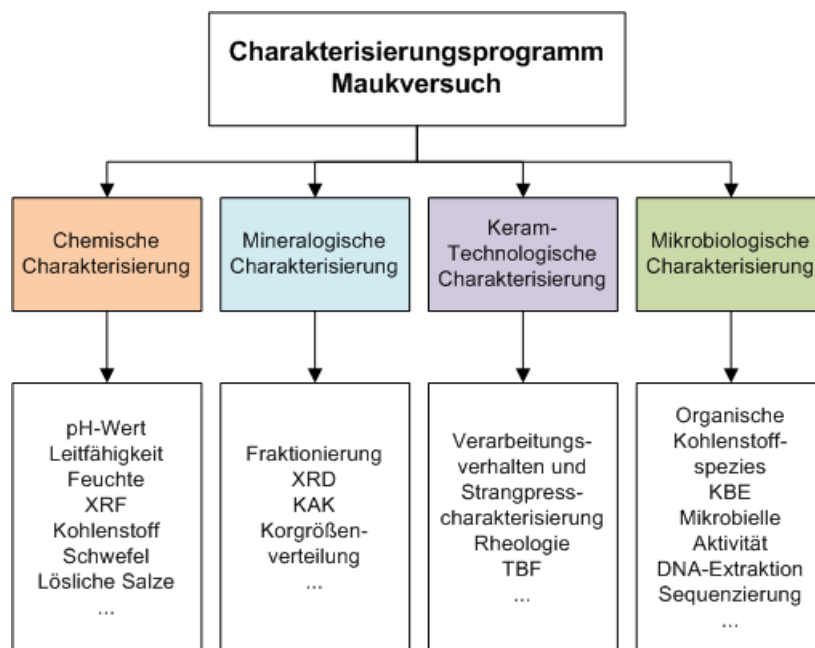


**Abbildung 36: Aufbereitung und Herstellung der Proben für den Maukversuch I**

Die Probenlagerung erfolgte in luftdurchlässigen, aber wasserdampfdurchlässig verschlossenen Probeneimern unter klimatisch konstanten Bedingungen am KIT.

Zu vorher definierten Probenahmeterminen (direkt nach Herstellung t1, nach 6 Tagen t6, nach 13 Tagen t13, nach 27 Tagen t27 nach 41 Tagen t45 und nach 83 Tagen t83 sowie ggf. zu partnerspezifisch individuell gewählten Zusatzterminen) wurde jeweils die entsprechend benötigte Anzahl Probeneimer entnommen und die erforderlichen Teilmengen Probe an die beteiligten Partner versandt.

In folgender Abbildung ist in einem kurzen Überblick zusammengefasst, welche Untersuchungen an den Tonmassen zu den Probenahmezeitpunkten durchgeführt wurden.



**Abbildung 37: Übersicht zum Charakterisierungsprogramm im Maukversuch I**

Im Anschluss an Maukversuch I wurde ein weiterer Maukversuch unter modifizierten Bedingungen (nur an Ton W2 unter dem Aspekt der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse; erhöhte Massenfeuchte) durchgeführt. Auch können Erkenntnisse aus dem Alginatbakterienversuch (siehe auch Kapitel 5) in die Bewertung der Tonreifung mit einbezogen werden. In den folgenden Ausführungen sollen die wichtigsten Ergebnisse der Maukversuche dargestellt werden.

### **4.3 Mineralogische Analysen**

Für die zeitliche Auflösung des Tonalterungsprozesses (Mauken) wurden die in der Aufbereitungsanlage WBB Moritz (Wirges/Westerwald) genommenen Proben W1 und W2 über einen Zeitraum von 19 Wochen mineralogisch untersucht. Das Gesamtmaterial als auch die daraus gewonnenen Fraktionen zeigten bezüglich der in Kapitel 3.1 vorgestellten und beim Maukversuch angewandten Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen mit der Zeit, d.h. die Veränderungen blieben innerhalb der analytischen Auflösbarkeit. Daher wurden die jeweiligen über den Zeitraum des Maukversuchs erhaltenen Ergebnisse gemittelt und für die allgemeinen intensiv-mineralogischen Untersuchungen herangezogen.

### **4.4 Mikrobiologische Analysen**

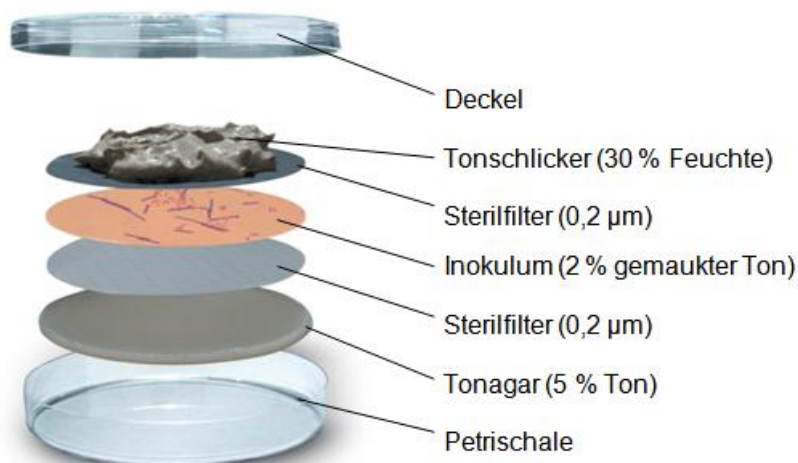
Die in der Basisforschung etablierten Arbeitsmethoden zur Charakterisierung bakterieller Populationen waren wesentlicher Bestandteil des Arbeitsprogramms zu den Maukversuchen. Im Zuge der Versuchsplanung zu diesen Maukversuchen mussten aus den Erkenntnissen der Basisforschung weitere Vorversuche zur Verbesserung von Kultivierungstechniken durchgeführt werden. Neben einer Extraktion der Gesamt-DNA aus den Proben der Versuchsphasen, sollten auch die sich spezifisch entwickelnden und verändernden Populationen neben der molekularbiologischen Analyse auch mittels optimierter Kulturtechniken charakterisiert werden. Diese Arbeiten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt.

In Vorversuchen zeigte sich, dass sich die DGGE-Bandenmuster einer bakteriellen Population, die zuvor mehrere Tage auf Agarmedien wie R2A oder Tonagar kultiviert wurde, unabhängig vom Alter bzw. Lagerungsdauer eines Rohstoffes, sehr ähnlich bzw. gleich ausbildete. Damit würden sich auch mögliche Änderungen der Populationszusammensetzung zu den verschiedenen Probenahmezeitpunkten des Maukversuchs, sichtbar in verändertem DGGE-Bandenmuster, annähernd gleich ausbilden. Spezifische Entwicklungen der Populationen können somit nicht ausreichend detektiert werden. Vermutlich bilden die auf den Agarplatten aufgebrachten Probematerialien im Zuge der gleichen Kultivierungsbedingungen nur diejenigen Organismen zum wachsen, die die Nährstoffe darin verstoffwechseln können. Andere, sich spezifisch ausbildende Populationen dagegen können über die Bebrütungsdauer von mehreren Tagen sich nicht zu Kolonien vermehren. Sie entziehen sich damit der weiteren molekularbiologischen Analyse, da vermutlich ihre geringe Menge an DNA auf den Agarplatten mittels PCR vergleichsweise gering amplifiziert wird.

Um die Bedingungen des natürlichen Habitates der Mikroorganismen im Vergleich zu der Kultivierung auf Tonagar zu verbessern, wurde das im folgenden Kapitel beschriebene Dynamische Kultivierungssystem (DCS) entwickelt (Abbildung 38).

#### 4.4.1 Dynamisches Kultivierungssystem (DCS)

Beim DCS handelt es sich um die Weiterentwicklung der „Diffusion Chamber“ (Bollmann et al. 2007), wobei zum Aufbau des DCS keinerlei Metalle, welche durch mögliche Ionenfreigabe Einfluss auf die Mikroorganismen nehmen könnten, eingesetzt wurden. Das Inokulum war ein verdünnter Tonschlacker des jeweiligen Probenahmezeitpunktes mit einem Feststoffanteil von 2%. Dieser befand sich beim DCS zwischen zwei Sterilfiltern mit einer mittleren Porenweite von 0,2  $\mu\text{m}$  (Abbildung 38). Das ermöglicht den Nährstoffaustausch mit dem bedeckenden Tonschlacker, welcher 50% Feststoffanteil enthielt und aus dem Ton der entsprechenden Probenahmezeitpunkte hergestellt wurde. Durch den Aufbau des Systems wird die Interaktion zwischen Bakterien innerhalb der Sterilbarriere mit den Mikroorganismen außerhalb ermöglicht. Diese Interaktion kann zum Beispiel Wachstumsmediation (Peterson et al. 2006), der gemeinsame Nährstoffabbau (Wolfaardt et al. 1994; Christensen et al. 2002), oder die Verstoffwechslung von Exsudaten anderer Spezies (Haak & Mc Feters 1982; James et al. 1995) sein. Weiterhin werden durch den Aufbau lokale mikroaerobe bzw. anoxische Bedingungen geschaffen, welche auch im Ton vorzufinden sind.



**Abbildung 38: Aufbau des Dynamischen Kultivierungssystems DCS**

Die DCS-Platten wurden 8 Tage bei 20°C inkubiert. Nach dem vorsichtigen Abheben des oberen Sterilfilters wurde dieser verworfen und die Bakterien vom unteren Filter mit 1 ml PBS (Phosphate buffered saline) abgewaschen. Dazu wurden die Mikroorganismen mit einem Zellschaber gelöst und in PBS aufgenommen, aliquotiert und eingefroren bzw. molekularbiologisch untersucht. Während des Maukversuchs wurden Sterilkontrollen des Systems an 1, 27, 41 und 83 Tage alten Tonmassen durchgeführt. Dafür wurden anstelle des Inokulums 50  $\mu\text{l}$  sterile, physiologische Kochsalzlösung eingesetzt.



#### 4.4.2 Biochemische Methoden

Die Komplexität einer sich in einem natürlichen Habitat entwickelnden Mischpopulation spiegelt sich auch in den Stoffwechseleigenschaften wieder. Da spezifische Stoffwechselaktivitäten nicht einer bestimmten Spezies zuzuordnen sind, kann dagegen die Erfassung der Gesamtstoffwechselaktivitäten Hinweise auf Phasen hoher oder niedriger Aktivitäten der gesamten Biozönose im Verlaufe des Alterungsprozesses aufzeigen. Hierzu wurden mit „Biolog“ und „ApiZym“ käuflich zu erhaltene Tests eingesetzt, deren Prinzip auf der semiquantitativen Detektion von spezifischen Substratumsätzen mittels chromogener Substrate beruht.

##### 4.4.2.1 Biolog

Das Prinzip der Biolog Methode ist, dass jede Bakterienspezies entsprechend seiner Enzymausstattung unterschiedliche Kohlenstoffquellen verwerten kann. Als Trockensubstrat sind in Mikrotiterplatten diverse Kohlenstoffverbindungen sowie physiologisch notwendige Nährstoffe, wie zum Beispiel Phosphat und der Indikatorfarbstoff Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) enthalten (Borchner 2005). Aktive Bakterien, welche die jeweilige Kohlenstoffquelle verwerten können, weisen eine Dehydrogenaseaktivität auf, durch welche das farblose TTC zu rotem Triphenylformazan reduziert wird.

Für die Anwendung des Biolog- Systems zur Untersuchung der Stoffwechselleistungen von aus dem Ton isolierten autochthonen Bakterienkulturen ohne Tonmatrix wurde jeweils eine Suspension von 150 µl mit einer Bakterienkonzentration von  $10^7$  ml<sup>-1</sup> bis  $10^8$  ml<sup>-1</sup> eingesetzt, was einem McFarland Standard (McFarland 1907) von ca. 0,5 entspricht. Die Inkubation wurde für 24 Stunden bei 20°C durchgeführt.

Tonschlicker wurden zu jeweils 150 µl je Vertiefung in Verdünnungen von 1:100 und 1:1000 eingesetzt. Die Untersuchungen mittels Biolog erfolgten neben der Basischarakterisierung der Tone auch beim Maukversuch. Die Dokumentation aller Ergebnisse der Biolog Ansätze erfolgte durch Scannen der Platten mit einem Flachbrettscanner „Epson Perfection 3170 Photo“. Für die Auswertung wurde das Schema entsprechend Abbildung 39 genutzt.

Die Bewertung der mit Tonsuspensionen angeimpften Platten erfolgte danach zusätzlich von oben mit dem gleichen Auswerteschema, da aufgrund der optisch dichten Masse der Tonschlicker in einigen Fällen eine punktuelle Verfärbung nur auf der Ober- oder Unterseite zu erkennen war.

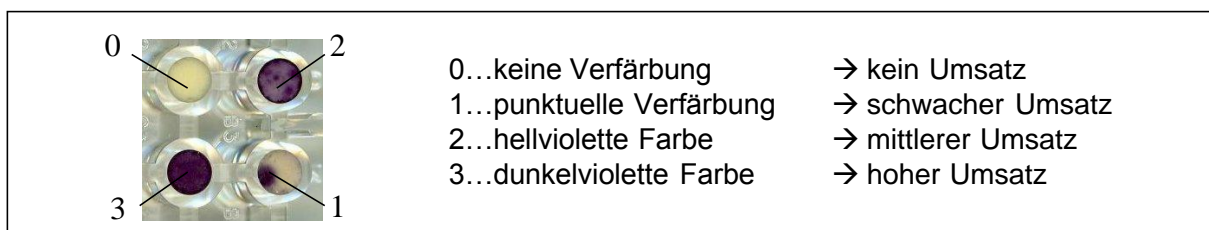


Abbildung 39: Bewertung der Stoffumsätze im Biolog



Um den mittleren Stoffumsatz über die ganze Platte und somit einer jeweiligen Probe zu charakterisieren, wurde daher der Wert des „average well color development“ (AWCD, Mittlere Farbentwicklung über die Gesamtheit der Reaktionen im Biolog) ermittelt (Garland 1996). Dabei handelt es sich in diesem Fall vereinfacht um den Mittelwert aller Einzelgewichtungen innerhalb einer Platte.

Zum Einsatz kamen sowohl Biolog GN2 MicroPlate™ und Biolog EcoPlate™, die mit einer reduzierten Substratauswahl drei Proben pro 96-well Mikrotiterplatte verarbeiten kann.

#### 4.4.2.2 ApiZym

Die Methode des „ApiZym“ von der Firma bioMérieux funktioniert nach dem Prinzip eines enzymatischen Substratumsatzes, wobei durch Verstoffwechslung ein chromogenes Produkt entsteht. Die Substrate, welche sich in den Kavitäten als Testsubstanz befanden sowie die Enzyme, mit welchen diese umgesetzt werden können, sind in der Dissertation von Herrn Kaden weiter erläutert.

Für die Untersuchung der Proben aus der Basischarakterisierung sowie denen des Maukversuchs wurden je Ansatz 2 ml Schlicker mit einer Verdünnung 1:100 bezogen auf die Frischmasse mit steriler physiologischer Kochsalzlösung angesetzt. Davon wurden in jede Vertiefung des Testsystems 100 µl pipettiert und für 24 h bei 20°C inkubiert. Tonmatrixfreie Bakterien wurden in einer Konzentration entsprechend dem McFarland Standard von 5 eingesetzt und bei gleichen Inkubationsbedingungen wie die Tonsuspensionen kultiviert.

#### 4.4.3 Maukversuch I

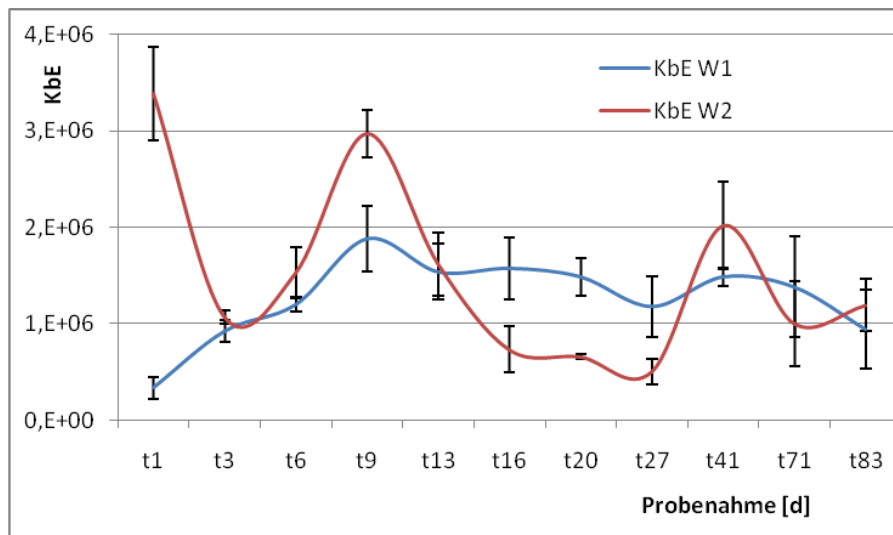
Das mikro- und molekularbiologische Methodenspektrum zur Charakterisierung der bakteriellen Population wurde für den Maukversuch I wie folgt zusammengestellt:

- Bestimmung der Kolonienbildenden Einheiten (KbE) auf R2A-Agar
- Biolog EcoPlate; Biolog GN2
- ApiZym
- Gesamt DNA-Gehalt
- Populationsanalysen von R2A-Agar, Tonagar und DCS

Dieses Analyseprogramm wurde zu den Probenahmezeitpunkten t1, t3, t6, t9, t13, t16, t20, t27, t41 und t83 durchgeführt, wobei die Zahl die Tage der Lagerung repräsentiert. Eine Probe t0 konnte nicht untersucht werden, da der zeitliche Abstand zwischen Aufarbeitung der Tone im Westerwald und dem potentiellen Beginn der Analysen im KIT mehr als 12 Stunden betrug. Da der Maukprozess ein zeitlich fortschreitender Vorgang ist, war es wichtig, die Proben am Tag der Probenahme oder im Falle der keramtechnischen Analytik, für welche die Tone versandt werden mussten, nach einer definierten Zeit zu bearbeiten.

#### 4.4.3.1 Untersuchung der KbE

Zwischen W1 und W2 waren deutliche Unterschiede in der ermittelten KbE auf R2A nach 8-tägiger Inkubation bei 20°C festzustellen (Abbildung 40). So stieg der Wert für W1 bis t9 an, um dann unter Berücksichtigung der Fehlerintervalle nahezu konstant zu bleiben, während die KbE für W2 mit 3 Maximal- und 3 Minimalwerten einen deutlich alternierenden Trend aufwies. Als eine Phase mit erhöhter KbE kann der Bereich ab t6 bis t9 angesehen werden.

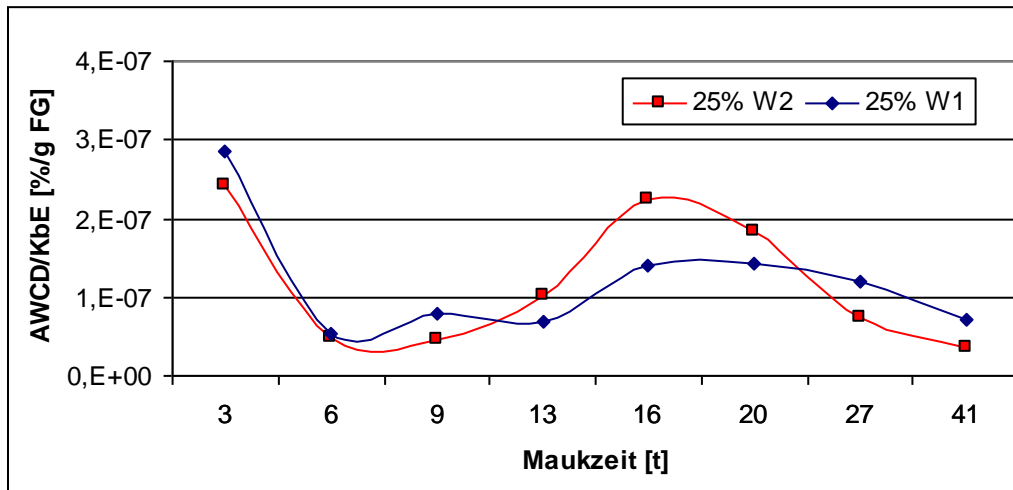


**Abbildung 40: KbE (R2A; 20°C; 8d) im Verlauf des Maukversuchs**

Es wurde für beide Tone ein deutlich alternierender Verlauf oder ein deutlicher Trend erwartet, da die Aufarbeitung der Tone einen starken Eingriff in das Habitat der autochthonen Mikroorganismen darstellte, und sich verschiedene Spezies den neuen Bedingungen entsprechend bevorzugt vermehren konnten oder im System abstarben. Diese Effekte werden in natürlichen Systemen zum Beispiel durch Konkurrenz, Symbiosen oder interspezifische Abbaukaskaden für Metabolite verstärkt. Ein Nachteil kultivierungsabhängiger Methoden liegt in einem methodischen Fehler. Wie groß dieser Fehler ist, wird deutlich, wenn man die Tatsache betrachtet, dass in Sedimenten bis zu 0,25 % (Jones 1977) und in Böden bis 0,3 % (Torsvik et al. 1990) der Bakterien kultivierbar sind. Bisher wurden viele Spezies neu entdeckt und beschrieben, weshalb diese Werte kontinuierlich nach oben korrigiert werden müssen (Amann et al. 1995). Eine weitere Besonderheit bei der Kultivierung von Bodenmikroorganismen ist, dass vielen Spezies die Fähigkeit zur Koloniebildung durch geringe Teilungsraten bei hoher Zelldichte fehlt, was zur Folge hat, dass diese Arten Mikrokolonien < 250 µm aus losen Zellassoziationen ausbilden, welche mit bloßem Auge nicht sichtbar sind und demnach bei der Ermittlung der KbE nicht berücksichtigt werden (Winding et al. 1994; Ferrari 2005). Da die genutzte Methode nur eine quantitative Aussage über den Bestand an kultivierbaren Mikroorganismen zulässt, sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen, welche im weiteren Verlauf dieses Kapitels vorgestellt werden, von größerer Bedeutung.

#### 4.4.3.2 Biochemische Charakterisierung

Die AWCD-Werte (Biolog) der eingesetzten biochemischen Testsysteme konnten eine im Vergleich zu Beginn des Maukversuchs erhöhte Aktivität zwischen  $t_6$  und maximal  $t_{20}$  aufzeigen.



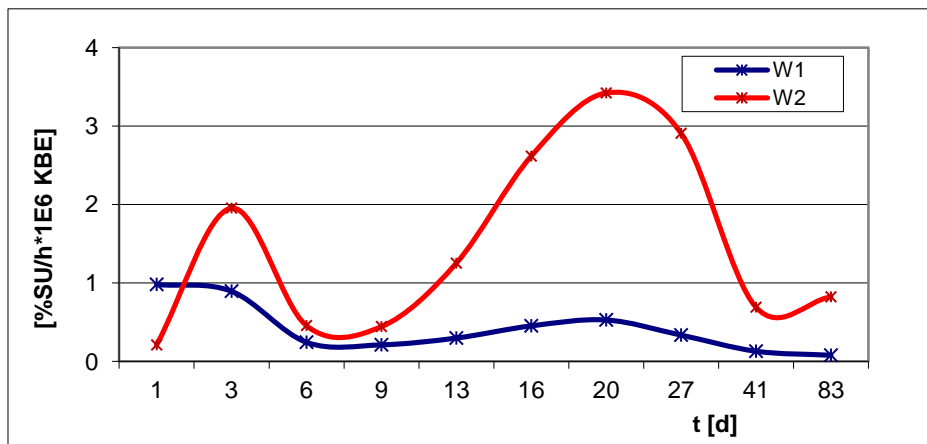
**Abbildung 41: AWCD ermittelt aus den ApiZym Einzelwerten im Verlauf des Maukversuchs**

Anhand der Abbildung 41 wird deutlich, dass W1 und W2 zeitlichen Verlauf des Maukversuchs Phasen ähnlicher Aktivitäten aufwiesen. Einem hohen Wert zu Beginn folgt ein starker Abfall bis  $t_6$ . Danach stellt sich eine Phase von etwa drei Wochen (ca.  $t_9$  bis  $t_{27}$ ) höherer AWCD-Werte ein, die für Stoffwechsel mit erhöhten Umsätzen steht. Die Funktion für W1 beschreibt einem alternierenden Trend. Ab  $t_{41}$  verhalten sich beide Funktionen nahezu spiegelbildlich im gegenläufigen Trend. Minimalwerte, wie bei der KbE von W2 zwischen  $t_{16}$  und  $t_{27}$  können auch am AWCD Diagramm nachvollzogen werden.

Der AWCD-Wert bezogen auf die KbE zeigt die enzymatische Aktivität der Population auf (Abbildung 41). Direkt nach Beginn des Versuchs ( $t_3$  –  $t_6$ ) reduziert sich die spezifische Aktivität, um ab  $t_9$  bis ca.  $t_{16}$  zu steigen. Danach verringern sich die Werte wieder. Dieser Verlauf ist für beide Referenztone wiederum sehr ähnlich. Der starke Abfall zu Beginn kann durch eine hohe aktive KbE, z.B. durch die Aufbereitung der Roherden oder das zugesetzte Prozesswasser bestimmt sein. Mit der Aufbereitung der Roherde in Backenbrechern und Siebgranulierern und der Zugabe von Wasser zur Erlangung eines gewünschten Feuchtegehaltes stellt für die autochthonen Organismen eine starke Veränderung des bisherigen Habitats dar. Aufbruch „alter“ Bodenstrukturen und die Einbringung von Sauerstoff und Wasser ermöglichen zunächst eine Phase hoher Aktivität angepasster Organismen. Der Wiederanstieg der spezifischen Aktivitäten ab  $t_9$  ist voraussichtlich auf die Einstellung einer spezifischen Population zu erklären, wobei aus den Daten der KbE und der AWCD-Werte ersichtlich wird, dass eine relativ geringe KbE für eine hohen enzymatische Aktivität verantwortlich ist. Deutlich werden diese Effekte bei W2 im Bereich von  $t_{16}$  bis  $t_{20}$ .

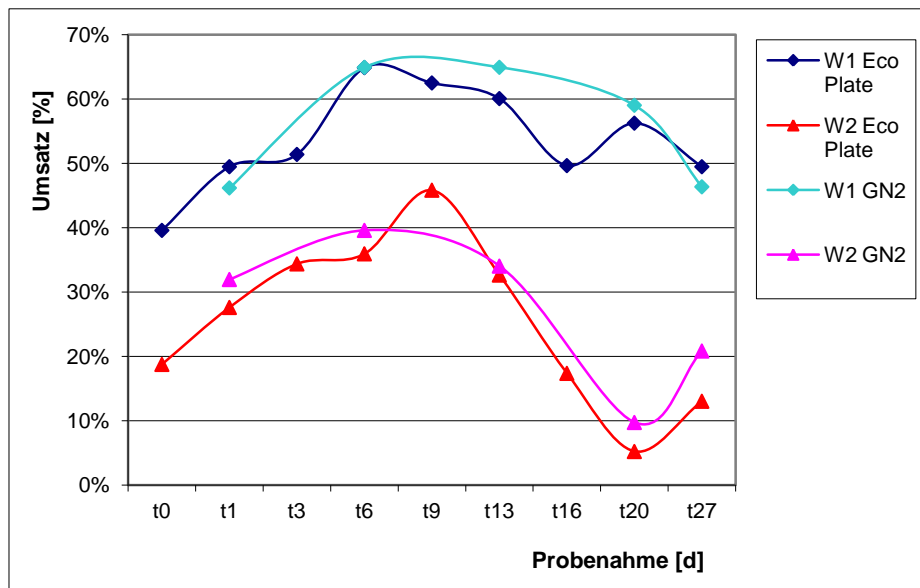
Somit kann die Phase der erhöhten biologischen Aktivität und der vermuteten Veränderung der plastischen Eigenschaften aufgrund biotischer Prozesse auf die zweite bis vierte Woche aufgezeigt werden.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei dem Versuch zur Untersuchung der spezifischen Enzymaktivität der Esterasen gefunden werden (Methoden und Ergebnisse in der Dissertation von Herrn Kaden). Esterasen sind Enzyme, die bevorzugt Esterbindungen organische Moleküle spalten können. Mischpopulationen bilden eine Vielzahl verschiedener Esterasen, so dass ihre Abbauaktivitäten das Substrat Fluoresceindiacetat in Fluorescein und Acetate abbauen können. Die Messung des fluorogenen Produktes erfolgte mittels Mikrotiterplattenfluorimeter. Auch im Verlauf des Maukversuchs schloss sich an einen anfänglichen Bereich hoher spezifischer Aktivität (t1-t3) eine Phase geringerer Aktivität an (Abbildung 42). Ab t9 stiegen die Werte bis t20 an um gegen Ende des Versuchs ähnliche Werte wie zu Beginn zu erreichen. Auch hier kann die Phase von der zweiten Woche an bis ca. zur fünften Woche als sehr aktive Zeit mikrobiologischer Biozönosen zu sein.



**Abbildung 42: Spezifischer Substratumsatz der Esterasen [%SU/h] von W1 und W2 während des Maukversuchs**

Der Einsatz der biochemischen Charakterisierung mittels Biolog EcoPlate bzw. GN2 zeigte gleichfalls eine erhöhte Nutzung verschiedener angebotener Substrate, wobei von Beginn des Versuchs an eine Steigerung bis ca. t9 zu beobachten ist, die jedoch bis gegen Ende t20 wieder abfällt. Somit ist auch mit dieser Methode eine biochemische Analyse der Tone möglich (Abbildung 43).



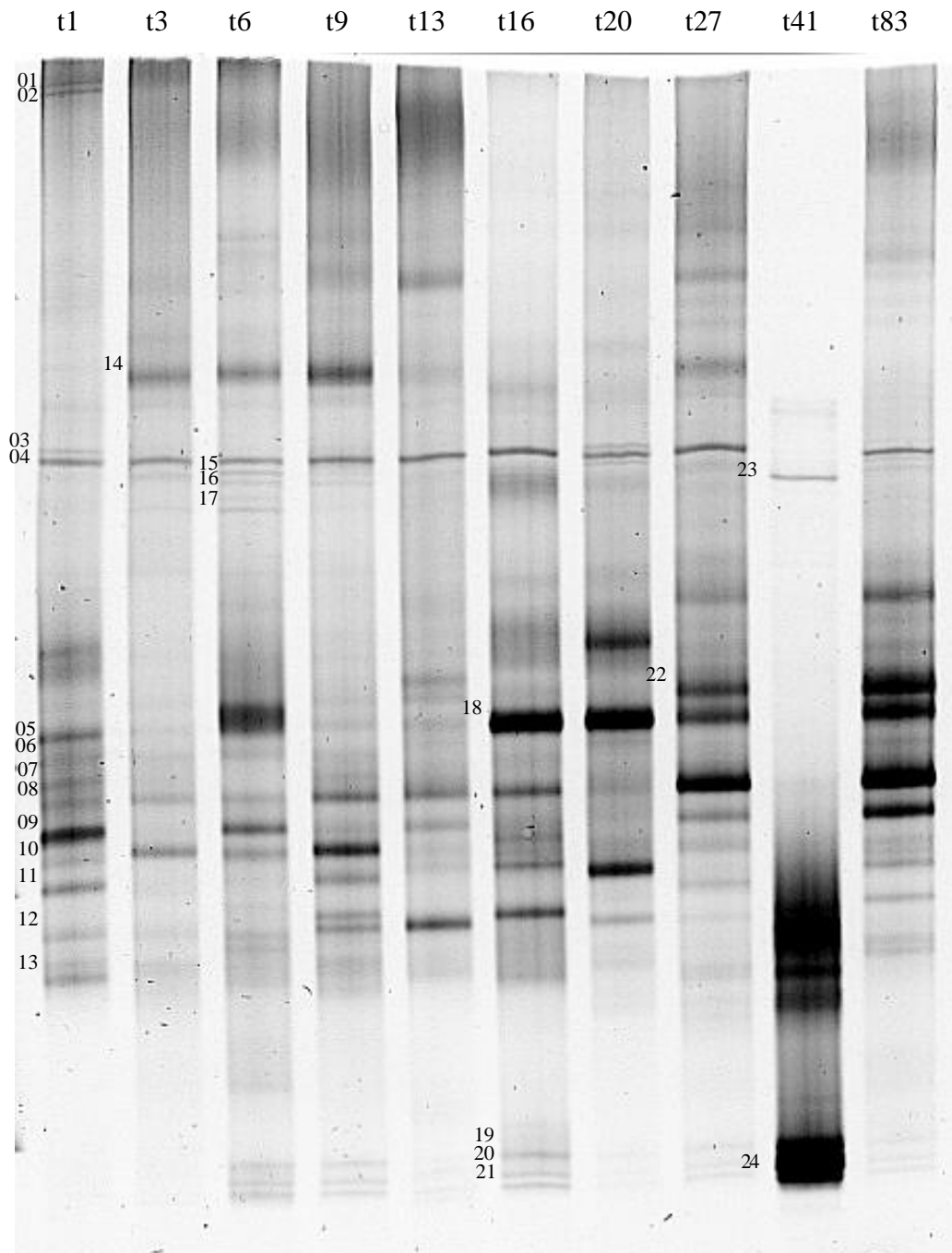
**Abbildung 43: AWCD Biolog GN2 und Eco Plates im Verlauf des Maukversuchs**

Aufgrund der Vielzahl der angebotenen Substrate in den Biolog Platten verschieben sich die Nutzung und der Umsatz bestimmter Substratklassen innerhalb der Versuchsreihe. Leicht abbaubare Substrate wie z.B. Kohlenhydrate und Aminosäuren werden über den gesamten Zeitraum sehr gut verwertet. Dagegen wurden viele Substrate nur schwach oder gar nicht verwertet, bzw. eine Farbreaktion und somit eine Auswertung konnte nicht stattfinden.

Eine Auswahl spezifischer Substratumsätze und damit die Möglichkeit, spezifische Stoffwechselprozesse innerhalb der komplexen Tonalterung identifizieren zu können, ist jedoch mit diesem Ansatz nur bedingt möglich, kann aber durch vergleichende Betrachtungen Hinweise zur Gesamtaktivität verschiedener Rohstoffe geben.

#### 4.4.3.3 Molekularbiologische Charakterisierung

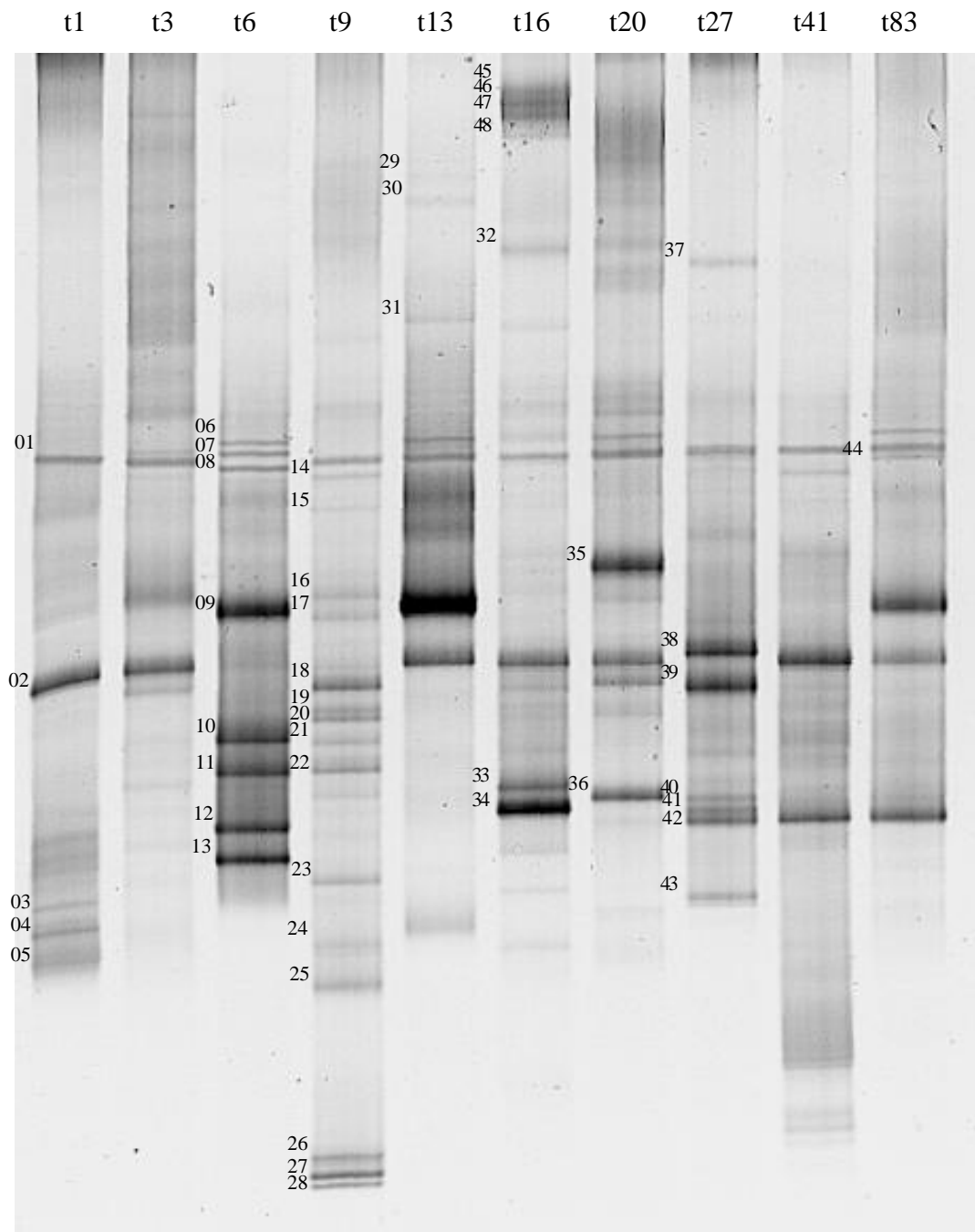
Um die Entwicklung eubakterieller Populationen während des Maukprozesses zu untersuchen, wurde nach der direkten Extraktion der Gesamt-DNA aus den tonhaltigen Proben und der anschließenden Amplifikation ein ca. 500 bp langes Fragment der 16S rDNA das Fragmentgemisch aus allen mit der Primerkombination 27f/517R amplifizierbaren Sequenzen mittels DGGE aufgetrennt. In dem DGGE-Gel mit der DNA der Proben von W1 wurden 24 (Abbildung 44) und in dem von W2 48 (Abbildung 45) verschiedene Banden detektiert und zur weiteren Charakterisierung ausgeschnitten. Bei den Proben von W1 wurden zu t1 einige Banden abgebildet, welche bereits zu t3 nicht mehr vorhanden waren und vermutlich durch Mikroorganismen aus dem Prozesswasser bedingt wurden, welche im Ton nicht weiter überleben konnten. Zum Zeitpunkt t3 wurden zunächst weniger Banden abgebildet. Analog der Kernaussage der „Intermediate Disturbance Hypothesis“ (Connell 1978) wurde jedoch bereits nach 6 Tagen wieder eine hohe Bandenanzahl mit ca. 20 Banden, welche im Idealfall je eine Spezies repräsentieren, beobachtet.



**Abbildung 44: W1 DGGE der Gesamt-DNA im Verlauf des Maukversuchs; Gradient 70 % - 40 %; 27f/517R**

Dass das System lange Zeit benötigt, um in Hinblick auf den Bestand bakterieller Populationen einen stabilen Zustand zu erreichen, wird an W2 deutlich, dass zwischen t41 mit einer geringen Bandenzahl, was ein stabiles System aus Spezialisten impliziert, und t83 enorme Veränderungen im DGGE-Muster vorhanden waren. Das Bandenmuster der W1-Proben bei t41 beruht wahrscheinlich auf einem methodischen Fehler, da sowohl t27 und t83 sehr ähnliche Muster aufzeigen. Damit kann in dieser Phase die Population in ihrer Zusammensetzung als stabil gewertet werden.

Ähnliche Schwankungen in der Bandenzahl wie bei den Proben von W1 waren auch bei denen von W2 zu beobachten. Die höchste Bandenzahl in W2 wurde allerdings abweichend von W1 bei t9 beobachtet.



**Abbildung 45: W2 DGGE der Gesamt-DNA im Verlauf des Maukversuchs; Gradient 70 % - 40 %; 27f/517R**

Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die höchste Anzahl KbE in W2 nachgewiesen. Dieses Maximum wurde demnach nicht durch eine Spezies verursacht, welche sich durch besondere Umgebungsparameter gut vermehren konnte, sondern durch ca. 20 verschiedene Arten.

Banden mit unterschiedlicher Laufweite, welche potentiell durch verschiedene Spezies bedingt wurden, wurden ausgeschnitten, die DNA daraus reamplifiziert

aufgereinigt und sequenziert. Eine Zusammenfassung aller, zu den nummerierten Banden aus Abbildung 44 und Abbildung 45 zugeordneten Spezies mit Angabe der Bestimmungswahrscheinlichkeit sind in der Dissertation von Herrn Kaden hinterlegt. Alle Spezies, welche mit einer Übereinstimmung von >97% zum entsprechenden Datenbankeintrag von NCBI ermittelt wurden, sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

**Tabelle 17: Gesamt- DNA Analyse mittels DGGE Separation und Sequenzierung; Zuordnung der ermittelten Spezies zu den Banden der DGGE und den Probenahmezeitpunkten**

Bestimmte Spezies	Alternativ ermittelte Spezies	Homologie	Banden-nummer	Proben
	<i>Bacillus cereus</i>	99%	6,7,8,9,19	alle
<b>W1</b>	<i>Pseudomonas mandelii</i>	99%	5,18	t1, t16, t20, t27
	<i>Streptom. turgidiscabies</i>	98%	23,24	t41, t83
	<i>P. mandelii</i>			
	<i>Pseudomonas cannabina</i> <i>P. fluorescens</i>	100%	2	alle außer t9, t27
	<i>P. syringiae</i>			
	<i>Aeromonas jandaei</i>	99%	3,4	t1, t13
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100%	16,18	t9 bis t20
<b>W2</b>	<i>Zoogloea ramigera</i>	98%	19,20	t9
	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	98%	22	t9
	<i>Pelomonas aquatica</i> <i>P. saccharophila</i>	100%	33,45,46	t16
	<i>Enterococcus faecium</i>	98%	6,7,9,31,35,44	alle
	<i>Tolumonas auensis</i>	99%	36	t20, t27
	<i>Rhizobacter fulvus</i>	99%	37,38	t27

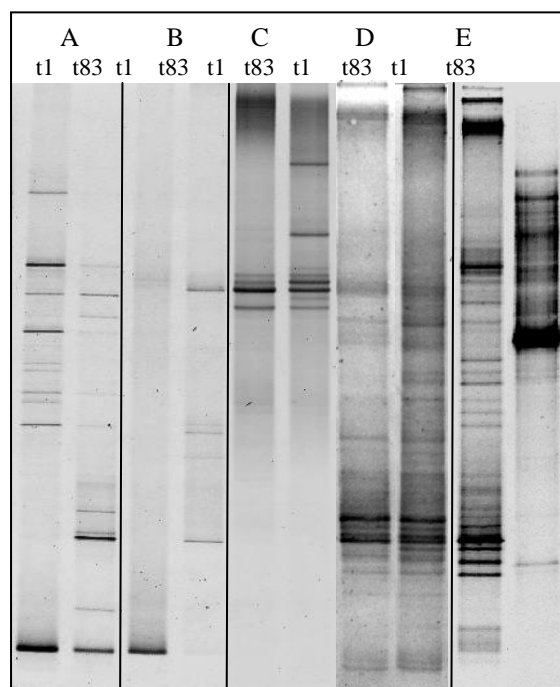
Mit der molekularbiologischen Analyse der Maukversuche in Verbindung mit einer ergänzenden Aufnahme von mikrobiologischen und biochemischen Parametern ließ sich der Prozess der Tonalterung über einen langen Zeitraum von 83 Tagen beobachten. Es konnten anfängliche Phasen kurzzeitiger starker Veränderungen bei der KbE und den biochemischen Aktivitäten gezeigt werden, die sich auch in einer Veränderung des Bandenmusters der DGGE-Gele zeigte. Im weiteren Verlauf konnten die Phasen der nachhaltigen Veränderungen während des Prozesses ab der zweiten Woche bis zum Ende detektiert werden. Beide Tone zeigen jeweils starke Veränderungen in mit der Zeit auf, wobei die drei Phasen (Start-, Mittel- und Endphase) bei beiden Tönen nahezu gleichzeitig stattfanden. In der Phase der vermuteten Tonalterung (t9 – t27) konnte bei W2 eine höhere Speziesvielfalt als bei W1 gemessen werden. Jedoch wies in diesem Zeitraum W2 eine geringere KbE auf als bei W1, die spezifische Aktivität war bei W2 stärker ausgeprägt. Somit war vermutlich eine kleinere Population mit einer hohen Speziesvielfalt für eine hohe enzymatische Aktivität in dem Ton verantwortlich.



Gegen Ende des Versuchs hatten beide Tone eine relativ stabile Biozönose ausgebildet, die sich in ihrer Zusammensetzung jedoch unterschieden. Bei allen aufgelisteten Organismen handelte es sich um typische Vertreter des Bodens. Eine Identifizierung von Organismen, die sich im Verlauf des Maukversuches in beiden Referenzansätzen etabliert haben, war nicht möglich. Beide Tone haben ihre eigene, spezifische Population an eubakteriellen Organismen ausgebildet.

Analysen der Basisforschung haben zeigen können, dass die detektierte Speziesvielfalt nach DNA-Extraktion direkt aus dem Ton geringer ist als nach einer Kultivierung. Daher wurden am Beispiel von W1 t1 und t83 die Bandenmuster von zwei kultivierungsunabhängigen Extraktionsmethoden (Soil Microbe DNA Kit (ZymoResearch); Phenol-Chloroform) neben DNA-Extrakten R2A, Tonagar und DCS kultivierter Populationen vergleichend untersucht.

In Abbildung 46 wird deutlich, dass von den beiden direkten Extraktionsmethoden der Soil Microbe DNA-Kit eine höhere Bandenzahl und damit Speziesvielfalt detektieren konnte. Auch wurden die Unterschiede zwischen den beiden Proben dargestellt.



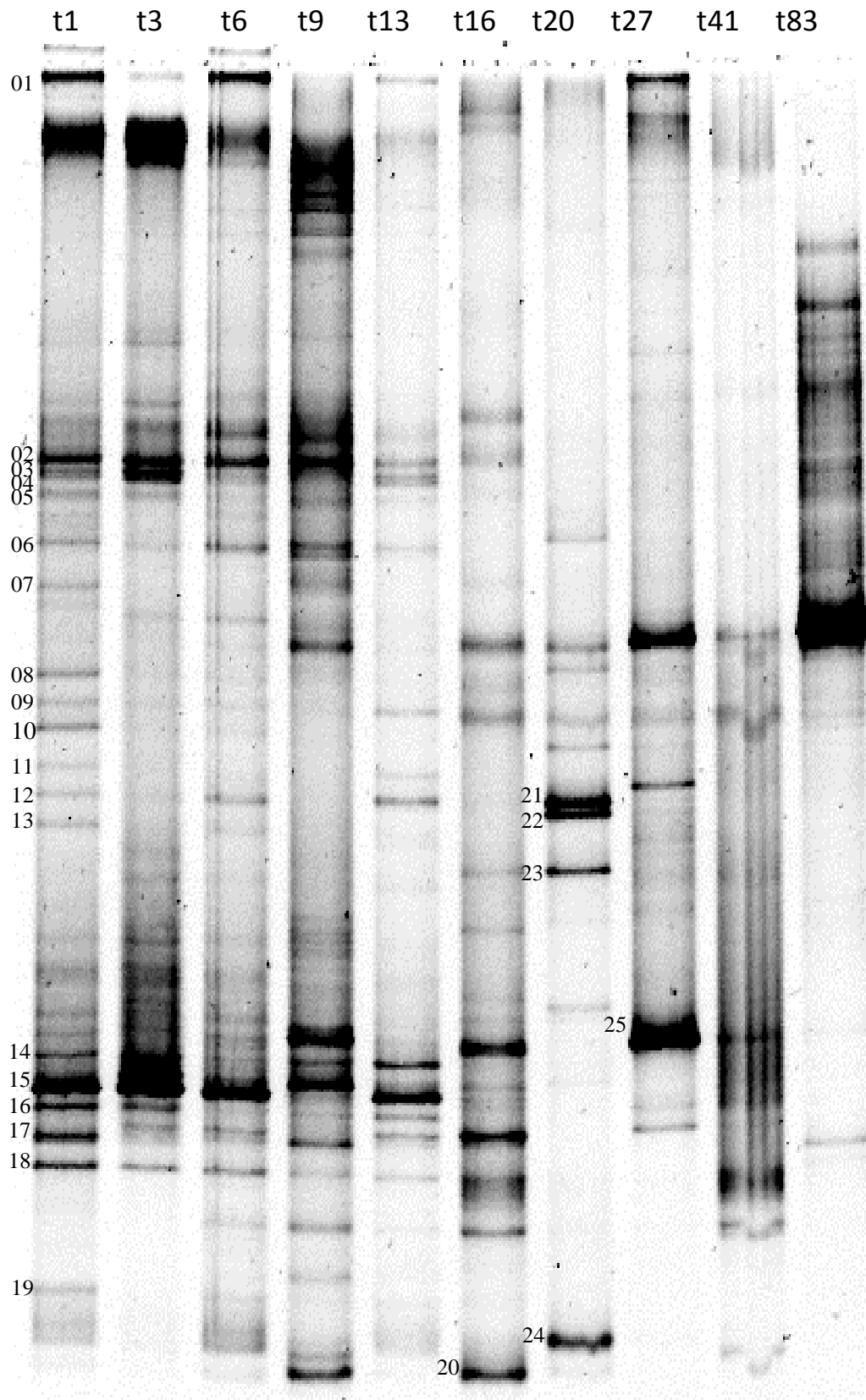
**Abbildung 46: DGGE W1 jeweils t1 und t83**  
**A) Soil Microbe DNA Kit (ZymoResearch)**  
**B) Phenol Chloroform Extraktion**  
**C) DNA Extraktion nach Inkubation auf R2A**  
**D) DNA Extraktion nach Inkubation auf Tonagar**  
**E) DNA Extraktion nach Inkubation auf DCS**

Die beiden Kultivierungsmethoden auf R2A und Tonagar zeigen eine viel höhere Bandenzahl bei dem eingesetzten Tonagar. Dies kann durch bessere Verfügbarkeit der nötigen Nährstoffe bedingt sein, die die Organismen im R2A-Agar nicht vorfinden. Hier jedoch unterscheiden sich bei beiden Methoden die Bandenmuster

zwischen t1 und t83 kaum. Die Populationen bilden sich zu beiden Probenahmezeitpunkten nahezu gleich aus.

Die Methode DCS dagegen konnte hingegen eine sehr hohe Ausbeute an DGGE-Banden generieren, die sich auch in einer sich unterschiedlich ausgebildeten Population t1 zu t83 widerspiegelt. Somit konnte anhand nativer Tonproben die gezeigt werden, dass der parallele Einsatz von direkter DNA-Extraktion (Soil Microbe DNA-Kit) und einer spezifischen Kultivierung mittels DCS für die molekularbiologische Analyse in der Lage ist, die Speziesvielfalt und damit die Detektion und Identifizierung von bakteriellen Vertretern sich verändernder Habitate am besten darzustellen.

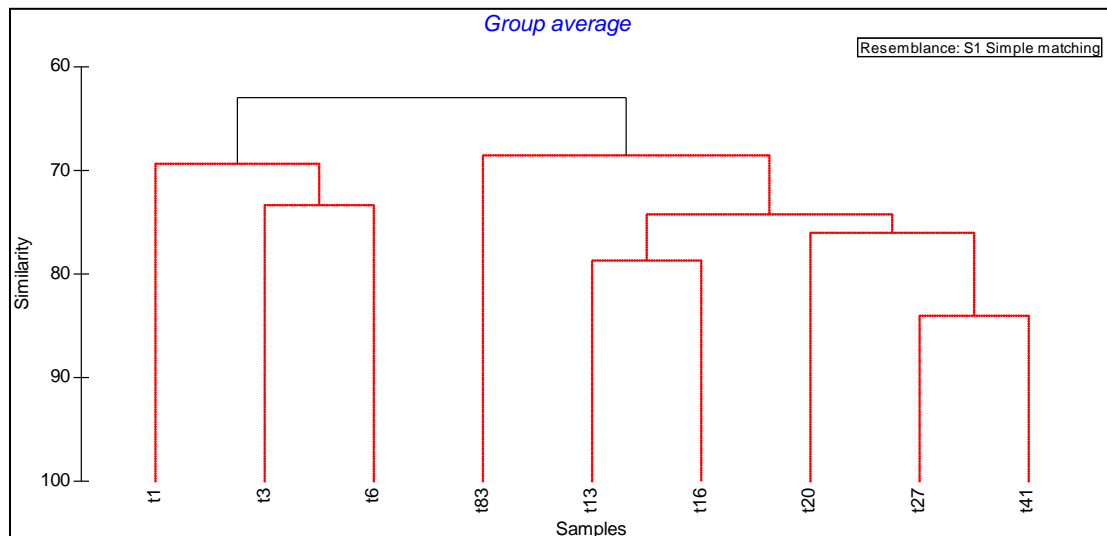
Am Beispiel der DGGE aus den PCR-Produkten der Gesamt-DNA-Extrakte von W1 wurde bei den Analysen der DNA der im DCS kultivierten Bakterien ein Rückgang der Bandenzahl im Verlauf des Maukversuchs beobachtet (Abbildung 47). Der Sauerstoffeintrag zu Beginn des Maukprozesses scheint dabei einen enormen Einfluss auf das Artenspektrum zu haben. Dass die DGGE-Muster zu den ersten drei Probenahmen sehr ähnlich waren und ab t13 größere Veränderungen hinsichtlich der Artenvielfalt und -zusammensetzung stattfanden, ist aus Abbildung 48 ersichtlich.



**Abbildung 47: DGGE der auf DCS angezüchteten Kulturen von W1 im Verlauf des Maukversuchs**

Diese Entwicklung könnte von dem zu dieser Zeit steigenden pH-Wert abhängig sein. Größere Veränderungen der DGGE-Muster waren auch gegen Versuchsende bei t41 und t83 zu beobachten. Zu diesen Probenahmen waren die wenigsten Banden

detektierbar, was ein Hinweis darauf ist, dass sich das System stabilisierte und nur die Mikroorganismen überleben konnten, die langfristig Stoffwechsel ohne externe Zufuhr von Nährstoffen betreiben können.



**Abbildung 48: Ähnlichkeitsprofil als Dendrogramm aus den DGGE Spuren (Abbildung 47) basierend auf 74 Banden der 16S rDNA aus den Kulturen des DCS im Verlauf des Maukversuchs (t1-t81)**

Distinkte Banden aus der DGGE der PCR-Produkte der DCS-Kulturen von W1 (Abbildung 47) wurden ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert. Spezies, welche mit einer sehr guten Sequenz und einem e-value von 0,0 ermittelt werden konnten sind in Tabelle 18 dargestellt.

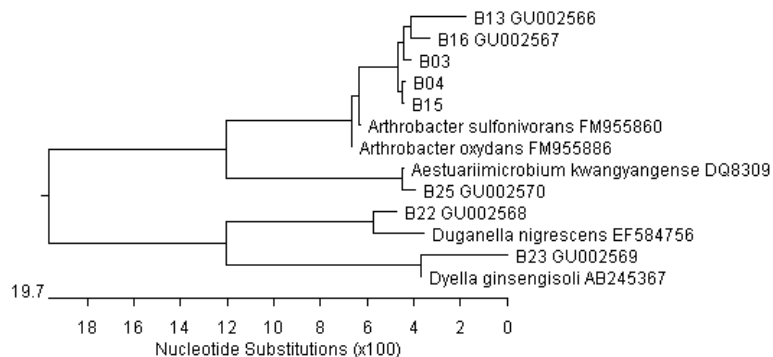
Auffällig an den Ergebnissen der Datenbankrecherchen war, dass von den 25 Banden 17 der Gattung *Arthrobacter* zugeordnet wurden. Die Sequenz von Bande B13 wich mit 4% so weit von der nächsten beschriebenen Spezies ab, dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich dabei um eine bisher unkultivierte Art der Gattung *Arthrobacter* handelte. Die Sequenzen der Banden B3, B4 und B15 waren sich so ähnlich, dass diese mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit die gleiche Spezies repräsentieren. Dieser Zusammenhang wird besonders anhand von Abbildung 49 deutlich.

Die Zuordnung der Sequenzen der Banden B22 und B23 kann auch nur die Zugehörigkeit zu der entsprechenden Gattung darstellen. Entsprechend dieser Ergebnisse kann bereits vermutet werden, dass aufgrund der vielen unbeschriebenen Bakterienspezies solch komplexe Prozesse, wie das Mauken nicht detailliert aufgeklärt werden können.

**Tabelle 18: Zuordnung der DGGE- Banden aus PCR- Produkten von DCS- kultivierten Bakterien aus W1 zu Spezies; Grau: Abweichung >3%**

Bande	Probenahme	Erste bestimmte Spezies	Ident
B03	t1 bis t13	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	98%
B04	t1 bis t13	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	98%
B13	t1	<i>Arthrobacter oxydans</i>	96%
B15	t1 bis t16	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	98%
B16	t1,t3,t27,t41	<i>Arthrobacter oxydans</i>	98%
B22	t20,(t27)	<i>Duganella nigrescens</i>	96%
B23	t20	<i>Dyella ginsengisoli</i>	96%
B24	t20	<i>Arthrobacter humicola</i>	99%
B25	t27,t41	<i>Aestuariimicrobium kwangyangense</i>	98%

Da prozentuale Abweichungen mehrerer Sequenzen durch diverse Unterschiede im Genom bedingt sein können, wurden alle in Tabelle 18 aufgeführten Spezies sowie die Typstämme der Spezies mit der höchsten Zuordnungswahrscheinlichkeit in einem Dendrogramm (Abbildung 49) dargestellt. Die Verwendung der Sequenz der Typstämme wurde gewählt, da diese Sequenz die ursprünglich publizierte und tatsächlich zur Spezies zugehörige Sequenz ist.



**Abbildung 49: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse der auf DCS kultivierten Spezies auf Basis der mittels DGGE separierten 16S rDNA unter Berücksichtigung nah verwandter Typstämme**

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das DCS nicht nur eine gute Populationsanalytik mit der Möglichkeit einer zeitlich differenzierten Betrachtung der Zusammensetzung der Population realisiert, sondern aufgrund der speziellen Nährstoffverfügbarkeit sowie der bereits beschriebenen möglichen Interaktionen zwischen den Organismen im bedeckenden Tonschlicker und dem Inokulum auch dazu geeignet ist, Bakterien anzuzüchten, welche bisher noch nicht kultiviert wurden.

Um jedoch den Prozess den Tonalterns und damit auch den Prozess der Verbesserung der Verarbeitbarkeit anhand mikrobieller Prozesse beweisen zu können, wären weiterführende Arbeiten nötig. Der Nachweis der Ausbildung einer spezifischen Biozönose innerhalb des Prozesses ist detektierbar und mit dem hier

angewendeten Methodenspektrum auch ausreichend. Dennoch kann Bildung der Biozönose eine Antwort auf sich verändernde Umweltbedingungen in den Tonen darstellen. Die Bedeutung der Mikroorganismen für einen Beitrag zu einer veränderten Verarbeitbarkeit kann mit diesen Methoden nicht gegeben werden. Dies ist nur im direkten Zusammenhang mit allen anderen mineralogischen, physikalischen und chemischen Parametern möglich, die ein komplexes System wie die Tonalterung mit beschreiben.

## 4.5 Anwendungstechnische Untersuchungen

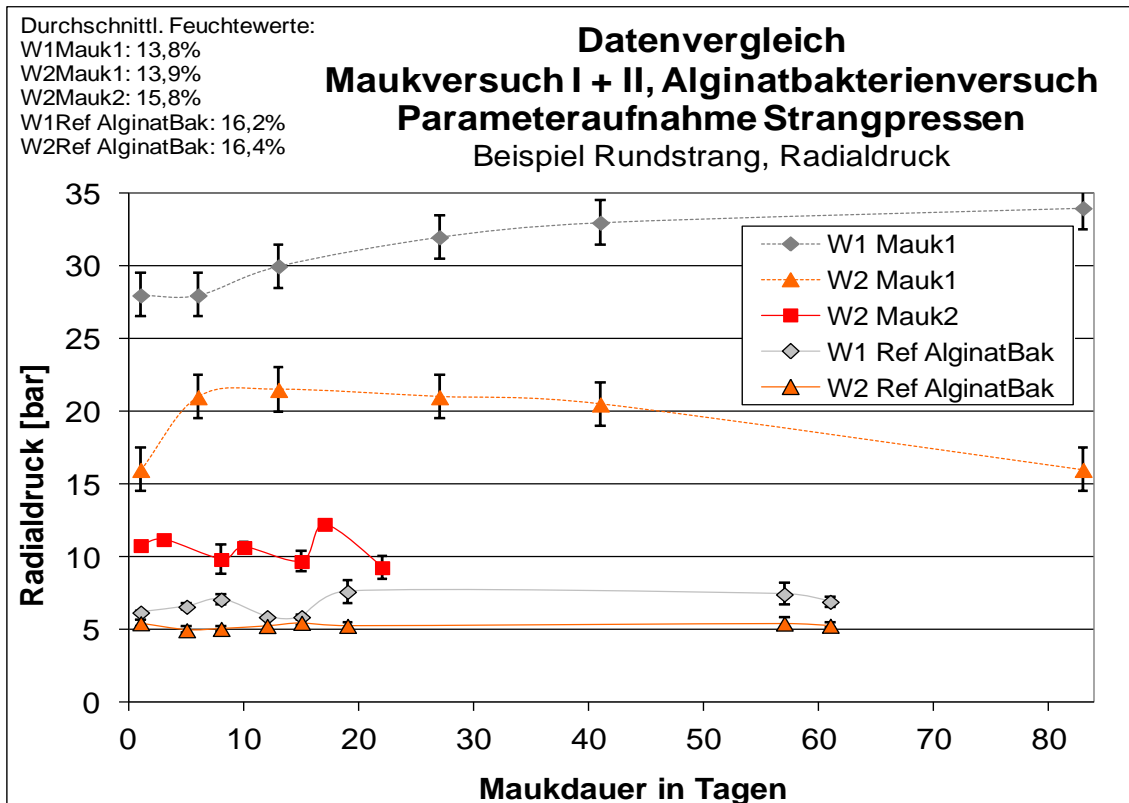
Das anwendungstechnische Untersuchungsprogramm zum Detektieren potentieller Veränderungen über den Maukzeitraum umfasste folgende Untersuchungen:

- Feuchtebestimmung der Massen
- Strangpressen von Rundstrang-, Flachstrang- und Trapezstrangproben mit gleichzeitiger Aufzeichnung von Radialdruck im Presskopf, Temperatur und Stromaufnahme
- Bestimmung der Pfefferkorn-Plastizität am Rundstrang
- Rheologiemessungen an Rundstrang und Flachstrang
- Qualitative Beurteilung der Textur durch das Strangpressen von Flach- und Rundstrang im Frosttest
- Trockenbiegefestigkeit an Trapezsträngen
- Analyse von Gesamtschwefel und –stickstoffgehalt sowie TC (Gesamt-Kohlenstoff), TOC (Gesamter organischer Kohlenstoff) und TIC (Carbonatisch gebundener Kohlenstoff) aus CNS-Analyse
- Bestimmung der löslichen Salze

Die Feuchte der Proben während des ersten Maukversuchs betrug über den Beprobungszeitraum konstant ca. 13,9 %. Während der Untersuchungen des ersten Maukversuchs stellte sich heraus, dass die Massenfeuchte für die Charakterisierung der Anwendungseigenschaften relativ niedrig war. Zum Verpressen der Massen war bei beiden Tonsorten ein verhältnismäßig hoher Aufwand erforderlich (Radialdruck >> 10 bar). Die Proben verursachten in den folgenden rheologischen Charakterisierungen eine große Anzahl an Fehlmessungen. Die Feuchte wurde daher für den zweiten Maukversuch auf ca. 16 % eingestellt und die rheologischen Messmethoden optimiert.

Im Folgenden sollen nun die wichtigsten Ergebnisse der beiden Maukversuche zusammengefasst dargestellt werden. Da auch im Rahmen des Laborversuchs zur mikrobiellen Aufbereitung von Tonen (Alginatebakterienversuch, siehe auch Kapitel 5) zeitabhängige Untersuchungen durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse der Referenzmassen hier zum Teil mit einbezogen.

Vergleicht man zunächst generell den Verarbeitungsaufwand (Radialdruck) der beiden Tone z.B. an t1 (siehe Abbildung 50), wird deutlich, dass die Proben signifikant unterschiedliche Verarbeitungseigenschaften zeigen. Bei gleicher Massenfeuchte wird bei W1 jeweils mehr Pressdruck (bis zu doppelt so viel) aufgebaut, als bei W2. Zudem reagiert W1 empfindlicher auf Feuchteveränderungen als W2.



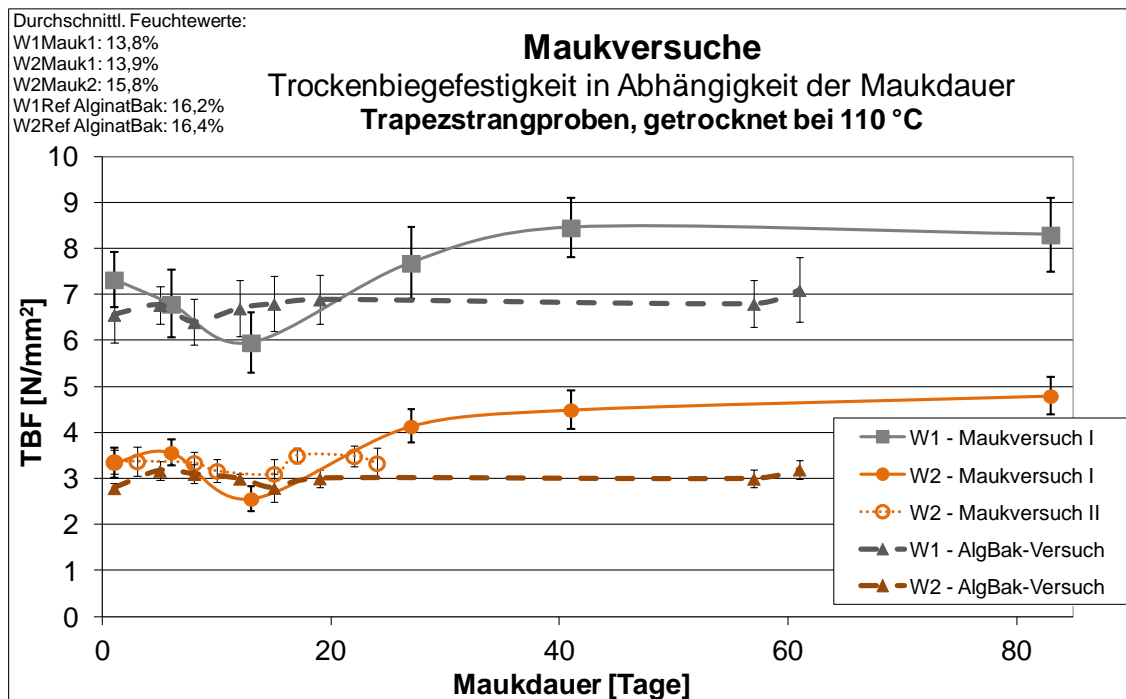
**Abbildung 50: Verarbeitungsaufwand in Abhängigkeit der Maukdauer**

W1 zeigt in den zeitabhängigen Versuchen tendenziell einen ansteigenden Verarbeitungsaufwand. Bei W2 ist über alle drei Versuche ausgewertet keine deutliche Tendenz zu erkennen. Beim Verpressen der Massen waren generell keine deutlichen Unterschiede oder Auffälligkeiten in Bezug auf Verarbeitungseigenschaften, Texturen oder anderer Strangpressfehler zu quantifizieren. Ausschließlich rein subjektiv konnte eine bestenfalls leichte Verbesserung der Plastizität beider Tonsorten beschrieben werden. Anhand der Messwerte kann diese Beobachtung allerdings nicht belegt werden.

Bei der Betrachtung der rheologischen Charakterisierung (ohne Abbildung) sind keine Schlussfolgerungen zu einer Lagerzeit-Abhängigkeit ableitbar. W1 zeigt im Vergleich zu W2 jeweils eine höhere Strukturstärke bzw. geringere Deformierbarkeit bei vergleichbarer Massenfeuchte. Auch traten wie eingangs erwähnt eine hohe Anzahl Fehlmessungen auf, die einen verlässlichen Vergleich der Proben erschwert. Ein leichter Zusammenhang der Parameter „Radialdruck beim Verpressen“ und „Deformierbarkeit der Proben“ ist in den rheologischen Messungen erkennbar. Bei stärkerer Verdichtung (höherem Radialdruck) erschien in den Messdaten die Verformbarkeit der Proben ebenfalls tendenziell geringer.



Aus Abbildung 51 ist ersichtlich, dass der Ton W1 eine deutlich höhere Trockenbiegefestigkeit als W2 aufweist. Hiermit sind die Ergebnisse der aus Tonmehl angesetzten Massen nochmals bestätigt (siehe auch Abbildung 34). In den zeitabhängigen Versuchen kann nur bei Maukversuch 1 jeweils eine tendenziell steigende TBF über die Zeit beobachtet werden. Bei den nachfolgenden Tests liegen die Veränderungen im Rahmen der Messunsicherheit. Die jeweils etwas höheren Werte von Maukversuch I zu den beiden anderen Versuchsreihen sind durch die niedrigere Massenfeuchte und damit höhere Verdichtung beim Verpressen erklärbar. Allerdings liegt insbesondere bei W1 die TBF-Verbesserung nahe der Messungenauigkeit.



**Abbildung 51: Trockenbiegefestigkeit der Projekttonne in Abhängigkeit der Maukdauer**

Der Gehalt an löslichen Salzen beider Proben ist laut Rohstoffhersteller WBB für Tonmassen vergleichsweise gering. W1 zeigt dabei einen höheren Anteil löslicher Salze als W2. Bei W1 ist im ersten Maukversuch eine deutliche Veränderung im löslichen Sulfatgehalt in Abhängigkeit der Maukdauer erkennbar. Diese Beobachtung konnte im Alginatbakterienversuch bestätigt werden (siehe Abbildung 52).

Die vergleichsweise hohe Herauslösung von Sulfat bei W1 kann mit der Zersetzung von Markasit erklärt werden. Bei Betrachtung der Verarbeitungseigenschaften und der Ergebnisse der rheologischen Messungen können hierzu allerdings noch keine eindeutigen Korrelationen gezogen werden.

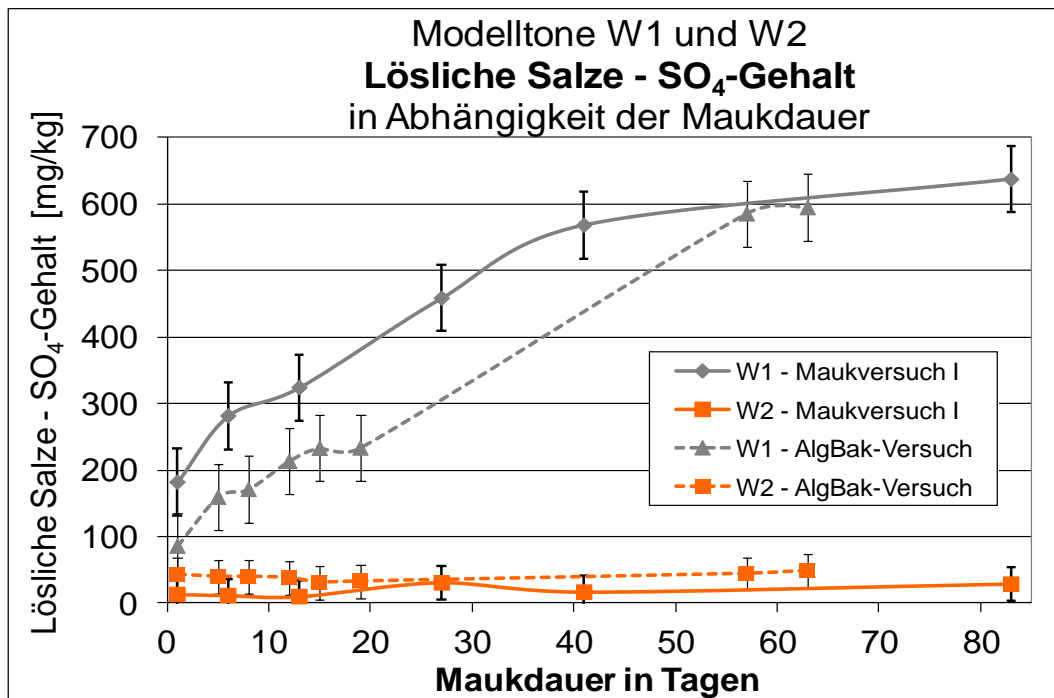


Abbildung 52: Sulfat-Löslichkeit über die Maukdauer bei W1 und W2

## 4.6 Diskussion

Sowohl bei den mikrobiologischen als auch bei den keramtechnischen Untersuchungen waren im Rahmen der Maukversuche gewisse Veränderungen detektierbar. Allerdings konnten die Ergebnisse nicht zu einer zweifelsfreien Interpretation der Vorgänge bei der Tonalterung herangezogen werden, da sie zum Teil nicht signifikant und/oder nicht reproduzierbar waren.

Im Bezug auf die Mineralphasen und Korngrößenverteilung der beiden untersuchten Tone konnten keine deutlichen und messbaren Veränderungen festgestellt werden. Die zeitliche Konstanz der mineralogischen Analyseergebnisse bedeutet, dass entweder

- (a) ein Maukprozess nicht stattfindet
- (b) der Maukprozess keinen Einfluss auf die mineralogischen Eigenschaften hatte
- oder
- (c) der Maukprozess mit den gewählten Methoden nachweistechisch nicht auflösbar ist.

Hinsichtlich der molekularbiologischen Analysen muss weiterhin angemerkt werden, dass die eingesetzten Methoden zwar ein interessantes Forschungsinstrument, jedoch sowohl extrem kosten- als auch äußerst zeitintensiv sind. Somit musste eine willkürliche Vorauswahl der Proben getroffen werden, ideale Zeitpunkte zur Probenahme waren unbekannt. Als weitere Schwierigkeit kommt hinzu, dass die Populationen nie mit 100 %-iger Genauigkeit bestimmt werden können, da die meisten Spezies noch unerforscht sind. Ausschließlich anzüchtbare

Mikroorganismen wurden bislang in der Literatur und in Datenbanken beschrieben. Schätzungsweise sind allerdings nur 0,3 % aller in tonigen Böden vorkommenden Spezies anzüchtbar. Durch den Einsatz von DCS kann diese Quote zwar gesteigert werden, spiegelt aber immer noch nicht die vollständige, tatsächliche Biozönose der Proben wider. Es ist somit durchaus möglich, dass gerade die „interessanten“, für ein Mauken verantwortlichen Mikroorganismen nicht kultivierbar und/oder unbekannt sind.

Für den zweiten Maukversuch wurden die molekularbiologischen Analysemethoden bestmöglich angepasst. Jedoch waren sowohl die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen als auch die keramtechnischen Ergebnisse aus dem ersten Maukversuch nicht reproduzierbar. Einzig die Tendenz des Tons W1, in Abhängigkeit der Lagerdauer verstärkt lösliche Salze freizusetzen, konnte in allen Versuchsreihen bestätigt werden. Es wird vermutet, dass bei einer Veränderung der plastischen Eigenschaften bzw. der Viskosität und Dispergierbarkeit die steigende Konzentration löslicher Salze eine Rolle spielt. Bei W1 konnte insbesondere eine steigende Sulfatkonzentration, die vermutlich aus organischen Bestandteilen und aus dem Zersetzen von Markasit resultiert, beobachtet werden.

Die anwendungstechnische Charakterisierung zu Verarbeitungseigenschaften konnte keine eindeutige, reproduzierbar belegte Verbesserung von Plastizität bzw. Prozessfähigkeit der Tone belegen. Auch gelang es im Projektrahmen nicht, eine sterile Referenzprobe herzustellen, um die beiden Aspekte „Wasserhomogenisierung“ und „mikrobielle Einflüsse“ des Maukens klar voneinander getrennt untersuchen zu können. Die Frage nach den genauen Mechanismen bei der Tonreifung bleibt somit weiter unklar und kann im Rahmen der zeitlich begrenzten Forschungsarbeit nicht abschließend beantwortet werden. Basierend auf den Ergebnissen der Maukversuche sowie den Erfahrungen des Projektpartners WBB wird vermutet, dass der Prozess des Maukens nicht maßgeblich durch mikrobielle Reaktionen beeinflusst wird. Es erscheint wahrscheinlicher, dass sich die Plastizität durch eine Homogenisierung der Feuchteverteilung und den besseren Aufschluss der Tonminerale in Abhängigkeit der Zeit verändert, auch wenn das durch die Messungen nicht klar belegt werden kann.

Auf Grundlage der durchgeführten intensiv-mineralogischen Untersuchungen wird angenommen, dass insbesondere quellfähige Wechsellagerungsminerale eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die generellen Plastizitätsmechanismen spielen. Dadurch erlangt die Mineralogie der Feinstfraktion verschiedener Tonrohstoffe eine besondere Bedeutung. Für eine aussagekräftige Qualitätskontrolle und zur anwendungstechnischen Bewertung von tonmineralischen Rohstoffen im Hinblick auf Plastizität ist demnach die Einführung einer Mineralphasenanalyse definierter Korngrößenklassen sinnvoll.

## **5 Laborversuch zur mikrobiellen Aufbereitung von Tonen: „Alginatbakterienversuch“**

### **5.1 Zielsetzung**

Im Laborversuch zur mikrobiellen Aufbereitung von Tonen sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob und wie Tonmassen effektiv und gezielt mit geeigneten Mikroorganismen aufbereitet werden können.

- Kann mit geeigneten Mikroorganismen die Plastizität von Tonrohstoffen gezielt verbessert werden?
- Können durch eine gezielte Behandlung von Tonmassen mit Mikroorganismen weitere Erkenntnisse zum Mauken gewonnen werden?
- Kann eine ggf. erforderliche Maukzeit durch Beimpfen der Tonmassen mit geeigneten Mikroorganismen bei messbarer Verbesserung der Masseigenschaften verkürzt werden?

Diesen Fragestellungen wurde im Rahmen des Versuchs zur gezielten Tonvorbehandlung nachgegangen. Der Versuch wurde wie bereits die Maukversuche über einen definierten Versuchszeitraum von mehreren Wochen durchgeführt, um zeitliche Effekte zu beobachten.

Da Alginat in den ersten Versuchen der Laborphase Basisforschung positive Wirkung auf die Verarbeitungseigenschaften von dem Modellton W2 gezeigt hatten, wurde für die Beimpfungsversuche eine alginatbildende Bakterienspezies ausgewählt.

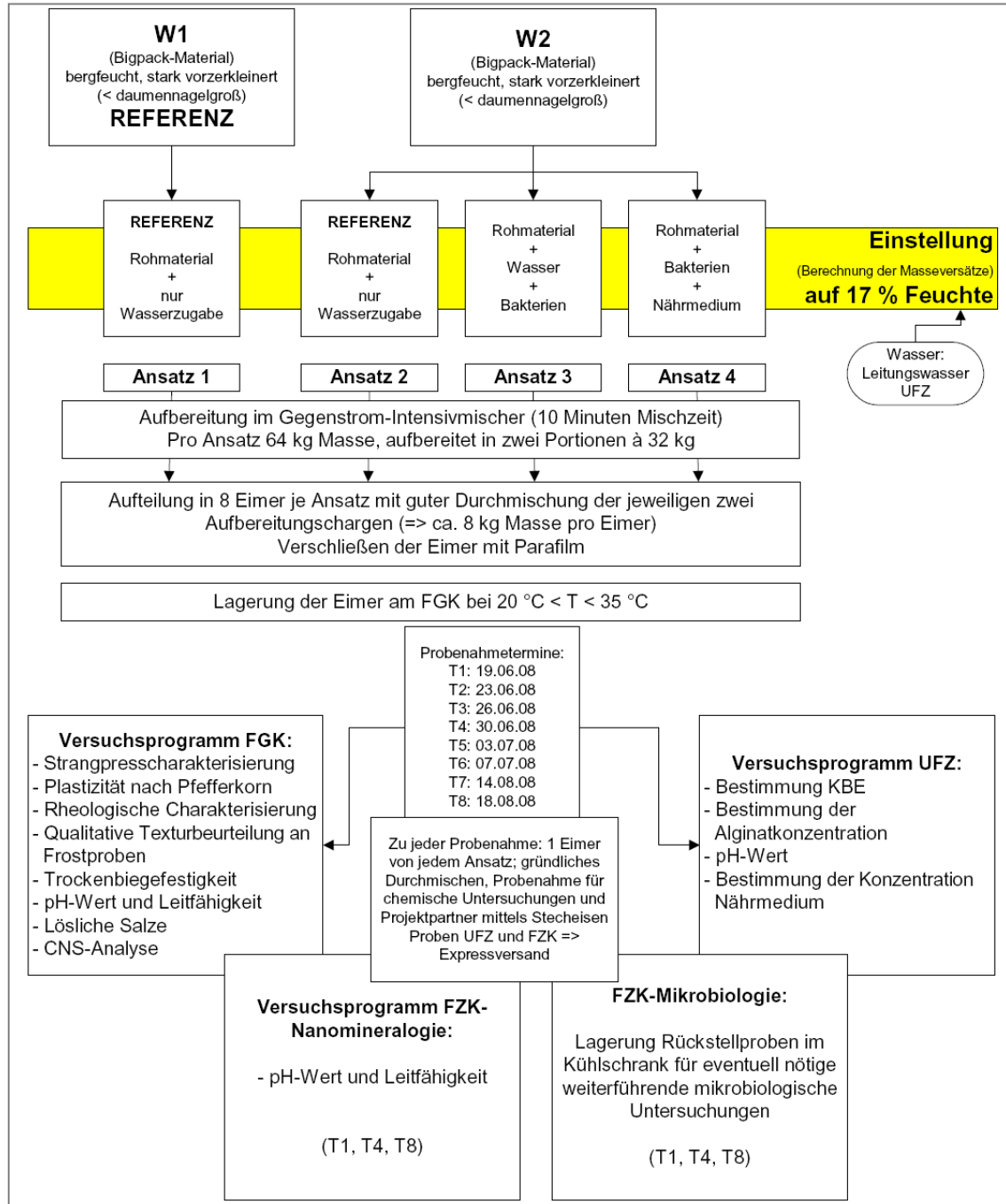
### **5.2 Versuchsdurchführung**

Der zu Beginn des Projektes als nicht plastisch deklarierte, ausgewählte Modellton W2 wurde mit dem Bakterium *Azotobacter vinelandii* DSM 576, Produzent des Exopolysaccharids Alginat, das die plastischen Eigenschaften von Ton positiv beeinflussen kann, beimpft und nach festgelegten Inkubationszeiten hinsichtlich mikrobiologischer und rheologischer Gesichtspunkte untersucht.

Zur Untersuchung kulturrelevanter Rahmenbedingungen wurde dazu sowohl eine bakterienbeimpfte W2-Masse zusammen mit einem Nährmedium angesetzt, als auch eine bakterienbeimpfte W2-Masse ohne weitere Nähstoffzugabe. Zum Vergleich wurde außerdem eine Referenzmasse aus W1, unbeimpft, und eine Referenzmasse aus W2, unbeimpft, zeitgleich aufbereitet und untersucht. Da der Ton W1 quasi ein Beispiel für einen ideal plastischen Rohstoff darstellt, kann somit unter gleichen Bedingungen analysiert werden, inwieweit eine bakterielle Beimpfung den Rohstoff W2 in Richtung W1 verbessert.

Zur Vorbereitung des Versuchs wurden am UFZ zwei Kultivierungen in 2-l-Bioreaktoren durchgeführt, um ausreichend Biomasse für den geplanten Animpfvorgang zu gewinnen. Die so produzierte Biomasse wurde in 5 l Leitungswasser suspendiert. Zusätzlich wurden 3 l siebenfach aufkonzentriertes Produktionsmedium hergestellt. Details zur Medienzusammensetzung und zur Prozessführung im Bioreaktor können dem Kapitel 6.2 entnommen werden.

Die Masseherstellung und Versuchsdurchführung erfolgte nach dem in Abbildung 53 dargestellten Schema.



**Abbildung 53: Ablaufschema des Versuchs zur Beimpfung von Tonmassen mit alginatbildenden Mikroorganismen**

### 5.3 Mikrobiologische Analysen

Die Angabe „unbehandelte Probe“ bezieht sich auf die Probe in dem Zustand der Anlieferung nach der Probennahme. Folgende Arbeitsschritte wurden bei Ansatz 3 und Ansatz 4 in Doppelbestimmung durchgeführt:

7 bis 8 g unbehandelte Probe wurden in ein steriles 50-ml-Proberöhrchen eingewogen. Anschließend wurde das Röhrchen mit dem fünffachen Gewicht der Probe an sterilem Leitungswasser (pH ca. 8,7) befüllt und solange geschüttelt, bis sich die Tonfraktion zu einem möglichst homogenen Schlicker gelöst hatte (2 - 4 h). Im Schlicker wurde der pH-Wert (teilweise 10 bis 15 min bis pH stabil) bestimmt. Für die KBE-Bestimmung wurden von dem Schlicker 2 ml in ein steriles Probengefäß überführt. Daraus wurde eine serielle Verdünnungsreihe in 10er-Schritten mit identischem Lösungsmittel hergestellt (steriles LW). Die Endverdünnung war abhängig vom Erwartungswert der Kolonie bildenden Einheiten. Anschließend wurden von jeder Verdünnungsstufe 3 \* 10 µl auf eine Agarplatte (Spezialagar für *Azotobacter*) aufgetragen und bei 30 °C inkubiert. Nach 48 und 72 h wurden die gewachsenen Kolonien pro Verdünnungsstufe ausgezählt. Die Ergebnisse der Feuchtebestimmung sind nicht im Einzelnen aufgeführt. Sie entsprachen durchschnittlich dem Erwartungswert von ca. 16 bis 17 % Feuchte.

**Tabelle 19: Messergebnisse der Ansätze 1 und 2 im Alginatbakterienversuch**

KBE – Kolonie bildende Einheiten pro g unbehandelter Probe  
 Alginat – g Alginat pro kg unbehandelter Probe  
 Zucker – g Gesamtzucker pro kg unbehandelter Probe

	A1			A2		
	pH	KBE	Alginat	pH	KBE	Alginat
<b>T1</b>	6,49	0	0	7,40	0	0
<b>T2</b>	6,59	0	0,11	7,44	0	0,21
<b>T3</b>	6,44	0	0,03	7,39	0	0,34
<b>T4</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>T5</b>	6,48	n.a.	n.a.	7,39	n.a.	n.a.
<b>T6</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>T7</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>T8</b>	6,41	0	0,63	7,41	0	0,1

Die Werte für die Ansätze 1 und 2 wurden stichprobenartig untersucht, da keine gravierende Veränderung zu erwarten war. Die KBE-, Zucker- sowie Alginatbestimmungen ergaben erwartungsgemäß einen Wert bei ca. 0. Der pH-Wert blieb größtenteils unverändert für A1 bei ~ 6,5 und für A2 bei ~ 7,4. Aufgrund des hohen pH-Wertes des zur Bestimmung verwendeten Lösungsmittels lag der tatsächliche pH-Wert der Feststoffproben unter den gemessenen Werten. Dies ist auch bei der Auswertung von A3 und A4 zu beachten.

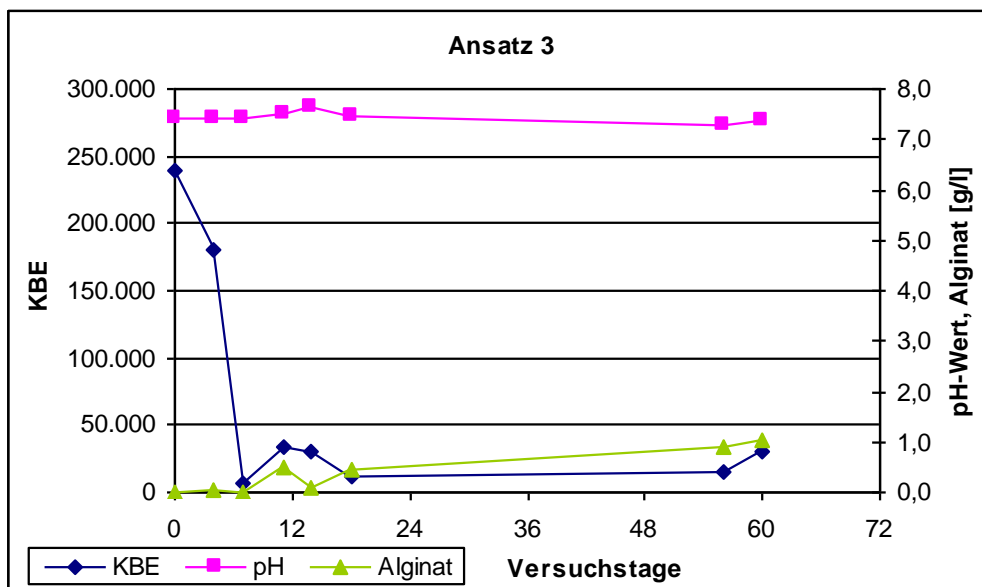
**Tabelle 20: Messergebnisse der beimpften Ansätze 3 und 4 im Alginatebakterienversuch**

KBE – Kolonie bildende Einheiten pro g unbehandelter Probe

Alginat – g Alginat pro kg unbehandelter Probe

Zucker – g Gesamtzucker pro kg unbehandelter Probe

	A3			A4			
	pH	KBE	Alginat	pH	KBE	Alginat	Zucker
T1	7,40	240.000	0	6,9	1.200.000	0	4,53
T2	7,4	180.000	0,06	6,32	7.500.000	0,48	2,262
T3	7,41	6.000	0	6,46	2.100.000	0,24	1,59
T4	7,5	33.000	0,48	6,64	600.000	0,69	1,068
T5	7,64	30.000	0,09	6,35	450.000	1,14	0,39
T6	7,45	12.000	0,45	6,61	540.000	1,29	0,528
T7	7,3	15.000	0,9	6,87	36.000	1,11	0,072
T8	7,37	30.000	1,02	6,65	90.000	1,26	0,078



**Abbildung 54: Messergebnisse über die Versuchslaufzeit bei Ansatz 3 beim Versuch zur Beimpfung von plastischen Tonmassen mit Mikroorganismen**

Die Anzahl an Zellen von *Azotobacter vinelandii* nimmt ab Tag 1 mit wachsender Tendenz ab. Dies ist die logische Konsequenz aus der fehlenden Nährstoffgrundlage in diesem Versuchsansatz. Einige Zellen haben, aufgrund der widrigen Lebensbedingungen, ein Dauerstadium ausgebildet, wodurch sie zu erneutem Wachstum fähig sind, sobald sie auf Agarplatten mit nährstoffreichem Medium übertragen werden. Innerhalb der Tonproben waren wahrscheinlich ab Tag 3 jegliche Stoffwechselaktivitäten von *Azotobacter vinelandii* eingestellt.

Die Alginatwerte spiegeln die bakterielle Entwicklung wider. Es konnte zwar eine leichte Alginatbildung festgestellt werden, diese ist aber auf die Zystenbildung der Dauerstadien zurückzuführen, da sich *Azotobacter vinelandii* zur Überbrückung von lebenswidrigen Zeitspannen mit einer dicken Schicht Alginat umhüllt. Die Werte für

Tag 7 und Tag 8 sind möglicherweise inkorrekt, da kein Grund für eine weitere Produktbildung nach Tag 6 gegeben war.

Die Alginatbestimmung war generell von teilweise starken Schwankungen geprägt, was auf die Art der Analytik zurückzuführen ist. Entweder verbleiben Moleküle im Feststoff oder teilweise lösliche Bestandteile des Tons werden durch die Analytik verschleppt und verfälschen das Ergebnis. Die ermittelten Werte können lediglich zur Feststellung von Tendenzen herangezogen werden.

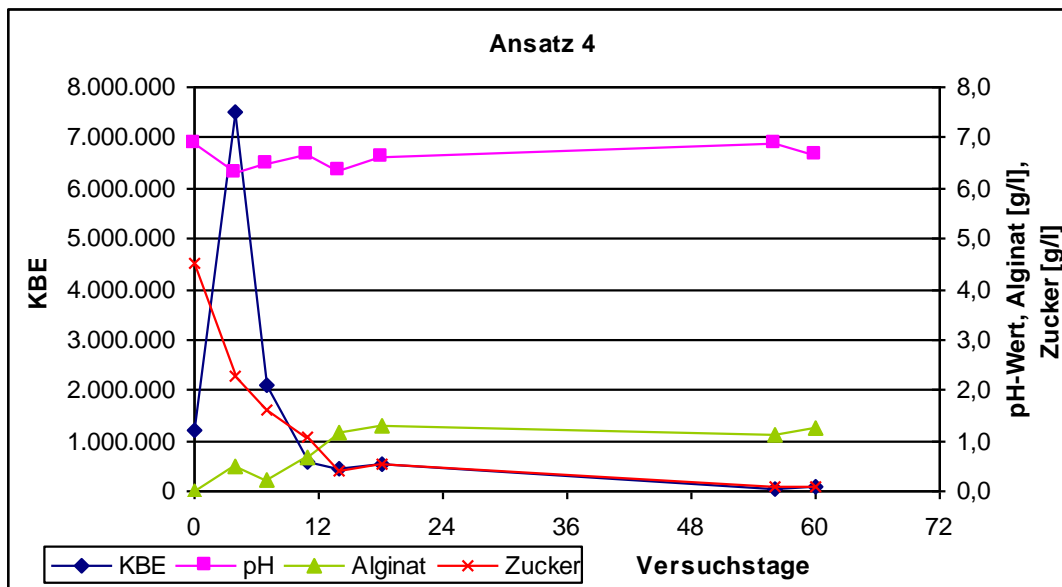


Abbildung 55: Messergebnisse über die Versuchslaufzeit bei Ansatz 4 beim Versuch zur Beimpfung von plastischen Tonmassen mit Mikroorganismen

Im Ansatz 4 fand aufgrund des hohen Nährstoffangebots zwischen Tag 1 und Tag 2 ein explosionsartiges Wachstum von *Azotobacter vinelandii* statt. Die Entwicklung lief dabei deutlich schneller ab als ursprünglich vermutet. Die Sauerstoffversorgung ist demnach kein kritischer Faktor für das bakterielle Wachstum innerhalb des Ton-Habitats. Anders verhält es sich beim pH-Wert. Der optimale pH-Wert für Wachstum und Produktbildung von *Azotobacter vinelandii* liegt zwischen pH 7 und 8. Außerhalb dieser Grenzen kommt es zu einer zunehmenden Inhibierung aller Stoffwechsellleistungen. Die erhoffte Pufferwirkung der Minerale ist nicht eingetreten, was dazu führte, dass der pH-Wert nach Tag 1 stark abfiel. Dies war hauptsächlich auf die bakterielle Stoffwechselaktivität (Säurebildung) zurückzuführen. Aufgrund des ungünstigen pH-Milieus kam es bereits ab Tag 2 zu einem Absterben der Mikroorganismen, obwohl noch ausreichend Nährstoffe vorhanden waren. Wie bei Ansatz 3 wurde die Absterbephase von einem leichten Anstieg des pH-Wertes begleitet. Zusätzlich zu den negativen Auswirkungen des pH-Wertes führten autochthone Konkurrenzorganismen zu einer Verdrängung von *Azotobacter vinelandii*. Auf den Agarplatten zur Bestimmung der KBE wurde neben dem Zielorganismus noch eine Vielzahl weiterer unbestimmter Mikroorganismen bestimmt, die offensichtlich die verfügbare Zuckerquelle genutzt haben. Infolgedessen kam es bis zum Versuchsende zu einer vollständigen Auszehrung der Nährstoffquelle, obwohl sich *Azotobacter vinelandii* nicht mehr vermehrt hat. Genau



wie bei A3 war die Alginatanalytik stark fehlerbehaftet. Trotzdem lässt sich die Tendenz erkennen, dass bis Tag 5 eine Alginatbildung stattgefunden hat, die anschließend stagnierte.

## 5.4 Anwendungstechnische Untersuchungen

Zum jeweiligen Probenahmetermin wurden die Proben nach dem im Versuchschemata beschriebenen Untersuchungsprogramm (siehe auch Abbildung 53) analysiert.

Es konnten leichte Schwankungen der Massenfeuchte beobachtet werden. Trotz gründlicher Homogenisierung stellte sich ein leichter Feuchtegradient in den Probeneimern ein, der bei der im Vergleich zum Maukversuch etwas höheren Massenfeuchte stärker zum Tragen kam.

W1 zeigt bei vergleichbarer Massenfeuchte stets eine höhere Pfefferkornstauchhöhe als W2. Die verschiedenen W2-Massen liegen in ähnlicher Größenordnung; tendenziell scheint die Masse mit Nährlösung und Bakterien sich in Richtung höherer Pfefferkornwerte zu bewegen.

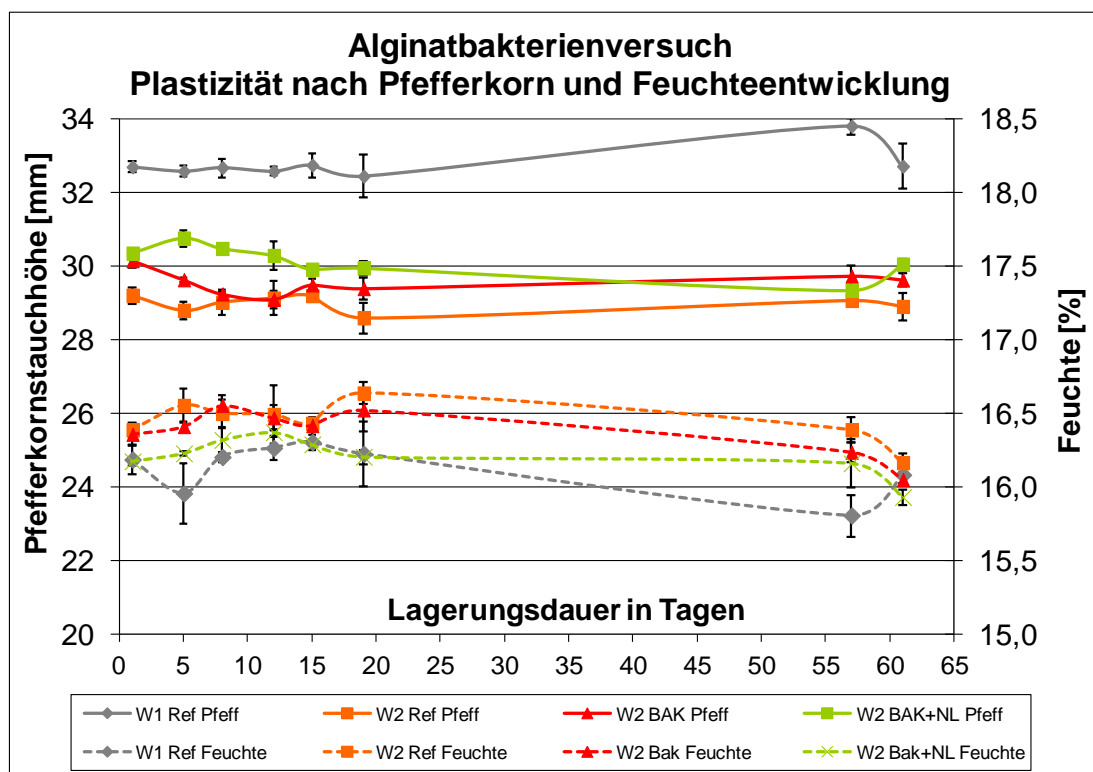
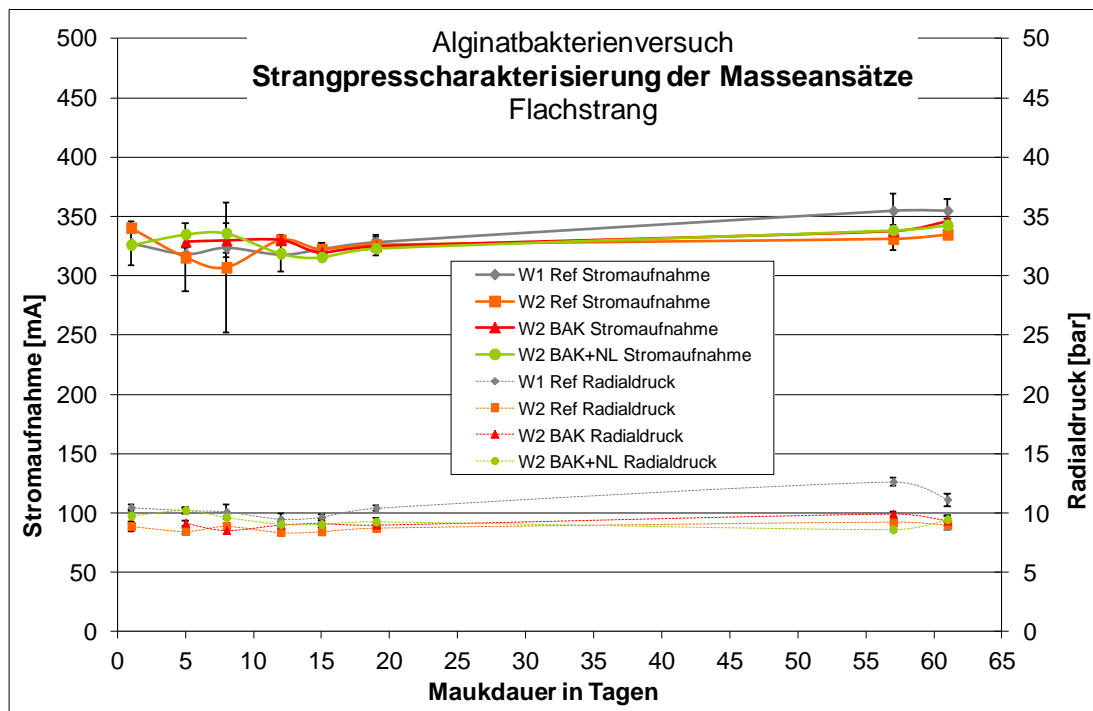


Abbildung 56: Alginatbakterienversuch – Plastizität nach Pfefferkorn und Feuchte in Abhängigkeit der Lagerdauer; Bak: mit Bakterienkultur versetzt; Bak+NL: mit Bakterien und Nährlösung versetzt

Im Gegensatz zum ersten Maukversuch (mit ca. 13,9 % Feuchte) sind die Massenfeuchten nun auf ca. 16,3 % Feuchte eingestellt. Dies sollte eine optimierte Charakterisierung der Massen gewährleisten. Im ersten Maukversuch zeigten die beiden Tonsorten W1 und W2 deutlich unterschiedlichen Energiebedarf beim Verarbeiten. Beim Verpressen von W1 stellten sich hier im Vergleich zu W2

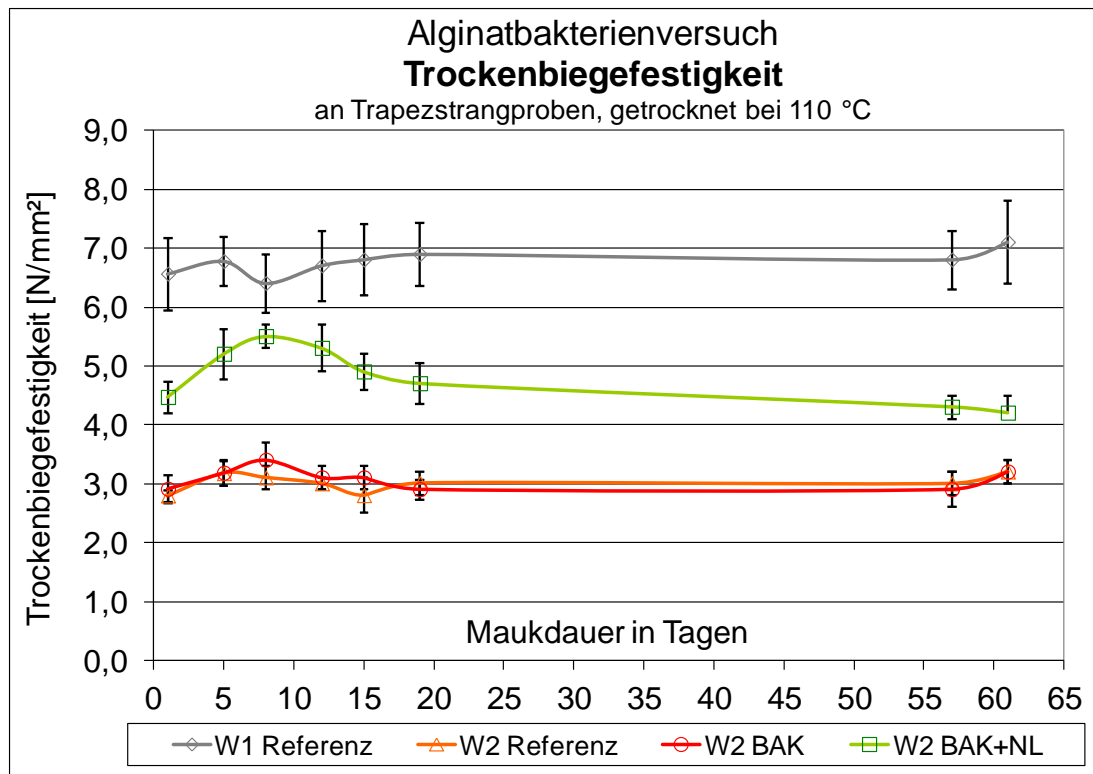
signifikant höhere Radialdrücke sowie eine höhere Stromaufnahme ein. Mit steigender Massenfeuchte verschwindet allerdings der Unterschied im Verarbeitungsaufwand der beiden Tonsorten fast völlig, wie man in Abbildung 57 gut erkennen kann (siehe dazu auch Abbildung 50 im Kapitel 4, Maukversuche).



**Abbildung 57: Strangpresscharakterisierung (Stromaufnahme, Radialdruck) der Massenansätze am Beispiel der Flachstrangproben**

In Abhängigkeit des Lagerungszeitraums kann dabei keine eindeutige Tendenz zu einer Verbesserung der Verarbeitungseigenschaften und Produktqualität quantifizierbar beschrieben werden. Die Massen waren durchgängig gut verarbeitbar. Allerdings zeichnete sich der Ansatz mit Bakterien und Nährlösung durch unangenehmen Geruch aus.

Betrachtet man die Ergebnisse der Trockenbiegefestigkeitsmessung an stranggepressten Trapezproben (siehe Abbildung 58), ist hier eine deutliche Festigkeitssteigerung des Ansatzes von W2 mit Bakterien und Nährlösung zu verzeichnen. Es wird jedoch vermutet, dass hier zumindest zum Teil der in der Nährlösung enthaltene Zucker die Verbesserung der TBF bewirkt. Der Ansatz nur mit Bakterien zeigt zum Vergleich über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikante Steigerung der Festigkeit. Zu t57 und t61 ist in der Probe W2 mit Bakterien und Nährlösung allerdings kein Zucker mehr nachweisbar, also könnte beispielsweise das gebildete Alginat Wirkung zeigen. Allerdings ist die messbar durch die Mikroorganismen produzierte Alginatmenge sehr gering (siehe Kapitel 5.3), so dass diese Vermutung mit Unsicherheit behaftet ist. Die Beobachtung der erhöhten Trockenbiegefestigkeit konnte somit abschließend bei diesem Probenansatz nicht zweifelsfrei geklärt werden.



**Abbildung 58: Trockenbiegefestigkeit der Proben aus dem Alginatbakterienversuch**

Die Untersuchungen zu löslichen Salzen bestätigen die Ergebnisse aus den Maukversuchen. Allein die Probe W2 mit Bakterien und Nährlösung zeigt im Vergleich zur Referenz und zur Probe nur mit Bakterien einen höheren Gehalt an löslichen Salzen sowie eine höhere Leitfähigkeit, was durch die Bestandteile der Nährlösung erklärt werden kann.

## 5.5 Diskussion

Aus mikrobiologischer Sicht ist eine Beimpfung von Tonmaterialien während der industriellen Aufbereitung technisch generell möglich. Die mechanische Belastung während des Anmischprozesses und die Versorgung mit Sauerstoff innerhalb der Tonmasse sind unproblematisch für die Mikroorganismen.

Im weiteren Verlauf der Behandlung von Tonmassen mit Mikroorganismen muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese ein definiertes pH-Milieu als Kultivierungs- bzw. Wachstumsbedingung benötigen. Je weiter sich der tatsächliche Wert von diesem Optimum entfernt, desto schlechter und langsamer verlaufen die spezifischen StoffwechsellLeistungen, bis sie schließlich komplett zum Erliegen kommen. Die im Experiment beobachtete Schwankung und Veränderung des pH-Wertes innerhalb der plastischen Massen ist daher äußerst problematisch, da chemische Reaktionen oder auch die Bildung mikrobieller Stoffwechselprodukte selbst den pH-Wert verändern können. Dies resultiert in einer undefinierten pH-Veränderung, die zum einen die Lebensbedingungen der Mikroorganismen negativ beeinflussen und zum anderen eine kontrollierte mikrobielle Prozessführung unmöglich machen kann.

Die höchst komplexe mineralogische Zusammensetzung der Tone stellt ein weiteres Problem bei der Einbringung von spezialisierten Mikroorganismen in die plastischen Massen dar. Die Entwicklung eines reproduzierbaren biotechnologischen Prozesses stützt sich auf die Verfügbarkeit von definierten Medien und reproduzierbaren Umweltbedingungen. Dies ist beim Einsatz verschiedener Tonrohstoffe nicht gegeben, was zu einer ständigen Anpassung der Strategie des Prozesses bei geringen Erfolgsaussichten führen würde. Durch die Einbringung von zusätzlichen Nährstoffen wird auch die autochthone Mikroflora stark beeinflusst. Ein übermäßiges Wachstum der autochthonen Organismen kann zu einer Hemmung von künstlich eingebrachten Organismen führen und somit zum Ausbleiben von gewünschten Effekten.

Die Beimpfung von plastischen Tonmassen mit nicht-autochthonen Organismen zur positiven Beeinflussung der rheologischen Eigenschaften von Ton ist nach derzeitigem Kenntnisstand als genereller Ansatz zur Integration von mikrobiellen Prozessen nicht empfehlenswert. Des Weiteren muss bei der Überprüfung weiterer Implementierungsstrategien der Zeitfaktor genauer beachtet werden. Eine Lagerung von Rohstoffen über einen Zeitraum von zwei Wochen hinaus, bei Erzielung von minimalen Effekten, ist für eine industrielle Anwendung nicht sinnvoll.

Eine Prozessentkopplung im Rahmen einer getrennten Additivproduktion (biotechnisch hergestelltes Alginat) und direkten Plastifizierung erscheint unter Bewertung der vorliegenden Ergebnisse als vielversprechender.

## **6 Plastifizierung durch Zugabe biotechnisch hergestellter Additive: „Additivversuche“**

Neben der Beimpfung von Tonrohstoffen mit Mikroorganismenkulturen ist die zweite, im Projektrahmen untersuchte Prozessroute zu mikrobiell unterstützten Aufbereitungstechnologien eine direkte biotechnische Herstellung von plastifizierenden Additiven. Diese können an entsprechend geeigneten Prozessknotenpunkten den Tonen oder Tonmassen zugegeben werden (siehe dazu auch Prozessdiagramme in Kapitel 2.2) und somit das zeitaufwändige Mauken durch eine direkte Verbesserung bzw. Optimierung der Plastizität ersetzen.

### **6.1 Zielsetzung**

Im Rahmen der Additivversuche wurden die Erkenntnisse aus der Laborphase Basisforschung zur Wirkung und gezielten Nutzung von mikrobiellen Stoffwechselprodukten (siehe auch Kapitel 3.3.2) ausgebaut. Das Exopolysaccharid Alginate, das in den Basisversuchen eine positive Wirkung auf die Anwendungseigenschaften von Modellton W2 gezeigt hatte, wurde als Modellsubstanz für eine biotechnische Produktion ausgewählt. Ziel der Additivversuche war zum einen weiterer Erkenntnisgewinn zur Wirkung der Alginat in Tonmassen. Zum anderen sollten vor allem die Prozess- und Kulturbedingungen bei der Fermentation der Alginat optimiert werden, um ein Additiv mit idealer Wirkung auf die Anwendungseigenschaften von Tonmassen reproduzierbar und im Pilotmaßstab herstellen zu können.

### **6.2 Versuchsdurchführung**

Im Vorfeld der Prozessentwicklung wurden zwei aus der Literatur bekannte Stämme der Art *Azotobacter vinelandii*, DSM 576 und DSM 13529, bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bestellt, im Labormaßstab kultiviert und hinsichtlich Substratverwertung und Produktbildung verglichen. Dabei konnte DSM 576 aufgrund der höheren Alginatausbeute als vorläufiger Produktionsstamm selektiert werden. Bereits in einem frühen Entwicklungsstadium des Prozesses resultierten die Kultivierungen in einer Fermentationsbrühe mit sichtlich erhöhter Viskosität, was bei gleichbleibender Produktkonzentration auf eine längere Alginatemolekülkette zurückzuführen ist. Diese konnte jedoch nicht eindeutig reproduziert werden. Ebenso zeigten die Bakterienkolonien in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer auf Agarmedien unterschiedliche phänotypische Ausprägungen, was auf eine Verunreinigung der Kultur mit einem Fremdorganismus schließen ließ. Infolgedessen wurden frische Kulturen von der DSMZ geordert und mit den etablierten Kulturen verglichen. Dabei konnte der Verdacht einer Kontamination bestätigt werden. Die Reinkultur von *A. vinelandii* DSM 576 zeigte vergleichbare Prozessverläufe wie die vorher eingesetzte Mischkultur. Die Alginatausbeuten lagen

mit durchschnittlich 0,18 g Alginat pro g Substrat im Vergleich etwas höher, jedoch verringerte sich die maximal erreichte Viskosität drastisch. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass sich die beiden Stämme der vorher verwendeten Mischkultur (B676) gegenseitig beeinflussen, was zu einer gesteigerten Molekülkettenlänge des produzierten Alginats führt. Somit wird bei gleicher Produktkonzentration eine höhere Viskosität der Lösung erreicht. Bei einer DNA-Analyse der Mischkultur in Karlsruhe konnte ein Stamm als *Azotobacter vinelandii* DJ (ATCC BAA-1303 / NCBI CP001157) identifiziert werden. Die Kontaminante ist ein bisher noch nicht beschriebenes Bakterium der Gattung *Massilia*. Der Stamm *Azotobacter vinelandii* DJ wurde isoliert (interne Bezeichnung B691) und in mehreren Kultivierungen mit den bis dahin erzielten Ergebnissen verglichen. Die Produktausbeute konnte dabei teilweise auf 0,25 g Alginat pro g Substrat gesteigert werden. Die Viskosität hingegen nahm stark ab. Bei Untersuchungen von verschiedenen Produktmustern im Laufe der Entwicklungsarbeiten wurde festgestellt, dass eine hohe Viskosität der Alginatlösung einen geringeren Einfluss auf die plastischen Eigenschaften des Tons besitzt als eine hohe Alginatkonzentration. Diese Tatsache und die exakte Kenntnis der Stammidentität führten dazu, dass *Azotobacter vinelandii* DJ (B691) als endgültiger Produktionsstamm für die weiteren Arbeiten ausgewählt wurde.

Als Medium diente das stickstofffreie *Azotobacter*-Medium der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (DSMZ-Medium 3) als Grundlage für weitere Optimierungen. Die definierte Zusammensetzung dieses Mediums garantierte einen minimalen Materialaufwand und wurde im Rahmen weitere Versuche hinsichtlich einer gesteigerten Alginatausbeute angepasst.

**Tabelle 21: Medium zur Produktion von Alginat mit *Azotobacter vinelandii* (Inoculum: 10 % (v/v) Vorkultur)**

Konzentration g/l	Hauptkultur
30	Saccharose
0,05	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O
0,005	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O
0,01	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O
0,2	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O
0,04	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,01	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2	NaCl

Die Produktion von Alginat mit *Azotobacter vinelandii* im Bioreaktor ist stark abhängig von den vorherrschenden Prozessbedingungen. Die ersten Prozessoptimierungen bestätigten die allgemeinen Angaben bezüglich optimaler Kultivierungstemperatur und pH-Wert für *Azotobacter vinelandii*. Sowohl Wachstum als auch Produktbildung liefern bei 30 °C und im pH-Bereich von 7 bis 7,7 die besten Ergebnisse. Während des Prozesses führt die Produktbildung zu einem stetigen Abfall des pH-Wertes, welcher geregelt werden muss.

Bei der Begasung mit Luft bzw. Sauerstoff wurde ein quasi-anaerober Prozessansatz gewählt, bei der mit konstanten Begasungsraten (0,8 Liter Luft pro Liter Fermentationsvolumen pro Minute (0,8 VVM) [Reyes, 2003]) gearbeitet wird was jedoch dazu führt, dass die Sauerstoffsättigung im Laufe des Prozesse gegen Null tendiert und die Stoffwechselrate des Bakteriums abfällt. Eine Übertragung in den großtechnischen Maßstab wäre dadurch jedoch mit geringstem regelungstechnischen Aufwand realisierbar.

Die erste Strategie zur Produktintegration sah vor, das Alginat aus der Fermentationslösung abzutrennen. Anschließend könnte das Produkt als gereinigte Lösung oder getrocknetes Pulver gelagert und bei Bedarf zur Produktion von Tonmassen verwendet werden.

Bei Versuchen zur Abtrennung der Biomasse aus der Fermentationsbrühe zeigten sich Probleme in Bezug auf die Eigenschaften der Alginatlösung. Die langkettigen Moleküle führen bereits bei geringen Konzentrationen und Viskositäten zu starken Verblockungen bei Filtrationsmembranen, was die Kosten des Gesamtprozesses zu stark beeinflussen würde. Der daraus resultierende Entwicklungsaufwand für eine universelle Aufarbeitung und die entstehenden Kosten für einen industriellen Prozess führten zu der Entscheidung, die Integrationsstrategie anzupassen. Die Fermentationsbrühe sollte direkt, ohne den Kosten verursachenden Aufarbeitungsschritt, in den Anmischvorgang der Tonmassen überführt werden. Sie dient dabei als Anmachwasser zur Einstellung spezifischer Feuchtegehalte bei gleichzeitiger plastifizierender Wirkung. Die Biomasse verbleibt dabei in der Fermentationsbrühe und wird dem Ton untergemischt. Beim späteren Brennprozess verbrennt sie rückstandslos. Die restlichen Bestandteile der Fermentationsbrühe sind Salze in sehr geringen Konzentrationen, die auf die Eigenschaften des Tons keinen negativen Einfluss haben sollten.

Die unter Parametervariation fermentierten Alginatchargen wurden jeweils in Versuchsmassen keramtechnisch charakterisiert, um so das optimale Produkt anhand seiner Verbesserungseffekte auf Verarbeitungseigenschaften, Formlingqualität und Trockenbiegefestigkeit definieren zu können.

### 6.3 Anwendungstechnische Untersuchungen

Die Versuchsmassen wurden aus dem Modellton W2 – wie bereits in Kapitel 3.3.2 im Versuchsschema (Abbildung 31) beschrieben – mit den Alginatlösungen aus verschiedenen Fermentationschargen angesetzt und keramtechnisch charakterisiert.

Zum Vergleich wurden außerdem verschiedene, kommerziell erhältliche Alginat aus Braunalgen und ein kommerziell erhältliches Additiv (nicht auf Alginaten basierend) zur Plastifizierung eingesetzt. Weiterhin wurde eine Alginatcharge auch in einer Original-Produktionsmasse für Spaltplatten getestet, die im Rahmen eines FGK-Projekts mit verschiedenen chemischen Additiven versetzt wurde und somit einen umfangreichen Vergleichsdatensatz zur Verfügung stellen konnte.

**Tabelle 22: Übersicht der im Rahmen der „Additivtests“ zusätzlich getesteten Alginat aus Braunalgen sowie der chemischen Additive**

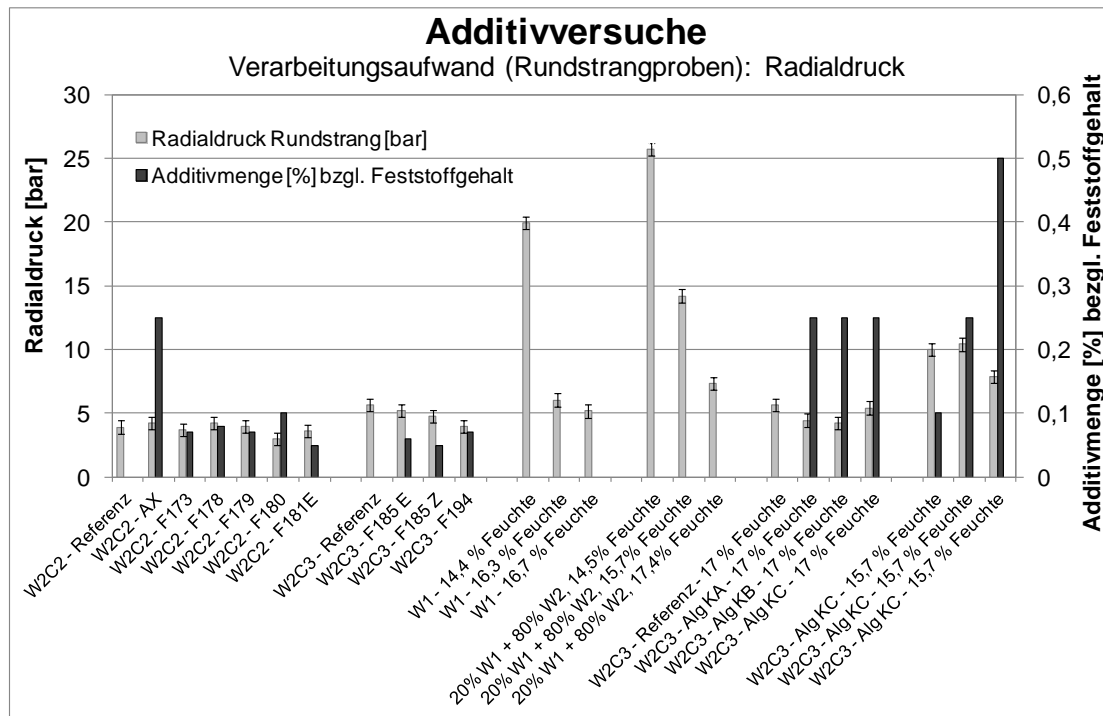
Kurz-Code	Firma	Nummer	Bemerkung
Alginat KA	Fluka bzw sigma	SAFF71238	alginate acid sodium salt for immobilization of microorganisms
Alginat KB	Alfa aesar	ALFAA18565.22	Alginic acid sodium salt very low viscosity
Alginat KC	Applichem Biochemika	A3249.0250	Natriumalginat Biochemika
Additiv AX	Z&S	Glydol N 109 NEU	Chemisches Additiv zur Plastifizierung; kommerziell erhältliche, universell einsetzbare Type für Anwendung in der Silikatkeramik

Als Referenzmassen sind zusätzlich Massen mit verschiedenen Feuchteinstellungen aus reinem W1 sowie aus einer Mischung aus W2 und W1 aufgenommen. Die Mischung enthält 80 % W2 sowie 20 % W1-Beimischung zur Verbesserung der plastischen Eigenschaften. Diese Mischung ist aufgrund der prozessbedingten Anforderungen gleichzeitig die Basistonmischung für die Pilotversuche. W2 kann im großtechnischen Maßstab nicht isoliert eingesetzt werden. Die Beimischung von W1 in der Minimummenge von 20 % ermöglicht eine generelle Prozessfähigkeit. Die Wirkung von Additiven auf diese Basismischung wird im Rahmen der Pilotphase näher untersucht. In Gegenüberstellung mit den Ergebnissen der reinen W2-Massen mit Alginaten kann außerdem untersucht werden, inwieweit W1 bezüglich der Verarbeitungseigenschaften durch Alginat ersetzbar wäre.



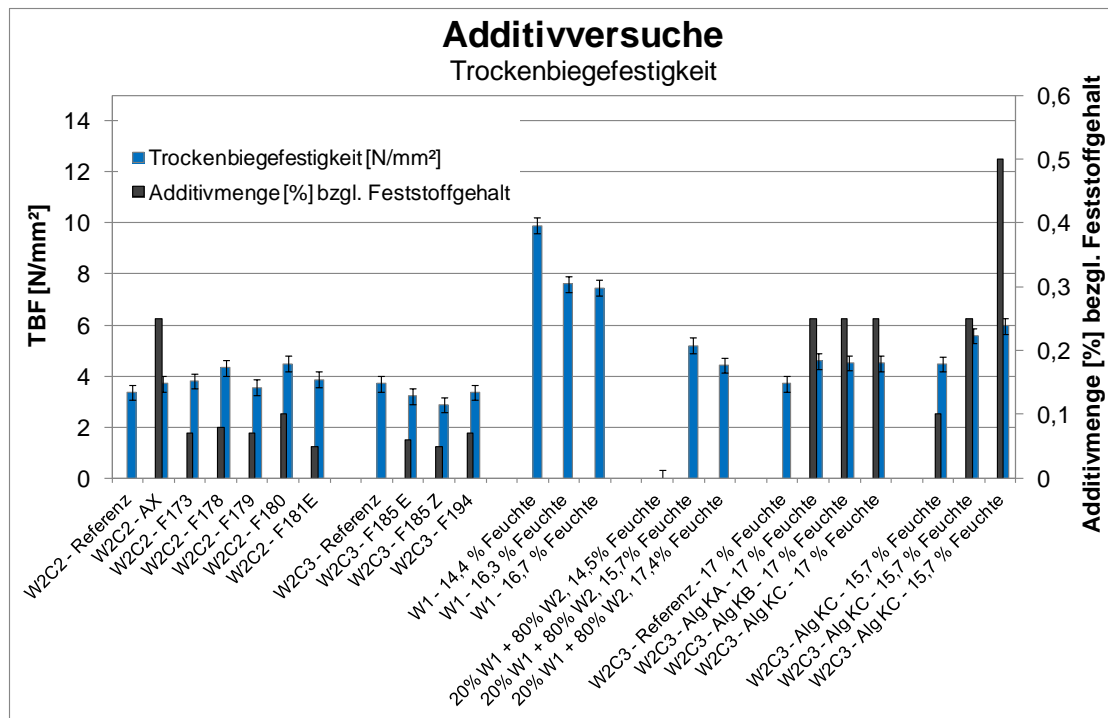
Aufgrund des zeitlich begrenzten Projektrahmens konnten nicht alle Masse-Additiv-Kombinationen in Feuchteabhängigkeit untersucht werden. In den nun folgenden Übersichtsgrafiken sind die Details zu den Massen den Legenden zu entnehmen. Da während der Versuche mehrere Chargen Tonmehl verwendet wurden, sind die Ergebnisse jeweils mit der passenden Referenz (wenn vorhanden) gruppiert dargestellt. Mit dem Alginat KC, dem preislich günstigsten Braunalgen-Alginat Produkt der Auswahl, das somit zum biotechnischen Alginat konkurriert, wurde außerdem eine Konzentrationsreihe untersucht.

In den Strangpressversuchen konnte gezeigt werden, dass der Verarbeitungsaufwand durch den Einsatz der Alginate im Vergleich zum reinen W2, zum reinen W1 und auch im Vergleich zur Mischung W2-W1 tendenziell verringert werden konnte (siehe Abbildung 59). Auch sind die Effekte zu denen des kommerziellen Plastifizierungshilfsmittels (Additiv AX) konkurrenzfähig.



**Abbildung 59: Verarbeitungsaufwand - Übersicht einer Ergebnisauswahl aus Additivversuchen mit verschiedenen Alginatchargen; wenn nicht anders angegeben liegt die Massenfeuchte bei ca. 17 %**

Die Untersuchungen zur Trockenbiegefestigkeit (siehe Abbildung 60) zeigen ebenso, dass der Einsatz geeigneter Fermentationsprodukte positive Auswirkungen hat.



**Abbildung 60: Trockenbiegefestigkeit - Übersicht einer Ergebnisauswahl aus Additivversuchen mit verschiedenen Alginatchargen; wenn nicht anders angegeben liegt die Massenfeuchte bei ca. 17 %**

Hier scheint außerdem tendenziell eine gewisse Abhängigkeit der TBF zum Alginatgehalt in der Masse erkennbar. Mit einer entsprechenden Optimierung des Fermentationsprozesses können die Ergebnisse voraussichtlich noch weiter verbessert werden. Bei den kommerziell erhältlichen Braunalgen-Alginaten ist ebenfalls eine gute Wirksamkeit bzgl. Erhöhung der TBF beobachtet worden. Diese wurden jedoch in höherer Konzentration den Versuchsmassen zugeführt, was bei der Ergebnisinterpretation berücksichtigt werden muss.

Ein Versuch mit einer Alginatcharge (F 181 E) in einer realen Produktionsmasse für Spaltplatten zeigte auch hier positive Effekte. Der erzielte Verarbeitungsaufwand entsprach dem der Referenz bei gleicher Feuchte. Im Vergleich zur Referenz sowie zu der Masse mit einem kommerziell erhältlichen Additiv AX ließ sich die alginatversetzte Masse deutlich besser und ohne Pressfehler verarbeiten.

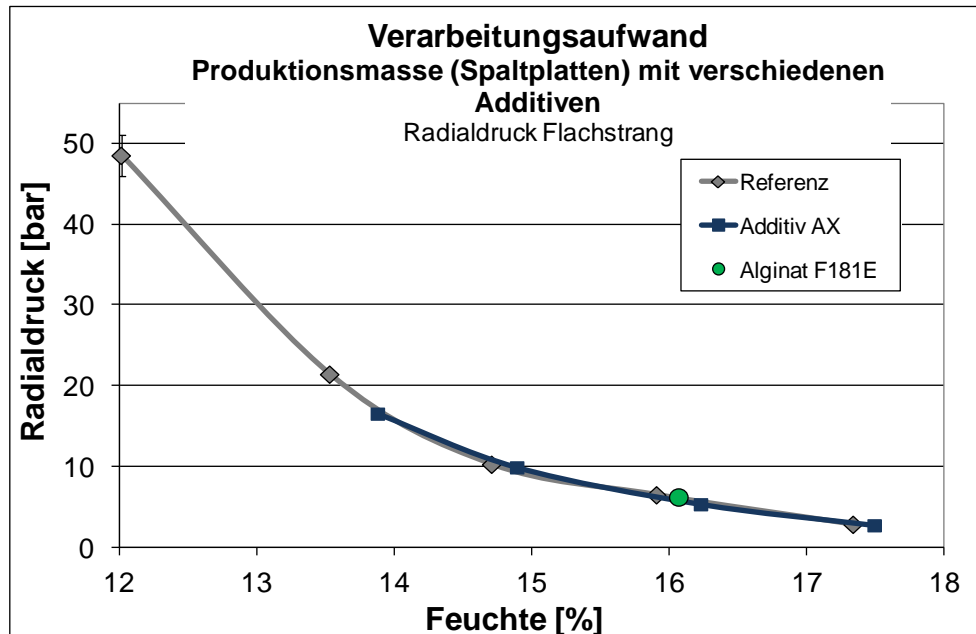


Abbildung 61: Verarbeitungsaufwand einer Original-Produktionsmasse

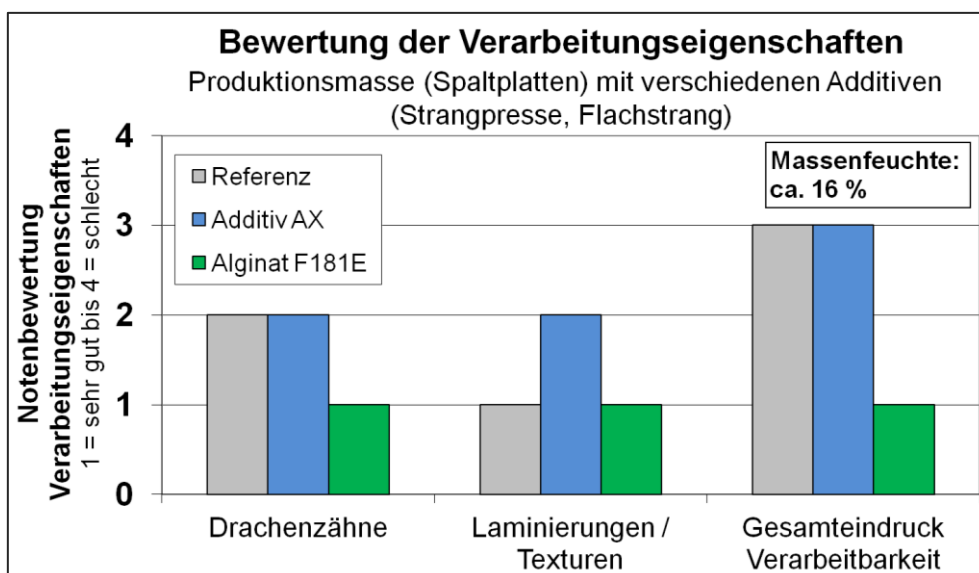


Abbildung 62: Bewertung der Verarbeitungseigenschaften einer Original-Produktionsmasse

## 6.4 Diskussion

Durch Einsatz der biotechnisch hergestellten Alginat konnte bei fast allen Chargen eine positive Beeinflussung der Verarbeitungs- und Produkteigenschaften der Tonmassen beobachtet werden. Der Vergleich verschiedener Produktmuster zeigte, dass eine hohe Viskosität der Alginatlösung einen geringeren Einfluss auf die plastischen Eigenschaften des Tons besitzt als eine hohe Alginatkonzentration. Auch zeigte die Fermenterlösung einer durch eine Kontamination mit Fremdstämmen erfolgte Bakterien-Mischkultur gute Ergebnisse. Da diese Bakterien nicht ausreichend identifizierbar bzw. charakterisiert sind, konnte dieser Ansatz nicht weiter verfolgt werden. Die Optimierung der Fermentationsprozesse an einer Reinkultur mit *Azotobacter vinelandii* konnte ebenfalls positive Effekte auf die keramtechnischen Eigenschaften erzielen.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist noch unklar, wie viel biotechnisch fermentierter Alginatlösung pro Tonne plastischer Masse hinzu gegeben werden muss, um einen ausreichenden und positiven Effekt auszulösen. Aufgrund der kurzen Entwicklungszeit des Verfahrens ist es derzeit nicht möglich die Produktqualität der Alginatlösungen exakt zu reproduzieren. Es müssten weitere umfassende Untersuchungen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Massen durchgeführt werden, um die generelle Einsetzbarkeit des biotechnologischen Produktes zu prüfen und die Veränderung der plastischen Eigenschaften zu testen. Der im Projekt erreichte Entwicklungsstatus wurde jedoch zum weiteren Erkenntnisgewinn und zur Optimierungsmöglichkeit als Ausgangspunkt für ein weiteres Scale-Up des Fermentationsverfahrens (ca. 100 l - Reaktor) für die Pilotversuche herangezogen.

## 7 Pilotphase

Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Forschungsthemen wurde im Rahmen der Pilotversuche die favorisierte Prozessroute der externen, biotechnischen Additivproduktion und der direkten Plastifizierung von Tonmassen im Großmaßstab getestet. Die Pilotphase sollte möglichst nah an einem realen Produktionsprozess der Rohstoff- bzw. keramischen Industrie ausgerichtet sein. Aus Kapazitätsgründen (größtmögliche biotechnisch am UFZ produzierbare Alginatmenge und erforderlicher Mindestmaterialbedarf der für die Versuche zur Verfügung stehenden Produktionsanlagen) wurden die Pilotversuche nach folgendem Schema konzipiert:

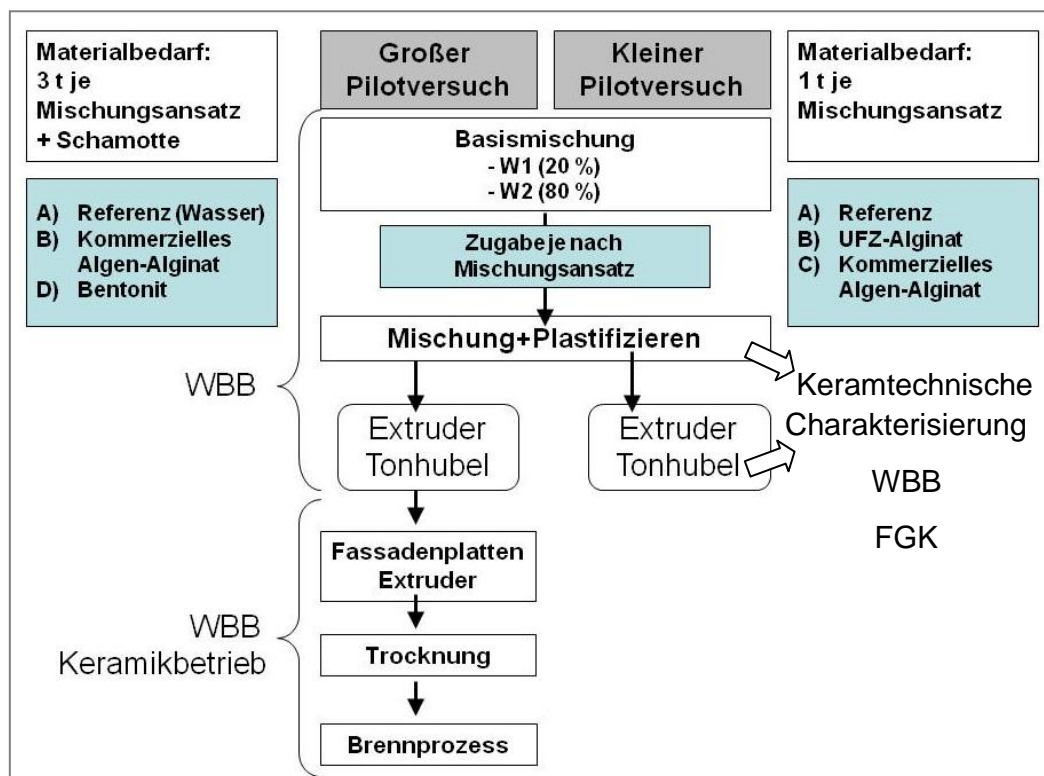


Abbildung 63: Ablaufplan der beiden Pilotversuche

Die biotechnische Herstellung einer für den kooperierenden Keramikbetrieb erforderlichen Alginatmenge war im Projektrahmen nicht mehr möglich. Im kleinen Pilotversuch wurden daher UFZ-Alginat und Kommerzielles Algen-Alginat gegenübergestellt, da der große Pilotversuch aufgrund der Mengenanforderungen nur mit Algen-Alginat als Beispielsubstanz durchgeführt werden konnte. Im großen Pilotversuch wurde außerdem Bentonit eingesetzt, ein stark quellfähiger und plastifizierend wirkender Ton, der im Einsatz durch eben diese Eigenschaften allerdings auch problematisch sein kann und oft z.B. zu Trockenrissen führt. Hierbei ist demnach interessant, ob Alginat eine geeignete Alternative zum anorganischen Plastifizierer Bentonit darstellen.

In der Pilotphase wurde weiterhin ein „Industriemaukversuch“ an einer über vier Wochen im Sumpfhaus gemauerten Klinkermasse durchgeführt.

## 7.1 Kleiner Pilotversuch

Als Massengrundlage wurde die „Basismischung“ eingesetzt. Dieser Basis-Tonversatz enthält 80 % W2 sowie 20 % W1-Beimischung zur Gewährleistung einer generellen Prozessfähigkeit auf Produktionsmaschinen, da W2 nach Angaben von WBB im großtechnischen Maßstab für plastische Massen nicht isoliert eingesetzt werden kann.

Zur Durchführung wurde die für den Massenansatz erforderliche Menge Alginatlösung aus Braunalgenalginat (Produkt KC, siehe auch Tabelle 22) am Vortag angesetzt. Die Konzentration Braunalgenalginat entspricht dabei der Alginatkonzentration, die auch durch das biotechnische Fermentationsprodukt eingebracht werden kann: Die fertigen Alginat-Massen enthalten schließlich jeweils 0,081 % Alginat bezogen auf den Feststoffgehalt. Das biotechnische UFZ-Alginat wurde als gebrauchsfertige Fermentationslösung angeliefert. Die drei verschiedenen Versuchsmassen wurden dabei nach folgendem Schema angesetzt:

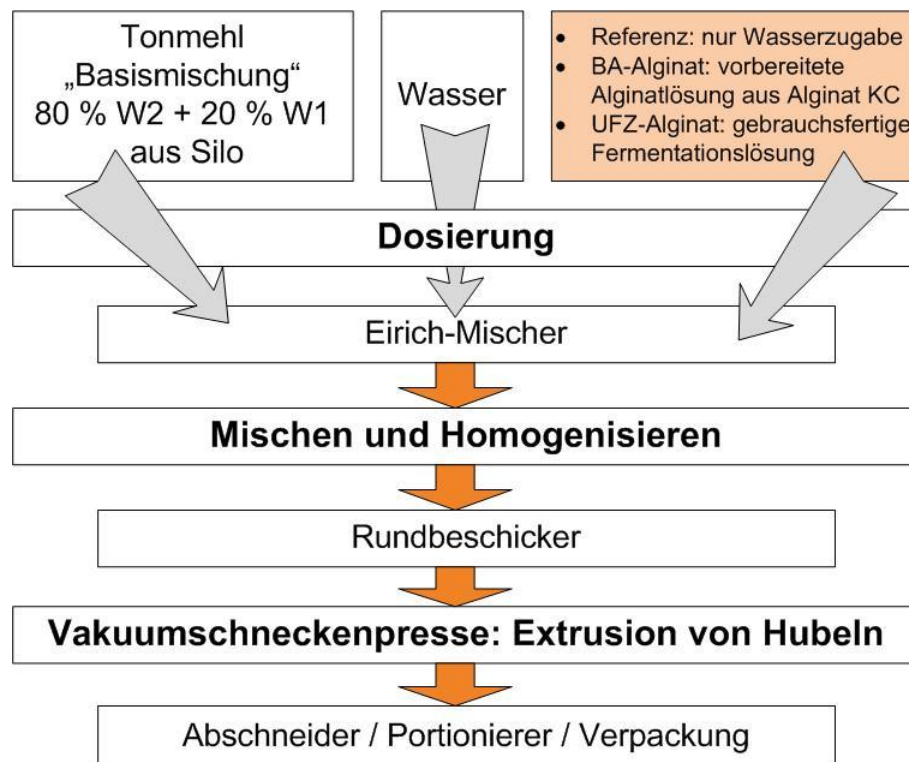


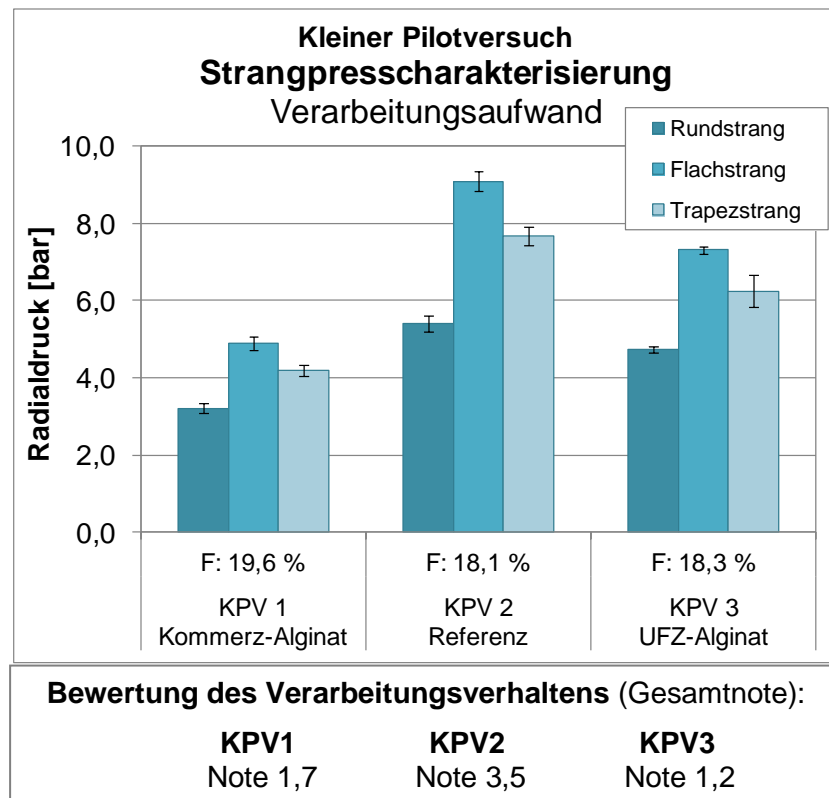
Abbildung 64: Massenherstellung und Verarbeitung im „Kleinen Pilotversuch“

Nach Eindüsung der Tonmehlmischung in den Eirich-Mischer wurde von Hand entsprechend Alginatlösung zugegeben. Mittels der automatischen Wasserdosierung wurde zusätzlich erforderliches Wasser zur Einstellung einer Massenfeuchte von ca. 18 % zugegeben. Diese Feuchteinstellung wurde gewählt, da die zunächst kalkulierte und geplante Einstellung von 16 % eine für den Extruder zu harte Masse ergab. Die Referenz wurde nur mit Prozesswasser angesetzt. Die Massenansätze wurden nach dem Anmischen direkt auf der über einen Rundbeschicker angeschlossenen Vakuumschneckenpresse zu Hubeln verarbeitet und für die anschließende keramtechnische Charakterisierung verpackt.

Leider stellte sich im Nachhinein heraus, dass sowohl die automatische Wasserdosierung als auch die Tonmehleinwaage in den Mischer mit gewissen Schwankungen behaftet war. Die Masse mit Braunalgen-Alginat KC hat über 1 % mehr Feuchte als Referenzmasse und UFZ-Alginat-Masse, so dass die Charakterisierungsergebnisse nur unter Vorbehalt verglichen werden können.

Am Hubel-Extruder können keine Parameter wie Radialdruck oder Stromaufnahme aufgezeichnet werden. Alle drei Massenansätze ließen sich unproblematisch zu Hubeln aufbereiten.

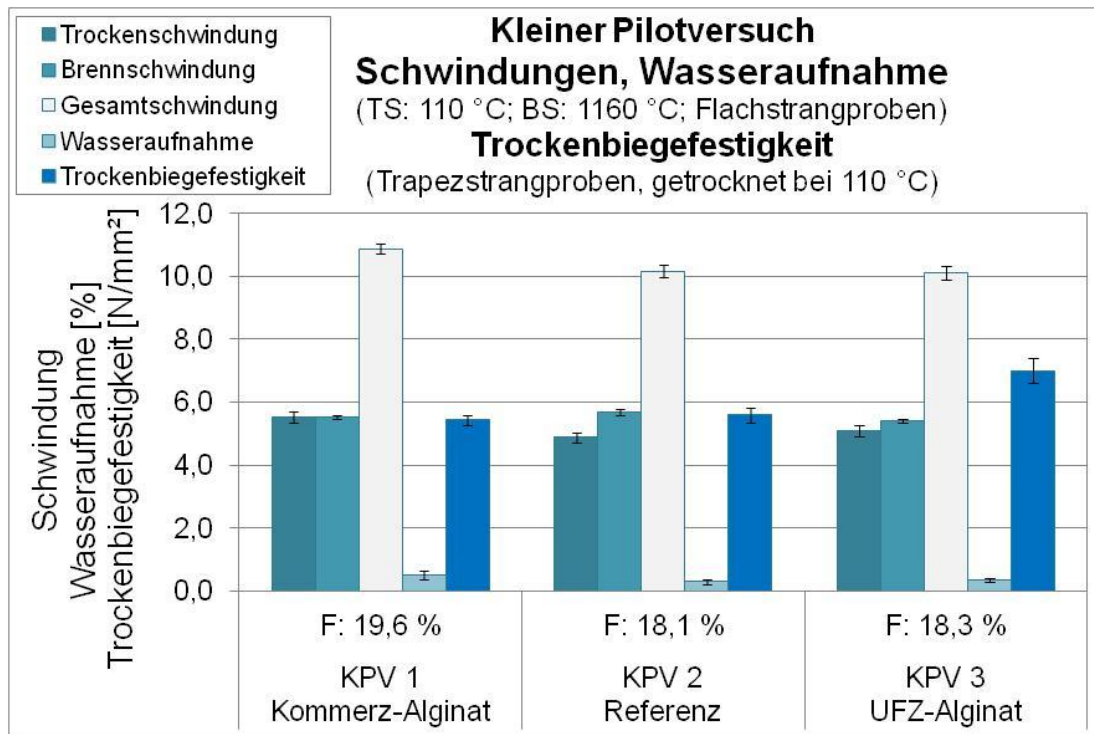
Bei der Strangpresscharakterisierung im Labor konnten Unterschiede in den Verarbeitungseigenschaften detektiert werden. Stellt man die beiden Massen mit vergleichbarer Feuchteinstellung (Referenzmasse KPV2 und UFZ-Alginat-Masse KPV3) gegenüber, ist eine leichte Verringerung des Verarbeitungsaufwands sowie eine deutliche Verbesserung des Verarbeitungsverhaltens zu beobachten.



**Abbildung 65: Bewertung der Verarbeitungseigenschaften der Massen im „Kleinen Pilotversuch“**

Schwindung und Wasseraufnahme der Versuchsansätze sind im Rahmen der ungenauen Feuchteinstellung in etwa vergleichbar. Die Masse mit Kommerz-Alginat zeigt tendenziell geringfügig höherer Schwindungs- und Wasseraufnahmewerte, was durch die geringere Verdichtung (vgl. niedrigere Radialdruckwerte) in Folge der etwas höheren Massenfeuchte erklärt werden kann.

Bei der Trockenbiegefestigkeit zeigte sich eine signifikante Verbesserung durch das UFZ-Alginat, während durch das Algen-Alginat keine Veränderung beobachtet werden konnte.



**Abbildung 66: Kleiner Pilotversuch - Ergebnisübersicht**

Zusammengefasst zeigte das UFZ-Alginat einen deutlich positiven Effekt auf die Masseneigenschaften. Die Trockenbiegefestigkeit konnte signifikant erhöht werden. Durch die Probleme bei der Feuchteinstellung ist im Rahmen des „Kleinen Pilotversuchs“ der umfassende Vergleich zu dem kommerziell erhältlichen Braunalgen-Alginat nicht möglich. Im Hinblick auf den recht feuchteunempfindlichen Parameter TBF zeigt das biotechnisch hergestellte Alginat jedoch eindeutig eine bessere Wirksamkeit als das getestete Algenprodukt.



## 7.2 Großer Pilotversuch

Der „Große Pilotversuch“ zielte zum einen auf weiteren Erkenntnisgewinn zur Additiv-Handhabung in einem realen Keramik-Produktionsprozess, zum anderen wurde unter dem Nachhaltigkeitsaspekt der Frage nachgegangen, ob Bentonit als hochwertiger, plastifizierend wirkender Tonrohstoff durch Alginat ersetzt werden kann. Aufgrund der Ergebnisse aus dem „Kleinen Pilotversuch“ wird die Zugabemenge an Braunalgen-Alginat erhöht und auf 0,25 % Additiv bzgl. Feststoffgehalt gesetzt.

Für den Großversuch konnte ein Fassadenplattenhersteller gewonnen werden, der dazu seine Produktionsline von der Extrusion von Plattenelementen bis hin zur Trocknung und zum Brand der Proben zur Verfügung stellte.

Für die Versuche wurden die Test-Massen wie bereits beim „Kleinen Pilotversuch“ beschrieben auf der Aufbereitungsanlage bei WBB hergestellt. Die Massen wurden allerdings aufgrund der Anforderungen der Produktionspresse direkt nach dem Mischer als Krümelmasse entnommen und nicht noch zu Hubeln verpresst.

Das folgende Schema illustriert den groben Ablauf des „Großen Pilotversuchs“:

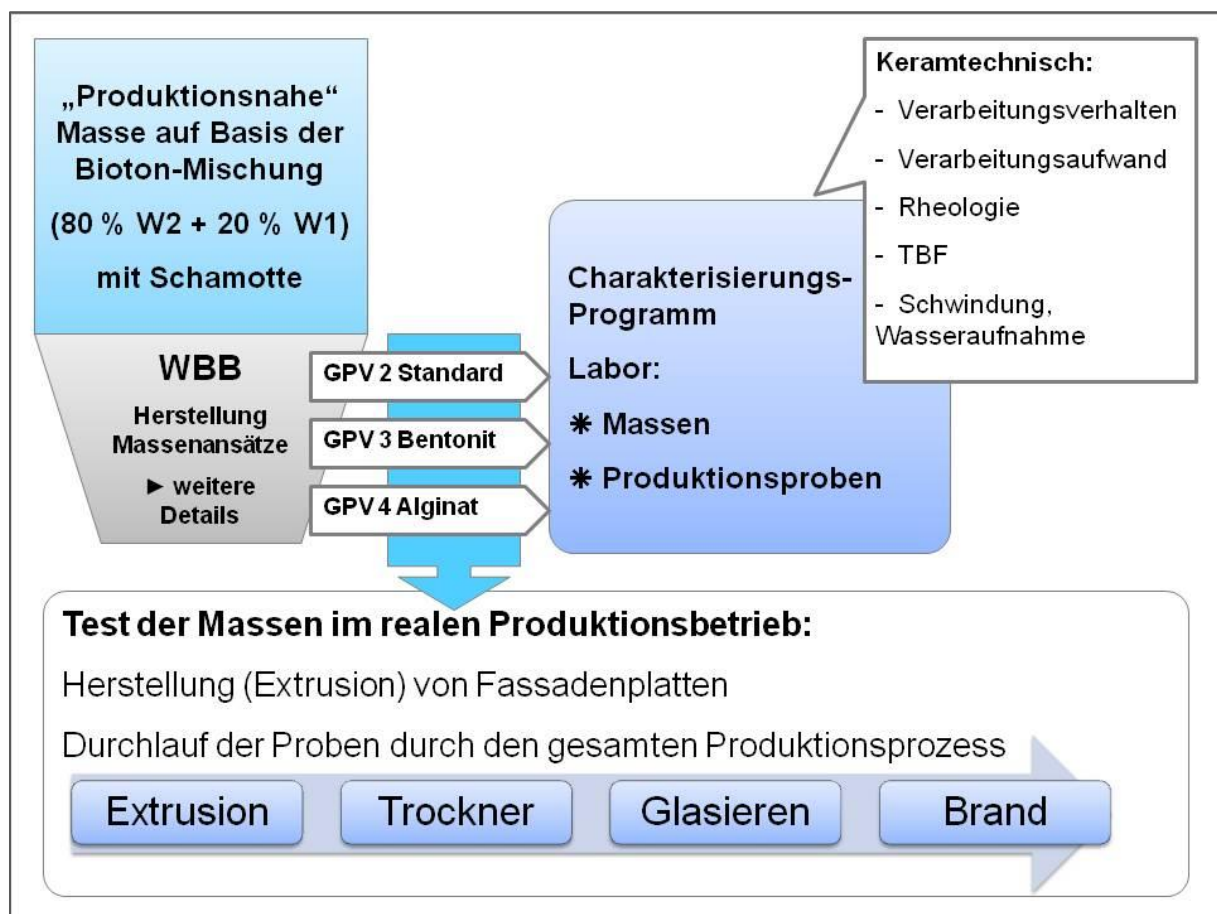


Abbildung 67: Ablaufschema „Großer Pilotversuch“

Für den Großversuch wurden folgende Massenansätze aufbereitet:

**GPV2 Standard:**

4 Mischungen je 750kg Feststoff  
mit 80,0% Bioton-Basismischung und 20% Schamotte der Körnung 0-0,63 mm

**GPV3 Bentonit:**

4 Mischungen je 750kg Feststoff  
mit 76,5% Bioton-Basismischung und 20% Schamotte der Körnung 0-0,63 mm  
sowie 3,5 % Bentonit CA

**GPV 4 Alginat:**

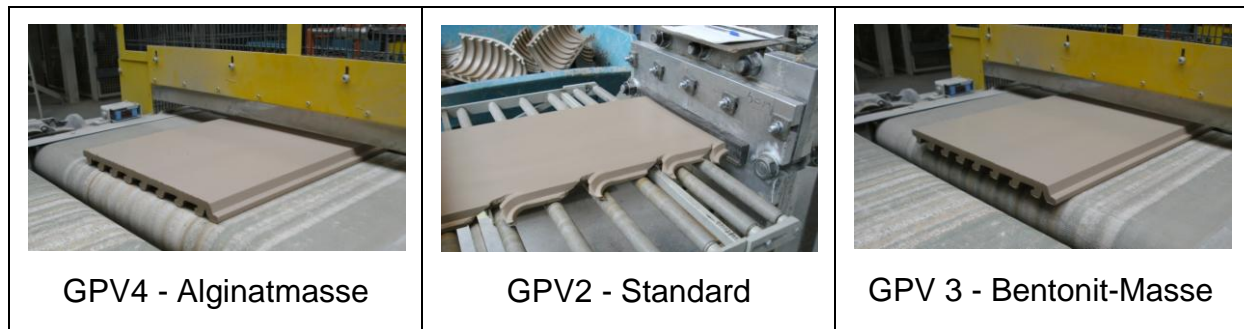
3-4 Mischungen je 750kg Feststoff  
mit 80,0% Bioton-Basismischung und 20% Schamotte der Körnung 0-0,63 mm  
sowie 0,25 % Alginat, bezogen auf den Gesamtfeststoffgehalt

Die Massenfeuchte muss für die maschinellen Gegebenheiten der Produktionsanlage ca. 14,5 – 15 % betragen; als Wert für die Versatzberechnung und das Anmischen wird eine Feuchte von 14,75 % eingesetzt.

Zum Vergleich wurde außerdem die in der realen Produktion eingesetzte Betriebsmasse für Fassadenplatten (**Code GPV1**) mit den keramtechnischen Methoden untersucht.

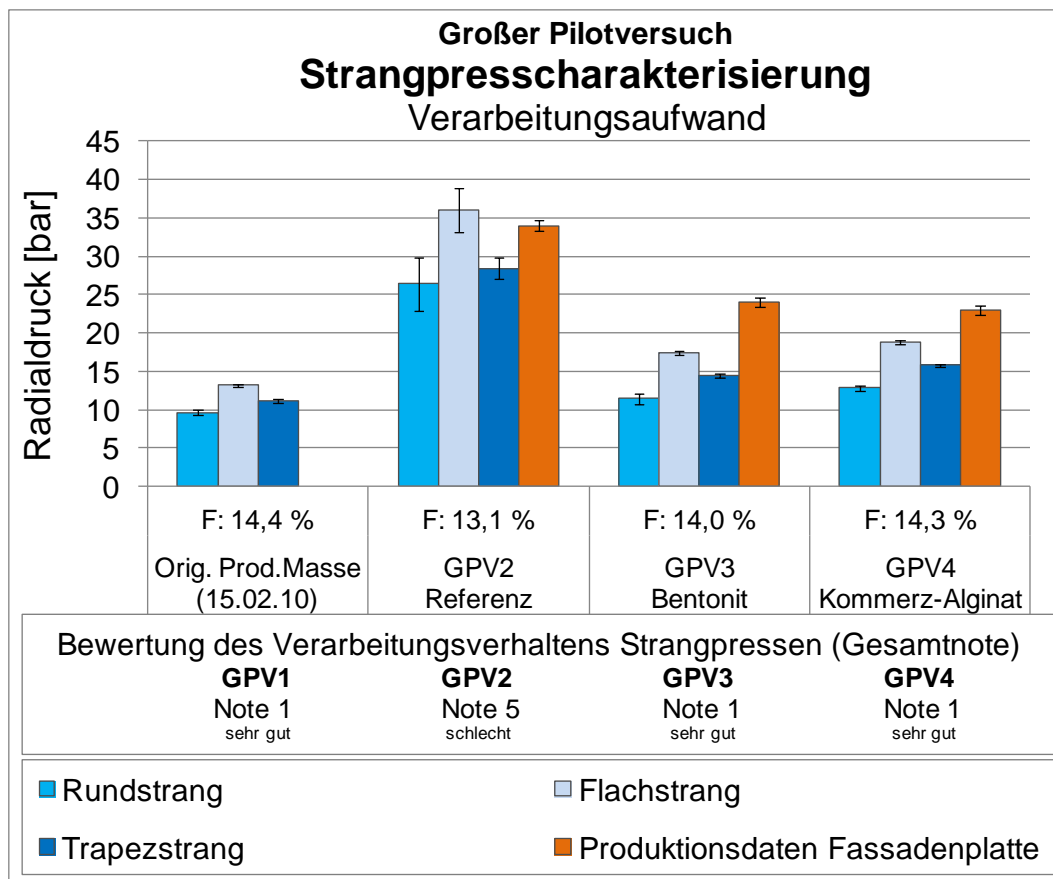
Die drei Bioton-Ansätze sowie die Betriebsmasse wurden parallel zum Versuchslauf in der Produktion mittels Strangpresscharakterisierung am instrumentierten Laborextruder untersucht.

Die vorbereiteten Massen wurden am Versuchstag in die Produktionsanlage eingebracht und zu Fassadenplatten des Formats 400 x 1200 mm, 26 mm Stärke, verpresst. Wie in Abbildung 68 deutlich erkennbar, ließ sich die Standardmasse GPV2 sehr schlecht verpressen und bildete extreme Drachenzähne während der Extrusion der kompletten Versuchscharge. Dies deutet auf fehlende Plastizität hin. Auch gab es beim Masseansatz nochmals Schwierigkeiten mit der genauen FeuchteEinstellung: GPV2 war die Masse mit der im Vergleich niedrigsten Feuchte (siehe dazu auch die folgenden Ergebnisdiagramme der Laborcharakterisierung), eine Tatsache, die sich ebenfalls in den schlechten Verarbeitungseigenschaften manifestiert haben könnte. Die Massen mit Alginat und Bentonit ließen sich fehlerfrei verarbeiten, jedoch waren nach dem Trocknen systematisch mittig in den Platten Anrisse erkennbar. Dies ist jedoch in erster Linie auf ein Problem in der Feinjustierung des Masseaustritts am Mundstück zurückzuführen und wäre prinzipiell behebbar. Im Rahmen der begrenzten Zeit- und Ressourcen-Kapazität des Pilotversuchs konnte dies nicht behoben werden. Die Proben wurden entsprechend im vorliegenden Zustand weiterbearbeitet.



**Abbildung 68: Pressverhalten der drei Versuchsmassen im „Großen Pilotversuch“**

Im Testbrand zeigten die Proben aller Versuchsmassen GPV2, GPV3 und GPV 4 starke Kühlrisse und Reduktionskerne. Diese Fehler haben ihre Ursache allerdings darin, dass der Grundversatz der Versuchsmassen nicht dem der üblichen Produktionsmasse entspricht. Trocknungs- und Brennprozess der Produktion sind jedoch naturgemäß spezifisch auf die Betriebsmasse angepasst. Diese Fehlerbeobachtung ist also aus der Massenbewertung zu entkoppeln, wengleich mit diesen defekten Proben alle weiteren Untersuchungen (Schwindung, Wasseraufnahme etc.) keine sinnvollen Aussagen bringen würden und demnach darauf verzichtet wurde. Verlässliche Ergebnisse zum Verarbeitungs- und Produktverhalten der GPV-Massen fließen so über die Laborcharakterisierung ein. Jedoch werden die an der Produktionsstrangpresse aufgezeichneten Daten in die Bewertung der Massen mit einbezogen sowie rheologische Messungen an Proben, die aus den frisch extrudierten Platten präpariert wurden.



**Abbildung 69: Verarbeitungseigenschaften Laborcharakterisierung und Produktion**

Sowohl Labor- als auch Produktionsdaten stellen heraus, dass durch Einsatz von Bentonit bzw. Alginat die Verarbeitungseigenschaften verbessert werden. Die Original-Produktionsmasse zeigt die im Vergleich besten Eigenschaften. Hier liegen allerdings keine Produktionsdaten vor.

In Abbildung 70 sind die Ergebnisse der rheologischen Charakterisierung an den im Labormaßstab gepressten Rund- und Flachstrangproben sowie an Proben aus Fassadenplatten der Produktion dargestellt.

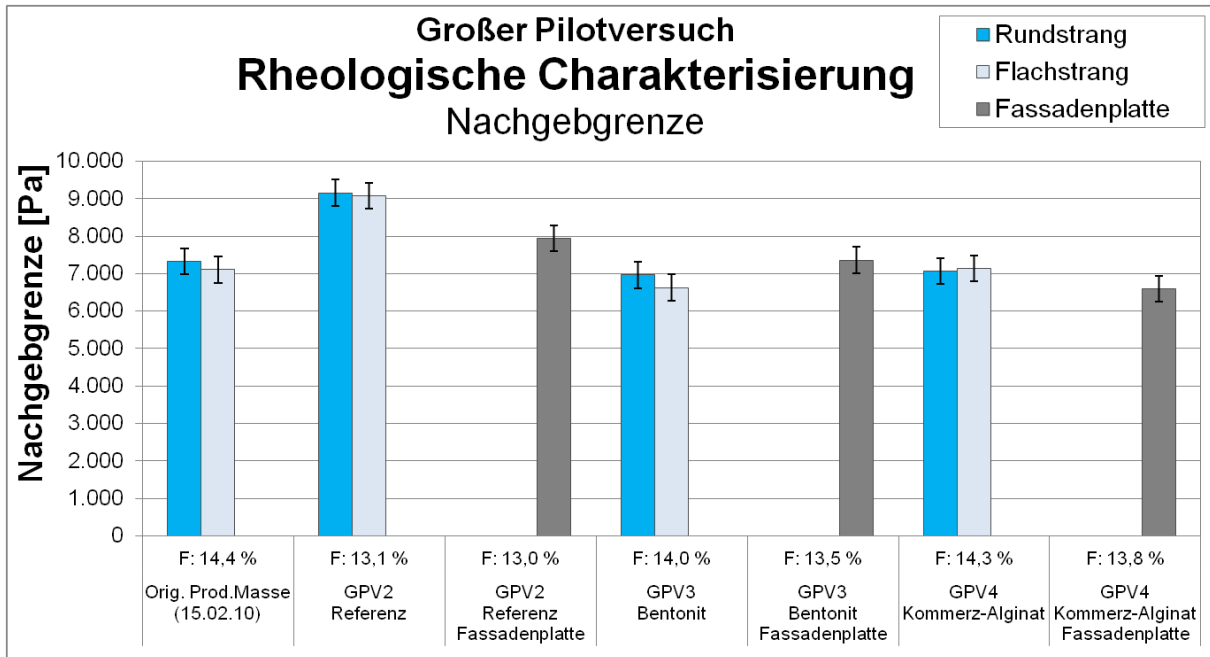


Abbildung 70: Rheologische Charakterisierung der Proben aus „Großem Pilotversuch“

Die Proben wurden jeweils frisch extrudiert präpariert und zur Messung eingesetzt. Die Bentonit-Masse GPV3 und die Alginat-Masse GPV4 zeigen Nachgebrenzen in der gleichen Größenordnung. Die Strukturstärke bzw. Stabilität der beiden Massen ist mit der Original-Produktionsmasse.

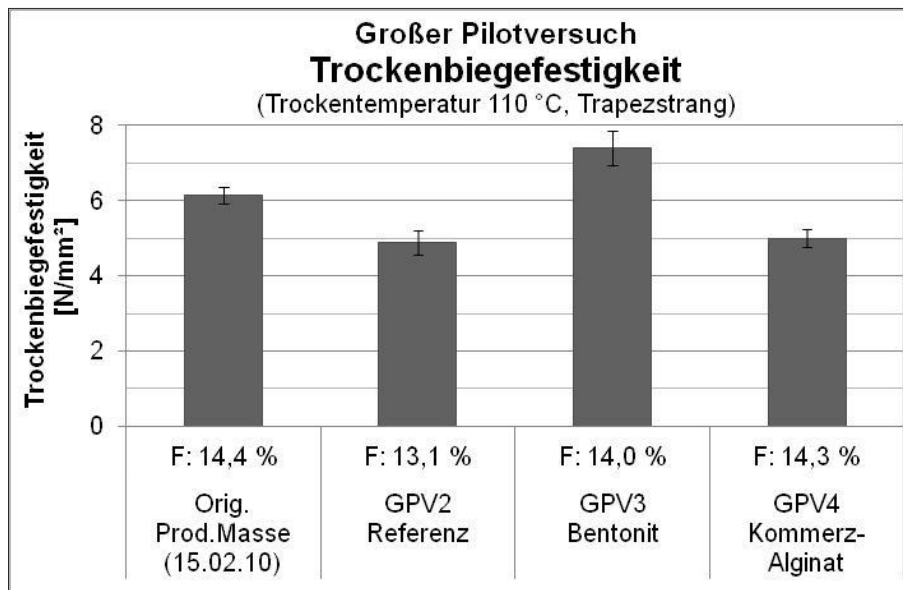


Abbildung 71: Trockenbiegefestigkeit der Laborproben aus „Großem Pilotversuch“

Bei Betrachtung der Trockenbiegefestigkeitswerte ist eine signifikante Steigerung durch den Einsatz von Bentonit im Vergleich zur Referenz GPV 2 und der Alginatmasse GPV4 erkennbar. Die Werte der Original-Produktionsmasse geben einen ungefähren Soll-Referenzwert vor, der mit diesen beiden Testmassen nicht erreicht wird.

Fasst man die Ergebnisse der beiden Pilotversuche zusammen, ist der Einsatz von Alginaten als Plastifizierungsmittel grundsätzlich möglich und zeigte auch im Großversuch zum Teil positive Effekte. Der Optimierungsbedarf ist allerdings noch groß, da die Einführung von Additiven bzw. modifizierten Massen eine genaue Einstellung der Prozessparameter im keramischen Betrieb mit sich bringt. Eine Weiterentwicklung und Anpassung von Massen und Additiven ist in der Praxis prinzipiell realisierbar. Zieht man zusätzlich die Ergebnisse aus den Additivtests (vgl. Kapitel 6) heran, scheinen die biotechnisch hergestellten Alginat gegenüber den Algen-Alginaten vorteilhafter zu sein. Dies kann in der unterschiedlichen Molekülstruktur der Algen- bzw. Bakterienalginat begründet sein (siehe auch Kapitel 3.3.2), müsste aber zur Klärung weiter untersucht werden. Bis zur entsprechenden großtechnischen Prozessreife ist allerdings ebenfalls noch Entwicklungs- und Optimierungsaufwand erforderlich. Weiterhin besteht zur Einführung der Alginat Konkurrenz durch etablierte Produkte der chemischen Industrie (siehe auch Diskussion in Kapitel 6.4).

### 7.3 Industriemaukversuch

Zur Untersuchung einer unter realen Prozessbedingungen in einem Sumpfhaus maukenden Masse konnte ein Ziegelhersteller für eine kleine Untersuchungsreihe gewonnen werden. Im Rahmen des Industriemaukversuchs wurde hierbei eine Dachziegel- (bzw. Klinker-) Masse frisch sowie nach ca. 4 Wochen Maukzeit im Sumpfhaus sowohl in der Produktion als auch mit dem keramtechnischen Labor-Charakterisierungsprogramm untersucht.

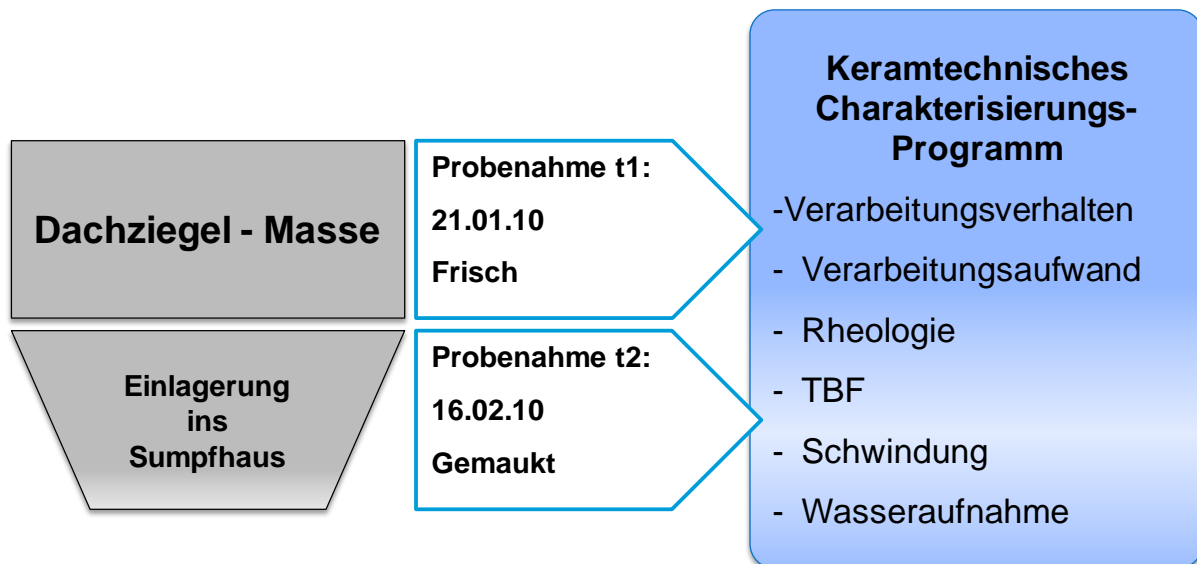


Abbildung 72: Ablaufschema Industriemaukversuch

Nach einer Lagerzeit von ca. 4 Wochen verringerte sich der Verarbeitungsaufwand geringfügig. Auch die Streubreite der gemessenen Radialdrücke reduzierte sich (siehe Abbildung 73).

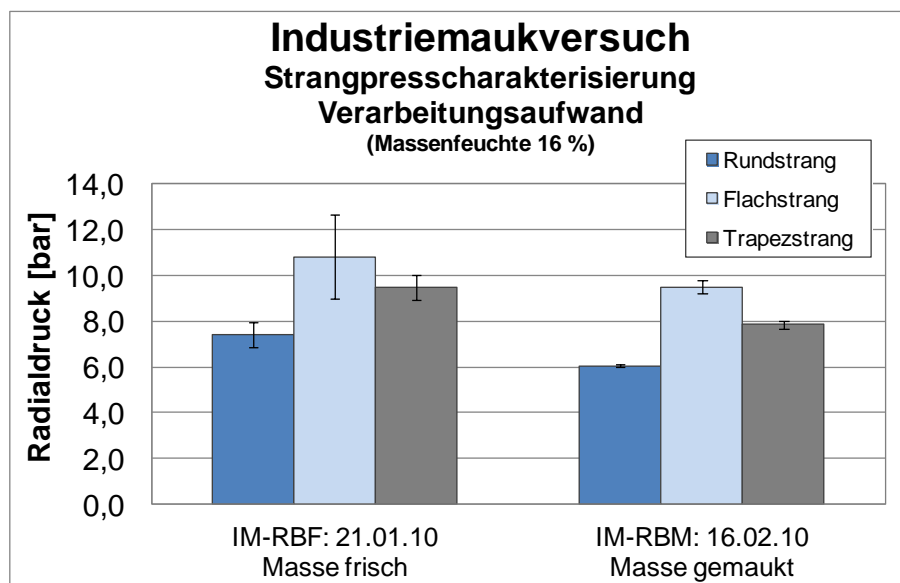


Abbildung 73: Industriemaukversuch – Verarbeitungsaufwand

Auf die Trockenbiegefestigkeit wirkte sich die Maukzeit in den Untersuchungen eher negativ aus (vgl. Abbildung 74).

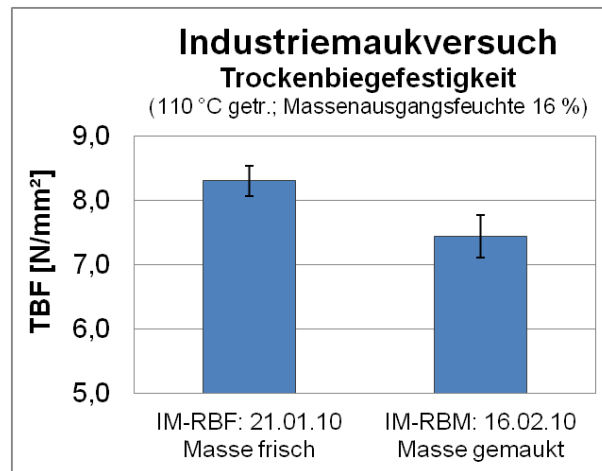


Abbildung 74: Industriemaukversuch - Trockenbiegefestigkeit

Bei den Schwindungsdaten konnte kein Unterschied zwischen frischer und gemaukter Masse festgestellt werden, jedoch erhöhte sich die Wasseraufnahme der Proben aus gelagerter Masse beträchtlich.

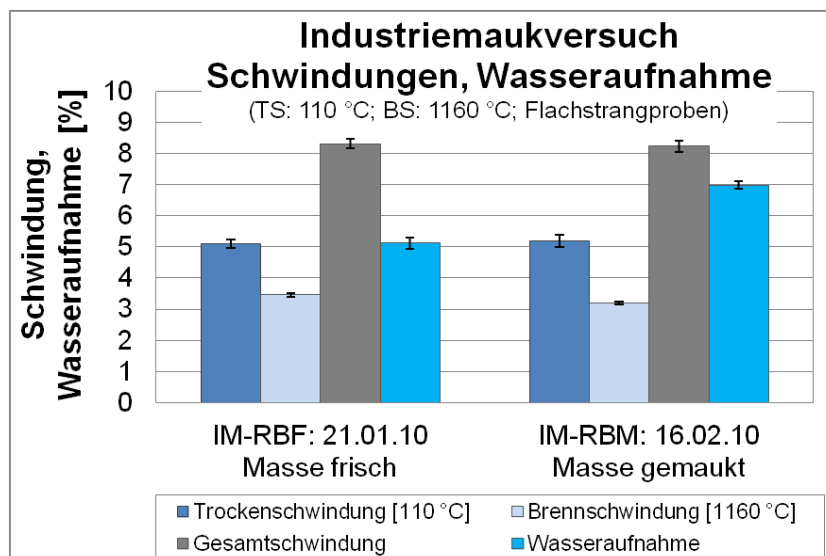


Abbildung 75: Schwindung, Wasseraufnahme der Industriemaukversuchsproben

Laut Aussage des Produktionsbetriebs war zwischen frischer und gemaukter Masse auf der Produktionslinie kein signifikanter Unterschied erkennbar. Beide Massen ließen sich gut verpressen und durchliefen unauffällig den Produktionsprozess.

Am Beispiel dieses Industriemaukversuchs wurde außerdem das etablierte molekularbiologische Analyseprogramm auf seine Einsatzfähigkeit für Rohstoffe mit hohem Tonmineralanteil erneut eingesetzt. Neben der Bestimmung der KbE wurden auch die verschiedenen Kultivierungsverfahren (DCS; Tonagar; R2A) vergleichsweise eingesetzt und die Proben molekularbiologisch analysiert. Zusätzlich wurde auch Gesamt-DNA direkt aus den Rohstoffen extrahiert.

Mit einer KbE von ca.  $8,6 \cdot 10^6$  zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $1,2 \cdot 10^7$  konnte bei den mikrobiologischen Untersuchungen kein signifikanter Anstieg der KbE detektiert werden.

Nach Kultivierungsschritten auf DCS, Tonagar und R2A-Agar konnten DNA-Produkte in ausreichender Menge und Qualität für weiterführende Arbeiten wie PCR-DGGE und Nukleotidsequenzierung aufbereitet werden. In der direkt aus den Massen extrahierten DNA konnten nur wenige DGGE-Banden Informationen für eine Charakterisierung der bakteriellen Populationen gefunden werden. Wie in den Maukversuchen zuvor waren bei der Kultivierung auf R2A-Agar die Bandenmuster zwar sehr deutlich herausgestellt, markante Unterschiede zwischen t0 und t28 wurden jedoch nicht festgestellt. Mit der DCS-Methode war es wiederum möglich eine sich verändernde Population bakterieller Vertreter in den Maukmassen zu detektieren.

Die Sequenzierung ausgewählter Banden aus diesen DCS Bandenmustern stellten zunächst überwiegend nicht kultivierbare Bakterien dar. Durch eine Erweiterung der Suchkriterien innerhalb der Datenbanken konnten den Sequenzen die nächsten wahrscheinlichen Vertreter zugeordnet werden (Tabelle 23).

**Tabelle 23: Übersicht der durch DCS kultivierten und identifizierten bakteriellen Vertreter zu t0 und t28**

erste Spezies	Übereinst
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	97%
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	93%
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	97%
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	97%
<i>Pseudomonas peli</i>	98%
<i>Massilia plicata</i>	93%
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	80%
<i>Variovorax paradoxus</i>	95%
<i>Nocardioides fulvus, flavus, luteus, albus</i>	99%
<i>Massilia plicata</i>	96%
<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	96%
<i>Massilia niabensis</i>	96%
<i>Curvibacter delicatus</i>	67%
<i>Massilia niabensis</i>	96%
<i>Massilia niabensis</i>	96%
<i>Variovorax paradoxus</i>	92%
<i>Duganella zoogloeoides</i>	97%
<i>Nitrobacteria novellus</i>	72%
<i>Massilia niabensis</i>	96%
<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	91%
<i>Caenimonas koreensis</i>	93%
<i>Aquamonas fontana</i>	76%
<i>Nocardioides fulvus, flavus, albus</i>	99%
<i>Rhizobium sllae</i>	99%

Bei vielen identifizierten Organismen handelte es sich wiederum um typische Bodenbakterien, die bereit zuvor auch in den Referenztonen W1 und W2 nachgewiesen wurden.

Es konnten deutliche Veränderungen in der Populationszusammensetzung nur mit der DCS Methode nachgewiesen werden. Molekularbiologische Analysen an direkt extrahierter DNA erweisen weniger aussagekräftig.



Weiterhin wurde eine Spaltplattenmasse auf Veränderungen durch einen Maukprozess untersucht. Die Referenz ist hierbei eine im Labor aus den Einzelkomponenten angesetzte Spaltplattenmasse, die mit Frisch-Masse aus direkt aus der Produktion verglichen wird. Die gemaukte Masse lagerte über ca. 6 Monate luftdicht verschlossen bei Raumtemperatur im Probeneimer.

Aus den Messkurven zum Verarbeitungsaufwand (Abbildung 76) und zur Strukturstabilität (Abbildung 77) geht kein signifikanter bzw. messbarer Unterschied zwischen der frischen und der ca. 6 Monate gemaukten Produktionsmasse hervor.

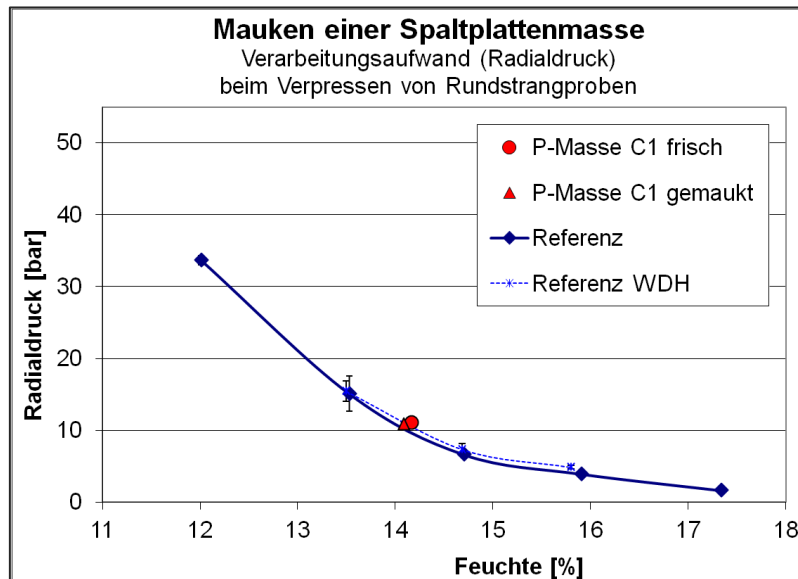


Abbildung 76: Mauken einer Spaltplattenmasse – Laboruntersuchungen zum Verarbeitungsaufwand

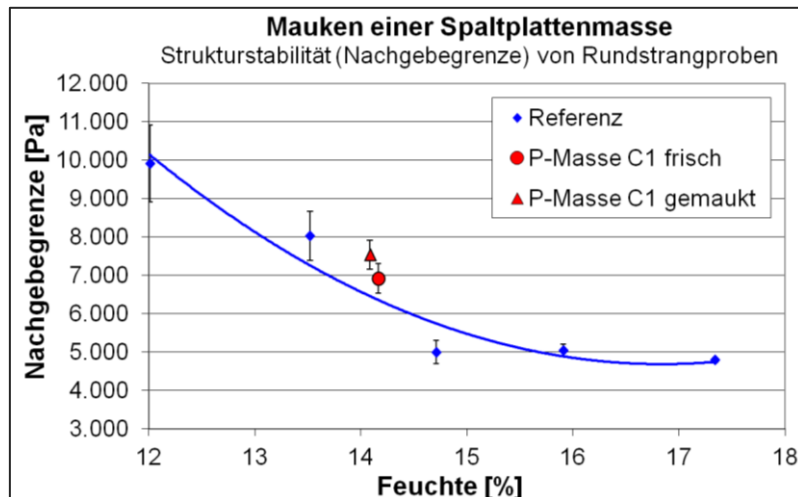


Abbildung 77: Mauken einer Spaltplattenmasse – Laboruntersuchungen zu rheologischen Eigenschaften

Die Verarbeitungseigenschaften waren jedoch bei der gereiften Spaltplattenmasse deutlich gleichmäßiger. Hier traten im Gegensatz zur Frischmasse keine Drachenzähne o. ä. auf. Auch war die Trockenbiegefestigkeit der gemaukten Masse höher (2,9 N/mm<sup>2</sup> zu 2,4 N/mm<sup>2</sup> der Frischmasse).

Fasst man die beiden kleinen, industrienahen Maukversuche mit einer Klinker- und einer Spaltplattenmasse zusammen, konnte abschließend kein zweifelsfrei belegbarer bzw. ausnahmslos positiver Effekt einer Tonalterung gemessen oder beobachtet werden. Wie bereits im Rahmen der Bewertung der Maukversuche an W1 und W2 vermutet, ist es denkbar, dass für ein Mauken eines Rohstoffs gewisse Voraussetzungen erfüllt sein müssen, damit eine Masse ihre Eigenschaften über einen Lagerzeitraum verbessert.

## **7.4 Diskussion der Ergebnisse aus der Pilotphase**

Es konnte bereits früh gezeigt werden, dass der Einsatz von biotechnologisch hergestellter Alginatlösung als Plastifizierer zu einer deutlichen Verbesserung der Verarbeitungseigenschaften von plastischen Tonmassen führt. Im Rahmen der Prozessentwicklung und Amplifikation wurde ein Verfahren etabliert, bei dem eine komplexe Lösung, bestehend aus Alginat, Biomasse und Mineralsalzkomponenten biotechnologisch hergestellt werden kann. Dieses Verfahren wurde erfolgreich bis in einem Maßstab von 100 Litern Produktionskapazität getestet. Ein Einsatz von biotechnisch hergestellten Alginaten als Plastifizierungsmittel erscheint somit grundsätzlich möglich.

Angaben zur Wirtschaftlichkeit der biotechnisch hergestellten Alginat sind derzeit noch nicht abschätzbar. Die anfallenden Kosten für Chemikalien sind mit ca. 2,80 Euro pro 100 Liter Alginatlösung sehr gering, wobei die Kosten für die Vorkultivierungen zu vernachlässigen sind. Unberücksichtigt sind die Kosten für die bereitgestellte Technik und das Personal, welche den Preis deutlich beeinflussen, aber abhängig von der jeweils verwendeten Anlage und deren Größe sind. In Anbetracht der großen Mengen an abgebauten Tonrohstoffen und des vergleichsweise geringen Rohstoffpreises ist ein wirtschaftlicher Einsatz des biotechnologischen Plastifizierers als Massenprodukt unwahrscheinlich. Denkbar wäre eher der spezifische Einsatz zur Veredelung von speziellen Produkten mit hohen technischen Anforderungen. Die Konkurrenz zu etablierten Produkten der chemischen Industrie ist allerdings groß.

Eine Aufbereitung und Verarbeitung der mit Alginaten versetzten Massen ließ sich sowohl im kleinen als auch im großen Pilotversuch prinzipiell problemlos durchführen. Die Alginat zeigten grundsätzlich auch im Großmaßstab positive Effekte. Zu einer besseren Beurteilung der Masseigenschaften im Produktionsbetrieb müsste allerdings eine genaue – damit auch rohstoff- bzw. versatzseitige – Anpassung der Massen auf die Produktionslinie durchgeführt werden, was im begrenzten Versuchsrahmen des Projekts nicht möglich war.

In Maukversuchen an Industrie-Massen, wie sie in einem Fliesen- und Klinkerwerk zur Produktion verwendet werden, konnte kein durchgehend positiver Effekt einer Tonreifung mittels des keramtechnischen Charakterisierungsprogramms belegt werden. Die Klinkermasse zeigte nach dem Mauken tendenziell einen niedrigeren Energiebedarf zum Verarbeiten und gleichmäßigere rheologische Eigenschaften,

allerdings verschlechterten sich die TBF-Werte sowie die Wasseraufnahme leicht. Sowohl die Frisch- als auch die gemaukte Masse ließen sich dabei sehr gut und fehlerfrei verarbeiten. Die Fliesenmasse wies keine messbaren Unterschiede im Bezug auf Verarbeitungsaufwand und Rheologie auf, jedoch konnte hier eine Verbesserung der Verarbeitungseigenschaften bzgl. Pressfehler erzielt werden.

Bei der Frage nach der Notwendigkeit des Maukens muss man außerdem berücksichtigen, dass sich die Aufbereitungstechnologie in den letzten Jahrzehnten stark gewandelt und verbessert hat. Einige Betriebe setzen bereits Gegenstrom-Intensivmischer zur Masseherstellung ein. Die Massen werden direkt im Anschluss an den Mischprozess mit doch eher positiven Erfahrungen verarbeitet. Oftmals erfüllt ein Maukhaus oder Maukturm in erster Linie den Zweck der Lagerhaltung sowie der Homogenisierung verschiedener Einzelkomponenten durch gezieltes Einlagern und Ausbringen der Massen.

## **8 Bewertungsschema Rohstoffe „Plastifizierung“**

Zur Rohstoffcharakterisierung muss grundsätzlich zwischen den intrinsischen (mineralogisch-chemisch-physikalischen-mikrobiologischen) Rohstoffmerkmalen und denjenigen Merkmalen unterschieden werden, die die Verarbeitungseigenschaften der Rohstoffe oder die Eigenschaften der Endprodukte repräsentieren. Dies ist von Bedeutung, da bei den Merkmalen für die Verarbeitungseigenschaften und für die Endprodukte eine Überlappung von Rohstoff- und Prozessmerkmalen stattfindet, aus denen selten direkte Ursachen für Änderungen im Verfahrensablauf und bei den Produkten ableitbar sind. Beispiele hierfür sind die Messung der Trockenbiegefestigkeit (Messwert resultiert aus den Rohstoffeigenschaften und dem Formgebungsprozess) und der Brennfarbe (Messwert resultiert aus dem Gehalt farbgebender Rohstoffkomponenten und den Brennbedingungen, nämlich der maximalen Temperatur, der Zeit der maximalen Temperatureinwirkung und der reduzierenden, der neutralen oder der oxidierenden Ofenatmosphäre).

Abbildung 78 zeigt sehr detailliert die wesentlichen Charakterisierungsmöglichkeiten keramischer Tone. Auf der rechten Seite werden die mineralogisch-chemisch-physikalischen Verfahren einerseits und die mikrobiologischen Verfahren andererseits dargestellt. Auf der linken Seite sind die wesentlichen Basismerkmale zur Charakterisierung der Verarbeitungs- und Produkteigenschaften aufgeführt.

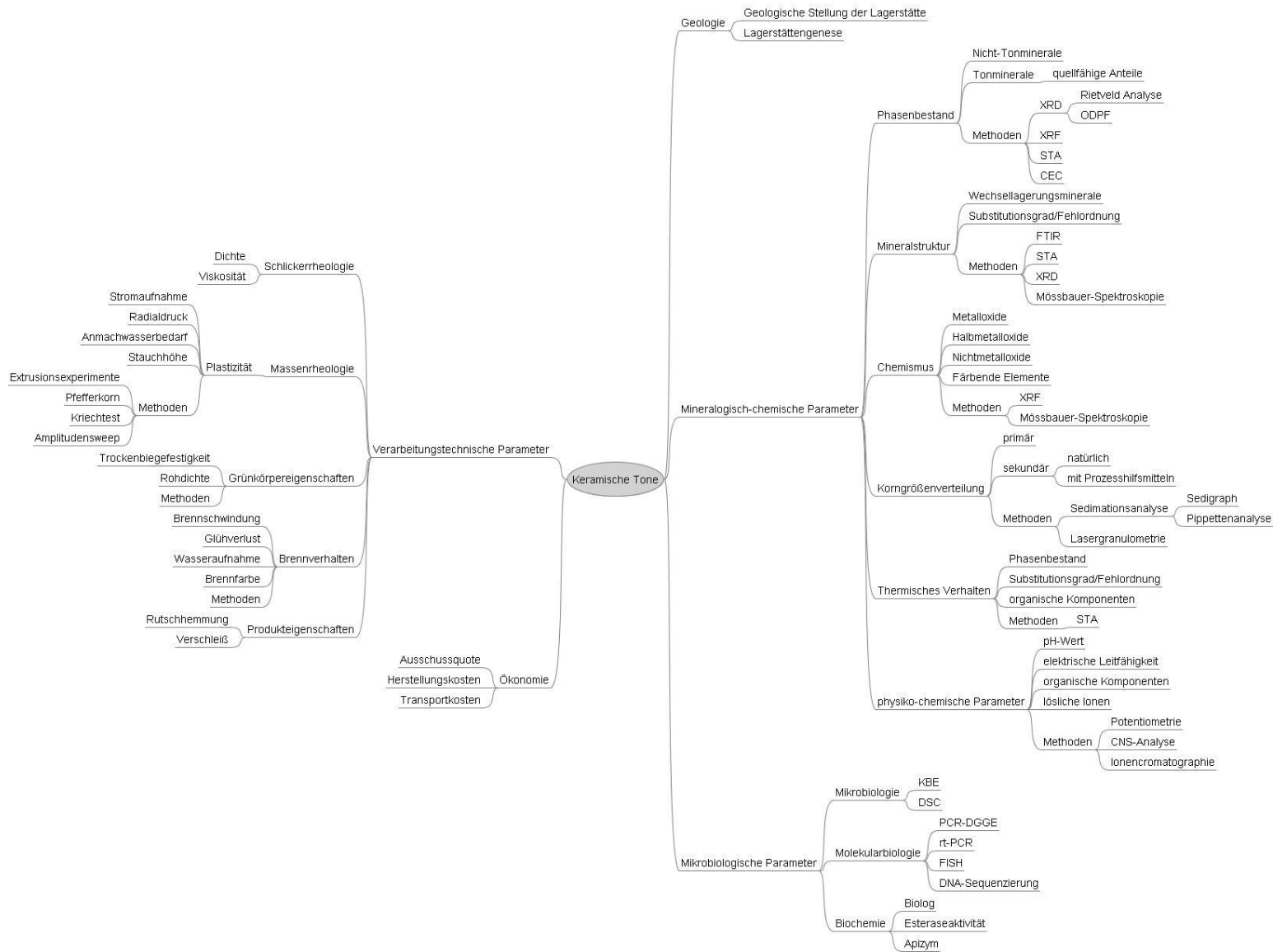


Abbildung 78: Bewertungsschema Rohstoffe – Charakterisierungsmöglichkeiten und beschreibende Parameter keramischer Tonrohstoffe

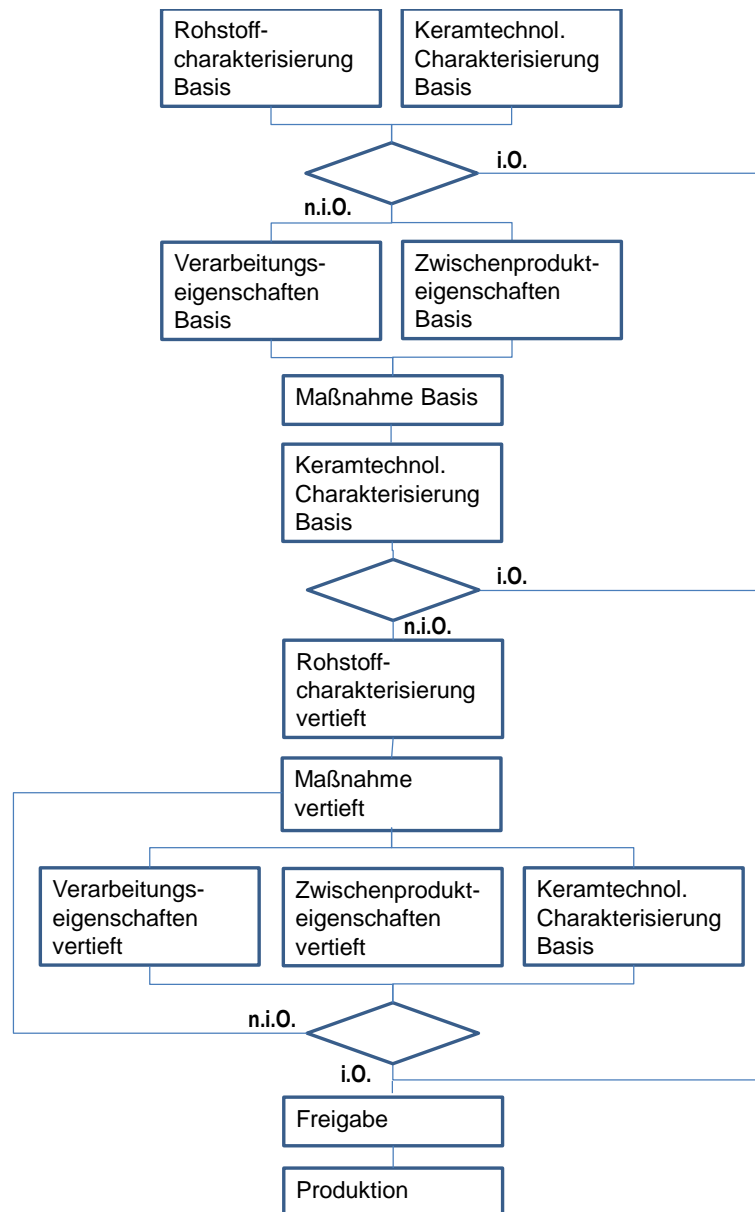
In der Praxis ist jedoch die komplette Abarbeitung aller Merkmale zur Charakterisierung der keramischen Rohstoffe wirtschaftlich nicht sinnvoll. Aus den positiven Erfahrungen der Praxis kombiniert mit den Erkenntnissen des vorliegenden Projektes wurde ein Schema zur Rohstoffbewertung entwickelt, welches modular aufgebaut und anlässlich der Sitzung des Fachausschusses Rohstoffe der Deutschen Keramischen Gesellschaft am 22.09.11 Vertretern der deutschen Rohstoff- und Keramikindustrie vorgestellt und zwischenzeitlich bereits weiterentwickelt wurde (Abbildung 79). In dieses sollen von den Fachausschussvertretern noch weitere Praxiserfahrungen einfließen.

Von vorrangiger Bedeutung ist die exakte Bestimmung der wichtigsten intrinsischen Rohstoffeigenschaften. Diese werden in den Betriebslabors mit der Bestimmung der chemischen Zusammensetzung (Hauptelemente) und der Bestimmung der Korngrößenverteilung ermittelt und stellen einen Teil der **Rohstoffbasischarakterisierung** dar. Ebenfalls zur Basischarakterisierung werden in den Betrieben keramtechnologische Merkmale wie die Bestimmung der Schwindungswerte, der Trockenbiegefestigkeit, der Wasseraufnahme und der Brennfarbe herangezogen, mit denen Zwischen- und Endprodukte beschrieben werden.

In Abhängigkeit des Verfahrens für die nachfolgende Keramikproduktion (plastische oder Gießformgebung) können Messungen zu den Verarbeitungseigenschaften ergänzend zur Bestimmung der Rohstoffmerkmale durchgeführt werden, um die Eignung der Rohstoffe sicherzustellen. I.d.R. kommen noch die klassischen Verfahren wie „Pfefferkorn“ für die Bewertung plastischer Massen oder die „Viskosimeter“ nach „Lehmann“ und „Gallenkamp“ zum Einsatz, die jedoch mittelfristig durch präzisere Verfahren abgelöst werden sollten (s.a. vertiefende Untersuchungen). An dieser Stelle kann, z.B. durch die Variation des Wassergehaltes und/oder der Zugabe organischer oder anorganischer Prozessadditive (Maßnahme Basis gemäß Abbildung 79), die Verarbeitbarkeit der Rohstoffe sichergestellt werden.

Sollten die Verarbeitungseigenschaften jedoch auch nach den Basismaßnahmen nicht den Anforderungen entsprechen, erfolgt zunächst eine Sperrung der Rohstoffe. In Abstimmung mit dem Lieferanten wird gemäß den Regelungen der Qualitätssicherungsvereinbarung über eine Rückweisung oder über eine Sonderfreigabe entschieden.

Zudem sind zunächst vertiefende Rohstoffuntersuchungen erforderlich, um eine Klärung der Abweichungen herbeizuführen. Die **vertiefende Rohstoffcharakterisierung** umfasst die Bestimmung der Mineralphasen in den verschiedenen Kornfraktionen. Daneben sind lösliche Salze und mikrobiologische Parameter bestimmend für ein zu erwartendes bzw. zu steuerndes rheologisches Verhalten.



**Abbildung 79: Schema zur Bewertung der Material- und Verarbeitungseigenschaften toniger Rohstoffe für die keramische Industrie**

Die Bedeutung **vertiefender Rohstoffcharakterisierungen** wurde durch das vorliegende Projekt par excellence herausgearbeitet.

An erster Stelle ist die Fraktionierung der Tone zu nennen. Diese ist zwar schon für die klassische Tonmineralanalytik gängige Praxis (Abtrennung der Tonfraktion < 2 µm), lässt aber weitergehende Bewertungen zu, wenn man insbesondere die Mittel- und Feintonfraktionen abtrennt und diese gesondert mineralogisch untersucht. Dreischicht- und Wechsellagerungsminerale, die in der Gesamtfraktion nicht identifizierbar sind, sind auf diese Weise detektierbar und lassen Rückschlüsse auf unterschiedliche Verarbeitungseigenschaften zu, die aus den Basisuntersuchungen nicht ableitbar gewesen wären. Zur Charakterisierung von Wechsellagerungsmineralen und deren spezifischen Tonmineraleigenschaften wurde

erfolgreich eine Methodenvielfalt angewandt, bestehend aus Röntgendiffraktometrie RBA, Kationenaustauschkapazität KAK, Simultanthermoanalyse STA).

Analog verhält es sich mit der zusätzlichen Analyse der sog. „Löslichen Salze“. Problematisch ist die Tatsache, dass bestimmte Elemente in niedrigen Konzentrationen (insbesondere Konzentrationsunterschiede) in den chemischen Basisuntersuchungen nicht erkennbar sind. Unter dem Begriff „Lösliche Salze“ subsummiert man gelöste Kationen (i. W.  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) und Anionen (i. W.  $SO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$ ). Diese Ionen können in Summe in einer Größenordnung von mehreren X00 ppm auftreten und damit insbesondere die rheologischen Eigenschaften in keramischen Gießmassen massiv verändern, ohne dass die Einflussgrößen schon im Detail verstanden werden.

Beeinflusst werden die anorganischen „Löslichen Salze“ auch durch mikrobielle Stoffwechselaktivitäten. Für die Nutzung von Ionen und löslichen Salzen sowohl als Quelle lebenswichtiger Elemente als auch als Elektronenakzeptoren bzw. Elektronendonatoren ist das umgebende Milieu für Mikroorganismen von großer Bedeutung. Zudem können extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) wie z.B. Polysaccharide, Nukleinsäuren und Proteine von den Mikroorganismen gezielt ausgeschieden werden. Diese beeinflussen die Verarbeitbarkeit von Rohstoffen zusätzlich. Biochemische Stoffwechselprozesse sind zunächst in Abhängigkeit von der spezifischen Stoffwechselaktivität mikrobieller Populationen, der Temperatur, dem Wassergehalt der Rohstoffe und der Dauer der Inkubation zu betrachten. Von daher ist der Einfluss mikrobieller Aktivitäten bei frisch (< ca. 5 Tage) aufbereiteten und verarbeiteten Massen niedrigen Wassergehaltes (<15 %) als gering anzusehen. Analysen enzymatischer Gesamtstoffwechselleistungen (Summenparameter) können hier die Aktivitätssteigerungen und damit zu erwartende Veränderungen in der chemisch-physikalischen sowie biochemischen Charakteristik aufbereiteter Rohmassen in Schnelltests beschreiben und Anhaltspunkte für eine sich nachhaltig verändernde (adaptierte) Biozönose liefern. Für eine Analyse der autochthonen, also der in den Rohstoffen natürlich vorkommenden, mikrobiellen Populationen mittels molekularbiologischer Arbeitsmethoden (PCR-DGGE; DNA-Sequenzierung und Identifikation) fehlt es bis heute an einer breiten Datenbasis zur sicheren Identifikation nicht kultivierbarer Bodenbakterien. Dennoch lassen sich mit einem erweiterten Arbeitsprogramm einzelne Spezies näher charakterisieren.

In Produktionsschlickern mit einem hohen Wassergehalt können jedoch mikrobielle Adaptationsprozesse weitaus schneller ablaufen. Hierzu lassen sich biochemische und gezielt auch molekularbiologische Methoden anwenden, die potenzielle, genetisch codierte, Stoffwechselprozesse detektieren können. Sie liefern wichtige Hinweise auf Mikroorganismen, die mit ihren spezifischen Stoffwechselwegen die Schlicker nachhaltig verändern können. Insbesondere in kontinuierlich betriebenen Aufbereitungs- und Produktionsprozessen mit wässrigen Schlickern kann eine sich manifestierende mikrobielle Population von großer Bedeutung für die Qualität der Endprodukte sein. Gerade hier können dominant vertretene Spezies detektiert und gezielt inhibiert werden.



Bei längerer Lagerungsdauer (> 6 Tage) können in Rohmassen mit niedrigen Wassergehalten intrinsische, mikrobielle Prozesse verstärkt stattfinden (Mauken), und die Qualität und Verarbeitbarkeit von z.B. Roh- und Fertigmassen oder Produktrohlingen, nachhaltig beeinflussen. Regelmäßige Messungen enzymatischer Gesamtaktivitäten können auch hier Informationen für eine verbesserte zeitliche Koordination der Rohstoffverarbeitung liefern. Mit dem entwickelten DCS steht zudem ein Kultivierungssystem zur Verfügung, das das Ausbilden spezifischer Zusammensetzungen der bakteriellen Populationen in Tonrohstoffen detektieren kann. Durch Identifikation dominant vorkommender, aktiver Organismen bzw. bedeutender Stoffwechselaktivitäten können diese mit geeigneten Methoden gezielt gefördert oder inhibiert werden. Prozessschlicker, die z.B. in der industriellen Produktion lange vorgehalten werden müssen, unterliegen einer sich relativ schnell entwickelnden mikrobiellen Biozönose. Auch in diesen Anwendungsprozessen sind sich entwickelnde mikrobielle Populationen für chemisch-physikalische und verarbeitungstechnische Veränderungen bei der Produktverarbeitung verantwortlich. Kenntnisse über die biochemischen und mikrobiellen Aktivitäten können eine optimierte Rohstoffnutzung und Prozesssteuerung z.B. in der Produktion von Fertigmassen bzw. Keramikprodukten unterstützen.

Der Erfolg der ergriffenen Maßnahmen wird durch die Charakterisierungsmethoden „**Vertiefende Verarbeitungseigenschaften**“ überprüft. Diese sind für plastische Massen Rheometer und instrumentierte Extruder, für Gießmassen ebenfalls Rheometer.

Die Plastizitätsmessung erfolgt noch weitverbreitet nach dem „Pfefferkorn“-Verfahren, wie schon zuvor bei den Basisverarbeitungseigenschaften erläutert. Rohstoffmischungen werden unter Zugabe von Wasser (ca. 14-18 Masse-%) plastifiziert. Diese verarbeitbare Masse wird in eine zylindrische Form von ca. 50 mm Höhe gebracht, auf die ein Fallgewicht aus einer definierten Höhe aufschlägt. Die Höhenreduzierung des Prüfkörpers gegenüber dem Ausgangszustand wird als Maß für die Verarbeitbarkeit herangezogen. Allerdings zeigt sich, dass dieses Verfahren durch die Art der schlecht reproduzierbaren Prüfkörperherstellung bereits Schwankungsbreiten in den Messwerten erzeugt, die größer sind als die Schwankungen zwischen Rohstoffen selbst. Des Weiteren besteht ein Problem, dass geringfügige Zugaben organischer und anorganischer Plastifizierungshilfsmittel zwar in der Praxis Auswirkungen zeigen, durch das Messverfahren aber nicht erkannt werden. Damit waren auch die mikrobiologisch induzierten Unterschiede in den Massen nicht detektierbar.

Im Rahmen des Projektes wurde ein instrumentierter Extruder eingesetzt. Druck- und Temperatursensoren am Mundstück zeigten, in Kombination mit der Stromaufnahme, sensible Änderungen der Verarbeitungseigenschaften an. Auf diese Weise konnten sowohl an mikrobiologisch veränderten als auch mit organischen Additiven in geringen Anteilen (< 1 Masse-%) versetzten Massen die Wirksamkeiten gemessen werden. Das Verfahren zeigte seine Eignung bereits während des Vorhabens zur

Charakterisierung plastischer Massen auch anderer Rohstoffzusammensetzungen aus Produktionsprozessen der keramischen Industrie.

Ebenfalls bewährte sich im Rahmen der vertiefenden Untersuchungen der Einsatz eines Rheometers. An Prüfkörpern, die reproduzierbar im Extruder erzeugt wurden und damit auch die Repräsentativität für den industriellen Produktionsprozess sicherstellen, konnte über die Messung der sog. „Nachgebrenze“ das Maß der Strukturstabilität festgestellt werden.

Um die gewünschten Verarbeitungseigenschaften und Produkteigenschaften zu erzielen können nun vertiefende Maßnahmen entsprechend der Struktur-Funktionalitäts-Beziehung der bestimmten Rohstoffeigenschaften ergriffen werden. Mit den Ergebnissen des „BIOTON“-Projektes haben wir dazu einen Beitrag leisten können (z.B. Identifikation des Einflusses der Reichweite von Wechsellagerungsmineralen). Aufgrund der komplexen heterogenen Zusammensetzung von keramischen Rohstoffen sind die Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten jedoch noch nicht vollständig verstanden. Dadurch definiert sich weiterer Forschungsbedarf, der durch die im November 2011 zwischen KIT/CMM und FGK gegründete „Allianz Rohstoffforschung TON ART“ strukturiert sowie über die wissenschaftlichen Fachgremien und die Industrie bearbeitet werden wird.

## 9 Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektstrangs Plastifizierung wurde den Aufgabenstellungen nachgegangen, welche Mechanismen der Plastizität von tonmineralischen Rohstoffen zugrunde liegen, inwiefern und wodurch die Plastizität beim Mauken bzw. beim Reifungsprozess beeinflusst wird, welche Wirkung Mikroorganismen auf die Eigenschaften von Tonrohstoffen haben und schließlich ob bzw. wie mikrobiologische Reaktionen gezielt nutzbar gemacht werden können.

Dazu wurde von den beteiligten Forschungseinrichtungen aus den Fachgebieten Mineralogie, Mikrobiologie, Biotechnologie und Keramik zusammen mit dem Industriepartner aus der Rohstoffindustrie ein interdisziplinäres, umfassendes Charakterisierungsprogramm entwickelt und zusammengestellt. Dieses Charakterisierungsprogramm erlaubt es nun, tonmineralische Rohstoffe intensiv zu analysieren und setzt neue Maßstäbe bei Qualitätskontrolle und Bewertung von Rohstoffen.

Im Projekt weiterentwickelte mineralogische Analysen haben zum Beispiel gezeigt, dass insbesondere die Mineralphasen der Feinstfraktionen von ca.  $< 1 \mu\text{m}$  und feiner für Prozesseigenschaften in der keramischen Fertigung (z.B. plastische Formgebung, Druckgussproduktion) relevant sind. Der Anteil quellfähiger bzw. nicht quellfähiger Mineralphasen, Wechsellagerungsminerale und freier Smectite lässt Rückschlüsse auf die Plastizität zu.

Tonmineralische Rohstoffe stellen aufgrund Ihrer speziellen Eigenschaften (u.a. Ladung der Mineralpartikel, Quellfähigkeit, Lebensbedingungen für Mikroorganismen) besondere Anforderungen an eine mikrobiologische Charakterisierung. Auch hier wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit eine Vielzahl an mikro- und molekularbiologischen Methoden weiterentwickelt, an die tonmineralischen Rohstoffe adaptiert und schließlich ein für Tone geeigneter Werkzeugkasten zusammengestellt.

Mit Hilfe des erarbeiteten keramtechnischen Untersuchungsprogramms können nun weiterhin Tonrohstoffe und –Massen bezüglich ihrer Verarbeitungseigenschaften umfassender als bislang möglich charakterisiert und bewertet werden.

Im Bewertungsschema Rohstoffe wurden die Erkenntnisse der interdisziplinären Analysen zusammengefasst. Es kann nun für Rohstoffindustrie und Keramikbetriebe als Leitfaden herangezogen werden, welche Untersuchungen für Standardanwendungen sowie bei speziellen Fragestellungen (z.B. im Hinblick auf Anforderungen an das Material für Produktionsprozesse) sinnvoll sind.

Die Frage, ob das Mauken ein überwiegend von mikrobiellen Stoffwechselprozessen und/oder durch Wasserhomogenisierung sowie physikalisch-chemische Veränderungen beeinflusster Tonreifungsprozess ist, konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Während der Projektlaufzeit wurde keine Methode gefunden, um Tonmaterial zu sterilisieren bzw. steril aufzubereiten und dabei die Mineralstruktur unbeeinflusst zu lassen. Somit konnten mikrobielle, physikalische und/ oder chemische Einflüsse auf Tonminerale während der Alterung nicht vollständig getrennt

untersucht werden. Generell waren insbesondere bezüglich Art und Anzahl mikrobieller Populationen durchaus Veränderungen im Laufe der Maukzeit detektierbar. Ob diese jedoch positive oder negative Auswirkungen auf die Plastizität haben, konnte mit den zur Verfügung stehenden keramtechnischen Methoden nicht herausgearbeitet werden. Weiterhin waren in Wiederholungsversuchen zum Mauken die Ergebnisse der mikrobiologischen und keramtechnischen Untersuchungen nicht reproduzierbar. Bei den mineralogischen Untersuchungen konnte keine signifikante Veränderung der Tonrohstoffe in Abhängigkeit der Maukdauer festgestellt werden. Es wird jedoch basierend auf den Ergebnissen vermutet, dass beim Mauken eine große Vielzahl an Parametern Einfluss nimmt und dass der Tonrohstoff bestimmte Voraussetzungen erfüllen muss, um „maukfähig“ zu sein. Auch in Industriemaukversuchen mit realen Produktionsmassen konnte ein positiver Effekt auf die Prozesseigenschaften durch das Reifenlassen mit den vorhandenen Analysemöglichkeiten nicht als signifikant aufgelöst werden.

Ein direktes Beimpfen von Tonmassen mit EPS-bildenden Mikroorganismen, die potentiell eine verbessernde Wirkung auf die Plastizität der behandelten Massen zeigen sollten, zeigte keinen Erfolg.

Es konnte jedoch im Rahmen der Additivversuche belegt werden, dass mikrobielle Stoffwechselprodukte und extrazelluläre polymere Substanzen Rheologie und Plastizität sowie auch Prozesseigenschaften von Tonmassen beeinflussen. Aus einer Vielzahl getesteter Substanzen wurde Alginat als biotechnisch leicht herstellbares, plastifizierend wirkendes Additiv für die Forschungsrouten „direkte Plastifizierung von Tonmassen mit mikrobiellen Produkten“ ausgewählt. Im Forschungsreaktor wurde mit geeigneten Bakterienkulturen biotechnisch Alginat produziert und das Verfahren bis hin zur Pilotreife entwickelt.

In Pilotversuchen konnten Wirksamkeit und positive Effekte von mikrobiellem Alginat auf die Verarbeitungseigenschaften von Tonmassen bestätigt werden. Für eine industrielle Umsetzung besteht allerdings noch Optimierungsbedarf, der im Rahmen der Projektlaufzeit nicht mehr bearbeitet werden konnte.

## 10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht zum Bioton-Projektstrang Plastifizierung.....	6
Abbildung 2: Produktionsablauf Grubenton .....	9
Abbildung 3: Produktionsablauf Sprühgranulat Aufbereitungsanlage KBL .....	10
Abbildung 4: Produktionsablauf Aufbereitungsanlage Fertigmassenherstellung .....	11
Abbildung 5: Korngrößenverteilung (Lasergranulometrie; Probe dispergiert in 0,1 %-iger Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> -Lösung) von W1 (blaue Kurve) und W2 (rote Kurve) .....	14
Abbildung 6: Fließschema der analytischen Methoden zur mineralogischen Charakterisierung der keramischen Tone .....	19
Abbildung 7: PA-Kurven zur Abschätzung des strukturellen Fehl Ordnungsgrades des Kaolinitis. Fette Linien: PA-Kurven eines geordneten und eines fehlgeordneten Kaolinitis als Vergleichsproben nach Symkatz-Kloss (1974). LA540: Vergleichsprobe aus dem Bioton-Projekt (Projektteil Metallspeziessolubilisierung) .....	25
Abbildung 8: Qualitatives Delaminationsmodell zur Veranschaulichung der Verarbeitungseigenschaften keramischer Tone: Beziehung zwischen Struktur und Ordnungsprinzip von 2:1 Schichtsilikaten und Delaminationsverhalten. F: externe Kraft.....	28
Abbildung 9: Schema der Bindung der DNA durch Kationenbrücken und organische Moleküle an Tonminerale (Blume et al. 2002).....	31
Abbildung 10: Fließschema zur molekularbiologischen DNA-Analytik der Tone W1 und W2 .....	31
Abbildung 11: Vergleich aller Extraktionskits hinsichtlich Gesamt-DNA-Ausbeute und Reinheit mittels Quotienten der OD260/280 und OD260/230.....	34
Abbildung 12: DGGE der Proben der DNA- Extraktionsmethoden und Variationen; Gradient 40%-70%; unterschiedliche Banden sind nummeriert.....	38
Abbildung 13: Basischarakterisierung DGGE der PCR-Produkte der Kulturen; SA: Sabouraud Agar, Cet: Cetrimid Agar, TA: Tonagar, O2: aerob, anae: anaerob .....	40
Abbildung 14: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse aller kultivierten und bestimmten Spezies auf Basis der 16S rDNA unter Berücksichtigung nah verwandter Typstämme.....	41
Abbildung 15: DGGE der Gesamt-DNA von W1 (links) und W2 (rechts).....	43
Abbildung 16: Übersicht der kerametechnischen Charakterisierungsmethoden (Standard und Bioton; grau hinterlegt: Standardmethoden, die aber nicht bei allen Rohstoff- bzw. Masseproduzenten eingesetzt werden).....	46
Abbildung 17: Der VAR 50A/50 Laborextruder im Einsatz .....	48
Abbildung 18: Beispiele für Pressfehler (Ausschnitt aus dem Fehlerkatalog): Oben von links nach rechts: Drachenzähne (leicht und stark), Laminierungen und Schuppen in der Oberfläche, unten links: Instabilität und Rissbildung, unten rechts: Blasen im Strang .....	48

Abbildung 19: Auszug aus Bewertungsbogen, Beispiel Flachstrang, zur semiquantitativen, möglichst objektiven Beurteilung der Verarbeitungseigenschaften .....	49
Abbildung 20: Plastizitätsprüfer M-1192 .....	49
Abbildung 21: Verschiedene, eingesetzte Platte–Platte Messsysteme; AP MCR 300 Rheometer .....	50
Abbildung 22: Probenvorbereitung für die rheologische Messung; Für die Messungen mit PP12 werden aus den präparierten Scheiben nochmals kleinere Proben im passenden Durchmesser ausgestanzt.....	51
Abbildung 23: Rheologische Modelle für viskoelastische Substanzen.....	52
Abbildung 24: Der Verlauf des Kriechversuches nach dem Burgers-Modell.....	53
Abbildung 25: Zwei-Platten-Modell für Oszillationsversuche.....	55
Abbildung 26: Der Phasenverlauf der $\gamma$ -Kurve und der $\tau$ -Kurve.....	56
Abbildung 27: $G'(\tau)$ und $G''(\tau)$ mit Nachgebegrenze $\tau_y$ und Fließgrenze $\tau_f$ aus der Modellbeschreibung (links) und entsprechende Messkurven einer keramischen Masse (rechts, $\gamma = 0,01 - 1 \%$ , $FN = 5 \text{ N}$ ; Messung von vier Proben, die aus dem extrudierten Flachstrang einer Masse präpariert wurden).....	57
Abbildung 28: Beispiel für Frostproben zur Visualisierung von Texturen.....	58
Abbildung 29: Übersicht zu Substanzen, die auf ihre Wirkung in Schlickern und/ oder plastischen Massen getestet wurden .....	60
Abbildung 30: Viskosität (bei Scherrate $50\text{s}^{-1}$ ) von Schlickern aus W1 bzw. W2, mit ausgewählten Additiven versetzt .....	60
Abbildung 31: Versuchsschema der Basistests zum Einfluss von mikrobiellen Stoffwechselprodukten auf anwendungstechnische Eigenschaften von Tonrohstoffen .....	62
Abbildung 32: Effekte von verschiedenen Additiven auf den Verarbeitungsaufwand beim Verpressen plastischer Massen (Beispiel Rundstrang) .....	63
Abbildung 33: Rheologische Charakterisierung an Flachstrangproben, Strukturstärke aus Amplitudensweep .....	64
Abbildung 34: TBF einer Auswahl von mit verschiedenen Additiven versetzten Massen.....	64
Abbildung 35: Beispiel für Auswertung von ersten Additivtests in plastischen Massen im Rahmen der Laborphase Basisforschung .....	65
Abbildung 36: Aufbereitung und Herstellung der Proben für den Maukversuch I .....	67
Abbildung 37: Übersicht zum Charakterisierungsprogramm im Maukversuch I.....	67
Abbildung 38: Aufbau des Dynamischen Kultivierungssystems DCS .....	69
Abbildung 39: Bewertung der Stoffumsätze im Biolog.....	70
Abbildung 40: KbE (R2A; $20^\circ\text{C}$ ; 8d) im Verlauf des Maukversuchs .....	72
Abbildung 41: AWCD ermittelt aus den ApiZym Einzelwerten im Verlauf des Maukversuchs .....	73
Abbildung 42: Spezifischer Substratumsatz der Esterasen [%SU/h] von W1 und W2 während des Maukversuchs .....	74
Abbildung 43: AWCD Biolog GN2 und Eco Plates im Verlauf des Maukversuchs .....	75

Abbildung 44: W1 DGGE der Gesamt-DNA im Verlauf des Maukversuchs; Gradient 70 % - 40 %; 27f/517R .....	76
Abbildung 45: W2 DGGE der Gesamt-DNA im Verlauf des Maukversuchs; Gradient 70 % - 40 %; 27f/517R .....	77
Abbildung 46: DGGE W1 jeweils t1 und t83 A) Soil Microbe DNA Kit (ZymoResearch) B) Phenol Chloroform Extraktion C) DNA Extraktion nach Inkubation auf R2A D) DNA Extraktion nach Inkubation auf Tonagar E) DNA Extraktion nach Inkubation auf DCS .....	79
Abbildung 47: DGGE der auf DCS angezüchteten Kulturen von W1 im Verlauf des Maukversuchs .....	81
Abbildung 48: Ähnlichkeitsprofil als Dendrogramm aus den DGGE Spuren (Abbildung 47) basierend auf 74 Banden der 16S rDNA aus den Kulturen des DCS im Verlauf des Maukversuchs (t1-t81).....	82
Abbildung 49: Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse der auf DCS kultivierten Spezies auf Basis der mittels DGGE separierten 16S rDNA unter Berücksichtigung nah verwandter Typstämme.....	83
Abbildung 50: Verarbeitungsaufwand in Abhängigkeit der Maukdauer.....	86
Abbildung 51: Trockenbiegefestigkeit der Projektione in Abhängigkeit der Maukdauer .....	87
Abbildung 52: Sulfat-Löslichkeit über die Maukdauer bei W1 und W2.....	88
Abbildung 53: Ablaufschema des Versuchs zur Beimpfung von Tonmassen mit alginatbildenden Mikroorganismen.....	91
Abbildung 54: Messergebnisse über die Versuchslaufzeit bei Ansatz 3 beim Versuch zur Beimpfung von plastischen Tonmassen mit Mikroorganismen .....	93
Abbildung 55: Messergebnisse über die Versuchslaufzeit bei Ansatz 4 beim Versuch zur Beimpfung von plastischen Tonmassen mit Mikroorganismen .....	94
Abbildung 56: Alginatbakterienversuch – Plastizität nach Pfefferkorn und Feuchte in Abhängigkeit der Lagerdauer; Bak: mit Bakterienkultur versetzt; Bak+NL: mit Bakterien und Nährlösung versetzt .....	95
Abbildung 57: Strangpresscharakterisierung (Stromaufnahme, Radialdruck) der Massenansätze am Beispiel der Flachstrangproben .....	96
Abbildung 58: Trockenbiegefestigkeit der Proben aus dem Alginatbakterienversuch .....	97
Abbildung 59: Verarbeitungsaufwand - Übersicht einer Ergebnisauswahl aus Additivversuchen mit verschiedenen Alginatchargen; wenn nicht anders angegeben liegt die Massenfeuchte bei ca. 17 % .....	103
Abbildung 60: Trockenbiegefestigkeit - Übersicht einer Ergebnisauswahl aus Additivversuchen mit verschiedenen Alginatchargen; wenn nicht anders angegeben liegt die Massenfeuchte bei ca. 17 % .....	104
Abbildung 61: Verarbeitungsaufwand einer Original-Produktionsmasse .....	105
Abbildung 62: Bewertung der Verarbeitungseigenschaften einer Original-Produktionsmasse...	105
Abbildung 63: Ablaufplan der beiden Pilotversuche .....	107
Abbildung 64: Massenherstellung und Verarbeitung im „Kleinen Pilotversuch“.....	108

Abbildung 65: Bewertung der Verarbeitungseigenschaften der Massen im „Kleinen Pilotversuch“ .....	109
Abbildung 66: Kleiner Pilotversuch - Ergebnisübersicht .....	110
Abbildung 67: Ablaufschema „Großer Pilotversuch“ .....	111
Abbildung 68: Pressverhalten der drei Versuchsmassen im „Großen Pilotversuch“ .....	113
Abbildung 69: Verarbeitungseigenschaften Laborcharakterisierung und Produktion .....	113
Abbildung 70: Rheologische Charakterisierung der Proben aus „Großem Pilotversuch“ .....	114
Abbildung 71: Trockenbiegefestigkeit der Laborproben aus „Großem Pilotversuch“ .....	114
Abbildung 72: Ablaufschema Industriemaukversuch .....	116
Abbildung 73: Industriemaukversuch – Verarbeitungsaufwand .....	116
Abbildung 74: Industriemaukversuch - Trockenbiegefestigkeit .....	117
Abbildung 75: Schwindung, Wasseraufnahme der Industriemaukversuchsproben .....	117
Abbildung 76: Mauken einer Spaltplattenmasse – Laboruntersuchungen zum Verarbeitungsaufwand .....	119
Abbildung 77: Mauken einer Spaltplattenmasse – Laboruntersuchungen zu rheologischen Eigenschaften .....	119
Abbildung 78: Bewertungsschema Rohstoffe – Charakterisierungsmöglichkeiten und beschreibende Parameter keramischer Tonrohstoffe .....	123
Abbildung 79: Schema zur Bewertung der Material- und Verarbeitungseigenschaften toniger Rohstoffe für die keramische Industrie .....	125
Tabelle 1: Vergleichende Übersicht der beiden Tonsorten für das Bioton-Projekt .....	7
Tabelle 2: Chemische Analyse der beiden Projekttone .....	12
Tabelle 3: Lösliche Salze und Kohlenstoff/Stickstoff/Schwefel-Analyse der beiden Projekttone ..	13
Tabelle 4: Plastizitätsbeschreibende Parameter und Trockenbiegefestigkeit der beiden Projekttone .....	13
Tabelle 5: Korngrößenverteilung der beiden Projekttone .....	14
Tabelle 6: Korngrößenverteilung der Proben W1 und W2 mit und ohne Na-Pyrophosphat als Dispergierhilfsmittel .....	17
Tabelle 7: Phänomenologische Beschreibung und verarbeitungsrelevante Eigenschaften der keramischen Tone .....	18
Tabelle 8: Chemische Zusammensetzung des Gesamtmaterials von W1 und W2 und der Tonfraktionen <2 µm. Die Werte sind auf den Glühverlust bei 1000 °C (LOI) normiert .....	20
Tabelle 9: Quantitativer Phasenbestand der Fraktionen <2 µm ermittelt durch eindimensionale Modellierung von Röntgendiffraktogrammen. W <sub>a</sub> : Anteil der zuerst genannten Komponente in der Wechsellagerung .....	21
Tabelle 10: Phasenbestand der keramischen Tone W1 und W2 .....	21



Tabelle 11: Gehalt austauschfähiger Kationen und gemessener CEC (CEC meas) des Gesamtmaterials und der Fraktionen 0.6-2 µm und <0.6 µm. %CEC: Verhältnis der Summe ausgetauschter Kationen ( $\Sigma$ ) zu gemessener CEC. CEC corr: korrigierte CEC gemäß Petrick et al. (2011). $w_{sc}$ : Anteil quellfähiger Komponenten gemäß CEC-Messung .....	23
Tabelle 12: Durch Mößbauer-Spektroskopie bestimmte Fe-Verteilung des Gesamtmaterials und der Fraktion <0.6 µm der Proben W1 und W2.....	24
Tabelle 13: KbE auf R2A Agar aerob/anaerob und Sabouraud Agar aerob .....	29
Tabelle 14: Primer mit zugehöriger Sequenz; Angabe der Bindungsstelle analog E. coli .....	35
Tabelle 15: Zuordnung der DGGE Banden zu Organismen mit Angabe der Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (NCBI); Referenzton W2 .....	39
Tabelle 16: Aus W1 und W2 kultivierte Organismen mit Angabe der Bestimmungswahrscheinlichkeit der Datenbank NCBI (Altschul et al. 1998) ...	42
Tabelle 17: Gesamt- DNA Analyse mittels DGGE Separation und Sequenzierung; Zuordnung der ermittelten Spezies zu den Banden der DGGE und den Probenahmezeitpunkten .....	78
Tabelle 18: Zuordnung der DGGE- Banden aus PCR- Produkten von DCS- kultivierten Bakterien aus W1 zu Spezies; Grau: Abweichung >3% .....	83
Tabelle 19: Messergebnisse der Ansätze 1 und 2 im Alginatbakterienversuch.....	92
Tabelle 20: Messergebnisse der beimpften Ansätze 3 und 4 im Alginatbakterienversuch.....	93
Tabelle 21: Medium zur Produktion von Alginat mit Azotobacter vinelandii (Inoculum: 10 % (v/v) Vorkultur) .....	100
Tabelle 22: Übersicht der im Rahmen der „Additivtests“ zusätzlich getesteten Alginat aus Braunalgen sowie der chemischen Additive .....	102
Tabelle 23: Übersicht der durch DCS kultivierten und identifizierten bakteriellen Vertreter zu t0 und t28.....	118

## 11 Literaturverzeichnis

- Altschul, S. Madden, T. Schaffer, A. Zhang, J. H. Zhang, Z. Miller, W. & Lipman, D. (1998). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Faseb Journal* 12(8), A1326-A1326.
- Altschul, S. F. Gish, W. Miller, W. Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3), 403-410.
- Amann, R. I. Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic Identification and in-Situ Detection of Individual Microbial-Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* 59(1), 143-169.
- Bascomb, C. L. (1968) Distribution of pyrophosphate - Extractable iron and organic carbon in soils of various groups. *Journal of Soil Science* 19, 251-268.
- Bland, P. A., Cressey, G., and Menzies, O. N. (2004) Modal mineralogy of carbonaceous chondrites by X-ray diffraction and Mössbauer spectroscopy. *Meteoritic & Planetary Science* 39, 3-16.
- Blume, H. P. Brümmer, G., W. Kandeler, E. Hartge, K. H. Auerswald, K. Beyer, L. & R., F. W. (2002). Lehrbuch der Bodenkunde Scheffer Schachtschabel. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.
- Borchner, B., R. (2005). Biolog: Modern Phenotypic Microbial Identification. In *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods* (Ed M. Miller, J.), pp. 55-73. PDA/DHI.
- Christensen, B. B. Haagensen, J. A. J. Heydorn, A. & Molin, S. (2002). Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 68(5), 2495-2502.
- Colombo, C. and Torrent, J. (1991) Relationship between aggregation and iron oxides in Terra Rossa soils from southern Italy. *Catena* 18, 51-59.
- Connell, J. H. (1978). Diversity in Tropical Rain Forests and Coral Reefs. *Science* 199(4335), 1302-1310.
- Cornell, R. M. and Schwertmann, U. (2003) The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 664.
- Ditz, H., Mörtel, H. (1986), Veränderungen von Rohstoffeigenschaften durch bakteriellen und mykotischen Angriff, cfi Fortschrittsberichte der Deutschen Keramischen Gesellschaft, Band 2 (1986/87) Heft 1 ISSN 0177-6983
- Dong, H., Kostka, J. E., Kim, J. (2003), Microscopic evidence for microbial dissolution of smectite, *Clays and Clay Minerals*, Vol. 51, No. 5, pp 502-512
- Drobner, E. Huber, H. Rachel, R. & Stetter, K. O. (1992). *Thiobacillus plumbophilus* spec. nov., a Novel Galena and Hydrogen Oxidizer. *Archives of Microbiology* 157(3), 213-217.
- Emmerichs, N. (2004) Untersuchung der Wechselwirkungen von Mangan- und Calciumionen mit Alginat von Algen und von verschiedenen mucoiden Stämmen des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, Dissertation Universität Duisburg
- Engels, M (2006); Neue Ansätze zur Prozessteuerung im keramischen Strangpressverfahren; Tagungsband 2. Höhr-Grenzhäuser Keramik-Symposium 2006 „Formgebung“

- Engels, M.; Diedel R. (2006): Optimized Process Control for the Tile Extrusion Process; Cfi/Ber. DKG; 83 No. 6-7 S. E31 – E32 / Conference Proceedings Qualicer 2006; Volume 3, Pos.147 – 150.
- Ernst, D. (2007), Mikro- und molekularbiologische Charakterisierung von Mikroorganismen in Tonrohstoffen und deren Fähigkeit, die rheologischen Eigenschaften von Tonschlickern durch spezifische Stoffwechselprodukte zu beeinflussen, Studienarbeit FH Koblenz mit Forschungszentrum Karlsruhe
- FGK (2006); Abschlussbericht AiF 13 941 N „Einfluss der Stoffbestandswerte der Komponenten keramischer Massen auf deren Trockenbiegefestigkeit“
- FGK (2008); FGK-Arbeitsvorschrift „Plastizität nach Pfefferkorn“
- Garland, J., L. (1996). Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biology and Biochemistry* 28(2), 213-221.
- Grafton, D. R. (1968) The effect of clay-adhesive interaction on the structure of coatings. The Institute of Paper Chemistry, Lawrence University, Wisconsin, Appleton, Wisconsin.
- Haak, T., K. & Mc Feters, G., A. (1982). Nutritional relationships among microorganisms in an epilithic biofilm community. *Microbial Ecology* 8, 115-126.
- Heitz et al. (Hrsg.) (1996), Microbially Influenced Corrosion of Materials. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 360-375
- Higgins, D. G. & Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73(1), 237-244.
- IDT (2010). IDT SciTools Oligo Analyzer. Zugriff: 01/2010. <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>.
- James, G. A. Beaudette, L. & Costerton, J. W. (1995). Interspecies Bacterial Interactions in Biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 15(4), 257-262.
- Jeanroy, E. and Guillet, B. (1981) The occurrence of suspended ferruginous particles in pyrophosphate extracts of some soil horizons. *Geoderma* 26, 95-105.
- Jones, J., G. (1977). The effect of environmental factors on estimated viable and total populations of planctonic bacteria in lakes and experimental enclosures. *Freshwater Biology* 7, 67-91.
- Kaden, R. (2009). Mikrobiologische Gewässeranalytik am Beispiel der Untersuchung einer Trinkwassertalsperre. Diplomica Verlag.
- Kaden, R. (2010). Mikrobiologische Charakterisierung von Tonrohstoffen unter Berücksichtigung des Alterationsprozesses „Mauken“, Dissertation, Fakultät für Physik und Chemie, Technische Universität Bergakademie Freiberg
- Kaufhold, S. and Penner, D. (2006) Applicability of the SER method for quality control of clays from the German 'Westerwald'. *Applied Clay Science* 32, 53-63.
- Kelly, D. & Wood, A. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50(2), 511-516.

- Kromer, H. and Rose, D. (1994) Der Einfluß des Stoffbestandes auf das Verflüssigungsverhalten von Tonen. *Ber. DKG* 71, 245-249.
- Lippmann, F. (1960) Über eine Apparatur zur Differentialthermoanalyse (DTA). *Keramische Zeitschrift* 11, 475-480, 524-528, 570-573.
- Liu, P. (2007); Polymer modified clay minerals: A Review; *Appl. Clay Science* 38 (2007): 64 – 76
- Löffler, G. (2003). Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Verlag. Berlin.
- Mazzeo, F.A. (2001); Extrusion and Rheology of fine particulate ceramic pastes, Dissertation Graduate School –New Brunswick, Rutgers, State University of New Jersey
- McFarland, J. (1907). The Nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* XLIX(14), 1176-1178.
- Mezger, T.G. (2006); Das Rheologie Handbuch: Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern, 2. überarbeitete Auflage; Vincenz Network GmbH & Co. KG Hannover; ISBN 3-87870-175-6
- Ongley, E. D., Bynoe, M. C., and Percival, J. B. (1981) Physical and geochemical characteristics of suspended solids, Wilton Creek, Ontario. *Canadian Journal of Earth Science* 18, 1365-1379.
- Penner, D. and Lagaly, G. (2001) Influence of anions on the rheological properties of clay mineral dispersions. *Applied Clay Science* 19, 131-142.
- Peterson, S. B. Dunn, A. K. Klimowicz, A. K. & Handelsman, J. (2006). Peptidoglycan from *Bacillus cereus* mediates commensalism with rhizosphere bacteria from the Cytophaga-Flavobacterium group. *Applied and Environmental Microbiology* 72(8), 5421-5427.
- Petrick, K., Diedel, R., Peuker, M., Dieterle, M., Kuch, P., Kaden, R., Krolla-Sidenstein, P., Schuhmann, R., and Emmerich, K. (2011) Character and amount of I-S mixed-layer minerals and physical-chemical parameters of two ceramic clays from Westerwald, Germany: Implications for processing properties. *Clays and Clay Minerals* 59, 58-74.
- Pindar, D. F., Bucke, C. (1975) The Biosynthesis of Alginate Acid by *Azotobacter vinelandii*, *Biochem. J.* (1975) 152, 617-622
- Rand, B. and Melton, I. E. (1977) Particle interactions in aqueous kaolinite suspensions: I. Effect of pH and electrolyte upon the mode of particle interaction in homoionic sodium kaolinite suspensions. *Journal of Colloid and Interface Science* 60, 308-320.
- Reyes C, Pena C, Galindo E (2003). Reproducing shake flask performance in stirred fermentors: producing of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *J Biotechnol* 105: 189-198.
- Rimstidt, J. D. and Vaughan, D. J. (2003) Pyrite oxidation: A state-of-the-art assessment of the reaction mechanism. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 873-880.
- Rösler, H. J. (1991) Lehrbuch der Mineralogie. Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, pp. 844.
- Sagova-Mareckova, M. Cermak, L. Novotna, J. Plhachova, K. Forstova, J. & Kopecky, J. (2008). Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* 74(9), 2902-2907.

- Sanger, F. Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12), 5463-5467.
- Schulle, W.; Schmidt, G. (1997); Möglichkeiten und Vorteile anorganischer Additive in Feinkeramischen Pressmassen; *Ker. Z.*, Jg. 49, Bd. 11, S. 961 - 968
- Smykatz-Kloss, W. (1974) *Differential Thermal Analysis*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 185.
- Staley, J. T., Ren, T., Pellerin, N. B., Graff, G. L., Aksay, I. A., (1992), Dispersion of Small Ceramic Particles (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) with *Azotobacter vinelandii*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, No. 9, pp 3130-3135
- Sutherland I.W. (1994), Structure-function-relationships in microbial exopolysaccharides, *Biotechnology Advances*, vol. 12, no. 2, pp. 393-448
- Taylor, J. P. Wilson, B. Mills, M. S. & Burns, R. G. (2002). Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 34(3), 387-401.
- Tebbe, C. C. & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8), 2657-2665.
- Torsvik, V. Goksoyr, J. & Daae, F. L. (1990). High Diversity in DNA of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56(3), 782-787.
- Wloka, M. (2006). Rheologische Untersuchungen an nativen Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation Universität Dortmund
- Wolfaardt, G. M. Lawrence et al. (1994). The Role of Interactions, Sessile Growth, and Nutrient Amendments on the Degradative Efficiency of a Microbial Consortium. *Canadian Journal of Microbiology* 40(5), 331-340.

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel  Schlussbericht zum Verbundvorhaben „Entwicklung neuer Aufbereitungstechnologien für tonmineralische Rohstoffe durch gezielte Nutzung und Steuerung mikrobiologischer Reaktionen“	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)]  Diedel, Ralf; Peuker, Miriam; Dieterle, Matthias; Kuch, Paul; Emmerich, Katja; Petrick, Kerstin; Zehnsdorf, Andreas; Beyer, Daniel; Huber, Stefan; Fischer, Heike; Kaden, Rene; Krolla-Sidenstein, Peter	5. Abschlussdatum des Vorhabens März 2011
	6. Veröffentlichungsdatum geplant
	7. Form der Publikation Fachzeitschrift
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Forschungsinstitut für anorganische Werkstoffe, Glas/Keramik GmbH - FGK; Heinrich – Meister Strasse 2; 56203 Höhr-Grenzhausen Karlsruher Institut für Technologie – KIT; Institut für Funktionelle Grenzflächen, IFG; Kompetenzzentrum Materialfeuchte, CMM; Hermann-von-Helmholtzplatz 1; 76344 Eggenstein-Leopoldshafen Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ; Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum (UBZ); Permoserstrasse 15; 04318 Leipzig Amberger Kaolinwerke Eduard Kick GmbH & Co. KG; Gerorg-Schiffer-Strasse 70 92242 Hirschau Sibelco Deutschland GmbH; Am Sportplatz 1; 56412 Ruppach-Goldhausen G.E.O.S. Freiberg Ingenieurgesellschaft mbH; Postfach 1162; 09581 Freiberg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 01RI0626 A-F
	11. Seitenzahl 221
12. Fördernde Institution (Name, Adresse)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 96
	14. Tabellen 51
	15. Abbildungen 108
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	

## 18. Kurzfassung

Kurzfassung für das Berichtsblatt:

Biotechnologische Prozesstechniken zur Schonung von Ressourcen, zur Rohstoffbereitstellung sowie zur Produktverbesserung wurden in der Ton verarbeitenden Industrie bisher nicht eingesetzt. Von der gezielten Nutzung von geomikrobiologischen Prozessen werden nachhaltige und kostengünstige Verfahren zur Verbesserung der technologischen Eigenschaften toniger Rohstoffe erwartet. Im Bereich der Entfernung färbender Metallspezies und verbesserter plastischer Eigenschaften wird ein großes Potenzial durch biotechnologisch gesteuerte Prozesse gesehen.

**Rohstoffbewertungssystem:** Durch die Anwendung eines interdisziplinären Analyse- und Methodenspektrums wurden geeignete Referenzrohstoffe mineralogisch, mikrobiologisch und physikalisch-chemisch, sowie keramtechnisch erstmals umfassend charakterisiert. Durch den Aufbau eines, dem jeweiligen Rohstoff angepassten, Systems verschiedener Analysetechniken, ist den Industriepartnern eine individuelle Bewertungsstrategie ihrer Rohstoffe an die Hand gegeben worden, die Möglichkeiten zur Optimierung prozesstechnisch spezifischer Aufbereitungsstrategien gibt.

**Metallspezies-Solubilisierung:** Biotechnologische Verfahren lassen sich prozessbedingt nur für aufbereitete Kaolinsuspensionen einsetzen. In den mineralogischen Analysen konnten färbende Eisenverbindungen entweder als oxidische Mineralphasen und/oder als in den Tonmineralen silicatisch gebunden detektiert werden. Diese Ergebnisse bestimmen die potenzielle Bleichbarkeit von Kaolinsuspensionen und damit die Auswahl geeigneter bakterieller Vertreter für eine biotechnologische Prozessaufbereitung. Der Modellorganismus *Shewanella putrefaciens* wurde in Technikums- und Pilotversuchen in Kaolinschlückern eingesetzt. Ein Weißgrad erhöhender Effekt wurde auf die Eliminierung oxidisch gebundener Eisenphasen und auf Verarmung/Reduktion silicatisch gebundenen Eisens zurückgeführt. Prinzipiell lassen sich für die verschiedenen eisenhaltigen Mineralphasen spezifische bakterielle Organismen zur selektiven Eliminierung färbender Metallspezies finden. Die Industrie hat durch die gewonnenen Daten und Erkenntnisse eine verbesserte Analysetechnik für die prozesstechnische Aufbereitung von Rohstoffen unterschiedlicher Qualitäten zur Verfügung, mit der eine nachhaltige Nutzung von Ressourcen erst möglich wird. Biotechnologische Prozessschritte zur Erhöhung des Weißgrades kaolinhaltiger Suspensionen sind prinzipiell möglich. Die Möglichkeit zum Ausbau der biotechnologischen Potenziale wird in der Zukunft gesehen, auf dem jetzigen Stand der Ergebnisse müssen die zeit- und kostenintensiven Verfahren weiter optimiert werden.

**Verbesserung der Plastizität:** Mit dem Einsatz adaptierter mikro- und molekularbiologischer Arbeitsmethoden konnten die dynamischen Veränderungen bakterieller Populationen erstmals zusammen mit mineralogischen, physikalisch-technischen und keramtechnischen Charakterisierungen bei der Tonalterung, dem so genannten Maukprozess betrachtet werden. Bei einigen gemessenen Parametern konnten im Labormaßstab während der ersten vier Wochen des Prozesses durchgreifende Veränderungen beobachtet werden. Der wechselseitige Einfluss mikrobieller Populationen, ihrer Stoffwechselaktivitäten und der physikalisch-chemischen Parametern auf die Veränderung der Verarbeitbarkeit aufbereiteter Rohstoffe konnte jedoch nicht geklärt werden. Für die hochtechnisierte Industrie stellt sich der Prozess des Maukens als zu zeitintensiv und bisher noch nicht kontrollierbar dar. Mit dem Modellorganismus *Azotobacter vinelandii* wurde ein Organismus zur biotechnischen Herstellung bakteriell gebildeten Alginats ausgewählt. Das extrahierte Alginat wurde in Labor-, Technikums- und industrienahen Pilotversuchen auf seine plastizitätsverbessernde Eigenschaft in ausgewählten Referenzrohstoffen getestet. Andere autochthone, stark EPS bildende Organismen wurden aus Tonrohstoffen isoliert, waren im begrenzten Zeitraum des Vorhabens jedoch nicht einsetzbar. Es konnte gezeigt werden, dass sich bakteriell erzeugte Alginat vorteilhaft auf Aufbereitung und Verarbeitung plastischer Massenauswirken und dem Vergleich mit Algen-Alginaten standhalten. Mit dem spezifischen Ausbau des interdisziplinären mineralogischen, mikrobiologischen und physikalisch-chemischen Methodenspektrum haben die Ton verarbeitenden Industrieunternehmen und Forschungsinstitute ein Werkzeug für ein tiefer greifendes Verständnis der komplexen Zusammenhänge in Tonrohstoffen erhalten. Für die industrielle Aufbereitung sind somit neue Möglichkeiten für optimierte Aufarbeitungsstrategien zum gezielten Einsatz auch von bisher ungenutzten Rohstoffen geschaffen worden.

## 19. Schlagwörter

Tonindustrie; Rohstoffbewertung; Ressourcenschonung; Prozessoptimierung; Biotechnologie; Implementierung; Plastizität; Eliminierung färbender Metallspezies; Molekularbiologie; Bakterielle Populationen; Kaolin; Weißgrad; Eisenreduktion

## 20. Verlag

## 21. Preis

## Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN	2. type of document (e.g. report, publication) Final report
3. title Final report to the joint research project "Development of new processing technologies for clay mineral raw materials by using and controlling targeted microbial reactions"	
4. author(s) (family name, first name(s))  Diedel, Ralf; Peuker, Miriam; Dieterle, Matthias; Kuch, Paul; Emmerich, Katja; Petrick, Kerstin; Zehnsdorf, Andreas; Beyer, Daniel; Huber, Stefan; Fischer, Heike; Kaden, Rene; Krolla-Sidenstein, Peter	5. end of project March, 2011
	6. publication date
	7. form of publication
8. performing organization(s) (name, address) Forschungsinstitut für Anorganische Werkstoffe, Glas/Keramik GmbH - FGK; Heinrich – Meister Strasse 2; 56203 Höhr-Grenzhausen Karlsruher Institut für Technologie – KIT; Institut für Funktionelle Grenzflächen, IFG; Kompetenzzentrum Materialfeuchte, CMM; Hermann-von-Helmholtzplatz 1; 76344 Eggenstein-Leopoldshafen Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ; Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum (UBZ); Permoserstrasse 15; 04318 Leipzig Amberger Kaolinwerke Eduard Kick GmbH & Co. KG; Gerorg-Schiffer-Strasse 70 92242 Hirschau Sibelco Deutschland GmbH; Am Sportplatz 1; 56412 Ruppach-Goldhausen G.E.O.S. Freiberg Ingenieurgesellschaft mbH; Postfach 1162; 09581 Freiberg	9. originator's report no.
	10. reference no.
	11. no. of pages  221
12. sponsoring agency (name, address)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 96
	14. no. of tables 51
	15. no. of figures 108
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)	



18. abstract

Biotechnological processing techniques for raw material supply, product enhancement and at least for conservation of natural resources are not established in the clay processing industry hitherto. Sustainable and cost-effective procedures to improve technological properties of clay raw materials by a targeted use of specific geomicrobial processes are expected. A great potential in biotechnology-driven techniques is seen in the focus of coloring metal species removal, improved plasticity properties and ductility.

**Raw material evaluation system**

Through the application of a broad interdisciplinary spectrum of analysis methods reference clay materials were extensively characterised for their mineralogical, microbiological, physico-chemical and application properties. By the creation of a system of various analysis methods respectively adapted to clayey materials, the industry partners have been given an individual assessment strategy of their resources. Furthermore it gives the possibilities for an optimization of process technology-specific treatment strategies.

**Improvement of whiteness - metalspecies- Solubilisation**

Process-related biotechnological methods were adapted only for processed kaolin slurries. By mineralogical analysis of these slurries, coloring iron species could be detected either as oxidic mineral phases and/or silica-bound in the clay minerals. These mineralogical results determine the potential for brightness improvement of kaolin and thus the selection of suitable bacterial species for a biotechnological process treatment. The model organism *Shewanella putrefaciens* was used in kaolin slurries in the scale up and the pilot facility phase of the project. A brightness-enhancing effect was attributed to the elimination of oxidic iron phases and silicate-bound iron depletion or reduction respectively. Specific bacterial organisms for selective elimination of coloring metal species could be selected for the various iron-bearing mineral phases in principle. The data and results gained by the improved analysis techniques of raw materials of different qualities, provides the industry now with a tool for a suitable and sustainable use of resources. Biotechnological process steps for increasing the whiteness of kaolin slurries can be applied successfully in principle. The ability to expand the biotechnological potential is seen in the future. At the present state of the research, the time-consuming and cost-intensive processes have to be further optimized.

**Improvement of plasticity:**

In the project focus "improvement of plasticity" dynamic changes in bacterial populations during the alteration process of clays (also referred as clay aging) were detected by the use of specific adapted micro- and molecular-biological methods together with mineralogical, physical-technical and ceramic characterisations for the first time. Some parameters measured on a laboratory scale pointed out sweeping changes during the clay aging process within the first four weeks.

The predominant impact of changing microbial populations and their metabolic products and the alteration of physico-chemical parameters on the processability of raw materials could not be clarified yet.

For high-tech industries, the process of the clay alteration by an activated natural autochthonous biocoenosis is considered as too time-consuming and not yet controllable. Using *Azotobacter vinelandii* as a model organism, a bacterial species for biotechnological production of alginate was selected. The extracted alginate was then tested in laboratory-, pilot- and industrial-scale experiments of its plasticity improving properties on the reference clay materials.

Other autochthonous, highly EPS-forming organisms isolated from clay raw materials were not used for alteration of clay plasticity due to the limited period of the project.

However, it could be demonstrated that bacterially produced alginates affect processing and plasticity advantageously and can compete with commercial available alginates.

The expansion of the spectrum of interdisciplinary mineralogical, microbiological, physico-chemical and ceramic characterisation methods, the clay processing companies and research institutes received a tool for a deeper understanding of the complex relationships in clay raw materials. For the clay processing industry, thus created opportunities enables new and optimized processing strategies targeted to a sustainable use of previously submarginal raw materials.

19. keywords

clay industry; conservation of resources; raw material testing; biotechnology; plasticity; molecular biology ; bacteria; kaolin; degree of whiteness; iron reduction; process enhancement

20. publisher

21. price