

Projekttitlel:

Untersuchungen zur mikrobiellen Laugung von Seltenen Erden aus technischen Produkten zur Entwicklung eines biotechnologischen Recycling-Verfahrens

Aktenzeichen: 29758

Verfasserinnen: Dr. Katrin Pollmann, Stefanie Hopfe

Institution/Bewilligungsempfänger: Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Helmholtz-Institut
Freiberg für Ressourcentechnologie, Postfach 510119, 01314 Dresden

Projektlaufzeit: 3 Jahre, 01.06.2013 – 31.05.2016

Berichtszeitraum: 01.06.2013-31.05.2016

Dresden, 20.07.2016

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	29758	Referat	Fördersumme	124.318 EUR
----	--------------	---------	-------------	--------------------

Antragstitel Untersuchungen zur mikrobiellen Laugung von Seltenen Erden aus technischen Produkten zur Entwicklung eines biotechnologischen Recycling-Verfahrens

Stichworte Bioleaching, Seltene Erden, Recycling

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
3 Jahre	01.06.2013	31.05.2016	1

Zwischenberichte	1
------------------	---

Bewilligungsempfänger	Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Helmholtz-Institut Freiberg für Ressourcentechnologie	Tel	0351- 260-3462
	Postfach 510119	Fax	0351- 260-3496
	01314 Dresden	Projektleitung	Dr. Katrin Pollmann

Kooperationspartner

Zielsetzung und Anlaß des Vorhabens

Angesichts der stark steigenden Nachfrage insbesondere an **metallhaltigen Rohstoffen** sind neue Technologien der Gewinnung und Verarbeitung gefragt, um den Rohstoffbedarf zu decken. Hierzu gehören neben einer effizienten Gewinnung auch effiziente Recyclingverfahren, um eine umweltfreundliche und nachhaltige Sicherung der Ressourcen zu ermöglichen. Die Biotechnologie bietet hier attraktive Möglichkeiten. **Ziel des Projektes** war die Entwicklung von innovativen und umweltfreundlichen Verfahren für das Recycling von seltenen Elementen wie Seltene Erden unter der Ausnutzung von mikrobiologischen Stoffwechselprozessen. Bakterielle Laugungsverfahren („Bioleaching“) werden bereits großtechnisch für die Gewinnung von Kupfer, Zink, Cobalt und Nickel angewendet. Eingesetzt werden diese Verfahren jedoch ausschließlich für Primärrohstoffe. Im Projekt sollten diese mikrobiellen Prozesse auf andere Materialien wie elektronische Abfallprodukte für das Recycling von metallischen Wertstoffen erweitert werden.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

In technischen Materialien liegen die verwendeten Seltenen Erden (REE) oft als Oxide oder Phosphatverbindungen vor, die äußerst stabil sind, unter sauren Bedingungen aber gelöst werden können. Ziel sollte zunächst sein, anhand von Modellverbindungen wie z.B. dotiertes LaPO₄ oder Y₂O₃ die prinzipielle Eignung von Mikroorganismen zur Solubilisierung von Oxiden und Phosphaten zu testen. In einem zweiten Schritt wurde dann die Extraktion von Seltenen Erden aus technischen Materialien wie Leuchtpulver aus Energiesparlampen untersucht. Für die Laugungsversuche wurden verschiedene Mikroorganismen mit unterschiedlichen Stoffwechselleistungen eingesetzt. Zum einen wurden heterotrophe Mikroorganismen untersucht, die durch die Bildung von organischen Säuren Oxide oder Phosphate auflösen. Des Weiteren wurde die Eignung von acidogenen Schwefeloxidierern für die Laugung der Seltenen-Erd Verbindungen untersucht. In einem dritten Ansatz wurden Mikroorganismen untersucht, die unter anaeroben Bedingungen Oxide reduzieren können. In den Vorversuchen ausgewählte Mikroorganismen wurden für die Laugung von Sekundärrohstoffen wie Leuchtpulver eingesetzt und Wechselwirkungen mittels verschiedener Methoden untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Für die Laugungsversuche wurde im Projekt das Leuchtpulver aus Energiesparlampen ausgewählt, da dieses hohe Konzentrationen an Seltenen Erden enthält, bislang nicht recycelt wird und für die Versuche gut zugänglich war. Die Zusammensetzung des Leuchtpulvers wurde umfangreich mittels verschiedener Methoden wie Röntgen-Fluoreszenz-Analyse (XRF) und ICP-MS untersucht. Nach diesen Analysen beträgt der Gehalt an Seltenen Erden 190,5 mg REE/g. Diese sind in den Dreiband-Farbstoffen $\text{BaSi}_2\text{O}_5\cdot\text{Eu}^{2+}$ (23 %), $\text{BaMgAl}_{10}\text{O}_{17}\cdot\text{Eu}^{2+}$ (BAM, 6 %), $\text{LaPO}_4\cdot\text{Ce}^{3+},\text{Tb}^{3+}$ (LAP, 4 %), $\text{CeMgAl}_{11}\text{O}_{19}\cdot\text{Tb}^{3+}$ (CAT, 7,5 %) und $\text{Y}_2\text{O}_3\cdot\text{Eu}^{3+}$ (YOE, 7 %) enthalten.

Im Projekt wurden verschiedene Organismen und Mechanismen hinsichtlich ihrer Eignung für die biologische Laugung der Seltenen Erden aus dem untersuchten Leuchtpulver untersucht. In einem Versuchsansatz wurden chemolithoautotrophe Mikroorganismen wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *A. thiooxidans* eingesetzt. Diese acidophilen Bakterien benötigen für ihr Wachstum einen niedrigen pH von $< 2,5$. Das Leuchtpulver wird in dem sauren Medium z.T. aufgelöst, was aber zu einer pH-Erhöhung führt. Der pH Wert muss daher ständig nachreguliert werden, damit die Bakterien überleben können. Biologische Laugungsaktivitäten konnten nur geringfügig (bis zu 3,25 % gelöste REE) nachgewiesen werden.

Versuche mit reduzierenden Bakterien wurden nicht durchgeführt. Vergleiche von Redoxpotenzialen verschiedener anorganischer Verbindungen und Metalle mit La(III) und Y(III) zeigen, dass die Redoxpotenziale dieser beiden Elemente im Gegensatz zu den anderen Elementen negativ sind. Diese Elemente sind daher energetisch sehr schlechte Elektronenakzeptoren und eine mikrobielle Reduktion dieser Elemente ist nicht möglich.

Erfolgreich war dagegen die Verwendung heterotropher Mikroorganismen bzw. die Verwendung von Kulturüberständen dieser Organismen. Insgesamt wurden 18 verschiedene mikrobielle Stämme (Bakterien und Hefen), die verschiedene organische Säuren produzieren, hinsichtlich ihrer Bioleachingeigenschaften analysiert. Einige Organismen wie die Hefe *Yarrowia lipolytica*, *Komagataeibacter xylinus*, *Lactobacillus casei* oder der „Teepilz“ Kombucha (symbiotische Mischkultur aus Hefen und Essigsäurebakterien) lösen in Schüttelversuchen bis > 12 % der Seltenen Erden aus dem Leuchtpulver. Intensiver analysiert wurden vor allem die Hefe *Yarrowia lipolytica* sowie die Mischkultur Kombucha. Während Einzelisolate von Kombucha (*Zygosaccharomyces lentus* und das Essigsäurebakterium *Komagataeibacter hansenii*) kaum laugen, konnten mit Hilfe der Mischkultur z.T. mehr als 12 % der Seltenen Erden gelöst werden. Diese Kultur bildet vor allem Essigsäure und Gluconsäure. Die Versuche zeigen außerdem, dass vor allem Y und Eu freigesetzt wurde. Weder Ce noch La konnten in signifikanten Mengen detektiert werden, obwohl sie Bestandteile der Hauptkomponenten des Leuchtpulvers sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass vor allem das dotierte Y_2O_3 gelaugt wird und evtl. Eu aus den übrigen Farbstoffen, während z.B. LaPO_4 sehr inert ist. Laugungsversuche mit reinem Y_2O_3 und LaPO_4 Pulver bestätigen diese Annahme: Nach 2 Wochen Inkubation waren mehr als 60 % des Y_2O_3 gelöst, während nur 0,01 % des LaPO_4 gelöst wurde.

Die Arbeiten zeigten weiterhin, dass für eine Extraktion der Seltenen Erden die Anwesenheit der Mikroorganismen nicht unbedingt erforderlich ist, sondern gute Laugungsraten auch mit Kulturüberständen erreicht werden können. Höhere Laugungsraten bei den „mikrobiellen“ Ansätzen sind vermutlich vor allem auf eine vermehrte Säurebildung, beeinflusst durch das Substrat, zurückzuführen. Zukünftige Arbeiten sollten sich daher auf Optimierungen der Metabolitproduktion konzentrieren. Des Weiteren können die Laugungsraten durch andere Versuchsbedingungen (optimierte Durchmischung, sequenzielle Laugung, Zugabe von Additiven) verbessert werden.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse wurden insgesamt auf 9 wissenschaftlichen **Konferenzen, Workshops und Symposien** in Form von Vorträgen oder Postern präsentiert. Hierzu gehören z.B. mehrere VAAM Jahrestagungen, EREAN Summer School on Rare Earth Technology, 18.-21.08.2014, Leuven, Belgien, International Conference on Bioengineering and Biotechnology, 15.07.2015, Barcelona, Goldschmidt Konferenz 2015 in Prag und mehrere Aufbereitung und Recycling-Tagungen in Freiberg. Des Weiteren wurden die Ergebnisse in zwei wiss. Fachzeitschriften publiziert bzw. zur Publikation eingereicht (Pollmann et al. Minerals 6(2016)54, Hopfe et al. eingereicht), 1-2 weitere Publikationen sind in Vorbereitung.

Fazit

Für die Laugungsversuche wurde im Projekt das Leuchtpulver aus Energiesparlampen ausgewählt. Die Arbeiten umfassten eine detaillierte Analytik des Ausgangsmaterials und die Durchführung von Laugungsversuchen mit verschiedenen Mikroorganismen und Verfahren. Das Ziel des Projektes, die Erbringung eines „proof of principle“ für die biologische Laugung von Seltenen Erden, wurde erreicht. Dabei wurden Laugungsraten von > 12 % für Seltene Erden in Leuchtpulver und 65 % für reines Y_2O_3 erzielt. Des Weiteren wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Seltenen-Erd-Komponenten des Leuchtpulvers nachgewiesen. Die derzeitigen erzielten Raten sind für die Umsetzung in ein tatsächliches industrielles Recyclingverfahren noch zu niedrig. Hierfür sind weitere Untersuchungen und Optimierung notwendig. Allerdings wurde die Grundlage für weitere Forschungen im Gebiet „Biolaugung von kritischen Elementen aus nicht-sulfidischen Rohstoffen“ bereitet. Ergebnisse dieses Projektes werden bereits in anderen Projekten verwendet.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
1.1 Anlass und Zielsetzung des Projekts	4
1.2 Darstellung der Arbeitsschritte und angewandte Methoden	6
AP 0: Analytik, Charakterisierung von Materialien und Laugungsrückständen	6
AP1: Versuche zur Laugung von Phosphaten und Oxiden mit heterotrophen Mikroorganismen	6
AP2: Versuche zur Laugung von Phosphaten und Oxiden mittels azidogenen Schwefeloxidieren	
.....	8
AP3: Versuche zur Laugung von Oxiden und Phosphaten mittels anaeroben Mikroorganismen	8
AP4: Vergleich und Bewertung der verschiedenen Verfahren und Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Laugungseffizienz	8
AP5: Übertragung der in AP1 bestimmten Laugungsbedingungen und ausgewählten Mikroorganismen auf die Laugung von sekundären Rohstoffen	8
AP6: Durchführung von Laugungsversuchen mit Mischkulturen	8
1.3 Ergebnisse	9
AP 0: Analytik, Charakterisierung von Materialien und Laugungsrückständen	9
AP1 Versuche zur Laugung von Phosphaten und Oxiden mit heterotrophen Mikroorganismen	
.....	10
<i>Screeningversuche</i>	10
<i>Versuche mit Yarrowia lipolytica</i>	14
<i>Optimierungsversuche</i>	15
<i>Untersuchungen von Laugungsmechanismen</i>	17
<i>Laugungsversuche mit weiteren Organismen</i>	17
<i>Laugung mit Additiven</i>	19
AP2 Versuche zur Laugung von Phosphaten und Oxiden mittels azidogenen Schwefeloxidieren (Chemolitho-autotrophe Laugung)	20
AP3: Versuche zur Laugung von Oxiden und Phosphaten mittels anaeroben Mikroorganismen	
.....	21
AP4-AP6: Vergleich und Bewertung der verschiedenen Verfahren und Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Laugungseffizienz, Übertragung der in AP1 bestimmten Laugungsbedingungen und ausgewählten Mikroorganismen auf die Laugung von sekundären Rohstoffen, Durchführung von Laugungsversuchen mit Mischkulturen.....	22
<i>Laugungsversuche mit dem „Teepilz“ Kombucha und Charakterisierung</i>	22
1.4 Diskussion	26
1.5 Öffentlichkeitsarbeit	27
1.6 Fazit	28
1.7 Literaturangaben	29
1.8 Anhang	31

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Allgemeiner schematischer Versuchsaufbau	7
Abb. 2: Zusammensetzung des verwendeten Recycling-LP.....	9
Abb. 3: Korngrößenverteilung des Leuchtpulvers.	10
Abb. 4: Laugung von Leuchtpulver mit der Hefe <i>Y. lipolytica</i> auf Variationen des Mediums nach Förster (siehe Anhang).....	14
Abb. 5: Laugung mit <i>Y. lipolytica</i> auf Medium nach Förster.....	15
Abb. 6: Laugung mit <i>Y. lipolytica</i>	16
Abb. 7: Laugung mit <i>Y. lipolytica</i>	16
Abb. 8: REM-Aufnahme und Dialysereaktor. Links: REM-Aufnahme von <i>Y. lipolytica</i> nach 2-wöchiger Laugung mit Leuchtpulver. Rechts: Schematischer Aufbau des Dialyse-Reaktors.	17
Abb. 9: Laugung von 0,1g Leuchtpulver mit 1ml Laugungslösung im Eppendorf-Reagenzgefäß für 1 Woche auf dem Rotationsschüttler.....	19
Abb. 10: Laugung mit <i>A. ferrooxidans</i>	20
Abb. 11: Relativer Massenanteil der Seltenen Erden (schwarz, durchgezogene Linie) und pH-Entwicklung (grau, gepunktete Linie) im Überstand während der Inkubation.	24
Abb. 12: Produktion von organischen Säuren in Kombucha-Kulturen während der Laugung von LP.....	25
Abb. 13: Vergleich der relativen molaren Laugungsrate von SE abzüglich dem Laugungseffekt des Mediums nach 2 Wochen in mol%.	25
Tabelle 1: Auswahl von heterotrophen Mikroorganismen für Laugungsversuche	7
Tabelle 2: Zusammenfassung der Laugungsergebnisse nach zwei Wochen mit den ausgewählten chemoorgano-heterotrophen Mikroorganismenstämmen.....	11
Tabelle 3: Übersicht über Laugungsraten und Säuremengen bei der Inkubation von Mikroorganismen sowie deren Kulturüberständen mit Leuchtpulver	18
Tabelle 4: Zusammenfassung der Laugungsergebnisse mit den chemolitho-autotrophen Mikroorganismenstämmen	21
Tabelle 5: Standardpotentiale von ausgewählten Verbindungen und Elementen.....	22

Abkürzungsverzeichnis

LP	Lampenpulver
XRF	Röntgen-Fluoreszenz-Analyse
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
SE	Seltene Erdelemente (Rare Earth Elements)
XRD	X-ray diffraction
MLA	Mineral Liberation Analyser
REM	Rasterelektronenmikroskop
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (energy dispersive X-ray spectroscopy)
CFL	Compact Fluorescent Lamps
LED	Licht-emittierende Diode, Leuchtdiode
OLED	Organische Leuchtdiode
EL foils	Elektrolumineszenzfolie (Leuchtfolie)
LCD	Liquid Crystal Display
YPD	yeast extract peptone dextrose

Zusammenfassung

Für die Laugungsversuche wurde im Projekt das Leuchtpulver aus Energiesparlampen ausgewählt, da dieses hohe Konzentrationen an Seltenen Erden enthält, bislang nicht recycelt wird und für die Versuche gut zugänglich war. Die Zusammensetzung des Leuchtpulvers wurde um umfangreich mittels verschiedener Methoden wie Röntgen-Fluoreszenz-Analyse (XRF) und ICP-MS untersucht. Nach diesen Analysen beträgt der Gehalt an Seltenen Erden 190,5 mg SE/g. Diese sind in den Dreiband-Farbstoffen $\text{BaSi}_2\text{O}_5:\text{Eu}^{2+}$ (27 %), $\text{BaMgAl}_{10}\text{O}_{17}:\text{Eu}^{2+}$ (BAM, 6 %), $\text{LaPO}_4:\text{Ce}^{3+}, \text{Tb}^{3+}$ (LAP, 6 %), $\text{CeMgAl}_{11}\text{O}_{19}:\text{Tb}^{3+}$ (CAT, 2 %), $(\text{Ce,Gd})\text{MgB}_5\text{O}_{10}:\text{Tb}^{3+}$ (CBT, 2 %) und $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ (YOE, 10 %) enthalten.

Im Projekt wurden verschiedene Organismen und Mechanismen hinsichtlich ihrer Eignung für die biologische Laugung der Seltenen Erden aus dem untersuchten Leuchtpulver untersucht. In einem Versuchsansatz wurden chemolithoautotrophe Mikroorganismen wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *A. thiooxidans* eingesetzt. Diese acidophilen Bakterien benötigen für ihr Wachstum einen niedrigen pH von $< 2,5$. Das Leuchtpulver wird in dem sauren Medium z.T. aufgelöst, was aber zu einer pH-Erhöhung führt. Der pH Wert muss daher ständig nachreguliert werden, damit die Bakterien überleben können. Biologische Laugungsaktivitäten konnten nur geringfügig (bis zu 3,25 % gelöste SE) nachgewiesen werden.

Versuche mit reduzierenden Bakterien wurden nicht durchgeführt. Vergleiche von Redoxpotenzialen verschiedener anorganischer Verbindungen und Metalle mit La(III) und Y(III) zeigen, dass die Redoxpotenziale dieser beiden Elemente im Gegensatz zu den anderen Elementen negativ sind. Diese Elemente sind daher energetisch sehr schlechte Elektronenakzeptoren und eine mikrobielle Reduktion dieser Elemente ist nicht möglich.

Erfolgreich war dagegen die Verwendung heterotropher Mikroorganismen bzw. die Verwendung von Kulturüberständen dieser Organismen. Insgesamt wurden 18 verschiedene mikrobielle Stämme (Bakterien und Hefen), die verschiedene organische Säuren produzieren, hinsichtlich ihrer Biolaugungseigenschaften analysiert. Des Weiteren wurden die Kulturüberstände näher analysiert. Einige Organismen wie die Hefe *Yarrowia lipolytica*, *Komagataeibacter xylinus*, *Lactobacillus casei* oder der „Teepilz“ Kombucha (symbiotische Mischkultur aus Hefen und Essigsäurebakterien) lösen in Schüttelversuchen bis > 12 % der Seltenen Erden aus dem Leuchtpulver. Intensiver analysiert wurden vor allem die Hefe *Yarrowia lipolytica* sowie die Mischkultur Kombucha. Während Einzelisolate von Kombucha (*Zygosaccharomyces lentus* und das Essigsäurebakterium *Komagataeibacter hansenii*) kaum laugen, konnten mit Hilfe der Mischkultur z.T. mehr als 12 % der Seltenen Erden gelöst werden. Diese Kultur bildet vor allem Essigsäure und Gluconsäure. Die Versuche zeigen außerdem, dass vor allem Y und Eu freigesetzt wurde. Weder Ce noch La konnten in signifikanten Mengen detektiert werden, obwohl sie Bestandteile der Hauptkomponenten des Leuchtpulvers sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass vor allem das dotierte Y_2O_3 gelaugt wird, während z.B. LaPO_4 sehr inert ist.

Die Arbeiten zeigten weiterhin, dass für eine Extraktion der Seltenen Erden die Anwesenheit der Mikroorganismen nicht unbedingt erforderlich ist, sondern gute Laugungsraten auch mit Kulturüberständen erreicht werden können. Höhere Laugungsraten bei den „mikrobiellen“ Ansätzen sind vermutlich vor allem auf eine vermehrte Säurebildung, beeinflusst durch das Substrat, zurückzuführen. Zukünftige Arbeiten sollten sich daher auf Optimierungen der Metabolitproduktion konzentrieren. Des Weiteren können die Laugungsraten durch andere Versuchsbedingungen (optimierte Durchmischung, sequenzielle Laugung, Zugabe von Additiven) verbessert werden.

1.1 Anlass und Zielsetzung des Projekts

Durch die rasante Entwicklung in der Mikroelektronik und regenerativen Energietechniken in den letzten Jahren ist insbesondere der Bedarf an seltenen, in der Vergangenheit technologisch wenig genutzten Metallen wie Gallium, Indium, Neodym, Scandium, Tantal, vor allem aber auch der Seltenen Erden gestiegen. So werden z.B. allein für die Herstellung heutiger Computerchips 60 verschiedene Rohstoffe benötigt.

Mit dem Energiekonzept der Bundesregierung (www.bundesregierung.de), das den Umstieg auf erneuerbare Energien, aber auch den Umstieg auf Elektroautos und effizientere Energienutzung forciert, wird der Bedarf an Windkraftanlagen, Photovoltaikmodulen, Elektrobatterien, aber auch energiesparender Beleuchtung steigen. Gerade diese Technologien benötigen aber Seltene Erden oder Elemente wie Indium oder Gallium.

Die derzeit praktizierten Verfahren der Gewinnung und Aufbereitung insbesondere der Seltenen Erden aus Primärrohstoffen sind aus Umweltgesichtspunkten als kritisch anzusehen, wie eine Studie des Öko-Institutes Freiburg zeigt [1]. Der Abbau der Erze erfolgt in China meist im Tagebau, was erhebliche landschaftliche Veränderungen zur Folge hat. Zudem werden radioaktive Elemente wie Thorium oder Uran frei gesetzt, was erhebliche gesundheitliche Beeinträchtigungen zur Folge haben kann [2]. Die weiteren Aufbereitungsschritte umfassen das Mahlen von Gestein und die Anreicherung der metallhaltigen Minerale durch Flotationsverfahren. Diese Schritte verbrauchen erhebliche Mengen an Wasser und Energie, zudem werden viele verschiedene oft toxische Chemikalien eingesetzt. Der gesamte Abfall bestehend aus großen Mengen Wassers, Prozesschemikalien und Mineralien (tailings) wird in großen künstlichen Sammelbecken oder natürlichen Seen endgelagert und durch umgebende Dämme geschützt. Aus dem angereicherten Material werden während der Prozessierung durch den Einsatz von Chemikalien wie starken Säuren und Komplexbildnern die Seltenen Erden extrahiert und in die Einzelemente aufgetrennt.

Zusätzlich ist zukünftig mit einer weiterhin steigenden Nachfrage an **metallhaltigen Rohstoffen** zu rechnen, so dass neue umweltfreundliche Technologien der Gewinnung und Verarbeitung gefragt sind, um den Rohstoffbedarf zu decken. Hierzu gehören neben einer effizienten und umweltfreundlichen Gewinnung aus Primärrohstoffen auch die Einsparung der Rohstoffe durch intelligente Materialentwicklungen und effiziente Recyclingverfahren. Insbesondere die letzten beiden Punkte sind wichtig, um eine umweltfreundliche und nachhaltige Sicherung der Ressourcen zu ermöglichen. Mit derzeit verfügbaren Recyclingtechnologien werden gerade die Hochtechnologie-Metalle nur unzureichend wiederverwertet.

Während Gold, Silber und Kupfer, die den größten Anteil der Metalle im Schrott bilden, bereits routinemäßig von großen Recyclingfirmen wie Aurubis oder Umicore zurückgewonnen werden, werden andere Metalle noch nicht oder nur unzureichend wieder gewonnen, wie eine Studie der UNEP [3] zeigt. Das Problem liegt dabei vor allem in der Wirtschaftlichkeit der Verfahren, aber auch im Verbraucherverhalten. So werden z. B. zwar derzeit 40-50 % des in Industrieanwendungen verwendeten Rutheniums recycelt, aber nur bis zu 5 % des im Elektronikschrott enthaltenen Rutheniums [3]. Dies liegt zum einen an einer schlechten Rücklaufquote der elektronischen Produkte durch den Verbraucher, hat aber auch technische Gründe: höhere Recyclingquoten sind zwar technisch machbar, erfordern aber wesentlich aufwendigere Recyclingprozesse. So liegen viele Metalle in komplexen Verbindungen vor, deren Auflösung schwierig ist. Zudem ist die Konzentration der Metalle oft so gering, dass sich ein Recycling derzeit wirtschaftlich nicht lohnt, wie das Beispiel

Neodym zeigt: Ein PC enthält etwa 0,04 Gewichtsprozent Neodym, aufbereitetes Erz aus den Minen enthält dagegen 35 % des Metalls.

Gerade Seltene Erden werden bislang nur unzureichend recycelt, obwohl sie essenzielle Bestandteile in neuen Technologien wie Windkraftanlagen, Elektrobatterien, energiesparende Lichtquellen wie Compact Fluorescent lamps (CFL), LEDs, OLEDs, EL foils, sowie in Plasmabildschirmen und LCDs sind [4]. Es gibt einige Forschungsarbeiten zur Rückgewinnung von Neodym aus Ausschuss aus der Produktion von Magneten oder von Windkraftanlagen, zum Recycling von Ni-MH-Batterien und zur Rückgewinnung von Yttrium und Europium aus Energiesparlampen oder Bildschirmen [5-11]. Die Rückgewinnung Seltener Erden aus anderen Produkten, wie z.B. aus Autokatalysatoren, wurde bislang noch gar nicht berücksichtigt. Herkömmliche pyrometallurgische Verfahren zum Recycling von Elektronikschrott zielen auf die Rückgewinnung von Metallen wie Kupfer oder Gold. Die Seltenen Erden gehen während dieser Behandlung verloren und verbleiben in der Schlacke. Die Biotechnologie bietet hier attraktive Möglichkeiten, zu innovativen Recyclingverfahren beizutragen.

Ziel des Projektes war die Entwicklung von innovativen und umweltfreundlichen Verfahren für das Recycling von seltenen Elementen wie Seltene Erden unter der Ausnutzung von mikrobiologischen Stoffwechselprozessen. Von hydrometallurgischen Verfahren zur Erschließung von Primärrohstoffen ist es bekannt, dass Mikroorganismen zur Überführung von Metallen in die wässrige Phase eingesetzt werden können. Hierbei spielen Stoffwechselprozesse wie Oxidation oder Reduktion eine Rolle, aber auch die Produktion von anorganischen oder organischen Säuren. Diese bakteriellen Laugungsverfahren („Bioleaching“) werden bereits großtechnisch für die Gewinnung von Kupfer aus Erzen eingesetzt. Diese Verfahren wurden bereits auf andere Metalle wie Gold, Cobalt, Nickel ausgeweitet. Eingesetzt werden diese Verfahren jedoch ausschließlich für Primärrohstoffe. Im Projekt sollten diese mikrobiellen Prozesse auf andere Materialien wie elektronische Abfallprodukte für das Recycling von Wertstoffen angewendet werden. Dabei sollte ein „proof of principle“ zur Eignung von Bioleaching-Verfahren zur Extraktion von Seltenen Erden aus technischen Produkten erbracht werden. Leuchtpulver aus Energiesparlampen wurde dabei als Testfall gewählt.

1.2 Darstellung der Arbeitsschritte und angewandte Methoden

Wichtige Grundlage für die Bewertung von Laugungsergebnissen ist die genaue Kenntnis der Zusammensetzung des zu laugendem Materials vor und nach der Laugung. Den mikrobiellen Untersuchungen vorangestellt wurde daher eine detaillierte Analytik mittels ICP-MS, XRF, XRD und MLA-Methoden.

Aus der Literatur sind prinzipiell verschiedene Stoffwechselaktivitäten von Mikroorganismen bekannt, die für Biolaugungs-Verfahren genutzt werden können. Am bekanntesten ist die sogenannte saure Laugung mittels acidophilen schwefeloxidierenden chemolithoautotrophen Mikroorganismen wie *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *A. thiooxidans*, die für sulfidische Erze auch industriell eingesetzt wird. Versuche anderer Gruppen hatten gezeigt, dass diese Organismen prinzipiell auch die Laugung von Elektronikschrott und anderen Sekundärrohstoffen eingesetzt werden können. In diesen Arbeiten wurde elementarer Schwefel zur Nährlösung gegeben, um biogene Schwefelsäure zu produzieren.

Für Oxide wird in der Literatur ein weiteres reduktives Laugungsverfahren beschrieben. Einige Organismen wie *Shewanella oneidensis* oder *Thermoanaerobacter* können unter anaeroben Bedingungen Oxide wie Mangan(IV)dioxid, Vanadium(V)pentoxid oder Elemente wie Fe(III) oder U(VI) reduzieren.

Ein dritter Forschungsansatz nutzt Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen wie Chelatoren, organische Säuren oder extrazelluläre Substanzen als Laugungsreagenzien. So konnte bereits 1980 die Solubilisierung von Oxiden verschiedener Seltener Erden durch *Aspergillus niger*-Stämme nachgewiesen werden. Es sind auch Bakterienstämme bekannt, die schwer lösliche mineralische Phosphatverbindungen auflösen können.

Alle drei Mechanismen sollten im vorliegenden Projekt hinsichtlich ihrer Eignung zur Laugung von Oxiden und Phosphaten Seltener Erden untersucht werden. Das Projekt umfasste im Einzelnen folgende Arbeitspunkte:

AP 0: Analytik, Charakterisierung von Materialien und Laugungsrückständen

Das im Projekt verwendete Leuchtpulver (LP) wurde vom Recyclingunternehmen Larec GmbH bezogen (Gesamtmenge 5 kg). Vor Beginn der Versuche wurde das Material mit Hilfe verschiedener Probenteiler in Portionen bis minimal 0,85 g unterteilt. Anschließend wurde die Elementzusammensetzung mittels Röntgen-Fluoreszenz-Analyse (XRF) bestimmt. Die Farbstoffzusammensetzung des LP wurde mittels Röntgen-Beugungs-Analyse unter Zuhilfenahme der XRF-Ergebnisse und Literaturdaten bestimmt. Des Weiteren wurden die Korngrößen bestimmt. Die Elementbestimmung in den Laugungslösungen erfolgte mittels ICP-MS („inductively coupled plasma mass spectrometry“)-Analysen.

AP1: Versuche zur Laugung von Phosphaten und Oxiden mit heterotrophen Mikroorganismen

Vorversuche hatten gezeigt, dass die Seltenen Erden aus dem Leuchtpulver insbesondere durch organische Säuren gelöst werden können. Es ist außerdem bekannt, dass auch metallkomplexierende Moleküle wie Chalkophore oder Siderophore und andere Stoffwechselprodukte zu einer Laugung beitragen können. Zu Beginn des Projektes wurde eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt und verschiedene heterotrophe Mikroorganismen für Screening-Versuche ausgewählt und in geeigneten Medien kultiviert (Tabelle 1 und Tabelle A1).

Tabelle 1: Auswahl von heterotrophen Mikroorganismen für Laugungsversuche

Mikroorganismus	Auswahlgrund
<i>Acitithiobacillus ferrooxidans</i> und <i>thiooxidans</i>	klassische chemolithoautotrophe Laugungsorganismen
<i>Bacillus caribensis</i>	soll Oxalsäure bilden
<i>Bacillus licheniformis</i>	bildet Polyglutaminsäure
<i>Bacillus megaterium</i>	soll Zitronensäure und Aminosäuren bilden
<i>Corynebacterium species (callunae</i> und <i>stationis)</i>	sollen Glutaminsäure und weitere Säuren bilden
<i>Haldenisolat</i> aus der Uranabfall-Herde Haberland	hohe Schwermetalltoleranz, evtl. auch gegen Seltene Erden, daher „naturnahe“ Umgebung
<i>Komatogateibacter xylinus</i>	Essigsäurebakterium
<i>Lactobacillus casei</i>	Milchsäurebakterium
<i>Priceomyces</i> (früher: <i>Pichia</i>) <i>haplophilus</i>	soll Zitronensäure bilden
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	bildet Siderophore
<i>Streptomyces acidiscabies</i>	bildet Siderophore
<i>Yarrowia lipolytica</i>	bildet Citronensäure und weitere Säuren

Für die Versuche wurden i. d. R. 0,85 g geteiltes Leuchtpulver mit 30 ml Medium versetzt und in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit dem jeweiligen Stamm angeimpft. Aufgrund des Quecksilbergehaltes des LPs erfolgte die Kultivierung bei Raumtemperatur unter dem Abzug. Mindestens wöchentlich wurden Proben genommen, der pH-Wert bestimmt und die Elementkonzentration mittels ICP-MS gemessen sowie gegebenenfalls bei Laugungserfolg die gebildete Säuremenge mittels HPLC analysiert. Der Versuchsabbruch erfolgte soweit nicht anders vermerkt nach 2 Wochen. Der allgemeine Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

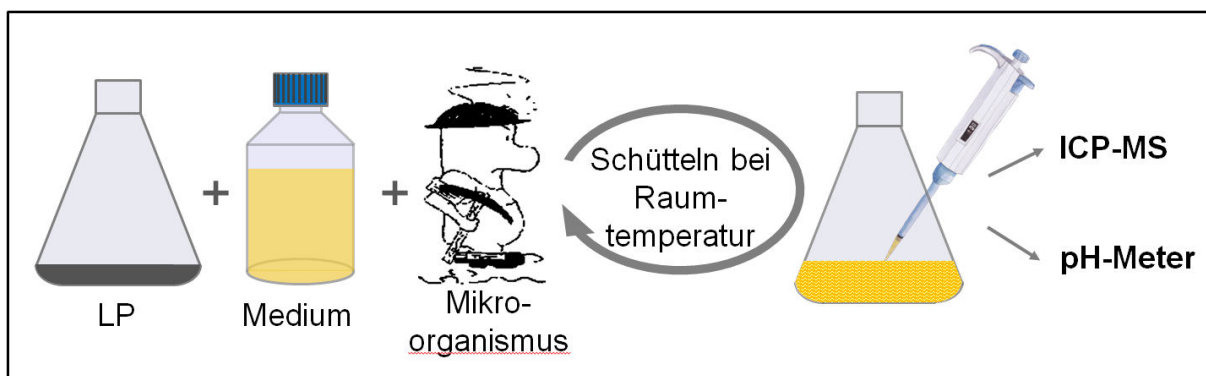


Abb. 1: Allgemeiner schematischer Versuchsaufbau

AP2: Versuche zur Laugung von Phosphaten und Oxiden mittels azidogenen Schwefeloxidieren

Für die chemolithoautotrophe Laugung wurden die Stämme *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *A. thiooxidans* als „klassische“ Laugungsbakterien ausgewählt. Diese Mikroorganismen wachsen unter aeroben Bedingungen bei pH 1-2,5 und können sulfidische Erze durch Oxidationsreaktionen und biogene Schwefelsäurebildung auflösen. Für die Versuche mit *A. ferrooxidans* wurden abweichend 3 g LP eingewogen und wöchentlich mit 10 ml 3-fach-konzentriertem Medium (DSMZ M882, pH 1,8) gefüttert. Ferner wurde der pH-Wert nach 16 Tagen nochmals auf 2 eingestellt, da dieser durch das Leuchtpulver stark gestiegen war und die Mikroorganismen dadurch nicht mehr wachsen konnten. Der Versuchsabbruch erfolgte nach einem Monat. Ähnlich wurde mit dem Stamm *A. thiooxidans* verfahren, wobei hier auf die nachträgliche Ansäuerung des Mediums und den Fed verzichtet wurde.

AP3: Versuche zur Laugung von Oxiden und Phosphaten mittels anaeroben Mikroorganismen

Die Arbeiten in diesem Arbeitspunkt konzentrierten sich auf die Durchführung von Literaturrecherchen und die Bewertung von Laugungsstrategien und Organismen zur Anwendung für Oxide und Phosphate Seltener Erden aus den Literaturdaten heraus.

AP4: Vergleich und Bewertung der verschiedenen Verfahren und Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Laugungseffizienz

Elementfreisetzung, Laugungsraten sowie Kultivierungs- und Versuchsbedingungen der in AP1-AP3 erfolgten Versuche wurden verglichen und hinsichtlich ihrer Effizienz und technologischer Umsetzbarkeit bewertet.

AP5: Übertragung der in AP1 bestimmten Laugungsbedingungen und ausgewählten Mikroorganismen auf die Laugung von sekundären Rohstoffen

Aus den Ergebnissen von AP1 wurden Mikroorganismen ausgewählt und weitere Versuche durchgeführt. Es wurden Kulturüberstände näher analysiert, um Laugungsmechanismen zu untersuchen. Des Weiteren wurden Medien variiert und der Einfluss der Zugabe von Komponenten wie Siderophore untersucht. Kombucha wurde als mikrobiologisches Konsortium genetisch analysiert und Einzelstämme isoliert, charakterisiert und hinsichtlich ihrer Laugungsaktivitäten untersucht.

Bakterielle Metabolite wurden mittels HPLC untersucht und identifiziert und hinsichtlich ihrer Laugungsaktivitäten analysiert.

AP6: Durchführung von Laugungsversuchen mit Mischkulturen

Als Mischkultur wurde der „Teepilz“ Kombucha ausgewählt. Es handelt sich dabei um ein mikrobiologisches Konsortium aus Hefen und Bakterien, das für die Fermentation von Tee verwendet wird und für seine Produktion diverser organischer Säuren bekannt ist. Diese Kultur bildet ein festes Pellet und lässt sich daher leicht vom flüssigen Medium abtrennen. Laugungsversuche wurden sowohl stationär als auch in Schüttelkultur durchgeführt. Die Laugungsraten der Mischkultur wurden mit Isolaten aus dieser Mischkultur verglichen.

1.3 Ergebnisse

AP 0: Analytik, Charakterisierung von Materialien und Laugungsrückständen

Eine genaue Kenntnis über die Zusammensetzung Materialien ist notwendig, um Laugungseffizienzen bestimmen zu können. Die Elementzusammensetzung des Leuchtpulvers wurde sowohl mittels Röntgen-Fluoreszenz-Analyse (XRF) als auch nach Mikrowellen-Aufschluss mittels ICP-MS bestimmt. Die Elementzusammensetzung nach XRF-Analyse ist in Abbildung 2_A dargestellt. Die Summe der Seltenen Erden beträgt 190,5 mg SE/g LP, folglich sind in den für die jeweiligen Laugungsversuche eingesetzten 0,85 g LP 161,9 mg SE enthalten. Diese Ergebnisse wurden für die Bilanzierung der Bio-Laugungsversuche eingesetzt.

Neben der Elementzusammensetzung sind auch Kenntnisse über die vorliegenden chemischen Verbindungen notwendig, um Laugungsprozesse verstehen und bewerten zu können. Die Bestandteile des Leuchtpulvers wurde mittels Röntgen-Beugungs-Analyse unter zu Hilfenahme der XRF-Ergebnisse und Literaturdaten bestimmt (Abbildung 2_B).

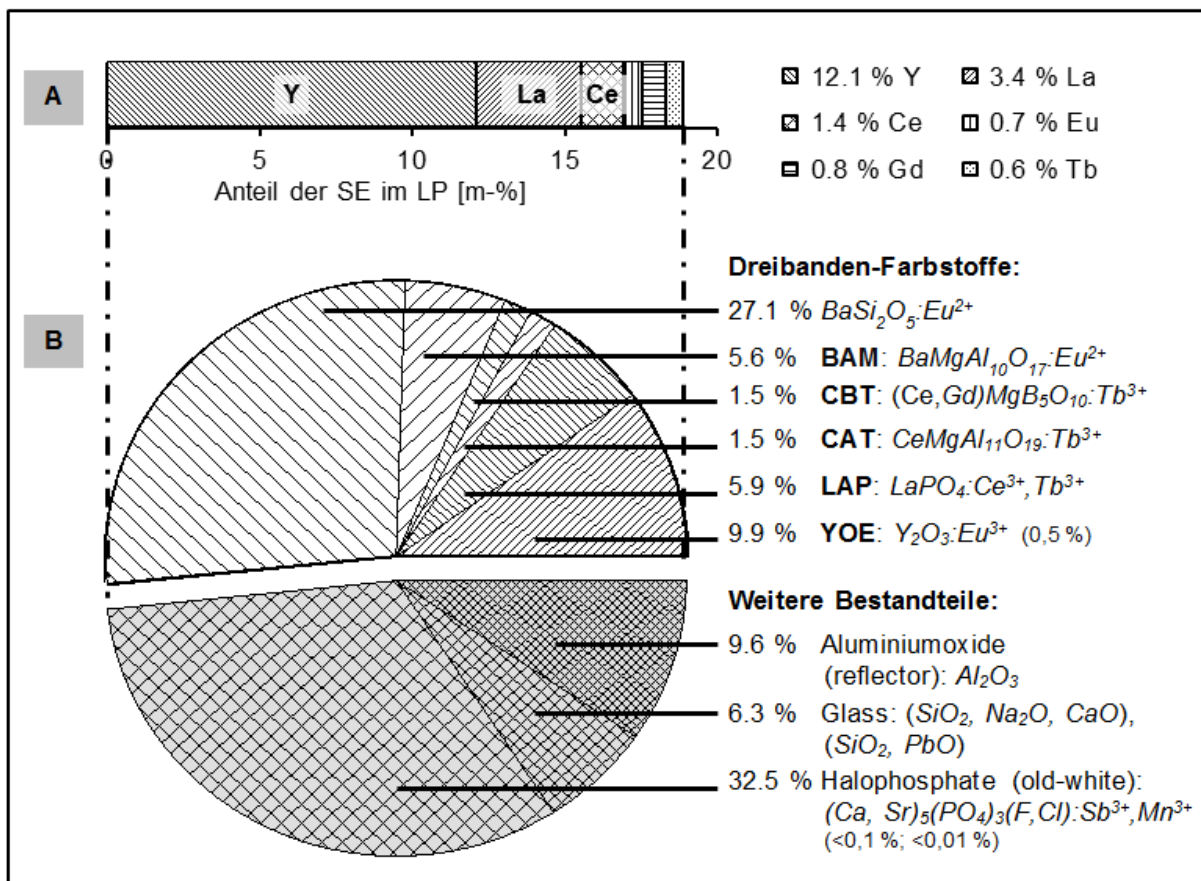


Abb. 2: Zusammensetzung des verwendeten Recycling-LP.

Gut die Hälfte des LPs besteht aus den sogenannten Dreiband-Farbstoffen. Nur in diesem Teil sind auch SE enthalten. Die mengenmäßig größte Fraktion der Seltenen Erden bildet entsprechend der XRF-Analyse das Yttrium, welches ausschließlich in der Rotkomponente Yttrium-Europium-Oxid gebunden ist. Den größten Anteil der Dreiband-Farbstoffe hat jedoch $BaSi_2O_5:Eu^{2+}$ mit 27 %. Der SE-freie Teil des Leuchtpulvers besteht hauptsächlich aus Halophosphat, dem alten Weiß-Farbstoff, sowie weiterhin aus dem Reflektor Aluminiumoxid und Glasrückständen.

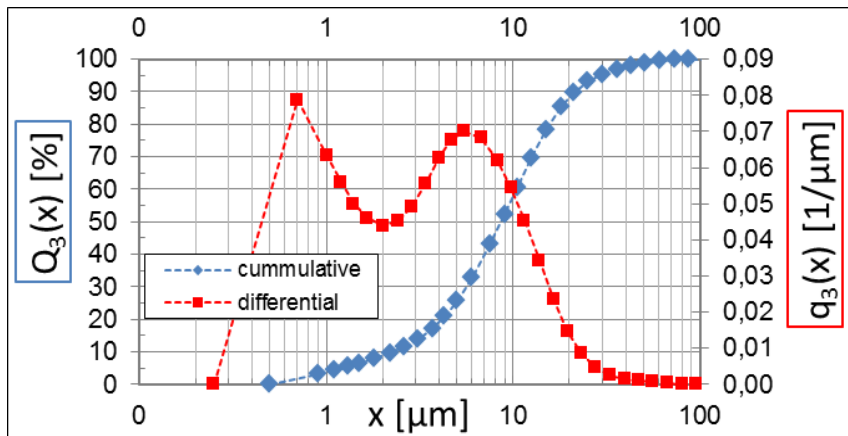


Abb. 3: Korngrößenverteilung des Leuchtpulvers.

Die Korngröße beeinflusst die Laugungseffizienz. Aus diesem Grunde wurde die Korngrößenverteilung des LP bestimmt (Abbildung 3). Demnach besteht das Leuchtpulver aus einer knapp $1\mu\text{m}$ und einer gut $5\mu\text{m}$ großen Fraktion. In der Literatur [12] werden ebenfalls zwei Fraktionen beschrieben, allerdings sollen diese eine Größe von 5 bzw. 10-15 μm haben.

AP1 Versuche zur Laugung von Phosphaten und Oxiden mit heterotrophen Mikroorganismen

Screeningversuche

Mit den in Tab. 1 genannten Mikroorganismen wurden Laugungsversuche durchgeführt. Neben der Freisetzung der Elemente wurden das Wachstum und der pH-Wert bestimmt. Die Ergebnisse zu den untersuchten Stämmen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen unterschiedliche stammabhängige Laugungsraten. Die besten Ergebnisse wurden mit der Hefe *Yarrowia lipolytica* und dem Bakterium *Komatogateibacter xylinus* (Essigsäurebakterium) mit einer Freisetzung von 10,6 % und 12,6 % der eingesetzten SE erzielt. *Y. lipolytica* bildet hauptsächlich Zitronensäure, *K. xylinus* v.a. Glucon- und Citronensäure. Diese Stoffwechselprodukte dürften für die Freisetzung der Seltenen Erden verantwortlich sein.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Laugungsergebnisse nach zwei Wochen mit den ausgewählten chemoorgano-heterotrophen Mikroorganismenstämmen

Stamm	Bezugsquelle	Medium (Zusammensetzung siehe Anhang)	mittlere OD600 in KMO	mittlerer pH-Wert in P	mittlere Laugung abzüglich Laugung durch das Medium	Bewertung des Laugungseffekts
<i>Bacillus licheniformis</i>	DSM-No: 8785	Medium E	geringes Wachstum in der Probe, pH-Wert analog Kontrolle mit Leuchtpulver ohne Mikroorganismen		0	-
		Mast	0,2	9,05	0	0
		Mast mit 2% Glycerin	0,27	5,7	0,01	+
<i>Bacillus megaterium</i>	DSM-No: 32	Mast	0,32	8,84	0	0
<i>Burkholderia caribensis</i>	DSM-No: 13236	Devasto 2009	geringes Wachstum in der Probe, pH-Wert analog Kontrolle mit Leuchtpulver ohne Mikroorganismen		0	0
		Mast	0,08	8,83	0	0
		Mast mit 2% Glycerin	6,35	7,61	0,03	+
<i>Corynebacterium callunae</i>	DSM-No: 20147	Delaunay 1999 ohne Citrat oder Deferoxamin; Mast	kein Wachstum in der Probe, pH-Wert analog Kontrolle mit Leuchtpulver ohne Mikroorganismen		0	-
<i>Corynebacterium stationis</i>	DSM-No: 20305	Delaunay 1999 ohne Citrat oder Deferoxamin; Mast	kein Wachstum in der Probe, pH-Wert analog Kontrolle mit Leuchtpulver ohne Mikroorganismen		0	-
<i>JG B58</i>	HZDR, Haldenisolat	Mast	0,7	9,18	0	0
<i>JG A13</i>	HZDR,	Mast	1,06	9,07	0	0

Stamm	Bezugs- quelle	Medium (Zusammensetzung siehe Anhang)	mittlere OD600 in KMO	mittlerer pH-Wert in P	mittlere Laugung abzüglich Laugung durch das Medium	Bewertung des Laugungs- effekts
	Haldenisolat	Mast mit 2% Glycerin	3	5,38	0,2	+
JG B37 Iso 3	HZDR, Haldenisolat	Mast	0,94	9,09	0	0
		Mast mit 2% Glycerin	3,79	8,78	0,02	+
JG B5T	HZDR, Haldenisolat	Mast	0,27	9	0	0
		Mast mit 2% Glycerin	0,44	5,47	0,03	+
JG C34	HZDR, Haldenisolat	Mast	0,9	8,99	0	0
Komatogateibacter xylinus	DSM-No: 2325	DSMZ 105 ohne CaCO ₃	0,3	2,7	12,6	+++
Lactobacillus casei	DSM-No: 20011	DSMZ 11	0,4	4,1	5	+++
Priceomyces haplophilus	DSM-No: 70365	Förster 2006	kein Wachstum in der Probe, pH-Wert analog Kontrolle mit Leuchtpulver ohne Mikroorganismen		0	-
		DSMZ 393	18,9	7,6	0,2	+
Pseudomonas fluorescens	DSM-No: 50090	Mast	0,56	9,18	0	0
		Mast mit 2% Glycerin	1,73	8,65	0,01	+
		PAF	1,53	9,05	0,02	+
Pseudomonas fluorescens	HZDR	Mast	0,46	9,12	0	0
		Mast mit 2% Glycerin	1,49	8,23	0,03	+

Stamm	Bezugs- quelle	Medium (Zusammensetzung siehe Anhang)	mittlere OD600 in KMO	mittlerer pH-Wert in P	mittlere Laugung abzüglich Laugung durch das Medium	Bewertung des Laugungs- effekts
		PAF	2,09	9,06	0,0	0
<i>Sphingomonas melonis</i>	DSM-No: 14444	Mast	1,23	9,09	0	0
		Mast mit 2% Glycerin	1,20	9,03	0	0
<i>Streptomyces acidiscabies E13</i>		Mast	0,83	8,69	0	0
		MM				
<i>Yarrowia lipolytica</i>	DSM-No: 3286	Förster 2006	24,8	2,4	10,6	+++

P: Probe, KMO: Kontrolle Mikroorganismen (ohne LP), KLP: Kontrolle LP (ohne Mikroorganismen). Bewertung des Laugungseffekts: -: Wachstumshinhibition durch LP, 0: keine Laugung, +: geringer Laugungseffekt, +++: hoher Laugungseffekt.

Versuche mit *Yarrowia lipolytica*

Detaillierter sollen die Laugungsergebnisse zu *Yarrowia lipolytica*, ein Organismus, der für seine Produktion von Zitronensäure bekannt ist, dargestellt werden. Um die Zitronensäureproduktion anzuregen, wurde der Stamm in einem Stickstoff-Mangelmedium kultiviert (siehe Tab. A1). Um mögliche Fällungen von SE mit Phosphat aus dem Medium auszuschließen, wurden außerdem Versuche durchgeführt, in denen das Kaliumphosphat durch Kaliumchlorid bzw. Kaliumcarbonat ersetzt wurde. Das Wachstum der Mikroorganismen war vor allem in den Ansätzen mit Kaliumchlorid gehemmt, die maximale OD₆₀₀ betrug nur rund 13 im Vergleich zu 17 bei der Variante mit Phosphat. Dennoch sank der pH-Wert in allen Ansätzen mit Mikroorganismen auf 2-2,5. Die höchsten Mengen an SE konnten entsprechend Abb. 7 in den Ansätzen mit Phosphat gelautet werden. Folglich hatte der Ersatz des Kaliumphosphats durch andere Kaliumverbindungen keinen positiven Einfluss auf den Laugungseffekt und eine mögliche Präzipitation der Seltenen Erden als Phosphate scheint vernachlässigbar zu sein. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Versuche in Medium mit Phosphat durchgeführt.

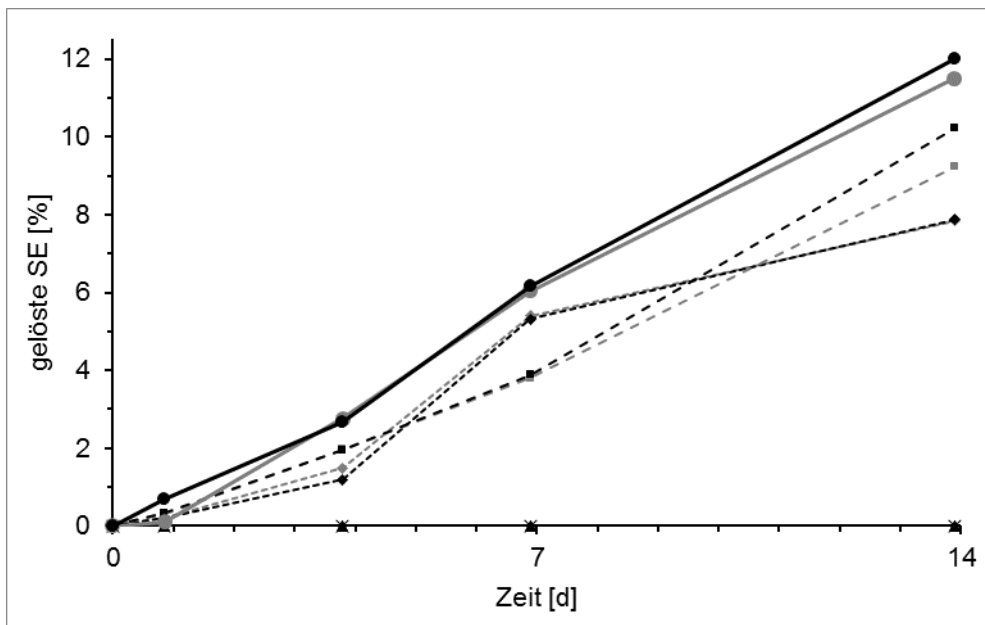


Abb. 4: Laugung von Leuchtpulver mit der Hefe *Y. lipolytica* auf Variationen des Mediums nach Förster (siehe Anhang). ○ Originalmedium, □ Ersatz des Phosphats durch KCl, ◇ Ersatz des Phosphats durch K₂CO₃, Kontrolle: nur mit Leuchtpulver (△) und nur mit Mikroorganismen (X).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden weitere Versuche durchgeführt. Zunächst wurde die Laugung in Medium mit Phosphat genauer untersucht. Dazu wurden die Ergebnisse von insgesamt 17 Wiederholungen ausgewertet. Die durchschnittliche Laugung betrug 10,6% nach 2 Wochen. Allen Ansätzen gemeinsam war das Absinken des pH-Wertes während der Laugung (Abb. 5 links). Daher wurde neben dem Glucose-Verbrauch auch die Säureproduktion untersucht. Auffällig ist, dass in den Proben die Glucose-Konzentration schneller sinkt, aber auch die Zitronensäurekonzentration schneller steigt als in der Kontrolle mit Mikroorganismen aber ohne Leuchtpulver (Abb. 5 rechts). Dies zeigt, dass in den Ansätzen mit Mikroorganismen und Leuchtpulver mehr Säure gebildet wurde. Ob und durch welche Bestandteile des Leuchtpulvers die Säureproduktion angeregt wurde, wäre weiter zu untersuchen.

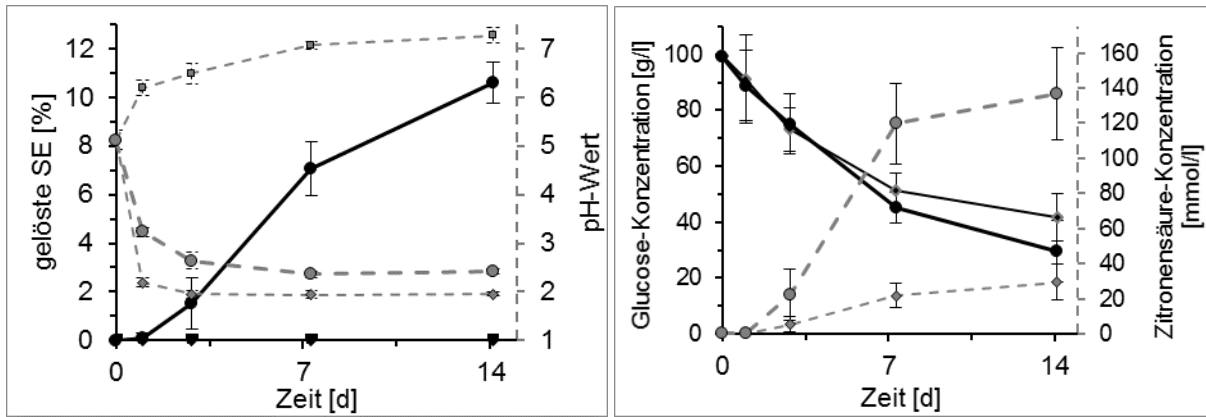


Abb. 5: Laugung mit *Y. lipolytica* auf Medium nach Förster.

Links: prozentual gelöste SE (durchgezogene Linie) und pH-Wert (gestrichelte Linie) im Überstand. Rechts: Glucose-Konzentration im Medium (durchgezogene Linie) und gebildete Zitronensäure (gestrichelte Linie). ○ Probe mit Mikroorganismen und Leuchtpulver, □ Kontrolle mit Leuchtpulver, ◇ Kontrolle mit Mikroorganismen.

Die Laugung der einzelnen Selten-Erd-Elemente aus dem Leuchtpulver wurde genauer untersucht. Die Laugungsraten der Seltenen Erden bezogen auf die Ausgangsmenge im Leuchtpulver sind in Abbildung 6 links dargestellt. Es wird ersichtlich, dass hauptsächlich Yttrium und Europium gelaut wurden.

Europium dotiertes Y_2O_3 ist mit einem Anteil von rund 10% eine wichtige Komponente des Leuchtpulvers und eine Hauptkomponente der Farbstoffe (s. Abb. 2). Mit Europium dotiert sind mehrere Komponenten. Andere wichtiger Komponenten, die SE enthalten, sind $LaPO_4:Ce^{3+}, Tb^{3+}$. $CeMgAl_{11}O_{19}:Tb^{3+}$, $BaSi_2O_5$ und $BaMgAl_{10}O_{17}:Eu^{2+}$. Weder Ce noch La konnten in signifikanten Mengen detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass vor allem das dotierte Y_2O_3 gelaut wird und evtl. Eu aus den übrigen Farbstoffen, während z.B. $LaPO_4$ sehr inert ist. Weitere Experimente mit reinem Yttriumoxid und reinem Lanthanphosphat bestätigten dies. So konnten in 2 Wochen über 3% Yttriumoxid gelöst werden, jedoch weniger als 0,1% Lanthanphosphat.

Optimierungsversuche

Ferner wurden alternative, preiswertere Energiequellen in der Nährlösung wie Rohglycerin oder Sonnenblumenöl getestet, um Möglichkeiten für eine industrielle Anwendung zu evaluieren, für die die Verwendung preiswerter Substrate für die Kultivierung der Mikroorganismen essenziell ist (Abb. 6 rechts). Die Laugungsraten nach 2 Wochen waren mit 5,1% für Rohglycerin und 5,0% für Sonnenblumenöl zwar nur etwa halb so hoch wie bei der Verwendung von reiner Glucose, aber die prinzipielle Ersetzbarkeit der C-Quelle konnte nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass mit reinem Glycerin deutlich niedrigere Laugungsraten erzielt wurden als mit Rohglycerin. Möglicherweise können Verunreinigungen im Rohglycerin als zusätzliche Nährstoffe genutzt werden.

In weiteren Versuchsansätzen wurde die Glucose-Konzentration verdoppelt um zu überprüfen, ob damit die Säureproduktion und folglich die Laugungsraten gesteigert werden können. Wie aus dem Diagramm ersichtlich, war eine solche Erhöhung des Laugungseffekts jedoch nicht möglich. Auch eine Erhöhung der Durchmischung durch die Verwendung eines Ultraschall-Schüttlers anstelle des Rotationsschüttlers führte zu keiner weiteren Steigerung der Laugung.

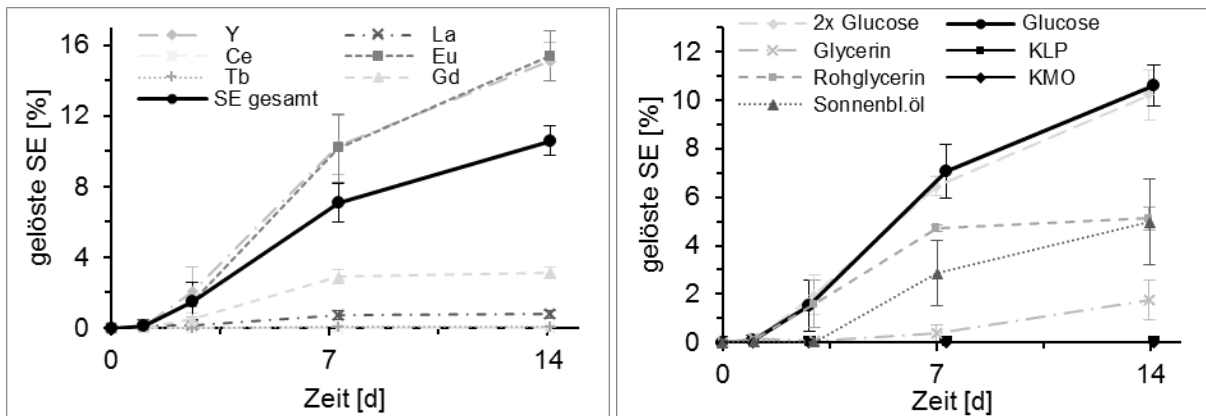


Abb. 6: Laugung mit *Y. lipolytica*.

Links: Aufschlüsselung der Laugung der einzelnen Selten-Erd-Elemente im Leuchtpulver. Rechts: Variation der C-Quelle im Medium (Sonnenbl.öl...Sonnenblumenöl)

Standardmäßig wurden die Laugungsversuche nach 14 Tagen abgebrochen. Die bislang gezeigten Ergebnisse zeigen jedoch, dass das Maximum in diesem Zeitraum noch nicht erreicht wurde. In weiteren Experimenten wurde daher die Versuchszeit verlängert. Des Weiteren wurden Möglichkeiten zur sequenziellen Laugung untersucht, d.h. das gelaugte LP wurde erneut mit frischem Medium versetzt. In Abb. 7 sind die Ergebnisse unterschiedlicher Versuchsansätze dargestellt.

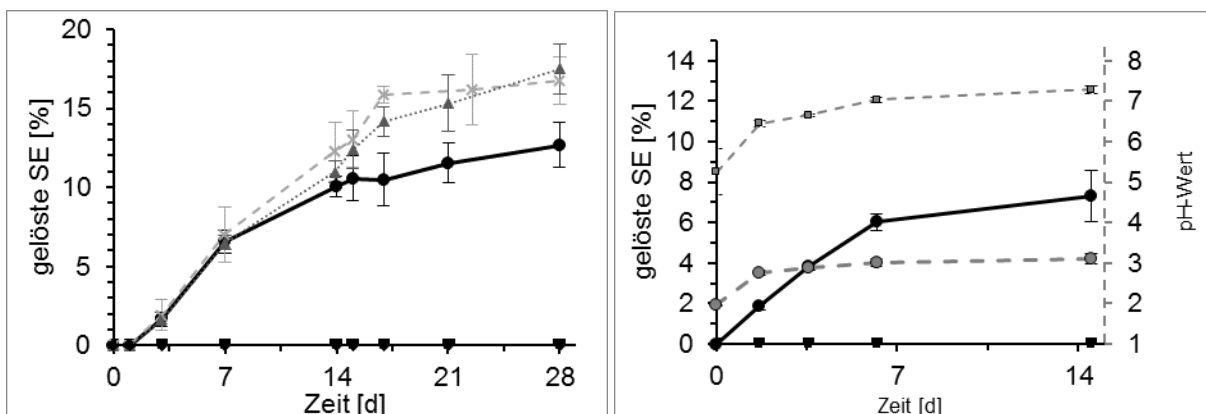


Abb. 7: Laugung mit *Y. lipolytica*.

Links: Verlängerung des Versuchszeitraums auf 28 d. Proben: ○ Laugung ohne Unterbrechung, X Mikroorganismen und Leuchtpulver nach 14 Tagen abzentrifugiert und mit frischem Medium versetzt, △ Mikroorganismen und Leuchtpulver nach 14 Tagen abzentrifugiert, Mikroorganismen mit frischem Medium angeimpft, □ Kontrolle mit Leuchtpulver, ◇ Kontrolle mit Mikroorganismen. Rechts: Laugung mit Kulturüberstand von *Y. lipolytica*: ○ Probe: Leuchtpulver mit Kulturüberstand, □ Kontrolle: Leuchtpulver mit Medium.

Die Verlängerung der Versuchszeit um 2 Wochen erhöht die Ausbeute an Seltenen Erden um rund 2,6%. Wird der Ansatz zusätzlich abzentrifugiert und mit frischem Medium versetzt, ist der zusätzliche Laugungseffekt etwa doppelt so hoch. Der Austausch des Mediums und Neubeimpfung mit Mikroorganismen hat einen ähnlichen Einfluss. Bei Betrachtung Laugung der einzelnen Elemente wird deutlich, dass jedoch weiterhin hauptsächlich Yttrium und Europium aus dem Rotfarbstoff gelaugt wird.

Während des Laugungsprozesses lagerten sich Partikel an der Oberfläche der Hefen an (siehe Abb. 8 links). REM-EDX-Untersuchungen ergaben, dass diese Partikel Seltene Erden enthalten. Es handelt sich also entweder um die Partikel des Leuchtpulvers, oder um sekundär gebildete Präzipitate mit den gelösten Seltenen Erden.

Untersuchungen von Laugungsmechanismen

Um eine mögliche Präzipitierung der Seltenen Erden durch die Mikroorganismen zu untersuchen, wurden Dialysereaktoren entworfen, in denen die Mikroorganismen getrennt vom Leuchtpulver inkubiert werden können (Abb. 8 rechts). Diese Reaktoren besitzen zwei Reaktionskammern, die durch eine Dialysemembran getrennt werden. Die Dialysemembran ermöglicht es, dass das Kulturmedium zwischen beiden Kammern ausgetauscht werden kann und sowohl Metabolite als auch die gelösten Elemente aus dem Leuchtpulver diffundieren können. Diese Reaktoren wurden erst gegen Projektende in Betrieb genommen und die Versuche dauern hierzu noch an.

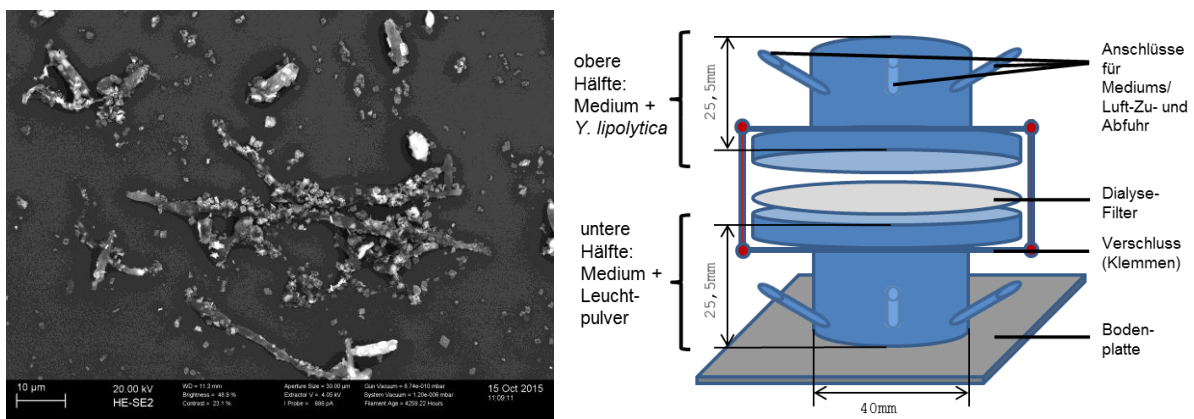


Abb. 8: REM-Aufnahme und Dialysereaktor. Links: REM-Aufnahme von *Y. lipolytica* nach 2-wöchiger Laugung mit Leuchtpulver. Rechts: Schematischer Aufbau des Dialyse-Reaktors.

Um den biogenen Einfluss der Laugung, also Einflüsse einer direkten Interaktion der Bakterien mit dem LP zu untersuchen, wurde die Eignung von Kulturüberstand von *Y. lipolytica* zur Laugung von Leuchtpulver getestet. Dazu wurde die Hefe für 2 Wochen kultiviert und anschließend der Überstand durch Zentrifugation und Sterilfiltration gewonnen. Auch mit dieser Lösung konnten Seltene Erden aus Leuchtpulver gelaut werden (Abb. 7 rechts). Allerdings ist die Ausbeute deutlich geringer, als wenn die Mikroorganismen direkt zugesetzt wurden. Dem gegenüber steht der Vorteil, dass die Laugungsrückstände nach Beendigung des Prozesses nicht mit Biomasse verunreinigt sind und damit weiteren Aufbereitungsschritten direkt zur Verfügung stehen.

Wie Tabelle 3 zeigt, enthielten die Überstände der mit LP versetzten Kulturen eine höhere Säurekonzentration als die Überstände der Kulturen ohne LP. Dies kann die Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Laugungsversuche mit weiteren Organismen

Neben den Versuchen mit der Hefe *Y. lipolytica* wurden auch mit den beiden anderen beiden gut laugenden Mikroorganismen, dem Milchsäure-Bakterium *L. casei* und dem Essigsäure-Bakterium *K. xylinus* sowie deren Kulturüberständen weiterführende Experimente gemacht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert Tabelle 3. Die höchsten Laugungsraten nach 2 Wochen konnten mit 12,6% bei der direkten Inkubation von *K. xylinus* mit Leuchtpulver erzielt werden. Bei der Bewertung für eine Anwendung ist jedoch zu bedenken, dass dieser Stamm Cellulose bildet.

Hierdurch kommt es zu Ausbildung großer Zellagglomerate. Die LP-Partikel können in die Cellulosematrix eingelagert werden und sind dann für eine Verwertung nicht mehr zugänglich.

Tabelle 3: Übersicht über Laugungsraten und Säuremengen bei der Inkubation von Mikroorganismen sowie deren Kulturüberständen mit Leuchtpulver

Stamm	Laugung mit Mikroorganismen		Laugung mit Kulturüberstand	
	mittlere Laugung nach 2 Wochen abzüglich Laugung durch das Medium	gebildete Säuren nach 2 Wochen	mittlere Laugung nach 2 Wochen abzüglich Laugung durch das Medium	Säuren im Kulturüberstand
<i>Y. lipolytica</i>	≈ 10,6 %	≈ 151 mmol/l Zitronensäure ≅ 453 mmol/l COOH	≈ 7,3 %	≈ 34 mmol/l Zitronensäure ≅ 102 mmol/l COOH
<i>Lactobacillus casei</i>	≈ 5,0 %	≈ 200 mmol/l Milchsäure ≅ 200 mmol/l COOH	≈ 4,6 %	≈ 179 mmol/l Milchsäure ≅ 179 mmol/l COOH
<i>Komatsgatibacter xylinus</i>	≈ 12,6 %	≈ 63 mmol/l Zitronensäure, 33 mmol/l Gluconsäure, 9 mmol/l Tartarsäure ≅ 240 mmol/l COOH	≈ 3,4 %	≈ 48 mmol/l Zitronensäure, 26 mmol/l Gluconsäure, 6 mmol/l Tartarsäure ≅ 182 mmol/l COOH

Allen drei Stämmen gemeinsam ist die Bildung von organischen Säuren während der Kultivierung. Unterschiede bestehen allerdings in der Art und Menge der Säuren. So bildet *Y. lipolytica* zwar die größte Menge an COOH-Äquivalenten, die höchste Laugung tritt jedoch bei *K. xylinus* auf. Die Laugung scheint demzufolge nicht nur von der Säuremenge, sondern auch von der Art der Säure abhängig. Auch eine direkte Interaktion der Mikroorganismen mit dem Leuchtpulver oder weitere gebildete Metabolite wie Siderophore könnten eine Rolle spielen.

Weiterhin ist auffällig, dass mit den Kulturüberständen grundsätzlich weniger Seltene Erden gelaugt wurden als bei direktem Kontakt der Mikroorganismen mit dem Leuchtpulver. Gleichzeitig ist die Säuremenge in den Kulturüberständen geringer, als nach 2 wöchiger Inkubation von Mikroorganismen und Leuchtpulver. Möglicherweise wird also durch die puffernde Wirkung des Leuchtpulvers die Säureproduktion angeregt und damit die Laugung erhöht. Zusätzlich könnte auch

die direkte Interaktion der Mikroorganismen mit dem Leuchtpulver zu einer Erhöhung des Laugungseffekts beitragen.

Laugung mit Additiven

Neben organischen Säuren könnten auch metallbindende organische Komplexbildner wie Siderophore an der Laugung beteiligt sein. Um dies zu überprüfen, wurden mit dem kommerziell erhältlichen Desferrioxamin E als Modellverbindung Versuche durchgeführt. Jeweils 0,1g Leuchtpulver in Eppendorf-Reagenzgefäßen wurden mit 1ml Laugungslösung versetzt und für eine Woche auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Als Konzentration wurden 0,83M Desferrioxamin bzw. bei den organischen Säuren 0,83M COOH eingesetzt. Die Ergebnisse der Laugung sind in Abb. 9 dargestellt. Im Vergleich zu den synthetischen organischen Säuren werden bei gleicher Bindungsstellenanzahl durch das Siderophor Desferrioxamin nur sehr geringe Mengen Seltene Erden gelaugt. Auch Vergleiche von sauren Kulturüberständen mit Überständen von Siderophorebildenden Mikroorganismen bestätigen sich diese Ergebnisse. Werden Säuren und Siderophore gemischt, konnte nur bei der Kombination aus Essigsäure und Desferrioxamin eine Laugungssteigerung über den additiven Effekt hinaus erreicht werden. Ferner wurde mit diesen Versuchen die Vermutung aus den Experimenten mit Kulturüberständen bestätigt, dass die Laugungseffizienz vor allem von der Art der organischen Säure abhängt.

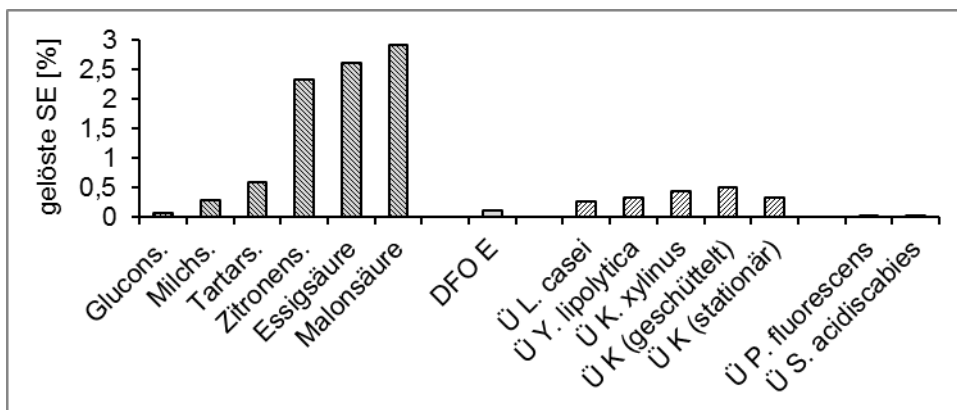


Abb. 9: Laugung von 0,1g Leuchtpulver mit 1ml Laugungslösung im Eppendorf-Reagenzgefäß für 1 Woche auf dem Rotationsschüttler.

s.: Säure, jeweils 0,83mol/l COOH, DFO E: 0,83M Desferrioxamin E, Ü: steriler Kulturüberstand, K: Kombucha.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass prinzipiell eine mikrobiologische Laugung der SE-Komponenten mit heterotrophen Mikroorganismen möglich ist. Die Laugung wird durch die Bildung von organischen Säuren beeinflusst. Als Laugungsagenzien sind insbesondere Gluconsäure und Citronensäure aktiv. Insbesondere Citronensäure wirkt als Komplexbildner für zahlreiche Elemente, auch für Seltene Erden [13]. Diese Eigenschaft begünstigt den Laugungsprozess.

AP2 Versuche zur Laugung von Phosphaten und Oxiden mittels azidogenen Schwefeloxidieren (Chemolitho-autotrophe Laugung)

Für die chemolitho-autotrophe Laugung wurden die Stämme *Acidithiobacillus ferrooxidans* und *A. thiooxidans* als „klassische“ Laugungsbakterien ausgewählt. Beide Stämme benötigen für ihr Überleben ein saures Milieu (pH < 2,5).

Die Auflösung des Leuchtpulvers führt zu einer Erhöhung des pH, was für das Wachstum der acidophilen Bakterien ungünstig ist. Für die Versuche mit *A. ferrooxidans* wurde daher der pH reguliert und auf pH 2 eingestellt. Parallel durchgeführte Kontrollexperimente zeigen, dass bereits durch das saure Medium SE freigesetzt werden. Ein deutlicher Unterschied zu den biologischen Proben ist nicht zu erkennen (Abb. 10). Berechnungen zeigen, dass nur etwa 3 % der Seltenen Erden durch mikrobielle Aktivitäten freigesetzt werden (Tab. 4). Es ist daher davon auszugehen, dass der biogene Einfluss sehr gering ist.

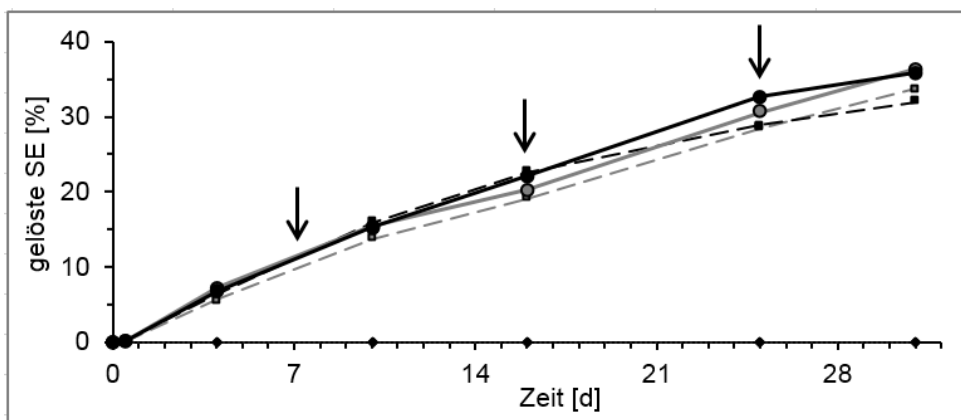


Abb. 10: Laugung mit *A. ferrooxidans*.

Doppelbestimmung (jeweils schwarze und graue Linie), ○ Probe mit Mikroorganismen und Leuchtpulver, □ Kontrolle mit Leuchtpulver, ◇ Kontrolle mit Mikroorganismen. Graue Pfeile markieren die Fed-Zeitpunkte.

Im Falle von *A. thiooxidans* wurde auf eine nachträgliche Ansäuerung und Beibehaltung des pH verzichtet. Die Auflösung des LPs führte jedoch zu einem pH-Anstieg, was sich negativ auf das Wachstum der Bakterien auswirkte. Die Laugungsrate war mit 0,19 %/d* l dementsprechend gering (Tab. 4).

Tabelle 4: Zusammenfassung der Laugungsergebnisse mit den chemolitho-autotrophen Mikroorganismenstämmen

Stamm	Bezugsquelle	Medium (Zusammensetzung siehe Anhang)	Wachstum	mikrobielle Laugung bei Versuchsende [%]	durchschnittliche mikrobielle Laugung/Tag*Liter [%/d*l]
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	DSM-No: 14882	DSMZ 882	Wachstum gehemmt durch Anstieg des pH-Wertes durch LP, Wachstum erst nach starker Ansäuerung des Mediums	3,27 (nach 31d)	3,52
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	DSM-No: 14887	DSMZ 71	Wachstum stark gehemmt durch Anstieg des pH-Wertes durch LP	0,04 (nach 14d)	0,19

LP: Leuchtpulver.

In der Literatur wird oft für die Biolaugungsreaktionen elementarer Schwefel oder Pyrit zugesetzt, werden nicht-sulfidische Minerale oder Materialien gelaugt. Durch diese Zugabe produzieren die Organismen biogene Schwefelsäure, die das Medium ansäuert und eine Freisetzung der Elemente bewirkt. Im Projekt wurde dieser Ansatz nicht verfolgt, da ein weiterer Zusatz von Feststoffen, gerade von Schwefelverbindungen, ein Recycling des Leuchtpulvers erschwert und der Einsatz von Schwefelsäure als kritisch für die Umwelt eingeschätzt wird. Der Anstieg des pH macht eine kontinuierliche Kontrolle und Ansäuerung des Mediums und einen entsprechend hohe Zusatz an elementarem Schwefel erforderlich. Die Durchführung von Laugungsversuchen im neutralen bis basischen Bereich und Nutzung von heterotrophen Mikroorganismen ist daher der umweltfreundlichere Ansatz.

AP3: Versuche zur Laugung von Oxiden und Phosphaten mittels anaeroben Mikroorganismen

Metallreduzierende Bakterien wie *Shewanella oneidensis* oder *Desulfovibrio desulfuricans* können Elektronen auf verschiedene Akzeptoren wie Nitrit, Nitrat, Thiosulfat, Eisen, Mangan oder Uran übertragen und dadurch Energie gewinnen. Ob eine Verbindung als Elektronenakzeptor wirken kann, wird durch ihr Redoxpotenzial bestimmt. Vergleiche von Redoxpotenzialen verschiedener anorganischer Verbindungen und Metalle mit La(III) und Y(III) zeigen, dass die Redoxpotenziale dieser beiden Elemente im Gegensatz zu den anderen Elementen stark negativ sind (Tab. 5). Diese Elemente sind daher energetisch sehr schlechte Elektronenakzeptoren. Eine mikrobielle Reduktion dieser Elemente ist daher nicht möglich und es wurden keine Experimente durchgeführt.

Tabelle 5: Standardpotentiale von ausgewählten Verbindungen und Elementen

Oxidierter Form	Reduzierte Form	Standardpotential E° in V
U(VI)	U(IV)	+0,33
Fe(III)	Fe(II)	+0,77
Mn(IV)	Mn(II)	+1,23
Thiosulfat	Schwefel	+0,6
Pd(II)	Pd(0)	+0,915
Cr(VI)	Cr(III)	+1,33
Y(III)	Y(0)	-2,37
La(III)	La(0)	-2,38

Elemente, die durch *Desulfovibrio* reduziert werden, sind grau markiert.

Eine weitere Möglichkeit, Metalle mikrobiell zu laugen stellt die mikrobielle Oxidation der Elemente dar. Bezogen auf die Seltene Erden enthaltenden Farbstoffe im Leuchtpulver erscheint aber auch diese Variante nicht möglich, da die Seltenen Erden in den Farbstoffen schon in der höchsten Oxidationsstufe vorliegen.

AP4-AP6: Vergleich und Bewertung der verschiedenen Verfahren und Mikroorganismen hinsichtlich ihrer Laugungseffizienz, Übertragung der in AP1 bestimmten Laugungsbedingungen und ausgewählten Mikroorganismen auf die Laugung von sekundären Rohstoffen, Durchführung von Laugungsversuchen mit Mischkulturen

Da insbesondere Laugungsversuche mit der Mischkultur „Kombucha“ detaillierter untersucht wurden, werden die Ergebnisse aus AP4-AP6 in einem gemeinsamen Abschnitt dargestellt.

Laugungsversuche mit dem „Teepilz“ Kombucha und Charakterisierung

Beim „Kombucha-Teepilz“ handelt es sich um eine symbiotische Mischkultur aus Hefen und Bakterien. Es gibt keine einheitliche Zusammensetzung, aber als Hauptorganismen werden in der Literatur immer wieder verschiedene Hefen (z.B. der Gattungen *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*) und Essigsäurebakterien genannt [14]. Diese Mischkultur ist bekannt dafür, dass sie viele verschiedene organische Säuren bildet. Im Haushalt wird die Kultur zur Fermentierung von gesüßtem Grünen Tee verwendet, der dann eine gesundheitsfördernde Wirkung haben soll. Die Essigsäurebakterien bilden dabei eine Matrix aus bakterieller Cellulose in die alle anderen Mikroorganismen eingelagert werden, sodass eine gallertartige Schicht an der Oberfläche des Mediums entsteht. Dadurch lässt sich das Medium leicht von der Kultur abtrennen.

Für Laugungsexperimente bietet die Kultur verschiedene Vorteile:

- Einfache Verfügbarkeit (in vielen Haushalten vorhanden)
- Einfache Kultivierbarkeit in preiswertem Medium (gesüßter grüner Tee)

- Hält sich selber steril, zusätzliche Sterilisierung nicht notwendig und keine Kontaminationsgefahr
- Bildung einer Vielzahl verschiedener organischer Säuren

Für die Laugungsversuche wurde eine Kombucha-Kultur eines lokalen Haushaltes verwendet. Zur Identifizierung der Mikroorganismen der Kultur wurden 16SrDNA-Analysen durchgeführt. Diese Analysen konnten zwei Organismen identifizieren: die Hefe *Zygosaccharomyces lentus* (DSM-103078) und das Essigsäurebakterium *Komagataeibacter hansenii* (DSM-103118). Laugungsversuche wurden sowohl mit der Mischkultur als auch mit den isolierten Organismen durchgeführt. Die Kulturüberstände wurden mittels HPLC analysiert, um Metabolite zu identifizieren.

Eine gute Durchmischung des Substrates begünstigt die eine effiziente Laugung. Andererseits erfolgt die Kultivierung von Kombucha üblicherweise bei stationären Bedingungen ohne Schütteln. Für die Untersuchungen wurden sowohl Schüttelversuche als auch Versuche mit stationären Kulturen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 11 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass innerhalb von 14 Tagen mit den Kombucha Mischkulturen durchschnittlich ca. 8 % der Seltenen Erden aus LP gelöst werden konnten, zum Teil wurden sogar Werte über 12 % erhalten. Ein Vergleich von Schüttelkulturen mit stationären Kulturen weist eine höhere Ausbringung für die Schüttelkultur nach, obwohl die Wachstumsbedingungen für diese Kultur nicht optimal waren (K1 und K2). Noch größer waren die Unterschiede bei den Versuchen, in denen zellfreier Kulturüberstand verwendet wurde (Ük_1 und Ük_2). Dies zeigt die Bedeutung einer guten Durchmischung des Substrates für die Laugung. Vergleicht man die Ergebnisse der Überstände mit den Ergebnissen der Kulturen, so sieht man, dass die Laugung bei der Verwendung der Überstände signifikant gesteigert werden konnte (K2 und Ük_2). Die Überstände wurden optimalen Kulturbedingungen produziert und enthalten daher viele mikrobielle Metabolite. Der Stoffwechsel und damit die Metabolitproduktion können durch die Anwesenheit des Leuchtpulvers bzw. durch das Schütteln jedoch beeinträchtigt sein. Vergleicht man die Laugungsraten mit den Ergebnissen von Einzelisolaten (*Zygosaccharomyces lentis* und *Komagataeibacter hansenii*), so sieht man, dass die Hefe alleine gar nicht laugt und das Bakterium, obwohl es verschiedene organische Säuren produziert, wesentlich weniger SE als die Mischkultur in Lösung bringt (H2 und B2). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Laugung durch die Mischkultur begünstigt wird. Es kann sein, dass die Mischkultur mehr laugungsaktive Metabolite produziert. Insbesondere die verminderte Produktion der Essigsäure bei dem Bakterienisolat im Vergleich zur Kombucha-Kultur weist darauf hin. Es kann aber auch sein, dass die Organismen in einer Mischkultur (insbesondere die Bakterien) vor einem negativen Einfluss des Substrates geschützt werden.

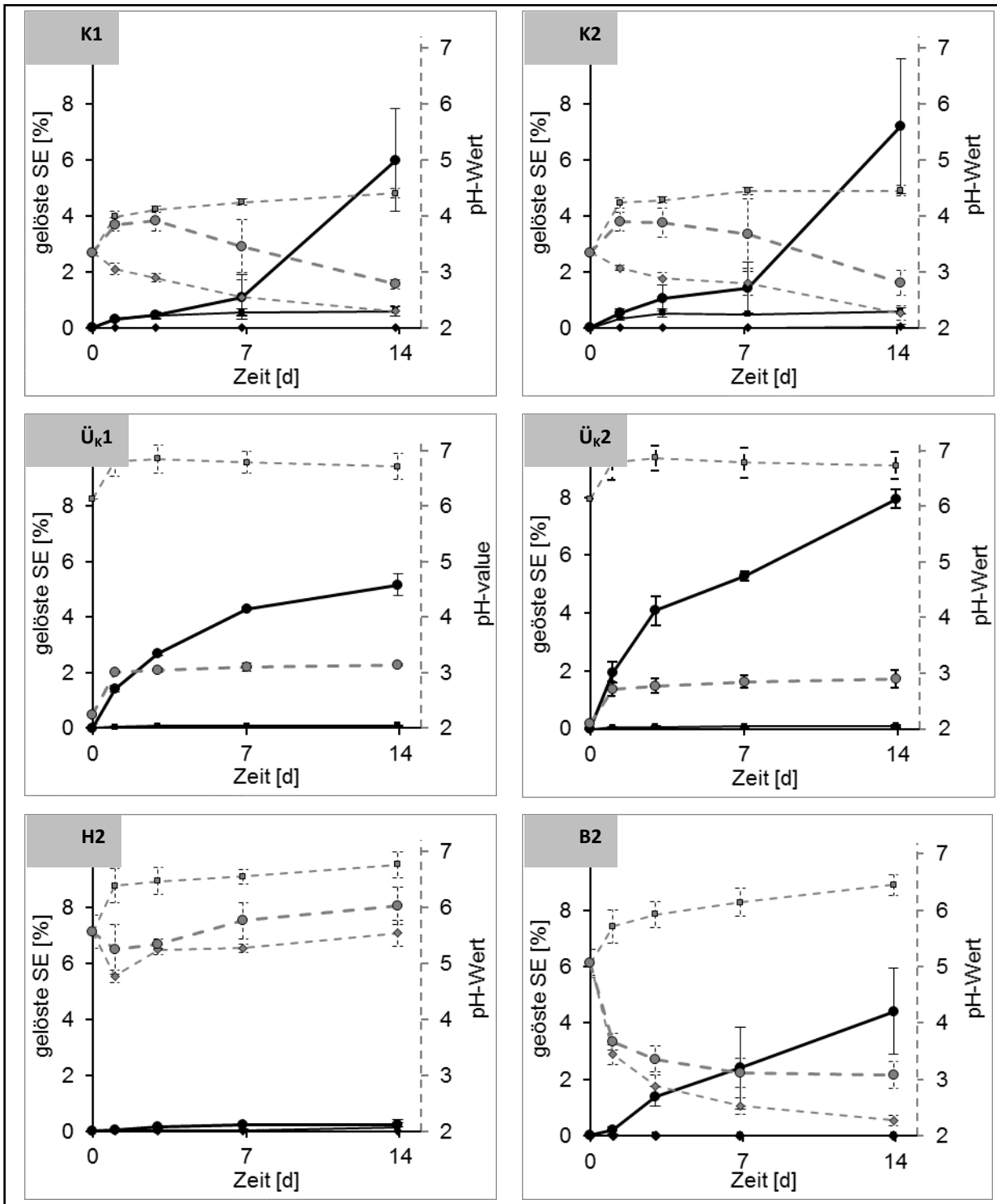


Abb. 11: Relativer Massenanteil der Seltenen Erden (schwarz, durchgezogene Linie) und pH-Entwicklung (grau, gepunktete Linie) im Überstand während der Inkubation.
 K: Kultivierung von Kombucha in Kombucha-Medium; Ü_k: Kulturüberstand einer zwei Wochen alten Kombucha-Kultur; H: *Zygosaccharomyces lentus* Isolat auf YPD-Medium; B: *Komagataeibacter hansenii* auf Medium DSMZ 105; 1: stationäre Kultur; 2: Schüttelkultur. ◊ Kontrolle mit Medium und Mikroorganismus; ◻ Kontrolle mit Medium und LP; ◊ Probe mit Medium, Mikroorganismus und LP.

Mittels HPLC wurde die Bildung von Metaboliten, insbesondere von organischen Säuren, näher analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 zusammengefasst.

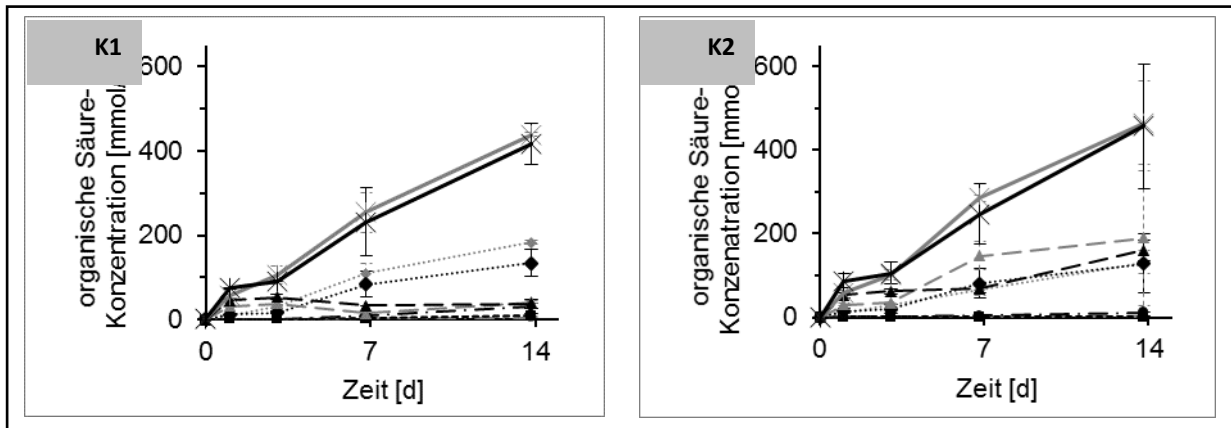


Abb. 12: Produktion von organischen Säuren in Kombucha-Kulturen während der Laugung von LP.

K1: stationäre Kultivierung; K2: Schüttelkultur. X Gesamte COOH Produktion; Δ Essigsäure; ◇ Gluconsäure; ○ Zitronensäure; □ Weinsäure; grau: Kontrolle mit Mikroorganismen; schwarz: Probe mit Mikroorganismen und LP.

Die Daten weisen die Entstehung von Essigsäure, Gluconsäure, Zitronensäure und Weinsäure nach. Die Gesamtproduktion ist weitestgehend unabhängig von Kultivierungsbedingungen, sowie der An- oder Abwesenheit von Leuchtpulver. Hauptsächlich wurden Glucon- und Essigsäure produziert. Allerdings schwanken die Werte, im Gegensatz zu den Laugungsergebnissen, teils erheblich zwischen den einzelnen Versuchsansätzen und lassen sich nur schwer reproduzieren. Dennoch wäre nach den Ergebnissen zu erwarten, dass vor allem Glucon- und Essigsäure zur Laugung beitragen.

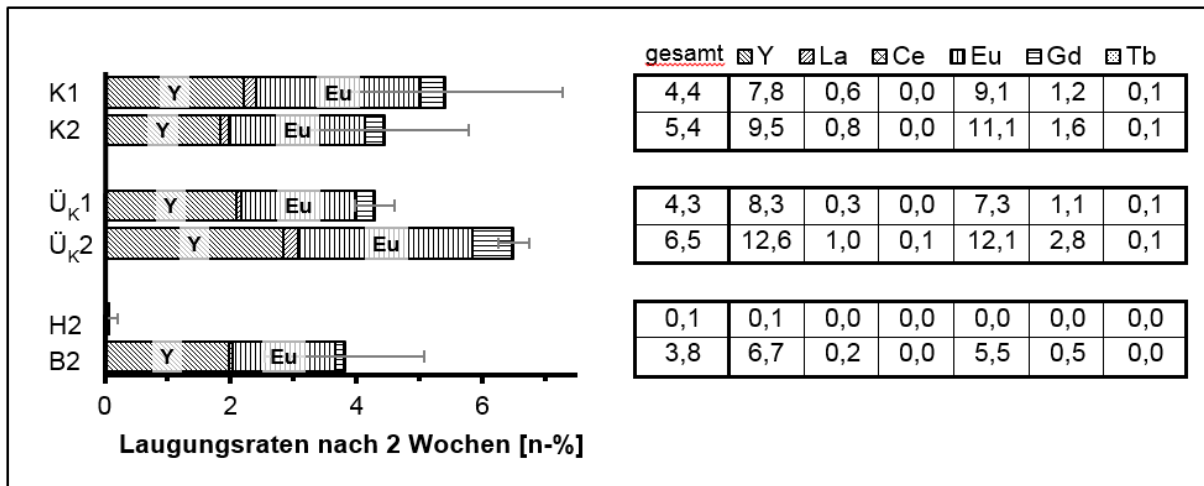


Abb. 13: Vergleich der relativen molaren Laugungsrate von SE abzüglich dem Laugungseffekt des Mediums nach 2 Wochen in mol%.

K: Kultivierung von Kombucha auf Kombucha-Medium; Ü_K: Kultivierungsüberstand einer 2 Wochen alten Kultur; Y: *Zygosaccaromyces lentus* auf YPD Medium; B: *Komagataeibacter hansenii* auf Medium DSMZ 105; 1: stationäre Kultur; 2: Schüttelkultur

In weiteren Analysen wurde die Freisetzung der SE genauer analysiert. Es zeigte sich, dass ähnlich wie bei *Y. lipolytica* vor allem Y und Eu in allen Versuchsansätzen freigesetzt werden (Abb. 13). Es wurde also wieder hauptsächlich der Rotfarbstoff $Y_2O_3:Eu^{3+}$ gelaugt. Um dies zu überprüfen, wurden Laugungsversuche mit reinem Y_2O_3 und $LaPO_4$ Pulver mit Kombucha wiederholt. Nach 2 Wochen

Inkubation waren 60,1 % (stationäre Kultur) bzw. 67,9 % (geschüttelte Kultur) des Y_2O_3 gelöst, während nur 0,01 % des $LaPO_4$ gelöst wurden (beide Varianten).

Für diese Analysen wären eigentlich Analysen der Laugungsrückstände ideal. Allerdings werden viele der LP-Partikel in die Cellulose-Matrix des Kombucha-Pilzes eingelagert und sind für eine Analytik nicht zugänglich. Daher konnten nur die Überstände analysiert werden.

1.4 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, Seltene Erden aus technischen Produkten mittels mikrobieller Laugung zu extrahieren. Mit Hilfe von Screening-Versuchen wurden mehrere Mikroorganismen identifiziert, die für eine Biolaugung infrage kommen.

Im vorliegenden Projekt stellte es sich heraus, dass insbesondere heterotrophe Mikroorganismen, die organische Säuren produzieren, für derartige Laugungsreaktionen geeignet sind. Dabei gibt es allerdings bevorzugte Verbindungen. So sind Seltene-Erd-Aluminate und -Phosphate wie z. B. $LaPO_4$ weitestgehend inert gegenüber den Laugungsreaktionen, während Y_2O_3 gelöst werden kann. Die Laugung ist also sehr selektiv und man könnte sich in einer Anwendung ein sequentielles Recycling vorstellen. Durch die Anwendung von Biolaugung könnte Yttrium selektiv von den anderen Komponenten getrennt werden.

Die Laugungsraten sind allgemein noch sehr niedrig. Nur bis 15 % des Yttriums konnte aus dem LP gelöst werden. Allerdings zeigen Versuche an reinem Y_2O_3 , dass mit > 60 % prinzipiell wesentlich höhere Laugungsraten erreicht werden können. Dies sollte auch für die technischen Materialien möglich sein. Für eine Wirtschaftlichkeit sollte eine Laugung von wenigstens 80 %, besser 100 % erreicht werden können.

Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Anwesenheit von Mikroorganismen für die Laugungsreaktionen nicht zwingend erforderlich ist. Sehr gute Ergebnisse werden auch bei der Verwendung von Kulturüberständen erzielt. Zukünftige Arbeiten sollten sich daher auf die effiziente und ökonomische Produktion von Metaboliten als Laugungsreagenzien konzentrieren.

Mit den bisher erzielten Ergebnissen wurden wesentliche Grundlagen für die Entwicklung von biobasierten Recyclingverfahren für Seltene Erden gelegt und damit bereits wesentliche Projektziele erreicht. Gerade Seltene Erden wurden bislang in biohydrometallurgischen Untersuchungen nur selten untersucht. In der Literatur finden sich Berichte zur Nutzung von Phosphat-lösenden Bakterien für die Extraktion von SE aus Monazit [15, 16] oder Citronensäure bildenden Pilzen für die Extraktion von SE aus Rotschlamm der Aluminiumproduktion [17]. Bereits in den 80er Jahren wurden Versuche zur biologischen Laugung von SE aus Zirkon durchgeführt [18]. Mit *A. ferrooxidans* wurden elementabhängig Laugungsraten zwischen 45 und 92 % erreicht, mit dem gluconsäurebildendem *Acetobacter methanolicus* elementabhängige Laugungsraten zwischen 59 und 89 %. In dem vorliegenden Projekt wurden ähnliche Versuchsansätze für moderne technische Produkte angewendet.

Die Projektergebnisse eröffnen Perspektiven für die Anwendung von Biolaugungsverfahren auch für andere Ressourcen mit Seltenen Erden wie z.B. verschiedene Primärrohstoffe, Reststoffe des Bergbaus, andere Sekundärrohstoffe. So werden die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse gerade erfolgreich auf andere Biolaugungs-Projekte der Gruppe übertragen, wie z.B. die Laugung von Seltenen Erden aus Ionenadsorptionstonen (BMBF-Projekt SEM²).

1.5 Öffentlichkeitsarbeit

Die Projektergebnisse wurden auf mehreren wissenschaftlichen **Konferenzen, Workshops und Symposien** präsentiert:

- Mey, S.; Kutschke, S.; Pollmann, K. (2014) Mikrobielle Laugung von Seltenen Erden aus Leuchtpulver. Aufbereitung und Recycling, 12.-13.11.2014, Freiberg, Deutschland (Vortrag)
- Pollmann, K. Geobiotechnologie: „Grüne“ Technologie zur Metallgewinnung? Vortrag, Seminar zum Stipendienprogramm der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, 02.09.2014, Ostritz/Kloster Marienthal, Deutschland
- Mey, S.; Kutschke, S.; Pollmann, K. (2014) Microbial leaching of Rare Earth Elements from fluorescent phosphor. Microbiology and Infection 2014. Gemeinsamer Kongress von DGHM und VAAM, 05.-08.10.2014, Dresden, Deutschland (Vortrag)
- Mey, S.; Kutschke, S.; Möckel, R.; Pollmann, K. (2014) Microbial leaching of Rare Earth Elements from fluorescent phosphor. EREAN Summer School on Rare Earth Technology, 18.-21.08.2014, Leuven, Belgien (Poster)
- Konsulke, S.; Hopfe, S.; Tolosana-Delgado, R.; Matos Camacho, S.; van den Boogaart, K. G. (2015) Method for constructing a mineralogical composition from a measured sample of single components; The 17th annual conference of the International Association for Mathematical Geosciences, 05.-13.09.2015, Freiberg, Deutschland (Vortrag)
- Pollmann, K.; Raff, J.; Hopfe, S.; Kostudis, S.; Matys, S.; Bertheau, R.; Lehmann, F.; Suhr, M.; Vogel, M.; Flemming, K.; Schönberger, N.; Kutschke, S. (2016) New “green” biotechnical concepts for the recovery of metals from primary and secondary resources. Green & Sustainable Chemistry, 04.-06.04.2016, Berlin, Deutschland (Vortrag)
- Hopfe, S.; Kutschke, S.; Möckel, R.; Pollmann, K. (2015) Screening of different microorganisms for the biological leaching of rare earth elements from fluorescent phosphor. ICBB 2015 BARCELONA, International Conference on Bioengineering and Biotechnology, 15.07.2015, Barcelona, España (Vortrag)
- Hopfe, S.; Kutschke, S.; Möckel, R.; Pollmann, K. (2015) Bioleaching of rare earth elements from fluorescent phosphor with the tea fungus Kombucha. Goldschmidt 2015, 16.-21.08.2015, Prague, Česká republika (Vortrag)
- Hopfe, S.; Kutschke, S.; Pollmann, K. (2015) Mikrobielle Laugung von Seltenen Erden aus Leuchtpulver. Aufbereitung und Recycling, 11.-12.11.2015, Freiberg, Deutschland (Poster)

Vorgesehen ist außerdem das Publizieren dieser Ergebnisse in wissenschaftlichen Fachzeitschriften.

Eine Publikation wurde bereits veröffentlicht und eine weitere eingereicht, die sich gerade im Begutachtungsprozess befindet. Ein bis zwei weitere Publikationen werden gerade vorbereitet (bis 2017):

- Pollmann, K.; Kutschke, S.; Matys, M.; Kostudis, S.; Hopfe, S.; Raff, J. (2016) Novel Biotechnological Approaches for the Recovery of Metals from Primary and Secondary Resources. Minerals 6(2016)54 DOI-Link: <http://dx.doi.org/doi:10.3390/min6020054>

- Hopfe, S., Flemming, K., Lehmann, F., Möckel, R., Kutschke, S., Pollmann, K. (2016) Leaching of Rare Earth Elements from fluorescent powder using the tea fungus Kombucha. Eingereicht bei Appl Microbiol Biotechnol

Der breiten Öffentlichkeit wurden die Ergebnisse auf mehreren *Veranstaltungen* wie „Tag des offenen Labores“ (2014 und 2016) des HZDR, dem Sommerfest der TUBAF (2014) oder Lehrerfortbildungen (2013) präsentiert.

Die Arbeiten wurden im Rahmen einer Promotionsarbeit durchgeführt, so dass auch die *Ausbildung wissenschaftlichen Nachwuchses* gefördert wurde. Die Promotion, und damit auch das Projektthema, wird im Anschluss an das Projekt weitergeführt und mit Institutsmitteln bis 2017 zum Abschluss gebracht.

Weiterführung des Vorhabens, Synergien zu anderen Projekten

Mit den Arbeiten konnten erstmals Erkenntnisse zur biologischen Laugung von Seltenen Erden gewonnen werden. Die Ergebnisse können auch für andere Projekte am HIF, insbesondere Bioleaching-Projekte, verwendet werden. So sind sie eine wichtige Grundlage für das im Jahr 2015 begonnene Projekt SEM², bei dem Seltene Erden aus Ionenadsorptionstönen biologisch gelaugt werden. Recycling von Seltenen Erd-Komponenten aus Leuchtpulver ist ebenfalls Thema im EU FP7 Marie-Curie-Projekt „MinePep“ (2015-2017). Hier werden LaPO₄-bindende Peptide entwickelt, die zur selektiven Abtrennung von LaPO₄-Partikeln aus Leuchtpulver eingesetzt werden sollen. Die analytischen Daten zur Zusammensetzung des Leuchtpulvers sind für dieses Projekt eine wichtige Grundlage.

Im Rahmen des Projektes konnten wichtige Kontakte zu Forschungs- und Firmenpartnern geknüpft werden, die in zukünftigen Verbundprojekten als Kooperationspartner oder Berater mitwirken möchten (z.B. Firma Walch-Recycling, Lars Walch GmbH & Co. KG).

Eine direkte technologische Umsetzung und Verwertung der Ergebnisse im Anschluss an das Projekt kann allerdings nicht erfolgen. Hierfür sind weitere Forschungsarbeiten, insbesondere eine Optimierung der Bioleachingrate (derzeit nur 12 %, erforderlich wäre > 80%), eine ökonomische Bewertung und ein Up-Scaling notwendig.

1.6 Fazit

Für die Laugungsversuche wurde im Projekt das Leuchtpulver aus Energiesparlampen ausgewählt, da dieses hohe Konzentrationen an Seltenen Erden enthält, bislang nicht recycelt wird und für die Versuche gut zugänglich war. Die Arbeiten umfassten eine detaillierte Analytik des Ausgangsmaterials und die Durchführung von Laugungsversuchen mit verschiedenen Mikroorganismen und Verfahren.

Das Ziel des Projektes, die Erbringung eines „proof of principle“ für die biologische Laugung von Seltenen Erden, wurde erreicht. Dabei wurden Laugungsraten von > 12 % und 65 % für reines Y₂O₃ erzielt. Des Weiteren wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Seltenen-Erd-Komponenten des Leuchtpulvers nachgewiesen.

Die derzeitigen erzielten Raten sind für die Umsetzung in ein tatsächliches industrielles Recyclingverfahren noch zu niedrig. Hierfür sind weitere Untersuchungen, z.B. Einsatz anderer Stämme, Optimierung von Metabolit-Produktion, sequenzielle Laugung, Optimierung von

Laugungsbedingungen notwendig. Allerdings wurde die Grundlage für weitere Forschungen im Gebiet „Biolaugung von kritischen Elementen aus nicht-sulfidischen Rohstoffen“ bereitet. Ergebnisse dieses Projektes werden bereits in anderen Projekten (z.B. BMBF-Projekt SEM²) verwendet. Somit ist eine nachhaltige Nutzung der Forschungsergebnisse gegeben.

1.7 Literaturangaben

1. Schüler, D., et al., *Study on rare earths and their recycling. Final Report for The Greens/EFA Group in the European Parliament*. 2011, Öko-Institut e.V. Freiburg: Freiburg.
2. MEP, *The explanation of compiling emission standards of pollutants from rare earth industry*. 2009, Ministry of Environmental Protection.
3. UNEP, *Recycling rates of metals - a status report, a report of the working group on the global metal flows to the international resource panel*, T.E.A. Graedel, J.; Birat, J.-P.; Reck, B. K.; Sibley, S. F.; Sonnemann, G.; Buchert, M.; Hagelüken, C., Editor. 2011, International Resource Panel of the United Nations Environment Programme (UNEP).
4. Wojtalewicz-Kasprzak, A., *Erzeugung von synthetischen Selten-Erd-Konzentraten aus Leuchtstoffabfällen*. 2007, TU Clausthal: Clausthal.
5. Asabe, K., et al., *Recycling of rare earth magnet scraps: Part I carbon removal by high temperature oxidation*. . *Materials Transactions*, 2001. 42: p. 2487-2491.
6. Luidold, S., ed. *Urban Mining von Seltenen Erden*. . *Recycling Magazin*. Sonderhft: Metallrecycling. 2010, Montanuniversität Leoben.
7. Otto, R. and A. Wojtalewicz-Kasprzak, *Method for recovery of rare earths from fluorescent lamps*, O. GmbH, Editor. 2009.
8. Rabah, M., *Recyclable recovery of europium and yttrium metals and some salts from spent fluorescent lamps*. *Waste Management*, 2008. 28: p. 318-325.
9. Tzanetakakis, N. and K. Scott, *Recycling of nickel-metal hydride batteries. I: Dissolution and solvent extraction of metals*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004. 79(9): p. 919-926.
10. Tzanetakakis, N. and K. Scott, *Recycling of nickel-metal hydride batteries. II: Electrochemical deposition of cobalt and nickel*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2004. 79(9): p. 927-934.
11. Rodrigues, L.E.O.C. and M.B. Mansur, *Hydrometallurgical separation of rare earth elements, cobalt and nickel from spent nickel-metal-hydride batteries*. *Journal of Power Sources*, 2010. 195(11): p. 3735-3741.
12. Schimroszyk, B., *Recycling von Yttriumeuropiumoxid aus Altleuchtstoffen*, in *Fakultät für Bergbau, Hüttenwesen und Maschinenbau*. 2004, Technische Universität Clausthal: Clausthal. p. 187.
13. Goyne, K.W., S.L. Brantley, and J. Chorover, *Rare earth element release from phosphate minerals in the presence of organic acids*. *Chem Geol*, 2010. 278: p. 1-14.
14. Chen, C. and B.Y. Liu, *Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation*. *Journal of Applied Microbiology*, 2000. 89(5): p. 834-839.
15. Shin, D., et al., *Use of Phosphate Solubilizing Bacteria to Leach Rare Earth Elements from Monazite-Bearing Ore*. *Minerals*, 2015. 5(2): p. 189-202.
16. Hassanien, A.G., O.A.N. Desouky, and S.S.E. Hussien, *Bioleaching of some Rare Earth Elements from Egyptian monazite using Aspergillus ficuum and Pseudomonas aeruginosa*. *Walailak J Sci & Tech*, 2014. 11(9): p. 809-823.
17. Qu, Y. and B. Lian, *Bioleaching of rare earth and radioactive elements from red mud using Penicillium tricolor RM-10*. *Bioresource Technology*, 2013. 136: p. 16-23.
18. Glombitza, F., U. Iske, and M. Bullmann, *Mikrobielle Laugung von Seltenen Erdelementen und Spurenelementen*. *Bioengineering*, 1988. 4: p. 37-43.

19. Delvasto, P., et al., *Mobilization of phosphorus from iron ore by the bacterium Burkholderia caribensis FeGL03*. Miner Eng, 2009. 22(1): p. 1-9.
20. Förster, A., *Die Nutzung der Hefe Yarrowia lipolytica zur Produktion von Citronensäure aus nachwachsenden Rohstoffen, in Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften*. 2006, Technische Universität Dresden: Dresden. p. 155.
21. Buescher, J.M. and A. Margaritis, *Microbial Biosynthesis of Polyglutamic Acid Biopolymer and Applications in the Biopharmaceutical, Biomedical and Food Industries*. Critical Reviews in Biotechnology, 2007. 27: p. 1-19.
22. Haferburg, G., et al., "*Ni-struvite*" – A new biomineral formed by a nickel resistant *Streptomyces acidiscabies*. Chemosphere, 2008. 72: p. 517-523.
23. Difco™ & BBL™ Manual, n.E., *Pseudomonas Agars: Pseudomonas Agar F (Flo Agar), Pseudomonas Agar P (Tech Agar)*, D.a.C.B. Becton, Editor. 2015.
24. Soliman, N.A., M.M. Berekaa, and Y.R. Abdel-Fattah, *Polyglutamic acid (PGA) production by Bacillus sp. SAB-26: application of Plackett–Burman experimental design to evaluate culture requirements*. Biotenologycal Products and Process Engeneering, 2005. 69: p. 259–267.
25. Uy, D., et al., *A method for the determination of pyruvate carboxylase activity during the glutamic acid fermentation with Corynebacterium glutamicum*. Journal of Microbiological Methods, 1999. 39: p. 91-96.

1.8 Anhang

Tabelle A1: Herstellung und Zusammensetzung der verwendeten Medien. Sofern nicht anders angegeben wurden die Lösungen für 20min bei 121°C autoklaviert und nach der Sterilisation vereinigt, sodass die angegebenen Endkonzentrationen erreicht wurden.

Medium	Herstellung
Delvasto 2009 [19]	10 g/l Glucose, 5 g/l $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0,25 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,2 g/l KCl, 0,1 g/l $(NH_4)_2SO_4$
DSMZ 11	10 g/l Casein-Pepton (tryptisch verdaut), 10 g/l Fleischextrakt, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Glucose, 1 g/l Tween 80, 2 g/l KH_2PO_4 , 8,29 g/l Na-Acetat $\times 3H_2O$, 2 g/l $(NH_4)_2$ -Citrate, 0,2 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,05 g/l $MnSO_4 \times 1H_2O$
DSMZ 71	3 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$, 3 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 0,25 g/l $CaCl_2 \times 2H_2O$ → pH auf 4,4-4,7 mit H_2SO_4 einstellen 5 g/l $Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$ → steril filtrieren
DSMZ 105 ohne $CaCO_3$	100 g/l Glucose, 10 g/l Hefeextrakt
DSMZ 393	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 20 g/l Glucose
DSMZ 882	132 mg/l $(NH_4)_2SO_4$, 53 mg/l $MgCl_2 \times 6H_2O$, 27 mg/l KH_2PO_4 , 147 mg/l $CaCl_2 \times 2H_2O$, 950 ml/l destilliertes Wasser → pH-Wert auf 1,8 mit 10 N H_2SO_4 einstellen 20 g/l $FeSO_4 \times 7H_2O$ → pH-Wert auf 1,2 mit 10 N H_2SO_4 einstellen → bei 112 °C für 30 min autoklavieren 62 µg/l $MnCl_2 \times 2H_2O$, 68 µg/l $ZnCl_2$, 64 µg/l $CoCl_2 \times 6H_2O$, 31 µg/l H_3BO_3 , 10 µg/l Na_2MoO_4 , 67 µg/l $CuCl_2 \times 2H_2O$ 950ml Lösung 1, 50ml Lösung 2 und 1ml Lösung 3 mischen
Förster 2006 [20]	1g/l $(NH_4)_2SO_4$, 1g/l KH_2PO_4 , 0.16 g/l $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 0.7g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0.5g/l NaCl, 0.4g/l $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ → steril filtrieren 500 µg/l H_3BO_3 , 40 µg/l $CuSO_4 \times 5H_2O$, 40 µg/l KI, 303,084 µg/l $MnSO_4 \times 1H_2O$, 200 µg/l $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$, 400 µg/l $ZnSO_4 \times 7H_2O$ → steril filtrieren 6000 µg/l $FeCl_3 \times 6H_2O$ (gelöst in 200 µl Ethanol) → steril filtrieren 300 µg/l Thiamin-HCl → steril filtrieren

Medium	Herstellung
	60 mg/l Leucine, 20 mg/l Uracil → steril filtrieren 100 g/l Glucose
Kombucha	10 g/l Grünen Tee in kochendes Wasser geben, erkalten lassen 140 g/l Haushaltszucker in kochendes Wasser geben, erkalten lassen → beide Lösungen im Verhältnis 1:1 mischen (Endkonzentration 5 g/l Grüner Tee, 70 g/l Saccharose)
Mast (mit 2% Glycerin)	10 g/l Mast, 20 ml/l Glycerin
Medium E [21]	80 g/l Glycerin, 20 g/l L-Glutaminsäure, 12 g/l Zitronensäure, 7 g/l NH ₄ Cl, 0,5 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O, 0,5 g/l K ₂ HPO ₄ , 0,15 g/l CaCl ₂ x 2H ₂ O, 0,104 g/l MnSO ₄ x 1H ₂ O, 0,04 g/l FeCl ₃ x 6H ₂ O → pH-Wert auf 7 mit NaOH einstellen
MM [22]	10 g/l Glucose, 0,5 g/l L-Asparagin, 0,5 g/l K ₂ HPO ₄ , 0,2 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O, 0,01 g/l FeSO ₄ x 7H ₂ O
PAF [23]	10 g/l pankreatischer Verdau von Casein, 10 g/l Proteose-Peptide, 10 g/l Glycerin, 1,5 g/l K ₂ HPO ₄ , 3,07 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O
[24]	20 g/l Glucose 18,344 g/l K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O, 6 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,41 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O, 8 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ → steril filtrieren 2,78 mg/l FeSO ₄ x 7H ₂ O, 1,47 mg/l CaCl ₂ x 2H ₂ O, 1,69 mg/l MnSO ₄ x 1H ₂ O, 1,363 mg/l ZnCl ₃ → steril filtrieren
[25] without citrate or desferoxamin	60 g/l Glucose 3.76 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 6 g/l KH ₂ PO ₄ , 2 g/l NaCl, 8 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,4 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O → steril filtrieren 40 mg/l FeSO ₄ x 7H ₂ O, 3,9 mg/l FeCl ₃ → steril filtrieren 0,9 mg/l ZnSO ₄ x 7H ₂ O, 0,3 mg/l CuCl ₂ x 2H ₂ O, 3,9 mg/l MnSO ₄ x 1H ₂ O, 0,1 mg/l (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O → steril filtrieren 0,3 mg/l Na ₂ B ₄ O ₇ x 10H ₂ O → steril filtrieren 4 mg/l Biotin, 20 mg/l Thiamin, 2.31 g/l Glycin-Betain x 1H ₂ O → steril filtrieren