

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
Biotatec OÜ

Baasmetallide bioleostamine e-jäätmetest *Aspergillus niger*'iga

Bakalaureusetöö

12 EAP

Karl Joosep Põldsepp

Juhendajad MSc Jaan Vihalemm

Kaasprofessor PhD Priit Jõers

TARTU 2024

Baasmetallide bioleostamine e-jäätmetest *Aspergillus niger*’iga

Bakalaureusetöö

Karl Joosep Pöldsepp

Lühikokkuvõte. Maailmas toodetakse igal aastal üle 50 miljoni tonni e-jäätmeid. Tänu suurenevale nõudlusele elektroonikaseadmete järele on e-jäätmetest saanud kõige kiiremini kasvav tahkete jäätmete liik, kuid olemasolevad viisid taaskasutamiseks on energiakulukad ja suure reostusohuga. Bioleostamine on alternatiivne lahendus, mis võimaldab metallide selektiivset eraldamist e-jäätmetest. Käesolevas töös rakendati baas- ja raskmetallide bioleostamiseks e-jäätmetest filamentse seene *A. niger* 3;320 tüve mida kultiveeriti 20-liitrisel bioreaktoris. Lisaks hinnati e-jäätmete eeltötluse mõju baas- ja raskmetallide bioleostamise efektiivsusele.

Märksõnad: Bioleostamine, e-jäätmed, *Aspergillus niger*

CERCS teaduseriala: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia, T450 Metallitehnoloogia, metallurgia, metallitooted, T490 Biotehnoloogia

Bioleaching of base metals from e-waste with *Aspergillus niger*

Bachelor’s thesis

Karl Joosep Pöldsepp

Abstract. Around 50 million tons of e-waste is generated each year worldwide. Due to the increasing demand for electronic devices, e-waste has become the fastest-growing type of solid waste. Existing recycling methods are energy-intensive and pose significant environmental risks. An alternative solution is bioleaching, which allows for the selective recovery of metals from e-waste. In this study a filamentous fungus strain *A. niger* 3;320, cultivated in 20 litre bioreactor, was used for bioleaching base and heavy metals from e-waste. Additionally, the effect of pretreatment on the efficiency of bioleaching was evaluated.

Keywords: Bioleaching, e-waste, *Aspergillus niger*

CERCS research specialization: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology, T450 Metal technology, metallurgy, metal products, T490 Biotechnology

SISUKORD

SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 E-jäätmed.....	7
1.1.1 E-jäätmetega seotud ohud	8
1.1.2 E-jäätmete ümbertöötlemine.....	9
1.2 Bioleostamine	11
1.2.1 Ajalugu	11
1.2.2 Tänapäev	12
1.2.3 Bioleostamise protsess	15
1.2.4 Redoksolüütiline bioleostamine	16
1.2.5 Atsidolüütiline bioleostamine	17
1.2.6 Kompleksolüütiline bioleostamine	19
1.3 Filamentsed seened	21
1.3.1 Bioleostamise heterogeensus	23
2 UURIMUS.....	26
2.1 Töö eesmärgid	26
2.2 Materjalid ja metoodika	26
2.2.1 Substraat.....	26
2.2.2 <i>A. niger</i> 'i kultiveerimine	26
2.2.3 Substraadi eeltöötlus.....	30
2.2.4 Substraadi metallsisalduse määramine.....	30

2.2.5	Mikrotsentrifuugi tuubide pesemine	32
2.2.6	E-jäätmete bioleostamine	32
2.2.7	Bioleostamisproovide metallisisalduse määramine.....	34
2.3	Tulemused.....	35
2.3.1	E-jäätmete metallisisaldus ja eeltötlus.	35
2.3.2	<i>A. niger</i> 'i kultuuri pH muutused söötmetel ja inokulumidel	36
2.3.3	Metallide leostamine <i>A. niger</i> 'i väikeses (800 mL) mahus kasvatatud kultuuriga.....	38
2.3.4	Metallide leostamine <i>A. niger</i> 'i 20-liitrisel bioreaktoris kasvatatud kultuuriga.....	40
2.3.5	E-jäätmete elektronmikroskoopia enne ja pärast bioleostamist.....	45
2.4	Arutelu	47
KOKKUVÕTE		50
SUMMARY		51
KASUTATUD KIRJANDUS.....		53
VEEBILEHED		58
LIHTLITSENTS		59

KASUTATUD LÜHENDID

A. Niger	<i>Aspergillus niger</i>
Atsetüül-Co	Atsetüülkoensüüm A
DSMZ	Saksamaa tüvekultuurikollektsioon
ICP-MS	Induktiivselt ühendatud plasma massispektrometria (ingl. <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ppm	osakest miljoni kohta (ingl. <i>parts per million</i>)
ppt	osakest triljoni kohta (ingl. <i>parts per trillion</i>)
rpm	pöördeid minutis (ingl. <i>revolutions per minute</i>)
SEM	skaneeriv elektronmikroskoop
WEEE	Elektri- ja elektroonikaseadmete jäätmed (ingl. <i>Waste Electrical and Electronic Equipment</i>)
WLIB	Kasutatud liitiumioon mobiiltelefoni akud (ingl. <i>Waste Li-ion battery</i>)
WPCB	Kasutatud trükkplaadid (ingl. <i>Waste Printed Circuit Board</i>)

SISSEJUHATUS

Tarbimise hulga suurenemine ja tehnoloogia kiire arengu tõttu on elektri- ja elektroonikaseadmete jäätmetest saanud aina suurenev jäätmeliik. Iga aasta toodetakse maailmas üle 50 miljoni tonni e-jäätmeid. Ainult 20% e-jäätmetest saab korrektselt käideldud ja taaskasutatud. Üheks põhjuseks on sobiliku ümbertöötlusprotsessi puudumine, mis konkureeriks konventsionaalse pürometallurgiaga. Otsitav tehnoloogia peab olema majanduslikult tasuv e-jäätmete taaskasutamisel ja paiskama vähem kasvuhoonegaase. Tänapäeva tööstuslikud e-jäätmete käitlejad keskenduvad kulla ja vase eraldamisele ning enamik väärtuslikke metalle, nende hulgas baasmetallid ja väärtuslikud muldmetallid, jäävad taaskasutusse võtmata. Lisaks jäävad pürometallurgilisel meetodil eraldamata toksilised metallid, mis võivad keskkonda sattudes põhjustada reostust ja terviseriske. Lahenduseks võib olla e-jäätmete rikastamine mikroorganismidega ehk bioleostamine, mis potentsiaalselt aitab ka lahendada konventsionaalsete meetodite metallide eraldamise selektiivuse puudumist. Tööstuslikult on välja arendatud ja rakendatakse tehnoloogiaid kulla ja vase eraldamiseks maakidest ja e-jäätmetest, kuid uurimist vajavad veel lahendused baas- ja raskmetallide eraldamiseks, näiteks heterotroofsete filamentsete seente teostatud bioleostamine.

Antud töö kirjanduslikus osas antakse ülevaade e-jäätmetest, bioleostamise ajaloost, arengust ja protsessist ning filamentsete seente kasutamisest e-jäätmete rikastamiseks. Töö uurimuslikus osas teostatakse e-jäätmete eeltöötlus, *A.niger*'l kultiveerimine, söötme optimeerimine ja teostatakse bioleostamiskatsed ning proovide analüüs.

Käesoleva töö eesmärk on uurida *A. niger*'i potentsiaali baas- ja raskmetallide selektiivsel bioleostamisel e-jäätmetest ning skaleerida antud lahendus 20-liitrise bioreaktori mahule. Töö teostati Biotatec OÜ-s.

1 KIRJANDUSE ÜLEVADE

1.1 E-jäätmed

Elektri- ja elektroonikaseadmete jäätmetest ehk e-jäätmetest, ingliskeelses kirjanduses tuntud ka kui WEEE (ingl. *Waste Electrical and Electronic Equipment*), on saanud tänu üha suurenevale nõudlusele tehnoloogia järele uus kasvutrendis jäätmeliik. Nende hulka kuuluvad erinevad majapidamistes, ettevõtetes ja riikide taristus kasutatavad ära visatud elektoonikat sisaldavad seadmed, näiteks köögitehnika, telefonid, tööstuselektronika, sülearvutid ja kliimaseadmed (Forti *et al.*, 2020). Iga aasta toodetakse maailmas üle 50 miljoni tonni e-jäätmeid, millest ainult alla 20% jõuab nõuetele vastavasse taaskasutusse (Forti *et al.*, 2020). Eelkõige on see tingitud sobiva ümbertöötamise protsessi puudumisest, millega seotud probleeme kirjeldatakse detailsemalt allpool. Kõige rohkem e-jäätmeid toodetakse aastaga Aasias (24,9 miljonit tonni), Euroopas koguneb aastaga 12 miljonit tonni e-jäätmeid, mis on inimese kohta 16,2 kg ja teeb Euroopast suurima e-jäätmete tootja *per capita*. Samas on Euroopa ka suurim e-jäätmete käitleja ja taaskasutaja, töödeldes korrektselt 42,5% kogutud e-jäätmetest (Forti *et al.*, 2020).

E-jäätmed on heterogeenne metalli, plastiku, keraamika ja klaasi fraktsioonide segu, mille osakaal ja täpne koostis varieerub tugevalt olenevalt seadmete tüübist, mudelist, tootjast ja vanusest. Metalliline osa koosneb ülekaalukalt rauast, vasest ja alumiiniumist (Al-Khatib & Fraige, 2024). Lisaks sisaldavad e-jäätmed ka ohtralt teisi metalle, nende hulgas ka mitmeid kriitilisi toormeid nagu koobalt ja gallium ning haruldasi muldmetalle nagu düsproosium ja neodüümium. Erilist huvi pakuvad e-jäätmetes leiduvad väärismetallid nagu kuld, hõbe ja pallaadium, mille kontsentratsioon on sageli palju suurem kui looduslikes maakides. Näiteks võib teatud tüüpi e-jäätmetes ehk trükkplaatides kulla sisaldus ulatuda kuni 1600 osakeseni miljoni kohta, mis ületab keskmise kullamaagi kontsentratsiooni (18 osakest miljoni kohta) ligi sajakordselt. Selline kõrge kontsentratsioon teeb e-jäätmetest atraktiivse ressursi väärismetallide taaskasutamiseks (Dhanunjaya Rao *et al.*, 2020).

E-jäätmetes leidub keskkonnale ja inimeste tervisele ohtlikke mürgiseid raskmetalle, näiteks kaadmium, plii ja elavhõbe, mis tekitavad mitmeid tehnoloogilisi ja keskkonna-alaseid probleeme (Dhanunjaya Rao *et al.*, 2020; Rai *et al.*, 2021; Sethurajan *et al.*, 2019). Lisaks sisaldavad e-jäätmed

toksilisi orgaanilisi ühendeid, näiteks broomitud leegiaeglusteid ning kloro- ja hüdroklorofluorühendeid, mis võivad lastel, kes puutuvad kokku e-jäätmetega, tekitada kilpnäärme hormoonide probleeme ja vaimse arengu aeglustumist (Lebbie *et al.*, 2021). Tabelis 1 on toodud näiteid eri liiki e-jäätmetes leiduvatest metallidest.

Tabel 1. Erinevates E-jäätme liikides esinevad metallid.

Jäätmeliik	Metallid	Allikas
Trükkplaadid	Cu, Au, Ag, Al, Co, Fe, Ni, Pb, Pd, Sn, Sb, Zn	Khaliq <i>et al.</i> , 2014
Liitium-ioonakud	Cu, Al, Co, Li, Mn, Ni	Naseri <i>et al.</i> , 2022
Mobiiltelefon	Cu, Au, Ag, Al, Fe, In, Nd, Ni, Pb, Pd	Hsu <i>et al.</i> , 2019
Vedelkristallekraanid	Cu, Al, As, Fe, In, Mo, Sn, Zn	Schuster & Ebin, 2021
Luminofoorlambid	Sc, La, Ce, Nd, Pr, Y	Patil <i>et al.</i> , 2022
Fotogalvaanilised elemendid	Cu, Al, Cd, In, Mo, Zn	Li <i>et al.</i> , 2023
Valgusdiodid	Cu, Au, Ag, Cd, In, Hg	Cenci <i>et al.</i> , 2020

1.1.1 E-jäätmetega seotud ohud

Kuna e-jäätmed sisaldavad toksilisi elemente ja ühendeid, võib ebakorrekne e-jäätmete käitlemine põhjustada ohtlikku keskkonnareostust, mõjutades nii looduslikke ökosüsteeme kui ka põllumajandust ja seeläbi ka inimeste tervist (Zhang *et al.*, 2018). Samuti muudab see reostusohu tõttu e-jäätmete taaskasutamise keerukaks ja kulukaks. Näiteks keerukate sorteerimis- ja töötlemistehnoloogiate kasutamine enne metallide eraldamist suurendab oluliselt kogu protsessi maksumust ja keerukust (Al-Khatib & Fraige, 2024; Torrubia *et al.*, 2023). Seetõttu on teravaks probleemiks e-jäätmete import arengumaadesse, kus prügikäitlemine on vähem reguleeritud, järelvalve puudulik ja tööjõud odavam. Selleks kasutatakse erinevaid pool-legaalseid ja illegaalseid meetodeid, nagu näiteks e-jäätmete dokumenteerimine kasutuselt kõrvaldatud elektroonikaseadmetena – kuna need võivad mõnikord olla parandatavad ja taaskasutatavad, ei kehti neile samad impordipiirangud mis e-jäätmetele. Seda olukorda ära kasutades eksporditakse taaskasutamiseks mõeldud seadmete asemel tegelikult e-jäätmeid (Forti *et al.*, 2020). Arengumaades toimub e-jäätmete kogumine ja taaskasutamine suures osas läbi mitteametlikult tegutsevate isikute, kes müüvad e-jäätmed edasi parandamiseks või demonteerimiseks. Demonteerijad eraldavad e-jäätmetest taaskasutatavad komponendid ja põletavad, leostavad ning sulatavad komponente sekundaarseteks toormeteks (Forti *et al.*, 2020). Selline

regulatsioonideta, primitiivseid meetodeid kasutatav taaskasutusahel põhjustab tõsist kahju keskkonnale ja suurendab terviseriske nii prügiga kokkupuutuvatele töötajatele kui ka lähikonnas elavatele inimestele, eriti lastele ja rasedatele naistele (Diaz *et al.*, 2020). Joonisel 1 on foto lapsest, kes kannab e-jäätmeid läbi prügi põletamisest tekkiva suitsu.



Joonis 1. Poiss kandmas e-jäätmeid prügimäel Ghanas. Autor: (Loeffelben, 2011)

E-jäätmete negatiivse mõju vähendamiseks on hädavajalik arendada uusi tehnoloogiaid raskmetallide eraldamiseks ja parandada e-jäätmete käitlemise regulatsioone.

1.1.2 E-jäätmete ümbertöötlemine

E-jäätmed on terav keskkonnaprobleem ning samaaegselt potentsiaalne kriitiliste toormete allikas. Samas komplitseerib e-jäätmete ümbertöötlemist materjali heterogeensus ja suur reostusohu, mis vähendab taaskasutamise efektiivsust ja majanduslikku tasuvust. Lahendustena on välja pakutud nii püro-, hüdro-, bio- kui ka hübriidmetallurgilisi lahendusi, millest on tööstuslikult ja laiamahuliselt seni kasutusele võetud vaid pürometallurgiline lähenemine, näiteks Umicore'i tehas Belgias ja Dowa Jaapanis (Dutta *et al.*, 2023; Hagelüken, 2006; Tipre *et al.*, 2021). Umicore'i tehases Hobokeni linnas Belgias toimub e-jäätmete integreeritud sulatamine ja rafineerimine, mille käigus segatakse e-jäätmetele juurde vaske, pliid ja niklit sisaldavaid jääkmaterjale või maake. Antud tehas kasutab IsaSmelt tehnoloogiat, mis hõlmab hapnikuga rikastatud õhu ja kütuse süstimist sulametalli vanni. Plastid ja orgaanilised ained e-jäätmetes

toimivad redutseerijana ja asendavad osaliselt kütust. Protsessi käigus moodustub väärismetallide ja vase sulam, millest eraldatakse väärismetallid elektrorafineerimise teel. (Hagelüken, 2006)

Vastavalt meetodile võivad jääda ülejäänud metallid räbusse koos keraamika ja klaasi fraktsioonidega. Selle meetodi puuduseks on sulatamisel tekkivad toksilised gaasid ja väga suur energiakulu (Hsu *et al.*, 2019). Sulatusprotsessid on majanduslikult tasuvad vaid suurte koguste katkematul töötlemisel ning väärindusjaamade loomine suure algkapitaliga investering, mis nõuab palju tööjõudu, piirates sellist finantsriski aktsepteerivate firmade arvu (Islam *et al.*, 2020). Lisaks on oluline märkida, et keerukate tehnoloogiate rakendamine on piiratud piirkondades, kus puudub tehniline ja regulatiivne taristu (Hagelüken, 2006; Islam *et al.*, 2020).

Hüdrometallurgiline e-jäätmete rikastamine hõlmab eeltöödeldud e-jäätmete leostamist hapete või muu söövitava ainega. Hüdrometallurgia miinusteks on väike selektiivsus, suure hulga jääkvedelikkude tekkimine ja reostusohu, näiteks happete ja toksiliste gaaside eraldumine keskkonda (Li *et al.*, 2019). Tööstuslikult kasutavad hüdrometallurgilist e-jäätmete rikastamist jäätmekäitlejad Indias ja seda kombineeritakse tehastes pürometallurgiaga, näiteks Umicore poolt (Hagelüken, 2006; Yunus & Sengupta, 2016).

Üheks kombineeritavaks lahenduseks on e-jäätmete keemiline eeltöötlus, mis läbi kemikaalidega (näiteks NaOH) orgaaniliste ja keemiliste katete eemaldamise e-jäätmetelt võib suurendada järgnevas metallurgilise rikastamise faasis e-jäätmete metallide eraldamise efektiivsust (Moyo *et al.*, 2020). Kasutuselolevatest meetoditest on pürometallurgia "küpsem" tehnoloogia ja eelistatud ka suurema majandusliku tasuvuse tõttu (Khaliq *et al.*, 2014).

1.2 Bioleostamine

Keskkonnasõbralikumaks alternatiiviks püro- ja hüdro metallurgiale on pakutud bioleostamist, mis on lihtsustatult metallide eraldamine, kasutades mikroorganisme. Bioleostamisel on palju eeliseid eelkirjeldatud meetodite ees, eelkõige väiksem CO₂ emissioon tänu palju madalamale töötemperatuurile (ca 30-37°C). Lisaks ei vaja see protsess ohtlikke/korrosiivseid kemikaale nagu hüdro metallurgia, tekitab vähe (kui üldse) ohtlikke jäätmeid ja on seepärast kohalike kogukondade poolt palju paremini aktsepteeritav. Samuti on bioleostamise protsessid kiirelt ja väikeste kuludega käivituvad ning suletavad, andes protsessile suure paindlikkuse, mis omakorda võimaldab kiiret reageerimist turuolukorrale ja seeläbi suuremat kasumlikkust. Bioleostamine võimaldab teoreetiliselt selektiivset rikastamist, langetab energiakulu ja vähendab reostusohu (Islam *et al.*, 2020; Rene *et al.*, 2021).

1.2.1 Ajalugu

Bioleostamisel on pikk ajalugu, juba antiikaja Hiinas ja Euroopas kasutati vase rikastamiseks vasemaagi leostamist. Mikroorganismide osalus leostamisprotsessis avastati 1947. aastal USAs, kui leiti, et kaevanduste happeline äravooluvesi (ingl. *acid mine drainage*) on põhjustatud püriidi bakteriaalsest oksüdatsioonist ja eraldati protsessis osalevad bakterid *Acidithiobacillus ferrooxidans* ja *Acidithiobacillus thiooxidans* (Ehrlich, 2001). Bioleostamistehnoloogiatel baseeruvad tööstuslikud lahendused hakkasid peagi levima ülemaailmselt, näiteks Tšiili ja Lõuna-Aafrika Vabariigi kaevandustesse. Peamiste tehnoloogiatena kasutati jäätme- (ingl. *dump leaching*) ja kuhjaleostamist (ingl. *heap leaching*) sekundaarsetest vase ja uraaniumi maakidest (Natarajan, 2018). Järgnesid 2000. aastatel uurimistööd baasmetallide bioleostamiseks püsisegamisega mahutites. Arendati välja ka mitmeid kuhjaleostamise ja bioreaktorite häid külgi ühendavaid leostamisprotsesse, näiteks niisutussüsteemidega vaaludes leostamine. Üldiselt kantakse peenestatud maagid 2-10 m kõrgustesse aereeritud kandekivimil kuhjadesse, mida pidevalt niisutatakse ja inokuleeritakse mikroorganismidega (Johnson, 2014). Kogu protsess kestab tavaliselt 60-120 päeva, mille järel kontsentraat eraldatakse ja suunatakse edasisele rikastamisele, näiteks leostamisse tsüaniidiga kulla või elektrorafineerimisse vase puhul (Harvey & Bath, 2007; Johansson *et al.*, 1999).

1.2.2 Tänapäev

Kuigi bioleostamist on rakendatud üle maailma alates eelmise sajandi keskpaigast ja arendatud tehnoloogiaid nii bioreaktorites kui ka kuhjades teiste metallide eraldamiseks, on tööstuslik bioleostamine piirdunud enamasti kulla ja vase rikastamisega. See on eelkõige tänu kahele aspektile – kasutatavate mikroorganismide metabolismist tulenevad piirangud ja kasumlikkus. Tänapäeval eksisteerivad tööstuslikud lahendused põhinevad atsidofiilsetel autotroofidel, mis vajavad oma “töök” väävli ja/või raua esinemist. Selline nõue limiteerib kasutatavaid maake ja seeläbi metalle. Samuti olid bioleostamislahendused piiratud kasumlikkusega, konkureerides odava energia perioodil selget eelist omanud püro- ja hüdro metallurgia lahendustega, mistõttu oli bioleostamine majanduslikult mõistlik vaid kõrge hinnaga metalle (näit. kulda) sisaldavatele materjalidele. Tšiilis rakendatakse bioleostamistehnoloogiat vase eraldamiseks sekundaarsetest sulfiidsetest maakidest. Aastaks 2020 oli Tšiili vase toodang ligi 6 miljoni tonni, mis on kolmandik globaalsest vase toodangust, ning aastal 2010 saadi 16% vasetoodangust bioleostamisega. Viimase kümne aasta jooksul on vähenenud uute bioleostamisprojektide rajamine Tšiilis, mis võib olla põhjustatud bioleostamiseks sobiva mineraali puuduse ja kuhjaleostamise ajamahukuse tõttu. (Roberto & Schippers, 2022)

Biooksüdatsioon on tunnustatud meetod raskesti töödeldavate sulfiidsete kullamaakide töötlemiseks, eriti Lõuna-Aafrikas. Näiteks Fairview kaevanduses kasutatakse BIOX[®] protsessi, mis suurendab kulla leostamise tõhusust, muutes sulfiidse kulla keemiliselt kättesaadavaks leostamiseks tsüaniidiga (Roberto & Schippers, 2022). Tööstuslikud biometallurgia projektid on esitatud tabelis 2.

Viimasel kümnendil on ülemaailmsete rohekokkulepete tõttu suurenenud tähelepanu säästlikumatele tehnoloogiatele ja taastuvenergia arendamisele. Roheliste tehnoloogiatega energia tootmine vajab suurtes kogustes vääris- ja muldmetalle, kuid neid sisaldavad maagid on koondunud üksikute riikide valdusse. Uued tehnoloogiad on tõstnud metallide leostamise efektiivsust, luues võimaluse kasutada toormete allikatena sekundaarseid maake ja jäätmeid, näiteks metallurgiline räbu, tolm, e-romu ja lendtuhk (Kinnunen & Hedrich, 2023). Bioleostamistulemused sekundaarsete toormetega on toodud tabelis 3.

Üheks näiteks sekundaarsete maakide bioleostamisest on Soomes Terrafame Sotkamo (endine Talvivaara) kaevandus. Sotkamo kaevanduses toodetakse bioleostamise teel hinnanguliselt 600

tonni koobaltit aastas, mis moodustas umbes 0,4% globaalsest koobalti toodangust aastal 2020 (Tuomela *et al.*, 2021). Sotkamo kaevanduses kasutatakse kahe kuhjaga bioleostamise meetodit. Esmalt viiakse maak primaarkuhja, kus seda õhutatakse kuhja alumistest osadest ja niisutatakse ringleva veega. Maagi leostamine primaarkuhjas kestab keskmiselt 18 kuud. Seejärel viiakse maak sekundaarsesse kuhja, kus leostamist jätkatakse, et eraldada allesjäänud metallid. Kuhjades tõuseb temperatuur umbes 70 °C-ni peamiselt pürroitiidi ($\text{Fe}_{(1-x)}\text{S}$) oksüdeerumise tõttu. Niisutuslahuse pH on umbes 2, kuid leostamise käigus tõuseb lahuse pH 2,5-3,0-ni. Lahustumise käigus vabaneb erinevaid metalle ja metalloide, mis suurendavad protsessilahuse soolakontsentratsiooni. Bioleostamise tõhususe parandamiseks on katsetatud toitainete lisamist ja erinevaid niisutuslahuse kompositsioone. Sotkamo kaevanduse kuhjades esinevad bioleostamiseks äärmuslikud keskkonningimused, mis esitavad väljakutseid bioleostamise efektiivsusele. (Falagán *et al.*, 2024)

Katseid tehakse ka aina suuremahulisemate segatud mahutite rakendamiseks bioleostamises (Roberto & Schippers, 2022). Samas on majandusliku kahju tõttu mõned projektid lõpetatud, näiteks Minteki ja Mondo Mineralsi projekt nikli bioleostamiseks talgikaevanduse jääkidest Soomes (Neale *et al.*, 2017; Roberto & Schippers, 2022; Elementis plc, 2024). E-jäätmete tööstuslik bioleostamine toimub tänapäeval põhiliselt väärismetallide eraldamiseks (saagikus 90%). Katseprojektides otsitakse alternative tsüaniidile, näiteks tiourea. Reostusohu vähendamiseks uuritakse leostamist näiteks joodi oksüdeerivate bakteritega perekonnast *Roseovarius* (Kudpeng *et al.*, 2020).

Tabel 2. Näited tööstuslikud bioleostamisetevõtmistest ja kulla biooksidatsioonist. Andmete päritolu: (Roberto & Schippers, 2022).

Kaevandus	Asukoht	Operaator	Tootlus (tonni aastas)	Rajatud
Escondida ¹	Tšiili	BHP/Rio Tinto/JECO	180 000 Cu	2007
Doña Inés de Collahuasi	Tšiili	Anglo American/Glencore/Mitsui	56 619 Cu	1995
Terrafame	Sotkamo, Soome	Finnish Minerals Group, Galena, Sampo	28 740 Ni 55 100 Zn 600 Co	2011
Obuasi	Obuasi, Ghana	Anglo Gold Ashanti	6 Au	1994

¹Tootluse hulgas on toodud ka hüdrometallurgiline kloriidleostamine.

Tabel 3. Bioleostamiskatsed sekundaarsete substraatidega.

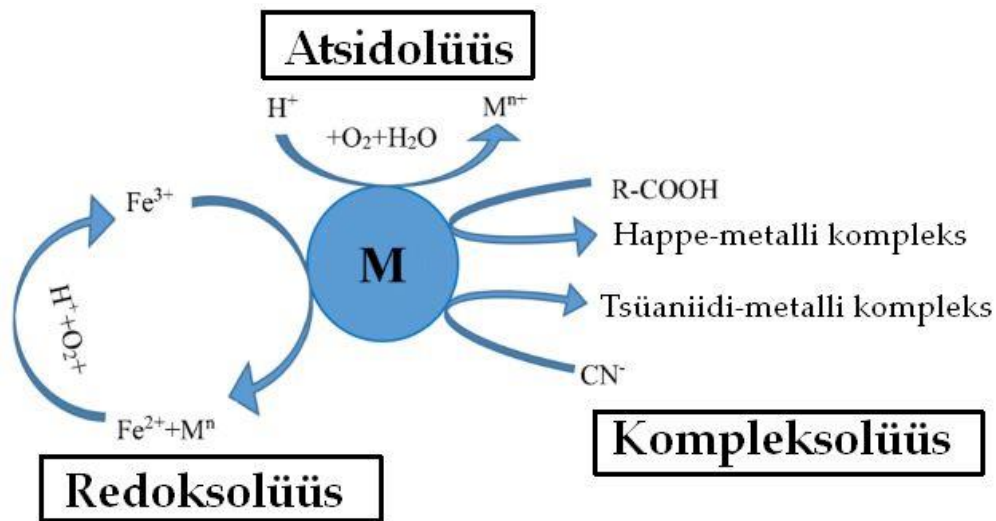
Substraat	Metallid	Mikroorganism	Meetod	Allikas
Vaseräbu	41% Fe 62% Cu 35% Zn 44% Ni	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	85-liitrine reaktor	Kaksonen <i>et al.</i> , 2011
Kalkopüriidi maak	>95% Cu	Termofiilne raua-väävli oksüdeerija	12-liitrine reaktor	Gericke <i>et al.</i> , 2001
Talgikaevanduse jäägid	>95% Ni	Mintek termofiilide kultuur	120-liitrine reaktor	Neale <i>et al.</i> , 2017

1.2.3 Bioleostamise protsess

Bioleostamisprotsessi kulg ja saagikus on mõjutatud mitmetest teguritest, millele tuleb vastavalt eesmärgile tähelepanu pöörata. Tingimusi mõjutavate tegurite hulka kuuluvad mikroobide valik, keskkonna pH, söötmekomponendid, temperatuur, aeratsioon ja substraadi valik (Naseri *et al.*, 2023). Vastavalt substraadi metallilisele koostisele eraldub leostumislahusesse erinevaid metalliioone. Tähelepanu tuleb pöörata vabanevate metallide toksilisusele mikroorganismide elutegevusele, mis võib vähendada bioleostamise efektiivsust. Raskmetallid omavad mikroorganismidele pärssivat mõju läbi ensüümide funktsionaalgruppide blokeerimise, oluliste metallide väljatõrjumise keskkonnast, valkude ja polümeeride konformatsiooniliste tõrgete ning mõju membraani terviklikkusele ja transpordireaktsioonidele (Asghari *et al.*, 2013). Traditsiooniliselt on bioleostamist teostatud, viies bakterirakud kontakti leostatava maagiga. Kontaktbioleostamiseks sobilikud kandidaatorganismid peavad lisaks liksiviandi tootmisele olema suutelised elama kõrge metallisisaldusega leostamislahuses (Yaashikaa *et al.*, 2022). Vastava fenotüübiga mikroorganisme võib leida looduslikult metallirikas keskkonnas elavatest kooslustest, näiteks kaevandustest ja e-jäätmete prügilatest (Thakur & Kumar, 2020). Bioleostamiseks sobilike kandidaatorganismidena on uuritud ja rakendust leidnud erinevad mikroorganismid, näiteks rauda ja väävlit oksüdeerivad *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* ja *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, orgaanilisi happeid tootvad *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus* ja *Penicillium simplicissimum*, biogeenset tsüaniidi tootvad *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus megaterium* ja *Pseudomonas fluorescens* jpt (Naseri *et al.*, 2023; Srichandan *et al.*, 2019). Metallide leostamiseefektiivuse tõstmiseks substraadist võib kasutada liksivianti ehk mikroorganismide kultuuri filtraati. Sellisel juhul ei oma substraadist eralduvad metallid toksilist mõju mikroorganismide kasvule ja bioleostamise viivad läbi mikroorganismide toodetud orgaanilised happed ja metaboliidid (Lobos *et al.*, 2021)

Bioleostamise mehhanisme, mille tulemusena liiguvad metallid lahusesse, saab klassifitseerida atsüdolüütiliseks, redoksolüütiliseks ning kompleksolüütiliseks (Joonis 2) (Li *et al.*, 2021). On

võimalik, et üks mikroorganism põhjustab metallide leostumist läbi mitme, samaaegselt rakenduva efekti (Biswal & Balasubramanian, 2023; Dong *et al.*, 2023).



Joonis 2.

Bioleostamise kolm mehhanismi. M: metallid e-jäätmetes; R-COOH: orgaaniline hape; CN⁻: tsüaniid. Hape ja metallide vaheline kompleksolüüs vajab pH väärtust alla 7, tsüaniidi ja metallide vaheline kompleksolüüs pH väärtust üle 10,5. Joonis: (Li *et al.*, 2021).

1.2.4 Redoksolüütiline bioleostamine

Redoksolüütilises bioleostamises rakendatakse mikroorganismide võimet manipuleerida metallide valentsseisunditega. Kemolitotroofsed mikroorganismid kasutavad elektroni doonorina anorgaanilisi ühendeid, näiteks biometallurgias tuntud mikroorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans* saab elektrone Fe^{2+} ja väävli oksüdeerimisest (Dong *et al.*, 2023). Rauda Fe^{2+}/Fe^{3+} redokspaari standardne redutseerimispotentsiaal (+0,77 V pH 2 juures) on positiivsem kui NAD(P)⁺/NAD(P)H paari potentsiaal (-0,32 V pH 7 juures). Elektronide liikumine Fe^{2+} -st NAD(P)⁺-ni on energeetiliselt ebasoodne, mis tähendab et neid tuleb tõugata "vastuvoolu" redokspotentsiaali gradiendile. Energia selleks tuleb prootonmootorjõust (ingl. *proton motive force*), mis tekib periplasmasmaatilises ruumis rakusisese ja keskkonna pH erinevuse tõttu (väljas pH2, sees pH 7). Lisaks sellele loob prootonite sisenemine raku läbi membraaniga seotud ATP süntetaasi ja nende kasutamine hapniku redutseerimisel veeks reaktsiooni, kus Fe^{2+} oksüdeerimisest pärinevad elektronid kulgevad energeetiliselt soodsas (allamäge) protsessis (Quatrini *et al.*, 2009).

Redoksolüütilise bioleostamise käigus toimub tsükliline biokeemilise oksüdeerimise ja keemilise redutseerimise reaktsioon, mille käigus Fe^{2+} oksüdeeritakse Fe^{3+} -ks ja väävel SO_4^{2-} ja H^+ -ks. Fe^{3+} ja H^+ reageerivad substraadiga tugevate oksüdeerijatena ja võimaldavad metallide leostumist lahusesse (Dusengemungu *et al.*, 2021; Huo *et al.*, 2024). Leostamislahuses olevad Fe^{2+} ioonid oksüdeeritakse mikroorganismide poolt Fe^{3+} ioonideks, mis omakorda redutseeritakse metallisulfiidide poolt tagasi Fe^{2+} ioonideks läbi isevooluliselt kulgeva protsessi, genereerides pidevalt metallide lahustamiseks liksivianti juurde (Desmarais *et al.*, 2020). Redoksolüütiline bioleostamine on võimalik, kui leostamiskeskonna pH on väiksem kui 5, kuid kemotroofsete raua- ja väävlioksüdeerijate bakterite elutegevuseks optimaalne pH on vahemikus 2-2,5 (Dusengemungu *et al.*, 2021).

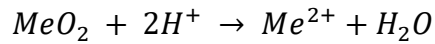
Redoksolüüsi läbiviimist *A. ferrooxidans*-iga limiteerib asjaolu, et leostamiskeskonnas peab leiduma rauda ja väävli, seega näiteks kalkosiini (Cu_2S) leostamiseks on vajalik lisada substraadi hulka rauarikkaid mineraale, näiteks püriiti (FeS_2), e-jäätmete puhul võib olla vajalik elementväävli lisamine (Huo *et al.*, 2024).

1.2.5 Atsidolüütiline bioleostamine

Atsidolüütiline bioleostamine toimub mikroobide poolt toodetud hapete dissotseerumisel tekkivate prootonite (täpsemalt hüdrooniumioonide) reageerimisel substraadi pinnaga. Prootonite doonoriks võivad bioleostamisprotsessides olla heterotroofsete seente sünteesitud orgaanilised happed, näiteks 2-hüdroksü-1,2,3-propaantrikarboksüülhape (sidrunhape, ingl. *citric acid*), etaandihape (oksaalhape, ingl. *oxalic acid*), (2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahüdroksüheksaanhape (glükoonhape, ingl. *gluconic acid*) ja 2-hüdroksübutaandihape (õunhape, ingl. *malic acid*), või kemolitotroofsete bakterite toodetud väävelhape (H_2SO_4 , ingl. *sulfuric acid*) (Desmarais *et al.*, 2020; Dutta *et al.*, 2023).

Happe dissotsiatsioonil lahusesse muutub metalliühendis asuv hapnik lihtsasti protoneeritavaks. Atsidolüüsi käigus kinnituvad prootonid metallimaagi pinnale ja reageerivad sellega. Prootonite reaktsioonil metallioksiididega nõrgestatakse metalliiooni ja hapniku vahelisi sidemeid, mille tulemusena metallioon vabaneb leostamislahusesse (Srichandan *et al.*, 2019). Protoni ja hapniku ühinemine veeks ja metalliiooni eraldumine tahkest faasist on näidatud joonisel 3. Sama

mehhanism toimib ka metallide eraldamiseks e-jäätmetest, näiteks purustatud ja peenestatud trükkplaatidest (Trivedi & Hait, 2024).



Joonis 3. Metalliooni vabanemine reaktsioonil happega. MeO_2 : metallioksiid; Me: metallioon. Joonis: (Dong *et al.*, 2023).

Kemolitotroofsetest bakteritest toodab väävelhapet näiteks *Acidithiobacillus thiooxidans*. *A. thiooxidans* saab energiat elementvääveli oksüdatsioonist, mille käigus tekib väävelhape (Srichandan *et al.*, 2019).

Enamik tööstuslikult olulisi orgaanilisi happeid, mida filamentsed seened toodavad, pärineb tsitraaditsüklist. Looduslikes tingimustes annab seente poolt eritatavate hapete tõttu langetatud pH tase konkurentsieelse neutroofilsete mikroobide ees. Lisaks võib väliskeskkonna hapestamine olla tõhus viis makrotoitainete (fosfor) ja mikrotoitainete (nagu raud, vask ja tsink) lahustamiseks (Cairns *et al.*, 2021).

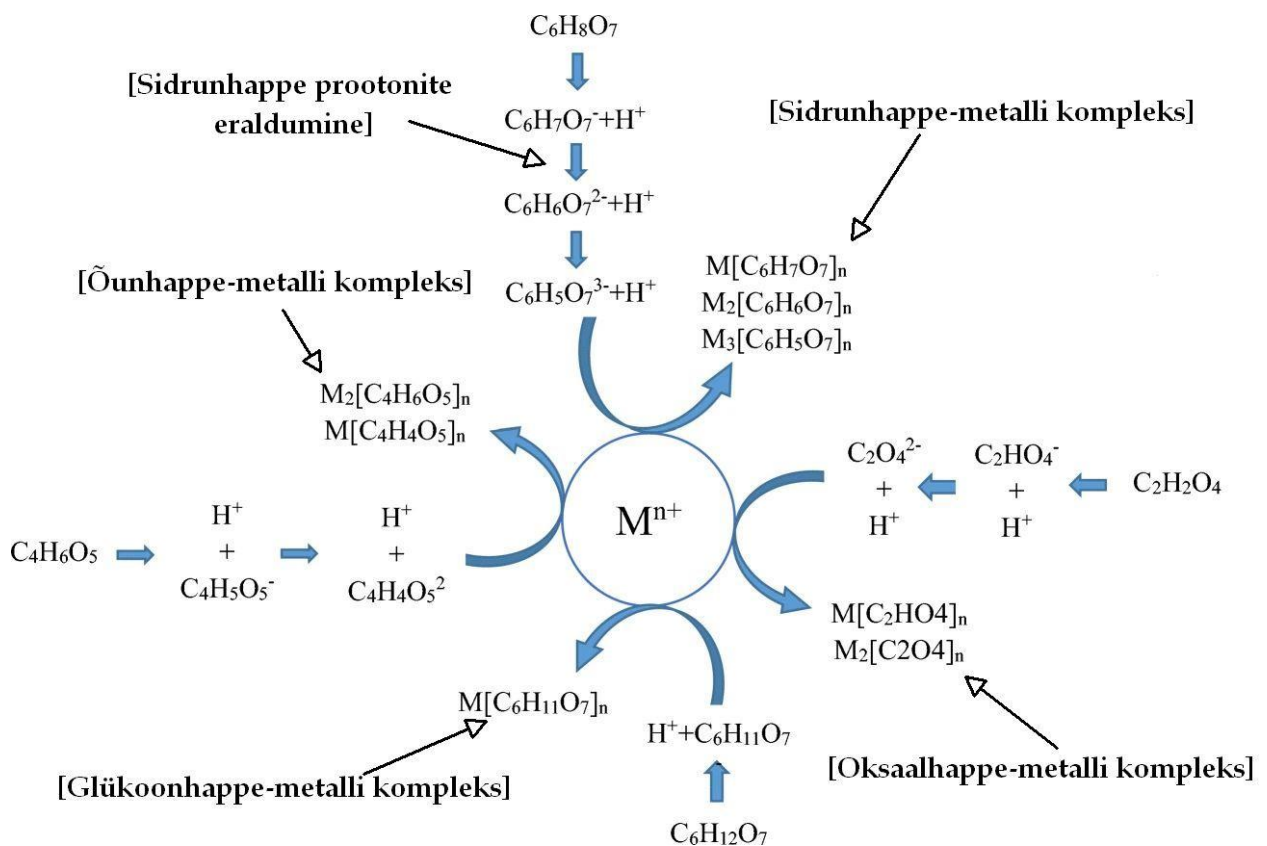
Bioleostamises kasutatava heterotroofse seene heaks näiteks on hallitusseen *Aspergillus niger* perekonnast *Aspergillus*. Tänu *A. niger*'i suurele taluvusele happelise keskkonna suhtes, kasutatakse seda tööstusliku sidrunhappe tootmisel (Behera, 2020). Biohüdro metallurgias on see kasutuses orgaaniliste hapete tootmise, toksiliste metallide taluvuse ja kiire kasvu tõttu. *A. niger* hapete keskkonda eritamise põhjusteks võivad olla lisaks eelnimetatule taimerakkude seinte lagundamine ja mikrotoitainete omastamine, kasutatades sidrunhapet siderofoorina (Cairns *et al.*, 2021).

Heterotroofsete bakterite hulgast tasub mainida *Gluconobacter oxydans*-i Acetobacteraceae sugukonnast. *G. oxydans* on tööstuslikult kasutusel madala pH taluvuse ja mittetäielike oksüdatsiooniproductide efektiivse tootmise tõttu. Teda kasutatakse näiteks sorboosi tootmiseks, mis on C-vitamiini tööstusliku tootmise substraat (Deppenmeier *et al.*, 2002). Atsidolüüsis osalevat glükoonhapet toodab *G. oxydans* glükoosi oksüdatsioonil. Reaktsioon toimub periplasmaatilisel membraaniseoselise glükoosi dehüdrogenaasiga, mille tulemusena tekkiv glükoonhape satub väliskeskkonda (Rasoulnia *et al.*, 2021).

Happelised tingimused hoiavad ära metallide sadestumise liksiviandist tänu vabade prootonite ioniseerivale toimele metallidele (Zhang *et al.*, 2020). Lisaks osalevad orgaaniliste hapete jäägid kompleksolüüsis liganditena.

1.2.6 Kompleksolüütiline bioleostamine

Kompleksolüütilise bioleostamise käigus toimub metallioonide kelaatumine ligandiga, mille tulemusel tekivad kompleksühendid. Bioleostamise puhul on kelaatuvateks aineteks ehk ligandideks heterotroofsete bakterite või seente toodetud orgaanilised ühendid, näiteks orgaanilised happed, tsüaniid ning aminohapped (Srichandan *et al.*, 2019). Liksiviandis lahustunud ligandide ja metallioonide vahel tekkivad sidemed on tugevamad kui metall-metall sidemed tahkes faasis, aidates kaasa metallühendite lahustumisele vedelasse faasi (Faraji *et al.*, 2018). Kompleksolüütiline mehhanism koos atsidolüütilise bioleostamisega on toodud joonisel 4.



Joonis 4. Atsidolüütiline ja kompleksolüütiline bioleostamine *A. niger*'i näitel. Sidrunhape võib eraldada lahusesse kuni kolm prootonit, oksaalhape ja õunhape kaks prootonit ning glükoonhape ühe prootoni. Antud happejäägid on võimelised moodustama komplekse igal väljatoodud oksüdatsiooniastmel. Joonis: (Li *et al.*, 2021).

Kompleksolüüs võib kulgeda paralleelselt atsidolüüsiga, näiteks võivad orgaanilised happed samaaegselt protoneerida tahke maatriksi struktuuris olevaid okside ning moodustada vabanenud metalliiooniga komplekse. Sellisel juhul vahendavad orgaanilised happed üheaegselt nii atsidolüütilist kui kompleksolüütilist bioleostamist (Mouna & Baral, 2019). Kelaatumine ligandiga stabiliseerib vabanenud metalloone, vähendades toksilist mõju bioleostamises osalevate mikroobide elutegevusele ning leostamislahuse kahjulikku mõju keskkonnale. Metalliooni kelaatumisel orgaaniliste hapetega konjugeeritud alustega võivad tekkida ka mittelahustuvad ühendid, sadestades toksilisi metalle, mis veelgi vähendab metallide pärssivat mõju mikroorganismide elutegevusele (Dusengemungu *et al.*, 2021).

Lisaks orgaanilistele hapetele sekreteerivad hallitusseened ja teised heterotroofid mitmeid teisi ühendeid, mis võivad parandada bioleostamise efektiivsust võrreldes puhtas hapes leostamisega (Srichandan *et al.*, 2019). Selliste ainete hulka kuuluvad siderofoorid, sekundaarsete metaboliitide rühm, mida mikroorganismid ja taimed toodavad, et hõlbustada raua, mis on

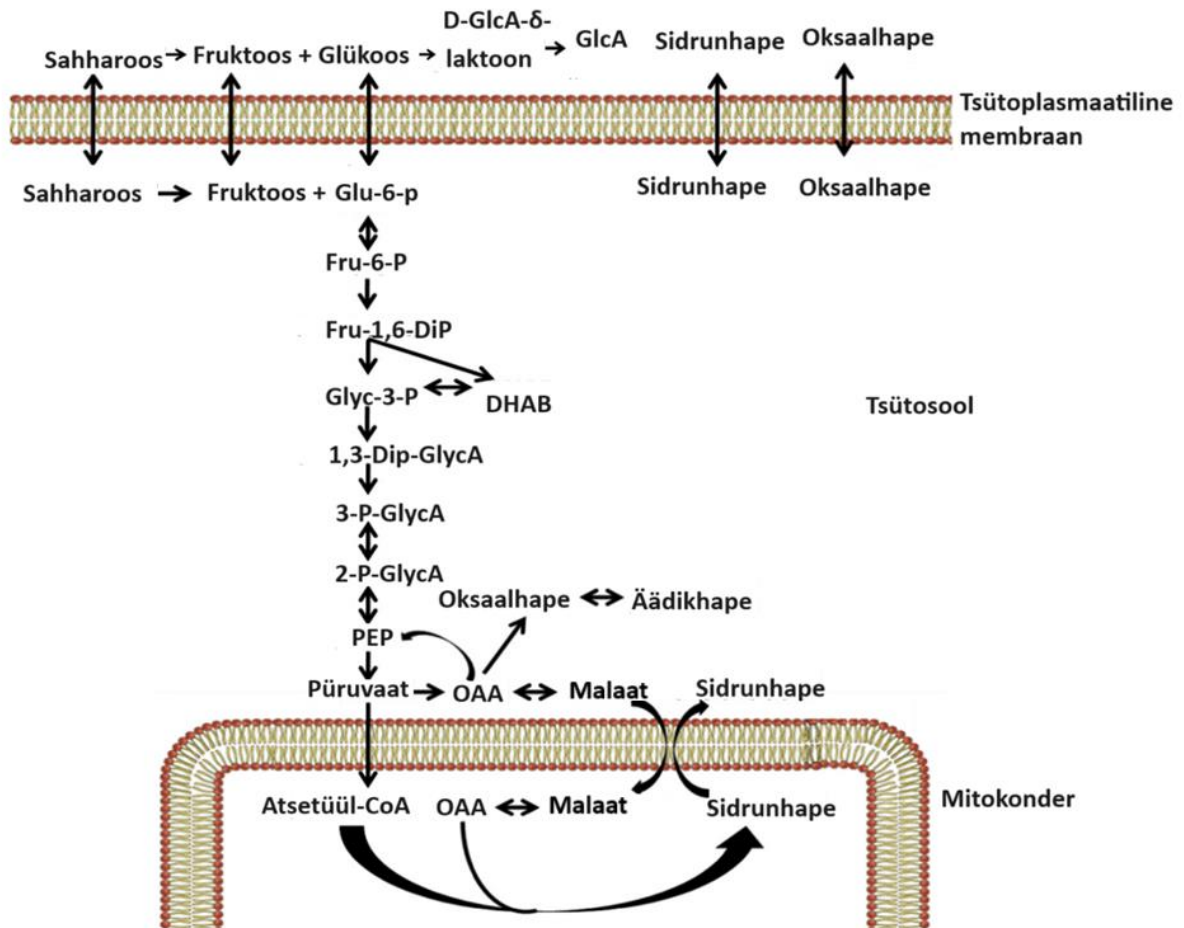
tavaliselt enamikus maismaakeskkondades lahustumatu, omastamist rakkude poolt. Siderofoorid moodustavad komplekse ka mitmesuguste muude metallidega, sealhulgas Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb, REE, Zr, Mo, Mn, Co ja Zn, samuti U, Np, Th ja Pu (Williamson *et al.*, 2021).

Tööstuslikult on kompleksolüüs kasutusel kulla bioleostamisel tsüaniidiga. Heterotroofsed tsüanogeensed bakterid *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Bacillus megaterium* eritavad statsionaarses kasvufaasis keskkonda tsüaniidioone (CN⁻) ja hüdrotsüaniidi (HCN) sekundaarsete metaboliitidena. Eritatud tsüaniid reageerib erinevate metallidega, näiteks vask, hõbe või kuld, moodustades vees lahustuvaid komplekse (vastavalt [Cu(CN₂)]⁻, [Ag(CN₂)]⁻ või [Au(CN₂)]⁻) (Pourhossein *et al.*, 2021). Tsüanogeensete bakterite puhul võivad tsüaniidi eritamise põhjusteks olla enesekaitse ja ressursside omastamise hõlbustamine. Tsüaniid aitab inhibeerida konkurentsete mikroobide kasvu ja lahustada metalle, muutes need bakteritele kättesaadavamaks (Rijavec & Lapanje, 2016).

1.3 Filamentsed seened

E-jäätmed, mille põhimassi moodustavad klaasfiiberkiud, keerukad orgaanilised ühendid ja metallid, ei sisalda energiaallikat mikroorganismide kasvuks. Autotroofsed bakterid vajavad oma ainevahetuseks peamiselt rauda ja väävlit, mida e-jäätmetes ei leidu piisavalt. Seetõttu on, hoolimata kasutatava mikroorganismi tüübist, vajalik välise energiallika lisamine leostamiskeskkonda, mis vähendab autotroofse rikastamise tasuvust (Işıldar *et al.*, 2019). Heterotroofsed seened kasutavad oma ainevahetuse käigus energiallikana orgaanilisi ühendeid, eelkõige süsivesikuid, nad suudavad kasvada autotroofsetest bakteritest laiemas pH vahemikus (1,5-9,8), neil on kiirem leostamiskiirus ja nad toodavad orgaanilisi happeid, mis võimaldavad läbi viia vähemalt teoreetiliselt selektiivset metallide leostamist. Seega on heterotroofsete seente abistatud bioleostamine sobiv ja efektiivne protsess metallide taaskasutamiseks e-jäätmetest, pakkudes ka majanduslikke eeliseid (Faraji *et al.*, 2018). Filamentsed seened on levinud nii mere- kui maismaaökosüsteemides, kus nad esinevad vabalt elavate mikroobide, sümbiontide, kommensaalide ja patogeenidena. Nende levik ja edukus arvatakse põhinevat nende võimel eritada erinevaid valke, orgaanilisi happeid ja sekundaarseid metaboliite. Need ained aitavad neil omastada toitaineid, kasvatada hüüfe ja täita mitmeid spetsiifilisi, ökonišist sõltuvaid funktsioone, sealhulgas peremeesorganismi kudede invasioon, sümbioos, suguline paljunemine või

konkurentideks olevate mikroobide tõrjumine (Cairns *et al.*, 2021). Efektiivne orgaaniliste hapete tootmine ja sekretsioon teeb neist bioleostamisel kasutatavad organismid, kuna nende poolt eritatavad metaboliidid võivad lahustada tahke maatriksi metalle nii atsidolüütiliselt kui ka kompleksolüütiliselt (Xia *et al.*, 2018). Orgaaniliste hapete konversioon sahharoosist seenerakus on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Orgaaniliste hapete konversioon sahharoosist. Kasutatud lühendid: **Glu-6-P**: Glükoos-6-fosfaat; **Fru-6-P**: Fruktoos-6-fosfaat; **Fru-1,6-DIP**: Fruktoos-1,6-bisfosfaat; **Glyc-3-P**: Glütseraaldehüüd-3-fosfaat; **DHAP**: Dihüdroksüatsetoonfosfaat; **1,3-Dip-GlycA**: 1,3-Bisfosfoglütseraat; **3-P-GlycA**: 3-Fosfoglütseraat; **2-P-GlycA**: 2-Fosfoglütseraat; **PEP**: Fosfoenoolpüruvaat; **OAA**: Oksaalatsetaat; **Acetyl-CoA**: Atsetüülkoensüüm A. Joonis: (Srichandan *et al.*, 2019).

Orgaaniliste hapete tootmine toimub seenerakkude tsütoplasmas ja mitokondrites glükoosi või sahharoosi muundamise kaudu ensümaatiliste reaktsioonide abil. Glükoos või sahharoos tuuakse esmalt tsütoplasmasse ning muundatakse glükolüüsi käigus püruvaadiks. Kahest püruvaadimolekulist üks dekarboksüülitakse mitokondriaalse püruvaadi dehüdrogenaasi kompleksi poolt atsetüül-CoA-ks, teine karboksüülitakse tsütosoolis püruvaadi karboksülaasi

poolt oksaalatsetaadiks. Tsütoplasmas toodetud oksaalatsetaat transporditakse mitokondrisse läbi malaadi süstiku, kus aldoolkondensatsioonil atsetüül-CoA-ga sünteesitakse sidrunhape, mis seejärel transporditakse rakust välja (Srichandan jt, 2019).

Filamentsete seente orgaaniliste hapete tootmist on võimalik suurendada süsinikuallika kättesaadavuse parandamise ja lämmastiku kontsentratsiooni vähendamisega söötmes. *A. niger*'i kultuuri hapete eritamine keskkonda on otseses seoses süsinikuallikate kättesaadavusega seenerakkude poolt (Kim *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2021). Lämmastiku puudujäägi tekkimisel söötmes hakkavad seenerakud ammoniumi (NH₄)⁺ saamiseks lagundama AMP-d (adenosiinmonofosfaat). AMP on kosubstraat isotsitraadi dehüdroganaasile, mis tsitraaditsükli katalüüsib isotsitraadist α-ketoglutaradi moodustamist. Protsessi tulemusel tekib kasutamata tsitraadi ülejääk, mis transporditakse rakust välja (Beopoulos *et al.*, 2011).

1.3.1 Bioleostamise heterogeensus

Bioleostamisprotsessi läbiviimiseks filamentsete seentega tuleb tähelepanu pöörata liikide eripäradele. Eri liigid eritavad keskkonda erinevaid metaboliite ja ka sama liigi tüvede vahel võib esineda märkimisväärseid erinevusi. *A. niger* toodab peamiselt sidrunhapet ja glükoonhapet, samas kui *Penicillium simplicissimum* võib toota suuremaid koguseid oksaalhapet ja piimhapet (Rosa *et al.*, 2022). Selline erinev orgaaniliste hapete profiil omab tugevat kvalitatiivset ja kvantitatiivset mõju metallide leostamisele. Sidrunhape on seente poolt toodetud hapetest üks tugevamaid ja on sobilik näiteks vase, raua, nikli, koobaldi ja tsingi leostamiseks. Oksaalhape ja sidrunhape on olulised ka komplekslühis ligandidena. Kuigi sekreteeritavaid happeid peetakse põhilisteks toimeaineteks filamentsete seentega bioleostamisel, on oluline märkida, et orgaaniliste hapetega läbiviidud bioleostamine on väiksema efektiivsusega kui mikroorganismide poolt toodetud samu happeid sisaldava lahusega. See viitab sellele, et eksisteerib ka muid, hetkel tundmatuid komponente, millel on kas individuaalne või koostoimes sekreteeritud hapetega koostoimes mõju metallide lahustuvusele (Sikander *et al.*, 2022). Filamentsete seentega bioleostades võivad tulemused sama substraadi peal varieeruda, näiteks *A. niger*'iga trükkplaatide bioleostamisel võib Cu eraldumine lahusesse olla vahemikus 5–100 % ja Ni eraldumine vahemikus 0–51 % (Faraji *et al.*, 2018; Trivedi & Hait, 2024). Meie piiratud arusaamine osalevatest mehhanismidest on osaliselt tingitud bioleostamise praktilisest suunast

– otsitakse “töötavat” lahendust ja seda tööd finantseerivad eraettevõtted ei ole enamasti huvitatud põhjalikest baasuuringutest. Samas on olnud pikalt teada, et erinevad filamentsete seente liigid annavad sama materjali bioleostamise puhul väga erinevaid tulemusi. E-jäätmete puhul komplitseerib olukorda veelgi eelpool kirjeldatud e-jäätmete heterogeenne koostis, mis võib tugevalt erineda eri tüüpi jäätmeliikide vahel (tabel 4). Sellest tulenevalt varieerub bioleostamise efektiivsus e-jäätmete puhul n.ö. “kahes suunas”, olles mõjutatud nii e-jäätmete konkreetse tüübi kui ka rakendatavate mikroorganismide poolt (Adetunji *et al.*, 2023).

Kuigi väärismetallid on e-jäätmete peamine eesmärk, tuleb tööstusesse sobiva bioleostamise lahenduse väljatöötamisel arvestada ka metallide hilisema eraldusprotsessiga. Kuigi näiteks kulda on e-jäätmetes märkimisväärses kogustes, on tina ja pliid absoluutväärtuses palju rohkem. Kuna antud metallid on oma omadustelt saranased kullaga, raskendavad nad multikomponentsest lahustest puhta kulla eraldamist. Seepärast on soovitatav kulla spetsiifiline eraldamine ilma kaasuva plii ja tina leostumisega. BiotaTec OÜ on välja töötanud väärismetallide eraldusprotsessi (hetkel patenteerimisel), mille rakendatavust ja tööstuslikku mahtu skaleerimist toetaks oluliselt eelnev baasmetallide, eriti tina ja plii, selektiivne eraldamine.

Tabel 4. E-jäätmete bioleostamise efektiivsus filamentsete seentega. Tabel: (Adetunji *et al.*, 2023).

Filamentse seene liik	Metalli allikas	Bioleostamise efektiivsus (%)	Bioleostamise tingimused	Viide
<i>A. niger</i>	WPCB ¹	100% (Zn); 80.39% (Ni); 85.88% (Cu)	Substraadi kontsentratsioon (0.5–20 g/L); 120 rpm; toatemperatuur; 30 päeva	Faraji <i>et al.</i> , 2018
<i>Trichoderma viride</i>	Arvuti trükkplaadid	1% (Pd); 10% (Au)	pH 5.0; 30 päeva; 1 g trükkplaate	Díaz-Martínez <i>et al.</i> , 2019
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Mobiiltelefoni trükkplaadid	90% (Cu); 89% (Ni)	Cu: pH 7.0; 3.3×10^7 spoore; suhkur; Ni: pH 2.0; 10^6 spoore; melass	Arshadi <i>et al.</i> , 2019
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Trükkplaadid	60.96% (Cu)	pH 5.0; substraadi kontsentratsioon 2%; 30 °C; 150 p/min; 14 päeva	Liu <i>et al.</i> , 2020
<i>A. niger</i>	WLIB ²	100% (Li); 72% (Mn); 45% (Ni); 38% (Co); 94% (Cu); 62% (Al)	30 °C; 30 päeva	Bahaloo-Horeh <i>et al.</i> , 2018
<i>Candida orthopsilosis</i>	Mobiiltelefoni trükkplaadid	1% (Cu)	pH 4.4; 0.5 g trükkplaate; 35 päeva	Díaz-Martínez <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus fumigatus</i> A2DS	Mobiiltelefoni trükkplaat	42.37%, 32.29%, 27.07% (Ni); 62%, 58%, 61.8% (Cu)	Substraadi kontsentratsioon 0.5%; inokulum 1% (v/v); pH 6.0; 40 °C	Patel & Lakshmi, 2021
<i>Trichoderma atroviride</i>	Arvuti trükkplaadid	1% (Pd); 13% (Au)	pH 5.0; 1 g trükkplaate; 30 päeva	Díaz-Martínez <i>et al.</i> , 2019

¹WPCB – Kasutatud trükkplaadid (ingl. *Waste Printed Circuit Board*)

²WLIB – Kasutatud liitiumioon mobiiltelefoni akud (ingl. *Waste Li-ion battery*)

2 UURIMUS

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks olid:

- Uurida *A. niger*'i potentsiaali baas- ja raskmetallide selektiivsel bioleostamisel kullarikkast e-jäätmetest.
- Skaleerida antud lahendus 20-liitrise bioreaktori mahtu.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Substraat

Töös kasutatud e-jäätmed pärinesid ühe Eestis tegutseva e-jäätmete kogumise ja käitlemisega tegutsevast ettevõttest. Antud jäätmete materjal pärineb peeneks jahvatatud (partiklite suurusega alla 1 mm) manuaalselt eraldatud kullarikastest osadest, enamasti trükkplaatidest. Substraati pildistati skaneeriva elektronmikroskoobiga (SEM, ingl. Scanning Electron Microscope) Vega II SBU (Tescan, Brno, Tšehhi) sekundaarelektronide detektoriga. Magnetronpihustuseadmega SC7640 (Quroum Technologies, Sacramento, California) kaeti e-jäätmete pulber 5 nM kullakihiga parameetritel 1500 V 15mA 7,5 Nm 90nm.

2.2.2 *A. niger*'i kultiveerimine

Käesolevas töös uuriti metallide bioleostamist *Aspergillus Nigeri* tüvega 3;320, mis pärines Leibnizi instituudi mikroorganismide kollektsioonist DSMZ (Saksamaa). Saabunud külmuivatatud kultuuri viaali lisati rehüdreerimiseks 0,5 mL linnaseekstrakti söödet DSMZ Agar 90 (söötme komponendid toodud tabelis 6). Kui möödunud oli 30 min, kanti kultuur katseklaasi 5 mL linnaseekstrakti söötmega ja inkubeeriti temperatuuril 25 °C pöörlemissagedusega 180 rpm. Katsetati kahe eri süsinikuallikaga söötmeid (linnaseekstrakt ja sahharoos) ja jälgiti *A. Nigeri* kultuuri pH muutumist ajas. Antud katse söötme komponendid on toodud tabelis 5.

Tabel 5. A. niger sötmed süsinikuallikate katses.

Söötme nr	Linnaseekstrakt (g)	Sahharoos (g)	Soja peptoon (g)	Agar (g)	pH
1	30	0	3	15	5,6
2	0	30	3	15	5,6

Katsetati süsinikuallika ja inokulumi suurendamise ning söötme algse pH väärtuse tõstmise mõju kultuuri pH muutumisele ajas. Selleks jälgiti sahharoosisöötme ja optimeeritud sahharoosisöötme (söötmekomponendid tabelis 6) pH muutust ajast inokulumidel 0,2% ja 3,5%.

Tabel 6. A. niger'i kultiveerimiseks kasutatud söötmekomponendid.

Söötmekomponendid	DSMZ Agar 90	Sahharoosisööde	Optimeeritud sahharoosisööde
Linnaseekstrakt	30 g/L	-	-
Soja peptoon	3 g/L	-	-
Agar	15 g/L	-	-
pH	5,6	4	5,44
Sahharoos	-	100 g/L	117 g/L
NaNO ₃	-	1,5 g/L	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	-	0,5 g/L	0,5 g/L
MgSO ₄ x 7H ₂ O	-	0,025 g/L	0,025 g/L
KCl	-	0,025 g/L	0,025 g/L
Pärmiekstrakt	-	1,6 g/L	1,6 g/L

E-jäätme bioleostamiskatsete jaoks kasutati optimeeritud sahharoosisöödet ning katsete tingimused on toodud tabelis 7. Esimese katse läbiviimiseks eelkasvatati *A.niger*'i kultuuri väikeses mahus (800 mL) ja teise katse jaoks bioreaktoris (20 L).



Joonis 6. Biotatec 20-liitrised bioreaktorid.

Bioreaktorid (toodud joonisel 6) on valmistatud selgest boorsilikaatklaasist (Simax, Praha, Tšehhi), mis on väga kuumuse- ja kemikaalikindlad ning vastavad rahvusvahelisele ČSN ISO 3585 standardile. Reguleeritava ringluse tagavad pealmised segajad Eurostar 40 (IKA-Werke, Staufen, Saksamaa) koos segamisjuhkutega Azlon SWN766 (DWK, Mainz, Saksamaa). Bioreaktorid on isoleeritud kivivillaga, optimaalne temperatuur saavutatakse termostaadiga juhitava 160 W küttekaabli abil. 20-liitrised bioreaktorid on varustatud pH-elektroodi ja saatjaga Liquiline CM442 (Endress Hauser, Reinach, Šveits) ning temperatuurianduritega (Amphenol, Wallingford, USA), samuti on olemas valikuline gaasikollektor kõrvalproduktide tekkemäära jälgimiseks

Tabel 7. A. niger'i kultiveerimistingimused läbiviidud bioeostamiskatsetes.

Katse	Sööde	Katsetingimused				
		Aeg	T	<i>rpm</i>	Inokulum	Täiendavad tingimused
1	Sahharoos: 117 g/L NaNO ₃ : 1,5 g/L KH ₂ PO ₄ : 0,5 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O: 0,025 g/L KCl: 0,025 g/L Pärmiekstrakt: 1,6 g/L pH: 5,44	11 päeva	25 °C	180	3,50%	Söötme ruumala 800 mL
2	Sahharoos: 117 g/L NaNO ₃ : 1,5 g/L KH ₂ PO ₄ : 0,5 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O: 0,025 g/L KCl: 0,025 g/L Pärmiekstrakt: 1,6 g/L pH: 5,44	11 päeva	25 °C	180 (päev 1-3) 230 (päev 3-4) 275 (päev 4-11)	3%	Söötme ruumala 10 L 20-liitrises bioreaktor, 5273 mL/min aeratsioon, lahustunud O ₂ ja pH jälgimine

2.2.3 Substraadi eeltöötlus

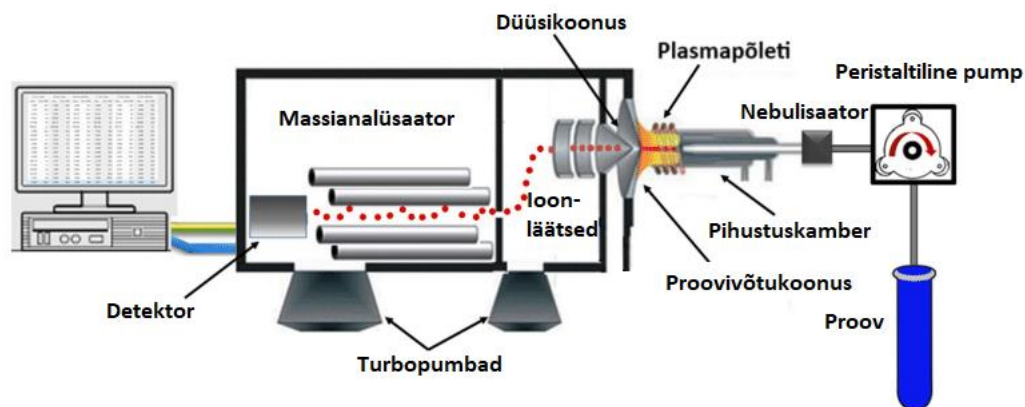
Käesolevas uuringus töödeldi e-jäätmete pulbrit naatriumhüdroksiidiga enne metallide leostamist. E-jäätmete pulbrile lisati 0,1 M NaOH lahust vahekorras 1:10 mass/ruumala suhtes, ning saadud suspensiooni eeltöödeldi borosilikaadist keeduklaasis, segades neli tundi toatemperatuuril pöörlemisagedusega 200 rpm. Seejärel pesti materjali korduvalt veega, et eemaldada residuaalne NaOH.

2.2.4 Substraadi metallsisalduse määramine

E-jäätmetest metallide eraldamiseks töödeldi substraati reaktsioonil happelahusega kuningvesi (ld. *aqua regia*). Substraat segati 35% soolhappe (HCl) ja 65% lämmastikhappe (HNO₃) lahusega (hapete ruumalade suhte 3:1) ning hoiti õlivannil temperatuuril 115 °C 1h. Seejärel filtreeriti saadud lahus läbi p3 (16 – 40 µm) klaasfiltri ja lahjendati deioniseeritud veega. Metallisisaldus määrati ICP-MS (Agilent 7500, California) meetodil.

ICP-MS on analüütilise keemia meetod, mis põhineb induktiivselt ühendatud plasma kui ionide tootmise (ioniseerimise) meetodi ühendamisel massispektromeetriaga kui ionide eraldamise ja tuvastamise meetodiga. ICP-MS võimaldab tuvastada metalle ja mittemetalle kontsentratsiooniosakest triljoni kohta (ingl. *parts per trillion, ppt*) ning määrata kontsentratsiooniosakest miljoni kohta (ingl. *parts per million, ppm*). ICP-MS on sobilik meetod metallide sisalduse määramiseks proovides, võimaldades suure täpsusega ja tundlikkusega analüüsi ning isotoopide eristamist (Thomas, 2003). ICP-MS seadme põhikomponendid on skemaatiliselt välja toodud joonisel 7.

ICP-MS on võrreldes teiste analüüsimeetoditega eelistatud mitmeelemendilisuse poolest, mis lühendab analüüsiaega. Lisaks vajavad proovid vähe ettevalmistamist (Wilschefski & Baxter, 2019).



Joonis 7. ICP-MS seadme põhikomponendid. Proov on uuritav katselahus. **Peristaltiline pump** tagab sõltumata viskoossusest erinevate proovide pideva voolu vedeliku ja gaasi edasitõukamisel nebulisaatorisse järk-järgult rullikute poolt kokkusurutavas voolikus. **Nebulisaator** pihustab proovi lahuse väikesteks piiskadeks ehk aerosooliks. **Plasmapõleti** ioniseerib osakesed selekteeritud piiskades. **Pihustuskamber** tagab ionide efektiivse, püsiva ja laengut mittemuutva liikumise. **Proovivõtu- ja düüsikoonus** lasevad plasma ionid massispektromeetri vaakumkambrisse. **Ioonläätsed** fokuseerivad ionide voogu ja kõrvaldavad segavad osakesed. **Massianalüsaator** koosneb neljast sama pikkuse ja läbimõõduga silindrilisest või hüperboolse ristlõikega roostevabast terasest vardast, mis rakendavad optimaalset alalis- ja vahelduvpinget, lastes läbi ainult teatud massi-laengu suhtega osakesed, ülejäänud osakesed juhitakse kõrvale. **Detektor** võimaldab elektroodile langenud ionide registreerimist. **Turbopumbad** loovad vaakumi massispektromeetri kambris ionide liikumiseks. Joonis: (Mazarakioti *et al.*, 2022).

Proovi, mis tavaliselt peab olema vedelal kujul, pumbatakse tavaliselt peristaltilise pumba abil 1 mL/min kiirusega nebulisaatorisse, kus see muundatakse peeneks aerosooliks argooniga umbes 1 L/min voolukiiruse juures. Aerosooli peened piisad, mis moodustavad ainult 1-2% proovist, eraldatakse suurematest piiskadest pihustikambri abil. Seejärel väljub peen aerosool pihustikambri väljundtorust ja transporditakse proovisüstla abil plasmapõletisse.

Plasmas tekkinud positiivselt laetud ionid suunatakse massispektromeetri poole läbi liideseregiooni, mida hoitakse mehaanilise raskuspumba abil vaakumis 1-2 Torri juures. Liides koosneb kahest gaasivoolu pidurdavast ahenevast metallist koonusest (tavaliselt niklist), mida nimetatakse proovivõtu- ja düüsikoonuseks, millel on mõlemal väike ava (0,6-1,2 mm) ionide pääsemiseksioonläätsedeni.

Ioonläätsede vaakumkambril töövaakumit (10^{-3} Torr) hoitakse turbopumba abil. Ioonläätsede disain võib olla erinev, kuid nende ülesanne on sama: elektrostaatiliselt fookuseerida ionikiir

massilahutusseadmesse, samal ajal takistades footonitel, osakestel ja neutraalsetel liikidel jõudmist detektorini.

loonikiir, mis sisaldab kõiki analüüte ja maatriksioone, väljub ionoptikast ning liigub nüüd massispektromeetri südamesse - massilahutusseadmesse, mille töövaakumit (10^{-6} Torr) hoitakse teise turbomolekulaarpumba abil.

Viimane protsess on ionide detektoris elektriliseks signaaliks muundamine. Elektronkordistis langevad detektori elektroodile laetud osakesed, mida on võimalik kasutada ionide tuvastamiseks. Enamik kasutatavaid tuvastussüsteeme suudab hallata kuni kaheksat järku dünaamilist ulatust, mis tähendab, et neid saab kasutada proovide analüüsimiseks *ppt* tasemelt kuni mõnesaja *ppm* tasemeni (Thomas, 2004).

2.2.5 Mikrotsentrifuugi tuubide pesemine

Proovide keemilise stabiilsuse saavutamiseks lahjendati proovid eeltöötluste käigus ~3,14% lämmastikhappes ning säilitati eelnevalt lämmastikhappes leostatud mikrotsentrifuugi tuubides. Tuubid loputati deioniseeritud veega 5L anumates, seejärel valati anum täis 2% HNO₃ lahust ja lasti seista. 24h möödudes valati lahus välja ja loputati tuube 3 korda deioniseeritud veega.

2.2.6 E-jäätmete bioleostamine

Viidi läbi 3 katseseeriat *A. niger*'i liksiviandiga e-jäätmete bioleostamiseks. Iga liksiviandiga katsel oli paraleelne negatiivne kontroll, kus liksiviant oli asendatud kultuuri kasvatamise jaoks kasutatud söötmega. Bioleostamiskatsete tingimused on toodud tabelis 8. Bioleostamise efektiivuse määramiseks võeti 2% HNO₃ lahusega pestud mikrotsentrifuugi tuubidesse iga päev 100 mL proovi. Proovides lahustunud metallide sisaldust analüüsiti ICP-MS meetodil (peatükk 2.2.4).

Tabel 8. Läviviidud bioleostamiskatsed

Katse	Substraat	Katsevedeliku Ruumala	Liksiviant	Katsetingimused			
				Aeg	T	rpm	Proovivõtmine
1	1% Eeltöötlemata e-jäätmed 1% 4h eeltöödeldud e- jäätmed	100 mL	Filtreeritud <i>A. niger</i> liksiviant	12 päeva	25 °C	180	5 min 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 päeva
2	2% Eeltöötlemata e-jäätmed 2% 4h eeltöödeldud e- jäätmed	100 mL	Filtreeritud <i>A. niger</i> liksiviant	12 päeva	25 °C	180	5 min 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 päeva

2.2.7 Bioleostamisproovide metallisisalduse määramine

Bioleostamiskatsetest võetud proovid tseentrifuugiti 12 000 *rpm* 7 min ja 250 µl supernatanti segati tulemuste säilimiseks 25 µm 34,5% HNO₃ eelnevalt 2% HNO₃ pestud mikrotsentrifuugi tuubidesse. Bioleostamiskatse proovide metallisisaldus määrati ICP-MS meetodil. Proovid lahjendati 100 kordselt 2% HNO₃ lahusega. Leostunud metallide hulga (L_i) arvutamiseks võeti arvesse katse substraadi mass (M), proovi ruumala (V) ja metalli kontsentratsioon lahuses (C_1). Leostamiseefektiivsuse arvutamiseks jagati saadud tulemus substraadi konkreetse metalli kontsentratsiooniga (C_0) (substraadi metallisisalduse määramine peatükis 2.2.4) ja korrutati saja protsendiga.

Leostunud metallide arvutamise valemid on toodud joonistel 8.

$$L_i = \frac{C_1 * V}{M}$$

Joonis 8. Leostunud metallide hulga arvutamise valem. Joonisel kasutatud Lühendid: L_i : leostunud metallide hulk; M : mass; V : proovi ruumala; C_1 : metalli kontsentratsioon lahuses. Joonis: (Marra *et al.*, 2018).

Statistilise analüüsi käigus arvutati katseseeriade paralleelsete korduste aritmeetilise keskmise standardhälve. Tulemuste visualiseerimisel sai joonistele veapiiridega näidatud metallide leostumise standardhälve.

2.3 Tulemused

2.3.1 E-jäätmete metallisisaldus ja eeltöötlus.

Katsetes kasutati kahte eri tüüpi e-jäätmeid n.ö. originaalset materjali kui ka eeltöödeldud materjali (peatükk 2.2.3). Eeltöötuse eesmärgiks oli eemaldada epoksiid- ja keemiline kate e-jäätmete partiklitelt, inkubeerides materjali 4h jooksul 0,1M NaOH-ga. Seejärel pesti materjali korduvalt veega, et eemaldada residuaalne NaOH. Substraati töödeldi *aqua regia* happelahusega (35% HCl ja 65% HNO₃) nagu kirjeldatud peatükis 2.2.4. ICP-MS meetodil määrati mõlemas materjalis sisalduvate metallide kontsentratsioonid (toodud tabelis 9).

Tabel 9. E-jäätmete metallisisaldus

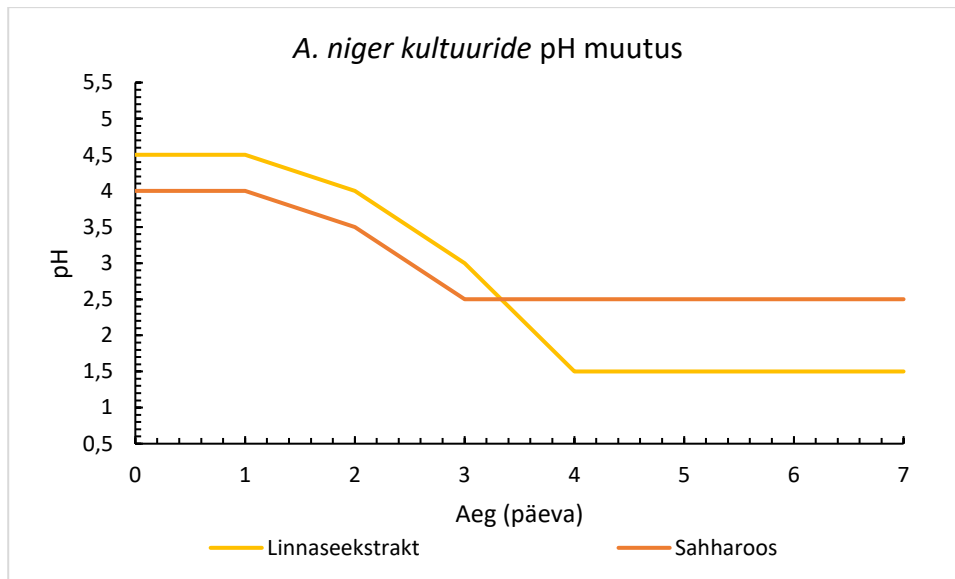
Element	Cr	Co	Ni	Cu	Zn	Ag	Sn	Au	Pb
Eeltöötlemata e-jäätmed (n=11)									
(mg/kg) ¹	250	639	3792	12891	5941	486	18543	701	21131
± (mg/kg) ²	23	705	679	1396	606	218	2171	110	2287
Eeltöödeldud e-jäätmed (n=11)									
(mg/kg)	241	419	3511	12446	5730	530	17478	743	20606
± (mg/kg)	32	46	331	1233	530	208	1746	60	1589

¹Uuritavate e-jäätmete keskmine metallisisaldus (n=11)

²Uuritavate e-jäätmete keskmise metallisisalduse standardhälve (n=11)

2.3.2 *A. niger*'i kultuuri pH muutused söötmetel ja inokulumidel

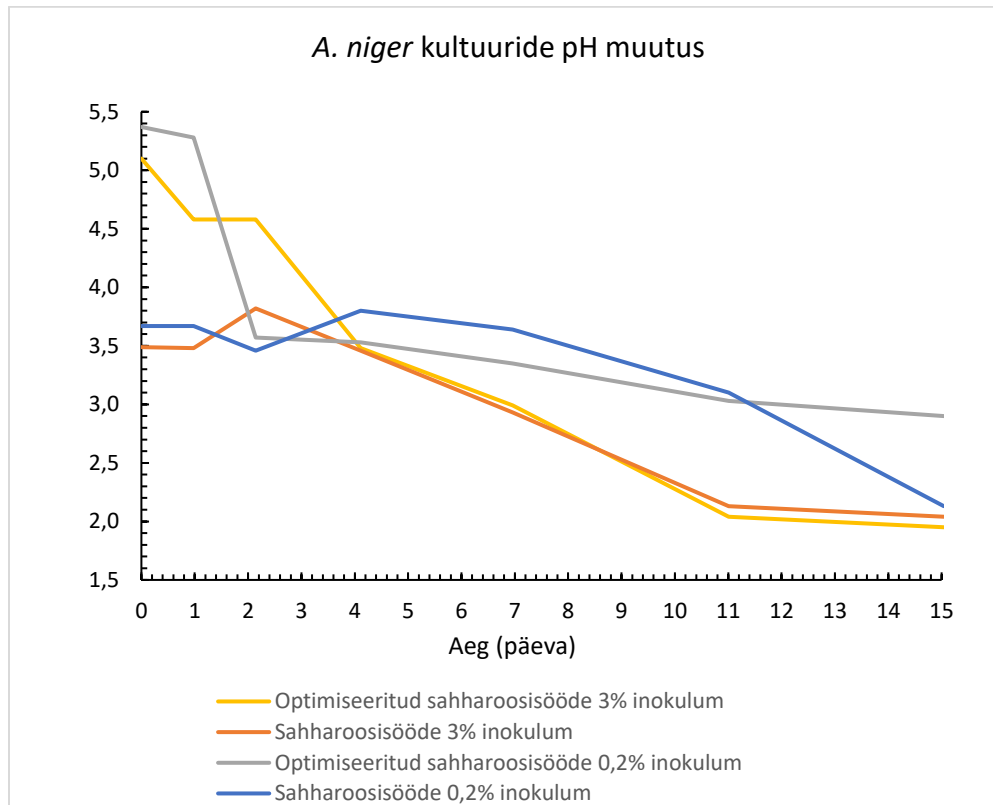
Käesolevas töös kasutati *A. niger*'i tüve 3;320, saabunud külmuivatud kultuur aktiveeriti linnaseekstrakti söötmetel (söötme komponendid toodud peatükis 2.2.2). Et selgitada välja optimaalsed tingimused orgaaniliste hapete tootmise jaoks, monitooriti pH muutuseid kahel enamlevinud *A. niger*'i söötmetel: linnaseekstrakt- ja sahharoossöötmetel (söötme komponendid toodud peatükis 2.2.2). Kultuuride pH muutus ajas on toodud joonisel 9.



Joonis 9. *A. niger*'i kultiveerimine linnaseekstrakti ja sahharoossöötmetel pH muutus ajas

Antud katses selgus, et *A. niger*'i kultuuri pH langes 7 päeva jooksul linnaseekstrakti söötmetel madalamale, kui sahharoosi söötmetel. Siiski on kirjanduse andmetel sahharoosisööde sobilikum substraat orgaaniliste hapete tootmiseks *A. niger*'i poolt (Ashour, 2019). pH väärtus linnaseekstraktiga söötmes on *A. niger*'i pH tolerantsipiiril, mis võib mõjuda negatiivselt *A. niger*'i elumusele ja seeläbi kahjustada metallide leostumise efektiivsust. Katsete jätkamiseks oli seepärast sobilikum sahharoosisööde. Samuti on GR (Guaranteed Reagent) puhtustasemega sahharoos (59,7€/kg) odavam kui linnaseekstrakt (294€/kg) (Fisher Scientific, 2024), ning on seega kooskõlas BiotaTec OÜ eesmärkidega arendada välja tööstuslikul skaalal bioleostamine. *A. niger*'i orgaaniliste hapete tootlikust saab suurendada, tõstes süsinikuallika kontsentratsiooni ja vähendades lämmastiku kontsentratsiooni söötmes. Seetõttu viidi orgaaniliste hapete

tootlikuse suurendamiseks läbi suurendatud süsinikuallika kontsentratsiooniga söötme katse. Testiti ka inokulumi suurendamise mõju pH muutusele ajas. Tulemused toodud joonisel 10.



Joonis 10. *A. niger* kultuuride pH muutus.

Kollase joonega toodud sahharoosisööde sisaldas sahharoosi 117g/L inokulumiga 3%; halli joonega sahharoosisööde sisaldas sahharoosi 117g/L inokulumiga 0,2%; oranži joonega toodud sahharoosisööde sisaldas sahharoosi 100 g/L 3% inokulumiga; sinise joonega toodud sahharoosisööde sisaldas sahharoosi 100 g/L 0,2% inokulumiga.

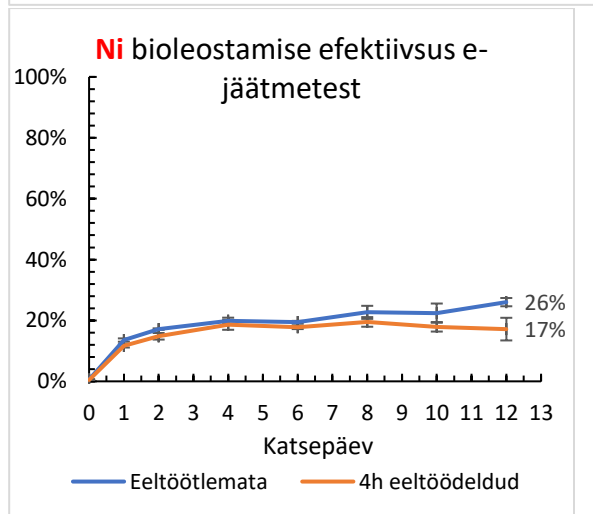
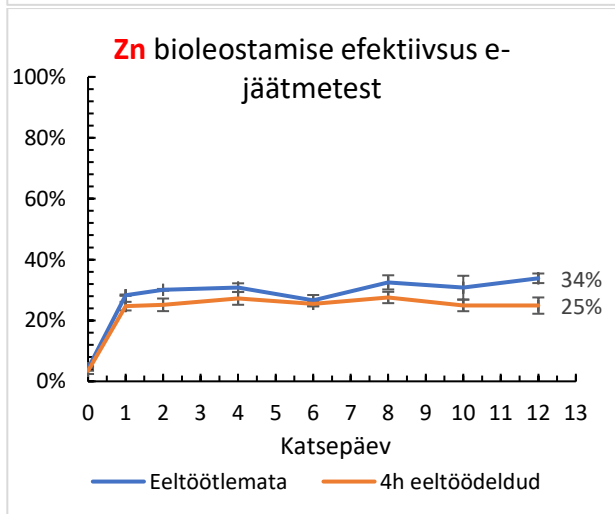
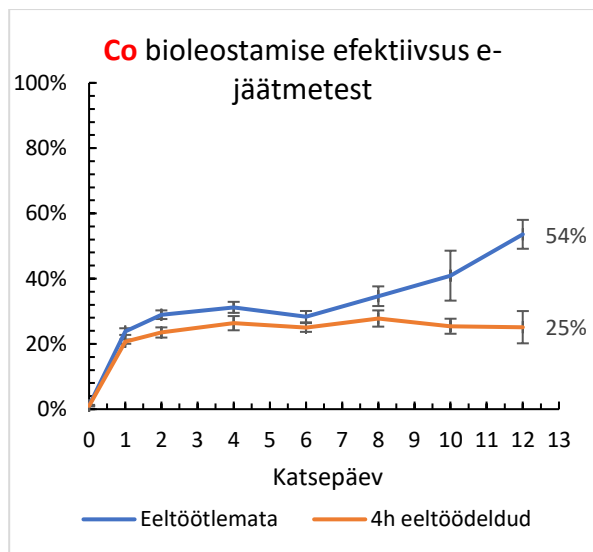
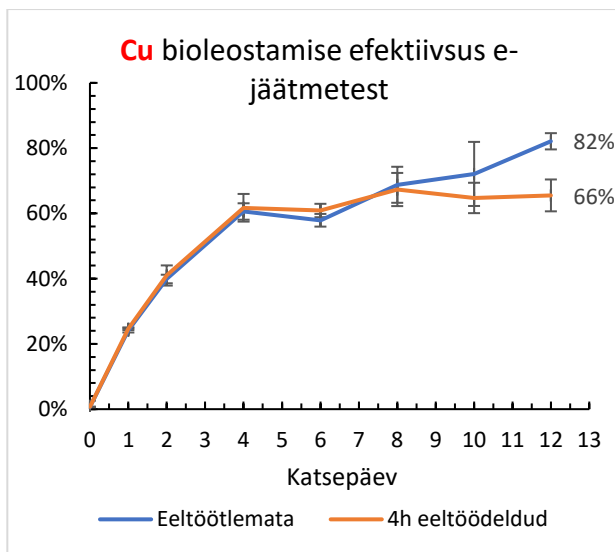
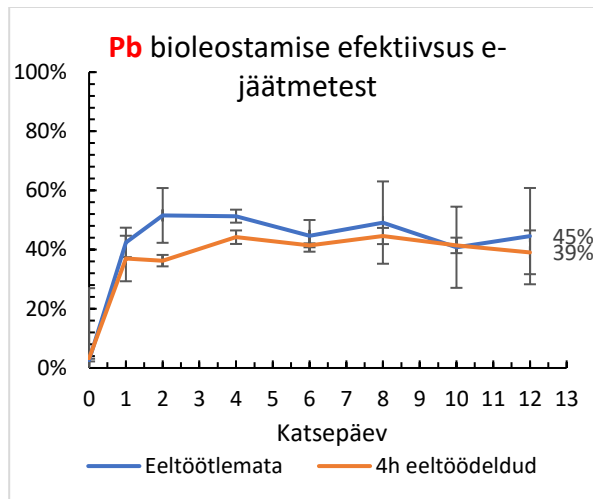
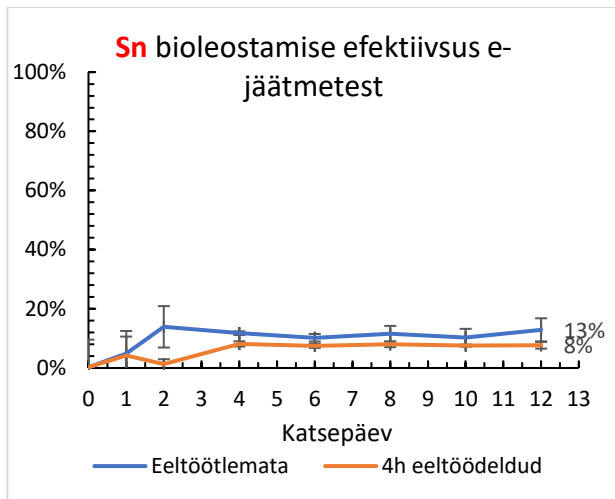
2.3.3 Metallide leostamine *A. niger*'i väikeses (800 mL) mahus kasvatatud kultuuriga

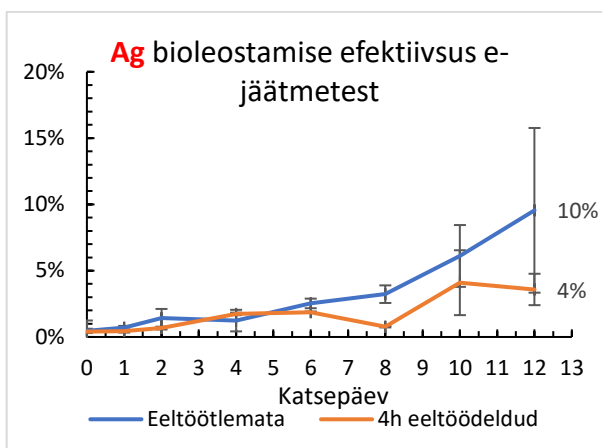
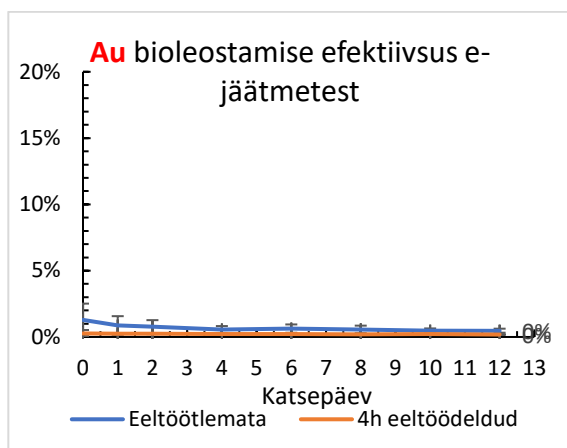
Katses eelkasvatati *A. niger*'i kultuuri sahharoosisöötmel (peatükk 2.2.2). 10 päeva pärast eraldati söötimest klaasfiltriga p3 rakud (joonis 11). Bioleostamiskatses kasutati rakuvaba liksivianti.



Joonis 11. *A. niger*'i kultuuri filtreerimine klaasfiltriga.

Tulemusi analüüsiti ICP-MS meetodil. Metallide leostumise efektiivsus (arvutused peatükk 2.2.7) on toodud joonisel 12. Enim leostunud metallideks olid eeltöötlemata e-jäätmetest Cu (82%), Co (54%) ja Pb (45%), eeltöödeldud e-jäätmetel leostusid enim Cu (66%), Pb (39%) ja Co (25%). Eeltöötlemata substraadil leostus Zn 35%, Ni 26%, eeltöödeldul Zn 25% ja Ni 17%. Sn leostumine oli mõlemal substraadil madal, eeltöötlemata 13% ja eeltöödeldud 8%. Au ei leostunud kummaski substraadis, eeltöödeldud substraadis leostus Ag 10% ja eeltöötlemata substraadis 4%.





Joonis 12. Väärismetallide bioleostamise efektiivsus e-jäätmetest. Veapiiridega näidatud metallide leostumise standardhälve (n=3)

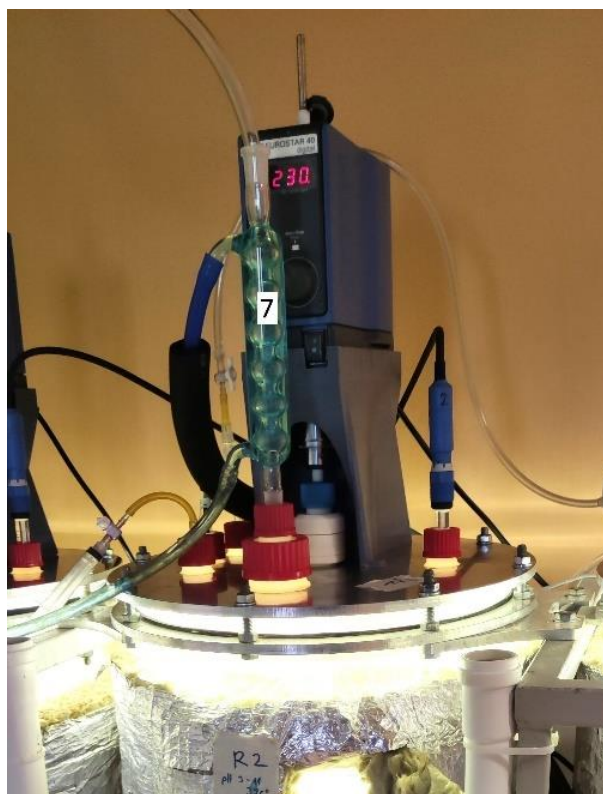
2.3.4 Metallide leostamine *A. niger*'i 20-liitrisel bioreaktoril kasvatatud kultuuriga

Katse läbiviimiseks eelkasvatati *A. niger* kultuuri 20-liitrisel bioreaktoril (joonis 14). Selleks viidi läbi järgmised ettevalmistavad sammud. Eelnevas peatükis 2.2.2 kirjeldatud reaktor puhastati kõigepealt 70% etanooliga. Seejärel ühendati juhtmoodul, mis mõõdab reaktoril pH-d ja temperatuuri ning edastab andmed USB-ühenduse kaudu arvutisse, kus neid kuvatakse ja salvestatakse programmiga MegunoLink (konstrueeritud insener Kalju Vanatalu poolt). Juhtmoodul reguleerib ka bioreaktori temperatuuri kütteelemendi kaudu vastavalt etteantud väärtustele. Bioreaktorisse paigaldatud pH ja temperatuuriandur ühendati juhtmooduliga (joonis 13) ning seadistati MegunoLink. Integreeritud programmeerimiskeskkonnas Arduino programmeeriti juhtmooduli mikrokontroller pH anduri kalibreerimiseks, bioreaktori temperatuuri reguleerimiseks ja andmepunktide kogumiseks.



Joonis 13. Bioreaktori juhtmoodul.

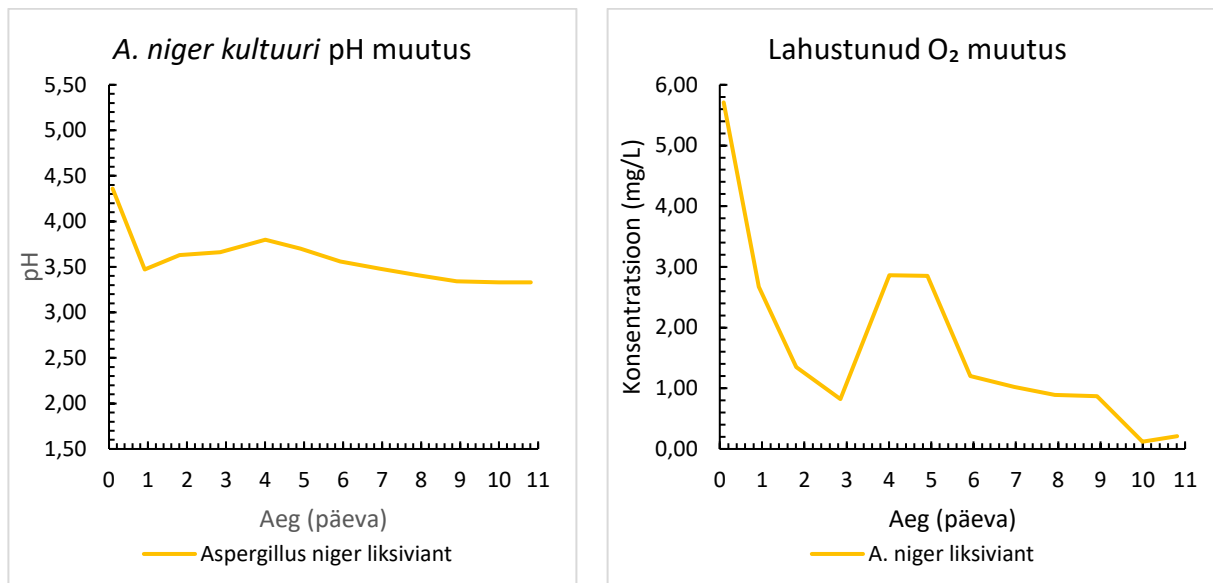
1—juhtmoodulit arvutiga ühendav COM kaabli port, 2—pH anduri signaali sagedus pH meetri kalibreerimiseks.



Joonis 14. Töövalmis BiotaTec 20-liitrine bioreaktor. Bioreaktoriga on ühendatud pH andur (1), proovivõtutoru (2), temperatuuriandur (3), aeratsiooni ava (4), aeraator (5), segaja (6), jahuti (7).

Seejärel lisati bioreaktorisse 9700 mL sahharoosi söödet ja 300 mL *A. niger* kultuuri. Kultuuri kasvatati 11 päeva ja iga 24h möödudes mõõdeti lahustunud hapniku (O_2) hulka mg/L kultuuri

elutegevuse jälgimiseks. Joonisel 15 toodud kultuuri pH muutus ajas ja lahustunud O₂ kontsentratsioon.

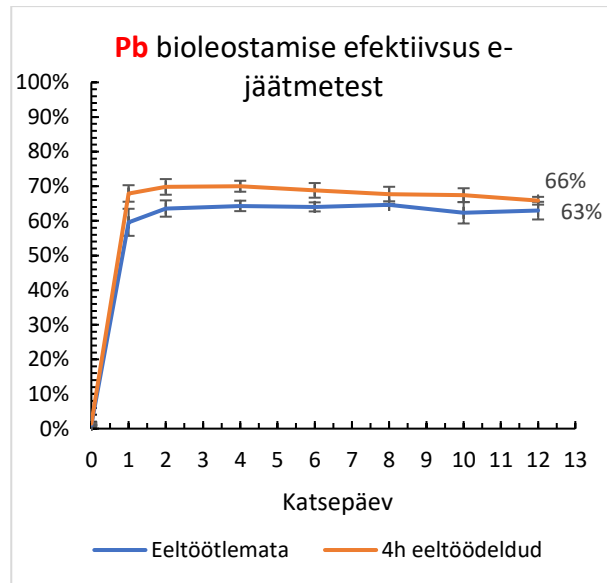
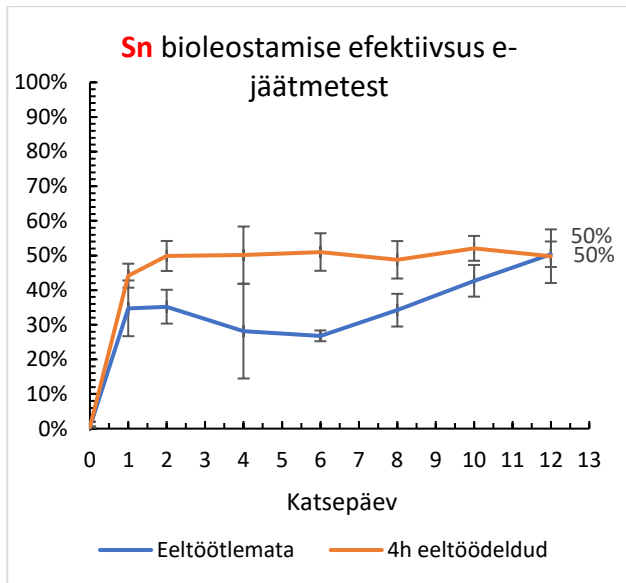


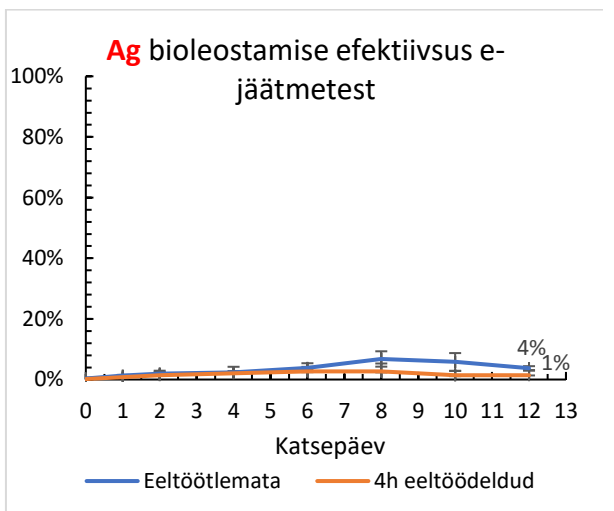
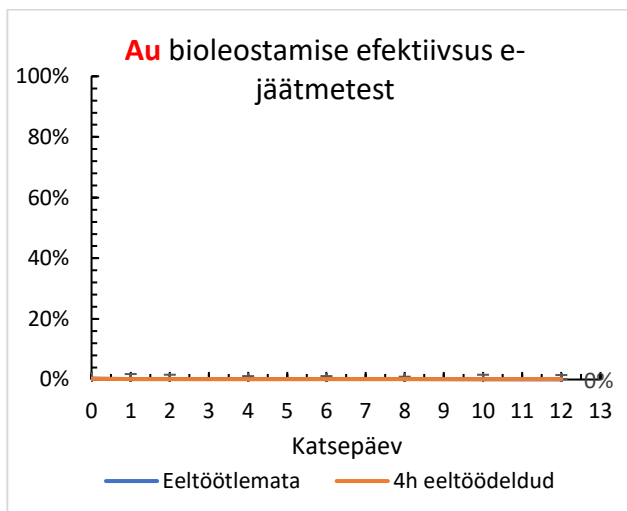
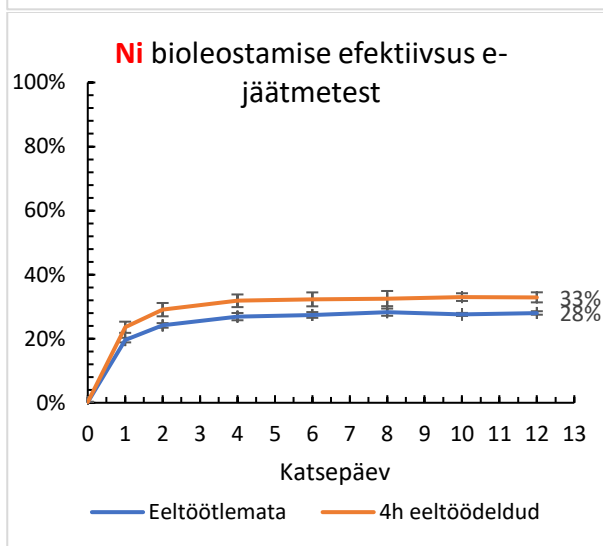
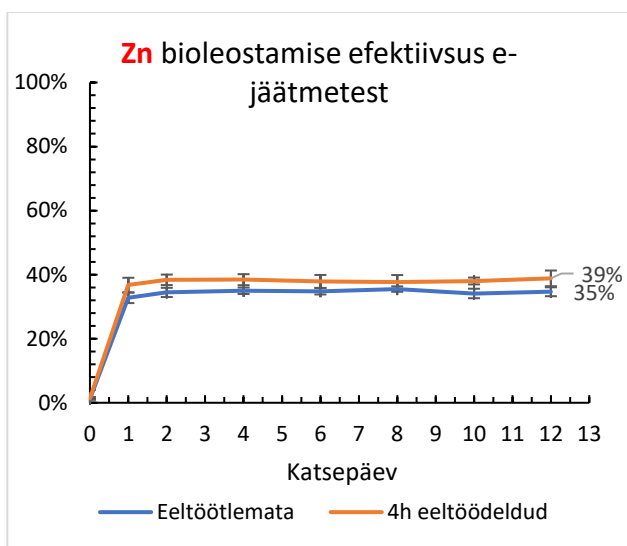
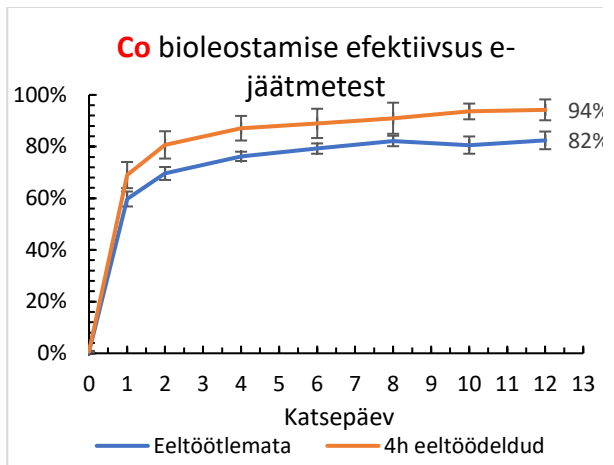
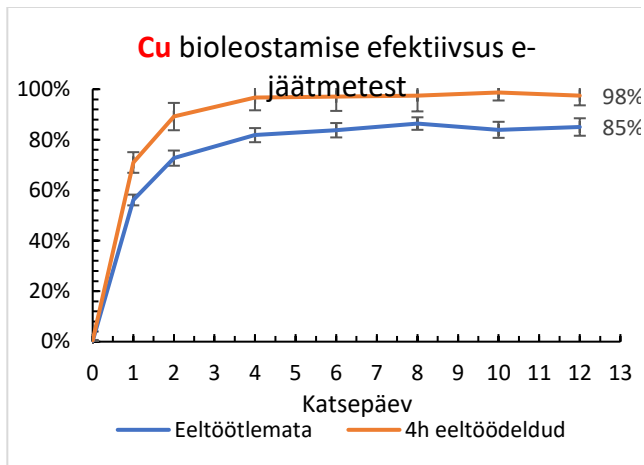
Joonis 15. *A. niger* kultuuri pH ja lahustunud O₂ muutus bioreaktoris. Lahustunud O₂ näitab *A. niger*'i kultuuri elutegevuse muutusi läbi hapniku tarbimise ja saadavuse söötmes. O₂ langusele reageeriti bioreaktori segaja kiiruse tõstmisega päevadel 2, 3 ja 4, mis põhjustades paremat O₂ lahustuvust ja väljendub graafikul lahustunud O₂ kontsentratsiooni tõusuga. Segaja kiiruse tõstmine oli vajalik, sest järsult suurenenud tihedusega *A. niger*'i biomass takistas hapniku ühtlast jaotumist reaktoris.



Joonis 16. *A. niger* kultuur bioreaktoris 11. päeval.

11 päeva järel oli kultuuris tihedalt *A. niger*'i sfäärilisi kolooniaid (joonis 16), mis eraldati söötimest filtreerimisega läbi klaasfiltrit. See oli vajalik, sest kultuuri tihedus oli väga suur, mis oleks potentsiaalselt hakanud segama metallide leostumist, nii häirides ühtlase e-jäätmete suspensiooni tekkimist kui ka orgaaniliste hapete lagunemise tõttu rakkude lüüsumise tagajärjel. Bioleostamiskatsed viidi läbi kolbides ning katsevedeliku mahuks oli 100 mL (peatükk 2.2.6). Tulemusi analüüsiti ICP-MS meetodil ja on toodud joonisel 17. Eelmise katsega võrreldes oli katse lõpuks tõusnud Sn, Pb, Cu, Co, Zn ja Ni leostumise efektiivsus mõlema substraadiga. Näiteks Sn leostumine kasvas mõlema substraadiga 50% peale (eelmises katse eeltöötlemata substraadil 13% ja eeltöödeldud substraadil 8%). Pb leostus vastavalt 66% ja 63% eeltöödeldud ja eeltöötlemata substraadil. Eeltöötlemata e-jäätmetel leostus Cu 85%, Co 82%, eeltöödeldud e-jäätmetel oli Cu 98% ja Co 94%. Au leostumine endisel 0% ja Ag alla 4%.

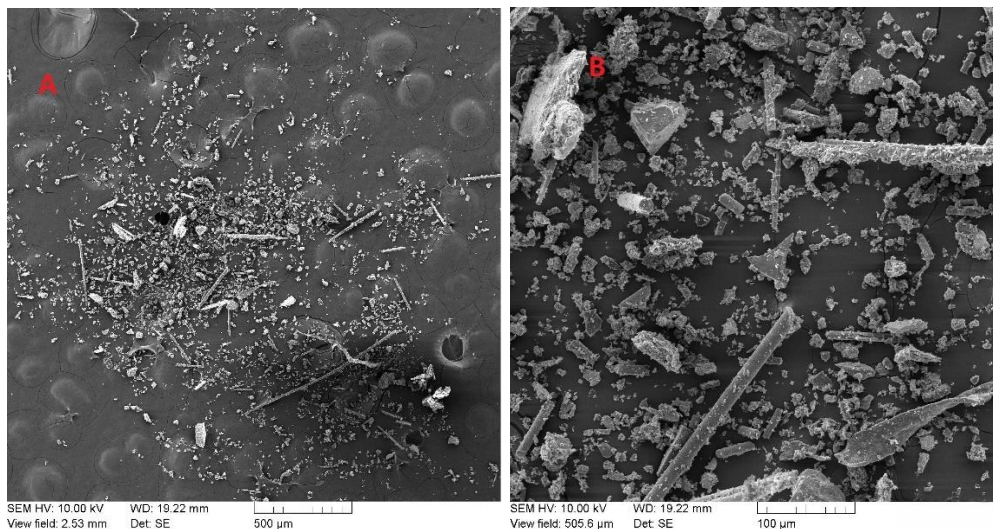




Joonis 17. Metallide bioleostamise efektiivsus e-jäätmetest. Veapiiridega näidatud metallide leostumise standardhälve (n=5)

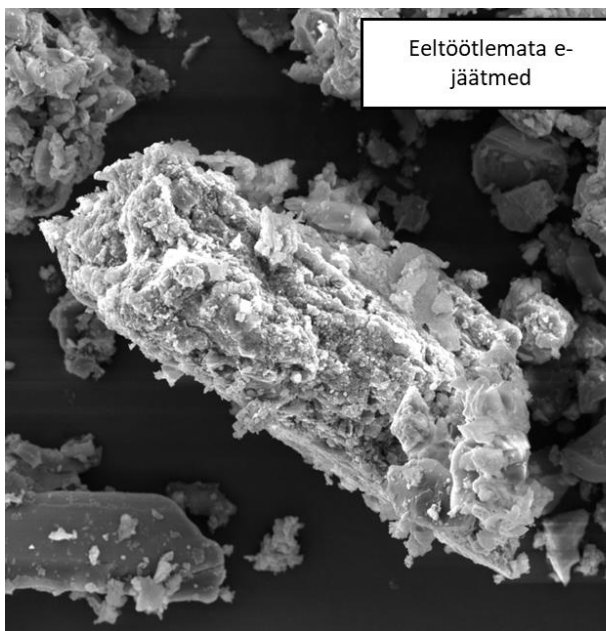
2.3.5 E-jäätmete elektronmikroskoopia enne ja pärast bioleostamist

E-jäätmete partiklite suuruse iseloomustamiseks viidi läbi SEM fotograafia bioleostamata substraadil. Substraadi osakeste keskmine paksus on 9 μm (määratud programmiga imageJ 1.54i), Pulber sisaldab üksikuid suuremaid ($\sim 600 \mu\text{m}$ pikkuseid) fiibreid. Pildid 150x ja 750x suurendusega toodud joonisel 18.



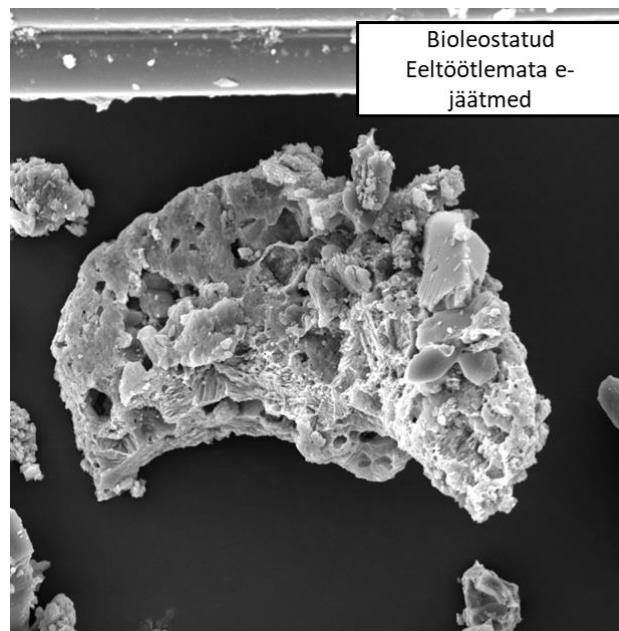
Joonis 18. SEM pilt substraadist. Pilt A on tehtud 150x ja pilt B 750x suurendusega. Kasutatud lühendid: **SEM HV**: skaneeriva elektronmikroskoobi kõrgepinge; **WD**: töökaugus (objektiivi kaugus pinnast); **View field**: vaatevälja laius; **Det:SE**: sekundaarelektronide detektor.

Võimalike substraadi muutuste jälgimiseks viidi läbi SEM fotograafia enne ja pärast bioleostamist peatükis 2.2.1 kirjeldatud meetodil. Piltidelt on näha, et eeltöötlemata ja eeltöödeldud e-jäätmete vahel ei ole märgatavaid erinevusi. Bioleostatud substraadid on muutunud poorsemaks, mis viitab metallide eraldumisele partiklitelt. Pildid toodud joonisel 19.



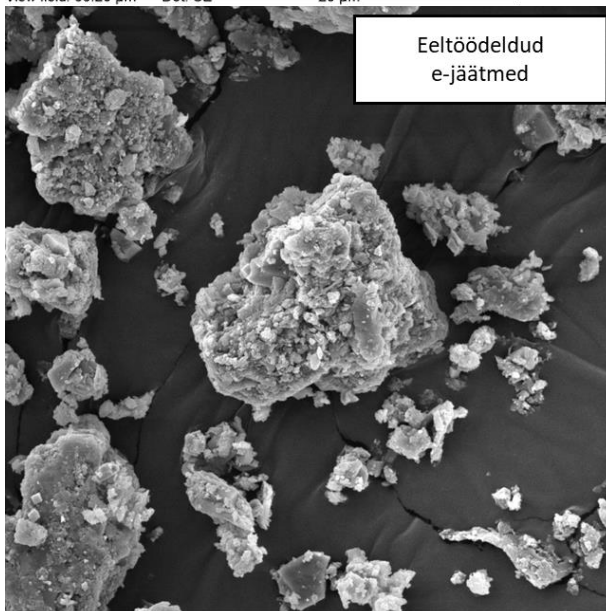
SEM HV: 10.00 kV WD: 19.20 mm
View field: 63.20 µm Det: SE

20 µm



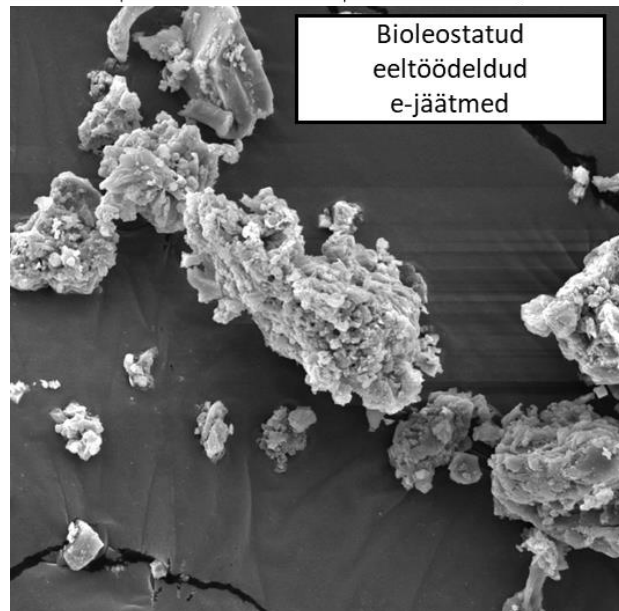
SEM HV: 10.00 kV WD: 19.13 mm
View field: 63.20 µm Det: SE

20 µm



SEM HV: 10.00 kV WD: 19.13 mm
View field: 63.20 µm Det: SE

20 µm



SEM HV: 10.00 kV WD: 19.12 mm
View field: 63.20 µm Det: SE

20 µm

Joonis 19. SEM pildid 6000x suurendus substraadist enne ja pärast bioleostamist. Kasutatud lühendid: **SEM HV:** skaneeriva elektronmikroskoobi kõrgepinge; **WD:** töökaugus (objektiivi kaugus pinnast); **View field:** vaatevälja laius; **Det:SE:** sekundaarelektronide detektor.

2.4 Arutelu

Käesoleva töö eesmärgiks oli testida filamentse seene *A. niger*'i baas- ja väärismetallide bioleostamise efektiivsust kullarikka e-jäätmete fraktsioonil. BiotaTec'i firmas on välja töötatud kulla ja teiste väärismetallide eraldamise meetod, kuid selleks, et saada hilisemaks metallide puhastamiseks võimalikult „puhas“ lahus ilma segavate baasmetallideta (eriti tina ja pliita), on vajalik nende eelnev eraldamine. Testimiseks, kas seda on võimalik teostada *A. niger*'iga, mis on tuntud kui efektiivne orgaaniliste hapete sekreteerija, analüüsiti pH muutust erinevatel söödetel ja metallide leostamist nii väikeses mahus, samuti defineeriti tingimused, kuidas antud organismi kultuuri ette valmistada suures mahus.

Esialgsete katsete juures selgus, et antud tüvi on võimeline langetama lahuse pH väärtuse 2-ni kuue päevaga ning kasvama sahharoossöötmel. Hilisemas katses selgus, et *A. niger*'i kultuuri pH langes 7 päeva jooksul linnaseekstrakti söötmel madalamale (pH 1,5) kui sahharoosi söötmel. Siiski peetakse kirjanduse andmetel sahharoosisöödet sobilikumaks substraadiks orgaaniliste hapete tootmiseks *A. niger*'i poolt (Ashour, 2019). Pealegi oli pH väärtus linnaseekstraktiga lähedane *A. niger*'i pH tolerantsipiirile, mis võib mõjutada negatiivselt metallide leostamise efektiivsust tänu negatiivsele efektile *A. niger*'i elulemusele pikemate inkubatsiooniperioodide jooksul. Sahharoossööde on sobilikum ka seetõttu, et GR (Guaranteed Reagent) puhtustasemega sahharoos on (GR) linnaseekstraktist odavam ja on seega kooskõlas BiotaTec OÜ eesmärkidega arendada välja tööstuslikul skaalal bioleostamine. Pealegi on võimalik sahharoosi asendada ka mõne suhkrurikka kultuurtaime nagu näiteks suhkruroo kasvatamise jääkidega, millede hinnad on palju odavamad puhastest sahhariididest (Nili *et al.*, 2022).

Bioleostamise efektiivsuse tõstmiseks katsetati sahharoosi kontsentratsiooni tõstmist ja inokulumi suurendamist, et suurendada orgaaniliste hapete, eriti sidrunhappe, sekretsiooni *A. niger*'i poolt. Tõsteti ka söötme algset pH-d, et vähendada tulevikus tööstusliku bioleostamise majanduslikke kulusi kemikaalidele. Läbiviidud katses ei olnud mõju kultuuri pH muutusele piisav kaugeleulatuvate järelduste tegemiseks, küll aga kiirendas suurem inokulumi kogus lahuse pH langemise kiirust. Söötme kõrgem algne pH (pH 4 asemel pH 5,44) osutus säästlikuks valikuks, sest neljandaks päevaks olid kõik kultuurid olenemata söötimest jõudnud pH väärtuse 3,5-ni.

Esimeses e-jäätmete leostamiskatses eraldus lahusesse töötlemata substraadist 12 päevaga 13% ja 4h töödeldust 8% tina (Sn). Pb leostus 45 % ja 39% vastavalt eeltöötlemata ja eeltöödeldud e-

jäätmetest. Lisaks leostus vastavalt 82% ja 66% vaske, 54% ja 25% Co. Antud tulemused näitasid, et kasutatud *A. niger*'i tüvel on potentsiaali raskmetallide ja baasmetallide eraldamiseks e-jäätmeteks, millele järgneks BiotaTec tehnoloogiaga väärismetallide eraldamine. Eeltöödeldud substraadist eraldus esimese katse käigus vähem metalle kui eeltöötlemata substraadist, kuigi vahe oli marginaalne (8%).

Järgmiseks etapiks oli katse skaleerimine 20-liitrisesse bioreaktorisse, et alustada tingimuste optimeerimisega suuremas mahus kultiveerimiseks. Substraadi kontsentratsioon katses tõsteti 2%-le, et uurida suurema hulga e-romu väärindamise efektiivust. Aja ja energia säästmiseks on oluline rikastada korraga maksimaalses koguses e-jäätmeid ehk suurendada e-jäätmete kogust maksimaalse võimaliku piirini. Analüüsides selgus, et teises katses eraldus eeltöötlemata substraadiga katse lõpuks (12. päevaks) 85% Cu ja eeltöödeldud substraadist 98% Cu. Eeltöödeldud substraadist eraldus 50% Sn ja 66% Pb. Nende tulemuste põhjal saab öelda, et e-jäätmete bioleostamisel *A. niger*'i liksiviandiga leostus hästi baasmetalle ja Pb, tina leostumine oli ootuste piiril, mis tähendab et antud meetod võib sobida Sn leostamiseks, aga vajab veel uurimist. Väärismetallid lahusesse ei eraldunud, mis on kooskõlas antud katses püstitatud eesmärgiga kombineerida BiotaTeci kulla leostamise meetodikat baasmetallide eraldamise etapiga. Lisaks vähendab Sn ja Pb leostumine substraadi toksilist mõju mikroorganismidele järgmistes etappides. Mõlemad katsed näitasid, et leostuvad metallid eralduvad lahusesse 24h-48h jooksul ja pärast seda enam eraldumise määrad märkimisväärselt ei tõuse. See tähendab, et *A. niger*'iga läbiviidud bioleostamine on kiire protsess, mis loob võimaluse suuremahuliste segatud bioreaktoritega (alates 100. liitrist) e-jäätmete bioleostamiseks, mis vähendab kulusid ja võimaldab leostada rohkem substraati lühema aja jooksul.

E-jäätmete eeltöötlemine 0,1M NaOH lahusega eraldab materjali osakesed epoksiid- ja keemilisest kattest. Võrreldes eeltöötlemata ja 0,1M NaOH-ga eeltöödeldud e-jäätmete leostamistulemusi tehtud katsetes, eraldus eeltöödeldud substraadist esimeses katses keskmiselt 9% vähem metalle ja teises katses keskmiselt 4% rohkem. Leostumise kiiruses märkimisväärsed erinevused puudusid. Eeltöötlemise marginaalne mõju bioleostamisele võib olla põhjustatud katses kasutatud e-jäätme väikese terade läbimõõdu tõttu. Eeltöötlemine omab efekti, kui näiteks trükkplaadi epoksiidkatte tõttu ei pääse mikroorganismide happed ja metaboliidid kontakti metallidega (Moyo *et al.*, 2020). Seda kinnitavad ka SEM pildid, kus pole märgata vahet

eeltöötlemata ja eeltöödeldud substraadi vahel. Seega ei ole *A. niger*'iga bioleostamine oluliselt mõjutatud NaOH eeltöötlemisest, mistõttu on seda võimalik rakendada peenestatud (<1mm) e-jäätmele ilma kulutusteta eeltöötlemisele.

Selleks, et e-jäätmete bioleostamine saaks tööstuslikult rakendatavaks lahenduseks, on vaja ületada veel mõned hetkel eksisteerivad probleemid. Üheks nendeks on varem viidatud e-jäätmete bioleostamise suur heterogeensus – üks ja seesama organism võib anda väga erinevaid tulemusi eri tüüpi e-jäätmete leostamisel (Faraji *et al.*, 2018; Trivedi & Hait, 2024). Veelgi enam, sarnased organismid, mis on tuntud kui orgaaniliste hapete sekreteerijadena, võivad leostada metalle ühe ja sama e-jäätme puhul erineva efektiivsusega. Nende probleemide lahendamise on vaja detailselt kirjeldada sekreteeritava hapete koostist kui ka võimalikku valgulist sekretoomi ning analüüsida nende koostoimet. Antud töö on selle laiaulatuslikuma projekti esimene etapp, milles on defineerinud *A. niger*'i metallide leostamise profiil ja efektiivsus, võimaldades tema funktsiooni täpsemat kirjeldust, mis on plaanis ette võtta edaspidi.

KOKKUVÕTE

Töö esimene eesmärk oli uurida *A. niger*'i potentsiaali baas- ja raskmetallide eraldamiseks e-jäätmetest. Leibnizi instituudi DSMZ mikroorganismide kollektsioonist tellitud *A. niger*'i tüvi 3;320 (DSM 2466) vastas esialgsetele ootustele, kui kultuuri pH muutus ajas kinnitas tüve võimet sekreteerida orgaanilisi happeid.

Antud tüvi on suuteline elama ja happeid tootma sahharoosisöötmel, mis on linnaseekstraktist odavam süsinikuallikas ja sobib BiotaTec'i eesmärgiga luua tööstuslikul skaalal tööstuslikke bioleostamistehnoloogiaid. ICP-MS meetodil mõõdetud esimesed bioleostamiskatse tulemused näitasid, et antud kultuuriga on leostamistingimuste optimeerimisel võimalik leostada baas- ja raskmetalle, järeltöötlemiseks oli vajalik katsed korrata suuremal mahul.

Teises, 20-liitrisel bioreaktoril eelkasvatatud *A. niger*'i kultuuriga katses saavutatud eeltöötlemata substraadi Sn (50%), Pb (63%), Cu (85%), Co (82%), Zn (35%) ja Ni (28%) bioleostamise efektiivsus oli piisavalt hea et kinnitada antud meetodi potentsiaali suuremahuliste bioreaktoritega (alates 100-liitrisel) baas- ja raskmetallide bioleostamise läbiviimiseks. Lisaks oli Au ja Ag leostumine mõlemal katsel peaaegu olematu, mis ühtib Biotatec'i eesmärgiga täiendada arendatud kulla leostamise tehnoloogiat eelneva baasmetallide eraldamisega substraadist. Hinnati ka 0,1M NaOH lahusega eeltöötlemise mõju e-jäätmete metallisisaldusele ja bioleostamise efektiivsusele. Selgus, et antud peenestusega e-jäätmete puhul ei mõjuta NaOH eeltöötlemine metallide sisaldust ja bioleostamist märkimisväärsel määral, ning *A. niger*'iga bioleostamist saab teostada vähem kulukate eeltöötlemata e-jäätmetega. Katses, kus tõsteti substraadi kontsentratsiooni 1%-lt 2%-le, tõusis bioleostamise efektiivsus, mis loob võimaluse korraga suurema hulga e-jäätmete töötlemiseks. Siiski võis tulemus olla mõjutatud mitmetest parameetritest ja vajab edasisi uuringuid.

SUMMARY

Due to increased consumption and rapid technological development, electronic and electrical equipment waste has become a rapidly growing type of waste. Every year, over 50 million tons of e-waste are produced worldwide, with only 20% being properly handled and recycled. One reason for this is the lack of a suitable recycling process that can compete with conventional pyrometallurgy. The desired technology should be economically viable for e-waste recycling and emit fewer greenhouse gases. Current industrial e-waste recyclers focus on extracting gold and copper, leaving most valuable metals, including base metals and rare earth elements, unrecovered. Additionally, pyrometallurgical methods fail to extract toxic metals, which can cause pollution and health risks when released into the environment. A potential solution could be bioleaching with microorganisms, which might also address the selectivity issues of conventional metal extraction methods.

The first goal of the work was to investigate the potential of using *A. niger* for the extraction of base and heavy metals from e-waste. The *A. niger* strain 3;320 (DSM 2466), ordered from the Leibniz Institute DSMZ collection of microorganisms, met the initial expectations, as the change in culture pH over time confirmed the strain's ability to secrete acids. This strain is capable of surviving and producing acids on a sucrose medium, which is a cheaper carbon source than malt extract, and aligns with BiotaTec's goal of creating large-scale industrial bioleaching technologies. By monitoring pH changes, the sucrose concentration in the standard sucrose medium (100 g/L) was adjusted to 117 g/L to provide an excess of carbon for organic acid production by the *A. niger* culture. Increasing the inoculum size accelerated the rate of pH decrease in the culture. A higher initial pH of the medium (pH 5.44 instead of pH 4) proved to be a cost-effective choice, as by the fourth day, all cultures had reached a pH value of 3.5 regardless of the medium. The initial bioleaching test results measured by ICP-MS showed, that it is possible to leach base and heavy metals with this culture, but further testing on a larger scale was necessary to draw conclusions. In the second test (20 litre bioreactor with pre-grown *A. niger* culture), the leaching efficiency of the untreated substrate for Sn (50%), Pb (63%), Cu (85%), Co (82%), Zn (35%), and Ni (28%) was sufficiently high to confirm the potential of this method for bioleaching base and heavy metals with larger bioreactors (starting from 100 L). Additionally, the leaching of Au and Ag was almost negligible in both tests, which aligns with BiotaTec's goal to complement the developed gold

leaching technology by first removing base metals from the substrate. The effect of 0.1M NaOH pretreatment on the metal content and bioleaching efficiency of e-waste was evaluated. It was found, that this finely ground e-waste was not significantly affected by NaOH pretreatment in terms of metal content and bioleaching, indicating that bioleaching with *A. niger* can be performed with less costly untreated e-waste. In the experiment, where the substrate concentration was increased from 1% to 2%, the bioleaching efficiency increased, allowing for the processing of larger amounts of e-waste at once. However, the result could be influenced by various parameters and requires further study.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adetunji, A. I., Oberholster, P. J., & Erasmus, M. (2023). Bioleaching of Metals from E-Waste Using Microorganisms: A Review. *Minerals*, *13*(6), Article 6.
- Al-Khatib, L. A., & Fraige, F. Y. (2024). The Potential Material Flow of WEEE in a Data-Constrained Environment—The Case of Jordan. *Recycling*, *9*(1), Article 1.
- Arshadi, M., Nili, S., & Yaghmaei, S. (2019). Ni and Cu recovery by bioleaching from the printed circuit boards of mobile phones in non-conventional medium. *Journal of Environmental Management*, *250*, 109502.
- Asghari, I., Mousavi, S. M., Amiri, F., & Tavassoli, S. (2013). Bioleaching of spent refinery catalysts: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *19*(4), 1069–1081.
- Ashour, E. (2019). *Citric Acid Fermentation by Aspergillus niger*.
- Bahaloo-Horeh, N., Mousavi, S. M., & Baniyasi, M. (2018). Use of adapted metal tolerant *Aspergillus niger* to enhance bioleaching efficiency of valuable metals from spent lithium-ion mobile phone batteries. *Journal of Cleaner Production*, *197*, 1546–1557.
- Behera, B. C. (2020). Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. *Critical Reviews in Microbiology*, *46*(6), 727–749.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.-M., & Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(4), 1193–1206.
- Biswal, B. K., & Balasubramanian, R. (2023). Recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries using microbial agents for bioleaching: a review. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1197081.
- Cairns, T. C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., & Meyer, V. (2021). Turning Inside Out: Filamentous Fungal Secretion and Its Applications in Biotechnology, Agriculture, and the Clinic. *Journal of Fungi*, *7*(7), 535.
- Cenci, M. P., Dal Berto, F. C., Schneider, E. L., & Veit, H. M. (2020). Assessment of LED lamps components and materials for a recycling perspective. *Waste Management*, *107*, 285–293.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., & Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*(3), 233–242.
- Desmarais, M., Pirade, F., Zhang, J., & Rene, E. R. (2020). Biohydrometallurgical processes for the recovery of precious and base metals from waste electrical and electronic equipments: Current trends and perspectives. *Bioresource Technology Reports*, *11*, 100526.
- Dhanunjaya Rao, M., K. Singh, K., A. Morrison, C., & B. Love, J. (2020). Challenges and opportunities in the recovery of gold from electronic waste. *RSC Advances*, *10*(8), 4300–4309.
- Diaz, S. M., Palma, R. M., Muñoz, M. N., Becerra-Arias, C., & Fernández Niño, J. A. (2020). Factors Associated with High Mercury Levels in Women and Girls from The Mojana Region, Colombia, 2013–2015. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(6), Article 6.
- Díaz-Martínez, M. E., Argumedo-Delira, R., Sánchez-Viveros, G., Alarcón, A., & Mendoza-López, Ma. R. (2019). Microbial Bioleaching of Ag, Au and Cu from Printed Circuit Boards of Mobile Phones. *Current Microbiology*, *76*(5), 536–544.
- Dong, Y., Zan, J., & Lin, H. (2023). Bioleaching of heavy metals from metal tailings utilizing bacteria and fungi: Mechanisms, strengthen measures, and development prospect. *Journal of Environmental Management*, *344*, 118511.
- Dusengemungu, L., Kasali, G., Gwanama, C., & Mubemba, B. (2021). Overview of fungal bioleaching of metals. *Environmental Advances*, *5*, 100083.
- Dutta, D., Rautela, R., Gujjala, L. K. S., Kundu, D., Sharma, P., Tembhare, M., & Kumar, S. (2023). A review on recovery processes of metals from E-waste: A green perspective. *Science of The Total Environment*, *859*, 160391.
- Ehrlich, H. L. (2001). Past, present and future of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, *59*(2), 127–134.

- Falagán, C., Dew, D. W., & Hudson-Edwards, K. A. (2024). Effect of nutrient concentration, dissolved salts, and mineralogy at high temperature column bioleaching of a pyrrhotite-pyrite secondary ore. *Minerals Engineering*, *209*, 108648.
- Faraji, F., Golmohammadzadeh, R., Rashchi, F., & Alimardani, N. (2018). Fungal bioleaching of WPCBs using *Aspergillus niger*: Observation, optimization and kinetics. *Journal of Environmental Management*, *217*, 775–787.
- Forti, V., Balde, C. P., Kuehr, R., & Bel, G. (2020). *The Global E-waste Monitor 2020: Quantities, flows and the circular economy potential*. United Nations University (UNU)/United Nations Institute for Training and Research (UNITAR) – co-hosted SCYCLE Programme, International Telecommunication Union (ITU) & International Solid Waste Association (ISWA), Bonn/Geneva/Rotterdam.
- Gericke, M., Pinches, A., & van Rooyen, J. V. (2001). Bioleaching of a chalcopyrite concentrate using an extremely thermophilic culture. *International Journal of Mineral Processing*, *62*(1), 243–255.
- Hagelüken, C. (2006). *Recycling of Electronic Scrap at Umicore*. *Precious Metals Refining*, *12*, 111–120.
- Harvey, T., & Bath, M. (2007). The GeoBiotics GEOCOAT® technology - Progress and challenges. *Biomining*, 97–112.
- Hsu, E., Barmak, K., West, A. C., & Park, A.-H. A. (2019). Advancements in the treatment and processing of electronic waste with sustainability: a review of metal extraction and recovery technologies. *Green Chemistry*, *21*(5), 919–936.
- Huo, X., Liu, J., Hong, X., Bai, H., Chen, Z., Che, J., Yang, H., Tong, Y., & Feng, S. (2024). Enhancing column bioleaching of chalcocite by isolated iron metabolism partners *Leptospirillum ferriphilum*/*Acidiphilium* sp. coupling with systematically utilizing cellulosic waste. *Bioresource Technology*, *394*, 130193.
- Işıldar, A., van Hullebusch, E. D., Lenz, M., Du Laing, G., Marra, A., Cesaro, A., Panda, S., Akcil, A., Kucuker, M. A., & Kuchta, K. (2019). Biotechnological strategies for the recovery of valuable and critical raw materials from waste electrical and electronic equipment (WEEE) – A review. *Journal of Hazardous Materials*, *362*, 467–481.
- Islam, A., Ahmed, T., Awual, Md. R., Rahman, A., Sultana, M., Aziz, A. A., Monir, M. U., Teo, S. H., & Hasan, M. (2020). Advances in sustainable approaches to recover metals from e-waste-A review. *Journal of Cleaner Production*, *244*, 118815.
- Johansson, C., Shrader, V., Suissa, J., Adutwum, K., & Kohr, W. (1999). Use of the GEOCOAT™ process for the recovery of copper from chalcopyrite. In *Process Metallurgy* (Vol. 9, pp. 569–576). Elsevier.
- Johnson, D. B. (2014). Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current Opinion in Biotechnology*, *30*, 24–31.
- Kaksonen, A. H., Lavonen, L., Kuusenaho, M., Kollu, A., Närhi, H., Vestola, E., Puhakka, J. A., & Tuovinen, O. H. (2011). Bioleaching and recovery of metals from final slag waste of the copper smelting industry. *Minerals Engineering*, *24*(11), 1113–1121.
- Khaliq, A., Rhamdhani, M. A., Brooks, G., & Masood, S. (2014). Metal Extraction Processes for Electronic Waste and Existing Industrial Routes: A Review and Australian Perspective. *Resources*, *3*(1), Article 1.
- Kim, J.-W., Barrington, S., Sheppard, J., & Lee, B. (2006). Nutrient optimization for the production of citric acid by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown on peat moss enriched with glucose. *Process Biochemistry*, *41*(6), 1253–1260.
- Kudpeng, K., Bohu, T., Morris, C., Thiravetyan, P., & Kaksonen, A. H. (2020). Bioleaching of Gold from Sulfidic Gold Ore Concentrate and Electronic Waste by *Roseovarius tolerans* and *Roseovarius mucosus*. *Microorganisms*, *8*(11), Article 11.
- Lebbie, T. S., Moyebi, O. D., Asante, K. A., Fobil, J., Brune-Drisse, M. N., Suk, W. A., Sly, P. D., Gorman, J., & Carpenter, D. O. (2021). E-Waste in Africa: A Serious Threat to the Health of Children. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(16), Article 16.

- Li, J., Xu, T., Liu, J., Wen, J., & Gong, S. (2021). Bioleaching metals from waste electrical and electronic equipment (WEEE) by *Aspergillus niger*: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(33), 44622–44637.
- Li, M., Widijatmoko, S. D., Wang, Z., & Hall, P. (2023). A methodology to liberate critical metals in waste solar panel. *Applied Energy*, *337*, 120900.
- Li, Z., Diaz, L. A., Yang, Z., Jin, H., Lister, T. E., Vahidi, E., & Zhao, F. (2019). Comparative life cycle analysis for value recovery of precious metals and rare earth elements from electronic waste. *Resources, Conservation and Recycling*, *149*, 20–30.
- Liu, Q., Bai, J., Gu, W., Peng, S., Wang, L., Wang, J., & Li, H. (2020). Leaching of copper from waste printed circuit boards using *Phanerochaete chrysosporium* fungi. *Hydrometallurgy*, *196*, 105427.
- Lobos, A., Harwood, V. J., Scott, K. M., & Cunningham, J. A. (2021). Tolerance of three fungal species to lithium and cobalt: Implications for bioleaching of spent rechargeable Li-ion batteries. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(2), 743–755.
- Marra, A., Cesaro, A., Rene, E. R., Belgiorno, V., & Lens, P. N. L. (2018). Bioleaching of metals from WEEE shredding dust. *Journal of Environmental Management*, *210*, 180–190.
- Mazarakioti, E. C., Zotos, A., Thomatou, A.-A., Kontogeorgos, A., Patakas, A., & Ladavos, A. (2022). Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS), a Useful Tool in Authenticity of Agricultural Products' and Foods' Origin. *Foods*, *11*(22), Article 22.
- Mouna, H. M., & Baral, S. S. (2019). A bio-hydrometallurgical approach towards leaching of lanthanum from the spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspergillus niger*. *Hydrometallurgy*, *184*, 175–182.
- Moyo, T., Chirume, B. H., & Petersen, J. (2020). Assessing alternative pre-treatment methods to promote metal recovery in the leaching of printed circuit boards. *Resources, Conservation and Recycling*, *152*, 104545.
- Naseri, T., Beiki, V., Mousavi, S. M., & Farnaud, S. (2023). A comprehensive review of bioleaching optimization by statistical approaches: recycling mechanisms, factors affecting, challenges, and sustainability. *RSC Advances*, *13*(34), 23570–23589.
- Naseri, T., Pourhossein, F., Mousavi, S. M., Kaksonen, A. H., & Kuchta, K. (2022). Manganese bioleaching: an emerging approach for manganese recovery from spent batteries. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *21*(2), 447–468.
- Natarajan, K. A. (2018). Chapter 5 - Methods in Biohydrometallurgy and Developments: Dump, Heap, In Situ, and Stirred Tank Bioleaching. In K. A. Natarajan (Ed.), *Biotechnology of Metals* (pp. 81–106). Elsevier.
- Neale, J., Seppälä, J., Laukka, A., Van Aswegen, P., Barnett, S., & Gericke, M. (2017). The MONDO Minerals Nickel Sulfide Bioleach Project: From Test Work to Early Plant Operation. *Solid State Phenomena*, *262*, 28–32.
- Nili, S., Arshadi, M., & Yaghmaei, S. (2022). Fungal bioleaching of e-waste utilizing molasses as the carbon source in a bubble column bioreactor. *Journal of Environmental Management*, *307*, 114524.
- Patel, F., & Lakshmi, B. (2021). Bioleaching of copper and nickel from mobile phone printed circuit board using *Aspergillus fumigatus* A2DS. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*(3), 1475–1487.
- Patil, A. B., Paetzl, V., Struis, R. P. W. J., & Ludwig, C. (2022). Separation and Recycling Potential of Rare Earth Elements from Energy Systems: Feed and Economic Viability Review. *Separations*, *9*(3), Article 3.
- Pourhossein, F., Mousavi, S. M., Beolchini, F., & Lo Martire, M. (2021). Novel green hybrid acidic-cyanide bioleaching applied for high recovery of precious and critical metals from spent light emitting diode lamps. *Journal of Cleaner Production*, *298*, 126714.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D., & Bonnefoy, V. (2009). Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*, *10*, 394.

- Rai, V., Liu, D., Xia, D., Jayaraman, Y., & Gabriel, J.-C. P. (2021). Electrochemical Approaches for the Recovery of Metals from Electronic Waste: A Critical Review. *Recycling*, 6(3), Article 3.
- Rasoulnia, P., Barthen, R., Puhakka, J. A., & Lakaniemi, A.-M. (2021). Leaching of rare earth elements and base metals from spent NiMH batteries using gluconate and its potential bio-oxidation products. *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125564.
- Rene, E. R., Sethurajan, M., Kumar Ponnusamy, V., Kumar, G., Bao Dung, T. N., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2021). Electronic waste generation, recycling and resource recovery: Technological perspectives and trends. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 125664.
- Rijavec, T., & Lapanje, A. (2016). Hydrogen Cyanide in the Rhizosphere: Not Suppressing Plant Pathogens, but Rather Regulating Availability of Phosphate. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Roberto, F. F., & Schippers, A. (2022). Progress in bioleaching: part B, applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(18), 5913–5928.
- Rosa, E., Di Piazza, S., Cecchi, G., Mazzoccoli, M., Zerbini, M., Cardinale, A. M., & Zotti, M. (2022). Applied Tests to Select the Most Suitable Fungal Strain for the Recovery of Critical Raw Materials from Electronic Waste Powder. *Recycling*, 7(5), Article 5.
- Schuster, J., & Ebin, B. (2021). Investigation of indium and other valuable metals leaching from unground waste LCD screens by organic and inorganic acid leaching. *Separation and Purification Technology*, 279, 119659.
- Sethurajan, M., van Hullebusch, E. D., Fontana, D., Akcil, A., Devenci, H., Batinic, B., Leal, J. P., Gasche, T. A., Ali Kucuker, M., Kuchta, K., Neto, I. F. F., Soares, H. M. V. M., & Chmielarz, A. (2019). Recent advances on hydrometallurgical recovery of critical and precious elements from end of life electronic wastes - a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(3), 212–275.
- Sikander, A., Kelly, S., Kuchta, K., Sievers, A., Willner, T., & Hursthouse, A. S. (2022). Chemical and Microbial Leaching of Valuable Metals from PCBs and Tantalum Capacitors of Spent Mobile Phones. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(16), 10006.
- Srichandan, H., Mohapatra, R. K., Parhi, P. K., & Mishra, S. (2019). Bioleaching approach for extraction of metal values from secondary solid wastes: A critical review. *Hydrometallurgy*, 189, 105122.
- Thomas, R. (2003). An Overview of ICP–Mass Spectrometry, p. 1- 6. In R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS*, 1st ed., CRC Press.
- Tipre, D. R., Khatri, B. R., Thacker, S. C., & Dave, S. R. (2021). The brighter side of e-waste—a rich secondary source of metal. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(9), 10503–10518.
- Torrubia, J., Valero, A., Valero, A., & Lejuez, A. (2023). Challenges and Opportunities for the Recovery of Critical Raw Materials from Electronic Waste: The Spanish Perspective. *Sustainability*, 15(2), Article 2.
- Trivedi, A., & Hait, S. (2024). Fungal bioleaching of metals from WPCBs of mobile phones employing mixed *Aspergillus* spp.: Optimization and predictive modelling by RSM and AI models. *Journal of Environmental Management*, 349, 119565.
- Tuomela, P., Törmänen, T., & Michaux, S. (2021). *Strategic roadmap for the development of Finnish battery mineral resources*.
- Williamson, A. J., Folens, K., Matthijs, S., Paz Cortes, Y., Varia, J., Du Laing, G., Boon, N., & Hennebel, T. (2021). Selective metal extraction by biologically produced siderophores during bioleaching from low-grade primary and secondary mineral resources. *Minerals Engineering*, 163, 106774.
- Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *The Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 115–133.
- Xia, J., Song, J., Liu, H., Nie, Z., Shen, L., Yuan, P., Ma, C., Zheng, L., & Zhao, Y. (2018). Study on catalytic mechanism of silver ions in bioleaching of chalcopyrite by SR-XRD and XANES. *Hydrometallurgy*, 180, 26–35.

- Xue, X., Bi, F., Liu, B., Li, J., Zhang, L., Zhang, J., Gao, Q., & Wang, D. (2021). Improving citric acid production of an industrial *Aspergillus niger* CGMCC 10142: identification and overexpression of a high-affinity glucose transporter with different promoters. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 168.
- Yunus, P. A., & Sengupta, D. B. (2016). *E-Waste Indian Perspective And Recovery of Valuable Metals From E-Waste-A Review*.
- Zhang, L., Zhou, W., Liu, Y., Jia, H., Zhou, J., Wei, P., & Zhou, H. (2020). Bioleaching of dewatered electroplating sludge for the extraction of base metals using an adapted microbial consortium: Process optimization and kinetics. *Hydrometallurgy*, 191, 105227.
- Zhang, P., Qin, C., Hong, X., Kang, G., Qin, M., Yang, D., Pang, B., Li, Y., He, J., & Dick, R. P. (2018). Risk assessment and source analysis of soil heavy metal pollution from lower reaches of Yellow River irrigation in China. *Science of The Total Environment*, 633, 1136–1147.

VEEBILEHED

- Elementis plc (2024). Annual Report of Accounts 2023. Vaadatud 21.05.2024
<https://www.elementis.com/investors/investor-information/results-reports-and-presentations/>.
- Loeffelben, K. (2011). Kids of Sodom - E-waste in Ghana. Vaadatud 20.05.2024
[tps://www.flickr.com/photos/brsmeas/38249177816/](https://www.flickr.com/photos/brsmeas/38249177816/).
- Fisher Scientific (2024). Saccharose, Certified AR. Vaadatud 22.05.2024
<https://www.fishersci.de/shop/products/sucrose-certified-ar-analysis-meets-analytical-specification-ph-eur-bp-fisher-chemical/10634932#?keyword=Sucrose%20ar>.
- Fisher Scientific (2024). Thermo Scientific™ Oxoid™ Malzextrakt. Vaadatud 22.05.2024
<https://www.fishersci.de/shop/products/oxoid-malt-extract/10188572#?keyword=malt%20extract>.

LIHTLITSENTS

LIHTLITSENTS LÕPUTÖÖ REPRODUTSEERIMISEKS JA ÜLDSUSELE KÄTTESAADAVAKS TEGEMISEKS

Mina, Karl Joosep Põldsepp

(sünnikuupäev: 04.12.2000)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

“Baasmetallide bioeostamine e-jäätmetest *Aspergillus niger*’iga”,

mille juhendajad on Jaan Vihalemm, MSc, kaasprofessor Priit Jõers, PhD

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Karl Joosep Põldsepp

26.05.2024