

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA
INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Vanaadiumi ja teiste metallide heterotroofne biolestumine graptoliitargilliidist

Bakalaureusetöö

12 EAP

Darja Lapina

Juhendaja Anne Menert, PhD

Tartu 2024

Vanaadiumi ja teiste metallide heterotroofne bioleostumine graptoliitargilliidist

Kõik teavad, et meie planeedi ressursid ei ole lõpmatud, mistõttu luuakse üha uusi projekte taastuvate energiaallikate otsimiseks, millest üks on vanaadiumredoksakud. Potentsiaalne vanaadiumi allikas Eestis on orgaaniliselt rikastatud settekivim – graptoliitargilliit ehk must kilt. Argilliidis seostatakse vanaadiumi sageli silikaatidega, kuid olulised vanaadiumi kandjad on ka metallorgaanilised kompleksid. Keskkonnasõbralik bioleostamismeetod võimaldab ekstraheerida seda haruldast metalli kildast väiksema keerukuse ja kasutuskuludega. Käesoleva töö eesmärk ongi määrata seos vanaadiumi ja graptoliidiargilliidi orgaanilise aine vahel bioleostumise teel, kasutades inokulumina kahte heterotroofset bakteritüve. Lisaks uuritakse ka mõnede teiste keemiliste elementide leostumist nimetatud bakteritüvede toimel.

CERCS:

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Märksõnad: bioleostumine, graptoliitargilliit, must kilt, vanaadium, geoporfüriinid.

Heterotrophic bioleaching of vanadium and other metals from graptolite argillite

Everyone knows that our planet's resources are not infinite, so new projects are being created to search for renewable energy sources, one of which is vanadium redox batteries. A potential source of vanadium in Estonia is an organically enriched sedimentary rock – graptolite argillite or black shale. In argillite, vanadium is often associated with silicates, but organometallic complexes are also important vanadium carriers. An environmentally friendly bioleaching method allows the extraction of this rare metal from shale with less complexity and operating costs. The purpose of this work is to determine the relationship between vanadium and graptolite argillite organic matter by bioleaching, using two heterotrophic bacterial strains as inoculums. Additionally, leaching of some other chemical elements by the mentioned bacterial strains is also being investigated.

CERCS:

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Keywords: bioleaching, graptolite argillite, black shale, vanadium, geoporpyrins.

SISUKORD

SISUKORD	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Eesti graptoliitargilliidi asukoht ja hinnanguline kogus	7
1.2 Graptoliitargilliidi iseloomustus	7
1.3 Graptoliitargilliidi ajalooline uurimine ja kasutamine Eestis	7
1.4 Graptoliitargilliidi kasutamise võimalused	8
1.4.1 Vaanadium	8
1.5 Graptoliitargilliidi kaevandamisega seotud probleemid	9
1.2. Bioleostumine	9
1.2.1 Kuhjaleostumine (Talvivaara kaevandus, Sotkamo vald)	10
1.2.2 Eesti BiotaMet protsess	11
1.2.3 Heterotroofne konsortsium inokulaadina	11
1.2.3.1 <i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	11
1.2.3.2 <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	12
2. EKSPERIMENTAALOSA	14
2.1. Töö eesmärgid	14
2.2. Materjal ja meetodika	14
2.2.1 Substraat ja söötmed	14
2.2.2 Inokulum	15
2.2.2.1 Inokulumide iseloomustus	15
2.2.3. Katseplaan	16
2.2.3.1 Eelkatsed	16
2.2.3.2 Vahekatse	16
2.2.3.3 Põhikatsed	17
2.2.3.2.1 Mikroorganismide arvukused	17
2.2.3.2.2 pH analüüs	17
2.2.3.2.3 Metallide analüüs	17
2.3 Tulemused ja arutelu	20
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY	28
KIRJANDUSE LOETELU	30
VEEBIAADRESSIDE LOETELU	34
LISAD	35

KASUTATUD LÜHENDID

ARGCON5 – argilliidi metallorgaanilisi komplekse lagundav mikroobikooslus, mis on deponeeritud mikroobitüvede kolleksiooni CELMS

CELMS – Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi juures asuv mittemeditsiinilise päritoluga looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kolleksioon

mQ – MilliQ vesi

GA – graptoliitargilliit

PBPs – penitsilliini siduvad valgud

ICP-MS – induktiiv-sidestatud plasma massispektromeetria

ppt – tuhandikosa

rpm – pööret minutis

SISSEJUHATUS

Bioleostumine on maagist metallide ekstraheerimise protsess elusate mikroorganismide abil. Selle meetodi reagentina võib kasutada graptoliitargilliiti ehk musta kilti, mis põhimõtteliselt koosneb mineraal- ja orgaanilisest maatriksist, kus must tähendab mis tahes orgaanilist ainet, mis annab kivimile värvi, ja kilt viitab peeneteralisele settekivimile. Selline orgaanikarikas kivim on kindlasti mitme metalli tulevikutooraine, tähelepanuväärselt kohal on vanaadiumi, uraani, molübdeeni, tsinki ja nikli sisaldus. Vanaadium on laialdaselt tarvitusel kaasaegses tööstuses, kus üle 85% sellest settekivimist kasutatakse süsinikterase, roostevaba terase ja ferrovanaadiumi tootmisel. Lisaks on metalli üks oluline potentsiaalne rakendus redokspatareides. Peamised kasutatavad mikroorganismid bioleostumiseks on kemolitotroofsed bakterid. Probleem on selles, et need bakterid vajavad väga happelist keskkonda, mis põhjustab suure hulga happelise reovee moodustumist. Selle meetodi loodussõbralikumaks muutmiseks on võimalik kasutada heterotroofseid baktereid. Nad kasutavad orgaanilisi aineid süsinikuallikana orgaaniliste hapete sünteesiks. Bioleostumise soodustab bioprotsessi seondumine orgaaniliste metaboliitide poolt põhjustatud happesusega. Lisaks võib selline leostumine lõhkuda metalli ja hapniku vahelise sideme, vabastades seeläbi soovitud metalli maagist.

Käesoleva töö põhieesmärk on määrata seos vanaadiumi ja graptoliidiargilliidi orgaanilise aine vahel heterotroofse bioleostumise teel, kasutades inokulaadina kahte bakteritüve, nimelt *Lysinibacillus fusiformis* EEUT ARG10A ja *Paenibacillus glucanolyticus* EEUT ARG7B4Lp.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Eesti graptoliitargilliidi asukoht ja hinnanguline kogus

Eesti maad peidavad endas sellist maavara nagu graptoliitargilliit, mis ulatub Eesti põhjaosas Hiiumaalt Narvani üsna laial alal ning kulub Kambriumi-Ordoviitsiumi mustade kildade ulatuslikku formatsiooni Onega järvest idas kuni Jüüti poolsaareni läänes (Sipp Kulli jt., 2016; Kivisaar ja Menert, 2020). Eesti GA ligikaudne pindala mandriosas on umbes 12 210 km², millele lisandub erodeeritud territoorium Lääne-Eesti saarte vahel pindalaga umbes 3190,4 km². Samuti on selle settekivimi koguhulk Eesti maapõues hinnanguliselt 67 miljardit tonni, eeldades, et keskmine erikaal on 2,1 g/cm³ ning võimalik erodeeritud materjali kogus Mandri-Eesti ja Hiiumaa vahel on ligikaudu 18,9 miljardit tonni (Hade ja Soesoo, 2014; Hade, 2014).

1.2 Graptoliitargilliidi iseloomustus

Graptoliitargilliit tunti varem diktüoneemakilda või diktüoneemaargilliidina, nimetused pärinevad Paleosoikumi mereloomalt graptoliidist *Dictyonema flabelliforme* (praegune nimetus *Rhabdinopora flabelliformis*). Nüüd on see maailmas tuntud kui *black shale* ehk must kilt, vastavalt terminite definitsioonile (Vine ja Tourtelot, 1970) tähistab must mis tahes orgaanilist ainet, mis annab kivimile värvi, ja kilt viitab peeneteralisele settekivimile. Kõnealune kivim koosneb põhimõtteliselt maatriksist, mis seob omavahel autigeenseid ja detriitmineraale ning orgaanilist ainet (kerogeeni). Tüüpilised autigeensed mineraalid on püriit, samas kui detriitmineraalid kujutavad endast näiteks kvarts, päevakivi, vilgukivi ja savi. Rõhutatakse püriidi iseloomulikku kõrget kontsentratsiooni argilliidis, mida koos kerogeeniga peetakse erinevate metallide peamiseks kandjaks (Hade ja Soesoo, 2014).

1.3 Graptoliitargilliidi ajalooline uurimine ja kasutamine Eestis

Erinevad allikad väidavad, et graptoliitargilliidi teaduslik uurimine Eestis sai alguse 18. sajandi lõpus. 1791. aastal juhtis Peterburi Teaduste Akadeemia akadeemik Johann Gottlieb Georgi oma teadustöös esimesena tähelepanu selle kivimi omadusele ise süttida ning 1808. aastal uuris Peterburi TA akadeemik Vassili Severgin selle esimest maaalust põlemist Surupi tuletorni lähedal. Vene teadlased aga hakkasid alles 1839. aastal tõsisemalt uurima graptoliitargilliidikihti krahv Benkendorfi kuulunud mõisas Keila-Joal ja parun Wrangelile Toolse mõisas, mis oli 19. sajandi keskel ajendiks seda settekivimit väetisena proovida, kuid suurema eduta (Pihlak, 2011).

1936. aastal ilmunud D. Kurbatovi artiklist sai teatavaks, et graptoliitargilliit on uraanisisalduse tõttu radioaktiivne. Nimelt see omadus ajendas põhjalikumalt uurima selle settekivimi kaevandamisvõimalusi Eestis Teise maailmasõja ajal. 1944. aastal saadeti geoloogiaprofessor

Mihhail Althausen Kremlist välja eriülesandega uurida selle kihti Eestis võimaluseks kasutada seda aatomipommi toorainena. Professor ise väitis, et just fosforiidi ja musta kilda varud Eestis on ainulaadsed kogu meie planeedil ning sisaldavad suures koguses haruldasi metalle ja fosforit. Akadeemiku E. Lippmaa sõnul kaevandati esimesed kilogrammid uraani pommi valmistamiseks 1945. aastal just Narvas „Krassilnaja Fabrika“ katsetehases kuhjaleostamise tehnoloogia abil, mis võimaldas eraldada ligikaudu 70% kildas sisalduvast uraanist (Aare, 1999). Aasta hiljem ehitati Sillamäel kombinat nr 7 graptoliitargilliidist uraani eraldamiseks, kuid 1948. aastaks jäi tootmisplaan täitmata nii madala uraanisisalduse kui ka võimsa tehnoloogia puudumise tõttu selle kaevandamiseks. Aastatel 1948–1952 toodeti 250 tuhandest tonnist graptoliitargilliidist üle 60 tonni uraaniühendeid (Aaloe jt., 2006).

1.4 Graptoliitargilliidi kasutamise võimalused

Kahjuks on must kilt madala kütteväärtusega kütus, selline väärtus jääb vahemikku 4,2–6,7 MJ/kg ja õlisaagis on 3–5% (Sipp Kulli jt., 2016; Hade ja Soesoo, 2014). Peale selle raudsulfiidide, nimelt püriidi (FeS_2) kõrge kontsentratsioon kildas, mis varieerub vahemikus 1,5–9,0%, kuid valdavalt 2,4–6,0% (Hade ja Soesoo, 2014), kujutab endast otsest ohtu keskkonnale. Põletamisel laguneb see ühend vääveldioksiidiks, mis viib õhureostusele. Eelnimetatud orgaanikarikas (8-20%) kivim on aga rikastatud tehnoloogiliselt väärtuslike metallidega nagu uraan (U), molübdeen (Mo), tsink (Zn), vanaadium (V), nikkel (Ni) ja mitmed muud metallid. Kuigi erinevate metallide sisaldus mustades kildades on maailmas erinev, jääb V-Mo-U-Ni-Zn assotsiatsioon küllaltki universaalseks (Vind ja Tamm, 2021). Mudeli (Hade ja Soesoo, 2014) põhjal on Eesti graptoliitargilliidi võimalik metallisisaldus näiteks 5,67 miljonit tonni U, 16,53 miljonit tonni Zn ja 12,76 miljonit tonni Mo. Seega võib kindlasti öelda, et graptoliitargilliit on potentsiaalne mitme metalli tulevikutooraine nii Eesti kui ka Euroopa jaoks.

1.4.1 Vanaadium

Graptoliitargilliidis leidub vanaadium (V) kõige sagedamini seotud kas orgaanilise aine või mineraaliga. Mineraalides esineb käsitletav keemiline element valdavalt kolmevalentses oksüdatsiooniastmes (V^{3+}), orgaanilises aines aga neljavalentses oksüdatsiooniastmes (V^{4+}) (Peacor jt., 2000). Esimesel juhul esineb V vilgukivi tüüpi silikaatmineraalidena, nagu roskoeliit, illit-smektiit, tšernükhiiit, fengiit ja vanaadiumi muskoviit. Muudel juhtudel aga vanadüülporfüriini kujul. On teada, et (geo)porfüriinid on tsüklilised metallorgaanilised kompleksid, mis on redutseerivates tingimustes väga stabiilsed, kuid ei talu oksüdeerivaid tingimusi. Seega võib järeldada, et metalloporfüriinid ei muuda maake mitte ainult mineraalhapete või leeliste suhtes vastupidavaks, vaid võivad kahjustada ka bioleostumist, eriti

vanaadiumi puhul (Vind ja Tamm, 2021). Sellele vaatamata on aga selle haruldase siirdemetalli saamiseks graptoliitargilliidist meetodi väljatöötamine õigustatud, kuna vanaadiumi kasutatakse kaasaegsetes tööstusharudes laialdaselt. Näiteks üle 85% vanaadiumi toodangust pärineb süsinikterase, roostevaba terase ja ferrovanaadiumi tootmisest. Seda rakendatakse ka keemiatööstuses oksüdatsioonikatalüsaatorina ja krakkimisainena (Sipp Kulli jt., 2016; Zhang jt., 2022). Lisaks on vanaadiumi redokspatareid veel üks potentsiaalne vanaadiumi rakendus (He jt., 2022).

1.5 Graptoliitargilliidi kaevandamisega seotud probleemid

Kahtlemata peidab graptoliitargilliit väärismetallide varu, kuid selle kaevandamisega seotud keskkonnaohtude ees on võimatu silmi kinni pigistada. Maardus saadi aastatel 1964–1991 fosforiidi pealmaakaevandamise käigus ligikaudu 73 miljonit tonni graptoliitargilliiti (Sipp Kulli jt., 2016; Hade ja Soesoo, 2014), mis tõi kaasa settekivimis leiduva püriidi oksüdeerumise vee ja hapniku juurdepääsu tõttu. Oluline on märkida, et antud keemiliste reaktsioonide rada ei põhjusta mitte ainult erinevate mürgiste ja kahjulike gaasiliste ühendite teket, vaid ka erinevate raskmetallide leostumist vette (Graptoliitargilliidi..., 2020). Tänu Maardu graptoliitargilliidi isesüttimise uurimisega seotud teadustööle sai võimalik võita „fosforiidisõda“ ning lõpetada 1991. aastal täielikult fosforiidi kaevandamine käesolevas linnas (Aare, 1999). Veelgi enam, nagu on teada, iseloomustab musta kilda üsna kõrge uraanisisaldus (kuni 1200 ppm) (Hade ja Soesoo, 2014), antud metalli lagunemisel tekib õhust raskem värvitu ja lõhnatu radioaktiivne gaas – radoon (Hade ja Soesoo, 2017; Graptoliitargilliidi..., 2020).

1.2. Bioleostumine

Graptoliitargilliidil on settekivimi jaoks kahtlemata keerukas struktuur, mis muudab raskete ja haruldaste metallide kaevandamise sellest energia- ja ressursimahukaks. Nimelt seetõttu töötatakse välja tehnoloogiaid, mille eesmärk on eraldada mitte ühte, vaid mitut metalli korraga. Sel juhul on sobivaks tehnoloogiaks hüdro metallurgia, mille tähendus on maakide töötlemine keemiliste reaktiivide vesilahustega koos järgneva metallide eraldamisega ioonidena. Metallisaldava lahuse edasine töötlemine võimaldab selle välja viia lihtainena (Raua..., 2011). Seda tehnoloogiat on erinevat tüüpi, näiteks keskkonnasõbralik mikrobioloogiline meetod nagu bioleostumine ehk biokaevandamine, mis kasutab mikroorganismide potentsiaali sulfidsete mineraalide oksüdatsiooni katalüüsiks.

Käsitleva alternatiivse meetodi kaasaegne ajastu sai alguse 1960. aastatel, kui Kennecott Copper Corporation kasutas bakterit *Thiobacillus ferrooxidans* (praegune nimetus *Acidithiobacillus ferrooxidans*) vase ekstraheerimiseks madala kvaliteediga maakidest

Bingham Canyon'i kaevanduses Utah's ja hiljem Chino kaevanduses New Mehhikos (Johnson, 2014). Rauda oksüdeeriva bakterina on see võimeline looma keskkonda, mis tekitab metallide leostumisprotsessi kiirendamiseks Fe^{3+} ja väävelhapet. Väärrib märkimist, et ligikaudu 15% vasest (Brierley jt., 2013), 5% kullast ja väikeses koguses muid metalle, nagu nikkel ja tsink, toodetakse biohüdrometallurgilise töötlemise teel (Johnson, 2014).

Üldiselt on antud protsessi läbiviimiseks vajalik lahustumatud sulfiidmineraalid muundada lahustuvateks metallsulfaatideks. Selleks oksüdeeritakse sulfiidne mineraal lahustunud ferriraudioonide (Fe^{3+}) toimel, mis saab omakorda eksisteerida ainult happelises keskkonnas. Ferriraud redutseeritakse peagi ferroraudaks (Fe^{2+}) ja seejärel muudavad mikroorganismid ferroraua tagasi ferrirauaks. Teised konsortsiumi liikmed täidavad muid ülesandeid, nagu hapete tootmine ja surnud rakkudest järelejäänud orgaanilise aine tarbimine (Kutschke jt., 2015). Peale selle, uuringud (Brown ja Chang, 2014; Kutschke jt., 2015) on teinud olulise järelduse, et bakteriaalne ensüüm, nagu peroksidaas, võib oma ligniinitaolise struktuuri tõttu kaasa aidata ekstraheerimata orgaanilise aine (st kerogeeni) lagunemisele. See on eriti oluline vanaadiumi puhul, mis on teadaolevalt (geo)porfüriinide keskne ioon.

Biokaevandamisel on teiste hüdrometallurgiliste protsesside ees mitmeid eeliseid. Nimetatud keskkonnasäästlik tehnoloogia toimib atmosfäärirõhul ja suhteliselt madalatel temperatuuridel ($\sim 20\text{--}80\text{ }^\circ\text{C}$). Tavaliselt pole välist soojusallikat vaja, kuna sulfiidmineraalide oksüdatsioon on eksotermiline protsess. Lisaks sobib see polümetalliliste ja madala kvaliteediga maakide töötlemisel (Johnson, 2014). Kokkuvõtteks võib öelda, et bioleostumise tehnoloogia võib võimaldada graptoliitargilliidist saada Eesti maavaraks.

1.2.1 Kuhjaleostumine (Talvivaara kaevandus, Sotkamo vald)

Üks bioleostustehnoloogia edukaid rakendusi on Soome Talvivaara kaevandus Sotkamo vallas. Euroopa suurim niklimaardla kasutab kuhjaleostumise tehnoloogiat, mille käigus metalli sisaldavat maaki (ingl k *black schist*) töödeldakse väävelhappe lahusega, mis on omakorda nakatatud bakterikooslusega (näiteks *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* ja *Leptospirillum ferrooxidans*) (Riekkola-Vanhanen, 2010). Pärast 13–14 kuud (esmane leostumine) järgneb sekundaarne leostumine ülejäänud metallide, peamiselt Co ja Cu, taastamiseks. Eeldatav kogusaagis esmasest ja sekundaarsest leostumisest on 85% niklit (Ni), 80% tsinki (Zn) ning 50% vaske (Cu) ja koobaltit (Co). Järgmisena sadestatakse metallid gaasilise vesiniksulfiidi (H_2S) abil (Riekkola-Vanhanen, 2013). Protsessi olulisim parameeter on pH (optimaalselt 1,5–3), silikaadi sadenemise vältimiseks tuleb pH väärtus hoida üle 1,5 (Riekkola-Vanhanen, 2010).

1.2.2 Eesti BiotaMet protsess

Enamik bioleostumiskatseid üle maailma toimub aeroobses keskkonnas, samas kui protsessi käigus kogunevad metaboliidid (aromaatsed ja alifaatsed süsivesinikud, orgaanilised happed) võivad takistada orgaanilise aine edasist lagunemist ja seeläbi metallide leostumist. Eestis patenteeriti kaheetapiline BiotaMet protsess, mis sisaldab nii anaeroobset kui ka aeroobset faasi. Täpsemalt, anaeroobses staadiumis (domineerib *Bacilli* klass) toimub metanogeneesi protsess, mille käigus moodustub gaas (CH₄) ja lagunevad metallorgaanilised kompleksid. Aeroobses staadiumis (domineerib *Clostridia* klass) leostuvad aga metallide sulfiidvormid. Tuleb mainida, et antud protsessi iseloomustab leeliseline keskkond (pH 6,8–7,5), mis säilib mikroelementide ja vitamiinide olemasolu tõttu (Kulli jt., 2016; Kivisaar ja Menert, 2020). Patendis (Menert jt., 2017) vabanes temperatuuril 37 °C gaasifaasi kuni 7,92 liitrit metaani kg argilliidi kohta ning anaeroobsetes tingimustes bioleostus 26,2% koobaltist (Co) ja 9,14% niklist (Ni). Hiljem saavutati RITA projektis (Kivisaar ja Menert, 2020) järgmised tulemused: 1) aeroobses tingimuses saavutati metallide ekstraheerimise efektiivsus > 100% Ni, 97% Co, 95% Cd ja 64% U; 2) anaeroobses tingimuses on Mo ekstraheerimise efektiivsus ~80%.

1.2.3 Heterotroofne konsortsium inokulaadina

Peamised kasutatavad mikroorganismid bioleostumiseks on kemolitotroofsed bakterid nagu *Acidithiobacillus*'e liigid. Probleem on selles, et need bakterid vajavad väga happelist keskkonda, mis põhjustab suure hulga happelise reovee moodustumist. Selle meetodi loodussõbralikumaks muutmiseks on võimalik kasutada heterotroofseid baktereid. Nad kasutavad orgaanilisi aineid süsinikuallikana orgaaniliste hapete sünteesiks. Bioleostumise soodustab bioprotsessi seondumine orgaaniliste metaboliitide poolt põhjustatud happesusega (Zhang jt., 2022). Käesolevas töös kasutati inokulaadina selliseid heterotroofseid baktereid nagu *Lysinibacillus fusiformis* EEUT ARG10A ja *Paenibacillus glucanolyticus* EEUT ARG7B4lp.

1.2.3.1 *Paenibacillus glucanolyticus*

1989. aastal eraldasid Alexander ja Priest esmakordselt mullaproovist *Bacillus glucanolyticus*'e (Alexander ja Priest, 1989). Antud grampositiivne pulgakujuline fakultatiivne anaeroobne bakter moodustab endospore ja liikuvaid kolooniaid ning seda iseloomustab ka võime lagundada erinevaid β -glükaane, näiteks karboksümetüülselluloosi (β , 1–4 seotud glükoos), kurdlaani (β , 1–3 seotud glükoos), pustulaan (β , 1–6 seotud glükoos). *Bacillus glucanolyticus* kasvab pH 5–7 juures, temperatuuril 17–37 °C, kuid mitte 5–50 °C ja 5% NaCl kontsentratsioonil, kuid mitte 10% NaCl. Tunnused, mis eristavad *B. guicanoliticus* sugulasliikidest, on nitraadi redutseerimine nitritiks, happe tootmine D-ksüloosist, Voges–

Proskauer'i puljongi pH on alla 5,5; negatiivne ureaasi reaktsioon ja samuti negatiivne indooli tootmine. G+C sisaldus DNA-s on vahemikus 48,3 kuni 48,6 mol%.

1997. aastal nimetati *Bacillus glucanolyticus* ümber *Paenibacillus glucanolyticus*'eks. Nimetatud muudatus tehti (Shida jt., 1997) uuringu põhjal, mis analüüsis 6 *Bacillus* liiki (*Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdolanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis* ja *Bacillus thiuminolyticus*). Fülogeneetiline analüüs rühmitas (clustered) need liigid tihedalt *Paenibacillus* spp.

Keskkonnareostust erinevate orgaaniliste ühendite ja raskmetallidega, mida põhjustavad nafta-, tekstiili-, mössi- ja paberitööstused, saab vältida *Paenibacillus*'e liikide kasutamisega. On näidatud, et *P. jamilae*, *P. macerans*, *P. polymyxa* ja *P. validus* tüved soodustavad raskmetallide ionide või happevärvide bioflokulatsiooni (Grady jt., 2016) ning *P. elgii* B69 toodab eksopolüsahhariidset (EPS) bioflokulandi, mis suudab laias pH vahemikus eemaldada raskmetallide ioone, värvained ja kaoliinsavi (Li jt., 2013). Lisaks sellele, artiklis (Mathews jt., 2014) näidati *Paenibacillus glucanolyticus*'e võimalikku kasutamist, kus antud bakter eraldati mustast leotisest. *P. glucanolyticus* suudab seda substraati kasutada süsiniku ja fikseeritud lämmastiku allikana ning metaboliseerida seda etanooli, merevaik-, propaan-, piim- ja maloonhappe tootmiseks. Eeltoodu põhjal on võimalik järeldada, et bakter *P. glucanolyticus* osaleb musta leotise biolagundamises kasulikeks toodeteks nagu kemikaalid või kütus.

1.2.3.2 *Lysinibacillus fusiformis*

1988. aasta artiklis kirjeldas Fergus G. Priest esimest korda *Bacillus fusiformis* kui grampositiivset, pulgakujulist, obligatoorset aeroobset ja endospore moodustavat bakterit (Priest jt., 1988). *Bacillus fusiformis* kasvab pH 6,0–9,5 juures, temperatuuril 17–37°C ja NaCl kontsentratsioonil 2–7%. Tunnused, mis eristavad *B. fusiformis* sugulasliikidest, on positiivne ureaasi test, kasv NaCl kontsentratsioonil 7% ja tundlikkus tetratsükliini suhtes (1 µg ml⁻¹). Antud bakter on oksüdaasi suhtes positiivne, lagundab želatiini ja testosterooni, kuid annab negatiivse Voges-Proskaueri reaktsiooni, ei lagunda tärklisi ega muuda nitraate nitrititeks. Need on oksüdaasi suhtes positiivsed, lagundavad želatiini ja testosterooni, kuid annavad negatiivse Voges-Proskaueri reaktsiooni ega lagunda tärklisi ega redutseeri nitraati nitritiks. G+C sisaldus DNA-s on vahemikus 35 kuni 36 mol%.

Uuring (Ahmed jt., 2007) lubas selliseid baktereid nagu *Bacillus fusiformis* ja *Bacillus sphaericus* ümber klassifitseerida teise perekonda nimega *Lysinibacillus*. Selline muudatus tehti erinevuste põhjal genoomsel tasemel ja nende rakuseinte peptidoglükaani koostises, mis sisaldab lüsiini. Lisaks (Priest jt., 1988) kirjeldusele kinnitati kolooniate liikuvus M söötme

(bioMe'rieux) ja mikroskoopia abil. Perekonda *Lysinibacillus* iseloomustab positiivne oksüdaasi ja katalaasi test, kuid samal ajal negatiivne test indooli ja H₂S tootmise, nitraatide redutseerimise ja beeta-galaktosidaasi (ONPG) suhtes.

Tööstusliku tootmise kasv aitab kaasa keskkonda saastavate jäätmete hulga suurenemisele. Näiteks erinevate metallurgiatööstuses kasutatavate metallide kaevandamine soodustab raskemetallide nagu Ni, Cu ja Zn leostumist. Kulusäästlik meetod, bioremediatsioon, mida katalüüsivad mõned perekonna *Lysinibacillus* liigid, omab potentsiaali ohtlike jäätmete töötlemiseks (Jamal ja Ahmad, 2022). Katse (Ghosh jt., 2021) näitas *Lysinibacillus*'e liikide abil kaevandusjäätmetest pärineva Mn bioleostumise edukust. 21 päeva pärast optimeeritud tingimustes (mõssi tihedus 2%, pH 6,5 ja temperatuur 30 °C) oli Mn biolahustumise efektiivsus 84%. Peale selle leiti, et *Lysinibacillus fusiformis* ZC1-1 on kõrge kromaaditaluvus ja Cr (VI) redutseerimispotentsiaal (He jt., 2011). Kromaadil on mutageensed ja kantserogeensed omadused, olles seega ohtlik keskkonnasaasteaine. Võimalus kasutada mikrokapslite kujul reaktiive, mis kaitsevad neid ebasoodsa keskkonna eest Cr(VI)-ga saastunud muldade bioremediatsiooniks, näidati (Huang jt., 2016) katses. Mikrokapslite reagentina kasutati bakterit *Lysinibacillus fusiformis* ZC1, mis 5 päeva jooksul pärast inokuleerimist redutseeris mullast 67% Cr(VI).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö põhieesmärk on uurida seost vanaadiumi ja graptoliidiargilliidi orgaanilise aine vahel heterotroofse bioleostamise abil, kasutades inokulumidena kahte erinevat bakteritüve.

Selleks oli esiteks vaja välja valida ja kultiveerida CELMSi kollektsioonist¹ kaks heterotroofset bakteritüve edasiseks kasutamiseks inokulumidena. Teiseks tuli läbi viia aeroobse bioleostamise katsed nende tüvede puhaskultuuridega. Kolmandaks tuli analüüsida mikroorganismide elutegevuse tulemusena leostunud metallide saagist ja lõpuks võrrelda vanaadiumi bioleostumise edukust sõltuvalt bakteri liigist.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1 Substraat ja söötmed

Kultiveerimiskatsetes kasutati graptoliitargilliiti tähisega ALARA GA (südamik a 22, sügavus 28,99 m), mis saadi Tartu Ülikooli Geoloogia osakonnast. Kivimiproovid jahvatasid Tartu Tamme Gümnaasiumi õpilased Karl-Erik Krillo ja Syed Jawan Hassan TÜ geoloogia kaasprofessori Argo Jõehehe juhendamisel Tartu Ülikooli Keemia instituudis 2023. aasta märtsis. Väikestesse sulguriga kottidesse kaaluti 1,5 g argilliidipuru ja hoiti enne katsete alustamist kinnises karbis. Kõikide katsete jaoks kasutati steriilset argilliiti, mille gammasteriilimist (50 kGy) teostas Ionisos Baltics OÜ 2023. aasta aprillis.

Bakterite kultiveerimiseks valiti kaks komplekssöödet (Tabel 1): LB ja R2A, mis sobivad heterotroofsete mikroorganismide kasvatamiseks. Aeroobsete bioleostumiskatsete läbiviimisel kasutati ainult R2A söödet ning teiste mikroorganismide kasvu vältimiseks lisati tühikatses toitekeskkonnale täiendavalt antibiootikumi – kanamütsiini. Söötmete erinevus seisneb selles, et LB on rikastussööde ehk see sisaldab kõiki vajalikke komponente isoleeritud bakterite kiireks kasvuks, R2A on aga lähedane minimaalsöötmele, sest koosneb minimaalsest kogusest mikroobide kasvuks vajalikest osistest. Minimaalsööde sisaldab tavapäraselt vaid neid komponente (anorgaanilised soolad, üks süsinikuallikas, teatud vitamiin), mis on hädavajalikud metsiktüüpi organismide kasvuks ja paljunemiseks. (Geneetika sõnastik, 2014). Tardsöötme valmistamiseks tuleb mõlemale söötmele lisada 15 g agarit 1000 ml destilleeritud H₂O (või Milli-Q H₂O) kohta. Kumbagi toitekeskkonda on tarvis autoklaavida 121 °C juures 15 minutit.

¹ Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi mikroobide kogu CELMS
<https://tymri.ut.ee/et/sisu/mikroobide-kogu>

Tabel 1. R2A puljongi ja LB koostis (Reasoner ja Geldreich, 1985; MacWilliams ja Liao, 2006).

Tüüpiline R2A puljongi koostis	g/l	Tüüpiline LB koostis	g/l
Pärmiekstrakt	0,5	Pärmiekstrakt	5
Peptoon	0,5	Trüptoon	10
CAS-aminohapped	0,5	NaCl	10
Glükoos	0,5		
Lahustuv tärklis	0,5		
K ₂ HPO ₄	0,3		
MgSO ₄	0,05		
Na-püruvaat	0,3		

2.2.2 Inokulum

Esiialgu otsustati inokulumina kasutada kahte CELSMi kollektsioonist pärit bakteritüve: *Paenibacillus glucanolyticus* [EEUT ARG7B4Lp](#) ja *Bacillus jeotgali* [EEUT ARG7A2](#), mis on eraldatud graptoliitargilliidi kooslusest ARGCON5 2016.a. (Korb, 2016) ja mida säilitatakse -80 °C juures (CELMSi elektrooniline kataloog, 2023). Lisaks kasutati kahte töötassi, millele olid nimetatud isolaatid eelnevalt külvatatud. Need bakterid inokuleeriti R2A või LB agarsöötmele külviaasaga, millele järgnes inkubeerimine 30 °C termostaadis. Nädala jooksul täheldati nende mikroorganismide kasvu ja tehti järgmised järeldused (Tabel 2), et

1. mõlemad bakterid kasvavad suhteliselt aeglaselt (*P. glucanolyticus* ~48 tundi, *B. jeotgali* >48 tundi);
2. mikroobide kasv on kiirem LB-agaril, kuid samas tekivad teistsuguseid kolooniad kui R2A-agaril.

Sellest lähtuvalt otsustati *B. jeotgali* asendada sarnaste parameetritega bakteriga – *Lysinibacillus fusiformis* [EEUT ARG10A](#) (CELMSi elektrooniline kataloog, 2023). Inokuleerimine toimus samalaadsel viisil, inkubeerimine aga 37 °C termostaadis ning käesoleva bakteritüve kasv oli juba märgatav 24 tunni pärast (Tabel 2). Kõiki saadud töötasse hoiti külmkapis temperatuuril 4 °C.

Üleskasvanud kolooniad suspendeeriti katseklaasis 5 ml LB vedelsöödega edasiseks kasutamiseks katsetes (katsed 253, 256, 257, 258).

2.2.2.1 Inokulumide iseloomustus

Allpool kirjeldatud andmed on võetud bakalaureusetööst (Antson, 2020), mille eesmärk oli iseloomustada eelnevalt magistritöös graptoliitargilliidist eraldatud isolaate (Korb, 2016).

Paenibacillus glucanolyticus [EEUT ARG7B4Lp](#) on grampositiivne, spore mitte moodustav pulkbakter. Kasvab temperatuuril 10-42 °C, pH 7-11 ja NaCl kontsentratsioonil 0-5%. Katalaasi

test on positiivne ning oksüdaasi, ureaasi ja tsitraadi testid on aga negatiivsed. Antud bakteritüvi on võimeline lagundama tärklis ja eskuliini, kuid mitte hemoglobiini.

Bacillus jeotgali [EEUT ARG7A2](#) on grampositiivne, spore mitte moodustav pulkbakter. Kasvab temperatuuril 20, 30-37 °C, pH 9 ja NaCl kontsentratsioonil 0-7%. Katalaasi test on positiivne ning oksüdaasi, ureaasi ja tsitraadi testid on aga negatiivsed. Antud bakteritüvi on võimeline lagundama eskuliini ja hemoglobiini.

Lysinibacillus fusiformis [EEUT ARG10A](#) on grampositiivne, spore moodustav pulkbakter. Kasvab temperatuuril 15-42 °C, pH 7-11 ja NaCl kontsentratsioonil 0-5%. Katalaasi ja tsitraadi testid on positiivsed ning oksüdaasi ja ureaasi testid on aga negatiivsed. Antud bakteritüvi on võimeline lagundama ainult hemoglobiini.

2.2.3. Katseplaan

Kõik edaspidi kirjeldatud mikrobioloogilised tööd teostati laminaarboksis ja leegis kuumutatud töövahenditega, et vältida saastumist väliskeskkonna mikroorganismidega.

2.2.3.1 Eelkatsed

Tuginedes saastumise ilmnemisele katse 252 kontrollseerias (Krillo ja Hassan, 2024), kus inokulaadina kasutati ka ARGCON5 koosluse baktereid, otsustati esialgselt testida pindkülvimeetodiga sellest katsest kuuel erineval kuupäeval võetud proove ampitsilliini või kanamütsiini sisaldaval söötmel.

Mõlemad antibiootikumid on laiatoimelised, kusjuures ampitsilliin inhibeerib rakuseina sünteesi, seondudes penitsilliini siduvate valkudega (PBPs), kanamütsiin liitub aga bakteri 30S ribosomaalse alaühikuga, põhjustades tRNA valesti lugemist, mille tulemusena ei saa bakter eluliselt olulisi valke sünteesida (DrugBank, 2024).

24-tunnine inkubeerimine 37 °C termostaadis näitas, et graptoliitargilliidis sisalduvad mikroorganismid on ampitsilliini suhtes resistentsed. Saadud tulemuse põhjal viidi läbi sarnane kontrollseeria katse (252 kordus), ainult juba kanamütsiini lisamisega (Tabel 3). Proovid olid kogutud 11 päeva jooksul ja külvatud steriilse Drigalski spaatliga R2A-agar söötmele.

2.2.3.2 Vahekatse

Saastumine katses 253 (täpsemalt B- ja C-seerias) ajendas lisaeksperimenti tegema, et välja selgitada, kas gammasteriliseeritud graptoliitargilliit on ikka steriilne. Kontrollina lisati igasse toitekeskkonnaga (R2A) koos autoklaavitud kolbi erinevaid graptoliitargilliite, nimelt ALARA GA, PED-11, PAL-27, PAL-28 ja ACT-7 (Tabel 3). 24 tunni ja kahe nädala pärast võeti

vahekatse kolbidest proovid, inokuleeriti pindkülvivi meetodiga R2A-agar söötmele ja termostateeriti 37 °C juures.

2.2.3.3 Põhikatsed

Teostatud aeroobse bioeostumise katse ja sellele järgneva analüüsi summeerib Joonis 1. Kõik katsepudelid autoklaaviti (0,5 atm; 15 min; 112 °C) koos R2A-söötmega. Peale selle lisati kontrollseeria pudelitesse (katsed 253, 256, 257, 258) kanamütsiin ja steriilne graptoliitargilliit. A-, B- ja C-seeria pudelitesse (katsed 253, 256, 257, 258) lisati igasse ühesugune kogus substraati ja inokulaati (*P. glucanolyticus* või *L. fusiformis*) (Tabel 3). Igast pudelist võeti 1 ml proovi epsidesse (1,5 ml), mida hoiti külmkapis 4 °C juures ning 5 ml proovi falkonitesse (10 ml), mida säilitati sügavkülmas -20 °C juures. Proove koguti 12–14 (50) päeva jooksul, esimesel nädalal peaaegu iga päev, seejärel üks või kaks korda nädalas.

2.2.3.2.1 Mikroorganismide arvukused

Põhikatse erinevates ajapunktides võetud kontrollseeria proovid mahuga 1 ml inokuleeriti R2A-agar söötmele pindkülvivi meetodiga, samal ajal kui samad A-, B- ja C-seeria proovid lahjendati detsimaalsete lahjenduste meetodil füsioloogiliste lahusega (0,9% NaCl) ja inokuleeriti R2A-agar söötmele tilkükilviga (Heinaru ja Vedler, 2011). Bakterite arvu määramiseks loendati kolooniad visuaalse vaatluse teel ning, võttes arvesse keskmist kolooniate arvu, külvimäära ja lahjendufaktorit, leiti elusrakkude arvukus väljakasvanud kolooniate järgi (CFU/ml ehk kolooniaid moodustavate ühikutena/ml).

2.2.3.2.2 pH analüüs

Nii kontrollseerias kui ka A-, B- ja C-seerias erinevatel ajahetkedel võetud proovide kasvukeskkonna pH määrati Whatman® Panpeha™ pH indikaatorribade abil.

2.2.3.2.3 Metallide analüüs

Käesolevas töös määrati uuritud proovide põhi- ja jälgelementide sisaldus induktiiv-sidestatud plasma massispektromeetria (ICP-MS) meetodi abil. Argooni plasma lõhub keemilised sidemed ja ioniseerib proovis olevad vabad aatomid, mida seejärel mõõdetakse massispektromeetriga. Üksikud ioonid impulsside kujul tuvastatakse nende massi ja laengu suhte (m/z) alusel ning seejärel võrreldakse nende omadusi teadaolevate elementide omadustega (Wilschefski ja Baxter, 2019). Selle meetodi üks peamisi eeliseid on, et see tagab peaaegu kõigi mõõtmisvõimalusega elementide jaoks äärmiselt madalad avastamispäärid, täpsemini suudab tuvastada palju elemente tasemetel alla 0,1 ppt (Dai jt., 2023).

Esmalt tuleb vabaneda proovides olevatest substraadi ja söötme komponentide osakestest, et vältida metallide immobiliseerumist ja tagada katsevedeliku keemiline stabiilsus (ICP-MS ...,

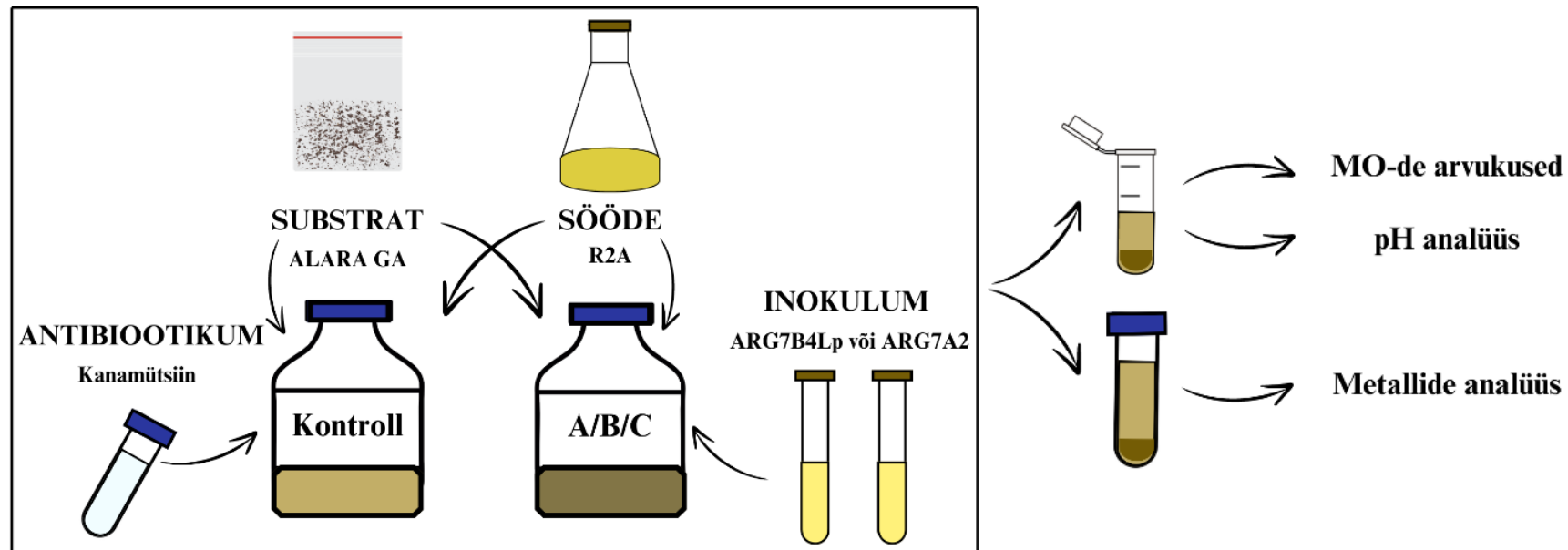
2021). Selleks eraldatakse suspensiooni tahke faas katsevedelike tsentrifuugimisega 2 minuti jooksul kiirusel 13 000 rpm. Saadud supernatant pipeteeritakse uude eelnevalt happega pestud tuubi ja lisatakse sellele juurde lämmastikhapet. Tühiproovid koosnevad milliQ veest ja lämmastikhapest ning R2A söötmest ja lämmastikhapest. Kõiki proove hoiti temperatuuril 20 °C (vt lisad).

Tabel 2. Isolaatide kasv R2A või LB söötmel erinevatel külvamise kuupäevadel, kus töötassideks võetud inokulaadid on märgistatud rohelisega

Isolaadi nr	Määratud tüvi	CELMS nr	Külvamise kuupäev	Sööde	Allikas	28.11.2023	29.11.2023	30.11.2023	01.12.2023	06.12.2023	07.12.2023
7B4Lp	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	EEUT ARG7B4Lp	27.11.2023	R2A	stock B1	-	++	+++			
			28.11.2023	R2A	stock B1		-	+++			
			28.11.2023	R2A	tass 06.09.2023		+	++	+++		
			28.11.2023	LB	stock B1		-	+	+	++	
7A2	<i>Bacillus jeotgali</i>	EEUT ARG7A2	27.11.2023	R2A	stock A1	-	-	+	+	++	
			28.11.2023	R2A	stock A1		-	+	+	++	
			28.11.2023	R2A	tass 06.09.2023		-	-	-	++	
			28.11.2023	LB	stock A1		-	++	++	++	
10A	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	EEUT ARG10A	29.11.2023	LB	stock ?			+	+	++	
			06.12.2023	R2A	tass 06.09.2023						++
			06.12.2023	R2A	tass 29.11.2023						++

Tabel 3. Eelkatse-, vahekatse- ja põhikatsesegu koostis

Segu koostis R2A=3 g/L katse kohta							
Inokulumi vaja 1%*300 ml=3 mL, 3%*300 ml=9 mL							
Katse nr	Katsesegu koostis	MilliQ ühele pudelile, ml	R2A ühele pudelile, g	Argiit ühele pudelile, g	Km ühele pudelile, ml	Inokulum ühele pudelile, mL	Inokulum kokku, mL
252 kordus	R2A + steriilne ALARA graptoliitargilliit (1%) + kanamütsiini (50 µg/ml)	300	0,9	3	0,3		
253 kontroll	R2A + steriilne ALARA graptoliitargilliit (1%) + kanamütsiini (50 µg/ml)	300	0,9	3	0,3		
253 A, B, C	R2A + steriilne ALARA GA (1%) + ARG10A (1%)	300	0,9	3		3,3	10
ALARA GA	R2A + steriilne ALARA GA (1%)	50	0,15	1,5			
PED-11	R2A + steriilne PED-11 (1%)	50	0,15	1,5			
PAL-27	R2A + steriilne PAL-27 (1%)	50	0,15	1,5			
PAL-28	R2A + steriilne PAL-28 (1%)	50	0,15	1,5			
ACT-7	R2A + steriilne ACT-7 (1%)	50	0,15	1,5			
256 kontroll	R2A + steriilne ALARA graptoliitargilliit (1%) + kanamütsiini (50 µg/ml)	300	0,9	3	0,3		
256 A, B, C	R2A + steriilne ALARA GA (1%) + ARG10A (3%)	300	0,9	3		11	45
257 kontroll	R2A + steriilne ALARA graptoliitargilliit (1%) + kanamütsiini (50 µg/ml)	300	0,9	3	0,3		
257 A, B, C	R2A + steriilne ALARA GA (1%) + ARG7B4Lp (1%)	300	0,9	3		5	20
258 kontroll	R2A + steriilne ALARA graptoliitargilliit (1%) + kanamütsiini (50 µg/ml)	300	0,9	3	0,3		
258 A, B, C	R2A + steriilne ALARA GA (1%) + ARG7B4Lp (1%)	300	0,9	3		5	20



Joonis 1. Aeroobne bioestumise katse ja sellele järgnev analüüs

2.3 Tulemused ja arutelu

Tabeli 2 põhjal on võimalik järeldada, et piisava mikroobse massi kogunemine võttis *Paenibacillus glucanolyticuse* puhul aega umbes kaks ööpäeva, *Bacillus jeotgali* puhul aga rohkem kui kaks ööpäeva, kui külvamismaterjal võeti „stockist“ ja kasvatati R2A-agar söötmel. Korduv inokuleerimine suurema materjalikogusega külviaasal andis veidi parema tulemuse, vahe oli üks ööpäev. Selgus, et „stockist“ võetud materjal on mõistlikum külvata LB toitekeskkonnale, kuid samal ajal tekivad R2A toitekeskkonnast erinevad kolooniad. *B. jeotgali* ebasoodsad resultaadid ajendasid asendama seda sarnase bakteriga *Lysinibacillus fusiformis*. Nimetatud bakteritüvi andis esimesel katsel häid tulemusi, mõlemal söötmel täheldati kasvu 24 tunni pärast. Kõigi ülalkirjeldatud bakteritüvede jaoks olid optimaalsed kasvutingimused täidetud, kuna CELSMi kataloogi põhjal sobivad kultiveerimiseks nii LB kui ka R2A söötmed. Lisaks täheldati bakalaureusetöös (Antson, 2020) käesolevate bakterite kasvu 30 ja 37 °C juures. Viga on tõenäoliselt tingitud ebapiisavast materjalikogusest külviaasal ja/või valest külvamistehnikast. Ebapiisavalt jahutatud külviaas vähendab võetud aines sisalduvate bakterite arvu.

Eelkatse võimaldab jälgida graptoliitargilliidist eraldatud ARGCON5 koosluse vastastikust toimet kahe antibiootikumiga. Pärast inkubeerimist ampitsilliini sisaldavas toitainekeskkonnas moodustusid kolooniad kõigil kuuel inokuleeritud tassil, samal ajal kui kõik kanamütsiiniga tassid jäid puhtaks (Lisa 2). Antud tähelepanek viis järeldusele, et mikroorganismid on ampitsilliini suhtes resistentsed ning järgnev kontrollseeria, korduskatse 252 viidi läbi, lisades juba kanamütsiini (Tabel 3). Selle katse edukust näitab Tabel 4, kus bakterikolooniate arv väheneb järk-järgult 5 päeva jooksul ja seejärel kaovad kolooniad üldse. Lisaks demonstreerib pH analüüs graptoliitargilliidist eraldatud bakterite kasvule ebasoodsat keskkonna oksüdatsiooni. Tänu otsusele teostada katse kahe laia toimespektriga antibiootikumiga, sai võimalikuks välistada kontrollseeria saastumine, kus mikroorganismide elutegevus ei olnud lubatud. Mainitud fakti kinnitavad edasised põhikatsed 253, 256 ja 258, aga ka sarnased katsed 252 ja 254 (Krillo ja Hassan, 2024), kus saastumise fakt mängis olulist rolli järgnevate eksperimentide läbiviimise võimaluses.

Tabel 4. Katses 252 analüüsitud mikroorganismide arvukused ja pH väärtused erinevatel proovivõtukuupäevadel

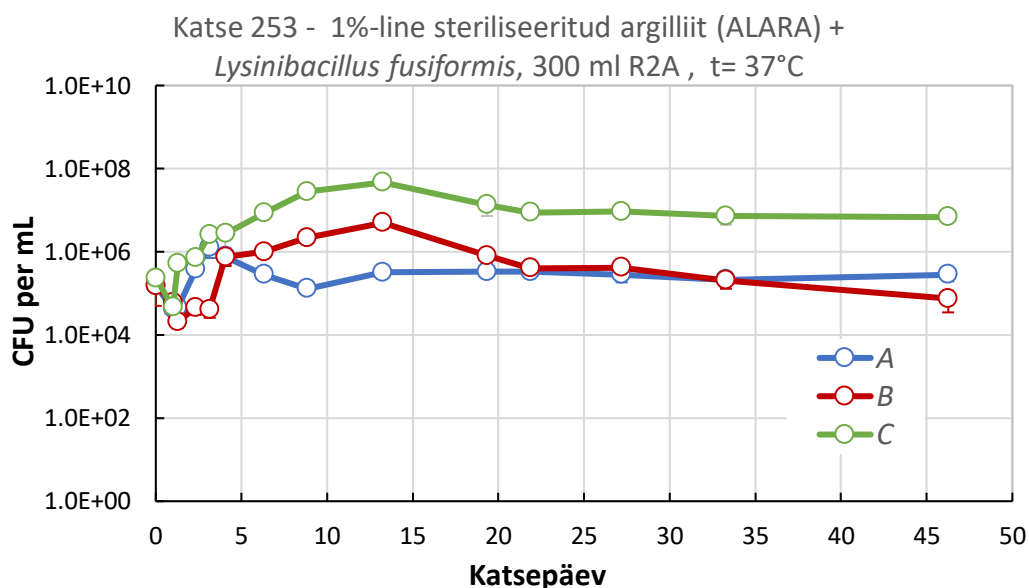
Jrk nr	Proovivõtu	Katse päev	Analüüs		Märkused (külvi kuupäev)
			pH	CFU	
			252 kordus	252 kordus	
1	30.11.2023 16:00:00	0	6,0	1,E+03	06.12.2024
2	01.12.2023 22:30:00	1,27	6,0	1,E+02	06.12.2024
3	03.12.2023 22:30:00	3,27	5,5	1,E+02	06.12.2024
4	04.12.2023 22:30:00	4,27	5,5	1,E+01	06.12.2024
5	05.12.2023 21:00:00	5,21	5,5	1,E+00	06.12.2024
6	06.12.2023 20:30:00	6,19	5,5	0,00	07.12.2024
7	07.12.2023 12:40:00	6,86	5,5	0,00	07.12.2024
8	08.12.2023 20:30:00	8,19	5,5	0,00	07.12.2024
9	11.12.2023 21:00:00	11,21	5,5	0,00	27.12.2023
10	14.12.2023 15:30:00	13,98	5,5	0,00	27.12.2023
11	19.12.2023 22:45:00	19,28	5,5	0,00	27.12.2023
12	22.12.2023 11:15:00	21,80	5,5	0,00	27.12.2023
13	26.12.2023 21:00:00	26,21	5,5	0,00	27.12.2023
14	01.01.2024 23:30:00	32,31	5,5	0,00	10.01.2024
15	05.01.2024 12:00:00	35,83	5,5	0,00	10.01.2024
16	10.01.2024 15:45:00	40,99	5,5	0,00	29.01.2024

Katses 253, milles kasutati 1% inokulaati (*L. fusiformis*), säilisisid saastuseta kontrollkatse- ja A-seeria katse. Ülejäänud seeria algproovid olid samuti saastumisevabad, kuid peagi märgati pärast söötmele külvamist esmalt C-seerias ning seejärel B-seerias (Lisa 3) erisuguseid kolooniaid ja ebaproportsionaalset arvukuse suurenemist. Antud asjaolu andis tõuke erinevate graptoliitargilliitidega katsete läbiviimiseks, et määrata kasutatud kivimisubstraatide steriilsus (Tabel 3). Pärast kivimiproovide ja toitekeskkonna R2A kokkusegamist ei esinenud katsekeskkonnas ühtegi mikroorganismide kolooniat, mis viitab gammastertilseeritud argilliitide puhtusele (Lisa 4). Seega, välistades substraadi saastumise võimaluse, võib eeldada, et erinevate kolooniate ilmumise põhjuseks olid ebapiisavalt steriilsed tingimused proovivõtu ajal, kuna saastus ilmnes katse toimetel ja püsis lõpuni. Ülal esitatud asjaoludest lähtuvalt, viidi läbi korduskatse 256, kuid kasutades 3% inokulaati ja säilitades võimalikult steriilseid tingimusi kontroll- ja A-, B-, C-seeria katsete läbiviimisel. Saadud *L. fusiformis*'e kasvu kujutavate graafikute (Joonis 2; Joonis 3) põhjal saab teha järgmised järeldused.

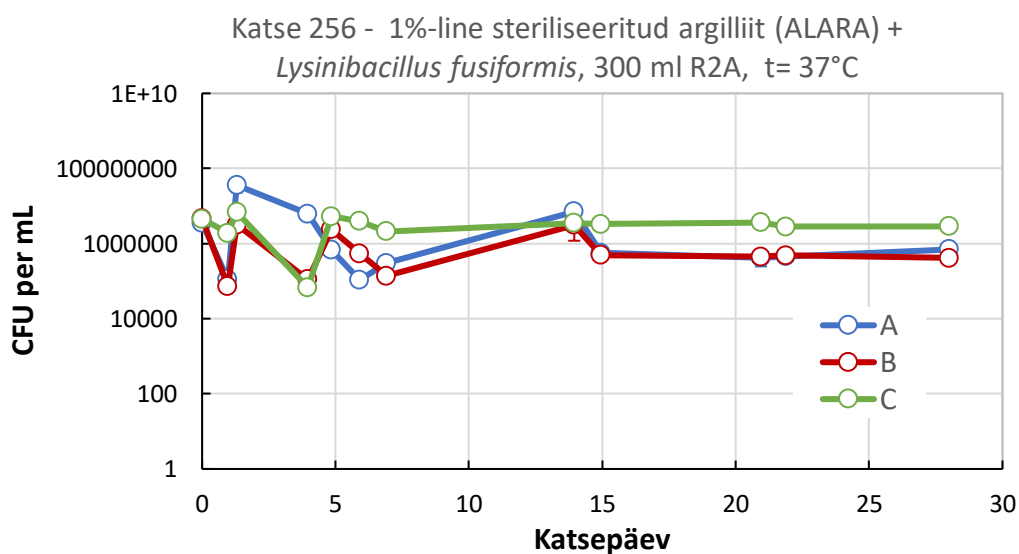
1. Mikroorganismide arvukus püsib kogu katse vältel suhteliselt madalal ja hakkab veelgi vähenema umbes kahe nädala pärast.

2. Inokulaadi kontsentratsiooni suurendamine mõjutab moodustunud kolooniate arvu tähtsusetult. Sobiv inokulaadi sisaldus on 1% katse vedelfaasi ruumalast; sel juhul saab jälgida lag-faasi, eksponentsiaalse faasi ja statsionaarse faasi kulgu.

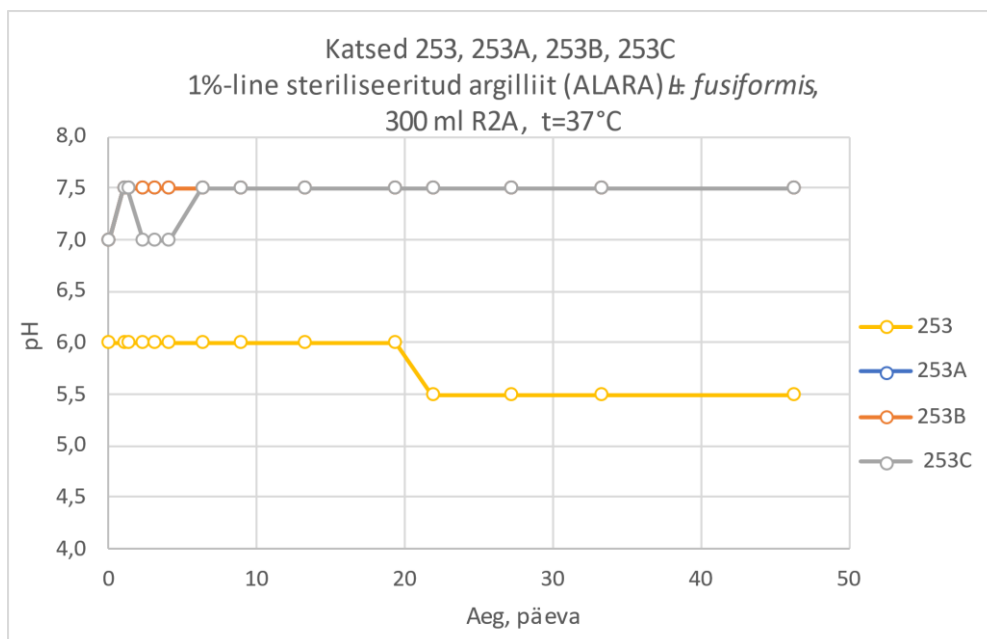
3. Külvamine tuleb teha proovivõtuga samal päeval või vähemalt samal nädalal, kuna mikroobide arv proovis aegamööda väheneb. Kahe katse pH analüüs näitas sarnaseid tulemusi kontrollseerias pH 5,5–6,0 ning A-, B- ja C-seerias pH 7,0–7,5 (Joonis 4; Joonis 5). Saaste katses 253 mõjutas C-seeria pH väärtust 0,5 ühiku võrra, kuid normaliseerus peagi.



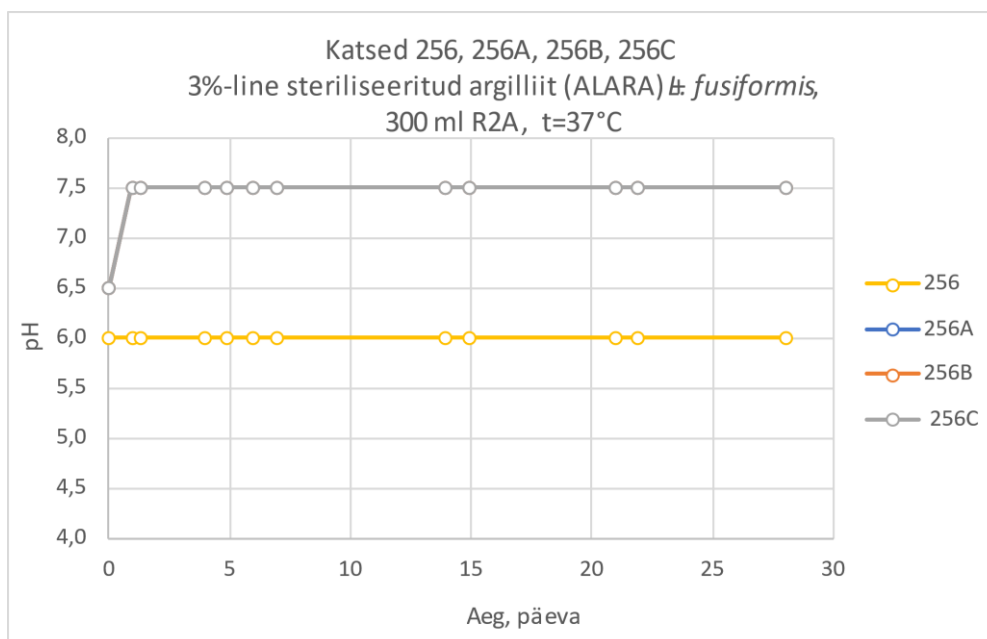
Joonis 2. Analüüsitud mikroorganismide arvukuse muutust katses 253 (A-, B- ja C-seerias) iseloomustav graafik.



Joonis 3. Analüüsitud mikroorganismide arvukuse muutust katses 256 (A-, B- ja C-seerias) iseloomustav graafik.



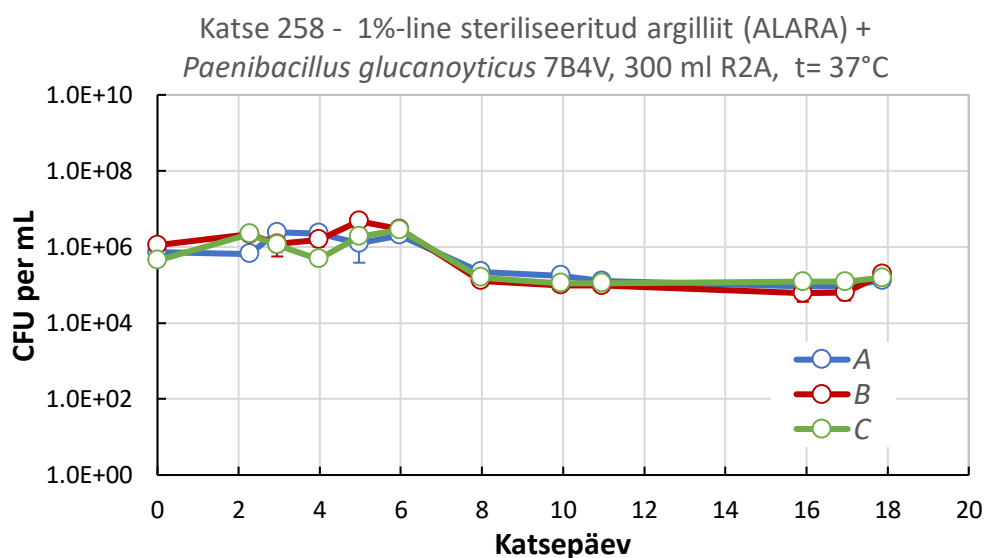
Joonis 4. Analüüsitud pH väärtuste muutust katses 253 (kontroll- ja A-, B-, C-seerias) iseloomustav graafik.



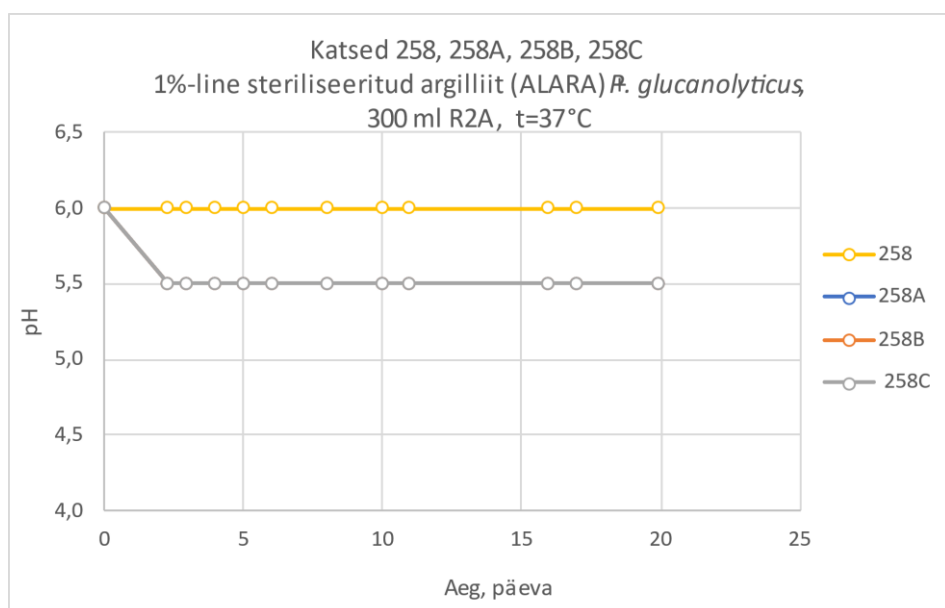
Joonis 5. Analüüsitud pH väärtuste muutust katses 256 (kontroll- ja A-, B-, C-seerias) iseloomustav graafik.

Graptoliitargilliidi steriilsuse tõendamise ja puhaskultuuri saamine bakteritüvega *L. fusiformis* võimaldas jätkata aeroobset bioleostuskatset *P. glucanolyticus*'ega. Kahjuks oli katse 257 aga algusest peale ebaõnnestunud, nii et kõik neli seeriat olid saastunud, mida kinnitas toitainekeskkonnale külvamine (Lisa 5). Tõenäoliselt oli saastumise põhjuseks substraadi ebapiisav eksponeerimine UV-lambi all laminaarboxis, samuti ebapiisavalt steriilne ruum ja vahendid katse alustamiseks ja proovi võtmiseks. Saastumise ohu minimeerimiseks vaadati

uesti üle varasemedukas katsetoodika ning seega võeti viimases katses 258 arvesse optimaalne inokulaadi kontsentratsiooni (1%) ja välistati kõik võimalikud saastetegurid. Selleks proovide võtmise tarvikud steriliseeriti laminaarsboksis koos graptoliitargilliidiga 3 korda 10 minutit UV-lambi all: 1) karp on suletud, 2) karp on avatud, 3) sulguriga väike kott (1,5 g) võetakse välja ja avatakse. Saadud *P. glucanolyticus*'e kasvu illustreeriva graafiku (Joonis 6) põhjal võib kokku võtta, et mikroorganismide arv püsib kogu katse vältel suhteliselt madal ja hakkab umbes nädala pärast veelgi vähenema. pH analüüs näitas kontrollseerias sarnaseid tulemusi (pH 6,0), samal ajal kui seeriates A, B ja C pH oli selgelt madalam (pH 5,5) (Joonis 7).



Joonis 6. Analüüsitud mikroorganismide arvukuse muutus katses 258 (A-, B- ja C-seerias) iseloomustav graafik

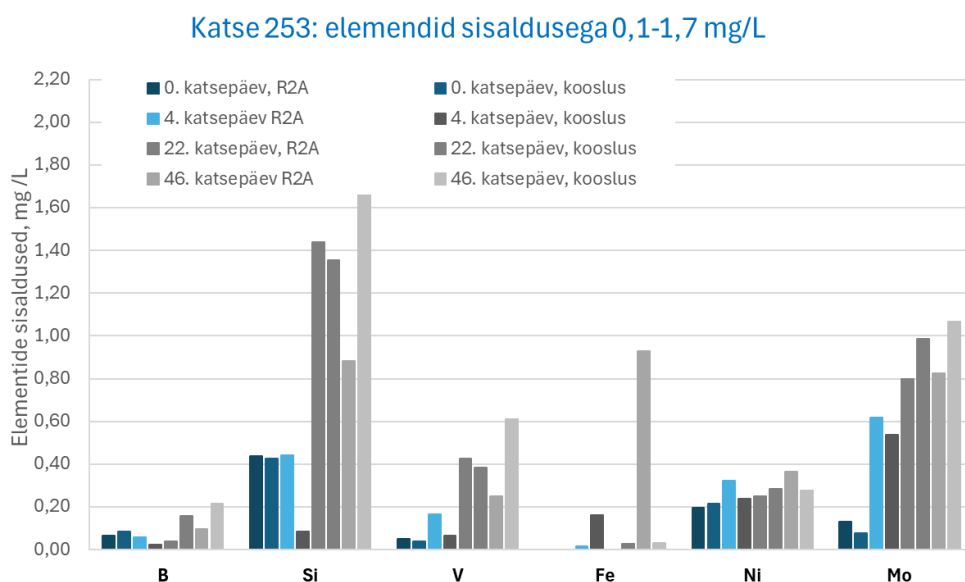


Joonis 7. Analüüsitud pH väärtuste muutus katses 258 (kontroll- ja A-, B-, C-seerias) iseloomustav graafik.

ICP-MS analüüsi jaoks võeti katsetest 253 ja 258 kolm proovi, esimene proov võeti katse esimesel päeval, teine logaritmilise faasi alguses ja kolmas viimasel päeval (Lisa 1). Eksperimentidest saadud kasvukõverad väljendavad selgelt rakkude arvukuse muutumist ajas, kuna kasutati optimaalset inokulaadi kontsentratsiooni 1%.

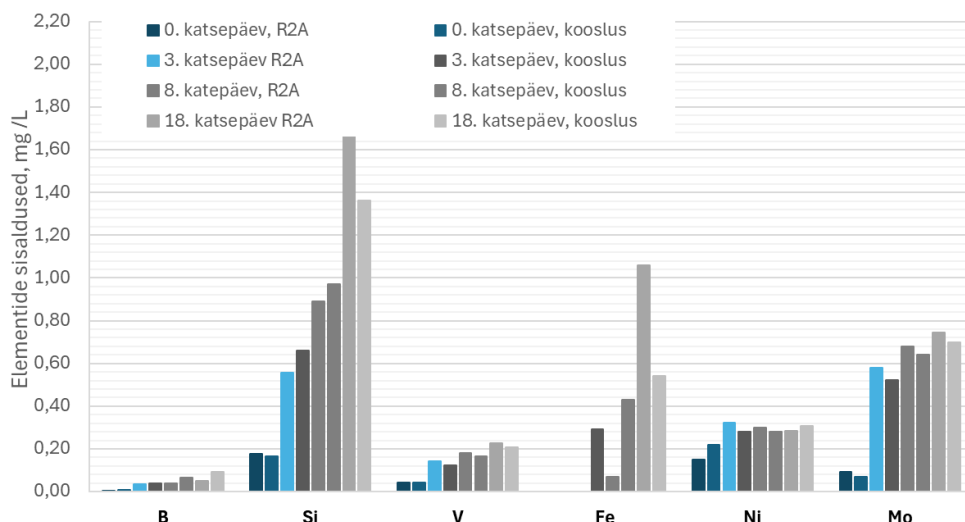
Induktiiv-sidestatud plasma massispektromeetria meetodil tehtud analüüsi käigus saadi andmed 50 proovidest leitud metalli kohta, millest valiti välja 19 metalli, mis muutsid oluliselt oma kontsentratsiooni aeroobse bioleostumise käigus. Järgmisena jaotati valitud metallid sisalduse järgi kolme rühma: elemendid Na, S, P ja K sisaldusega 3–130 mg/L (Lisa 10; Lisa 12), elemendid B, Si, V, Fe, Ni ja Mo sisaldusega 0,1 –1,7 mg /L (Joonis 8; Joonis 9), elemendid Li, Co, Cu, As, Rb, Sb, Ce, Pb, ja U sisaldusega 0,01–0,14 mg/L (Lisa 11; Lisa 13).

Võrreldes kahe katsega saadud erinevate leostunud metallide graafikuid, võib järeldada, et *Lysinibacillus fusiformis*'el on suurem potentsiaal metallide leostumiseks kui *Paenibacillus glucanolyticusel*. Seda seisundit võib täheldada vanaadiumi näitel, mille kontsentratsioon oli katses 253 viimasel päeval 0,611 mg/L, samas kui katses 258 oli see 0,206 mg/L. Ligi kolmekordne erinevus on seletatav sellega, et nagu eelnevalt kirjeldatud, esineb vanaadiumi osades argilliitides seoses orgaanilise ainega. Lisaks sellele, varasemad uuringud näitavad hemoglobiini lagunemise võimalust bakteri *L. fusiformis* poolt, mis omakorda on mudelaine metalloporfüriinide uurimisel (Antson, 2020).



Joonis 8. Katses 253 ICP-MS-ga mõõdetud erinevate elementide kontsentratsioonid vahemikus 0,1 kuni 1,7 mg/L.

Katse 258: elemendid sisaldusega 0,1-1,7 mg/



Joonis 9. Katses 258 ICP-MS-ga mõõdetud erinevate elementide kontsentratsioonid vahemikus 0,1 kuni 1,7 mg/L.

Järeldused:

1. Graptoliitargilliidil olev loomulik mikroobikooslus on resistentne ampitsilliini suhtes, kuid mitte kanamütsiini suhtes.
2. Veelkord leidis kinnitust fakt, et sobiv inokulaadi sisaldus ka bioleostamise katsetes on 1% katse vedelfaasi ruumalast. Sellisel juhul on võimalik jälgida lag-faasi, eksponentsiaalse faasi ja statsionaarsefaasi kulgu.
3. Väljakülv mikroorganismide arvukuse määramiseks bioleostamise katsetest tuleb teha proovivõtuga samal päeval või vähemalt samal nädalal, kuna mikroobide arv proovis isegi +4°C juures säilitamisel aegamööda väheneb.
4. Mikroorganismide arvukus püsib kogu aeroobse bioleostumise katse vältel suhteliselt madalal ja hakkab veelgi vähenema umbes ühe või kahe nädala pärast. Ilmselt püsiks mitut erinevat puhaskultuuri sisaldava koosluse arvukus pikemat aega kõrge.
5. Kooslusest ARGCON5 eraldatud hemoglobiini lagundaval tüvel *Lysinibacillus fusiformis*'el on suurem potentsiaal metallide leostumiseks graptoliitargilliidist kui tüvel *Paenibacillus glucanolyticusel*.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli määrata seos vanaadiumi ja graptoliidiargilliidi orgaanilise aine vahel bioleostumise teel, kasutades inokulumina kahte heterotroofset bakteritüve (EEUT ARG7B4Lp ja EEUT ARG10A). Viidi läbi kolm edukat aeroobset katset, kasutades steriilset kivimsubstraati ja kahe erineva puhaskultuuriga inokulaati, mis olid varem argilliidikooslusest eraldatud. Kildast mikroorganismide abil metallide leostumise efektiivsust mõõdeti ICP-MS meetodil. Teostati ka katsekeskkonna pH analüüs.

Inokulaadi ettevalmistamisel, mis hõlmas ka bakterite kultiveerimist toitekeskkonnas, näitas *Bacillus jeotgali* end aeglaselt kasvava bakterina. Antud asjaolu ei võimaldanud seda mikroorganismi kasutada puhaskultuurina bioleostumise katsetes. Selgus, et kivimisubstraadil olev loomulik mikroobikooslus on resistentne ampitsilliini suhtes, kuid mitte kanamütsiini suhtes. Antud katse edu võimaldas vältida edaspidiste kontrollkatseseeriade saastumist keskkonnast või otse argilliidilt pärit mikroorganismidega.

Teostatud katsed näitasid, et metallide bioleostamise uurimisel on optimaalne inokulaadi sisaldus 1%, kuna ainult sel juhul on suletud süsteemis võimalik jälgida kõiki bakterite kasvufaase - lag-, log-, statsionaarset ja suremise faasi, kuna see on vajalik edasiseks proovide võtmiseks metallianalüüsides jaoks. Võetud proovide inokuleerimine näitas, et toitekeskkonnale moodustunud kolooniate täpsema arvu jaoks on vajalik külvata kas samal päeval või vähemalt samal nädalal proovivõtuga.

Metallide ICP-MS analüüs näitas, et *Lysinibacillus fusiformis*'eli puhul oli metalli leostumise efektiivsus suurem kui *Paenibacillus glucanolyticus*eli puhul. See järeldus kinnitab võimalust leida graptoliitargilliidist vanaadiumi geoporfüriinide kujul, kuna *Lysinibacillus fusiformis*'e metabolism hõlmab orgaanilise aine lagundamist.

SUMMARY

Bioleaching is the process of extracting metals from ore using living microorganisms. The mineral substrate used in this method was graptolite argillite, or black shale, which basically consists of a mineral and organic matrix, where black means any organic matter that gives the rock its color, and shale refers to a fine-grained sedimentary rock.

Such organic-rich rock is definitely the future raw material for several metals, as the content of vanadium, uranium, molybdenum, zinc and nickel is remarkably present. Vanadium is widely used in modern industry, where over 85% of this sedimentary rock is used in the production of carbon steel, stainless steel and ferrovandium.

The main microorganisms used for bioleaching are chemolithotrophic bacteria. The problem is that these bacteria require a very acidic environment, which leads to the formation of large amounts of acidic sewage. To make this method more environmentally friendly, it is possible to use heterotrophic bacteria. They use organic matter as a carbon source for the synthesis of organic acids.

The aim of the study was to:

1. Select and culture two heterotrophic bacterial strains from the CELMS culture collection for further use as inoculums.
2. Perform two strictly aerobic bioleaching experiments with the two bacterial strains selected.
3. Analyze the yield of metals leached during the life of microorganisms.
4. Compare the success of vanadium bioleaching depending on the bacterial species.

The aim of this work was to determine the relationship between organic matter and vanadium in graptolite argillite by bioleaching, using two heterotrophic bacterial strains (EEUT ARG7B4Lp and EEUT ARG10A). Three successful aerobic experiments were performed using a sterile substrate and two inoculums previously isolated from the argillite consortium ARGCON5. The efficiency of metal leaching from shale by microorganisms was measured by the ICP-MS method, and the pH analysis of the environment was also performed in the experiments.

In the preparation of the inoculum, which involved culturing the bacteria in a nutrient medium, *Bacillus jeotgali* showed itself as a slow-growing bacterium. This fact did not allow it to be used as the only microorganism in bioleaching experiments. The argillite indigenous microbial community is resistant to ampicillin but not to kanamycin. The success of this experiment made

it possible to avoid contamination in the control series of experiments with microorganisms from the environment or directly from the argillite.

The experiments carried out have shown that the optimal inoculum content is 1%, because only in this case it is possible to observe all phases of bacterial growth in a closed system, namely lag-phase, log-phase, stationary and dying phase, as this is necessary for further sampling for metal analysis. In addition, the inoculation showed that for a more accurate number of colonies formed on the nutrient medium, it is essential to plate on the same day or at least the same week as sampling.

ICP-MS analysis of metals showed that *Lysinibacillus fusiformis* had a higher metal leaching efficiency than *Paenibacillus glucanolyticus*. However, this finding confirms the possibility of finding vanadium in the form of geoporphyrins in graptolite argillite, since the metabolism of *Lysinibacillus fusiformis* involves the breakdown of organic matter.

KIRJANDUSE LOETELU

- Aaloe, A., Bauert, H., Soesoo, A. (2006). Kukersiit – Eesti põlevkivi. Tallinn: MTÜ GEOGuide Baltoscandia.
- Aare, J. (1999). Fosforiidisõda 1971-1989. Tallinn: Kirilille Kirjastus.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57, 1117-1125.
- Alexander, B., Priest, F.G. (1989). *Bacillus glucanolyticus*, a new species that degrades a variety of B-glucans. Int. J. Syst. Bacteriol. 39 (2), 112–115.
- Antson, E. R. (2020). Graptoliitargilliidist eraldatud bakteriaalsete isolaatide kirjeldamine. Bakalaureusetöö. Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituut.
- Brierley, C.L., Brierley, J.A. (2013) Progress in bioleaching. Part B. Applications of microbial processes by the minerals industry. Appl. Microbiol. Biot. 97, 7543-7552.
- Brown, M.E., Chang, M.C. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. Curr. Opin. Chem. Biol. 19, 1–7.
- Dai, S., Finkelman, R. B., Hower, J. C., French, D., Graham, I. T., Zhao, L. (2023). Inorganic geochemistry of coal. Elsevier.
- Ghosh, S., Gandhi, M., van Hullebusch, E. D., Das, A. P. (2021). Proteomic insights into *Lysinibacillus* sp.-mediated biosolubilization of manganese. Environ. Sci. Pollut. R. 28, 40249–40263.
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z.C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. Microb. Cell Fact. 15 (203), 1-18.
- Graptoliitargilliidi käitlemise juhend. (2020). Eesti Geoloogiateenistus, Rakvere.
- Hade, S. (2014). GIS Applications in the Studies of the Palaeozoic Graptolite Argillite and Landscape Change (GIS meetodite rakendused Paleosoikumi graptoliitargilliidi ja keskkonnaseisundi muutlikkuse uuringutes). Doktoritöö. Tallinna tehnikaülikooli geoloogiainstituut.

- Hade, S., Soesoo, A. (2014). Estonian graptolite argillites revisited: a future resource?. *Oil Shale*. 31(1), 4-18.
- He, M., Li, X., Liu, H., Miller, S. J., Rensing, C., Wang, G., 2011. Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *J. Hazard. Mater.* 185 (2-3), 682–688.
- He, Z.; Lv, Y.; Zhang, T.; Zhu, Y.; Dai, L.; Yao, S.; Zhu, W.; Wang, L. (2022). Electrode materials for vanadium redox flow batteries: Intrinsic treatment and introducing catalyst. *Chem. Eng. J.* 427, 131680.
- Heinaru, E. ja Vedler, E. (2011). *Praktilisi töid mikrobioloogiast*. Tartu: AS Atlex.
- Huang, J., Li J., Wang, G. (2016). Production of a microcapsule agent of chromate-reducing *Lysinibacillus fusiformis* ZC1 and its application in remediation of chromate-spiked soil. *SpringerPlus*. 5, 1-10.
- ICP-MS Agilent 7500 kasutamine. (2021). BiotaTec OÜ, Tartu.
- Jamal, Q. M. S., Ahmad, V. (2022). *Lysinibacilli*: A Biological Factories Intended for Bio-Insecticidal, Bio-Control, and Bioremediation Activities. *Journal of Fungi*. 8, 1288.
- Johnson, D. B. (2014) Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr. Opin. Biotech.* 30, 24-31.
- Kivisaar, M., Menert, A. (2020). Applicability of bioleaching for the extraction of metals from Estonian graptolitic argillite (RITA project). University of Tartu, Tartu.
- Korb, T. (2016). Biodegradatiivse potentsiaaliga mikroobikooslused Eesti graptoliitargilliidist. *Magistritöö*. Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituut. 77 lk.
- Krillo, K.-E. ja Hassan, S. J. (2024) Metallide mikrobioloogiline leostamine graptoliitargilliidist. *Uurimistöö*, Tartu Tamme Gümnaasium, Tartu 2024, 36 lk.
- Kutschke, S., Gu'ezennec, A. G., Hedrich, ... Bodéan, F. (2015). Bioleaching of Kupferschiefer blackshale—A review including perspectives of the Ecometals project. *Miner. Eng.* 75, 116-125.
- Li, O., Lu, C., Liu, A., Zhu, L., Wang, P.M., Qian, C.D., Jiang, X.H., Wu, X.C. (2013). Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment. *Bioresource Technol.* 134, 87–93.

- MacWilliams, M. P., Liao, M. K. (2006). Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. ASM MicrobeLibrary. Am. Soc. for Microbiology, 2006.
- Mathews, S.L., Pawlak, J.J., Grunden, A.M. (2014). Isolation of *Paenibacillus glucanolyticus* from pulp mill sources with potential to deconstruct pulping waste. *Bioresource Technol.* 164, 100-105.
- Menert, A., Kivisaar, M., Sipp Kulli, S., Heinaru, A., Maidre, T. (2020). Method for decomposition of the metallorganic matter of graptolite-argillite by microbial consortium. U.S. Patent Application No. 15/998,841.
- Peacor, D.R., Coveney, R.M., Zhao, G. (2000). Authigenic Illite and Organic Matter: The Principal Hosts of Vanadium In The Mecca Quarry Shale at Velpen, Indiana. *Clay. Clay. Miner.* 48, 311–316.
- Pihlak, A.-T. (2011). *Keskkonnatehnika.* 5, 33–37.
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Todd, C. (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 1847–1882.
- Reasoner, D. J., Geldreich, E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microb.* 49(1), 1-7.
- Riekkola-Vanhanen, M. (2010). Talvivaara Sotkamo mine—bioleaching of a polymetallic nickel ore in subarctic climate. *Nova Biotechnol.* 10, 7–14.
- Riekkola-Vanhanen, M. (2013). Talvivaara mining company – From a project to a mine. *Miner. Eng.* 48, 2–9.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L.K., Komagata, K. (1997). Transfer of *Bacillus aligonolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (2), 289–298.
- Sipp Kulli, S., Menert, A., Kamenev, I., Reinsalu, E., Maidre, T., BiotaP, O.Ü. (2016). Preliminary economic assessment of the extraction of methane gas from the Estonian argillite. BiotaP OÜ, Tallinn.
- Zhang, H., Shi, J., Chen, C., Yang, M., Lu, J., Zhang, B. (2022). Heterotrophic Bioleaching of Vanadium from Low-Grade Stone Coal by Aerobic Microbial Consortium. *Int. J. Env. Res. Pub. He.* 19, 13375.

Wilschefski, S. C., Baxter, M. R. (2019). Inductively coupled plasma mass spectrometry: introduction to analytical aspects. *The Clinical Biochemist Reviews*. 40(3), 115-133.

Vind, J., Tamm, K. (2021). Review of the extraction of key metallic values from black shales in relation to their geological and mineralogical properties. *Miner. Eng.* 174, 107271.

Vine, J.D., Tourtelot, E.B. (1970). Geochemistry of black shale deposits; a summary report. *Econ. Geol.* 65, 253–272.

VEEBIAADRESSIDE LOETELU

CELMSi elektroonilise kataloogi kodulehekülg. (2023). Vaadatud 05.05.2024.

https://eemb.ut.ee/celms/main_list.php?q=EEUT%20ARG7B4Lp&criteria=or

CELMSi elektroonilise kataloogi kodulehekülg. (2023). Vaadatud 05.05.2024.

https://eemb.ut.ee/celms/main_list.php?q=EEUT%20ARG7A2&criteria=or

CELMSi elektroonilise kataloogi kodulehekülg. (2023). Vaadatud 05.05.2024.

https://eemb.ut.ee/celms/main_list.php?q=EEUT%20ARG10A&criteria=or

DrugBanki kodulehekülg. (2024). Vaadatud 05.05.2024.

<https://go.drugbank.com/drugs/DB00415>

DrugBanki kodulehekülg. (2024). Vaadatud 05.05.2024.

<https://go.drugbank.com/drugs/DB01172>

Geneetika. Sõnastik geneetikahuvilistele. 9/10/2014 Vaadatud 05.05.2024.

<https://geneetika.ee/encyclopedia/minimaalsoode/>

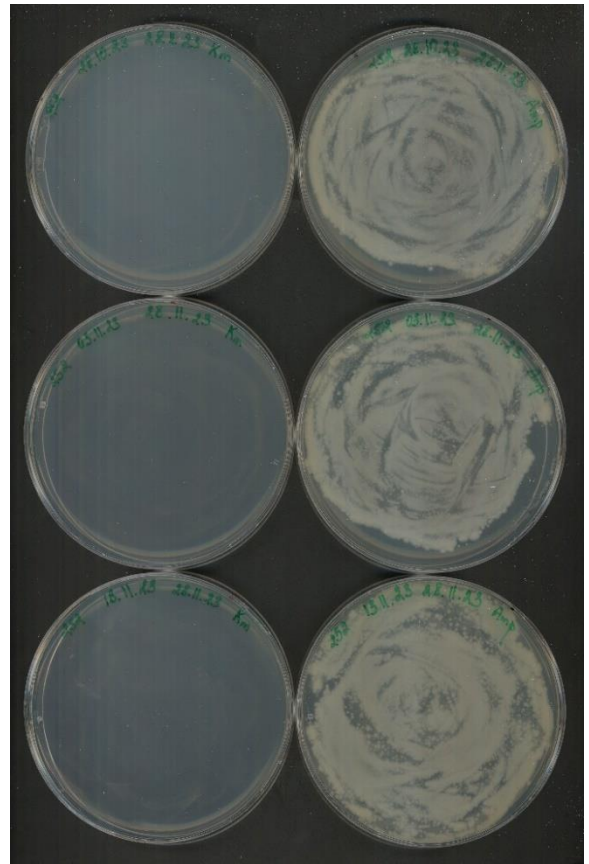
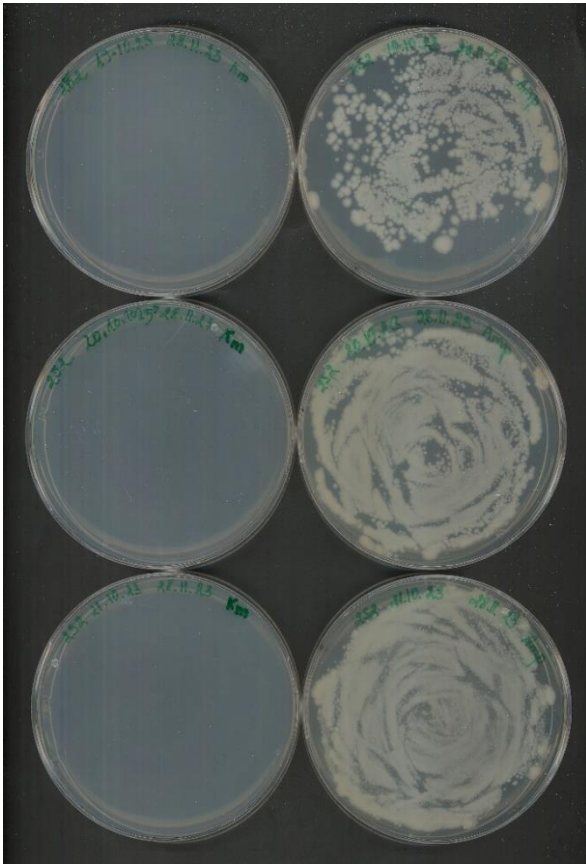
Raua ja tema sulamite tootmine. (2011). Vaadatud: 28.04.2024

https://web.archive.org/web/20111203130213/http://miksike.ee/documents/main/elehed/9klass/metallid_mittemetallid/9-1-13-1.htm

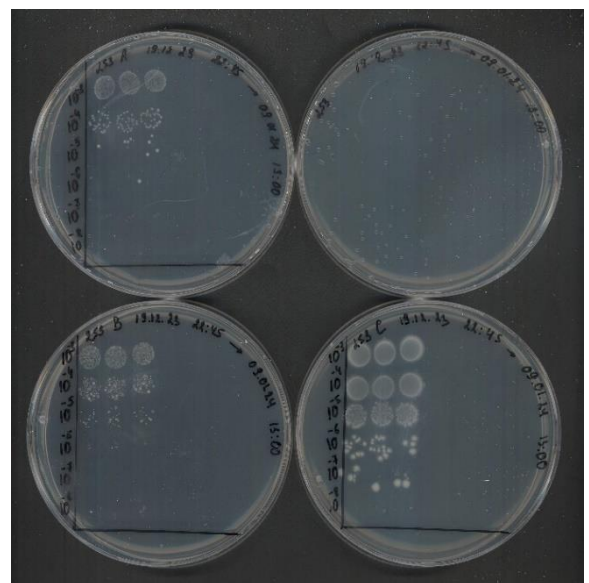
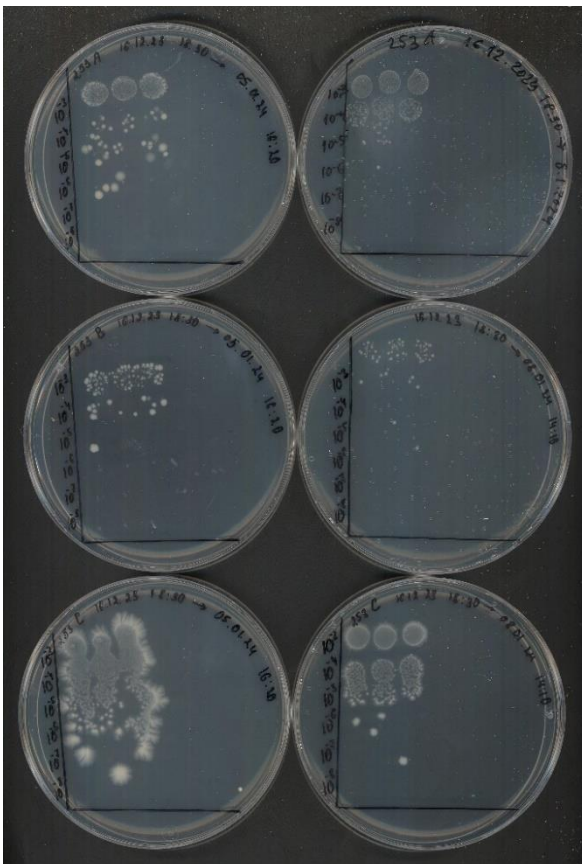
LISAD

Lisa 1. Metallide analüüsi jaoks proovide ettevalmistamise segu koostis

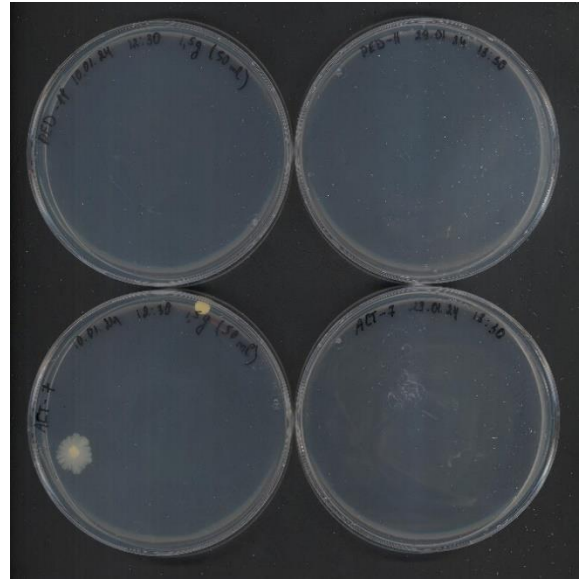
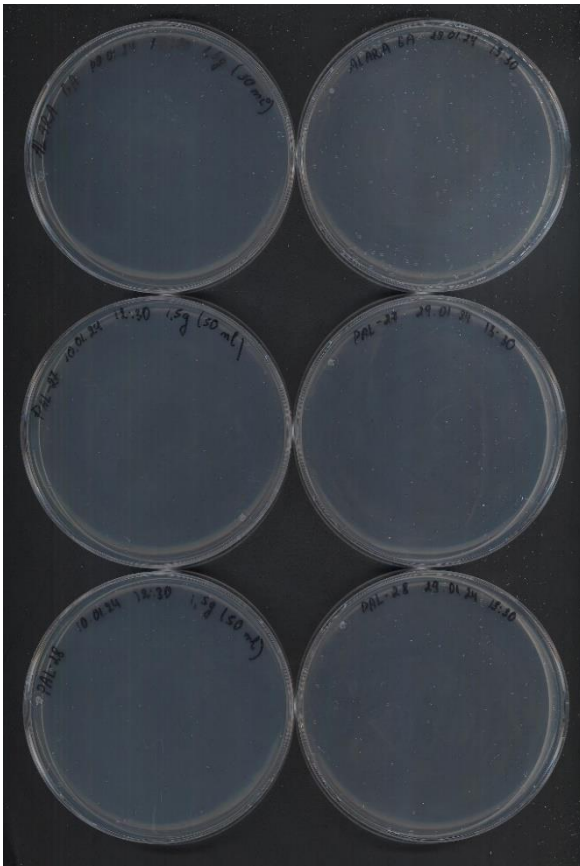
Plaan 18.04.2024 - 250µl vedelfaas + 25µl HNO ₃						
Proovi nr.	Proovi kood	Proovi nimi	Proovi ja happe kogus	Proovi säilitamiste mperatuur		
		Ühik				
Katse 253						
389	C 389	Katse 253 ALARA+R2A 13.12.2023 15:00	250µl proovi + 25µl HNO ₃	Hapestatud peale 1 ml proovi võtmist esialgsest 15 ml proovist; hapestatud proovi säilitatud t=20°C		
390	C 390	Katse 253A ALARA+R2A +L. <i>fusiformis</i> 13.12.2023 15:00				
391	C 391	Katse 253B ALARA+R2A+L. <i>fusiformis</i> 13.12.2023 15:00				
392	C 392	Katse 253C ALARA+R2A+L. <i>fusiformis</i> 13.12.2023 15:00				
393	C 393	Katse 253 ALARA+R2A 17.12.2023 16:40				
394	C 394	Katse 253A ALARA+R2A +L. <i>fusiformis</i> 17.12.2023 16:40				
395	C 395	Katse 253B ALARA+R2A+L. <i>fusiformis</i> 17.12.2023 16:40				
396	C 396	Katse 253C ALARA+R2A+L. <i>fusiformis</i> 17.12.2023 16:40				
397	C 397	Katse 253 ALARA+R2A 04.01.2024 11:30				
398	C 398	Katse 253A ALARA+R2A +L. <i>fusiformis</i> 04.01.2024 11:30				
399	C 399	Katse 253B ALARA+R2A+L. <i>fusiformis</i> 04.01.2024 11:30				
400	C 400	Katse 253C ALARA+R2A+L. <i>fusiformis</i> 04.01.2024 11:30				
401	C 401	Katse 253 ALARA+R2A s 28.01.2024 21:00				
402	C 402	Katse 253A ALARA+R2A +L. <i>fusiformis</i> 28.01.2024 21:00				
403	C 403	Katse 253B ALARA+R2A+L. <i>fusiformis</i> 28.01.2024 21:00				
404	C 404	Katse 253C ALARA+R2A+L. <i>fusiformis</i> 28.01.2024 21:00				
Katse 258						
405	C 417	Katse 258 ALARA+R2A 25.03.2024 16:00			250µl proovi + 25µl HNO ₃	Hapestatud peale 1 ml proovi võtmist esialgsest 15 ml proovist; hapestatud proovi säilitatud t=20°C
406	C 418	Katse 258A ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 25.03.2024 16:00				
407	C 419	Katse 258B ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 25.03.2024 16:00				
408	C 420	Katse 258C ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 25.03.2024 16:00				
409	C 421	Katse 258 ALARA+R2A 28.03.2024 14:50				
410	C 422	Katse 258A ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 28.03.2024 14:50				
411	C 423	Katse 258B ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 28.03.2024 14:50				
412	C 424	Katse 258C ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 28.03.2024 14:50				
413	C 425	Katse 258 ALARA+R2A 02.04.2024 15:20				
414	C 426	Katse 258A ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 02.04.2024 15:20				
415	C 427	Katse 258B ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 02.04.2024 15:20				
416	C 428	Katse 258C ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 02.04.2024 15:20				
417	C 429	Katse 258 ALARA+R2A 12.04.2024 14:40				
418	C 430	Katse 258A ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 12.04.2024 14:40				
419	C 431	Katse 258B ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 12.04.2024 14:40				
420	C 432	Katse 258C ALARA+R2A+P. <i>glucanolyticus</i> 12.04.2024 14:40				
421	C 433	mQ+HNO ₃ kontroll 18.04.2024	250µl proovi + 25µl HNO ₃	Säilitatud t=20°C		
422	C 434	R2A+HNO ₃ 18.04.2024				



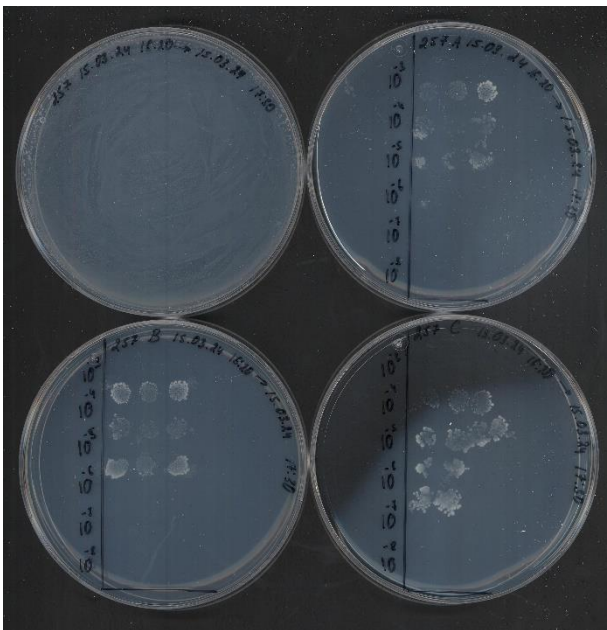
Lisa 2. Antibiootikumide tundlikkuse katse 6 erineva prooviga katsest 252 kanamütsiini (vasak veerg) või ampitsiliini (parem veerg) sisaldaval söötmel



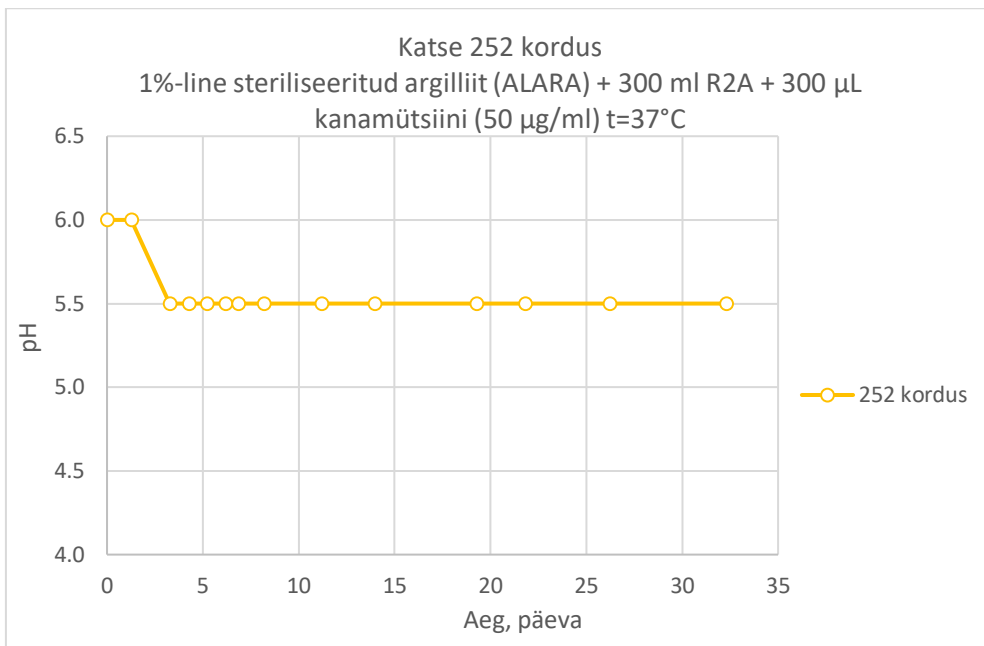
Lisa 3. Saastumine ilmumine katses 253 B-seerias (parem pilt, kolmas rida paremalt) 19. detsembril 2023 ja C-seerias (vasak pilt, kolmas rida) kuupäeval 16. detsembril 2023 R2A-agar söötmel



Lisa 4. Katse erinevate argilliitide (vasakul joonisel ALARA GA, PAL-27, PAL-28 ja paremal joonisel PED-11, ACT-7) steriilsuse kontrollimiseks R2A-agar söötmel, kus ühel joonisel on kaks paralleeli: vasakul on külvatud 10. jaanuaril 2024, paremal 29. jaanuaril 2024.



Lisa 5. Saastumine ilmumine katses 257 kontroll- ja A-, B-, C-seerias (ridade kaupa vasakult paremale) 15. märtsil 2024 R2A-agar söötmel



Lisa 6. Analüüsitud pH väärtuste muutus katses 252 kordus iseloomustav graafik

Lisa 7. Katses 253 analüüsitud mikroorganismide arvukused ja pH väärtused erinevatel proovivõtukuupäevadel, kus saastumine on märgitud punasega

Jrk nr	Proovivõtu	Katse päev	Analüüs										Märkused (külvikuupäev)
			ICP-MS	LC / UV-Vis	pH				CFU				
					253	253A	253B	253C	253	253A	253B	253C	
1	13.12.2023 15:00:00	0	+	+	6,0	7,0	7,0	7,0	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+04	27.12.2023
2	14.12.2023 15:00:00	1,00	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+04	27.12.2023, 4.01.2024
3	14.12.2023 22:00:00	1,29	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+03	1,E+03	1,E+05	27.12.2023, 4.01.2024
4	15.12.2023 23:00:00	2,33	+	+	6,0	7,5	7,5	7,0	0,00	1,E+05	1,E+03	1,E+05	27.12.2023, 4.01.2024
5	16.12.2023 18:30:00	3,15	+	+	6,0	7,5	7,5	7,0	0,00	1,E+04	1,E+03	1,E+06	5.01.2024, 8.01.2024
6	17.12.2023 16:40:00	4,07	+	+	6,0	7,5	7,5	7,0	0,00	1,E+05	1,E+05	1,E+06	5.01.2024, 8.01.2025
7	19.12.2023 22:45:00	6,32	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+05	1,E+06	09.01.2024
8	22.12.2023 11:15:00	8,84	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+05	1,E+06	10.01.2024
9	26.12.2023 21:00:00	13,25	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+05	1,E+06	11.01.2024
10	01.01.2024 23:30:00	19,35	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+05	1,E+06	11.01.2024
11	04.01.2024 11:30:00	21,85	+	+	5,5	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+06	12.01.2024
12	09.01.2024 19:45:00	27,20	+	+	5,5	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+06	12.01.2024
13	15.01.2024 21:45:00	33,28	+	+	5,5	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+05	29.01.2024
14	28.01.2024 21:00:00	46,25	+	+	5,5	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+05	29.01.2024

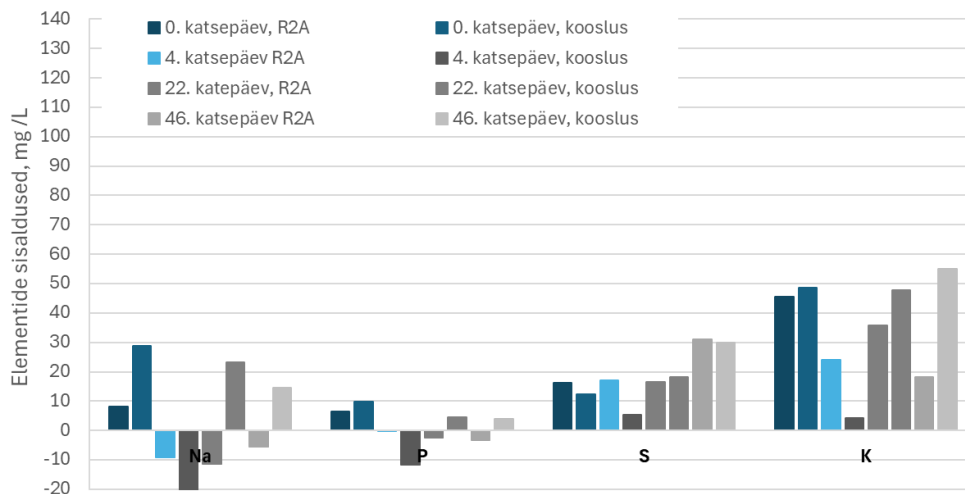
Lisa 8. Katses 253 analüüsitud mikroorganismide arvukused ja pH väärtused erinevatel proovivõtukuupäevadel

Jrk nr	Proovivõtu	Katse päev	Analüüs										Märkused (küivi kuupäev)
			ICP-MS	LC / UV - Vis	pH				CFU				
					256	256A	256B	256C	256	256A	256B	256C	
1	01.02.2024 14:45:00	0	+	+	6,0	6,5	6,5	6,5	0,00	1,E+05	1,E+05	1,E+05	02.02.2024
2	02.02.2024 13:40:00	0,95	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+03	1,E+03	1,E+04	06.02.2024, 07.02.2024,08.02.2024, 15.02.2024
3	02.02.2024 22:15:00	1,31	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+06	1,E+05	1,E+05	06.02.2024, 07.02.2024
4	05.02.2024 13:50:00	3,96	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+05	1,E+03	1,E+03	07.02.2024,08.02.2024, 15.02.2024
5	06.02.2024 11:00:00	4,84	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+05	1,E+05	22.02.2024, 23.02.24
6	07.02.2024 12:30:00	5,91	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+03	1,E+04	1,E+05	29.02.2024
7	08.02.2024 12:30:00	6,91	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+05	01.03.2024
8	15.02.2024 13:30:00	13,95	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+05	1,E+05	1,E+05	16.02.2024
9	16.02.2024 13:30:00	14,95	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+05	16.02.2024
10	22.02.2024 13:30:00	20,95	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+05	22.02.2024, 23.02.24
11	23.02.2024 12:10:00	21,89	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+05	23.02.2024
12	29.02.2024 14:40:00	28,00	+	+	6,0	7,5	7,5	7,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+05	29.02.2024

Lisa 9. Katses 253 analüüsitud mikroorganismide arvukused ja pH väärtused erinevatel proovivõtukuupäevadel

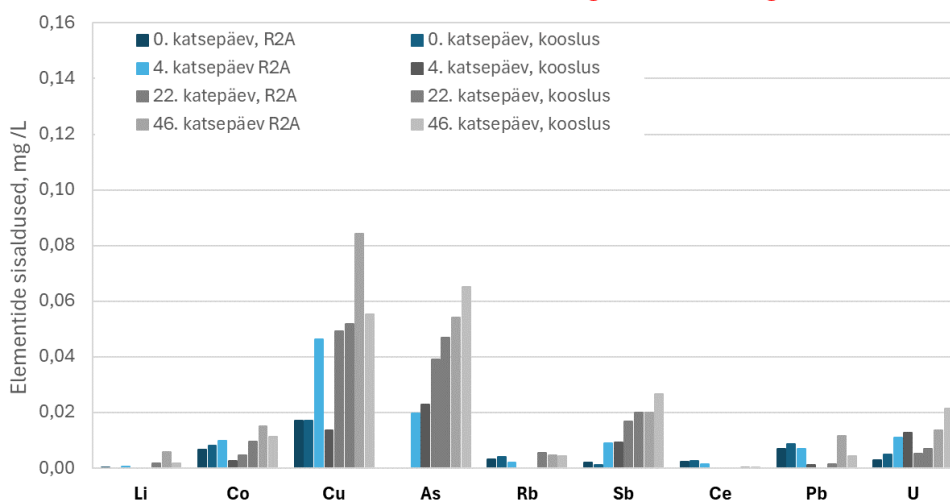
Jrk nr	Proovivõtu	Katse päev	Analüüs										Märkused (küivi kuupäev)
			ICP-MS	LC / UV - Vis	pH				CFU				
					258	258A	258B	258C	258	258A	258B	258C	
1	25.03.2024 16:00:00	0	+	+	6,0	6,0	6,0	6,0	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+04	28.03.2024
2	27.03.2024 22:30:00	2,27	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+04	28.03.2024, 02.04.2024
3	28.03.2024 14:50:00	2,95	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+04	02.04.2024
4	29.03.2024 15:20:00	3,97	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+04	02.04.2024
5	30.03.2024 15:20:00	4,97	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+04	05.04.2024
6	31.03.2024 15:20:00	5,97	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+04	1,E+04	1,E+04	05.04.2024
7	02.04.2024 15:20:00	7,97	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+03	1,E+03	1,E+03	04.04.2024
8	04.04.2024 14:40:00	9,94	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+03	1,E+03	1,E+03	04.04.2024
9	05.04.2024 15:00:00	10,96	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+03	1,E+03	1,E+03	10.04.2024
10	10.04.2024 13:50:00	15,91	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+03	1,E+03	1,E+03	10.04.2024
11	11.04.2024 15:00:00	16,96	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+03	1,E+03	1,E+03	11.04.2024
12	14.04.2024 12:50:00	19,87	+	+	6,0	5,5	5,5	5,5	0,00	1,E+03	1,E+03	1,E+03	15.04.2024

Katse 253: elemendid sisaldusega 3-130 mg/L



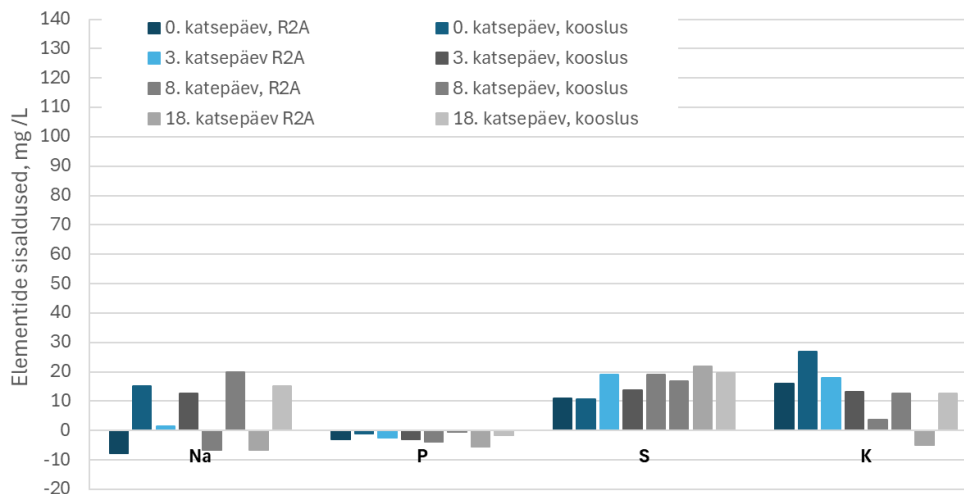
Lisa 10. ICP-MS-ga mõõdetud katses 253 erinevate elementide kontsentratsioonid vahemikus 3 kuni 130 mg/L

Katse 253: elemendid sisaldusega 0,01-0,14 mg/L



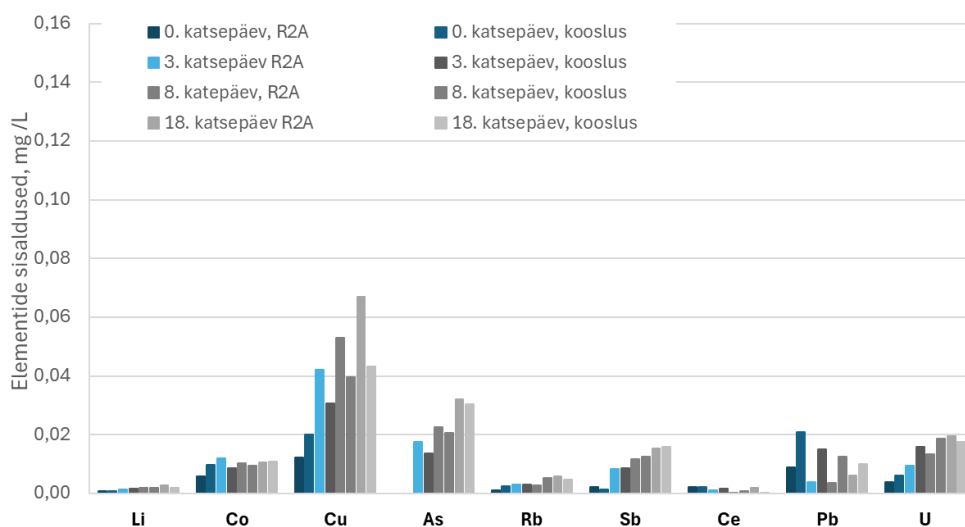
Lisa 11. ICP-MS-ga mõõdetud katses 253 erinevate elementide kontsentratsioonid vahemikus 0,01 kuni 0,14 mg/L

Katse 258: elemendid sisaldusega 3-130 mg/L



Lisa 12. ICP-MS-ga mõõdetud katses 258 erinevate elementide kontsentratsioonid vahemikus 3 kuni 130 mg/L

Katse 258: elemendid sisaldusega 0,01-0,14 mg/L



Lisa 13. ICP-MS-ga mõõdetud katses 258 erinevate elementide kontsentratsioonid vahemikus 0,01 kuni 0,14mg/L

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Darja Lapina

(sünnikuupäev: 28.05.2002)

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

Metallide heterotroofne bioleostumine graptoliitargilliidist,

mille juhendaja on Anne Menert (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.

Darja Lapina

27.05.2024