

Tartu Ülikool  
Loodus- ja täppisteaduste valdkond  
Molekulaar- ja Rakubioloogia instituut  
Geneetika õppetool

**Trükkplaatide mittemetallilise osa mikrobioloogiline lagundamine**  
Bakalaureusetöö  
12 EAP  
Pärtel Reppo

Juhendaja: PhD Anne Menert

Tartu 2023

# INFOLEHT

## **Trükkplaatide mittemetallilise osa mikrobioloogiline lagundamine**

Epoksüvaigud moodustavad märkimisväärse osa (umbes 30%) mittemetallilisest osast trükkplaatides. Nende jäätmete ringlussevõtul on pöhirõhk seni olnud metallide ja väärismetallide maksimaalsel eraldamisel. Mittemetallilised osad ladestatakse prügilasse või põletatakse, mis põhjustab materjali kadu ja võimalikke keskkonnaprobleeme. Vajadus tegeleda ülemaailmse plastikjäätmete kogusega peegeldab hästi publikatsioonide arvu kasv WoS-is nende biolagunemise kohta (33 aastal 1992; 3313 aastal 2023), kuigi epoksüvaikude biolagunemist käsitlevate paberite arv on endiselt alles mõõdukas (esmatrükk 1992, 125 publikatsiooni 2023). Käesoleva eesmärk on uurida trükkplaatide orgaanilist osa lagundavaid mikroobe.

### **Töö teadusala CERCS kood:**

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

T490 Biotehnoloogia

**Märksõnad:** e-romu; trükkplaat; anaeroobne protsess; metanogenees

## **Microbiological degradation of the non-metallic fraction of printed circuit boards**

Epoxy resins form a considerable part (about 30%) of the non-metallic fraction of printed circuit boards (PCBs). In recycling this waste, the main focus has so far been on the maximal extraction of valuable basic and precious metals. The non-metallic fractions are landfilled or incinerated, which will cause waste of resources and potential environmental problems. The necessity to cope with global waste plastic amounts is well reflected by the increase of number of Publications in WoS on their biodegradation (33 in year 1992; 3313 in year 2023), while the number of papers on the biodegradation of epoxy resins is still moderate (first publication in 1992, 125 publications in 2023). The aim of this thesis is to study the microbes that degrade the organic part of printed circuit boards.

### **CERCS research specialization**

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

T490 Biotechnology

**Keywords:** e-waste; printed circuit board; anaerobic process; methanogenesis

# SISUKORD

<b>KASUTATUD LÜHENDID.....</b>	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>5</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....</b>	<b>6</b>
1.1. <b>Elektroonikaromu päritolu ja koostis.....</b>	<b>6</b>
1.2. <b>E-jäätmete mõju keskkonnale .....</b>	<b>8</b>
1.3. <b>Trükkplaatide mittemetallilise osa iseloomustus.....</b>	<b>8</b>
1.4. <b>Bioleostamine .....</b>	<b>10</b>
1.4.1.    Bioleostamise liigid .....	10
1.4.2.    Bioleostamise eesmärgid ja keskkonnamõju .....	11
1.5. <b>Mikroorganismid bioleostamises.....</b>	<b>12</b>
1.5.1.    Kemolitotroofsed mikroorganismid .....	12
1.5.2.    Kemolitoautotroofsed bakterid .....	13
1.5.3.    Heterotroofsed mikroorganismid .....	14
1.6. <b>Mikroorganismid elektroonikaromu töötlemisel.....</b>	<b>14</b>
1.6.1.    Metallide leostamine e-romust.....	15
1.6.2.    Trükkplaatide töötlemine .....	15
1.6.3.    Plastikud ja vaigud .....	17
1.6.4.    Vaikude lagundamine .....	18
1.7. <b>Eluvõimelised mittekultiveeritavad bakterid.....</b>	<b>19</b>
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....</b>	<b>21</b>
2.1. <b>Töö eesmärk .....</b>	<b>21</b>
2.2. <b>Materjalid ja meetodid.....</b>	<b>21</b>
2.2.1.    Reaktorikatse.....	21
2.2.2.    Biomassi eraldamine.....	28
2.2.3.    DNA eraldamine DNEASY Powersoil Kitiga .....	29
2.2.4.    DNA sisalduse mõõtmine Qubit Fluorometriga .....	30
2.2.5.    Sekveneerimine .....	31
2.2.6.    Bioinformaatiline analüüs .....	33
<b>3. TULEMUSED JA ARUTELU .....</b>	<b>34</b>
3.1. <b>Reaktorikatse tulemused.....</b>	<b>34</b>
3.2. <b>Biomass ja sellest eraldatud DNA .....</b>	<b>37</b>
3.3. <b>Amplikonid ja genoomi kokkupanek.....</b>	<b>40</b>
3.4. <b>Määratud tüvede kirjeldused .....</b>	<b>43</b>
<b>KOKKUVÕTE.....</b>	<b>48</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>49</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>	<b>51</b>

## **KASUTATUD LÜHENDID**

**ASV** – amplikon järjestuse variant

**BFR** - broomitud leegiaeglustaja

**GA** - graptolliitargilliit

**MMO** - mittemetalliline osa

**Mt** - miljonit tonni

**OTU** – operatiivne taksonoomiline üksus

**VBNC** - elujõulised mittekultiveeritavad

## SISSEJUHATUS

Praegune tarbimisühiskond on toonud kaasa pideva elektri- ja elektroonikaseadmete suurenenud tootmise ning nendest tekkinud jäätmete tekke. Kõige väärtuslikumaks, kuid samas ka üheks probleemsemaks osaks peetakse neis sisalduvaid trükkplaate. Palju töid ning eksperimente on proovinud biometallurgia abil eraldada neist jäätmetest erinevaid metalle. Seda on palju uuritud ning olgugi et kohati on tegemist keeruka ülesandega on töö sellega olnud tulemuslik.

Vähem on uuritud just mittemetallilise osa mikrobioloogilise lagundamise kohta. Täpsemalt epoksüvaikude biolagunemise kohta on vähe teadustöid. Selle juures on tähtsad elujõulised mittekultiveeritavad mikroorganismid. Nende seast on lootus leida potentsiaalseid bakterite perekondi, kes oleksid edukad eposküvaikude lagnamisel. Neid pole kahjuks võimalik kultiveerida tavapärase meetmetega. Tuleb luua neile mikroorganismidele loomumane paljunemiskeskond.

Antud töös näidatakse trükkplaatide mittemetallilise osa mikrobioloogilise lagunemise võimalust kohandatud anaeroobse konsortsiumiga katseseadmes. (20-liitrine reaktor) Algselt graptoliitargilliidist (GA) ja teisel puhul trükkplaadist rikastatud inokulumiga. Suurenenud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooniga trükkplaatide kasutamine (30,56% võrreldes 12,28% graptoliitargilliidiga), kuid säilitades söötme koostise, andis tulemuseks CH<sub>4</sub> saagise suurenemine 1,8 korda (75,6 L CH<sub>4</sub> kg materjali kohta) võrreldes graptoliitargilliidiga. Toitekeskkonna lisandid mõjutasid metaani tootmist, kuid neid ei kasutatud otseselt metaani tootmiseks.

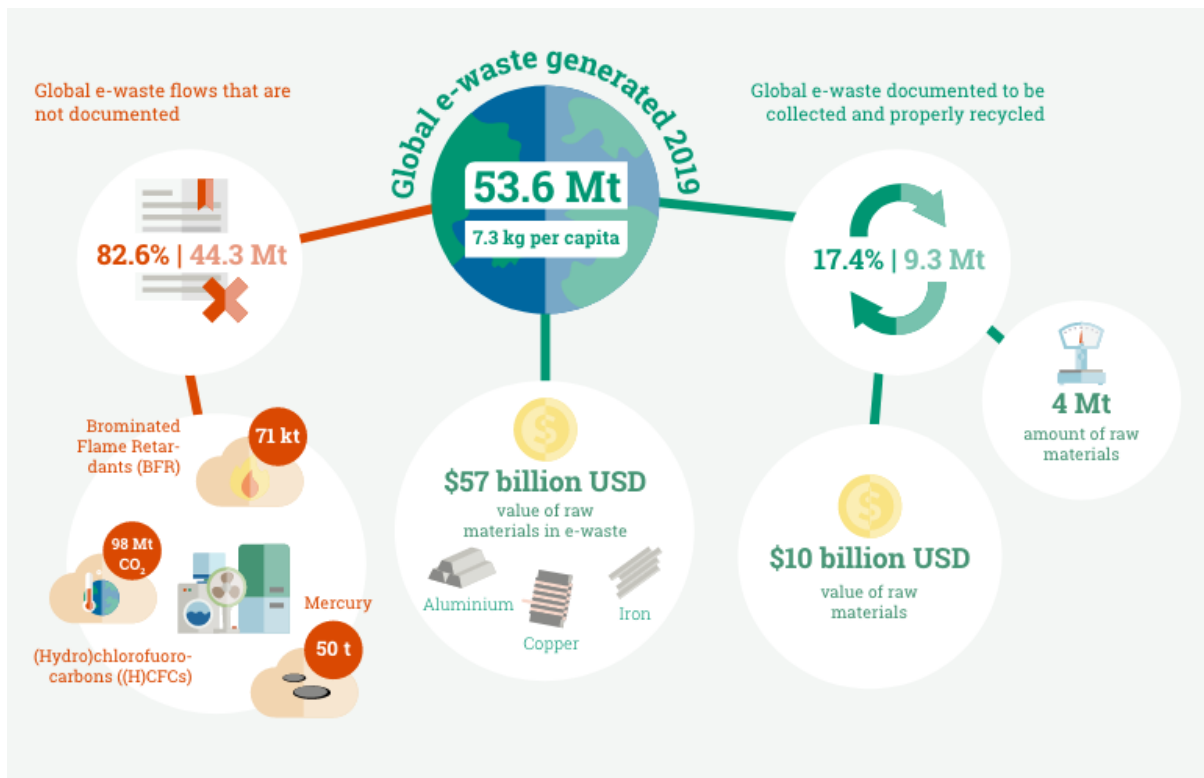
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Elektroonikaromu päritolu ja koostis

Elektroonikaromu e elektroonikajäätmed või teisiti e-romu (*waste electrical and electronic equipment - WEEE*) on igasugune elektroonikaseadmetest moodustuv prügi. Sinna alla kuuluvad nii elektrilised kui elektroonikaseadmed – sisuliselt kõik elektriga seotud seadmed. E-romuks saab pidada lampe, patareisid, nutitelefone, jahutusseadmeid, mänguasju, PCR-masinaid jne. Need on jäätmed, mis hõlmavad endas seadet kõigi tema komponentidega hetkest kui seade on vananenud või liiga kahjustunud selle kasutamiseks (UNEP, 2014). Jäätmete liigitamine on regiooniti erinev, kuid üks võimalus neid kategoriseerida:

1. soojusvahetusseadmed (jahutus- ja külmutusseadmed);
2. ekraanid ja monitorid (telerid ja lauaarvutid);
3. lambid (fluorestsentslambid, LED-lambid, luminofoortorud);
4. suureseadmed (pesumasinad, elektripliidid, keevitused, kohviautomaadid);
5. väikeseadmed (muusikakeskused, tolmuimejad, veekeetjad, nutikad koduseadmed);
6. väiksed IT- ja telekommunikatsiooniseadmed (mobiiltelefonid, printerid, mängukonsoolid, monitor-arvutid) (Forti, Vanessa et al., 2018).

Suurimad jäätmetootjad on Aasia (24,9 miljonit tonni-Mt), Ameerika (13,1 Mt) ja Euroopa (12 Mt), kus enim kogutakse ja ümber töötlemisega (42,5%) tegeletakse Euroopas. Kõige rohkem jäätmeid tekib väikeseadmetest (17,4 Mt), suureseadmetest (13,1 Mt) ja soojusvahetusseadmetest (10,8 Mt). Aastaks 2030 on prognoositud ülemaailmse jäätmete hulga kasv kuni 74,7 Mt-ni. Järjest enam jõuab kaasa ka riiklik ja rahvusvaheline seadusandlus, et tulla toime üha enam kasvava jäätme hulga. Siiski seisab kuhjumise taga suurem tarbimine, seadmete lühike eluiga ja vähe võimalusi neid remontida. See kõik on üksnes nähtav osa, sest suur hulk on jäätmeid, mida ei dokumenteerita (Forti et al., 2020).



**Joonis 1.** Dokumenteeritud ja dokumenteerimata e-jäätmete kogus 2019 (Forti et al., 2020)

Elektri- ja elektroonikaseadmetes (*Electrical and Electronic Equipment - EEE*) on kasutusel ol 69 erinevat elementi väärismetallidest (kuld, hõbe, vask, plaatina, pallaadium, ruteenium, roodium, iriidium ja osmium) kriitiliste toormaterjalideni (koobalt, indium, germaanium, vismut ja antimon) ning kergemini kättesaadavad alumiinium ja raud. Põhiosa jäätmetes leiduvatest elementidest on raud, alumiinium ja vask. Lisaks metallidele leidub neid ka palju mittemetalle. Kõikvõimalike materjalide ja nende hulga taaskasutamine on üksnes võimalik kindlates tingimustes ja ka seljuhul on küsitav hetkel kasutuses olevate tehnoloogiate kasutegur (Forti et al., 2020)

## 1.2. E-jäätmete mõju keskkonnale

Suurimad jäätmetootjad 2012 seisuga on Ameerika Ühendriigid, Hiina, Jaapan, Saksamaa ja Venemaa. Tekkinud jäätmed sisaldavad aineid, mis on kahjulikud nii keskkonnale kui inimeste tervisele, kui puudub nõuetekohane käitlemine. Lisaks Tabelis 1 välja toodule kasutatakse elavhõbedat veel näiteks LCD (*liquid-crystal display* e.k. vedelkristall ekraan) ekraanides. Trükkplaatide joodised sisaldavad vaske, pliid, tina ja antimoni. Nende materjalide ja ainete varel käitlemisel on potentsiaalne oht inimese tervisele. BFR-e (*brominated flame retardant*, e.k. broomitud leegiaeglustaja) kasutatakse plastikutes, et vähendada trükkplaatide, kaablite jms tuleohtlikkust. Kõige ebasoodsam keskkonnale ja inimese tervisele on jäätmeid põletada või ladestada prügilatesse. Ladestamine ei säilita ressursse ja põletamine paiskab õhku mürgiseid aure ja gaase. Samuti võib ladestamise tõttu sattuda põhjavette erinevaid toksilisi ühendeid, mis tekitab pinnase, õhu ja vee saasteprobleeme (Kaya, 2016).

**Tabel 1.** Kahjulikud ained elektri- ja elektroonikaseadmetes ning nende jäätmetes (Kaya, 2016)

Ained	E-romudes leidumine	Võimalikud kahjulikud mõjud
Plii (Pb)	Patareid, trükkplaat	Oksendamine, krambid, kooma ja surm
Elavhõbe (Hg)	Luminifoortorud, lülitid	Aju ja maksa kahjustused
Ameriitsium (Am)	Suitsuandur	Radioaktiivne element
Arseen (As)	LED	Nahahaigused, kopsuvähk
Antimon (Sb)	Tulekindel plastik	Kantserogeen
Trükkplaat	Kondensaatorid, trafod	Vähk, mõju immuun- ja närvisüsteemile
Polübroomitud difenüüleeter	Tulekindel plastik	Hormonaalsed mõjud

## 1.3. Trükkplaatide mittemetallilise osa iseloomustus

Peale erinevates trükkplaatides leiduvate metallide esineb nendes veel erinevas koguses töötlemist vajavaid materjale. Vastavalt klassifikatsioonile on nendes plastikuid, klaaskiude, epoksüvaike ja fenoolvaike. Nimetatud vaigud on polümeersed ühendid, mida võib lihtsustatult samuti plastikuteks nimetada. Trükkplaadid võivad sisaldada epoksüvaike, fenoolformaldehüüd vaike (PF), akrüülnitriilbutadienüstireeni (ABS) ja polüvinüülkloriidi

(PVC). Plastikud võivad trükkplaatide mahust moodustada 10%-30%. Trükkplaatide mittemetalliline osa moodustab trükkplaatide massist ligikaudu 70%. Hinnangulist globaalset e-jäätmete kasvutrendi arvestades, ning ligikaudset keskmist trükkplaatide hulka selles, on plastikute osakaal ca 0,63 Mt. Seda on üle 30 korra rohkem kui Eestis aastas e-jäätmeid tekib (Forti et al., 2020). Võimalused e-jäätmeid taaskasutada on kas töödelda ning kasutada uuesti elektroonikatoodetes või täiteainena.

Trükkplaatide väärtus ja hind võivad olla väga erinevad. Tavapäraselt koosnevad trükkplaadid mitmest sünteetilise vaiguga lamineeritud tselluloosi või klaasikiudude kihist. On olemas nt FR-2 kuni FR-6 (*Flame Resistant*) tüüpi trükkplaat, kusjuures FR-2 ja FR-3 on tselluloosil põhinevad trükkplaadid ning neile on lisatud kas fenool- või epoksiidvaiku. FR-4 ja FR-5 tüüpi plaadid sisaldavad tselluloosi asemel klaasikiude ning FR-6 tüüpi plaatides kasutatakse hoopis polüestervaiku. Lisaks on välja töötatud ka trükkplaadid tähistega CEM-1 kuni CEM-8 (*composite epoxy material*) ja G-10 (*glass*) ning G-11. Oma koostiselt on tegemist samalaadsete komposiitidega kui seda on FR-2 jt, kuid CEM ja G komposiidid on uuemad ning rohkem edasi arendatud. G komposiite kasutatakse kallimates valdkondades nagu nt kosmosetehnoloogia.

Levinuimad trükkplaatide tüübid on FR-2, mida kasutatakse odavamas elektroonikas (telerid, raadiod), ja FR-4, mida kasutatakse kallimas elektroonikas (telefonid, sülearvutid). Just oma laialdase kasutuse ning leiduvuse tõttu on teaduslik huvi ning ühiskondlik hüväng nende komposiitide turvaliseks taaskasutamiseks suur. Mitmed uuringud on näidanud, et trükkplaatide massist moodustab ligikaudu 65% klaasikiud, 32% epoksiidvaik, 3% Cu ja <0,1% jootesulamid, milles suurim kontsentratsioon klaasikiude ja Cu on peenemates struktuurides ning epoksiid jämedamas struktuuris (Kumar et al., 2018). Lisaks metallidele ja nende ühenditele, millest mõned on mürgised, leidub trükkplaatide mittemetallilises osas ka mürgiseid või ühel või teisel moel inimesele ja keskkonnale ohtlikke aineid. Põhilised ohtlikud segud trükkplaatides ongi BFR-id (nt tetrabromobisphenüül-A (TBBA)) (Marques et al., 2013). Tulekaitsena kasutatavaid broomiühendid tähistatakse üldnimetusega PBDE (*polybrominated diphenyl ethers* e.k. e.k. polübroomitatud difenüüleeterid).. Need ühendid on inimese tervisele potentsiaalselt ohtlikud, kuid seda pole hetkel veel täielikult tõestatud. Küll aga on loom katsetes tõestatud nende vähki tekitavat toimet (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2017) ja lisaks on järjest enam leitud, et tegemist bioakumuleeruva ainega (Hooper & McDonald, 2000).

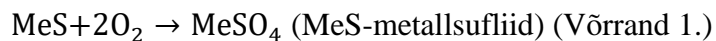
## 1.4. Bioleostamine

### 1.4.1. Bioleostamise liigid

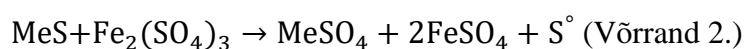
Metallide saamiseks e-romust kasutatakse mitmeid metallurgia meetodeid nagu püro-, hüdrometallurgia, millest kaks esimest on enamlevinud, kuid need on energia- ja toorainemahukad, kallid ning neist tekib mürgiseid gaase nt dioksiinid ja furaanid (Priya & Hait, 2017).

Biometallurgia ehk biohüdrometallurgia on keskkonnasõbralik ja säästlik viis e-romu töötlemiseks. Nimetatud protsessi sünonüümideks on biokaevandamine, bioekstraktsioon, biotaastamine ja bioleostamine, st antud protsessid, milles kasutatakse ära mikroorganismide (bakterid ja seened) võimet muuta tahked ühendid lahustuvateks ja ekstraheeritavateks (Krebs et al., 1997; Thakur & Kumar, 2020). Põhilised bioleostamisega seotud mehhanismid on: atsidolüüs, redoksreaktsioonid ja kompleksi moodustumisega seotud mehhanismid. Esimeses protsessis muudetakse mittelahustuvad metallühendid lahustuvateks ühenditeks; redoksreaktsioonides osalevad tavaliselt rauda (Fe) ja väävlit (S) oksüdeerivad bakterid, kes soodustavad nt Fe<sup>2+</sup>-ioonide oksüdeerumist Fe<sup>3+</sup>-ioonideks; viimases mehhanismis viivad mikroorganismid, Fe ionide juuresolekul, läbi kelaatumise moodustades seeläbi metallide kompleksühendeid (Brandl et al., 2001; Li et al., 2021; Priya & Hait, 2017).

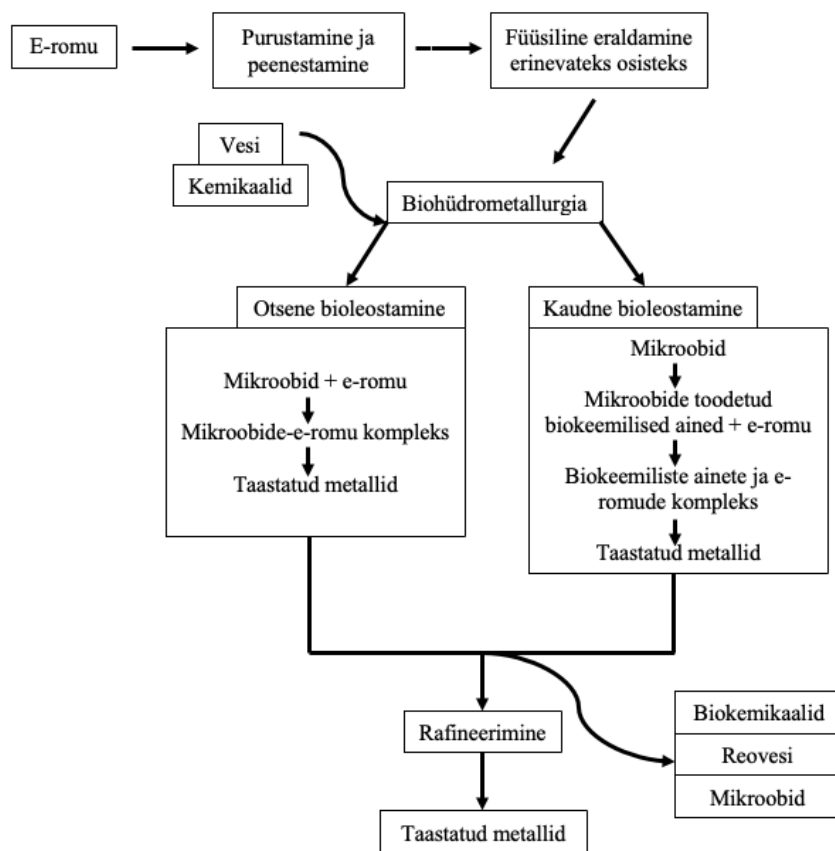
Üldiselt saab jagada bioleostamise liigid kaheks: otsene ja kaudne. Sellel teemal on teadlaste seas palju ebakõla ning lihtsalt ebatäpsusi, kuid neid kahte peetakse bioloogiliselt domineerivaks. Otsese bakteriaalse bioleostamise puhul peab bakteril olema otsene kontakt sulfiidse mineraaliga.



Võrrand 1 näitab, kuidas bakterite juuresolekul otsene bioleostamine välja näeb. Bakter ei kinnitu kogu mineraali pinnale, vaid kindlatele kristalli defektsele saitidele ja metalli lahustumine toimub elektrokeemilise interaktsiooni vahendusel. Kaudse bioleostamise puhul ollakse rohkem üksmeelel. Seda näitab Võrrand 2.



Antud mehhanismis pole otsene kontakt vajalik. Bakteri tekitatud liksiviandis oksüdeeridakse sulfiidne mineraal. Antud happe lahuses on liksiviant  $Fe^{3+}$  ioon (Bosecker, 1997; Rawlings, 2002; Sand et al., 2001).



**Joonis 2.** Hüdrometallurgia abil e-romust metalli saamine skemaatiline esitus (Priya & Hait, 2017)

#### 1.4.2. Bioleostamise eesmärgid ja keskkonnamõju

Ennekõike on antud valdkonna arendamise eesmärgiks pakkuda hetkel kasutuses olevatele tehnoloogiatele odavamat ja keskkonnasõbralikumat alternatiivi. Samuti on biometallurgial ka oma kitsaskohad nagu spetsialistide puudus ja tootmise madal kvantiteet. Suuremas plaanis on taaskasutamise eesmärk säästa loodusressursse, vähendada keskkonnareostust ja leevendada e-jäätmete toksilisuse ohtu ja bioakumulatsiooni (Priya & Hait, 2017). See kõik sõltub riikidest ja nende vahelistest koostöödest, kus kõige selle elluviimiseks ja toimimiseks on vaja seadusandlust.

Teisalt on vaja luua biometallurgia suuremaks arendamiseks peale soodsa poliitilise keskkonna ka vastavaid looduslikke tingimusi. Bioleostamist saab rakendada kohtades, kus püro- ja

hüdrometallurgiast on vähe kasu. See on sobilik madala kvaliteediga maakidest või e-jäätmetest metallide eraldamiseks ning mürgiste metallide eemaldamiseks (Pollmann et al., 2018). Biometallurgiline leostamine sõltub paljuski mikroorganismide efektiivsusest ja maagi keemilisest ning mineraloogilisest koostisest (Bosecker, 1997). Selleks on vastavate mikroorganismide elutegevuseks vajalik kontsentratsioon, hapniku ja C-allika olemasolu, pH tase, temperatuur.

Keskkondlikust vaatenurgast on biometallurgial mitmeid eeliseid. Biometallurgiliste protsesside käigus tekib vähem mürgiseid ühendeid, nendel protsessidel on madal energiakulu, materjali kadu on väike, protsessid on majanduslikult säästlikud, toimub potentsiaalne selektiivne metallide eraldamine madalal temperatuuril. Peab aga ära märkima ka biometallurgiliste protsesside puudused. Antud tehnoloogiat on teaduslikult vähem uuritud, see on ajamahukas, puuduvad piisava väljaõppega inimesed, mikroorganismid võivad olla tundlikud toksiinide suhtes (Bosecker, 1997; Pollmann et al., 2018; Priya & Hait, 2017; Thakur & Kumar, 2020).

## **1.5. Mikroorganismid bioleostamises**

Juba mainitud bakterite ja seente kõrval on ka arhesid ja pärme, kes on võimelised tootma leostavaid liksiviante metallide eraldamiseks. Bakterid ja seened toodavad orgaanilisi happeid ja teisi kelaativaid metaboolseid aineid (Bosecker, 1997). Kolm põhilist mikroorganismide gruppi bioleostamises on: autotroofsed bakterid, heterotroofsed bakterid ja heterotroofsed seened (Wu & Ting, 2006). Mitmete mikroorganismide seas on leitud, et kõige eelistatumad ja aktiivsemad bioleostamiseks on perekond *Acidithiobacillus* (varasemalt *Thiobacillus*) (Sonawane & Gupta, 2021). Need on Gram-negatiivsed spoore mittemoodustavad pulkbakterid, kellele sobib aeroobne keskkond (Bosecker, 1997).

### **1.5.1. Kemolitotroofsed mikroorganismid**

Tegemist on üsna aktiivsete bioleostamises osalevate organismidega, mis on sobilikud mitmete rohkem ja vähem väärtuslike metallide eraldamiseks. Kemolitotroofid on üksnes prokarüootsed organismid nagu bakterid ja arhed ning enamik neist on autotroofid (Amils, 2011). Kemolitotroofid saab jagada autotroofseteks ja heterotroofseteks.

### 1.5.2. Kemolitoautotroofsed bakterid

Süsinikuaallikana kasutavad nad atmosfääris leiduvat CO<sub>2</sub>, mistõttu on neil vajadus üksnes anorgaaniliste ühendite järele. Põhilised esindajad kemolitoautotroofsete bakterite seas on *Acidithiobacillus* spp., *Leptospirillum* spp., *Sulfobacillus* spp., *Ferrimicrobium* spp. Need bakterid kasutavad Fe<sup>2+</sup> ioone ja/või redutseeritud väävliühendeid elektroni doonorina tootes väävelhapet (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ja Fe<sup>3+</sup> ioone. Nad on atsidoofiilsed ja kasvavad pH vahemikus 1,5-2,0.

Tuntumad atsidoofiilsed bakterid on *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* ja *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *A. ferrooxidans* ja *A. ferrooxidans* abil on suudetud e-romu kontsentratsioonil 5-10 g L<sup>-1</sup> leostada enam kui 90% saadaolevast vasest (Cu), tsingist (Zn), niklist (Ni) ja alumiiniumist (Al) (Bosecker, 1997; Brandl et al., 2001; Li et al., 2021; Pollmann et al., 2018; Priya & Hait, 2017).

Üheks efektiivseks bioleostavaks liigiks on *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Keskkonnatingimustest on neile sobilik temperatuur 28°C ning pH vahemik 1,5-2,5. Need bakterid erinevad teistest samalaadsetest, sest peale redutseeritud väävliühendi oksüdeerimisest saadava energia on ta võimeline kasutama Fe<sup>2+</sup> ioone elektroni doonorina. Põhilise anorgaanilise happena toodavad nad väävelhapet (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Nad eraldavad n atsidoofiilid, mis tähendab elutsemist äärmiselt happelistes keskkondades; samuti on nad ühed põhilistest väävli oksüdeerivatest bakteritest. Teine sarnane liik on *Acidithiobacillus thiooxidans*. Need bakterid on võimelised elama happelises keskkonnas säilitades enda rakusisese neutraalse pH taseme tänu erinevatele tasakaalu-mehhanismidele nagu nt suur H<sup>+</sup> ionide läbilaskevõime (Bosecker, 1997; Sonawane & Gupta, 2021; Tu et al., 2017).

Hindamiseks mikroorganismide tegevust on vaja kindlaid kriteeriume. Tuleb luua optimaalsed katsetingimused hindamiseks bakterite võimekust leostada erinevaid mineraale ja e-romu koostisosi. Kui bakterite elutegevusks vajalikud eeldused on loodud, saab valmistada bioreaktori, kus segatakse omavahel bakterikultuur ja madala väärtusega maak või e-romu peenestatud mass. Bioreaktorissaab jälgida erinevate näitajate (pH, leostunud metallid, eraldunud gaasid, redokspotentsiaali jms) muutust ajas ning seejärel analüüsida bakterite leostamispotentsiaali.

### 1.5.3. Heterotroofsed mikroorganismid

Neil seentel ja bakteritel on eraldi vaja orgaanilist energiaallikat, mida nad passiivselt omandada ei saa. Samuti võivad neil, sarnaselt autotroofidele, olla head metalle leostavad omadused. Nad toodavad ja eraldavad erinevaid metaboliite nagu orgaanilisi happeid (nt piimhape, oksaalhape, sidrunhape) või kelaativaid ühendeid, mis on võimelised lahustama metalle. Need organismid leostamisprotsessist ise kasu ei saa. Perekonnad *Bacillus* ja *Pseudomonas* esindajad on võimelised mitte-sulfiidsest allikast eraldama metalle, kus puudub neile kasulik energiaallikas. Peale bakterite on ka teatud seened väga edukad metallide leostamises ning teatud juhtudel isegi suurema kasuteguriga kui bakterid. Tähtsamatel liikidel *Aspergillus niger* ja *Pseudomonas simplicissium* on näidatud alumiiniumi (Al), nikli (Ni), plii (Pb) ja tsingi (Zn) kuni 95% lahustumist 100g/L e-romu kohta (Bosecker, 1997; Pollmann et al., 2018; Priya & Hait, 2017; Thakur & Kumar, 2020; Brandl et al., 2001).

Väärismetallide eraldamisel on kohati edukamad tsüanogeensed bakterid, kes toodavad tsüaniidi. Tuntumad on nt *Chromobacterium violaceum* ja *Pseudomonas aeruginosa*. On leitud et need liigid on kulla (Au) kättesaamisel e-romust kõige efektiivsemad (Vakilchap et al., 2020). On uuritud ja leitud, et *C. violaceum* eraldab oma varases statsionaarses faasis kahte produkti, millest üks on  $CN^-$  ioonid ja teine dissotsieerumata HCN (tsüaniidhape), kus tsüaniidi hüdrolüüs sõltub pH tasemest (Li et al., 2020). Samuti on neil bakteritel kindlad biotilised ja abiotilised faktorid, mis mõjutavad nende leostamise efektiivsust. Kohati võib takistuseks olla mingi metalli (nt vase või raua) suur kontsentratsioon, mis ei lase teisi metalle (nt kulda) eraldada. Seetõttu on teatud puhkudel tulemuslikum kasutada kahte või enamat bakteri liiki.

## 1.6. Mikroorganismid elektroonikaromu töötlemisel

Kõige väärtuslikumaks e-romu komponendiks peetakse trükkplaate, mis moodustavad ca 3-5% e-romu kogumassist. Võttes arvesse Globaalne E-jäätmete Monitooring raportit (Forti et al., 2020), milles on märgitud, et aastaks 2030 kasvab e-jäätmete kogus ca 75 Mt ühes aastas ja sellest ca 3-5% moodustavad trükkplaadid, siis on nende hinnanguline aastane kogus 2-3,75 Mt. Trükkplaadid sisaldavad erinevaid metalle, mittemetalle ja mõnda toksilist ainet. Trükkplaatides sisalduvaid metalle võib olla kuni 30%, millest esikohal on vask. Trükkplaadid on väärtuslik metallide allikas, sest nendes on väärtuslikke metalle tunduvalt rohkem kui samas koguses rikastes maakides. Näiteks üks tonn kasutatud mobiiltelefone sisaldab ca 340g kulda, samas kui väärtuslikumad kullamaagid sisaldavad parimal juhul ühe tonni kohta 10-15g kulda (Heller, 2022; Vats & Singh, 2015).

Teisalt on vajalik ka töötlusse suunata MMO (mittemetalliline osa), milles leidub erinevaid sünteetilisi komposiite. Selle lagundamine nii füüsikaliste kui keemiliste meetoditega on teadlastele suur väljakutse, et teha seda loodushoidlikult ning odavalt. Selle protsessi eesmärk on taaskasutada materjale, mis muul juhul kuhjuks prügina, ning leida mikrobioloogilisi viise toksiliste ainete turvaliseks töötlemiseks (Jiang et al., 2012; Kaya, 2016; Zhou & Qiu, 2010).

#### 1.6.1. Metallide leostamine e-romust

Sonawane ja Gupta (2021) uurisid, kuidas kasutuselt kõrvaldatud mobiiltelefonide trükkplaatidest kemolitotroofsete bakterite abil metalle eraldada. Pulbristatud trükkplaatide leostamiseks kasutati liike *Acidithiobacillus ferrooxidans* ja *Acidithiobacillus thiooxidans*, mille puhaskultuure lisati 10% reaktoris oleva suspensiooni kogumassist. Pulbristatud trükkplaatide lisati vastavalt 0,5%, 1,0%, 1,5% ja 2,0% suspensiooni massist. Mikroorganisme kultiveeriti 500 mL Erlenmeyeri kolvis, mida inkubeeriti 28°C juures loksutis 120 pööret minutis (rpm *revolutions per minute*). Perioodiliselt mõõdeti pH taset ja leostunud metallide sisaldust analüüsiti 10 päevase inkubatsiooniperioodi möödudes. Metallid eraldusid trükkplaatide suspensiooni kõigi kontsentratsioonide puhul, kuid e-romu kontsentratsiooni kasvades vähenes ka metallide eraldumine. Seda seostati trükkplaatide suspensiooni aluseliste omadustega, sest aja jooksul pH tase tõusis ning bakterid muutusid inaktiivsemaks.

Benzal jt (2021) proovisid kalkopüriidist ( $\text{CuFeS}_2$ ) erinevate bakterikultuuride kooslusega eraldada vaske. Kasutati kahte erineva kontsentratsiooniga maaki, milles oli vastavalt rohkem (47 mg/L) ja vähem (1 mg/L) vaske. Katse viidi läbi 500 mL Erlenmeyeri kolvis, milles oli 100 mL mineraalsöödet, 10 g kalkopüriiti ja 100 mL bakterikultuuri tihedusega  $8.75 \cdot 10^6$  rakku/mL. Tühikatse teostati ilma bakterikultuuri lisamata. Kolbe inkubeeriti loksutil temperatuuril 28°C ja 120 rpm. Vask eraldus mõlema kontsentratsiooniga maagist ning nii leostavate bakterite olemasolul kui ka ilma. Autorid rõhutavad suurema konsentrasiooniga maagi paremat leostamist bakterite juuresolekul. Madala kontsentratsiooniga maagi puhul pakuti välja, et mõlemal puhul toimus pigem keemiline leostumine; tekitatud katsekeskkonnas ei saanud bakterid elutseda.

#### 1.6.2. Trükkplaatide töötlemine

Trükkplaatide töötlemisviisid saab üldiselt jagada füüsikalisteks ja keemilisteks ja need valitakse vastavalt plastiku tüübile. Pealtnäha on füüsikalised töötlemisviisid võivad

tunduda suhteliselt lihtsad, vähese energiakuluga ja odavad, kuid trükkplaadid võivad olla keeruka koostisega ning ka toksilised.

Varasemalt on eriarvamusel olnud trükkplaatide MMO materjalide otstarbeka kasutuse osas, kus üks pool kasutaks neid termoplastikute tootmises ning teised hoopis täiteainena epoksüvaike sisaldavates toodetes nagu värvid, liimid ning erinevad ehitusmaterjalid. Siiski ollakse üksmeelel antud materjali töötlemise vajalikkuses, et see ei kuhjuks prügilates. Polüpropüleen on enimlevinud tarbeplastik ning seda leidub laialdaselt nii pakendites kui ka autotööstuses. Seda on odav ja lihtne töödelda, kuid samas pole see eriti vastupidav. Lisades trükkplaatidest pärit MMO koostisosi saab muuta polüpropüleeni vastupidavamaks. Fenoolsetes vormimissegudes (PMC- *phenolic molding compound*) kasutatakse täiteainena puidutolmu, kuid trükkplaatidest saadud täiteaine saaks asendada suurt nõudlust puidu järele. Antud vormimissegu kasutatakse paljudes elektroonsetes köögimasinates. Samuti saab trükkplaatidest saadud materjale lisada ehitusmaterjalidele, kusjuures nad on tsemendist ja liivast kergemad ning annavad potentsiaalselt kindlama mehhaanilise tugevuse konstruktsioonile (Marques et al., 2013).

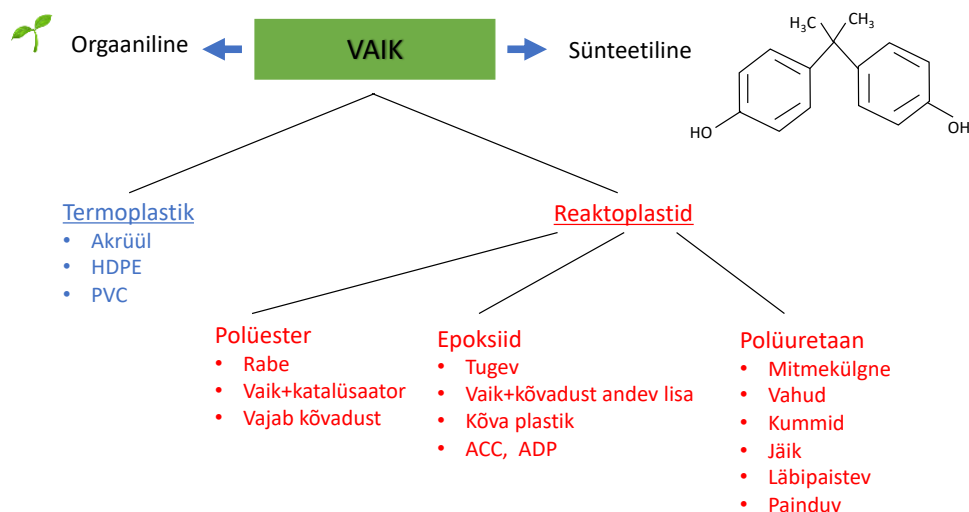
Keemilise töötlemise eelis füüsilise ees on võimalus aineid efektiivsemalt kasutada ning vähendada ohtlike ja toksiliste ühendite hulka. Eesmärk seda töötlemisviisi rohkem uurida on majanduslikult potentsiaalne, leidmaks odavamaid mooduseid selle teostamiseks. Pürolüüsi teel tekib sünteetilisest polümeeridest gaase, õlisid ja erinevad söed, mida saab kasutada keemiliste lähteainetena või toormaterjaliks kütustele. Gaasistamise abil on näidatud dioksiinide vähendamist keskkonnas, mis tähendab BFR ohutumalt töötlemist.

Lisaks on neile leidub veel mikrobioloogiline töötlemise viis, kuid seda pole veel tööstuslikule tasemele viidud. On tehtud erinevaid katseid mikroorganismidega nii metallilise kui MMO eraldamisel. Metallide eraldamine on näidanud edusamme ning samuti ka MMO töötlemisel on edukalt suudetud seda lagundada. On tehtud katseid trükkplaatide MMO leiduvate epoksü- ja fenoolvaikudega, uurimaks mikroorganismide võimet neid lagundada. Siiski on see hetkel kõik veel eksperimentaalses järgus (Eliaz et al., 2018; Faiza et al., 2021; Marques et al., 2013; Otsuki et al., 2019).

### 1.6.3. Plastikud ja vaigud

Vaik on viskoosne või tahke suure molekulmassiga aine. Eristatakse orgaanilisi (puiduvaik, merevaik) ja sünteetilisi (epoksüvaikvaik, PVC) vaike. Sünteetilistel vaikudel on palju kasutusalasid ning allpool (Joonis 3) näeb ka erinevate sünteetiliste vaikude jaotust. Neid vaike saab kasutada ehituses, kunstis, meditsiinis ehk nende kasutusala on äärmiselt lai. Sünteetilised vaigud jaotuvad lihtsustatult termoplastideks (*thermoplastic*) ja reaktoplastideks (*thermosetting*) või termovaikudeks (*thermoset resin*), millest viimaseid nende omaduste tõttu on keeruline töödelda. Termoplaste saab uuesti kuumutada, sest nende kuumutamisel keemiline koostis ei muutu. Reaktoplastide kuumutamisel pärast nende tardumist toimub hoopis lagunemine ja seega ei saa neid uuesti vormida.

Leidub erinevaid sünteetilisi vaike, millest igaühel on oma spetsiifilised omadused ja kasutusala. Mõned levinumad tüübid on epoksüvaigud, polüestervaigud ja polüüretaanvaigud. Epoksiidvaigud on tuntud oma suure tugevuse ja keemilise vastupidavuse poolest, mistõttu sobivad need kasutamiseks liimide ja komposiitide valmistamisel. Polüestervaigud on seevastu plastilisemad ja neid kasutatakse sageli klaaskiuga tugevdatud plastide valmistamisel. Polüüretaan on mitmekülgne materjal, mida kasutatakse paljudes rakendustes, sealhulgas vahtplastist isolatsioonis, polsterduses, liimides ja kattekihtides, sest neil on hea vastupidavus abiootilistele faktoritele ning nad on läbipaistvad.

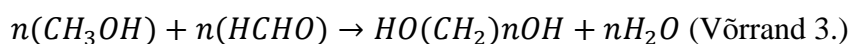


**Joonis 3.** Sünteetiliste vaikude jaotus ning olulisemad reaktoplastid

FR-2 ja FR-4 puhul kasutatavad reaktoplastid on fenoolformaldehüüdvaik ja epoksüvaik. Fenoolvaik saadakse fenooli kondenseerumisel aldehüüdiga, tavaliselt formaldehüüdiga.

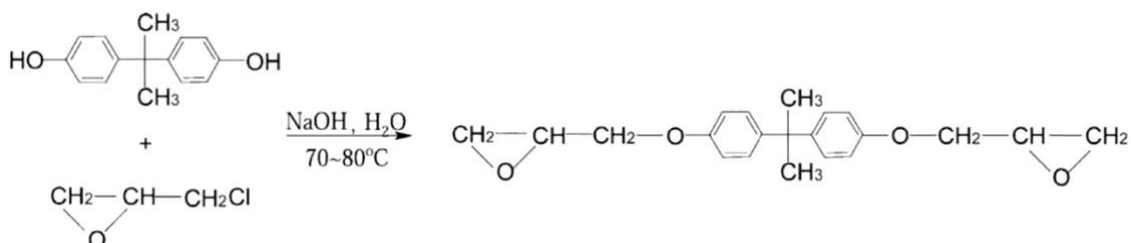
Epoksüvaik moodustub epoksüvaigu monomeeride ja kõvendi vahelisel reaktsioonil. Fenoolvaikudel on kolmemõõtmeline võrkstruktuur fenoolse karkassi ja metüleensildadega. Epoksüvaikudel on seevastu lineaarne või hargnenud struktuur, mille polümeeriahelas on reaktiivsed epoksiidrühmad. Nii fenool- kui ka epoksüvaikudest saab valmistada BFR-i, et parandada nende tulekindlust. Pidevalt uuritakse ja kontrollitakse teatud BFR-e mõju tervisele ja keskkonnale.

Fenoolvaigu moodustumise keemiline reaktsioon nähtub võrrandis 3.



Epoksüvaigu süntees hõlmab järgmisi samme:

1. Epoksümonomeeri valmistamine: Epiklorohüdrin ja bisfenool A (2,2-bis[4-hüdroksüfenüül]propan) reageerivad koos kontrollitud tingimustes, moodustades bisfenool A diglütüüleetri. See reaktsioon hõlmab epiklorohüdrini klooriaatomite asendamist epoksürühmadega.
2. Polümerisatsioon: Seejärel polümeriseeritakse epoksümonomeer kasutades kõvendit. Kõvendi reageerib epoksürühmadega, mille tulemusena moodustub ristseotud võrkstruktuur. Seda protsessi nimetatakse epoksükõvastumiseks või ristsidumiseks (Hesse, 2000; Sukanto et al., 2021).



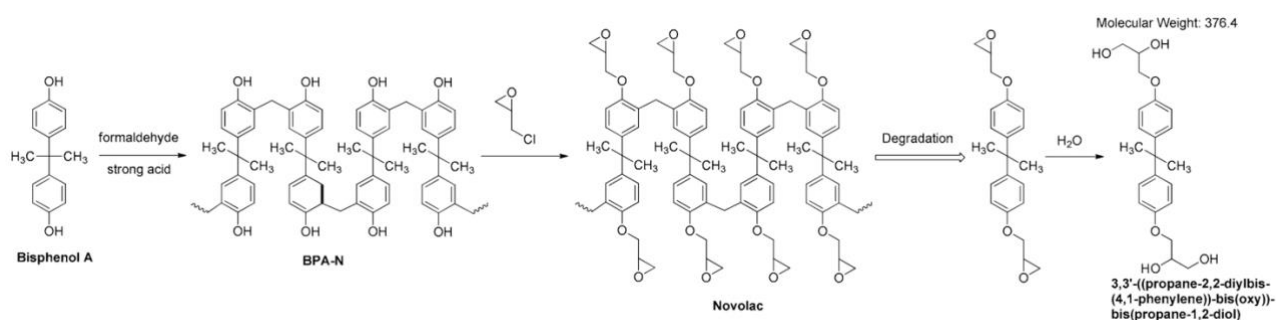
**Joonis 4.** DGEBA moodustumine bisfenool A-st ja epiklorohüdrinist (Sukanto et al., 2021)

#### 1.6.4. Vaikude lagundamine

Termoplaste on võimalik taaskasutada, kuid termovaike on keeruline ning nad pole ka otseselt biolagunevad. Palju on uuritud ja ka teada abiootiliste faktorite kohta ning kuidas need mõjutavad reaktoplastide lagunemist. Tunduvalt vähem on teada just looduslikult leiduvate mikroorganismide mõju kohta vaikude lagunemisele.

(Breister et al., 2020) uurisid mulla mikrobioomi mõju vinüülestervaiikude lagundamisel. Vaadati kas ja kui palju muutuvad polümeerse komposiidi omadused. Põhilised neli suurt

bakterite seltsi olid: *Chloroflexi* (*Chloroflexota*), *Chlorobi* (*Chlorobiota*), *Deltaproteobacteria* (*Myxococcota*) ja (*Candidate Phyla Radiation*) CPR/*Patescibacteria*. Neid leidis polümeerse komposiidi lagunemisel enim. Täpsemalt täheldati neid akrülaadi lagundamisel, kuid ka estrite ja bisfenool A juures, kuid tunduvalt vähem. Katse tulemusena vähenes komposiidi struktuuriline terviklikkus. Varasemate eksperimentide tulemused on olulised, kuid antud üksikute organismide ja valgupõhiste uuringute põhjal ei saa üldistada keerukamate looduslike mikroobikoosluste mõju polümeersetele komposiitidele (Breister et al., 2020). Antud teadustöö on oluline, kuna võttis arvesse reaalses keskkonnas, milles need metaboolsed protsessid toimuvad ning autorid püüdsid neid jäljendada.



**Joonis 5.** Novalaci moodustumine Bisfenool A-st ja Novalaci lagunemine bakterite abil (Eliaz et al., 2018)

Bakterite abil on õnnestunud lagundada ka epoksüvaike. Kahe liigi, *Rhodococcus rhodochrous* ja *Ochrobactrum anthropi*, abil näidati nende mikroorganismide võimet kasutada epoksüvaiku süsiniku allikana. Üleval (Joonis 5) nähtub mikroobide abil Novalaci lagunemine, millest valmistatakse epoksüvaiku. Epoksüvaikudele ka keskkonnasõbralikumaid alternatiive, milles epoksüvaikudele on lisatud jäikuse andmiseks kalasoomuseid, mis ei jää alla tehismaterjalidele. Niisugust materjali on ka lihtsam lagundada nt erinevates taimedes leiduvate ensüümidega. Ühes teises uuringus täheldati samuti, et bisfenool A, mille monomeerist valmistatakse plastikuid ja epoksüvaike, on potentsiaalne kemikaal, mida bakterid vähesel määral lagundavad. Sellegipoolest on see mikroorganismide abil töötlemiseks keeruline ühend (Eliaz et al., 2018; Faiza et al., 2021; Im & Löffler, 2016).

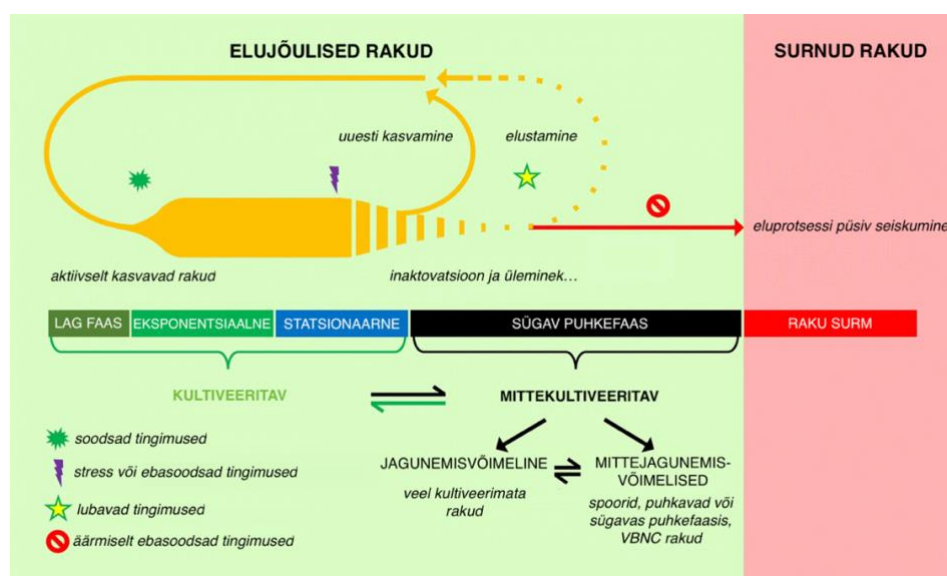
## 1.7. Eluvõimelised mittekultiveeritavad bakterid

Mitmed tööd ja uuringud on näidanud, kuidas mikroorganismide abil on võimalik üha kasvavat e-jäätmete kogust töödelda ja taaskasutada. Mitmetel ekstreemsemates tingimustes eluvõimelistel mikroorganismidel on potentsiaali lagundamiseks erinevaid, sh e-jäätmetes leiduvaid materjale. Hinnanguliselt on avastamata veel 99% mikroorganismidest ja

teadaolevatest saab kultiveerida üksnes väheseid. Mistõttu on vajalik uurida neid perekondi ja liike, keda potentsiaalselt saab kasutada taaskasutamiseks mõeldud materjalide töötlemisel. Olemasoleva tehnika ja meetoditega on siiski võimalik uurida ning saada uut informatsiooni elujõuliste mittekultiveeritavate bakterite (*viable but nonculturable*-VBNC) kohta. Kasutades oskusi ja teadmisi geneetika erinevatest valdkondadest on lootust kultiveerida ja arendada uusi baktereid, kes võimelised tootma uutmoodi ensüüme ja metaboliite, millest oleks kasu keskkonna reostusega tometulekuks (Bodor et al., 2020).

VBNC bakterid on eluvõimelised, kuid neid ei saa kasvatada tavapärase söötmete ja tingimustega. Allpool (Joonis 6) on näha rakkude erinevaid olekuid soodsast seisundist kuni surnud rakkudeni. VBNC rakkudel on säilinud raku terviklikkus ja neil on alles genoomne või plasmiidne DNA. Sellisesse olekusse sunnivad baktereid keskkonnategurid nagu äärmuslikud temperatuurid, toiteainete puudus, pH muutused, osmootne stress, kokkupuude raskemetallidega. VBNC rakkudel on metaboolsed ja morfoloogilised tunnused, kuid neist üksi on vähe eristamaks neid muudest.

Maailmas on kindlaks määratud ligikaudu 100 bakterite liiki kes on võimelised minema VBNC seisundisse (Progulske-Fox et al., 2022). Neid on uuritud 40 aasta jooksul, kui esimesena (Xu et al., 1982) Rita R. Colwelli laboris uuriti *E. coli* ja *Vibrio cholerae* rakke, mis läksid tagasipööramatusse olekusse, kuid säilitasid oma elujõulisuse. See erineb teistlaadi olukordadest nagu nt sporulatsioon ja puhkeseisund. Põhiline erinevus VBNC ja kahe viimasel vahel on metaboolne aktiivsus, mis kahel viimasel puudub või on allpool avastamispiiri (*limit of detection – LOD*) (Pinto et al., 2015).



**Joonis 6.** Skemaatiline diagramm bakteriraku erinevatest olekutest ja üleminekutest (Bodor et al. 2020)

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärk

Töö eesmärk oli leida, missugused mikroorganismid osalevad elektroonikaromu lagundamisel reaktoris, tuginedes metagenoomilistele meetoditele. Sealhulgas kontrollida, kas koosluses on säilinud inokulumis EEUTARGCON5 sisalduvaid liike.

### 2.2. Materjalid ja meetodid

Antud osa jaguneb kolmeks a) reaktori katse (seda tegevust ei viinud läbi autor, kuid see on aktuaalne antud töös), b) biomassist DNA eraldamine ning sobilike proovide väljavahimine ja c) bioinformaatiline analüüs.

Antud lõputöös kasutati kahe 20 L reaktoris tehtud pilootkatse analüüsi tulemusi, mis nimetati vastavalt katse 200 ja 234.

#### 2.2.1. Reaktorikatse

#### Ekspirimendi plaan reaktorile

**Tabel 2.** Ekspirimendi plaan reaktorile

Reaktiivid	Konts. reakts. segus	Lisatud kogus	Vesi
E-romu	1%	150 g	
R2A	3 g/l	2×22,5 g = 45 g	2x250 ml
Betaiin	1,35 g/l	20,25 g	400
NaHCO <sub>3</sub>	2,52 g/l	37,8 g	
L-tsüsteiin	0,45 g/l	6,75 g	150
Na <sub>2</sub> S	0,225 g/l	3,375 g	150
inokulum	10%	1500 ml	
Vesi		Loputamiseks	100 ml
Vesi reaktorisse*		12200 ml	

\* Vee kogus arvutatakse valemi järgi: 15000 ml – R2A vesi – Betaiin/sooda vesi – L-tsüsteiini vesi - Na<sub>2</sub>S vesi – loputusvesi – Innoculum = 15000-500-400-150-150-100-150 = 12200 ml

1. Katse viidi läbi 20 L reaktoris, reaktsiooni ruumala 15 L. Reaktor oli puhastatud ja loputatud deioniseeritud veega. Reaktori servale kanti õhuke silikoonhermeetiku kiht ja

paigaldati kummitihend. Kummitihendi ühtlaseks liimimiseks oli kaas suletud ja fikseeritud mutritega.

2. Söötme komponientide valmistamiseks kasutati kokku 1300 ml deioniseeritud vett.
  - kahte 500-ml pudelisse valati 250 ml vett ja lisati 22,5 g R2A. Loksutati aine lahustumiseni ja viidi autoklaavimiseks (121 °C, 1 bar). Autoklaavitud R2A lahus hoiti inkubaatoris 37 °C juures.
  - 500-ml pudel sildistati „Betain + NaHCO<sub>3</sub>“, pudelisse valati 500 ml vett, suleti keeratava korgiga ja pandi inkubaatorisse t = 37 °C juurde.
  - 250-ml pudel sildistati „Tsüsteiin“, pudelisse valati 150 ml vett, suleti keerava korgiga ja pandi inkubaatorisse t = 37 °C juurde.
  - 250-ml pudel sildistati „Na<sub>2</sub>S“, pudelisse valati 150 ml vett, suleti keerava korgiga ja pandi inkubaatorisse t = 37 °C

*Vaja läks kolm 500-ml pudelit ja kaks 250-ml pudelit. Pudelid paigutati inkubaatorisse u 1 tund enne katse alustamist.*

3. Töö teostati kummikinnastes ja näomaskiga. Osales vähemalt kaks operaatorit.
  - Reaktori kaas avati ja varustati mehhaanilise seguriga. Reaktori sisepind desinfitseeriti 70% etanooli lahusega niisutatud salvrätikuga.
  - Alumise kraani toru suleti 70% etanooliga desinfitseeritud korgiga.
  - Kummitihendi peale kanti õhuke silikoonhermeetiku kiht.
  - Reaktori kaas desinfitseeriti 70% etanooli lahusega ja paigaldati kohale. Kaas fikseeriti mutritega.
  - Mehhaaniline ühendati mootoriga.
  - Temperatuuri anduri toru desinfitseeriti 70% etanooliga ja paigutati oma kohale.
  - Vedeliku proovivõtutoru desinfitseeriti 70% etanooliga ja paigutati oma kohale.
  - Gaasi proovivõtukraan desinfitseeriti 70% etanooliga ja paigutati oma kohale.
  - Lehtri abil valati reaktorisse 13,7 L deioniseeritud vett.
  - Ainete lisamise ava (port) suleti korgiga.
  - pH-meeter kalibreeriti vastavalt juhendile ja paigutati oma kohale.
  - Temperatuuriandur asetati oma torusse.
  - Parafilmiga kinnitati temperatuuri anduri / klaasi vahemik ning anduri vahel tilk vett.
  - Juhtmoodul käivitati vastavalt juhendile.

- Süstlaga ühendatud õhupall täideti argooniga või õhuga. (Palli õhuga täitmiseks ärge puhuge suuga, kasutage õlivaba pumpa!) Õhupall ühendati gaasiproovi kraaniga.
  - Segaja käivitati ja vesi reaktoris soojendati 37 °C-ni (üleöö). Parameetrid fikseeriti arvutis. Reaktori hermeetilisus hinnati õhupalli suuruse järgi.
4. Söötme komponendid laaditi reaktorisse vastava kaela kaudu.
1. Argooni ballooni reduktoriga reguleeriti sobiv gaasi voolu kiirus ja ühendati reaktoriga. **Argooni väljalaskmiseks laadimisava peab olema lahti. Vastasel juhul võib reaktorisse tekkida ohtlik ülerõhk!**
  2. Lisati soe R2A lahus
  3. Kaalutud betaiin ja sooda lahustati soojas vees vastavas pudelis ja lisati reaktorisse
  4. Lisati kaalutud elektroonikaromu
    - Lisati inokulum
    - Kaalutud tsüsteiin ja Na<sub>2</sub>S lahustati soojas vees vastavates pudelites ja lisati reaktorisse. Na<sub>2</sub>S lisati reaktorisse viimasena, et vältida H<sub>2</sub>S eraldumist ruumiõhku
    - Segaja kiirus 150-180 rpm

Reaktiivide lisamise ajaks arvestati 10-15 minutit, selle aja jooksul pidi reaktoris saavutama õhuvaba keskkond. Kui kogu lisamine oli kiirem kui 10 minutit, võis oodata tsüsteiini ja Na<sub>2</sub>S lisamisega, et reaktor oleks argooniga korralikult läbi puhutud.

Peale tsüsteiini ja Na<sub>2</sub>S lisamist oli reaktor hermeetiliselt suletud ja katse loeti alustatuks.

5. Reaktorist võeti null-proov (gaasiproov, 15 ml vedeliku juhtivuse mõõtmiseks, 1 ml ICP analüüsi jaoks). Algproovist ja lõpp-proovist võeti 4 ml biomassi ja vedelfaasi analüüsiks.

Kahe nädala jooksul proovid võeti kord päevas. Järgmise kahe nädala jooksul võeti proovid iga 3 päeva tagant.

Reaktoris jälgiti rõhku ja eraldunud gaasi kogust vastava anduri abil, mis oli ühendatud vooliku abil gaasivõtupordiga. Gaasiproovi võtmiseks voolik suleti klambriga, kraan keerati kinni ja voolik ühendati lahti. Gaasi proov võeti väikese pudeliga (50 ml). Voolik ühendati tagasi, kraan keerati lahti ja klamber eemaldati.

Bakterite arvukust jälgiti heterotroofsete fakultatiivsete anaeroobide väljakülvide abil. Vedeliku proov võeti süstlaga, 1 ml valati ICP eppendorfi, 4 ml steriilsesse falkonisse väljakülvide jaoks ja 14-15 ml juhtivuse mõõtmiseks falkonisse.

Kokku planeeriti kasutada kuni 18 gaasipudeli, happega pestud Eppendorfe ja Falcone.  
Gaasi proovide üldkogus 18 x 50 ml ~900 ml, vedeliku proovide ruumala 18 x 15 = 270 ml.

### Katse 234

Reaktiivide lisamine 29.06.2021

Argooni vool ühendati reaktorisse 10:05.

R2A lisatud 10:07

Betaiin/sooda 10:08

Romu + inokulum 10:14

Tsüsteiin + Na<sub>2</sub>S 10:18

Null proovi võeti kell 10:27

Vee ruumala arvutamisel jäi arvestamata Innoculum. Reaalne reaktsioonisegu ruumala 16500 ml.

		Tegelik		
	Kaalutud	konts	Peaks olema	Juurde lisada
<u>El Romu</u>	150	0,91	1%	15 g
R2A	45	2,73	3 g/L	4,5 g
Betaiin	20,25	1,23	1,35 g/L	2,03 g
NaHCO <sub>3</sub>	37,8	2,29	2,52 g/L	3,78 g
L-tsüsteiin	6,75	0,41	0,45 g/L	0,68 g
Na <sub>2</sub> S	3,35	0,20	0,225 g/L	0,36 g
<i>Innoculum</i>	1500	9,1	10%	

Otsustati reaktori mitte avada ja jätkata eksperimendi olemasolevate kontsentratsioonidega.

### Reaktorikatse

Reaktorikatse jaoks oli vaja enne teha Oxitopi katseid, et jälgida protsesse ja koguda inokulumi. Reaktori kogumahtuvus oli 20 liitrit. Reaktor käivitati 29.09.2020. Eelneval päeval täideti reaktor destilleeritud veega (14,5 l) ja jäeti soojenema kuni reaktori käivitamiseni. Veetemperatuur pidi olema 37 kraadi. Kaaluti ka vastavad vajalikud tooraine (Tabel 3).

**Tabel 3.** Reaktori katse jaoks vajalikud komponendid

Komponendid	20 L reaktor
E-romu	150 g
R2A sööde	45 g
Betaiin	20,25 g
NaHCO <sub>3</sub>	37,8 g
Na <sub>2</sub> S	3,375 g
Tsüsteiin	6,75 g
Inokulum	600 ml

Katse alustamisel võeti reaktorist 1 L destilleeritud vett (H<sub>2</sub>O), et lahustada vajalikud komponendid enne nende lisamist reaktorisse. Enne komponentide lisamist oli reaktori pH 6,6.

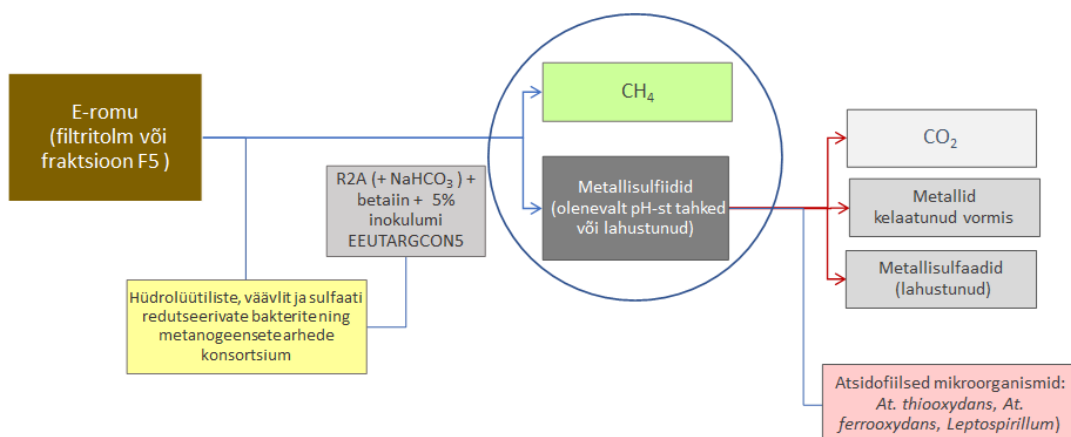
Komponendid lisati järgnevalt:

1. Reaktorisse lisati e-romu
2. Lisati NaHCO<sub>3</sub>, mille järel keskkonna pH tõusis 8,28 juurde
3. Lisati betaiini
4. Lisati juurde R2A söödet ning pH langes
5. Lisati tsüsteiini
6. Lisati inokulum
7. Viimasena lisati Na<sub>2</sub>S

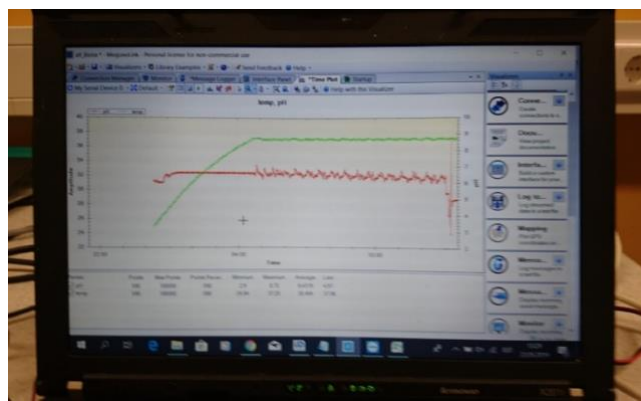
Seejärel juhiti 20 min jooksul reaktorist läbi argooni. Kui kõik vajalikud toorained olid lisatud, oli keskkonna pH reaktoris 7,79. Katsest võeti vedeliku- ja gaasiproov. Katse tähistati numbriga 200. Reaktori katse algas 29.09.2020 ja lõppes 26.10.2020. Katse alguses võeti pidevalt vedelikufaasi proove. Gaasiproove võeti vastavalt vajadusele, kui andur näitas, et gaasi on piisavalt reaktoris. 07.10.20 oli reaktori pH tõusnud, mis oli vajalik metanogeenide tööks. Ideaalne pH kasvukeskkond metanogeenidele on 7,2.

Kultiveerimiseks ja söötme optimeerimiseks valiti esimeseks faasiks anaeroobne protsess. Orgaanilise aine lagundamisel tekib anaeroobsetes tingimustes metaani. Anaeroobse kääritamise bioleostumise faasi skeem (Joonis 7) reaktoris.

Anaeroobne, t=37°C  
pH 6.8 → pH 7.5



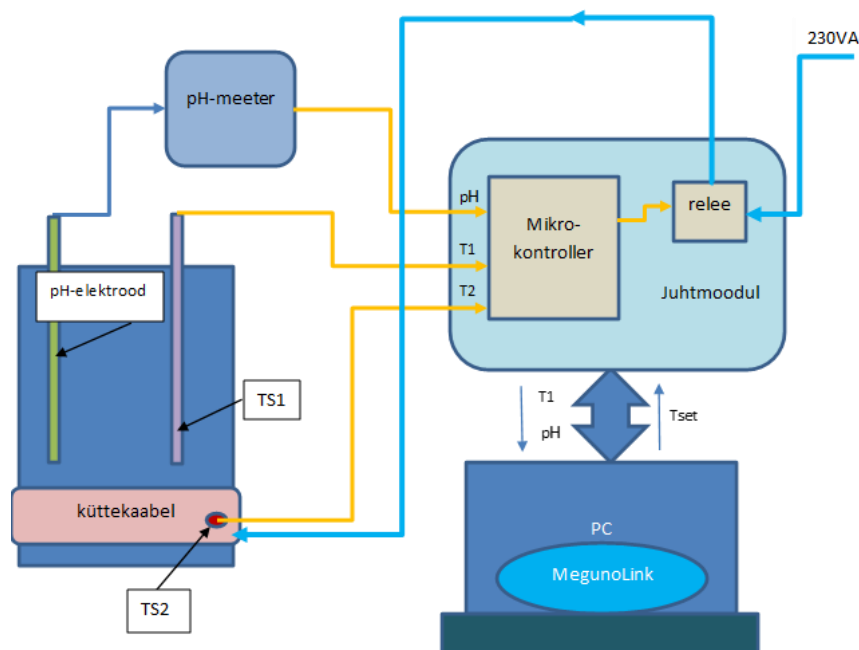
**Joonis 7.** Anaeroobse protsessi põhimõtteline skeem (ringiga ümbritsetud osa on uuritud antud töös)



**Joonis 8.** 20 L reaktor koos sensoritega, segajaga, proovivõtu avaga ja juhtploki. Söötme komponendid, mineraalsed materjalid ja inokulum, mis ettevalmistatud 20 L reaktorikatses jaoks. Arvuti kasutajaliidesega juhtploki opereerimiseks.

Fermentatsiooni protsessi jälgimist ja juhtimist korraldab vastavalt eelprogrammeeritud mikrokontroller (MC) (joonis 8). MC loeb oma sisendites signaale kahelt temperatuuri andurilt ning pH-meetrilt ning edastab need läbi USB arvutile (PC) programmile MegunoLink. Kasutajaliidese abil antakse operaatori poolt arvutisse soovitud fermentaatori temperatuur (Tset), mis edastatakse MC-le ning vastavalt fermentaatorisse sukeldatud sensori

TS1 poolt mõõdetud temperatuuri väärtusele T1 lülitab MC läbi relee küttevoolu kas sisse või välja püüdes saavutada olukorda  $T1=T_{set}$ . Küttevooluks on 230V võrguvool. Lisaks mõõdetakse turvakaalutlustel ka küttekeha temperatuuri T2. Selleks on ka veel teine termosensor TS, mis on paigaldatud küttekehale. Kui mingil põhjusel on tuvastatud kütteelemendi ülekuumenemine (T2 on suurem mingist kontrollväärtusest), siis kütte sisselülitamist ei toimu enne küttekeha maha jahtumist. Fermentaatoris oleva lahuse pH väärtust mõõdab pH-meeter, millel on ka 0-20mV signaali väljund, sealt saadav signaal edastab pH väärtuse MC-le. Selleks on süsteem eelnevalt kalibreeritud seades vastavusse mõõdetud signaali suuruse ja pH väärtuse. Kuna tegemist on lineaarse sõltuvusega, siis piisab kahest mõõtepunktist. Juhtmoodul asub plastikkarbis, millele on paigaldatud ekraan, mis kuvab vajalikke parameetreid võimaldades vajadusel ka süsteemi kontrollida ning seadistada (joonis 9). Kogu juhtsüsteem on tegelikult väga paindlik ja võimaldab rakendada väga erinevaid andmete kogumise, kuvamise ja ka juhtimise mooduseid. Samuti on võimalik juurde lisada mõõdetavaid ja kontrollitavaid parameetreid kui selleks tekib vajadus.



**Joonis 9.** Fermentatsiooni juhtimise blokk-skeem

## Töö praktilise osa etapid:

1. Biomassi eraldamine katsevedelikust (15ml falkon)
2. DNA eraldamine
3. DNA sisalduse mõõtmine
4. Vajalike praimerite lisamine ja PCR
5. DNA kontrollimine ja sobilike proovide väljavõtmine
6. Genoomi kokkupanek
7. Bioinformaatiline analüüs

### 2.2.2. Biomassi eraldamine

Katse 200 sisaldas 20 proovi 15 ml falkon tsentrifuugtuubides. Nendest eraldati vedelik ja biomass kanti 2ml eppendorf tuubidesse.

15 ml falkonid tuli eelnevalt sulatada ja vortexil segada ning peale proovi võtmist tsentrifuugida. Tekkis 3 sorti proove:

- Sulatatud ja Vortexil segatud proovid
- Tsentrifugeeritud vedelfaasi proovid
- Biomassid

Biomassi eraldamine kogu katsevedelikust (15 ml falkon).

1. Tsentrifugeeri 5000 p/min 10 min
2. Vedelik kalla ära ja lisa 2 ml 0,9% NaCl lahust. Suspendeeri.
3. Segu jaota kahe 1,5 ml epsi sisse ja lisa juurde nii palju NaCl lahust, et täituks 1,5 ml piirini.
4. Tsentrifugeeri 5000 p/min 10 min
5. Vedelik pipeteeri sette pealt ära. Ühte epsi lisa 0,4 ml NaCl lahust, suspendeeri ja pipeteeri segu teise epsi. Kui esimesest ei saa kõike kätte lisa veel 0,3 ml NaCl lahust, suspendeeri ja lase üle Vortexi ning lisa teise epsi. Kui epsis on ruumi, siis lisa NaCl lahust 1,5 ml piiri täitumiseni.
6. Tsentrifugeeri 13000 p/min 2 min
7. Vedelik pipeteeri sette pealt ära.
8. Epsid koos settega pane -20°C külmikusse.

### 2.2.3. DNA eraldamine DNEASY Powersoil Kitiga

Protokoll DNA eraldamiseks

- Teostada kõik tsentrifuugimised toatemperatuuril (15-25°C)
- Kui lahus C1 on sadestunud, siis kuumutada 60°C juures kuni sade on lahustunud.
- 2 ml kogumistuubid on komplektis.

Protseduur

1. Lisa 0,25 g biomassi *PowerBead* tuubi, mis on komplektis. Lase kergelt üle Vortexi.
2. Lisa 60 µl C1 lahust ja pööra tuubi mitu korda või lase kergelt üle Vortexi.  
**Märkus:** C1 lahust võib lisada *PowerBead* tuubi enne biomassi lisamist.
3. Kinnita *PowerBead* tuubid horisontaalselt kasutades Vortex adapterit 24 (1,5-2,0 ml) tuubi jaoks (kat nr 13000-V1-24)
4. Lase üle Vortexi max kiirusel 10 min.  
**Märkus:** Kui kasutad 24-kohalist Vortex adapterit rohkem kui 12 proovi jaoks, siis pikenda segamise aega 5-10 min.
5. Tsentrifuugi tuube 10k x g 30 sek.
6. Kanna puhas vedelik 2 ml kogumistuubi.  
**Märkus:** Viimased 400-500 µl vedelikku mitte kanda kogumistuubi. Vedelik võib sisaldada biomassi osakesi.
7. Lisa 250 µl C2 lahust ja lase üle Vortexi 5 sek. Inkubeeri 2-8°C 5 min.  
**Märkus:** Sa võid 5 min inkubatsiooni vahele jätta. Sama kui sa oled juba protokolliat kinni pidanud, siis soovitame jätkata inkubatsiooniga.
8. Tsentrifuugi tuube 1 min 10k x g.
9. Vältides pelleteid kanna kuni 600 µL vedelikku puhtasse 2 ml kogumistuubi.
10. Lisa 200 µl C3 lahust ja lase kergelt üle Vortexi. Inkubeeri 2-8°C juures 5 min.  
**Märkus:** Sa võid 5 min inkubatsiooni vahele jätta. Samas kui sa oled juba protokollist kinni pidanud, siis soovitame jätkata inkubatsiooniga.
11. Tsentrifuugi tuube 1 min 10k x g.
12. Vältides pelleteid kanna kuni 750 µl vedelikku puhtasse 2 ml kogumistuubi.
13. Loksuta C4 lahust ja lisa 1200 µL vedelikku. Lase üle Vortexi 5 sek.
14. Kanna 675 µl *MB Spin* kolonni ja tsentrifuugi 10k x g 1 min. Vala ära vedelik, mis kogenenud kolonni põhja.
15. Korda punkti 14 kuni kogu proov on töödeldud.
16. Lisa 500 µl C5 lahust. Tsentrifuugi 30 sek 10k x g.

17. Vala ära vedelik, mis kogunenud kolonni põhja. Tsentrifuugi uuesti uuesti 1 min 10k x g.
18. Ettevaatlikult aseta *MB Spin* kolonn puhtasse 2 ml kogumistuubi. Väldi C5 lahuse pritsumist kolonni peale.
19. Lisa 100 µl C6 lahust valge filtermembraani keskele. Alternatiivina võib kasutada steriilset DNA-vaba PCR-järgu vett (kat nr 17000-10).
20. Tsentrifuugi toatemperatuuril 30 sek 10k x g. Viska ära *MB Spin* kolonn. DNA on nüüd valmis järeltöötlemiseks.

**Märkus:** Soovitame DNA-d hoida külmutatult (-20°C kuni -80°C) kuna C6 lahus ei sisalda EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*). Kontsentreerimaks DNA-d vaadake tõrkeotsingu juhendit.

**Märkus:** Juhendis märgitud Vortexi ja adapteri asemel kasutati katse 200 puhul hoopis homogenisaator *TissueLyser II*. Programmi seaditus oli 27,5 MHz ja 40 sek.

#### 2.2.4. DNA sisalduse mõõtmine *Qubit Fluorometriga*

DNA OD (*optical density*) mõõtmiseks *Qubit Fluorometriga* pidi esmalt valmistama töölahuse *Qubit dsDNA BR Assay Kitiga*. Komplekti kuulub kontsentreeritud analüüsireaktiiv (*concentrated assay reagent*), lahenduspuhver (*dilution buffer*) ja DNA standardid, millega kalibreerida QF. Antud komplekti võib kasutada iga versiooni QF masinaga. Komplektist on puudu, kuid on vaja, epse segamaks kokku töölahus ja *Qubit* analüüsituube (*Life Technologies, Cat. no. Q32856*) või *Axygen PCR-05-C* tuube (*VWR, part no. 10011-830*).

##### **Märkused:**

- *Qubit dsDNA BR Assay* tagab kõige optimaalsema tulemuse, kui kõik lahused on toatemperatuuril (22-28°C).
  - Analüüsituube mitte hoida käes, kuna need soojenevad ning samuti mõõtmisel hoida tuubi masinas lühiaegselt, sest masin ise soojeneb samuti.
  - Optimaalne fluorestsentskiirgus saabub peale DNA proovi lisamist 2 min jooksul ning on stabiilne kuni 3 h.
1. Iga DNA analüüsimiseks on vaja 1 (0,5 mL) analüüsituubi ja 2 standardite jaoks.
  2. Märki tuubide kaantele proovi tähis.

**Märkus:** Mitte märkida tuubi külgedele, kuna need on läbipaistvad, et mõõtemasin saaks toimida.

3. Valmista töölahus lahjendades reagenti suhtes 1:200 lahjenduspuhvril. Kasuta sobiva suurusega epsi või falkon tuubi.

**Märkus:** Iga mõõdetava proovi maht peab olema 200 µL. Iga standardi tuub sisaldab 190 µL töölahust ja iga DNA proovi tuub 180-199 µL. Valmista sobiv kogus töölahust ning arvesta varuga 2 proovi jagu lisaks.

Näiteks 8 proovi jaoks valmistage proovide ja 2 standardi jaoks ette piisavalt töölahust: ~200 µL katsuti kohta 10 tuubis annab 2 ml töölahust (10 µL reagenti ja 1990 µL puhvrit). **NB!** Arvesta 2 proovi jagu lisaks.

4. Lisa standardite jaoks kumbagi tuubi 190 µL töölahust.
5. Lisa kumbagi tuubi 10 µL vastavat standardi lahust. Lase üle Vortexi 2-3 sek. Vaata et ei tekiks mulle.
6. Lisa töölahust iga proovi jaoks nii palju, et kogumaht oleks 200 µL.

**Märkus:** DNA proovi võib lisada 1-20 µL. Lisa vastav kogus töölahust, mis võib olla 180-199 µL.

7. Lase proovid üle Vortexi 2-3 sek. Kogumaht tuubis peaks tulema 200 µL.
8. Lase tuubidel inkubeerida toatemperatuuril 2 min.
9. Kalibreeri QF. Koduekraanil vali analüüsivormiks *dsDNA Broad Range* ja vajuta *GO*. Vali *Run new calibration* ja vajuta *GO*.
10. Sisesta tuub, millel märgitud *Standard 1* ja vajuta *GO*.
11. Sisesta tuub, millel märgitud *Standard 2* ja vajuta *GO*.
12. Sisesta järgemööda proovid ja vajuta iga uue proovi puhul *GO*.
13. Arvutamaks DNA kontsentratsiooni vali *Calculate sample concentration* ja sisesta lisatud DNA proovi kogus µL.
14. Kui jätsid punkti 13. vahele, siis saad arvutada tulemused ise vastava valemiga.

Sinu DNA proovi kontsentratsioon = QF väärtus × (200/x), kus x on: QF väärtus = *Qubit fluorometer* tulemus, x = kogus DNA proovi, mis sa lisasid analüüsituubi.

### 2.2.5. Sekvenerimine

Sekvenerimine viidi läbi katsete 200 ja 234 eraldatud DNA-ga. Selleks oli vaja:

1. Segada praimerid
  - a. Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

	1x
2x Physion Master Mix	10 $\mu$ L
Forward primer	0.5 $\mu$ L
Reverse primer	0.5 $\mu$ L
Water	8 $\mu$ L *
Template DNA	1 $\mu$ L *
<b>Sample vol</b>	<b>20<math>\mu</math>L</b>

\*Sõltub template'i kogusest  
\*Sõltub DNA kontsentratsioonist

\*Kasutati vett, mis puhastatud süsteemiga Milli-Q.

## 2. PCR programm

1x	98°C 30s
25x	98°C 10s
	60°C 20s
	72°C 15s
1x	72°C 8 min
1x	4°C hold

PCR viidi läbi masinaga 2720 *Thermal Cycler* toodetud november 2009.

Produkte kontrolliti geelektroforeesi abil 1,5% agaroskeeliga. Geeli jaoks arvestati:

- 150 mL 1x TAE (Tris-acetate-EDTA) puhvrit
- 0,8  $\mu$ L EtBr 50 mL puhvri kohta 0,8x3=2,4  $\mu$ L EtBr
- 2,25 g agarooosi

Geeli valmistamine:

1. Segada TAE ja agaros kuumakindlas Erlenmeyeri kolvis
2. Kuumutada mikrolaineahjus kuni pole nähtavaid agarooosi osakesi
3. Lasta jahtuda mõned minutid ja lisada EtBr  
**Märkus:** EtBr on mutageen ja soovituslik on kanda kaitsekindaid.
4. Hoida geeli kuumakapis ja kolvi suue katta fooliumiga.

### 2.2.6. Bioinformaatiline analüüs

Genoomi kokkupaneku teostas biotehnoloogia ettevõtte Novogene ning saadud tulemusi analüüsiti PipeCraft 2.0 abil, mis on avatud lähtekoodiga tarakvaraline lahendus. Selle abil saab teha bioinformaatilist analüüsi suure-läbilaskega amplikon-järejstusega andmetele.

PipeCraft lahendusele on lisaks tarvis Docker programmi, mis hõlmab endas erinevaid tööriistu programmide kasutamiseks.

1. Saadud toorandmed tuli esmalt *demultiplexida*. See jagab toorfailid fastq failiformaadina laiali. *Paired-end* andmete puhul on ühe DNA proovi jaoks kaks faili R1 ja R2.
2. Pidi tegema *reorient* töötlust. Järjestused on tihti mõlema-, 5'-3' ja 3'5', -suunalised. See töötlus teeb seda amplikonjärjestustele ja R1 failid saavad 5'-3' suuna ja R2 failid 3'-5' suuna. Vajalik, et hiljem saaks need omavahel liita.
3. Seejärel lõigati ära praimerid. See on vajalik ASV (*amplicon sequence variant*) koostamiseks.
4. Andmeid jooksutati *DADA2 Workflows*. See parandab vead andmetes, mis võivad DNA järjestuses olla. Selle abil saab leida kimääre ning eemaldada need. Samuti saab selle abil kokku panna *paired-end* lugemid.
5. Sai koostada ASV tabelid.
6. Sai määrata taksonoomia.

Olles andmeid töödeldud sai neid kujutada ka vastava tabeli või joonisena. Seal sai näha antud töös biomassi proovidest eraldatud mikroorganisme.

### **3. TULEMUSED JA ARUTELU**

Reaktorist kogutud proove oli kummastki katsest (katse 200 ja 234) vastavalt 20 ja 19 tk. Saadud biomassi pesti ja sellest eraldati DNA. Sobilikele DNA proovidele tehti amplikonid, mida kontrolliti geelektroforeesi abil ning kõlblikud saadeti ettevõttele Novogene genoomi kokkupanekuks. Saadud tulemustele tehti bioinformaatiline analüüs. Praktilises osas toimus kahe erineva eksperimendi proovide biomasside eraldamine katsevedelikust ja need on nimetatud vastavalt katse 200 ja katse 234.

#### **3.1. Reaktorikatse tulemused**

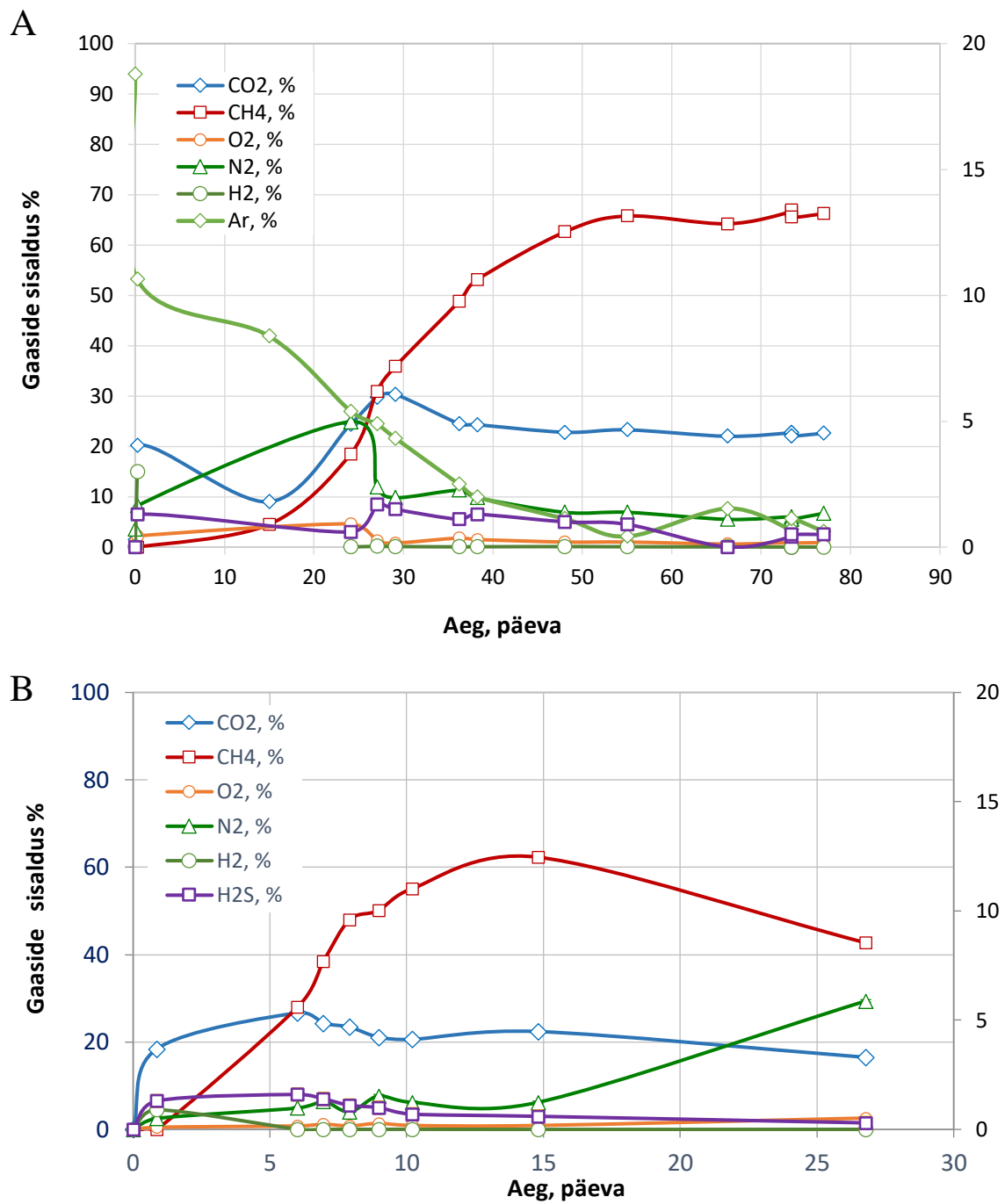
Antud töös ei viidud läbi reaktorikatset, kuid selle tulemusena sai antud töö raames eraldada eksperimendi käigus tekkinud biomassist DNA. See oli vajalik, et saada aimu potentsiaalsetest liikidest, keda rakendada e-romu lagundamisel. Eksperimendi jaoks valmistati eelnevalt OxiTop® katsete käigus inokulumid 20 L reaktokatsete jaoks.

Reaktorikatsetest võeti proove 20 tk (katse 200) ja 19 tk (katse 234) ning samuti määrati gaaside koostis (Joonis 20). Katse 200 substraadiks oli e-romu ja katse 234 puhul argilliit (Tabel 4).

Gaasikoostises on katse algfaasis domineeriv CO<sub>2</sub>. See viitab orgaanilise materjali lagunemisele. Eksponentsiaalses faasis kasvab metaani sisaldus üle kõigi gaaside. Kusjuures katse 200 puhul algab metaani taseme kiire kasv märgatavalt varem kui katse 234 puhul. Selle põhjuseks on substraadi erinevus. E-romust inokulum oli peenike tolm ja seetõttu on see suurema eripinnaga ning mikroorganismidel on lihtsam kasutada seda süsiniku allikana. Siiski on mõlema katse puhul metaani max tase üle 60%, mis kinnitab metanogeenide osalust protsessis.

**Tabel 4.** Inokulumi päritolu ja reaktorikatsed 200 ja 234

Katse nr	Katse anum	Katse kuupäev	Substraat	Katse kirjeldus
196	Oxitop	01.09.2020	e-romu	R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 1% e-romu (Sample 4 (Filter Dust Zig-Zag)) + 5% inokulum 5A (-80°C stock, roheline B9)
196B		01.09.2020		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 5% inokulum 5A (-80°C stock, roheline B9)
197		01.09.2020		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 1% e-romu (Sample 4 (Filter Dust Zig-Zag)) + 5% inokulum 5A (katse 189, -80°C stock, sinine F5)
197B		01.09.2020		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 5% inokulum 5A (katse 189, -80°C stock)
198		01.09.2020		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 1% e-romu (Sample 4 (Filter Dust Zig-Zag)) + 5% inokulum 5A (katse 194, -80°C stock, sinine F7)
198B		01.09.2020		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 5% inokulum 5A (katse 194, -80°C stock)
199		15.09.2020		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 1% e-romu (Sample 4 (Filter Dust Zig-Zag)) + 5% inokulum 5A (katse 196, +37°C)
199B		15.09.2020		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 5% inokulum 5A (5% inokulum 5A (katse 196, +37°C))
<b>Katse 200</b>		<b>Reaktor 20 L</b>		29.09.2020
231	Oxitop	22.06.2021	Argilliit	R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 3% argilliit (Sötke alumine) + 5,0% inokulum 229 (t=37°C)
231B		22.06.2021		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 5,0% inokulum 229 (t=37°C)
232		22.06.2021		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 3% argilliit (Sötke alumine) + 5,0% inokulum 230 (t=37°C)
232B		22.06.2021		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 5,0% inokulum 230 (t=37°C)
233		22.06.2021		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 3% argilliit (Sötke alumine) + 5,0% inokulum 231 (t=37°C)
233B		22.06.2021		R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 5,0% inokulum 231 (t=37°C)
<b>Katse 234</b>	<b>Reaktor 20 L</b>	29.06.2021	e-romu	R2A (+ NaHCO <sub>3</sub> ) + betaiin + 1% e-romu (Reydesa e-romu F5 Promedio 3 (28.05.2019)) + 5% inokulum 5A (katsed 198 ja 199, +37°C)



**Joonis 10.** Gaasifaasi koostis anaeroobses reaktorikatses 1% e-romu (zig-zag dustl) + inokulum . (B) katse 200 inokulum e-romu. (A) katse 234 inokulum argilliit.

### 3.2. Biomass ja sellest eraldatud DNA

Kokku võeti vastavalt 20 (katse 200) ja 19 (katse 234) proovi. Saadud biomassesse pesti ja neist eraldati DNA. Katse 200 puhul kasutati eraldamisel Vortexi ja selle adapteri asemel homogenisaatorit *TissueLyzer II*. Olulist erinevust katsetulemuste osas ei kajastunud. *TissueLyzer II* tööaeg on ligikaudu 20 korda kiirem ja rakud purunevad rohkem. Saadud tulemuste põhjal on ainsaks erinevuseks aeg, mis kulub proovide töötlemiseks.

Katse 200 puhul mõõdeti DNA sisaldust *Qubit Fluorometer 1.0* abil. Tulemusi mõõdeti korduvalt, et olla kindel proovide kvaliteedis. Samuti esines probleeme DNA mõõtmisel protokolliga jälgimisega *Qubit dsDNA BR Assay Kitiga*. Tulemuste erinevused olid tingitud mõõtelahuste ebakorrektsusest käsitsemisest, mistõttu esines temperatuuri kõikumisi. See mõjutab DNA kontsentratsiooni mõõtetulemusi. Katse 200 puhul eraldati DNA ka erinevatest faasidest. Selleks segati erinevad faasid, mis võeti falkonist enne puhta biomassi eraldamist. Proovidest (Tabel 5) otsustati välja jätta oma väikse kontsentratsiooni tõttu katsepäev 0 ja 1,511 proovid.

Katse 234 tulemusi mõõdeti nii *Qubit Fluorometriga 1.0* kui ka *NanoDrop 2000*. *Nanodrop* polnud antud DNA proovide mõõtmiseks hea, sest see ei suuda edukalt tuvastada väikseid kontsentratsioone ning võib näidata tegelikkusest suuremaid kontsentratsioone. *Qubitiga* mõõtmine on täpsem ja usaldusväärsem, kuid mõõteprotsess ise ajakulukam. Katsest valiti (Tabel 6) 7 proovi (märgitud värviliselt), sest nende kontsentratsioone suudeti määrata *Qubitiga*.

**Tabel 5.** Katse 200 15 mL falkonist saadud ja eraldatud ning mõõdetud DNA kontsentratsioon

Proovivõtu kuupäev & kellaeg	Katse-päev	Proovi mass falcon g	Biomass millest eraldatud DNA g	DNA kont µg/mL (3.12.20)	DNA kont µg/mL II mõõtmine(3.12.20)	Biomass millest eraldatud DNA g	DNA kont µg/mL eraldatud 23.02.21
29.09.2020 14:00	0	4,295	0,05	1* out of range	1* out of range	0,025	1* out of range
30.09.2020 22:05	1,34	8,698	0,06	1,77	1*	0,032	1,47
01.10.2020 15:20	2,06	11,27	0,06	5,38	1,69	0,029	6,33
02.10.2020 14:50	3,03	5,976	0,06	6,72	1,25	0,039	3,26
04.10.2020 19:30	5,23	10,86	0,065	9,68	3,74	0,044	11,8
05.10.2020 10:44	5,86	10,44	0,065	4,32	1*	0,052	6,48
06.10.2020 15:24	7,06	10,457	0,065	7,45	3,17	0,026	10,6 (segu)
07.10.2020 12:05	7,92	11,044	0,06	5,41	2	0,036	9,84
08.10.2020 15:45	9,07	10,027	0,06	6,65	2,56	0,071	5,45
09.10.2020 21:20	10,31	1,511	0,05	1* out of range	1* out range	0,039	1,16
11.10.2020 17:42	12,15	10,374	0,07	3,33	1,22	0,045	11,3
12.10.2020 09:05	12,8	9,343	0,065	1,78	1*	0,065	8,72
13.10.2020 12:51	13,95	9,606	0,06	5,78	1,94	0,04	8,89
14.10.2020 11:35	14,9	11,053	0,05	3,25	1*	0,089	9,7 (segu)
15.10.2020 10:05	15,84	8,038	0,045		1*	0,045	7,51
16.10.2020 14:20	17,01	11,2	0,07	3,31	1,04	0,047	5,19
18.10.2020 17:49	19,16	10,045	0,05	3,64	1,79	0,033	3,66
20.10.2020 14:01	21	9,173	0,04	1,24	1*	0,044	6,78
21.10.2020 14:00	22	5,112	0,045	11,6	10,9	0,042	7,55
26.10.2020 11:15	26,89	9,065	0,04	1,36	1*	0,018	5,31

**Tabel 6.** Katse 234 15 mL falkonist saadud ja eraldatud ning mõõdetud DNA kontsentratsioon

Proovivõtu kuupäev & kellaaeg	Katse-päev	Proovi mass falkon g (03.02.2022)	DNA konts µg/mL QF (04.03.2022)	DNA konts µl/mL Nanodrop (04.03.2022)	Vortex faasi biomassid g (18.03.2022 ja 21.03.2022)	DNA konts µl/mL QF (18.03.2022)	DNA konts µl/mL Nanodrop (18.03.2022)	DNA konts µl/mL Nanodrop (21.03.2022)
29.06.2021 10:31	0	6,692	out of range	1,5	0,054		2,7	
29.06.2021 16:11	0,24	6,663	out of range	1,9	0,014			1,8
30.06.2021 10:38	1,01	6,85	out of range	1,6	0,019		1,5	
30.06.2021 16:11	1,24	6,445	out of range	1,8	0,016			1,3
01.07.2021 11:06	2,02	6,782	out of range	1,6	0,016		3	
02.07.2021 10:36	3	6,868	0,636	2,4				
03.07.2021 11:46	4,05	6,613	1	2,8	0,026		1,8	
05.07.2021 10:45	6,01	6,669	out of range	4,1	0,024			1,7
07.07.2021 10:51	8,01	6,71	out of range	5,5	0,014		3,1	
09.07.2021 10:51	10,01	6,747	out of range	2,4	0,048			1,5
12.07.2021 10:29	13	6,398	out of range	3,1	0,026	1,58	2,1	
13.07.2021 09:52	13,97	6,476	0,936	8				
14.07.2021 10:26	15	6,782	0,291	3,9	0,008		1,6	
15.07.2021 08:55	15,93	6,925	0,236	3,9				
19.07.2021 10:33	20	6,818	0,272	2,2	0,024		1,7	
23.07.2021 13:42	24,13	6,82	out of range	1,9	0,02			1,3
26.07.2021 11:20	27,03	6,729	out of range	0,6	0,028		1,6	
28.07.2021 13:22	29,12	7,144	out of range	0,5	0,019			1,8
04.08.2021 15:55	36,22	7	0,232	0,8	0,048		1,3	

### **3.3. Amplikonid ja genoomi kokkupanek**

Amplifitseerimise järel teostati produktidele kontroll geelelektforeesil ning vajadusel tehti uued amplikonid nendest, mille proovid olid kehva kvaliteediga. Amlikone tehti 3 kordust ning sobilikud proovid segati omavahel ja saadeti genoomi koostamiseks ettevõttele Novogene.

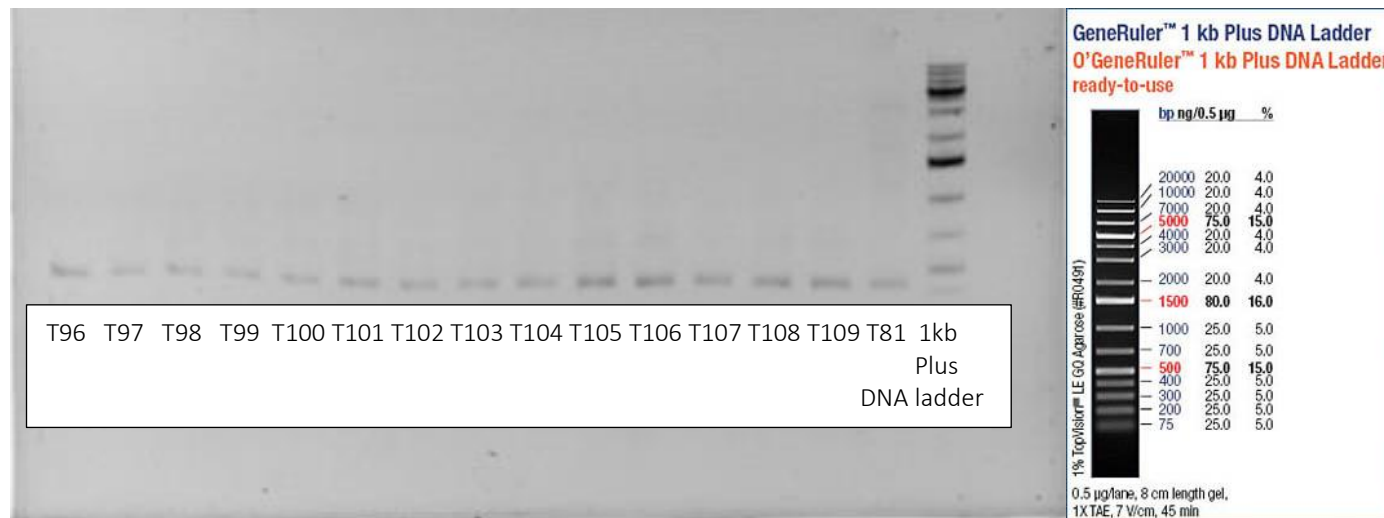
Kokku läks genoomi koostamisse 27 proovi, mille seas 1 positiivne ja 1 negatiivne kontroll. Kontrollide eesmärk on tagada analüüsitavate proovide usaldusväärsus. Need toimised ootuspäraselt ning seega on ka saadud produktid valiidsed. Valitud praimerid (Tabel 7) on ära märgitud neile spetsiifiliste koodidega ning seal nähtub ka amplikonide kontsentratsioon. Kontsentratsioonid on omased amplifitseeritud DNA omale ehk on suurenenud. Joonisel (joonis 21) on näha ühe foreesi tulemusi, mis ei kajasta kõiki genoomi koostamisse saadetud produkte. See annab kindluse amplikonide kvaliteedi ja DNA olemasolu kohta.

**Tabel 7.** Genoomi koostamiseks Novogene'ile saadetud amplikonid

No	Sample code	Primers		Template DNA, $\mu\text{L}$	Volume in the pooled PCR, $\mu\text{L}$	Qubit measurement from pooled PCR, $\mu\text{g/mL}$
		Forward	Reverse			
1	<b>T76</b>	515F 201	928R 201	1	5	31,8
2	<b>T77</b>	515F 202	928R 202	1	5	27,9
3	<b>T78</b>	515F 203	928R 203	1	5	41,6
4	<b>T79</b>	515F 204	928R 204	1	5	48,0
5	<b>T80</b>	515F 205	928R 205	1	5	28,9
6	<b>T81</b>	515F 206	928R 206	1	10	23,1
7	<b>T82</b>	515F 208	928R 208	1	5	51,0
8	<b>T83</b>	515F 209	928R 209	1	10	37,8
9	<b>T84</b>	515F 210	928R 210	1	5	41,7
10	<b>T85</b>	515F 211	928R 211	1	5	37,1
11	<b>T86</b>	515F 212	928R 212	1	5	41,1
12	<b>T87</b>	515F 213	928R 213	1	5	47,0
13	<b>T88</b>	515F 214	928R 214	1	5	44,3
14	<b>T89</b>	515F 215	928R 215	1	5	40,5
15	<b>T90</b>	515F 216	928R 216	1	5	46,2
16	<b>T91</b>	515F 217	928R 217	1	5	56,1
17	<b>T92</b>	515F 218	928R 218	1	5	47,3
18	<b>T93</b>	515F 219	928R 219	1	5	42,3
19	<b>T94</b>	515F 220	928R 220	1	1	39,7
20	<b>T95</b>	515F 221	928R 221	1	5	3,4

**Tabel 8.** Genoomi koostamiseks Novogene'ile saadetud ampliconid

19	<b>T94</b>	515F 220	928R 220	1	1	39,7
20	<b>T95</b>	515F 221	928R 221	1	5	3,4
21	<b>T96</b>	515F 222	928R 222	1	10	38,5
22	<b>T97</b>	515F 223	928R 223	1	10	33,0
23	<b>T98</b>	515F 224	928R 224	1	10	38,1
24	<b>T99</b>	515F 225	928R 225	1	10	30,2
25	<b>T107</b>	515F 226	928R 226	1	5	33,1
26	<b>T108</b>	515F 227	928R 227	1	5	36,0
27	<b>T109</b>	515F 228	928R 228	1	5	34,4



**Joonis 21.** Ampliconide kontroll geelelektrofooresil

### 3.4. Määratud tüvede kirjeldused

Enne võimalike bakterite määramist jooksutati andmeid programmis PipeCraft 2.0. Selleks *demultiplexiti* 2 toorfaili.

Seejärel teostati saadud fq failidele eraldi käsina *reorient*. Seejärel jooksutati ASV *workflow* DADA2. Esmalt lõigati ära primerid ja seejärel *filter* ASV *table*. Viimaseks sai määrata taksonoomia. ASV puhul võib tulla vähem tulemusi, kuid võrreldes OTU (*operational taxonomic unit*) on ASV täpsem. ASV kasutamisel tuli ka selles töös vähe tulemusi, sest see võib arvestada nukleotiidi täpsusega määratavaid liike ja perekondi. See tähendab et isegi kui kattuvus on üle 97%, siis ei pruugi ASV jaoks see piisav olla.

Oleks võinud ka määrata OTU-de alusel ning leida rohkem geneetiliselt kattuvaid perekondi, kuid seljuhul oleks risk andmeid mittevaliidselt esitada ning edaspidiseid tööd selle põhjal võivad potentsiaalselt olla kallutatud.

#### **Perekond *Haoranjiana***

*Haoranjiana* liigid on gram-negatiivsed spore mittemoodustavad pulkbakterid, kes on isoleeritud pestitsiiditehase aktiivmudast. Fülogeneetiline 16S rRNA analüüs näitas, et antud perekond kuulub seltsi *Chitinophagaceae* (Zhang et al., 2016).

#### **Perekond *Sedimentibacter***

*Sedimentibacter* liigid on anaeroobseest metanogeensest kooslusest eraldatud. Algselt on nad isoleeritud mere pinnasettest. Nad on gramm-negatiivsed mitteliikuvad spore mittemoodustavad pulkbakterid (Imachi et al., 2016).

**Tabel 8.** PipeCraftis töödeldud andmete äralõigatud praimerjärjestused

File	demultiplex_out	reoriented_out	primersCut_out
T108.R1.fq	341 628	341 420	335 499
T108.R2.fq	341 628	341 420	335 499
T109.R1.fq	106 322	106 037	100 786
T109.R2.fq	106 322	106 037	100 786
T76.R1.fq	396 346	395 805	380 368
T76.R2.fq	396 346	395 805	380 368
T80.R1.fq	231 494	231 261	223 605
T80.R2.fq	231 494	231 261	223 605
T87.R1.fq	423 855	423 521	410 631
T87.R2.fq	423 855	423 521	410 631
T98.R1.fq	665 563	665 139	649 331
T98.R2.fq	665 563	665 139	649 331
T77.R1.fq	290 659	278 131	278 131
T77.R2.fq	290 659	278 131	278 131
T78.R1.fq	366 588	358 036	258 036
T78.R2.fq	366 588	358 036	358 036
T79.R1.fq	410 855	398 288	398 287
T79.R2.fq	410 855	398 288	398 287
T80.R1.fq	231 494	223 605	223 605
T80.R2.fq	231 494	223 605	223 605
T81.R1.fq	465 122	455 181	455 181
T81.R2.fq	465 122	455 181	455 181
T88.R1.fq	467 805	453 745	453 744
T88.R2.fq	467 805	453 745	453 744
T89.R1.fq	493 315	479 908	479 908
T89.R2.fq	493 315	479 908	479 908
T90.R1.fq	385 037	373 864	373 864
T90.R2.fq	385 037	373 864	373 864
T91.R1.fq	190 877	182 558	182 558
T91.R2.fq	190 877	182 558	182 558
T92.R1.fq	607 721	595 920	595 919
T92.R2.fq	607 721	595 920	595 919
T93.R1.fq	381 695	371 212	371 212
T93.R2.fq	381 695	371 212	371 212

**Tabel 9.** PipeCraftis töödeldud proovide andmed ja ASV

File	qualFiltered	denoised_R1	denoised_R2	merged	chimeraFiltered	no.of ASVs
T108	43	33	37	3	3	1
T109	13	3	11	0	0	0
T76	19	6	9	0	0	0
T80	17	6	11	0	0	0
T87	15	8	13	0	0	0
T98	74	51	62	7	7	2
T77	32	20	32	0	0	0
T78	7	2	7	2	2	1
T79	26	10	22	0	0	0
T80	12	4	11	0	0	0
T81	26	16	23	0	0	0

**Tabel 10.** PipeCraftis saadud proovide ASV

ASV	T108	T109	T76	T80	T87	T98	T78
ASV1;size=6	0	0	0	0	0	6	
ASV2;size=3	3	0	0	0	0	0	
ASV3;size=1	0	0	0	0	0	1	
ASV1;size=2							2

**Tabel 11.** PipeCraft DADA2 ASV määratud mikroorganismid

	Class	Order	Family	Genus	Species	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
ASV1;size=6	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Haoranjiana	flava	100	100	100	100	100	100	98
ASV2;size=3	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Haoranjiana	flava	100	100	100	100	100	100	97
ASV3;size=1	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Sedimentibacteraceae	Sedimentibacter	NA	100	100	100	75	74	74	45
ASV1;size=2	Clostridia	Peptostreptococcales-Tissierellales	Sedimentibacteraceae	Sedimentibacter	NA	100	100	100	100	100	100	100

## **Järeldused**

Algselt graptolliitargilliidist eraldatud metanogeenne kooslus sobib samuti trükkplaatide orgaanilisest osast metaani eraldamiseks. Amplikoni järjestuse variantide (ASV) meetodil määratud liikide arv oli suhteliselt väike, sest ASV puhul arvestatakse nukleotiidi täpsusega liike ja perekondi. Edaspidi võib antud tulemuste alusel katsetada liikide määramist OTU (*operational taxonomic unit*) alusel. Edaspidi võib modifitseerida ASV parameetrid. Tulemusi võib pidada heaks, sest suudeti leida ebasoodsast katsekeskkonnast eksisteerivad mikroorganisme.

## KOKKUVÕTE

Trükkplaate peetakse e-jäätmete kõige hinnalisemaks osaks nendes leiduvate metallide tõttu. Palju on uuritud erinevate erinevaid meetmeid, kuidas neid metalle kätte saada ning seda üsna tulemuslikult. Vähem on uuritud mittemetallilise osa biolagundamise kohta. Ometigi on teema aktuaalne üha enam suureneva e-jäätmete hulga tõttu. Neis leiduv epoksüvaik on sünteetiline vaik, mis bioloogiliselt ei lagune. Ometigi leidub elujõulisi mittekultiveeritavaid baktereid, kelle seast on leitud selliseid, kes on võimelised lagundama erinevaid sünteetilisi plastikuid ning nende erinevaid koostisosasid. Selleks on vajalik neid kultiveerida neile omases keskkonnas, kus neid loomulikult leidub.

Selleks kasutati käesolevas töös eelnevalt teostatud eksperimendist saadud biomasse, millest eraldati DNA ning lõpuks prooviti bioinformaatiliste meetodite abil leida katse käigus kasvanud baktereid. Töös määrati võimalikke baktereid ASV ja mitte OTU põhimõttel ning seetõttu esines andmetes mahu poolest vähe taksonoomilisi sugukondi ja perekondi.

Epoksüvaikude lagundamise kohta mikroorganismide abil on vähe uuritud ja seetõttu on ka saadud tulemused informatiivsed selles osas, keda võiks edaspidi leida loomlikest kohtadest, kus bakterid lagundavad epoksüvaike.

## **Microbiological degradation of the non-metallic fraction of printed circuit boards**

### **SUMMARY**

Printed circuit boards (PCBs) are considered the most valuable part of electronic waste due to the metals they contain. Extensive research has been conducted on various methods to extract these metals, yielding positive results. However, there has been limited research on the biodegradation of the non-metallic components. Nevertheless, this topic is relevant given the increasing amount of electronic waste. The epoxy resin used in PCBs is a synthetic resin that does not naturally degrade. Nonetheless, viable non-cultivable bacteria have been identified, some of which are capable of breaking down different synthetic plastics and their components. Cultivating these bacteria in their natural habitats is necessary for such degradation.

To address this, the present thesis utilized biomass obtained from a previous experiment, from which DNA was isolated. Using bioinformatics methods, the thesis aimed to identify the bacteria that grew during the experiment. In this work, potential bacteria were determined based on Amplified Sequence Variants (ASV) rather than Operational Taxonomic Units (OTU), resulting in limited taxonomic families and genera in terms of volume.

Research on the degradation of epoxy resins by microorganisms has been scarce, making the obtained results informative for future studies on naturally occurring bacteria involved in the degradation of epoxy resins in natural environments.

The methanogenic community isolated from graptolitic argillite has demonstrated potential for methane extraction from the organic components of printed circuit boards. The amplicon sequence variant (ASV) method identified a relatively small number of species, as ASV provides precise nucleotide-level resolution of species and genera. In future studies, the determination of species based on the operational taxonomic units (OTUs) can be tested using these results. Additionally, modifications to ASV parameters can be explored for further refinement.

## TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajat, Anne Menertit, kõigutamatu optimistliku oleku ja täieliku toetuse eest.

Lisaks soovin tänada oma vanemaid kõigi nende aastate eest, mis nad on toetanud minu elukestvat õpet. Soovin tänada ka oma õde Marianni.

Suur aitäh nüüdseks parematel jahimaadel olevale vanaema Ilsele, kes uskus minusse alati.

Veel tänan Liisi Trumm, Laura Parm ja ema Siret, Valeta mulle veel pls seltskond, Avo ja Pille Trumm.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Amils, R. (2011). Chemolithotroph. M. Gargaud, R. Amils, J. C. Quintanilla, H. J. (Jim) Cleaves, W. M. Irvine, D. L. Pinti, & M. Viso (Toim), *Encyclopedia of Astrobiology* (1k 289–291). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-11274-4\\_273](https://doi.org/10.1007/978-3-642-11274-4_273)
- Benzal, E., Solé, M., Lao, C., Morral, E., Gamisans, X., & Dorado, A. D. (2021). Influence of ore grade and mineral medium on chalcopyrite bioleaching with mixed microbial consortia. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 40(3), e13588. <https://doi.org/10.1002/ep.13588>
- Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G. E., Erdeiné Kis, Á., Laczi, K., Bende, G., Szilágyi, Á., Kovács, T., Perei, K., & Rákhely, G. (2020). Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>
- Bosecker, K. (1997). Bioleaching: Metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3–4), 591–604. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00340.x>
- Brandl, H., Bosshard, R., & Wegmann, M. (2001). Computer-munching microbes: Metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi. *Hydrometallurgy*, 59(2–3), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00188-2)
- Breister, A. M., Imam, M. A., Zhou, Z., Ahsan, M. A., Noveron, J. C., Anantharaman, K., & Prabhakar, P. (2020). Soil microbiomes mediate degradation of vinyl ester-based polymer composites. *Communications Materials*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s43246-020-00102-1>
- Eliasz, N., Ron, E. Z., Gozin, M., Younger, S., Biran, D., & Tal, N. (2018). Microbial Degradation of Epoxy. *Materials*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ma11112123>

- Faiza, W., Firouzi, A., Islam, M. R., Sumdani, G., & Taher, A. (2021). Degradation analysis of epoxy resin composites reinforced with bioprotein: Effects of hydrolysis using papain and bromelain. *Polymer Composites*, 42(6), 2717–2727. <https://doi.org/10.1002/pc.26007>
- Forti, V., Baldé, C. P., Kuehr, R., & Bel, G. (2020). *The Global E-waste Monitor 2020*. 120.
- Forti, Vanessa, Baldé, Kees, & Kuehr, Ruediger. (2018). *E-waste Statistics: Guidelines on Classifications, Reporting and Indicators, second edition* (1k 71).
- Heller, P. A. (2022, detsember 22). *The Basic Economics Of Gold Mining*. Numismatic News. <https://www.numismaticnews.net/coin-market/the-basic-economics-of-gold-mining>
- Hesse, W. (2000). Phenolic Resins. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. [https://doi.org/10.1002/14356007.a19\\_371](https://doi.org/10.1002/14356007.a19_371)
- Hooper and McDonald. (2000, mai). *The PBDEs: An Emerging Environmental Challenge and Another Reason for Breast-Milk Monitoring Programs*. <https://web.archive.org/web/20110614150610/http://ehp.niehs.nih.gov/docs/2000/108p387-392hooper/hooper-full.html>
- Im, J., & Löffler, F. E. (2016). Fate of Bisphenol A in Terrestrial and Aquatic Environments. *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8403–8416. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00877>
- Imachi, H., Sakai, S., Kubota, T., Miyazaki, M., Saito, Y., & Takai, K. (2016). Sedimentibacter acidaminivorans sp. Nov., an anaerobic, amino-acid-utilizing bacterium isolated from marine subsurface sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1293–1300. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000878>
- Jiang et al. (2012). *Improving the End-of-Life for Electronic Materials via Sustainable Recycling Methods* / Elsevier Enhanced Reader. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.066>

- Kaya, M. (2016). Recovery of metals and nonmetals from electronic waste by physical and chemical recycling processes. *Waste Management*, 57, 64–90. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.08.004>
- Krebs, W., Brombacher, C., Bosshard, P. P., Bachofen, R., & Brandl, H. (1997). Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3–4), 605–617. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00341.x>
- Kumar, A., Holuszko, M. E., & Janke, T. (2018). Characterization of the non-metal fraction of the processed waste printed circuit boards. *Waste Management*, 75, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.02.010>
- Li, J., Wen, J., Guo, Y., An, N., Liang, C., & Ge, Z. (2020). Bioleaching of gold from waste printed circuit boards by alkali-tolerant *Pseudomonas fluorescens*. *Hydrometallurgy*, 194, 105260. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2020.105260>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15074-z>
- Marques, A. C., Cabrera Marrero, J.-M., & de Fraga Malfatti, C. (2013). A review of the recycling of non-metallic fractions of printed circuit boards. *SpringerPlus*, 2(1), 521. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-521>
- Otsuki, A., Gonçalves, P. P., Stieghorst, C., & Révay, Z. (2019). Non-Destructive Characterization of Mechanically Processed Waste Printed Circuit Boards: X-ray Fluorescence Spectroscopy and Prompt Gamma Activation Analysis. *Journal of Composites Science*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jcs3020054>
- Pinto, D., Santos, M. A., & Chambel, L. (2015). Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 61–76. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.794127>

- Pollmann, K., Kutschke, S., Matys, S., Raff, J., Hlawacek, G., & Lederer, F. L. (2018). Bio-recycling of metals: Recycling of technical products using biological applications. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1048–1062. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.006>
- Priya, A., & Hait, S. (2017). Comparative assessment of metallurgical recovery of metals from electronic waste with special emphasis on bioleaching. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(8), 6989–7008. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8313-6>
- Progulske-Fox, A., Chukkapalli, S., Getachew, H., Dunn, W., & Oliver, J. (2022). VBNC, previously unrecognized in the life cycle of *Porphyromonas gingivalis*? *Journal of Oral Microbiology*, 14(1), 1952838. <https://doi.org/10.1080/20002297.2021.1952838>
- Rawlings, D. E. (2002). Heavy Metal Mining Using Microbes. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 65–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161052>
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.-G., & Schippers, A. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching—Direct vs. Indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59(2), 159–175. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00180-8)
- Sonawane, P. M., & Gupta, S. G. (2021). Metal Mobilisation from Obsolete PCB of Mobile Phones Using Chemolithotrophs. *Ecological Engineering & Environmental Technology (EET)*, 22(6), 79–84. <https://doi.org/10.12912/27197050/141536>
- Sukanto, H., Raharjo, W. W., Ariawan, D., Triyono, J., & Kaavesina, M. (2021). Epoxy resins thermosetting for mechanical engineering. *Open Engineering*, 11(1), 797–814. <https://doi.org/10.1515/eng-2021-0078>
- Zhang, L., Chen, X.-L., Hu, Q., Chen, K., Yan, X., Li, S.-P., Freilich, S., & Jiang, J.-D. (2016). *Haoranjania flava* gen. Nov., sp. Nov., a new member of the family Chitinophagaceae, isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4686–4691. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001411>

- Zhou, Y., & Qiu, K. (2010). A new technology for recycling materials from waste printed circuit boards. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1), 823–828. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.083>
- Thakur, P., & Kumar, S. (2020). Metallurgical processes unveil the unexplored “sleeping mines” e- waste: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(26), 32359–32370. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09405-9>
- Tu, Z., Guo, C., Zhang, T., Lu, G., Wan, J., Liao, C., & Dang, Z. (2017). Investigation of intermediate sulfur species during pyrite oxidation in the presence and absence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 167, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2016.11.001>
- UNEP. (2014). *Basel convention technical guidelines*.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. (2017). *TOXICOLOGICAL PROFILE FOR POLYBROMINATED DIPHENYL ETHERS (PBDEs)*. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Vakilchap, F., Mousavi, S. M., Baniasadi, M., & Farnaud, S. (2020). Development and evolution of biocyanidation in metal recovery from solid waste: A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(3), 509–530. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09544-y>
- Vats, M. C., & Singh, S. K. (2015). Assessment of gold and silver in assorted mobile phone printed circuit boards (PCBs): Original article. *Waste Management*, 45, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.002>
- Wu, H.-Y., & Ting, Y.-P. (2006). Metal extraction from municipal solid waste (MSW) incinerator fly ash—Chemical leaching and fungal bioleaching. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(6), 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.08.012>
- Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the

estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 8(4), 313–323.

<https://doi.org/10.1007/BF02010671>

# LIHTLITSENTS

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Pärtel Reppo,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose  
Trükkplaatide mittemetallilise osa mikrobioloogiline lagundamine  
mille juhendaja on Anne Menert  
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, alates **08.06.2025** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Pärtel Reppo*  
**29.05.2023**