

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

Triin Korb

**Biodegradatiivse potentsiaaliga mikroobikooslused Eesti  
graptoargilliidist**

Magistritöö

Juhendaja PhD Anne Menert

TARTU 2016

## **Biodegradatiivse potentsiaaliga mikroobikooslused Eesti graptoliitargilliidist**

Eesti aluspõhjas olevad suhteliselt kõrge orgaanilise aine sisaldusega kivimid (nt graptoliitargilliit) on elupaigaks mikroorganismidele. Metallid esinevad argilliidis kas sulfiidsete mineraalidena või on metallorgaaniliste ühendite koosseisus. Metallorgaaniliste komplekside mikrobioloogilise lagundamise kohta kivimites on andmeid vähe. Kivimites elavate mikroorganismide biodegradatsioonivõime ja liigilise koosseisu põhjalik tundmine võimaldab selgitada argilliidi kompleksse kasutuselevõtu võimalusi. Käesoleva eesmärk ongi iseloomustada argilliidi orgaanilist komponenti lagundavat mikroobikooslust ja selgitada isoleeritud mikroorganismide võimekust seda protsessi läbi viia.

### **Töö teadusala CERCS kood:**

B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

T490 Biotehnoloogia

**Märksõnad:** biodegradatsioon; metanogenees; graptoliitargilliit; geoporfüriinid.

## **Microbial consortia with biodegrading potential from Estonian graptolite argillite**

Estonian basement minerals with relatively high content of organic matter (e.g. graptolite argillites) are habitat for microorganisms. Metals are in argillite as sulfides or in the composition of organometallic compounds. The microbial decomposition of organometallic complexes is less known. The project examines impact of microorganisms on argillite degradation from the viewpoint of organic matter decomposition. In-depth knowledge of biodegrading potential and species composition of inherent microorganisms in minerals offers complex deployment options for argillite. The aim of this thesis is to characterize the biodegradative microbial communities of argillite organic component and to explain their capability to carry out this process.

### **CERCS research specialization:**

B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

T490 Biotechnology

**Keywords:** biodegradation; geoporpyrins; graptolite argillite; methanogenesis.

## Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Biogaas ja anaeroobse lagundamise tehnoloogia.....	7
1.1.1 Anaeroobne lagunemine ja selles osalevad mikroorganismid .....	8
1.2 Metallide bioleostamine.....	20
1.2.1 Metallisulfiidide bioleostamine.....	21
1.2.2 Metallorgaaniliste ühendite biodegradatsioon .....	24
1.3 Graptoargilliit.....	26
1.4 Graptoliitargilliidi lõhustamine mikroobikoosluse abil koos kaasneva metallide leostumisega.....	28
1.4.1. Gaasi eraldumine argilliidiproovidest .....	29
2. TÖÖ EESMÄRK.....	32
3. MATERJALID JA MEETODID.....	32
3.1 Katsetoodika .....	32
3.1.2 Substraat ja söötmed.....	33
3.1.3 Inokulum .....	34
3.1.4 Katseplaan .....	34
3.2 Analüüsimetoodika .....	37
3.2.1 Meetodid kasvukeskkonnast eralduvate gaasiliste produktide uurimiseks. ....	37
3.2.2 Mikrobioloogilise analüüsi meetodid.....	40
4. TULEMUSED .....	44
4.1. Fakultatiivsete anaeroobide isoleerimine.....	44
4.1.1 Isolaatide kirjeldus biokeemiliste testide põhjal .....	44
4.1.2 Isolaatide kirjeldus 16S rRNA analüüsi põhjal.....	46
4.1.3 Identifitseeritud tüvede kirjeldused kirjanduse põhjal .....	47
4.2. Selekteeritud isolaatide toime argilliidi orgaanilise osa lagundamisele .....	50

4.2.1 Isoleeritud mikroorganismide mõju gaasi eraldumisele argilliidist .....	51
4.2.2 Gaasiliste metaboliitide kontsentratsioonide muutused kultiveerimiskatses .....	52
4.2.4 Mikroorganismide arvukus, metaani teke ja söötme pH.....	55
5. ARUTELU .....	57
6. JÄRELDUSED .....	60
7. KOKKUVÕTE .....	61
8. SUMMARY .....	62
KASUTATUD KIRJANDUS .....	65
KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....	71
LIHTLITSENTS.....	77
LISAD .....	73

## KASUTATUD LÜHENDID

<b><math>\Delta G_0'</math></b>	standardne Gibbsi vabaenergia muut
<b>ARGCON5</b>	argilliidi metallorgaanilisi komplekse lagundav mikroobikooslus, mis on deponeeritud mikroobitüvede kolleksiooni CELMS
<b>CELMS</b>	Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi juures asuv mittemeditsiinilise päritoluga looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kolleksioon
<b>inok</b>	inokulum
<b>KA</b>	kuivaine ( <i>TS - total solids</i> )
<b>KA%</b>	proovi kuivaine sisaldus, massi%
<b><math>m_{\text{subs}}</math></b>	substraadi mass, g
<b><math>n_{\text{biogaas}}</math></b>	kumulatiivne biogaasi kogus, mmol
<b><math>n_{\text{CH}_4,\text{subs}}</math></b>	ainult substraadi lagunemisel eraldunud biometaani kogus, mmol
<b><math>n_{\text{CH}_4,\text{subs}/\text{OS}}</math></b>	substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biometaani kogus orgaanilise süsiniku massi kohta, mmol/g LA
<b><math>n_{\text{CH}_4,\text{t}}</math></b>	kumulatiivne biometaani kogus, mmol
<b><math>n_{\text{subs}}</math></b>	ainult substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biogaasi kogus, mmol
<b><math>n_{\text{subs}/\text{OS}}</math></b>	substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biogaasi kogus orgaanilise süsiniku massi kohta, mmol/g LA
<b>OS</b>	orgaaniline süsinik
<b>OS%</b>	proovi orgaanilise süsiniku sisaldus, %.
<b><math>P_{\text{sum},\text{t}}</math></b>	kumulatiivne rõhk reaktoris, hPa
<b>R</b>	universaalne gaasikonstant, $\text{cm}^3 \text{kPa K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
<b>ROS</b>	reaktiivsed hapnikuühendid
<b>T</b>	temperatuur, K
<b><math>V_{\text{CH}_4,\text{A}}</math></b>	substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biometaani kogus argilliidi massi kohta, $\text{m}^3/\text{t MM}$
<b><math>V_{\text{CH}_4,\text{OS}}</math></b>	substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biometaani kogus orgaanilise süsiniku kohta, $\text{m}^3/\text{t LA}$
<b>XCH<sub>4</sub></b>	metaani moolosa biogaasis

## SISSEJUHATUS

Inimkonna arvukuse plahvatuslik kasv ja erinevate tehnoloogiavahendite kasutamine on suurendanud oluliselt nõudlust viimaste järele. Valitsused soovivad parandada oma riigi elanike heaolu, kusjuures erinevaid tehnoloogiatooteid peetakse hea ja „normaalse“ elatustaseme elementaarseks ja lahutamatuks osaks. Eestiski unistatakse juba pikemat aega meie oma „Nokiast“, mis tõstaks elatustaseme vähemalt Soome riigiga samale tasemele. Paraku on need otsingud seni sarnanenud Pipi Pikksuka „spungi“ otsingutega...

Tehnoloogiavahendid sisaldavad toimimiseks vajalikke metalle, sh väärismetalle, mille looduslikud varud on tavametallidest väiksemad. Suurenev nõudlus tehnoloogiavahendite järele tingib ka suurenenud metallidevajaduse. Kõrgema metallidesisaldusega maagivarud on ammendumas, mistõttu tuntakse aina enam huvi vähemkvaliteetsete ja raskemini töödeldavate maakide vastu. Üheks selliseks on must kilt ehk graptoliitargilliit, mida leidub suurtes kogustes ka Eestis ja mis sisaldab U, Mo, Va, Pb, Zn, Re, Ni kümme korda rohkem kui maakoores keskmiselt. Nimetatud metallide sisaldused jäävad siiski liiga madalaks, et neist iga üksikut oleks mõistlik eraldi kaevandada, mitut neist korraga aga küll.

Metallid esinevad argilliidis kas sulfiidsete mineraalidena (nt  $\text{FeS}_2$ ,  $\text{PbS}$ ) või on metallorgaaniliste ühendite (geopolümeeride) koosseisus. Metallide bioleostamine sulfiidsetest mineraalidest on juba kasutuses olev tehnoloogia, kuid metallide bioloogiline eraldamine metallorgaanilisi ühendeid sisaldavatest mineraalidest veel mitte. Argilliidi orgaanilise osa lagundamist anaeroobsetes tingimustes heterotroofsete mikroorganismide ja metanogeenide abil uuritakse Eestis Tartu Ülikoolis koostöös firmaga BiotaP OÜ. Tehtud on esimesed mikroobikoosluse liigilise koosseisu analüüsid ja katsetatud selle koosluse võimet argilliidi orgaanilist komponenti lagundada; käesolev töö on osa nendest uuringutest.

Töö eesmärgiks on seega iseloomustada argilliidi loomulikus mikroobikoosluses olevaid ja selle orgaanilist komponenti lagundavaid fakultatiivselt anaeroobseid mikroorganisme ning selgitada isoleeritud mikroorganismide võimekust seda protsessi läbi viia.

Märksõnad: biodegradatsioon, metanogenees, graptoliitargilliit, geoporfüriinid.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Biogaas ja anaeroobse lagundamise tehnoloogia

Biogaasi toodetakse biolagunevate materjalide anaeroobsel lagundamisel mikroorganismide abil ja selle peamised koostisosad on toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Biogaasi keskmine koostis (Normak *et al*, 2009)

Koostisosa	Kontsentratsioon
Metaan (CH <sub>4</sub> )	50 – 75 mahu%
Süsinikdioksiid (CO <sub>2</sub> )	25 – 45 mahu%
Divesiniksulfiid (H <sub>2</sub> S)	20 – 20 000 ppm
Vesi (H <sub>2</sub> O)	2 – 7 mahu% (20-40°C)
Hapnik (O <sub>2</sub> )	<2 mahu%
Lämmastik (N <sub>2</sub> )	<2 mahu%
Vesinik (H <sub>2</sub> )	<1 mahu%

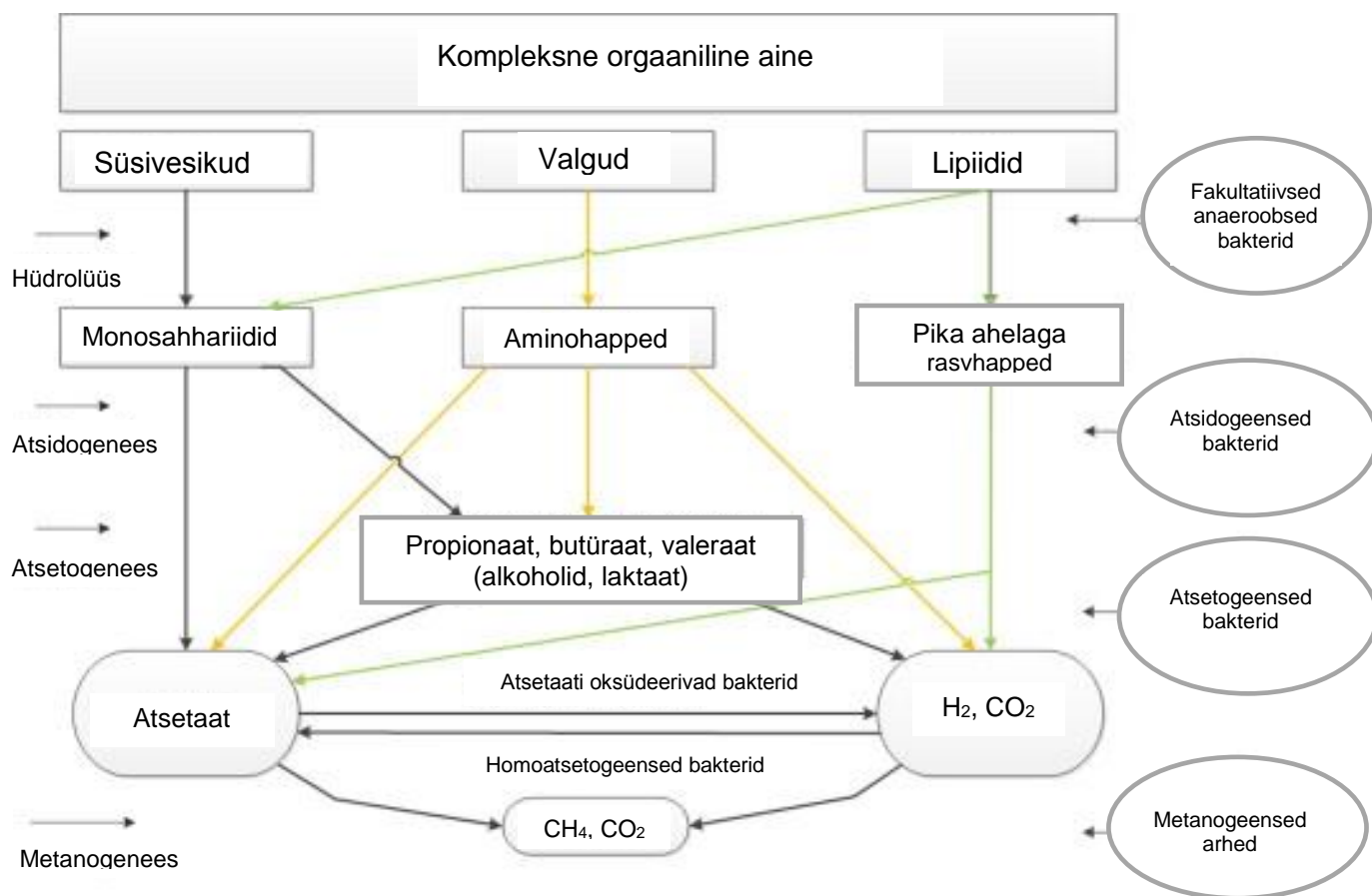
Anaeroobsel lagundamisel tekib kõige rohkem metaani, mistõttu nimetatakse biogaasi tekke protsessi ka metaankääritamiseks. See on mitmete biokeemiliste reaktsioonide kompleksne protsess, erinevate anaeroobsete protsesside sümbioos, mille käigus multimolekulaarsed orgaanilised substraadid lagundatakse lihtsateks ühenditeks. (*Biogaas, Wikipedia*) Protsessi viivad rangelt anaeroobsetes tingimustes läbi kaks bioloogilist riiki: bakterid ja arhed. Looduses esineb seda protsessi näiteks rabades, soodes, järvedes, kuumaveeallikates, prügilates, ookeanides ja loomade soolestikus. (Merlin Christy *et al*, 2014) Kui samad tingimused luua tehislikult biogaasi kääritys, st temperatuur vähemalt 37°C, anaeroobne keskkond ja piisava koguse biomassi olemasolu, siis saab nimetatud gaasi tehislikult toota ja kasutada kütusena. Biogaasi kütteväärtus jääb enamasti vahemikku 5-7 kWh/Nm<sup>3</sup>. (*Biogaas, Energiatalgud*)

Anaeroobse lagundamise protsessis on olulised mitmed keskkonnatingimused, mille sobivusest sõltuvad reaktsioonide toimumine ja biogaasi teke. Hapniku kontsentratsioon reaktoris peaks olema võimalikult väike, et tagada mikroobidele anaeroobsed elutingimused. Protsess võib toimuda erinevatel temperatuuridel, kas mesofiilses (t = 32–42°C) või termofiilses (t = 50–57°C) reaktoris. Kõige levinumad on mesofiilsed reaktorid, kus on tagatud kõrge gaasi produktsioon ja tootmisprotsessi stabiilsus suhteliselt madala reaktori

kütmiss vajaduse juures. Lisaks tuleb jälgida pH väärtust, piisava koguse substraadi olemasolu ja võimalike inhibiitorite (ammooniumioon  $\text{NH}_4^+$ , divesiniksulfiid  $\text{H}_2\text{S}$ , raskmetallid jt) kontsentratsiooni. (*Biogaas, Wikipedia*)

### 1.1.1 Anaeroobne lagunemine ja selles osalevad mikroorganismid

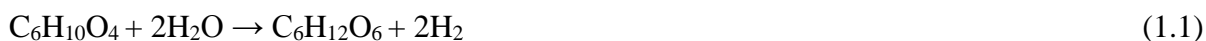
Metaankäärimine jaguneb neljaks faasiks – hüdrolyüs, fermentatsioon e. atsidogenees, atsetogenees ja metanogenees ning selle üldine skeem on esitatud joonisel 1.



**Joonis 1.** Anaeroobse lagunemise põhimõtteline skeem koos selles osalevate mikroorganismidega. See on mitmete biokeemiliste reaktsioonide kompleksne protsess, erinevate anaeroobsete protsesside sümbioos, mille käigus multimolekulaarsed orgaanilised substraadid lagundatakse lihtsateks ühenditeks. (Merlin Christy *et al*, 2014)

### 1.1.1.1 Hüdrolüüs

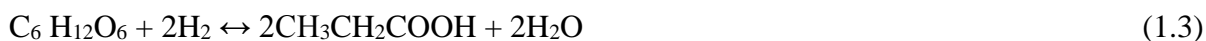
Anaeroobse lagunemise esimene etapp on kogu lagundamisprotsessi kiirust limiteeriv hüdrolüüs, mille käigus lõhustatakse lahustumatud polümeriseerunud orgaanilised ühendid, nagu süsivesikud, rasvad, valgud, väiksemateks molekulideks: suhkruteks, rasvhapeteks, aminohapeteks (võrrand 1.1).



Hüdrolüüsi teostavad obligatoorsed ja /või fakultatiivsed anaeroobid ekstratsellulaarsete hüdrolaaside (amülaaside, proteaaside, lipaaside) abil. Nendeks mikroorganismideks on hõimkonnast *Firmicutes* liigid perekondadest *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Selenomonas*, *Acetivibrio*, *Ruminococcus*; hõimkonnast *Bacteroidetes* liigid perekonnast *Bacteroides*; hõimkonnast *Actinobacteria* liigid perekonnast *Micrococcus* ning hõimkonnast *Proteobacteria* liigid perekondadest *Enterobacterium* ja *Pseudomonas*. Hüdrolüüsi teostavad bakterid viivad läbi ka järgmist faasi – atsidogeneesi. (Shah *et al*, 2014; Merlin Christy *et al*, 2014)

### 1.1.1.2 Atsidogenees

Atsidogenees on kiire happemoodustumise faas, milles happebakterid muudavad vees lahustunud (sh ka hüdrolüüsil tekkinud) ühendid lühikeseahelalisteks (lenduvateks) orgaanilisteks hapeteks (äädikhape, propaanhape, butüürhape, pentaanhape, sipelghape), alkoholideks (etanool, metanool), aldehüüdideks, süsinikdioksiidiks, vesinikuks. Põhiline atsidogeneesi rada on atsetaadi, CO<sub>2</sub> ja H<sub>2</sub> kaudu, kusjuures ülejäänud atsidogeneesi produktide roll on tühine (võrrandid 1.2-1.4). (Shah *et al*, 2014; Merlin Christy *et al*, 2014)



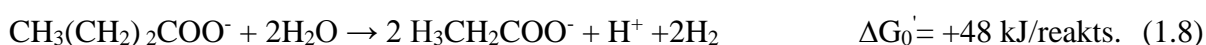
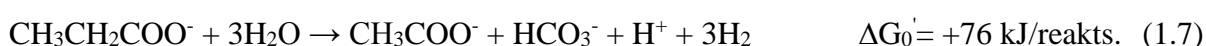
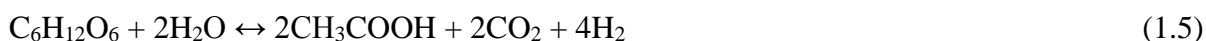
Neidprodukte saavad metanogeenid substraadi ja energiaallikana otse kasutada. Vesiniku kontsentratsiooni suurenemise vastusena akumulatsioonivad bakterid laktaati, etanooli, propionaati, butüraati ja kõrgemaid lenduvaid rasvhappeid, mida metanogeenid ei saa otse kasutada. Neid konverteeritakse atsetogeneesis. Atsidogeneesi bakterid (atsidogeenid)

kasutavad ära ka juhuslikult tekkinud hapniku, luues soodsa keskkonna obligatoorsetele anaeroobidele. (Shah *et al*, 2014)

Atsidogeneesi viivad läbi erinevad fakultatiivsed anaeroobid – *Clostridium sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Propionibacterium* ja *Clostridium propionicum* (Insam *et al*, 2010) ja obligatoorsed anaeroobid – peamiselt *Clostridium* nii mesofiilses kui termofiises süsteemis, aga ka *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* (Shah *et al*, 2014), *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* (Merlin Christy *et al*, 2014).

### 1.1.1.3 Atsetogenees

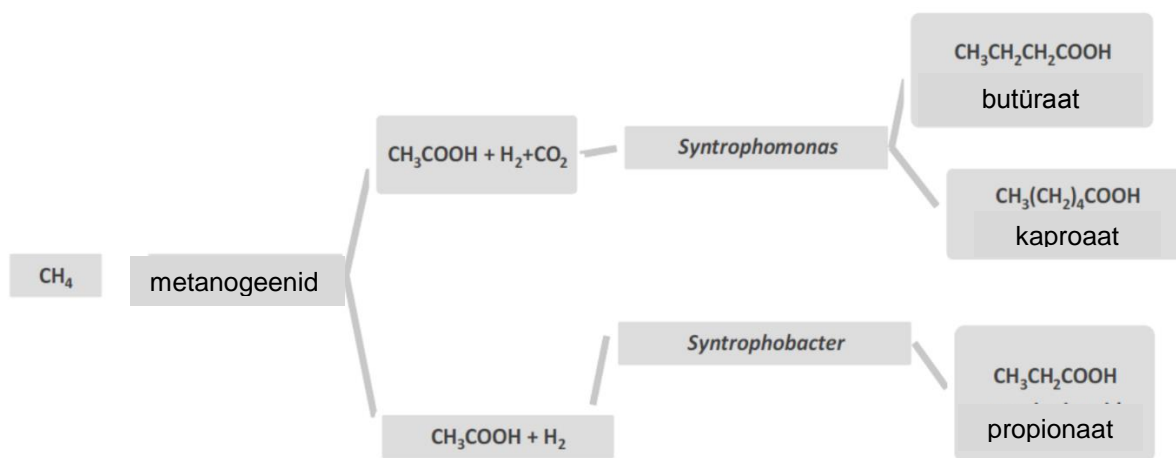
Vesiniku suurenev kontsentratsioon reaktsioonikeskkonnas põhjustab metanogeenide poolt mittetarbitavate elektronide allikate (laktaat, etanool, propionaat, butüraat ja kõrgemad lenduvad happed) akumulatsioon. Neid lagundavad edasi atsetogeensed bakterid (atsetogeenid) ja seda protsessi nimetatakse atsetogeneesiks (Insam *et al*, 2010) e. käärimisfaasiks, milles bakterid perekondadest *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Clostridium* ja *Acetobacterium* muudavad pikema ahelaga orgaanilised happed ja alkoholid äädikhappeks, CO<sub>2</sub>-ks ja molekulaarseks vesinikuks H<sub>2</sub>. (Kriipsalu *et al*, 2016). Atsetogeenid saavad kasutada erinevaid elektroni doonoreid (süsivesikud, lühikeseahelalised rasvhapped, alkoholid...) ja aktseptoreid (CO<sub>2</sub>, fumaraat, püruvaat, prootonid) ja seega tekitada mitmeidprodukte peale atsetaadi (võrrandid 1.5.-1.10). (Insam *et al*, 2010; Merlin Christy *et al*, 2014)



Atsetogeenid on ranged anaeroobid, kes kasvavad aeglaselt ja on tundlikud orgaanilise aine sisalduse kõikumiste ja keskkonnatingimuste muutuste suhtes (Merlin Christy *et al*, 2014). Atsetogeenid on fülogeneetiliselt mitmekesised, kuid enamuse neid klasterduvad madala G+C sisaldusega hõimkonna *Firmicutes* harusse. Enamus atsetogeenseid liike hõlmavad perekonnad, sh *Clostridium*, *Eubacterium* või *Ruminococcus*, sisaldavad ka mitteatsetogeenseid liikmeid. (Insam *et al*, 2010) *Methanobacterium suboxydans* lagundab

pentaanhappe propioonhappeks; *Methanobacterium propionicum* lagundab propioonhappe atsetaadiks. (Ziemiński, 2012) Elektroni aktseptorina võidakse kasutada ka sulfaate (*Syntrophobacter*, *Desulfotomaculum*). *Desulfovibrio* osaleb koos perekonnaga *Metanobacterium* sulfaate ja laktaati kasutades atsetaadi ja H<sub>2</sub> tootmises. (Ziemiński, 2012)

Mõned atsetogeneesi reaktsioonid (võrrandid 1.7, 1.8 ja 1.10) on standardtingimustel termodünaamiliselt ebasoodsad (Insam *et al*, 2010), sest reaktsiooniprodukt H<sub>2</sub> inhibeerib oksüdatsiooni ja on atsetogeenidele toksiline. Reaktsioonid saavad toimuda vaid madalal H<sub>2</sub> osarõhul (Ostrem, 2004). *Syntrophomonas*, *Syntrophospora*, *Syntrophobacter* oksüdeerivad propionaati ja butüraati, kasutades H<sup>+</sup> elektroni aktseptorina (Ostrem, 2004, Plugge *et al*, 2009), kuid vajavad selleks H<sub>2</sub> tarbivaid metanogeenseid arhesid, homoatsetogeneene või teisi H<sub>2</sub> tarbijaid (k.a. sulfaadi redutseerijaid) (Angelidaki *et al*, 2011). Mõned atsetogeenid (homoatsetogeensed bakterid) konkureerivad metanogeenidega substraatide – H<sub>2</sub>, metanaat ja metanool – pärast. (Angelidaki *et al*, 2011), kuid enamasti esineb atsetogeensete bakterite (H<sub>2</sub> tootjate) ja metanogeensete arhede (H<sub>2</sub> tarbijate) vahel süntroofia – kahe erineva metabolismiga mikroobide sümbioos, mis võimaldab erinevaid substraate lagundada ja on anaeroobses protsessis kriitilise tähtsusega. (Ziemiński, 2012, Angelidaki *et al*, 2011)



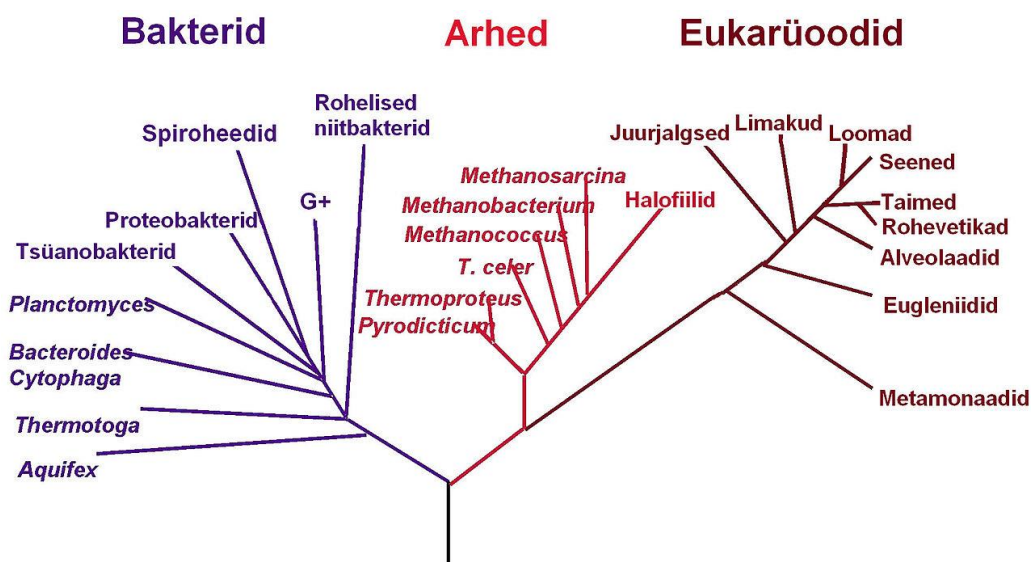
**Joonis 2.** Rasvhapete metabolism atsetogeenide ja metanogeenide süntroofia käigus. (Ziemiński, 2012)

Süntroofsed atsetaati oksüdeerivad bakterid võivad atsetaadi konverteerida ka CO<sub>2</sub>-ks ja H<sub>2</sub>-ks. Neid leidub nii mesofiilsetel (*Clostridium ultunense* ja *Syntrophaceticus schinkii*) kui ka termofiilsetel (*Thermacetogenium phaeum* ja *Thermotoga lettingae*) tingimustel. Süntroofsed bakterid toodavad oma metabolismis alkohole ja rasvhappeid lagundades substraadipõhise fosforüleerimise või oksüdeerimise abil ATP-d. (Shah *et al*, 2014)

Atsetogeneesi määrab biogaasi tootmise efektiivsuse, sest ca 70% metaanist moodustub atsetaadi redutseerumisel. Seetõttu on atsetaat kõige olulisem vaheühend metaankäärimise protsessis. (Shah *et al*, 2014) Ülejäänud 30% moodustub vesinikust, CO<sub>2</sub>-st või formaadist (Angelidaki *et al*, 2011).

#### 1.1.1.4 Metanogenees

Metanogeneesi käigus konverteeritakse atsetogeneesi produktid metanogeensete mikroorganismide poolt metaaniks ja CO<sub>2</sub>-ks. Metanogeensed mikroorganismid klassifitseeruvad arhede domeeni *Euryarchaeota* gruppi (joonis 3), nad on rangelt anaeroobsed kemolitotroofid, väga tundlikud temperatuuri ja pH muutustele (optimaalne pH 6,8-7,2). Nende seas on nii psühro-, meso- kui ka termofiilseid liike. Nad on väga mitmekesise morfoloogiaga, suurusega 0.3 kuni 7.4 μm. (Shah *et al*, 2014)



**Joonis 3.** Domeenid fülogeneesi puul

([https://et.wikipedia.org/wiki/Domeen\\_%28bioloogia%29](https://et.wikipedia.org/wiki/Domeen_%28bioloogia%29))

Metanogenees võib toimuda mitut rada pidi (vt tabel 2).

**Tabel 2.** Tüüpilised metanogeenide poolt läbiviidavad reaktsioonid metanogeneesis ja nendele vastavad Gibbsi vabaenergiad, ΔG° (kJ mol<sup>-1</sup> reaktsioon). (Zhuang 2014)

$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_{4,\text{aq}} + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	-223
$4\text{CH}_3\text{NH}_3^+ + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_{4,\text{aq}} + \text{HCO}_3^- + 4\text{NH}_4^+ + \text{H}^+$	-136
$4(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+ + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6\text{CH}_{4,\text{aq}} + 2\text{HCO}_3^- + 4\text{NH}_4^+ + 2\text{H}^+$	-261
$4(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+ + 9\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_{4,\text{aq}} + 3\text{HCO}_3^- + 4\text{NH}_4^+ + 3\text{H}^+$	-402
$2(\text{CH}_3)_2\text{S} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_{4,\text{aq}} + \text{HCO}_3^- + 2\text{H}_2\text{S} + \text{H}^+$	-46
$4\text{CH}_3\text{SH} + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_{4,\text{aq}} + \text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2\text{S} + \text{H}^+$	-59

**Hüdrogenotroofselt metanogeesil** kasutavad mikroobid ainult CO<sub>2</sub> ja H<sub>2</sub>:

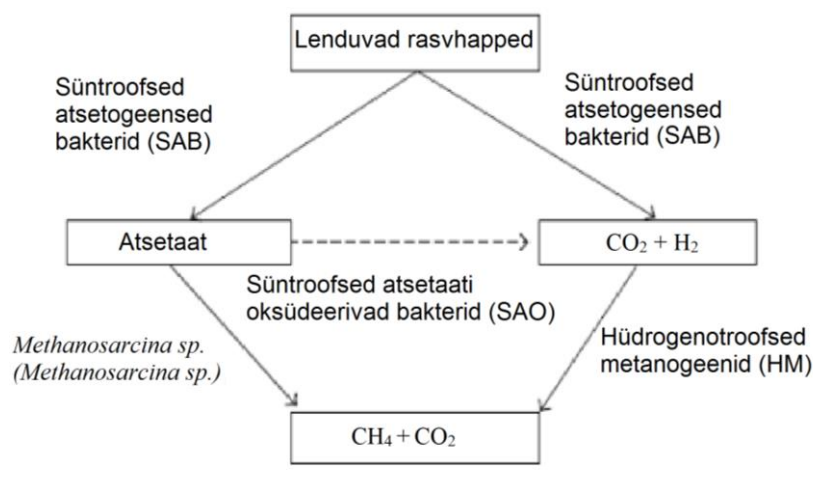


Selles osalevad mikroobid seltsidest *Methanobacteriales* ja *Methanomicrobiales* nii mesofiilses kui termofiilses süsteemis ning liigid perekonnast *Methanosarcina*. Süntroofne atsetaadi oksüdatsioon koos hüdrogenotroofse metanogeesiga on ülekaalus orgaaniliste hapete akumulatsioonil, termofiilses keskkonnas, kõrgel ammoniumi kontsentratsioonil. (Shah *et al*, 2014)

**Atsetoklastilisel metanogeesil** kasutavad mikroobid atsetaati:



Atsetoklastilisel metanogeesil osalevateks mikroobideks on liigid perekondadest *Methanosarcina* (domineerivad kõrgema atsetaadi kontsentratsiooni juures) ja *Methanosaeta* (domineerivad madala atsetaadi kontsentratsiooni juures). (Plugge *et al*, 2009) Mesofiilsetel tingimustel on soodustatud atsetoklastiline metanogees. (Shah *et al*, 2014) Üle 70% biometaanist tekib atsetaadi konversioonil, mistõttu on ka enamuse biogaasi reaktoreid mesofiilidele sobiva temperatuuriga.



**Joonis 4.** Atsetogeeni ja metanogeenide süntroofia anaeroobses reaktoris. SAB *Clostridium* sp, HM – põhiliselt *Metanobacteriales* ja *Methanomicrobiales* (Shah *et al*, 2014).

**Metülotroofselt metanogeesil** on substraatideks metüleeritud C1 ühendid, nt metanool, metüülamiinid või dimetüülsulfiidid. Mitmete uuringute põhjal pärineb metanoolist vähem kui 5-10% kogu metanogeesist.



Metülotroofsel metanogeneesis osalevad liigid perekonnast *Methanosarcina*, nt *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanolobus zinderi* (obligatoorne metülotroof) (Penger *et al.*, 2012).

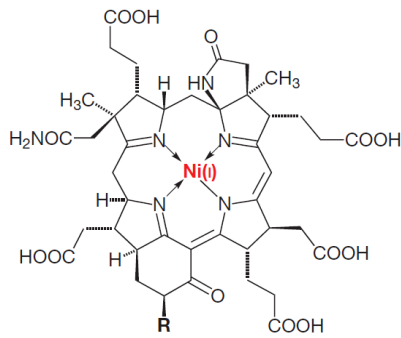
**Tabel 3.** Metanogeensete arhede omadused ja võimalikud substraadid (Ziemiński 2012).

Liik	Substraadid	Optimaalne temperatuur (°C)	Optimaalne pH
<i>Methanobacterium Brytanii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	37	6,9-7,2
<i>Methanobacterium formicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formaat	37-45	6,6-7,8
<i>Methanobacterium thermoalcaliphilum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	58-62	8,0-8,5
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicum</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	65-70	7,0-8,0
<i>Methanothermobacter wolfii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	55-65	7,0-7,5
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formaat	37-39	-
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formaat	37-39	-
<i>Methanothermus fervidus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formaat	83	<7,0
<i>Methanothermococcus thermolithotrophicus</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formaat	65	-
<i>Methanococcus voltaei</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formaat	35-40	6,0-7,0
<i>Methanococcus vannileii</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formaat	65	7-9
<i>Methanomicrobium mobile</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formaat	40	6,1-6,9
<i>Methanolacinia paynteri</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	40	7,0
<i>Methanospirillum hungatei</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , formaat	30-40	-
<i>Methanosarcina acetivorans</i>	metanool, atsetaat	35-40	6,5
<i>Methanosarcina barkeri</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , metanool, atsetaat	35-40	5-7
<i>Methanosarcina mazei</i>	metanool, atsetaat	30-40	6-7
<i>Methanosarcina thermophila</i>	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> , metanool, atsetaat	50	6-7
<i>Methanococcoides methylutens</i>	metanool	42	7,0-7,5
<i>Methanosaeta consilii</i>	atsetaat	35-40	7,0-7,5
<i>Methanosaeta thermophila</i>	atsetaat	55-60	7

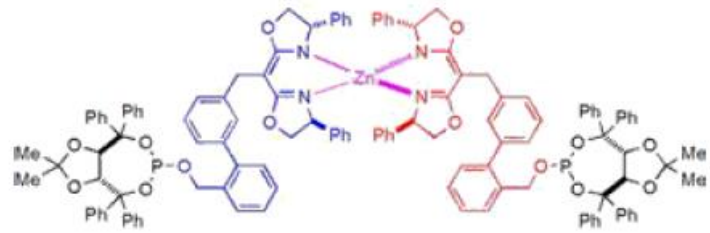
### Metallid metanogeneesis

Metanogenees on üks metalliderikkamaid ensümaatilisi radu bioloogias. Täpne metallide vajadus võib, olenevalt rajast erineda, kuid üldine tendents on sarnane: kõige enam vajab metanogenees Fe, seejärel Ni ja Co ning väiksemas koguses Mo (ja/või W) ja Zn. Vähene Fe, Ni ja Co saadavus limiteerib metanogeneesi nii puhas- kui segakultuuris. (Glass & Orphan, 2012).

Koensüüm F<sub>430</sub>

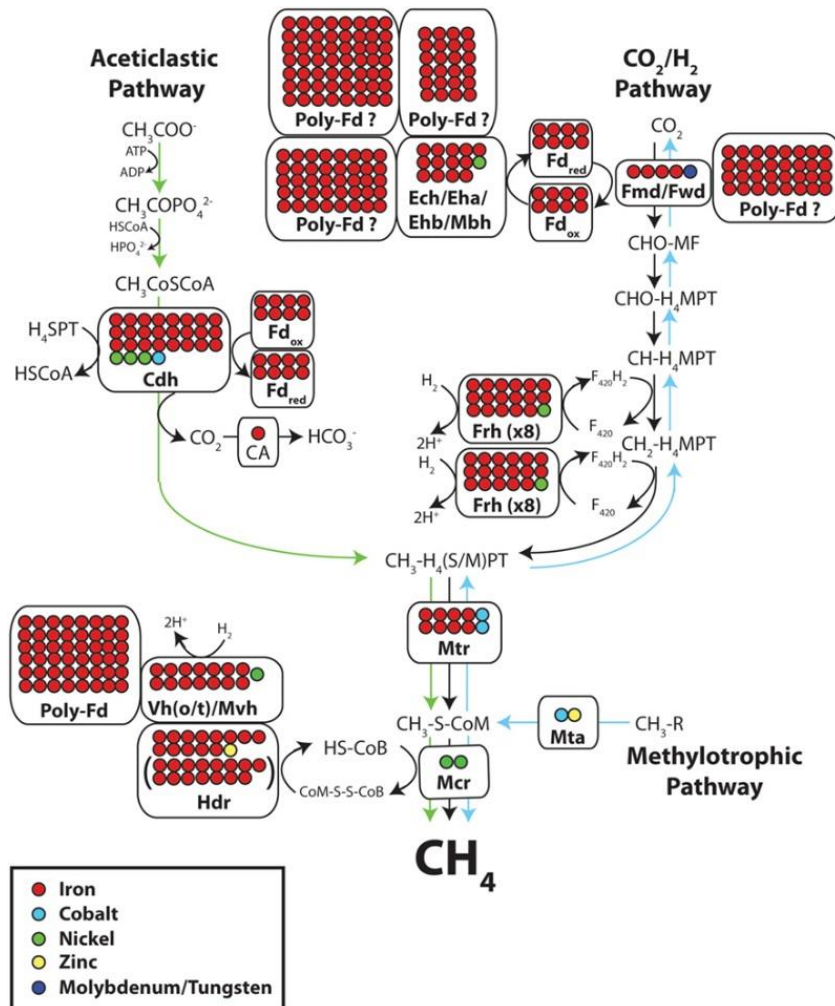


Metanopteriin



**Joonis 5.** Mõned koensüümid ja prosteetilised rühmad metanogeneesis (*coenzymes and prosthetic groups of methanogenes*) (Scheller *et al*, 2010; Ziemiński, 2012).

Fe vajadus metanogeneesis on tohutu – peaaegu iga ensüüm rajas sisaldab mitut Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>, või Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> klastrit.

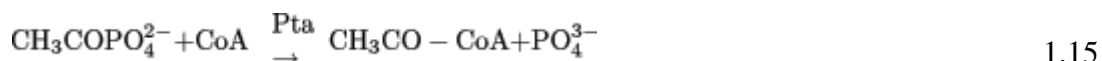


**Joonis 6.** Metallide sisaldus metalloensüümidel kolmes metanogeneesi rajas: H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (mustad nooled), atsetoklastiline (rohelistes nooled) ja metülotroofne (sinised nooled). Iga täpp tähendab metalliaatomit. (Glass & Orphan, 2012)

Liigid perekonnast *Methanosarcina* liigid on biogaasi tootmises väga olulised: nad on võimelised kasutama nii hüdrogenotroofset kui atsetoklastilist rada ehk nii CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> kui ka atsetaati, lisaks võimelised kasutama metanooli ja metüülamiine, on suurema kasvukiirusega (poolestusaeg 1-1,2 päeva) kui teised metanogeenid (poolestusaeg 4-6 päeva), on pH suhtes vähem tundlikud ja taluvad kõrgemat ammooniumi kontsentratsiooni (Shah *et al*, 2014). Samas on andmeid, et mõned hüdrogenotroofsed metanogeenid (*Methanospirillum hungatei*, *Methanoculleus receptaculi*) on kiirema kasvuga (poolestusaeg kuni 6h) kui mõned atsetoklastilised metanogeenid (*Methanosarcina thermophila*) (poolestusajaga 2,6 päeva). (Merlin Christy *et al*, 2014)

### **Perekonna *Methanosarcina* mitmekesise metabolismi oletatav põhjus**

Atsetoklastiline metanogeneesis algab metanogeensetel arhidel atsetaadi aktiveerimisega atsetüülkoensüüm A-ks. *Methanosaetaceae* sugukonna liikmed kasutavad selleks üheastmelist atsetüül-CoA süntaasi (ACS) rada, kuid perekond *Methanosarcina* liikmed kaheastmelist atsetaatkinaasi (AckA)-fosfoatsetüültransferaasi (Pta) rada. AckA/Pta rada (võrrand 1.14) on energeetiliselt tõhusam, vajades ainult ühte ATP molekuli ühe atsetaadi molekuli aktiveerimiseks: (Rothman *et al*, 2014)



(Fournier & Gogarten, 2007)

ACS rada (võrrand 1.15) vajab selleks kahte ATP molekuli (Rothman *et al*, 2014) konverteerides ATP, CoA ja atsetaadi atsetüül-CoA-ks ja pürofosfaadiks (PPi). (Berger *et al*, 2012)

*Methanosarcina* tõhusam rada arenes pärast Kesk-Ordoviitsiumi maismaa soontaimede evolutsiooni – 450-500 miljon aastat (Ma) tagasi üheainsa horisontaalse geeniülekanne sündmuse tagajärjel, tõenäoliselt tsellulolüütilistelt *Clostridia* bakteritelt. Hilis-Permian, umbes 252,28 (Ma) tagasi, leidis aset suurim organismide väljasuremine Maal (Rothman *et al*, 2014), kui kadus umbes 95% mereliikidest ja 75% mandriliikidest. (Shen & Bowring, 2014). Samal ajal, Hilis-Permian toimus AckA/Pta horisontaalne ülekanne *Methanosarcina* perekonna siseselt. Vahetult enne väljasuremist toimus Maal suurim teadaolev vulkaaniline sündmus, Siberi vulkanism, mis vabastas metanogeneesiks hädavajalikku kofaktori Ni, võimaldades metanogeenide arvukuse kiiret kasvu. Selle tulemusena suurenes plahvatuslikult metaani tase,

tõusis süsihappegaasi ja vähenes niigi madal hapniku tase, ookeanid hapestusid. Anaeroobne metaani oksüdeerimine võis suurendada ka sulfiidide tasemeid, tõenäoliselt vabastades atmosfääri toksilist vesiniksulfiidi. (Rothman *et al*, 2014)

### **Anaeroobse metanogeense mikrobioomi mitmekesisust mõjutavad:**

- keskkond – temperatuur, pH, substraadi tüüp, metaboliidid (lenduvad rasvhapped, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S jne)
- uute liikide ilmumine.

Hüdrolüütilised, atsetogeensed ja metanogeensed prokarüooidid erinevad oluliselt füsioloogia, toitumisvajaduste, kasvukineetika ja keskkonnatingimustele tundlikkuse poolest. Atsidogeensete ja metaani tootvate mikroorganismide vahelise tasakaalu puudumine on peamine biogaasi reaktori ebastabiilsuse põhjus. (Braun *et al*, 2010) Biogaasi mikroobikooslusi moodustavad bakterite domeenist peamiselt hõimkonnad *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* ja arhede domeenist rühma *Euryarchaeota* metanogeenid.

Rasvarikas substraat soodustab *Thermosediminibacter litoperuensis* esinemist. Kõrgem orgaanika sisaldus soodustab hõimkonna *Firmicutes* liikide domineerimist. Mesofiilsetel temperatuuridel domineerivad hõimkonnad *Bacteroidetes* ja *Chloroflexi*. (Carballa *et al*, 2015) Metaboliidid, nagu lenduvad rasvhapped, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S häirivad tihti metaankääritamist. Metaani teket võib mõjutada nii lämmastiku puudus kui liig. NH<sub>3</sub> difundeerub vabalt rakku, põhjustades prootonite tasakaalu muutust ja/või kaaliumi puudust. (Braun *et al*, 2010) Hõimkonnast *Firmicutes* klassi *Clostridia* liigid panustavad valkude ja tselluloosi lagundamisse, klassi *Bacilli* liigid lagundavad rasvu ja süsivesikuid. Hõimkondade *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* liigid on ära mainitud olulistena tahkete jäätmete põhistes reaktorites. (Carballa *et al*, 2015)

### **Kolm põhilist mikroobikoosluse säilimise mehhanismi**

Anaeroobsete reaktorite haldamisel on vaja teada, kuidas reageerivad mikroobikooslused protsessi ja keskkonna häiretele. Funktsionaalse stabiilsuse ja efektiivsuse säilitamises mängivad olulist rolli kolm ökoloogilist parameetrit:

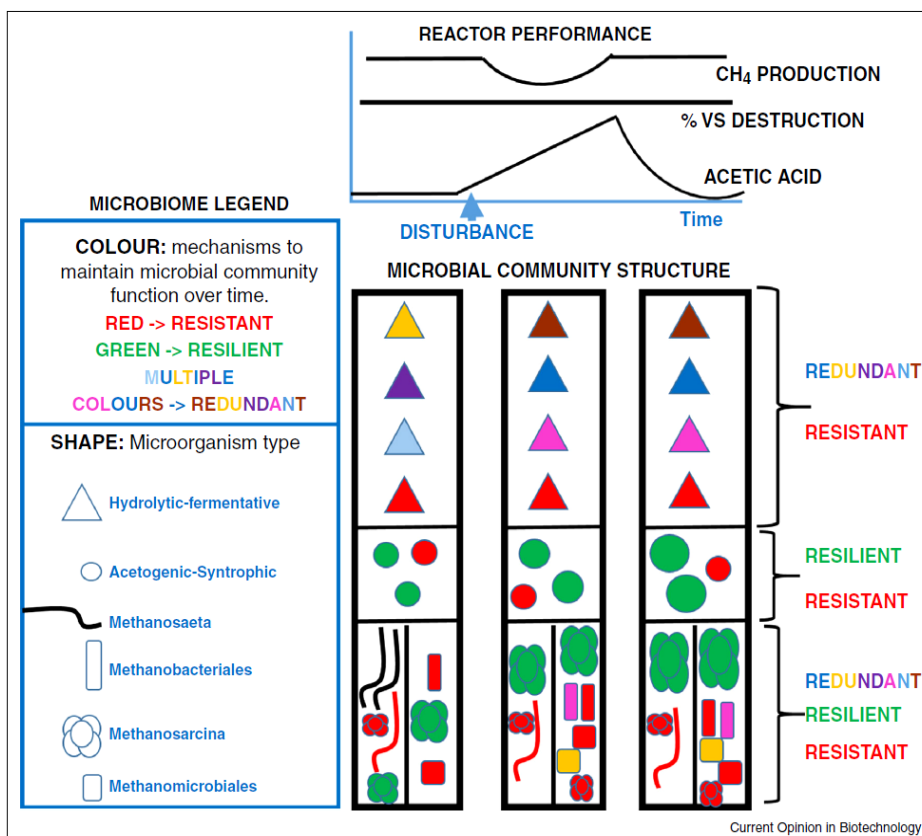
- mikroobikoosluse mitmekesisus
- mikroobikoosluse struktuuri ühtlus
- mikroobikoosluse dünaamika ajas.

Kuigi on ka vähese mitmekesisusega reaktoreid, mis töötavad stabiilsetel tingimustel (nt. sellised, mis töötlevad lihtsaid substraate või töötavad kõrgel temperatuuril), võimaldab funktsionaalselt mitmekesine mikroobikooslus iga troofilise astme paralleelsete radade toimimist. Seepärast on suur mitmekesisus tihti korrelatsioonis hästitoimiva anaeroobse reaktoriga. Selle seletuseks on anaeroobse mikroobioomi vastupidavus, paindlikkus ja funktsionaalne redundantsus kui kolm põhilist mikroobikoosluse säilimise mehhanismi:

- **Vastupidavus** (*ingl. k. resistance*) – populatsioon võime muutustele vastu pidada ilma, et kooslus muutuks, tuumikmikrobioom.
- **Paindlikkus** (*ingl. k. resilience*) – populatsiooni võime taastuda pärast häirimist. Nt *süntroofsed kooslused* – üldkoosluses on vähemuses, kuid oma funktsioonile äärmiselt spetsialiseerunud st. süsteemi taastumine sõltub nende taastumisest.
- **Funktsionaalne redundantsus** – uus populatsioon asendab vana, kuid funktsioon jääb samaks, mis eelmisel, nt *hüdrolüütilised-fermentatiivsed kooslused*.

**Arhed** on vähem mitmekülgsed, metaboolselt aeglasemad ja vähem paindlikud kui bakterid, seega metanogeneesis on tundlikum stressi ja ebastabiilsuse suhtes. Metanogeenide seas võiksid olla: *Methanobacteriales* – vastupidavad; *Methanosaeta* – redundantsed; *Methanosarcina* ja *Methanomicrobiales* - paindlikud ja redundantsed. Nende kolme tüüpi mikroobipopulatsioonide kombineerimine tagab igakülge funktsionaalse stabiilsuse ja võimaldab mikroobikooslusel toime tulla keskkonnastressi või protsessi kõrvalekalletega. (Carballa *et al*, 2015) Joonis 7 kujutab anaeroobse mikroobioomi reaktsiooni häiretele, kus

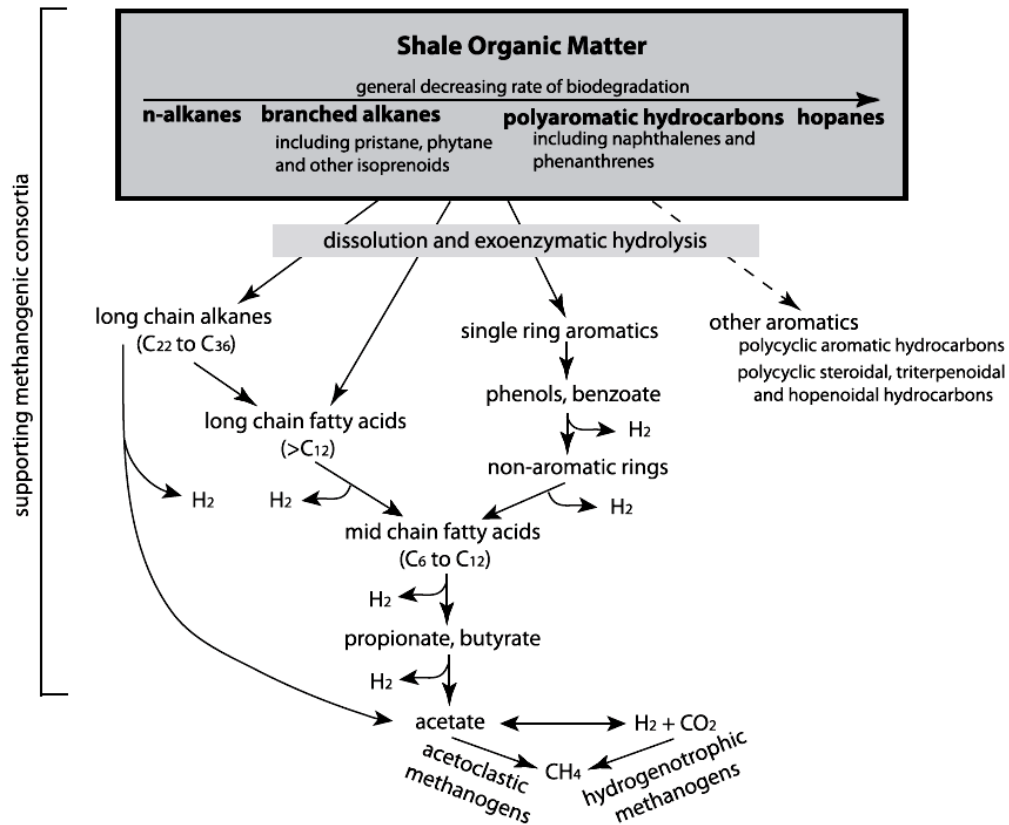
- Hüdrolüüsi-fermentatsiooni häirimine ei mõjuta reaktori toimimist tänu mikroorganismide funktsionaalsele redundantsusele (orgaanilise aine lagundamine on konstantne);
- Atsetogeneesi-süntroofia häirimine (atsetaadi kuhjumine) mõjutab reaktori toimimist, kuid populatsioon taastub tänu mikroorganismide paindlikkusele;
- Metanogeneesi häirimine mõjutab samuti reaktori toimimist (metaani teke vähenenud), kuid protsess taastub tänu mikroorganismide paindlikkusele ja funktsionaalsele redundantsusele;
- Resistentid mikroorganismid esinevad eeldatavasti kõigis staadiumites.



**Joonis 7.** Anaeroobse mikroobioomi reaktsioon häiretele (selgitused tekstis) (Carballa *et al*, 2015).

### Argilliidi orgaanilise aine lagunemise mehhanism

Sügavate pinnasekihtide orgaanikarikkad kihistud nagu kildad ja söelademed, kus terminaalsete elektronaktseptoreid on limiteeritud, esindavad ühte elu piiriala. Selles anaeroobses keskkonnas lagundab mikroobide konsortsium raskesti lagundatava orgaanilise materjali CO<sub>2</sub>-ks ja atsetaadiks, mille metanogeenid metaboliseerivad looduslikuks (ehk biogeenseks) gaasiks. Geopolümeeride biodegradatsiooni etappide ja nendes osalevate mikroorganismide uuringud on algusjärgus. Joonisel 8 on toodud kilda orgaanilise aine võimalikud biodegradatsiooni etapid ja nendega seotud ning metaani tekkeks vajalikud ühendid. Kilda ligniini-laadsest orgaanilisest ainest (kerogeenist) tekivad pikaahelalised alkaanid, ühe benseenituumaga aromaatsed ühendid ning polütsükliilised aromaatsed ühendid jms., mis kõik lagundatakse butüraadiks ja propionaadiks, need edasi atsetaadiks ja lõpuks metaaniks. (Schlegel *et al*, 2013) Domineerivaks rajaks on atsetoklastiline metanogenees (joonis 8).



**Joonis 8.** Kildas sisalduvate geopolümeeride biodegradatsiooni mehhanism. (Schlegel *et al*, 2013; Kutschke 2015)

Kildas sisalduvate geopolümeeride biodegradatsiooni mehhanismi on selgitanud Kutschke 2015 ja sellest on juttu alljärgnevas metallide bioleostamist käsitlevas peatükis.

## 1.2 Metallide bioleostamine

Bioleostamine on metallide lahustumine maagist, kasutades bioloogilisi süsteeme, peamiselt prokariootseid mikroorganisme. (Johnson 2014) Kõrge metallide sisaldusega maagid on ammendumas, mistõttu muutub vajalikuks eraldada metalle madala metallide sisaldusega ja komplekssematest maakidest, et rahuldada maailma nõudlust metallide järele. Seal, kus need maagid sisaldavad mineraalseid sulfiide, saavad kindlad rauda ja väävlit oksüdeerivad atsidofiilsed mikroorganismid katalüüsida sulfiidide oksüdatiivset lahustumist. Potentsiaalne madala metallide sisaldusega polümetalse sulfiidse kõrge orgaanilise süsiniku sisaldusega maagi bioleostamise tehnoloogia on päevakajaline teema. (Watling 2013)

### 1.2.1 Metallisulfiidide bioleostamine

Atsidofiilsete kemolitotroofsete bakterite ja arhede võimet kiirendada sulfiidsete mineraalide oksüdatiivset lahustumist on rakendatud sulfiidsetest maakidest või kontsentratsioonidest metallide eraldamiseks. Praegusel ajal kasutatakse bioleostamist peamiselt vase leostamiseks sulfiididest, kuid seda kasutatakse ka teiste põhimetallide nagu Co, Ni ja Zn eraldamiseks. Mõnel juhul, näit. kulla ja teiste väärismetallide biokaevandamisel, kasutatakse mikroorganisme metalle sisaldavate mineraalide eraldamiseks; metallid lahustatakse sellele järgnevas protsessis. Sellist bioloogilist eeltötlust nimetatakse biooksidatsiooniks. Nii bioleostamine kui biooksidatsioon toimivad samadel põhimõtetel ja sarnaste mikroorganismide konsortsiumitega. Hinnanguliselt 15% vaske, 5% kulda ja väiksemad kogused teisi metalle (Ni, Zn) kaevandatakse maailmas praegu bioleostamise tehnoloogia abil. (Johnson 2014)

Bioleostamist ja biooksidatsiooni vahendavad atsidofiilsed konsortsiumid jagunevad:

- raud(III)iooni genereerivad autotroofid (primaarsed prokarüoodid) – kes toodavad mineraalset oksüdeerijat;
- väävelhapet genereerivad autotroofid (sekundaarsed prokarüoodid) – tagavad keskkonnas madala pH;
- heterotroofsed ja miksotroofsed (tertsiaarsed) prokarüoodid – lagundavad orgaanilisi ühendeid.

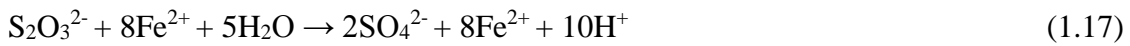
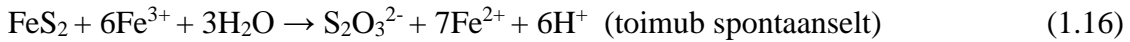
Nende rühmade vahel on olulisi kattuvusi, sest mõned autotroofid kui ka heterotroofid ja miksotroofid võivad oksüdeerida nii rauda kui väävlit (või mõlemat).

Bioleostamise keskkonna ekstreemne füüsikalise-keemiline olemus - madal pH, kõrgendatud (toksiliste) metallide, mittemetallide, lahuste kontsentratsioonid ja kõrge redokspotentsiaal - on tugevalt toksiline suuremale osale elusvormidele, sh ka mikroorganismidele. Kuigi on teada paljud erinevad madala pH juures raud(II)iooni oksüdeerivad bakterite ja arhede liigid, kes teoreetiliselt võiksid oksüdeerida ka sulfiidseid mineraale (raud(III)iooni vahendusel), siis tundlikkus ekstreemsetele tingimustele jätab biokaevandamise kontekstis „sõelale“ vaid mõned neist - *Leptospirillum ferriphilum* on tihti domineeriv rauda oksüdeeriv autotroof, *Acidithiobacillus caldus* on domineeriv väävlit oksüdeeriv autotroof. *Sulfobacillus spp.* (fakultatiivsed autotroofid) ja/või rauda oksüdeerivad *Euryarchaeotes* (*Ferroplasma* või *Acidiplasma spp.*; obligatoorsed heterotroofid) vahendavad orgaanilise süsiniku degradatsiooni (Johnson 2014).

### 1.2.1.1. Metallisulfiidide lahustumise rajad

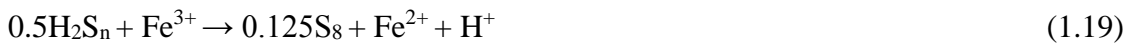
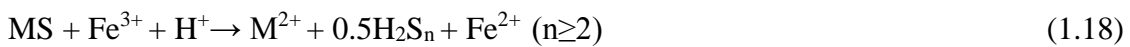
Metallisulfiidide (MS) bioleostamist viivad läbi väga erinevad bakterid, kuid metallisulfiidide lahustumise (bio)keemia järgib vaid kahte rada, mille määrab sulfiide lahustuvus happes (Rohwerder & Sand, 2007):

**Tiosulfaadi rada** – happes lahustumatutele metallisulfiididele (FeS<sub>2</sub>, MoS<sub>2</sub> ja WS<sub>2</sub>).



(Dempers *et al*, 2003)

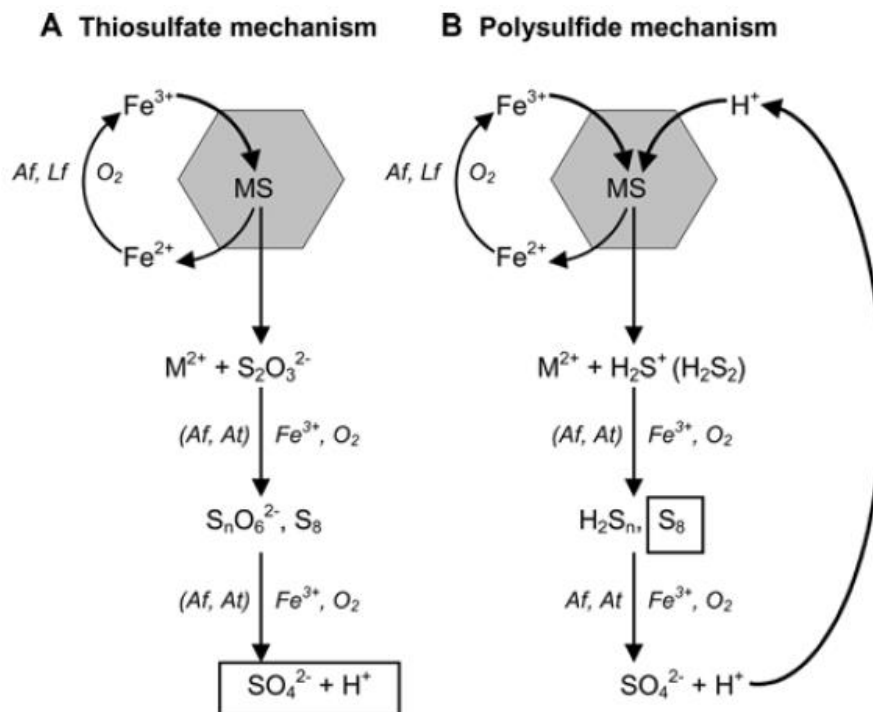
**Polüsulfaadi rada** – happes lahustuvatele metallisulfiididele (ZnS, PbS, FeAsS, CuFeS<sub>2</sub> ja MnS<sub>2</sub>)



**Raua oksüdeerijad regenereerivad Fe<sup>3+</sup>:**



(Johnson, 2014)



**Joonis 9.** Tiosulfaadi raja (A) ja polüsulfiidi raja (B) võrdlus metallisulfiidide bioleostamises (selgitused tekstis). (Rohwerder & Sand, 2007; Vera *et al*, 2013).

Raud(III) ioon redutseeritakse reaktsioonis metalli sulfiidiga (MS) raud(II) iooniks ning vabanevad metalli katioon ( $M^{2+}$ ) ja väävli vaheühendid. Raud(II)iooni oksüdeerivad bakterid *Acidithiobacillus ferrooxidans* ja *Leptospirillum ferrooxidans* tagavad raud(III) iooni regenereerimise happelises keskkonnas. (B) Polüsulfiidi mehhanismi puhul lisandub metalli sulfiidi mikroobsele oksüdatsioonile veel prootonite toime. Väävliühendite oksüdatsioon toimub enamasti abiootiliselt, kuid võimalik on ka oksüdeerumine bakterite (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*) vahendusel. Lühendid: Af - *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Lf - *Leptospirillum ferrooxidans*, At - *Acidithiobacillus thiooxidans*. Kui bakterite lühendid on sulgudes, siis toimub protsess peamiselt abiootiliselt. Elektronaktseptorid paiknevad nooltest paremal. Kastiga on märgitud peamised reaktsiooni produktid k.a. väävelhape tiosulfaadi rajas ja elementaarne väävel polüsulfiidi rajas, mis akumulatsioonid väävliühendite oksüdeerijate puudumisel. Antud võrrandid ei ole stöhhiomeetrised. (Rohwerder & Sand 2007)

#### 1.2.1.2 Hapete ja kelaativate ainete biogenerimine

Mikrobioloogiliselt genereeritud anorgaanilised happed, nagu lämmastikhape, lämmastikushape, väävelhape, väävlishape ja süsihape, võivad muuta mineraalide struktuuri nõrgemaks. Väävelhapet ja väävlishapet toodavad *Acidithiobacillus* liigid, aga ka *Thiothrix*, *Beggiatoa* ja mõned seened. Lämmastikhapet ja lämmastikushapet toodavad ammoniaaki ja nitritit oksüdeerivad organismid, heterotroofsed nitrifitseerivad organismid ja mõned seened. Süsihape on energiametabolismi lõpp-produkt, kui süsinikdioksiidi reageerib veega, kuid see on nõrk hape ja tõenäoliselt mineraalide lahustumisse oluliselt ei panusta. (Watling 2015)

Kõik mikroorganismid eritavad orgaanilisi happeid, eriti kui kasv ei ole tasakaalustatud. Hästi on see teada piimhappe- ja äädikhappebakterite kohta. Orgaanilised happed nagu oblikhape, sidrunhape, glükoonhape, õunhape, merevaikhape, aminohapped, nukleinhapped ja uroonhapped, võivad soolade moodustumise ja kompleksimoodustamise reaktsioonide vahendusel mineraale lahustada.

Siderofoorid on mikroorganismide poolt toodetavad ühendid raua omastamiseks vähese raua saadavuse korral, neil on tugev afiinsus raud(III) ja mangaan(III) suhtes, mida nad kelaadivad ja transpordivad rakkudele. Uuringutes on näidatud siderofooride põhjustatud mangaani oksiidide ja hematiti ( $Fe_2O_3$ ) lahustumist orgaaniliste hapete juuresolekul. Siderofoorid ja orgaanilised happed toimivad sünergistiliselt – mikroorganism ja/või orgaaniline hape seonduvad mineraali pinnaga ja eraldavad raua või mangaani mineraalid, siderofoor kelaadib raua

lahusest, vähendades sellega vaba raua kontsentratsiooni ja soodustades lahustumisreaktsiooni. (Watling 2015)

### 1.2.2 Metallorgaaniliste ühendite biodegradatsioon

Cu, Fe, Se, Ag, Cd ja Bi esinevad kiltades tüüpiliselt mineraalses vormis. V, Ni, Mo, Re ja U domineerivad raskemini eraldatavate porfüriini-seoseliste metallidena. Metalloporfüriine peetakse lagundamisele kõige resistentsemateks ühenditeks.

Mikroobse mitmekesisuse uuringud on oluline osa mõistmaks, kuidas lademed moodustuvad, kuid ainult vähesed uuringud kirjeldavad kultiveeritavaid liike. Isoleeriti kaks heterotroofsete bakterite tüve, *Bacillus (B.) cereus* ja *B. amyloliqueficiens*, ja kasutati neid metallide eraldamiseks (pH 7 juures) Kupferschiefer'i musta kilda maagi metallorgaanilisest komponendist. Metallorgaanilisi komponente lagundavate heterotroofsete isolaatide hulgas oli *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Brevibacillus*, *Microbacterium* ja *Bacillus* liike. Enamus isolaate olid võimelised kasutama lihtsaid orgaanilisi ühendeid, nagu happed ja suhkrud; üks isolaat oli võimeline lagundama fenantreeni (aromaatne süsivesinik) ja mitmed isolaadid suutsid lagundada sünteetilisi metalloporfüriine. Kõik tüved kasvasid musta kilda maagil kui ainsal energia- ja süsinikuallikal, mille tulemusena suurenes vähesel määral lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon ( $14\text{--}16\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) võrreldes kontrolliga ( $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 30 päeva möödumisel. (Watling 2015)

Uuringus, kus kasutati erinevaid valitud segakultuure liikidest *Bacillus*, *Streptomyces*, *Burkholderia* ja/või *Pseudomonas* naturaalsel konsortsiumi kohalikest bakteritest leiti, et sünteetiliste Cu-, V-, Ni- ja Fe-oktaetüülporfüriini ühendite lagundamine oli aeglane. Maksimaalne eraldumine sünteetilisest metalloporfüriinidest 8 nädala pärast oli Cu 80%, Ni 72% ja V 4% , kui eraldumine kilda orgaanilisest materjalist oli Cu 32%, Ni 81% ja V 12%. Metallide eraldumise suurenemine nendes eksperimentides oli kooskõlas lahuses olnud lahustunud orgaanilise süsiniku sisalduse vähenemisega.

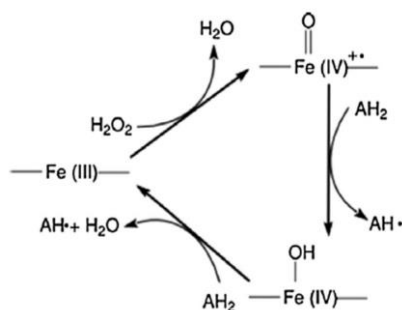
Saksamaal, Ranstadi uraanikaevanduses (praeguseks suletud), rakendati heterotroofsed bakterid, *Pm. fluorescens*, *Shewanella (Sh.) putrefaciens* ja *Pm. stutzeri*, uraani eraldamiseks maagijääkidest. Uuringu eesmärk oli pigem metallide mobiliseerimine jääkidest ja testideks valitud liigid olid tuntud ligande tootvad bakterid. Autorid leidsid, et ligandid võivad suurendada mikrotoitainete - Cr, Co, Cu, Mn, Fe, Mo, Ni, V or Zn ning võimalike lantaniidide ja aktiniidide elementide, liikuvust pH 7 juures. (Watling 2015)

Mitmed autorid (Kim & Crowley, 2007; Matlakowska *et al.*, 2012, 2010; Petsch *et al.*, 2005; Sadowski *et al.*, 2007) on näidanud eraldatava orgaanilise materjali edukat lagundamist Lubin Kupferschiefer-is ja teistes mustades kiltades. Vaadeldud lagundamine tugines peamiselt fakultatiivsete aeroobsete heterotroofsete neutrofiilide nagu, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Microbacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, ja *Streptomyces sp.* kui ka mitmete seente metaboolsel aktiivsusel. Matlakowska *et al.* (2013) tõestasid 70% orgaanilise aine lagunemist heterotroofse konsortsiumiga pärast 30 päevast inkubeerimist. (Kutschke 2015) Bakterite ekstratsellulaarsete metaboliitide roll Ca, Na, Mg, Si, Al, Cu, Co, As, V, Zn, Ni, Mo, Fe ja Mn mobiliseerimises oli selgelt tõestatud. (Matlakowska *et al.*, 2014)

Heterotroofsete bakteritega leostamise puhul tekivad küsimused, missugust süsinikuallikat peaks kasutama maksimeerimaks nende kasvu ja orgaanilise happe tootmist, samuti missugused happed oleksid kõige tõhusamad sihtmetailidele ja kas orgaanilise süsinikuga allikaga varustamine on taotletava protsessi jaoks ökonoomne. (Watling 2015)

### 1.2.2.1 Porfüriinide lagundamine

Geoporfüriinide mikroobse lagundamise mehhanism pole senini hästi teada. Eelpoolmainitud mikroorganismide kasutamisega saab lagundada vaid leostuvaid, st veeslahustuvaid ühendeid; mitteleostuv orgaaniline aine (k.a. kerogeen) on endiselt probleem. Lähtuvalt kerogeeni ligniinisarnasest struktuurist võivad lahenduseks olla nt Dyp-Type peroksidaasid e. bakteriaalsed peroksidaasid, nt heemi peroksidaasi ensüümide perekond liigil *Rhodococcus* ([https://en.wikipedia.org/wiki/DyP-type\\_peroxidase\\_family](https://en.wikipedia.org/wiki/DyP-type_peroxidase_family)) Peroksidaasid on radikaalreaktsiooniga võimelised lagundama väga keerukaid ja ebakorrapäraseid struktuure (joonis 10).



**Joonis 10.** Dyp-Type peroksidaaside radikaalataki mehhanism. (Kutschke 2015)

Natiivsed Dyp-Type peroksidaasid sisaldavad raud(III)iooni kofaktorina. Pärast oksüdeerumist vesinikperoksiidi toimet moodustuv raud(IV)ioon on seotud hapnikuga ning tekib katioonne radikaal. See tugevalt reaktiivne kompleks on võimeline eemaldama hüdriidi kõigilt substraadiks olevatelt ühenditelt sh ligniinilt ja kerogeenilt. Järgmise etapina toimub hüdroksüülradikaali ülekande uuele juhuslikule ühendile, mis omakorda moodustab radikaali ligniini või kerogeeni maatriksisse ning regenereerib natiivse ensüümi. Jätkuv radikaalatakk vabastab lõpuks väiksemaid ühendeid, mida on võimalik edasi lagundada. (Kutschke 2015)

Reaktiivsed hapnikuühendid (*reactive oxygen species*, ROS), nagu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or H• võivad tekkida ka anaeroobses keskkonnas (Sabumon 2009).

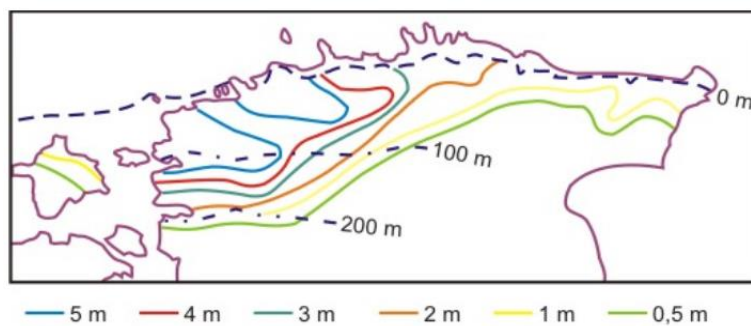
### 1.3 Graptoargilliit

**Graptooliitargilliit** ehk diktüoneemaargilliit (nimetatakse ka veel diktüoneemakildaks) on tavapärase põlevkiviliiki - orgaanilise ainega (12–17%, nim. ka kerogeen) läbi imbunud kõvastunud savikivim, mis levib katkematu kihina Eesti põhja- ja loodeosas Hiiumaalt Narvani. Kuid arvestatavad paksused (>3 m, max 8 m Osmussaarel) on jälgitavad siiski vaid Haapsalu-Tallinna vahelisel alal (joonis 12).



**Joonis 11.** Graptooliitargilliit

[http://kivid.blogspot.com/2011\\_11\\_01\\_archive.html](http://kivid.blogspot.com/2011_11_01_archive.html)



Graptooliitargilliidi levik.  
Pidev joon - samapaksusjooned, punktiir - lasumussügavus

**Joonis 12.** Graptoargilliidi levik Eestis

<http://www.ut.ee/BGGM/maavara/dityoneema.html>

Põlevat orgaanilist ainet sisaldava argilliidi varud on hiiglaslikud, hinnanguliselt ligikaudu 60 miljardit tonni. Suurem osa neist lasub ka kaevandamiseks kättesaadavas sügavuses, avanedes paekaldajärsaku jalamil üsna madalal. Paraku on kõnealuse kivimi kasutamine maavarana tõkestatud mitme asjaoluga. Esiteks on temas leiduva orgaanilise aine sisaldus madal (12–17%, keskmiselt 13–14%), mis teeb kütteväärtuseks üksnes 1500–1600 kcal/kg (5–7 MJ/kg,

õlisaagis 2-6%). Teisisõnu, nii kõrge tuhasusega kütuseliigi kasutamine ei tule tänapäeva tehnilistes oludes kõne alla ei tehnoloogiliselt ega majanduslikult. Teiseks piirajaks on argilliidi kõrge rauasulfiidse mineraali - püriidi ( $\text{FeS}_2$ ) - sisaldus, mis tõuseb kohati 8-9%, püsides enamasti siiski 2,4-6,0% piires. See väevliühend laguneb põletusprotsessidel vääveloksiidseks gaasiks, mis põhjustab atmosfäärisaastet. (<http://www.ut.ee/BGGM/maavara/dityoneema.html>)

Perspektiivikamaks on loetud argilliidis esinevate haruldaste ja hajutatud elementide kõrgendatud sisaldust. Märkimist väärivad uraan, molübdeen, vanaadium, plii, tsink ja reenium, mille sisaldus kivimis ületab kümneid kordi nende maakoos esineva keskmise hulga. (<http://www.ut.ee/BGGM/maavara/dityoneema.html>) Eesti argilliit sisaldab märkimisväärset koguses raskmetalle (Lippmaa *et al*, 2009), olles rikastatud uraani (minimaalne rikastusväärtus, *minimum enrichment value*, m.e.v. 30 ppm), molübdeeni (m.e.v. 200 ppm), vanaadiumi (m.e.v. 1000 ppm), plii (m.e.v. 100 ppm) ja koobaltiga (m.e.v. 30 ppm), aga ka tsingi, reeniumi, nikli jt. elementidega. (Petersell, 2008, Voolma *et al*, 2013)

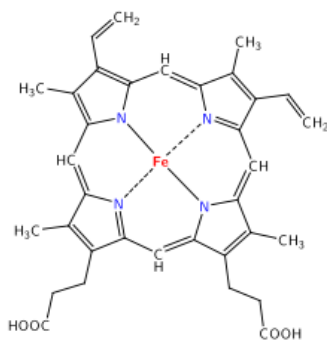
Metallid esinevad argilliidis kas sulfiidsete mineraalidena



**Joonis 13.** Püriit galeniidi soonega

<http://www.ut.ee/BGGM/miner/pyriit.html>

või metallorgaaniliste ühendite (geopolümeeride) koosseisus. [21]



**Joonis 14.** Porfüriin raua aatomiga

<https://en.wikipedia.org/wiki/Porphyrin>

Siiski ei tõuse see sisaldus kusagil tänapäevaste maakide tasemele, mistõttu neist metallidest saaksime rääkida üksnes kui kaasnevatest maavaradest, mille kasutamine tuleks kõne alla vaid argilliidi kompleksel kasutamisel. Kõige kaugemale on sel teel mindud uraani kasutuselevõtul, milleks rajati Sillamäele vastav rikastuskombinaat. Teisele maailmasõjale järgnenud aastatel, 1946-1952 kaevandati Sillamäel toorainena uraani, milleks rajati ka Sillamäele vastav rikastuskombinaat. Sillamäe kaevanduses toodeti üle 270 000 tonni argilliiti, millest saadi ainult 22,5 tonni uraani. Sobivamate maagilasundite leidmisel Venemaalt sellest aga loobuti. (<http://www.ut.ee/BGGM/maavara/dityoneema.html>)

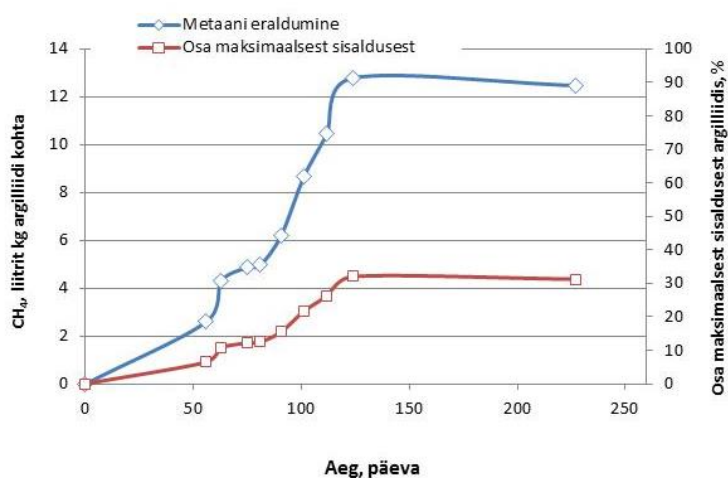
#### 1.4 Graptoliitargilliidi lõhustamine mikroobikoosluse abil koos kaasneva metallide leostumisega

Argilliidi orgaanilise osa lagundamist anaeroobsetes tingimustes heterotroofsete mikroorganismide ja metanogeenide abil on juba uuritud Eestis Tartu Ülikoolis koostöös firma Biotap OÜ. Tehtud on esimesed mikroobikoosluse analüüsid ja katsetatud selle võimet argilliidi orgaanilist komponenti lagundada. Värskest purustatud argilliidi ja erinevate söötmetega kultiveerimiskatsete abil selekteeriti argilliidi orgaanilist osa lagundav mikroobikooslus (CELMS No EEUT ARGCON5, Menert *et al*, 2016), mida **käesolevas töös nimetatakse inokulumiks 5A**, kusjuures ühtlasi toimus metallide bioleostumine.

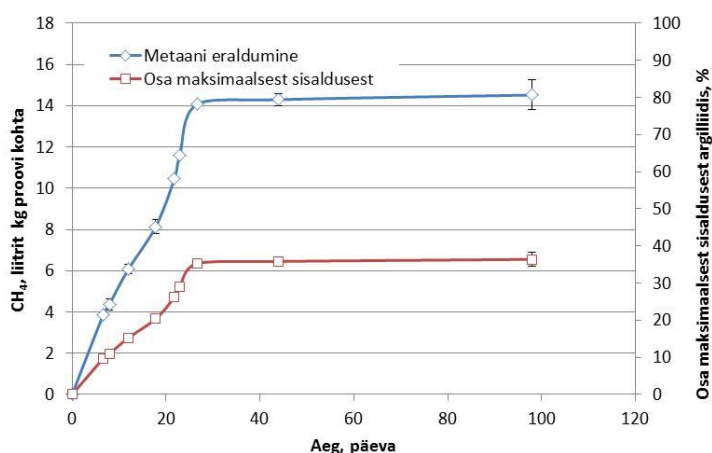
Eelnevalt selekteeriti tõhusaim argilliidi orgaanika (kerogeeni) lagundamist soodustav sööde. Metanogeensete mikroorganismide kasvatamisel segakultuuris on eriti oluline toitainelahuse piisav puhverdusvõime, sest kasvukeskkond kipub fermentatiivsete mikroorganismide metabolismiproduktide tõttu kiiresti hapustuma, metanogeenidele on aga soodne vaid leeliseline kasvukeskkond (vahemikus pH 7–9). Oluline on mikroelementide ja vitamiinide lisand, samuti soodustab metanogeenide kasvu metabolismi vaheproduktide ja metanogeensete substraatide (atsetaat, metanool, trimetüülamiin, CO<sub>2</sub> ja H<sub>2</sub> segu jms) lisamine. Toitelahusega R2A puljong + NaHCO<sub>3</sub> + betaiin isoleeritud kooslus sisaldas muuhulgas metalle leostavate omadustega ja ureaaset aktiivsust omavat perekonda *Ureibacillus* sp, kes võib olla vastutav porfüriinringi lõhustamise ning metallide ja orgaanika vabastamise eest. Ühtlasi saadi selle toitelahusega kõige mitmekesisem mikroobikooslus, kes kasutas efektiivselt argilliidi orgaanilist osa, mis viis edasisele metaani genereerimisele.

### 1.4.1. Gaasi eraldumine argilliidiproovidest

Argilliidi metallorgaaniliste komplekside lagunemise üheks tõendiks on metaani eraldumine gaasifaasi. Mikroorganismide abil võib mustast kildast eralduda 10-250  $\mu\text{mol CH}_4$  / g kivimi kohta. (Wuchter *et al*, 2013, Meslé *et al*, 2015). Katsetes kasutatud toitelahusega (R2A + betaiin) eraldus gaasifaasi aga tunduvalt rohkem metaani – maksimaalselt  $14.52 \pm 0.72$  liitrit metaani kg (648 $\pm$ 32  $\mu\text{mol/g}$ ) argilliidi kohta (joonised 15 ja 16). Argilliidi orgaanika lagundatav osa moodustas kuni  $36,40 \pm 1,80\%$  kogu orgaanilisest ainest. Metaani päritolu argilliidi orgaanilisest osast kontrolliti isotoopanalüüsiga  $\delta^{13}\text{C}$  meetodil (tabel 4), kus kerogeenselt materjalist pärit metaani tüüpiline väärtus on  $-50\%$ .



**Joonis 15.** Metaani eraldumise dünaamika argilliidist adapteerumata, argilliidile omase kultuuriga, kasutades söödet R2A puljong + NaHCO<sub>3</sub> + betaiin.

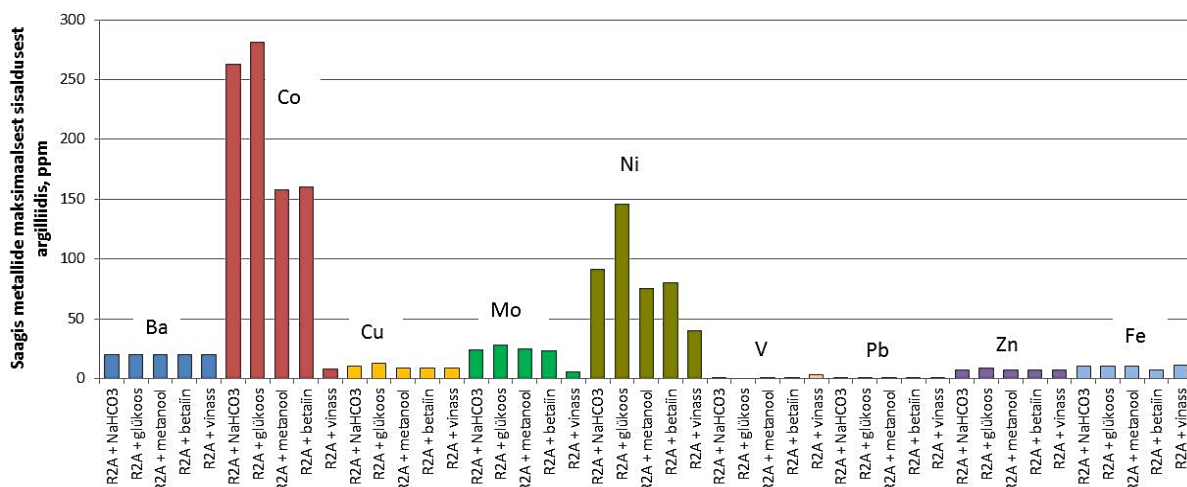


**Joonis 16.** Metaani eraldumise dünaamika argilliidist adapteerunud kultuuriga, kasutades söödet R2A puljong + NaHCO<sub>3</sub> + betaiin.

**Tabel 4.** Isotoopanalüüs  $\delta^{13}\text{C}$  meetodil metaani päritolu määramiseks.

Jrk nr	Proovi ID2	Kasvukeskkonna koostis	Inkubeerimise aeg, päeva	$\delta^{13}\text{C}$ (VPDB), ‰	$\text{CH}_4$ gaasi-faasis, %
1	proov 16	argilliit +R2A(3g/L) + betaiin	98	-52,20	46,0
2	proov 16a	argilliit +R2A(3g/L) + betaiin	98	-47,90	38,0
3	proov 16a (kordus)	argilliit +R2A(3g/L) + betaiin	98	-48,10	38,0
4	proov 17	R2A(3g/L)+betaiin	98	-67,90	2,72
5	proov 17a	R2A(3g/L)+betaiin	98	-74,40	18,4
6	proov 17A (kordus)	R2A(3g/L)+betaiin	98	-72,10	18,4
7	proov 18 <b>	R2A(1,5g/L)+betaiin	69	-61,40	10,8
8	proov 19	argilliit +R2A(1,5g/L) + betaiin	69	-52,20	5,3
9	proov 19 (kordus)	argilliit +R2A(1,5g/L) + betaiin	69	-52,60	5,3
10	proov 20	argilliit +R2A(1,5g/L) + betaiin	69	-49,50	7,2
11	proov 19b	R2A(1,5g/L)+betaiin	69	-81,20	15,6
12	proov 20b	R2A(1,5g/L)+betaiin	69	-68,70	10,0
Argilliidi ja söötmega proovid, $\delta^{13}\text{C}$ , ‰				-50,42 ± 2,18	
Vaid söötmega proovid, $\delta^{13}\text{C}$ , ‰				-70,95 ± 6,69	

Argilliidi metallorgaaniliste komplekside lõhustumist näitab ka metallide leostumine kasvukeskkonda. Kasutades kultiveerimise katsetes graptoliitargilliiti nii mikroorganismide allika kui substraadina vabanesid kasvukeskkonda metallidest kõige enam Co ja Ni. Katsetes kasutatud toitelahustega (R2A +  $\text{NaHCO}_3$  ja R2A + glükoos) eraldus kasvukeskkonda vastavalt 262-281 ppm Co ja 91-146 ppm Ni nende metallide maksimaalsest sisaldusest argilliidis (joonis 17).



**Joonis 17.** Metallide bioleostumine argilliidist erinevates kasvukeskkondades; Y-teljel on metallide saagis metalli maksimaalsest sisaldusest argilliidis (rikastusväärtus).

Biogeenset gaasi tootvate mikroorganismide koosluse määramiseks eraldati DNA ja sekveneeriti, kasutades teise põlvkonna 454 Life Sciences pürosekveneerimise tehnoloogiat. Pürosekveneerimise tulemuste põhjal olid metaani moodustumist stimuleerivas kasvukeskkonnas R2A + betaiin ülekaalus klassi *Bacilli* esindajad – (bakterite 16S rRNA geenile spetsiifiliste praimerite järgi) praimeritega MCRf-MCRr perekond *Ureibacillus* (87,43% taksonitest). Arhede 16S rRNA geeni praimeritega BSR357-BSF8 määrati ka metanogeenide perekond *Methanosarcina* (3.69% taksonitest). Seevastu kasvukeskkonnades R2A ja R2A + metanool olid ülekaalus klassi *Clostridia* esindajad, peamiselt väävli metabolismiga seotud perekond *Desulfotomaculum*, kes moodustasid 50-85% kõigist määratud taksonitest. Seega betaiini lisamine soodustab tasakaalu sulfaadi redutseerijate ja metanogeenide vahel, nii et protsess läheb metanogeneesi suunas.

## 2. TÖÖ EESMÄRK

Iseloomustada argilliidi orgaanilist komponenti lagundavat mikroobikooslust, isoleerida sellest kultiveeritavad mikroobitüved ning selgitada nendest tüvedest koostatud inokulumi võimekust argilliidi orgaanilist komponenti lagundada.

## 3. MATERJALID JA MEETODID

### 3.1 Katsemetoodika

#### 3.1.1 Katseseade OxiTop®

Kultiveerimiskatsed teostati OxiTop® süsteemi abil, mis koosnes rõhumõõtmis aparatuuriga varustatud hermeetiliselt suletavates 300 ml ruumalaga reaktoritest ning andmete lugemiseks andmehõiveseadest, mille vahendusel sai andmed üle kanda arvutisse (joonis 18). Reaktoril e. pudelil oli kolm kaela, millest ühele sai kinnitada manomeetrilise mõõdepeaga korgi ning külgmistele gaasi- ja vedelfaasi proovide



**Joonis 18.** OxiTop® katseseade ja andmehõiveseade.

võtmiseks kujundatud korgid. OxiTop® süsteemiga katsetes on mõõdetavateks parameetriteks katsepudeli sisene rõhk ja gaasisegu koostis, mille alusel on võimalik genereerida mikroorganismide kasvukõver. Anaeroobsel lagundamisel eralduv biogaas tõstab rõhku korgiga suletud gaasikindlas kalibreeritud OxiTop® klaaspudelis. Rõhku mõõdetakse hektopaskalites (1 hPa = 102,1 Pa = 1mbar). Rõhmuutuse alusel arvutatakse eraldunud gaasi kogus võrrandi 3.1 järgi (Menert, 2015):

$$pV = nRT, \text{ kus} \quad (3.1)$$

p – gaasi rõhk [N/m<sup>2</sup>] või [hPa]

V – gaasi ruumala [m<sup>3</sup>]

R – universaalne gaasikonstant [J/mol\*K], R = 8,314 J/mol\*K

T – absoluutne temperatuur [K]

n – moolide arv [mol]; moolide arvule n = 1 vastab normaaltingimustel 22,4 L gaasi.

### 3.1.2 Substraat ja söötmed

Kultiveerimiskatsetes kasutati substraadina Eesti Geoloogiakeskusest saadud proove argilliidikihindist (sügavuselt 50 m). Proovid purustati haamriga väiksemateks tükikesteks, suurima mõõtmega vahemikus 0,5 kuni 1cm. Saadud argilliidiproov oli üheaegselt nii inokulumiks (sisaldas nii fakultatiivselt anaeroobseid mikroorganisme kui ka obligatoorselt anaeroobseid baktereid ja arhesid) kui ka substraadiks (toitainete allikas), sest proovitüki orgaanilise süsiniku sisaldus oli 11,4% (sh väävlit 2,3%). (<http://www.eas.ee/images/doc/sihtasutusest/uuringud/ettevotlus/uuring-argilliidist-biogeense-metaangaasi.pdf>)

**Tabel 5.** Uuritava proovi füüsikalise-keemilised näitajad. (<http://www.eas.ee/images/doc/sihtasutusest/uuringud/ettevotlus/uuring-argilliidist-biogeense-metaangaasi.pdf>)

Näitaja	Katsemeetod	Mõõtühik	Tulemus
Analüütiline niiskus, W	EVS 668	massi %	1,2
Utmise produktide saagis kuivainele:			
utteõli	GOST 3168	massi %	2,5
poolkoks			92,3
pürogeenne vesi			2,1
uttegaas ja kaod			3,1
Tuhasus, A	ISO 1171	massi %	82,9
Lenduvate ainete saagis	GOST 6382	massi %	11,7
Karbonaatide süsinikdioksiidi sisaldus	GOST 7752	massi %	Ei leitud
Tinglik orgaaniline mass, TOM	arvutus	massi %	17,1
Kütteväärtus pommi meetodil	GOST 147	MJ/kg	5,040
Kütteväärtus ülemine			4,800
Kütteväärtus alumine			4,500
Elementkoostis:			
C	ASTM D5373	massi %	11,4
H			1,3
N			0,3
Üldise orgaanilise süsiniku sisaldus, TOC	arvutus	massi %	
Üldväävlit sisaldus	GOST 8606	massi %	2,30
S orgaaniline	GOST 30404	massi %	0,25
S püriitne		massi %	1,53
S sulfaatne		massi %	0,52
Kloori sisaldus		GOST 9326	massi %

Keskkonnaproovidest eraldatakse mikroorganisme tavaliselt minimaalsöötmetega, mida antud kontekstis võib käsitleda baassöötmena. Käesolevas projektis valiti selleks R2A, mis on sobiv sööde keskkonnast, sh veest mikroorganismide eraldamiseks (Reasoner et al, 1985). (Menert – Uuring argilliidist)

**Tabel 6.** R2A puljongi koostis. [<http://www.labm.com/products/r2a-broth.asp>]

Tüüpiline koostis	g/l
Pärmiekstrakt	0,5
Liha peptoon	0,5
Casamino happed	0,5
Glükoos	0,5
Tärklis	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3
MgSO <sub>4</sub>	0,05
Naatriumpüruvaat	0.3

Täiendavalt lisati R2A põhisöötmele filtersteriilimise (Whatman süstlafilter poori suurusega 0,2 µm) teel erinevaid süsinikuallikaid ja metanogeneesi soodustavaid substraate - betaiini, tsüsteiini, NaHCO<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>S.

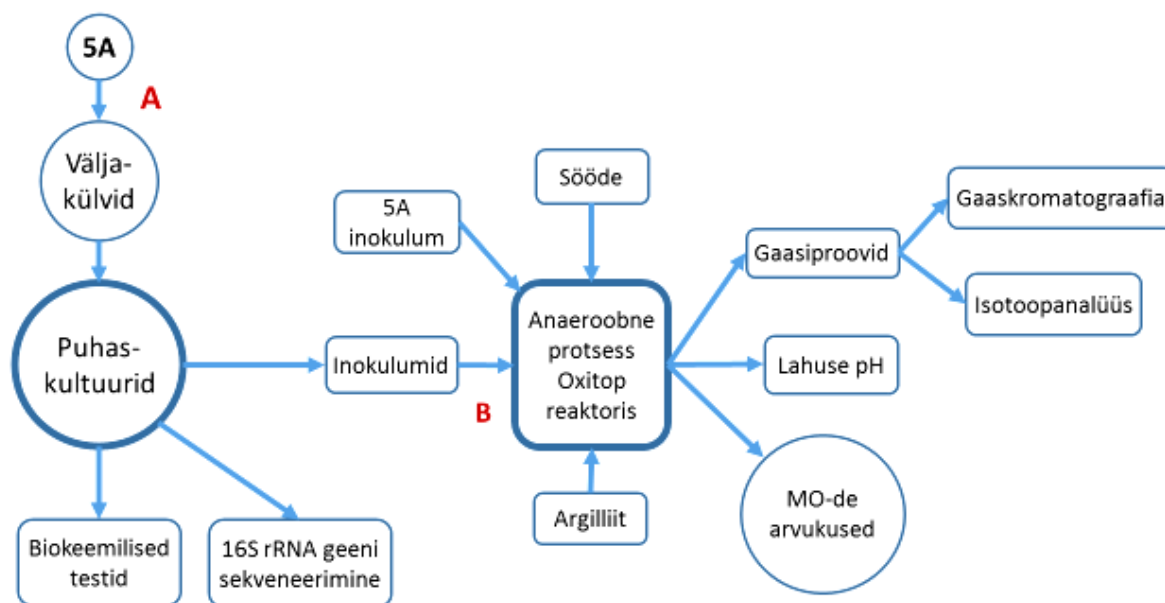
### 3.1.3 Inokulum

Inokulumina kasutati -80°C säilitatud glütserooli kultuure (5A etalonina, isolaadid 1-29). Puhaskultuurid (isolaadid 1-29) kasvatati ette eraldi R2A + betaiin tardsöötmele sektorkülvidena 2-4 päeva, kogu biomass suspendeeriti 1 ml 0,9% NaCl, millest edasi 15 ml vedelsöötmetesse (R2A + betaiin + NaHCO<sub>3</sub> + Na<sub>2</sub>S + tsüsteiin) pandi kokku 3 komplekti: isolaadid 1-29 (katse 28), isolaadid 1-13 (katse 29) ja isolaadid 14-29 (katse 30). Need konsortsiumid lisati kohe katsete kasvukeskkonda (7,5 g argilliiti + sööde). -80°C säilinud 5A) inokuleeriti külviaasaga 15 ml vedelsöötmesse, kasvatati ette anaeroobselt 2-4 päeva argooni keskkonnas ja lisati sealt katsesse (katse 26).

### 3.1.4 Katseplaan

Varasematest kultiveerimiskatsetest isoleeriti üksikud tüved (joonis 20, A), iseloomustati nende biokeemilisi omadusi ning määrati 16S rRNA geeni sekveneerimisega lähimad vasted. (vt lisad). Eesmärk oli näidata, kas need tüved toimivad samaväärselt varem äraproovitud, argilliidi orgaanikat lagundava kooslusega (kooslus 5A) ja kas nad toimivad sama hästi koos,

eraldi või teatud kombinatsioonis. Selleks tehti uued kultiveerimiskatsed (joonis 19, B), mille jaoks koostati isoleeritud tüvedest 3 erinevat inokulumit (tabel 8) – üks katse koos kõigi tüvedega (katse 28) ning kaks katset juhuliku valiku alusel kahte ossa jagatud tüvedega (katse 29 ja 30).



**Joonis 19.** Väljakülvidest (A) isoleeriti 29 puhaskultuuri, millest 25-ga tehti kolmes erinevas kombinatsioonis uued OxiTop<sup>®</sup> kultiveerimiskatsed argilliidiga (B). Erinevatel ajapunktidel analüüsiti katsetest võetud gaasiproove, määrati mikroorganismide (MO-de) arvukusi ja kasvukeskkonna pH-d.

Kokku käivitati 9 OxiTop<sup>®</sup> reaktorit, kus oli 4 põhikatset koostisega inokulum + argilliit + sööde (katsed nr 26-30), neile võrdluseks 4 ilma argilliidita katset koostisega inokulum + sööde (katsed nr 26B-30B) ja 1 katse 0,9%NaCl lahus + argilliit (katse 27).

Katsepudelid steriliseeriti koos põhisisõotmega (R2A). Järgnevalt lisati filtersteriilimise teel labiilsed söotmekomponendid (NaHCO<sub>3</sub>, betaiin, tsüsteiin, Na<sub>2</sub>S), argilliidiproovide kaalutised, inokulumid (tabel 7) ning komplekteeriti katsepudelid rõhuandurite ja proovivõtuportidega. Põhjuseks, et argilliidis elunevad mikroorganismid ei talu hapnikku, saab neid kasvatada vaid anaeroobses keskkonnas. Selleks juhiti enne katsete käivitamist katsepudelite gaasifaasi argooni (5 min). Kultiveeritavatele mikroorganismidele sobivate temperatuuride saavutamiseks ja hoidmiseks ning toitekeskkondade segamiseks kasutati termostateeritavat loksutit. Katsed teostati t=37°C juures.

**Tabel 7.** Katsete 26-30 ja 26B-30B koostised. Täpne koostis ja arvutused on lisades.

Katsete nr	Katsesegu koostis						0,9% NaCl
	R2A söödet (3g/L), mL	Betaiin (1,35g/L), mL + NaHCO <sub>3</sub> (2,52 g/L), mL	Na <sub>2</sub> S (0,22 g/L) + tsüsteiin (0,45 g/L)	Söötme maht kokku, mL	Argilliit, g	Inokulum, ml	
26-30	135	7,5	7,5	150	7,5	7,5	
27	0	0	0	0	7,5	0	150ml
26B-30B	135	7,5	7,5	150	7,5	7,5	

**Tabel 8.** Isolaatide valik kultiveerimiskatsetesse.

Isolaadi nr	16S rRNA järgi lähim tüvi	Katsed 28, 28B	Katsed 29, 29B	Katsed 30, 30B
1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SLG510A3-8	1	1	0
2	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SLG510A3-8	1	1	0
3	<i>Pseudomonas</i> sp. HPC26	1	1	0
7	<i>Bacillus subterraneus</i> strain CW27-B11	1	1	0
9	<i>Bacillus humi</i> strain RHM_120	1	1	0
10	<i>Bacillus fusiformis</i> strain LL 58	1	1	0
11	<i>Bacillus</i> sp. NBK45	1	1	0
12	<i>Bacillus cereus</i> strain R-14	1	1	0
5	<i>Enterobacter cloacae</i> strain 34978	1	1	0
6	<i>Enterobacter cloacae</i> strain 34978	1	1	0
13	<i>Staphylococcus warneri</i> strain mammoth-17	1	1	0
14	<i>Bacillus thermoamylovorans</i> strain O21	1	0	1
15	<i>Staphylococcus warneri</i> strain SuMS_N03	1	0	1
16	<i>Bacillus</i> sp. NBK45	1	0	1
17	<i>Microbacterium oxydans</i> strain Pp15	1	0	1
18	<i>Rothia</i> sp. R2A-A1X-SW	1	0	1
19	<i>Staphylococcus warneri</i> strain SuMS_N03	1	0	1
20	<i>Staphylococcus warneri</i> strain SuMS_N03	1	0	1
21	<i>Enterobacter cloacae</i> strain 34998	1	0	1
22	<i>Bacillus humi</i> strain RHM_120	1	0	1
24	<i>Bacillus</i> sp. NBK45	1	0	1
25	<i>Microbacterium oxydan</i> isolate M3_I7	1	0	1
26	<i>Bacillus</i> sp. NBK45	1	0	1
27	<i>Bacillus</i> sp. EF1A-B810	1	0	1
29	<i>Bacillus humi</i> strain RHM_120	1	0	1
	Kokku	25	11	14

## 3.2 Analüüsimetoodika

### 3.2.1 Meetodid kasvukeskkonnast eralduvate gaasiliste produktide uurimiseks.

#### 3.2.1.1 Gaasi koguse määramine

OxiTop® kultiveerimisest võeti gaasiproovid koostise ja päritolu analüüsiks.

Gaaside protsentuaalseid sisaldusi kasutades saab arvutada **metaani moolosa** biogaasis:

$$x_{CH_4} = \frac{c_{CH_4}}{c_{kõik}} = \frac{\frac{\rho_{CH_4} \cdot CH_{4,mahu\%}}{M_{CH_4}}}{\frac{\rho_{CH_4} \cdot CH_{4,mahu\%}}{M_{CH_4}} + \frac{\rho_{CO_2} \cdot CO_{2,mahu\%}}{M_{CO_2}}}, \quad (3.1)$$

kus  $c_{CH_4}$  – metaani molaarne kontsentratsioon, mol/L,

$c_{kõik}$  – kõigi gaasikomponentide molaarne kontsentratsioon kokku, mol/L,

$\rho_{CH_4}$  – metaani tihedus normaaltingimustel, g/L,

$M_{CH_4}$  – metaani molaarmass, g/mol,

$CH_{4,mahu\%}$  – metaani sisaldus biogaasis, mahu%,

$\rho_{CO_2}$  – süsihappegaasi tihedus normaaltingimustel, g/L,

$M_{CO_2}$  – süsihappegaasi molaarmass, g/mol,

$CO_{2,mahu\%}$  – süsihappegaasi sisaldus biogaasis, mahu%.

Asendades valemisse konstandid, saadi metaani moolosa arvutamiseks järgmine valem:

$$x_{CH_4} = \frac{\frac{0,688}{16,043} \cdot CH_{4,mahu\%}}{\frac{0,688}{16,043} \cdot CH_{4,mahu\%} + \frac{1,842}{44,01} \cdot CO_{2,mahu\%}}. \quad (3.2)$$

OxiTop® andmehõiveseadmest saadud toorikfaiili andmete põhjal arvutati esmalt **kumulatiivne rõhk** (hPa) reaktoris:

$$P_{sum,t} = P_{sum,t-1} + P_t - P_{t-1}, \quad (3.3)$$

kus  $P_{sum,t-1}$  – summaarne rõhk eelmises katsepunktis, hPa,

$P_t$  – rõhu hetkeväärtus antud katsepunktis, hPa,

$P_{t-1}$  – rõhu hetkeväärtus eelnevas katsepunktis, hPa.

Järgnevalt oli võimalik arvutada **kumulatiivne biogaasi kogus millimoolides**:

$$n_{biogaas} = \frac{P_{biogaas} \cdot V_{biogaas}}{R \cdot T}, \quad (3.4)$$

- kus  $P_{biogaas}$  – biogaasi rõhk reaktoris, kPa,  
 $V_{biogaas}$  – biogaasi ruumala reaktoris, cm<sup>3</sup>,  
 $R$  – universaalne gaasikontant, cm<sup>3</sup> kPa K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>,  
 $T$  – temperatuur, K.

Enne katsete alustamist inokulumi ei pestud, seega selles sisaldus samuti vähesel määral toitaineid, mille lagundamisel eraldus biogaasi. Ainult **substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biogaasi kogus millimoolides** arvutatakse järgnevalt:

$$n_{subs} = n_{biogaas} - n_{inok} \cdot \frac{m_{inok.segus}}{m_{inok}}, \quad (3.5)$$

- kus  $n_{biogaas}$  – substraadi ja inokulumi lagunemisel kokku tekkinud biogaasi, mmol,  
 $n_{inok}$  – inokulumi lagunemisel eraldunud biogaasi kogus, mmol,  
 $m_{inok.segus}$  – inokulumi mass, mis oli lisatud substraadile, g,  
 $m_{inok}$  – inokulumi mass, mis oli tühiproovi pudelis, g.

**Substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biogaasi kogus orgaanilise süsiniku massi kohta (mmol/ OS):**

$$n_{subs/OS} = \frac{n_{subs}}{m_{subs} \cdot \frac{KA\%}{100\%} \cdot \frac{OS\%}{100\%}}, \quad (3.6)$$

- kus  $n_{subs}$  – substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biogaasi kogus, mmol,  
 $m_{subs}$  – substraadi mass, g,  
 $KA\%$  – proovi kuivaine sisaldus, %,  
 $OS\%$  – proovi orgaanilise süsiniku sisaldus, %.

**Kumulatiivne biometaani kogus (mmol):**

$$n_{CH_4,t} = n_{CH_4,t-1} + (n_{biogaas,t} - n_{biogaas,t-1}) \cdot x_{CH_4}, \quad (3.7)$$

- kus  $n_{CH_4,t-1}$  – kumulatiivne biometaani kogus eelmises katsepunktis, mmol,  
 $n_{biogaas,t}$  – kumulatiivne biogaasi kogus antud katsepunktis, mmol,  
 $n_{biogaas,t-1}$  – kumulatiivne biogaasi kogus eelnevas katsepunktis, mmol,  
 $x_{CH_4}$  – metaani moolosa antud katsepunktis.

**Substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biometaani kogus orgaanilise süsinikumassi kohta (mmol/g OS):**

$$n_{CH_4,subs/OS} = \frac{n_{CH_4,subs}}{m_{subs} \cdot \frac{KA\% \cdot OS\%}{100\% \cdot 100\%}}, \quad (3.8)$$

- kus  $n_{CH_4,subs}$  – substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biometaani kogus, mmol,  
 $m_{subs}$  – substraadi mass, g,  
 $KA\%$  – proovi kuivaine sisaldus, %,   
 $OS\%$  – proovi orgaanilise süsiniku sisaldus, %.

**Substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biometaani kogus argilliidi kohta (m<sup>3</sup>/t A):**

$$V_{CH_4,A} = \frac{n_{CH_4,subs} \cdot 22,4 \cdot 1000}{m_{proov,A}}, \quad (3.9)$$

- kus  $n_{CH_4,subs}$  – substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biometaani kogus, mol,  
22,4 – ühe mooli gaasi ruumala normaaltingimustel, L,  
 $m_{proov,A}$  – argilliit, g,  
1000 – tulemuse teisendamiseks tonnideks (ilma teisenduseta on ühikuks L/g ehk m<sup>3</sup>/kg).

**Substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biometaanu kogus orgaanilise süsiniku kohta (m<sup>3</sup>/t OS):**

$$V_{CH_4,OS} = \frac{n_{CH_4,subs} \cdot 22,4 \cdot 1000}{m_{proov,OS}}, \quad (3.10)$$

kus  $n_{CH_4,subs}$  – substraadi lagunemisel eraldunud kumulatiivne biometaanu kogus, mol,  
22,4 – ühe mooli gaasi ruumala normaaltingimustel, L,  
 $m_{proov,OS}$  – kääritatavas proovis sisalduva orgaanilise süsiniku mass, g,  
1000 – tulemuse teisendamiseks tonnideks (ilma 1000 korrutamata tuleks ühikuks L/g ehk m<sup>3</sup>/kg).

(Menert, 2015)

### 3.2.1.2 Kromatograafiline analüüs

Eralduva gaasisegu koostist kõigis kultiveerimise katsetes mõõtis A. Teemusk Tartu Ülikooli Ökoloogia ja maateaduste instituudis gaaskromatograafia Shimadzu GC-2014 (metaani määramispiirkond 10ppb -30%) ja K. Orupõld Maaülikoolis gaaskromatograafia Varian Inc., Model CP-4900 (metaani määramispiirkond 0-100%). Varian Inc., Model CP-4900 on varustatud 2 kolonniga : Molsieve 5A Backflush kuumutatud kolonn (20 m x 0.53 mm), kus kandjagaasina kasutatakse argooni ning PoraPLOT U kuumutatud kolonn (10 m x 0.53 mm), kus kandjagaasina kasutatakse heeliumi. Esimese kolonni sisestustemperatuur oli 110°C, kolonnitemperatuur 120°C ja rõhk 50 Psi. Teise kolonni sisestustemperatuur oli 110°C, kolonnitemperatuur 150°C ja rõhk 22 Psi. (Luna-delRisco *et al*, 2011)

### 3.2.2 Mikrobioloogilise analüüsi meetodid

#### 3.2.2.1 MO-de arvukused

Kultiveerimiskatse käigus määrati erinevatel katse ajapunktidel lahjenduskülvide meetodil (R2A + betaiin tardsöötme) mikroorganismide arvukused, mida võrreldi gaasitekke ja –koostise dünaamikaga. Kolooniad loendati visuaalsel vaatlusel. Keskmist kolooniade arvu, külvimäära ja lahjendufaktorit arvestades leiti elusrakkude arvukus väljakasvanud kolooniade järgi (CFU/ml ehk kolooniaid moodustavate ühikutena/ml).

Lahjenduse pöördarv on lahjendusfaktor, mis matemaatiliselt väljendatuna oleks järgmine:

$$\text{Lahjendusfaktor} = \frac{\text{proovi maht(ml)+lahjendusvee hulk (ml)}}{\text{proovi maht (ml)}} \quad (3.11)$$

Söötmeplaadil väljakasvanud mikroobikolooniate loendamise järel on võimalik leida rakkude kaudne arvukus algproovis, arvestades kasutatud lahjendusfaktorit ja külvimäära. See väljendatakse kolooniaid moodustavate ühikutena (CFU – *colony-forming units*) 1 ml algproovi kohta:

$$\text{Arvukus} \left( \frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{kolooniate arv (CFU) x lahjendufaktor}}{\text{külvimäär (ml)}} \quad (3.12)$$

(Heinaru & Vedler, 2011)

#### 3.2.2.2 pH analüüs

Metanogeensete mikroorganismide kasvatamisel segakultuuris on eriti oluline toitainelahuse piisav puhverduisvõime, sest kasvukeskkond kipub fermentatiivsete mikroorganismide metabolismiproduktide tõttu kiiresti hapustuma, metanogeenidele on aga soodne vaid leeliseline kasvukeskkond (vahemikus pH 7–9). Kultiveerimiskatse käigus määrati erinevatel ajapunktidel kasvukeskkonna pH Whatman® Panpeha™ pH indikaatorribadega.

#### 3.2.2.3 Bakteritüvede isoleerimine

Väljakülvide jaoks võeti a) OxiTop katsetest nr 19, 20, 21 ja 22 ning b) +4°C juures säilinud katsete 16 ja 16A proovidest 1,5ml vedelikuproovi, millest tehti 10<sup>-1</sup> kuni 10<sup>-4</sup> lahjendused ning külvati R2A + betaiin tardagarile. Külve inkubeeriti 37°C juures 24-48h. Puhaskultuuride saamiseks tehti morfoloogiliselt erinevatest kolooniatest lahjenduskülvid R2A + betaiin agarile. Puhaskultuure säilitatakse 30%-lises glütseroolis -80°C juures.

#### 3.2.2.4 Biokeemilised testid isoleeritud tüvedega

Gramreaktiivsuse määramiseks tehti tüvedele gram järgi värvimine ja KOH lüüsi test. Testiti järgmiste süsinikuallikate kasutamist isolaatide poolt: glükoos, sahharoos, fruktoos, arabiin, ksüloos, mannoos, maltoos, tsitraat. Käärimistüübi määramiseks tehti Voges-Proskaueri test, denitriifitseerimisvõimet testiti Hiltay söötmega. Määrati järgmiste ensüümide

aktiivsust: cyt c oksüdaas, katalaas, amülaas (tärkliis), trüptofanaas (indooltest), proteaas (kaseiin, želatiin) , ureaas, DNAas, arginiini dihidrolaas (ADH),  $\beta$ -galaktosidaas ja  $\beta$ -glükosidaas (eskuliin). KingB söötmel testiti fluorestseeruvate pigmentide olemasolu. Testiti isolaatide soolataluvust (2, 5, 7 ja 10% NaCl sisaldusega tardsöötmel) ja pH taluvust (pH 5,7,9 ja 11 tardsöötmetel).

Isolaatide biokeemiliste omaduste määramiseks tehtud biokeemilised testid ja ära toodud **lisades 2 ja 3**.

#### *3.2.2.5 Isolaatide DNA eraldamine*

Õvede kõrvaldamiseks analüüsiti puhaskultuuride genoomseid sõrmejälgi BOX-PCR meetodikaga (mitmete erinevate pikkustega DNA fragmentide amplifitseerimine). Selleks valmistati tardsöötmel ettekasvatatud isolaatidest suspensioonid, mida kuumutati rakkude lüüsimiseks 96°C juures 15 minutit. Lüsadiga valmistati BOX-PCR reaktsioonisegu, BOX-PCR töötlemise amplikonid lahutati geelelektroforeesiga 1,5 % (40ml TAE, 6g agarooosi) agarosgeelil 1x TAE puhvril, millega saadi igale isolaadile iseloomulik erineva pikkusega geenifragmentide muster. Saadud tulemusi võrreldi biokeemiliste testide tulemustega.

#### *3.2.2.6 Geenifragmentide amplifitseerimine 16S rRNA geeni sekveneerimiseks*

BOX-PCR-ga väljavalitud tüvedest tehti uus lüsaa, mida kasutati 16S rRNA PCR-i reaktsioonisegu valmistamisel. Geenifragmentide amplifitseerimiseks kasutati PCR reaktsioonisegu lõppmahuga 25  $\mu$ l. Segu sisaldas 1x lõppkontsentratsiooniga PCR puhvrit [75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,01% Tween 20], 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM igat nukleotiidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,8  $\mu$ M praimereid (Tabel 3), 0,5 U Taq DNA *Polymerase* ja 0,5-6 $\mu$ l raku lüsaa. Lüüsimiseks kuumutati rakke 15 minutit 96°C juures, jahutati jääl ning rakukestad eraldati tsentrifuugimisel (13000 x g, 1 min). Amplifikatsiooniprogramm koosnes initsiatsioonietapist 95°C juures 5 minutit, millele järgnes 40 tsüklit. Iga tsüklil koosnes kolmest etapist: DNA ahelate denatureerimine 95°C juures 1 minut, praimerite seondumine vastava seondumistemperatuuri (Tabel 3) juures 1 minut, DNA süntees 72°C juures 2 minutit ning pärast 40 tsüklit toimus lõppekstensioon 72°C juures 10 minutit.

**Tabel 9.** Töös kasutatud praimerid. (Toomik, 2015)

Praimerite sihtmärklaud	Praimerite nimetus	Järjestus 5' – 3'	Viide	Seondumis-temperatuur (°C)	Sünteesiaeg (min)	Produkti suurus (bp)
<b>Tüvede iseloomustamiseks</b>						
16S rRNA	PCR1 Seq1	AGAGTTTGATCATGGCTCA G  GTATTACCGCGGCTGCTGG	Weisburg <i>et al.</i> , (1991) Vedler <i>et al.</i> , (2000)	55	2	~450
Kordus-järjestus	BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTG ACG	Louws <i>et al.</i> , (1994)	53→68	1→8	erinev

### 3.2.2.7 Geelelektroforees

PCR edukuse kontrollimiseks kasutati 1,5% (40ml TAE, 6g agarooosi) agarosgeeli 1x TAE puhvris. Geeli hambasse kanti 6 µl proovi segatuna 3,5 µl laadimispuhvriga (6x MassRuler™ Loading Dye Solution; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% broomfenoolsinine; 60% glütserool; 60 mM EDTA; Thermo Scientific™, Leedu). Produkti suuruse hindamiseks kasutati 1 kb DNA suurusmarkerit (GeneRuler™; Thermo Scientific™; Leedu). Geelelektroforees viidi läbi 1x TAE puhvris 100 V juures. Seejärel immutati geeli 1xTAE puhvris, millele lisati 3µg ml<sup>-1</sup> kontsentratsiooniga etiidiumbromiidi (EtBr). Geeli pildistati UV transilluminaatoris.

### 3.2.2.8 16S RNA geeni Sangeri sekvenerimine

Geenifragmentide sekvenerimiseks töödeldi PCR segu praimerite katki lõikamiseks ja nukleotiidide inaktiveerimiseks ensüümidega eksonukleas I (ExoI; Thermo Scientific™, Leedu; lõppkontsentratsiooniga 0,36 U µl<sup>-1</sup>) ja kreveti aluselise fosfataasiga (SAP; Thermo Scientific™, Leedu; lõppkontsentratsiooniga 0,14 U µl<sup>-1</sup>) 37°C juures 15 minutit. Seejärel ensüümid inaktiveeriti 80°C juures (15 minutit). Sekvenerimiseks kasutati BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-i (Applied Biosystems Inc., USA) vastavalt protokollile. Reaktsioon viidi läbi kasutades PCR programmi, mis koosnes 30 tsüklist. Iga tsükkel sisaldas kolme etappi: ahelate denaturatsioon 95°C juures 15 sekundit, praimerite seondumine Tabelis 3 toodud temperatuuri juures 10 sekundit ja DNA süntees 60°C juures 45 sekundit. Geenifragmendid sekveneriti Applied Biosystems täisautomaatse kapillaarsekvenaatoriga 3730xl DNA Analyzer. (Toomik, 2015)

### 3.2.2.8 Sekveneeritud järjestuste analüüs

Sekveneerimisjärjestusi analüüsiti BioEdit (v7.2.5) programmiga, neile leiti vasted ja referentstüved BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>] otsingumootoriga. (Toomik, 2015)

## 4. TULEMUSED

Algse inokulumiga tehtud kultiveerimiskatsetest eraldati aeroobsetes tingimustes 29 isolaati (isolaadid 1-29, fakultatiivsed anaeroobid). Minimaalse toimiva tüvede arvuga koosluse leidmise eesmärgil vähendati isolaatide hulka, välja valiti 25 isolaati. Eraldatud isolaate kaasavate kultiveerimiskatsetega kirjeldati argilliidi orgaanika lagundamise dünaamikat, kusjuures jälgitavaks parameetriks oli tekkinud metaani kogus. Võrdluseks kasutati algset inokulumi (ARGCON 5 ehk 5A).

Argilliidi orgaanilist osa lagundava koosluse mikroorganismide rolli selgitamiseks tehtud katsete ja analüüside tulemused on järgmised:

### 4.1. Fakultatiivsete anaeroobide isoleerimine

#### 4.1.1 Isolaatide kirjeldus biokeemiliste testide põhjal

Isolaatide **Gram** järgi värvimine ei andnud paljude isolaatide (*Batsillused* ja *Mikrobakterium*) puhul selgelt eristatavat tulemust, seepärast tehti isolaatidele gramreaktiivsuse määramiseks ka KOH lüüsitest. Hiljem näitasid 16S rRNA tulemused, et ka KOH lüüsitest ei andnud alati õiget tulemust.

**Sporulatsiooni** testiks valiti esialgsed grampositiivsed isolaadid, 16S rRNA analüüsiga grampositiivseks osutunud tüvedele tuleb sporulatsiooni test teha tulevikus. Seni tehtud testi põhjal moodustavad spoore isolaadid 7, 10, 11,12, 14, 24, 27, kes 16S rRNA analüüsi põhjal osutusid *Batsillusteks* ja isolaadid 13, 19, 20, kes 16S rRNA analüüsi põhjal osutusid *Stafülokokkideks* (*warneri*) ning isolaat 17, kes 16S rRNA analüüsi põhjal osutus *Mikrobakteriumiks* (*oxydans*).

**Denitrifikatsiooniks** olid võimelise vaid isolaadid 1-4 (perekond *Pseudomonas*).

**Süsinikuallikana** kasutasid **suhkruid** (happe tootmisega) vähesed. Kõiki suhkruid kasutasid ainult isolaadid 5,6,8 (*Enterobakterid*), kes tootsid sealjuures ka gaasi ja isolaat 15 (*Stafülokokk*). Osaliselt kasutasid suhkruid isolaadid 1-4 (*Pseudomonased*); 12, 27

(*Batsillused*) 17, 25 (*Mikrobakeerium*) ja 18 (*Rothia*). Isolaadid 10 ja 24 (*Batsillused*) kasutasid ainult mannoosi. Ülejäänud isolaadid ei kasutanud suhkruid üldse või ei olnud võimelised kasvama.

**Oksüdatsiooni/fermentatsiooni (O/F)** testiga osutusid käärıtajateks isolaadid 5, 6, 8 (*Enterobakterid*), 12 (*B. cereus*).

**Oksüdaasset** aktiivsust näitasid isolaadid 1-4 (*Pseudomonased*).

**Katalaasset** aktiivsust seevastu oli paljudel isolaatidel: 7, 10, 11, 12, 14, 16, 24, 26, 27 (*Batsillused*); 13, 15, 19, 20 (*Stafülokoidid*); 17 (*Mikrobakterium*).

**Ureaasset** aktiivsust näitasid samuti paljud isolaadid: 9, 10, 11, 12, 16, 22, 23, 24, 26, 28, 29 (*Batsillused*); 15, 19, 20 (*Stafülokoidid*); 18 (*Rothia*); 5, 6, 8 (*Enterobakterid*).

$\beta$ -galaktosidaas ja DNAasi aktiivsusega isolaate oli rohkem kui trüptofanaasi (idooltest), proteaasi (kaseiin, želatiin),  $\beta$ -glükosidaasi (eskuliin) ja arginiindihüdrolaasi (ADH) aktiivsusega isolaate.

Kasvukeskkonna soolasisalduse ja pH suhtes isolaatide hulgas ekstremofiile ei leitud. Suurem osa isolaate eelistas kasvada söötmel soolasisaldusega 2-5%, ca pooled isolaadid kasvasid vähem või rohkem ka 7% NaCl-ga söötmel, 4 isolaati (*Stafülokoidid* ja üks *Batsillus*) kasvasid isegi 10% NaCl sisaldusega söötmel. Enamus isolaati olid võimelised kasvama söötmel pH 7-11, isolaadid 5,6,8 (*Enterobakterid*) 13, 19, 20 (*Stafülokoidid*) ja 17, 25 (*Mikrobakteriumid*) kasvasid pH 5-11 söötmetel.

Tabelis 10 on ära toodud isolaatide ensümaatilised aktiivsused ja 16S rRNA geeni sekveneerimise analüüsi tulemused. Teiste biokeemiliste testide tulemuste tabelid ja 16S järgi määratud isolaatide klassifikatsiooni tabel on lisades.

**Tabel 10.** Isoleeritud tüvede biokeemilised testid ja lähim tüvi 16S rRNA geeni järgi

Gramreaktiivsus	Isolaat	Ensümaatiline aktiivsus											Denitrifikatsioon	16S rRNA järgi lähim tüvi
		Oksidaas	Katalaas	Ureeaas	Indool	Tärklis	Kaseiin	Želatiin	Eskuliin	β-galaktosidaas	ADH	DNaas		
Grampositiivsed	12	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+		<i>Bacillus cereus</i> strain R-14
	10	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+		<i>Bacillus fusiformis</i> strain LL 58
	9	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+		<i>Bacillus humi</i> strain RHM_120
	29	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+		<i>Bacillus humi</i> strain RHM_120
	22	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+		<i>Bacillus humi</i> strain RHM_120
	27	-	+	-	-	-	0	-	+	+	-	+		<i>Bacillus</i> sp. EF1A-B810
	11	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+		<i>Bacillus</i> sp. NBK45
	24	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+		<i>Bacillus</i> sp. NBK45
	26	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+		<i>Bacillus</i> sp. NBK45
	16	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+		<i>Bacillus</i> sp. NBK45
	7	-	+	-	-	+	0	-	-	-	-	+		<i>Bacillus subterraneus</i> strain CW27-B11
	14	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+		<i>Bacillus thermoamylovorans</i> strain O21
	17	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+		<i>Microbacterium oxydans</i> strain Pp15
	25	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+		<i>Microbacterium oxydan</i> isolate M3_17
	18	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-		<i>Rothia</i> sp. R2A-A1X-SW
	13	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+		<i>Staphylococcus warneri</i> strain mammoth-17
15	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-		<i>Staphylococcus warneri</i> strain SuMS_N03	
19	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+		<i>Staphylococcus warneri</i> strain SuMS_N03	
20	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-		<i>Staphylococcus warneri</i> strain SuMS_N03	
Gram-negatiivsed	5	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-		<i>Enterobacter cloacae</i> strain 34978
	6	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-		<i>Enterobacter cloacae</i> strain 34978
	21	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+		<i>Enterobacter cloacae</i> strain 34998
	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		<i>Pseudomonas</i> sp. HPC26
	2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SLG510A3-8
	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SLG510A3-8

#### 4.1.2 Isolaatide kirjeldus 16S rRNA analüüsi põhjal

16S rRNA geeni järgi määramist tehti 29-st isolaadist 25-le, neli isolaati jäeti välja, sest BOX-PCR-i ja biokeemiliste testide tulemuste põhjal olid nad väga sarnased mõne teise isolaadiga:

- isolaat 4 oli sarnane isolaadiga 3
- isolaat 8 oli sarnane isolaadiga 5
- isolaat 23 oli sarnane isolaadiga 22
- isolaat 28 oli sarnane isolaatidega 9 ja 29

16S rRNA geeni fragmendi sekveneemise tulemuste analüüs (tabel 10 ja lisa 4) näitas, et uuritud järjestused klasterdusid kolme hõimkonda: grampositiivsed bakterid hõimkondadesse *Firmicutes* (16 isolaati) ja *Actinobacteria* (3 isolaati), gramnegatiivsed *Proteobacteria*

hõimkonda (6 isolaati). Kõigi BLAST otsingumootoriga uuritud järjestustele leitud referentstüved olid sarnasusega 99-100%.

Kõige rohkem esines katsetest eraldatud kooslustes hõimkonna *Firmicutes* perekonna *Bacillus* esindajaid (12 isolaati), kelle hulgas omakorda oli kõige enam *Bacillus* sp. NBK45 – ga lähedasi tüvesid (4 isolaati) ja liigiga *humi* lähedasi tüvesid (3 isolaati). *Bacillus cereus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus* sp. EF1A-B810, *Bacillus subterraneus*, *Bacillus thermoamylovorans* liikidega oli igauhuga lähedane üks isolaat. Kõik ülejäänud hõimkonna *Firmicutes* esindajad olid perekonna *Staphylococcus* liigiga *warneri* lähedased tüved (4 isolaati). *Actinobacteria* hõimkonda liigitunud isolaatidest kaks olid lähedased perekonna *Microbacterium* liigiga *oxydans* ja üks isolaat lähedane perekonna *Rothia* sp. R2A-A1X-SW-ga. *Proteobacteria* hõimkonda klasterdusid perekonna *Enterobacter* liigiga *cloacae* lähedased tüved (3 isolaati) ja perekonna *Pseudomonas* liigiga *stutzeri* (2 isolaati) ning *Pseudomonas* sp. HPC26-ga (1 isolaat) lähedased tüved.

Katset 19 isoleeritud tüved osutusid kõik perekonna *Pseudomonas* esindajateks, katset 21 isoleeritud tüved osutusid kõik isolaadid *Enterobacter-iteks*, katset 20 isoleeritud tüved olid kõik *Bacillus* perekonna liigid. Kõige mitmekesisema kooslusega oli katse 16A, millest isoleeriti 7 erinevat tüve 5-st erinevast perekonnast. Katsetest 22 isoleeriti 2 tüve ja katset 16 isoleeriti 4 erinevat tüve 2-st perekonnast.

#### **Tabel 10 ja lisa 4**

#### **4.1.3 Identifitseeritud tüvede kirjeldused kirjanduse põhjal**

##### **Perekond *Bacillus***

*Bacillus* liigid on pulgakujulised, endospori moodustavad, aeroobid või fakultatiivsed anaeroobid, grampositiivsed, mõnes kultuurid võivad muutuda ajaga gramnegatiivseks. Paljude liikidega perekonnana esindab suurt valikut füsioloogiliste võimeid elamaks igas looduslikus keskkonnas. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/>)

##### ***Bacillus humi***

Isoleeritud pinnasest, grampositiivne, nõrga anaeroobse kasvuga, sporuleeruv, oksüdaas ja katalaas positiivne, ureaas negatiivne, T° optimum 30°C, kasv pH 7-9, denitrifitseeriv. (Heyrman 2005)

### ***Bacillus thermoamylovorans***

Isoleeriti palmiveinist (kirjeldus põhineb ühel tüvel), fakultatiivne anaeroob, spore pole täheldatud, T° optimum 37°C, katalaas positiivne, optimaalne pH 6.5–7.5. Toodab heksoose fermenteerides atsetaati, formaati, laktaati ja etanooli. (De 2009) H<sub>2</sub> ei tooda. Ei denitrifitseeri. Metülotroofne – mõni tüvi kasvab ka etanoolil. (<http://www.tgw1916.net/Bacillus/thermoamylovorans.html>) Saksamaal isoleeriti termofiilsetest ja mesofiilsetest biogaasi tootvatest kultuuridest äädik-, propioon- ja butüürhapet tootvate isolaatide hulgas ka *Bacillus thermoamylovorans*. (Cibis *et al*, 2016)

### ***Bacillus subterraneus***

Isoleeritud maa-alt, termaalsest veesoonest 2km sügavuselt (71°C, pH 7.8). Gramnegatiivne fakultatiivne anaeroob, (värvus gramnegatiivselt aga elektronmikrograaf näitas grampositiivset rakuseina), spore ei moodusta. T° optimum 37-40°C, pH vahemik 6,5-9, katalaas positiivne. Kasutab amorfset raud(III), mangaan(IV), nitraati, nitritit ja fumaraati elektroni aktseptorina. Elektroni aktseptorid ei ole kasvuks hädavajalikud, kuid nitraadi olemasolul kasvab paremini. Vajab kasvuks biotiini ja tiamiini aga tsüsteiini mitte. (De 2009, Kansa *et al*, 2002)

### ***Bacillus cereus***

Grampositiivne, fakultatiivne anaeroob, sporuleeruv. Rakud üksikult, paaris või pikkade ahelatena. T optimum 37°C, isoleeritud on ka psührotolerantseid isolaate, kes kasvavad t = 6°C juures. Kasvab pH 5-7 juures. Katalaas positiivne, ureaas positiivne (varieeruv), denitrifitseeriv. Erinevates keskkondades laialt levinud, sh ka pinnases. (De 2009)

### ***Bacillus fusiformis* (*Lysinibacillus fusiformis*)**

Isoleeritud pinnasest, gramvarieeruv; aeroob, sporuleeruv, kasvutemperatuur 17-37°C, kasvu pH 6-9,5. Ei denitrifitseeri, katalaas positiivne, ureaas ja oksüdaas varieeruv, kasutab atsetaati, tsitraati, formaati, laktaati ja suktsinaati. (De 2009, <http://www.tgw1916.net/Bacillus/fusiformis.html> (ABIS Encyclopedia)

Kan *et al.* on leidnud, et homoatsetogeenidest segakultuur, *Clostridium ljungdahlii*, *Lysinibacillus fusiformis* ja *Bacillus cereus*, on võimeline konverteerima H<sub>2</sub> ja CO<sub>2</sub> atsetaadiks, moodustades efektiivse mikroobse ressursi sünteesitud gaasi biokonversiooniks. (Kan *et al*, 2014)

### ***Staphylococcus warneri***

Isoleeritud inimese ja loomade nahalt, grampositiivne, fakultatiivne anaeroob, paremini kasvab aeroobselt, spore ei moodusta. T° optimum 30-40°C, katalaas ja ureaas positiivne, denitriifitseeriv (nõrgalt). (<http://www.tgw1916.net/Staphylococcus/warneri.html>)

*Staphylococcus warneri* on isoleeritud ka õlireostusega pinnasest. (Yele & Densai, 2014 )

### ***Microbacterium oxydans***

Isoleeritud erinevatest keskkondadest, grampositiivne, aeroobne, T° optimum 30°C, katalaas positiivne. Ei denitriifitseeri. (De 2009)

*M. oxydans*-i on isoleeritud *Alyssum murale* (kilbirohi) risosfäärist ning tehti kindlaks, et võimeline lahustama pinnasest metalle (mis on seotud nii orgaanilise ja anorgaanilise mulla osaga). (Abou-Shanab et al, 2006) Venemaal Siberis isoleeriti radioaktiivsete jäätmete ladustamiskoha põhjaveest *M. oxydans*i tüved, mis akumulereerisid suures koguses uraani (pH 4,5 juures rohkem kui pH 2 juures). (Nedelkova et al. 2007)

### ***Perekond Rothia***

16s rRNA geeni järjestuse analüüsil tulemustes oli *Rothia* sp. R2A-A1X-SW järel, teisel kohal *R. terra*e täpselt sama (100%) identsuse, kattuvuse, skoori ja E-väärtuse näitajatega. Esimese liigi omaduste kohta andmeid ei leitud, mistõttu märgime ära *R. terra*e omadused.

#### ***Rothia terra*e**

Isoleeritud pinnasest, grampositiivne, fakultatiivne anaeroob. Spore ei moodusta, katalaas positiivne, T° optimum 35°C, optimaalne pH 7-8, denitriifitseeriv. (Chou et al. 2008)

### ***Enterobacter cloacae***

Leidub vees, pinnases, loomade soolestikus jm. Gramnegatiivne, fakultatiivne anaeroob, T° optimum 30-37°C. Katalaas positiivne, denitriifitseeriv, uureaas varieeruv. (<http://www.tgw1916.net/Enterobacteria/Enterobacter.html>)

Perekonna *Enterobacter* liigid on peamiselt teada kui lihtsamate ühendite lagundajad, kuid on näidatud, et neid adapteerides võivad nad lagundada ka suuri koguseid metalloporfüriine ning teiste liikidega konsortsiumites on biodegradatsioon oluliselt suurem. (Cordero et al. 2015)

### *Pseudomonas stutzeri*

Isoleeritud pinnasest, veest (mageveest, mereveest, setetest), kliinilistest proovidest. Gramnegatiivne, rangelt aeroobne va. nitraati sisaldavas keskkonnas – siis on fakultatiivne anaeroob. T° optimum 35°C, denitrifitseeriv (pool-aeroobses keskkonnas võib reaktsioon), oksüdaas positiivne. (<http://www.tgw1916.net/Pseudomonas/stutzeri.html>)

Mõned *P. stutzeri* tüved sünteesivad siderofoore. Kasvutemperatuuri ulatus erinevatel tüvedel 4-45°C. Happelisi tingimusi ei talu, alla pH 4,5 ei kasva.

*P. stutzeri* oksüdeerib tiosulfaadi (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) tetrionaadiks (S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>) kasutades seejuures elektroni aktseptorina nitritit, nitraati või lämmastikdioksiidi. Anaeroobsetes tingimustes toimub see palju aeglasemalt kui aeroobselt, samuti sõltub orgaanilise elektroniaktseptori olemasolust. Tetrionaati moodustavad isolaadid on obligatoorsed heterotroofid. Denitrifikatsioon on stabiilne *P. stutzeri* omadus, mis toimub anaeroobsetes tingimustes, kuid vahel ka mikroaeroobselt või isegi aeroobselt. *P. stutzeri* on üks kõige aktiivsemaid denitrifitseerivaid heterotroofseid baktereid.

Kõik kirjanduses hästi klassifitseeritud lämmastikku fikseerivad *Pseudomonased* on *P. stutzeri* liikmed. Lämmastiku fikseerimine toimub madalal hapniku rõhul, mikroaeroobsetes tingimustes.

*P. stutzeri* tüvesid on kirjeldatud ka suure biosorbtsiooni potentsiaaliga ja resistentsusega metallidele nagu: alumiinium, kroom, koobalt, vask, germaanium, plii, mangaan, nikkel, plutoonium, seleen, hõbe, tallium, titaan, uraan, vanaadium ja tsink. (Lalucat *et al*, 2006)

Oma suurepärase metaboolsete omaduste (N fikseerimine, denitrifikatsioon, keskkonnareostuste lagundamine) tõttu on *P. stutzeri* äratanud palju tähelepanu. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1432>) Isoleeritud on teda ka kooslusest, mis eraldati veest, mida oli kasutatud kilda hüdraulilisel fraktsioneerimisel. Seal võis ta olla seotud lihtsamate või keerulisemate orgaaniliste ühendite (nt. alkaanid või aromaatsed ühendid) oksüdeerimisega kui ka nitraadi redutseerimisega. (Cluff *et al*, 2014)

#### 4.2. Selekteeritud isolaatide toime argilliidi orgaanilise osa lagundamisele

Nii looduses kui biotehnoloogilistes protsessides lagundavad mikroorganismide kooslused orgaanilist substraati paremini kui üksikud tüved eraldi. Käesoleva töö käigus kasutati algsetest kooslustest eraldatud ja iseloomustatud fakultatiivselt anaeroobseid isolaate uutes OxiTop® kultiveerimiskatsetes (tabel 11), selgitamaks nende rolli protsessis ning millise

kooseisuna toimiksid nad kõige tõhusamalt. Kooslused katsete nr 28-30 inokulumide jaoks koostati juhusliku valiku alusel. Võrdluseks kasutati katses nr 26 algset (5A) inokulumit.

**Tabel 11.** Kultiveerimiskatsed eraldatud ja selekteeritud tüvedega.

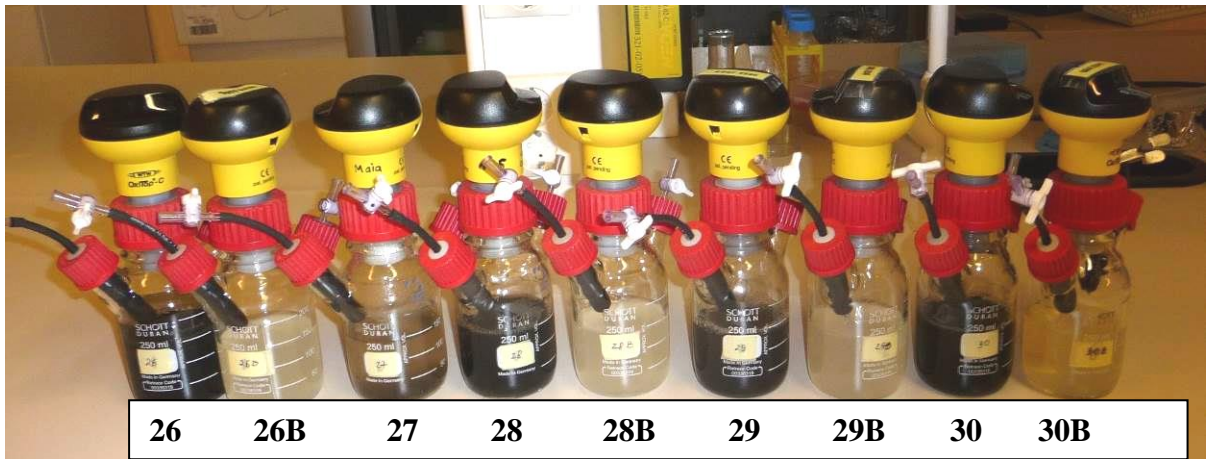
Katse koostis	Katse nr
5A + argilliit + sööde	26
Isolaadid 1-29 + argilliit + sööde	28
Isolaadid 1-13 + argilliit + sööde	29
Isolaadid 14-29 + argilliit + sööde	30
Argilliit + 0,9% NaCl lahus	27

Lisaks käivitati paralleelkatsed (26B, 28B, 29B, 30B) samade inokulumidega, kuid ilma argilliidita, et eristada söötmetest ja argilliidi orgaanilisest ainest toodetud gaasi ehk määrata argilliidist tekkinud gaasi hulk kogu tekkinud gaasi hulgast.

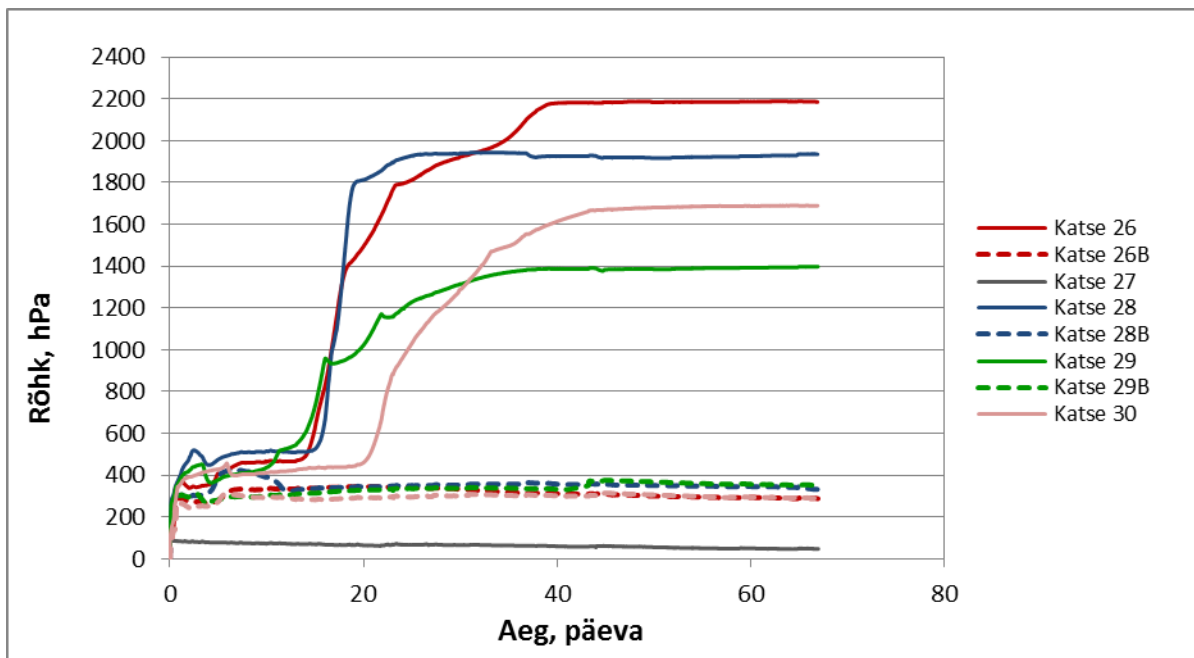
#### 4.2.1 Isoleeritud mikroorganismide mõju gaasi eraldumisele argilliidist

Rõhumuutused argilliidiproovide mikrokosmides (joonis 21) näitasid, et kõige rohkem tekkis gaasi katsetes 26, mis sisaldas algset kooslust sh ka metanogeenide ning katses 28, mille inokulum sisaldas kõiki isoleeritud tüvesid. Katses 29 jäi eksponentsiaalne gaasiteke lühiajaliseks ning kogu toodetud gaasi hulk kõige väiksemaks. Katsel 30 oli teistest pikem lag-faas ja sellele ei järgnenud hüppelist gaasitekke kiiruse suurenemist nagu teistel katsetel. Lõplik gaasi kogus oli keskmine. Kõigis paralleelkatsetes (26B-30B) oli gaasiteke ühtemoodi väike. Katses 27, kus oli vaid argilliit ja NaCl lahus, gaasi ei toodetud.

Kõigis argilliiti sisaldanud ja gaasiteket näidanud pudelites (26, 28, 29, 30) muutus sööde katse käigus mustjaks. Ilma argilliidita ja vähe gaasi tootnud pudelites (26B, 28B, 29B, 30B) jäi sööde värvusetuks. Argilliidi ja NaCl lahusega pudelis jäi lahus kergelt pruunikaks (joonis 20).



Joonis 20. Kultiveerimiskeskonna värvuse muutus katse käigus.



Joonis 21. Rõhmuutused argilliidiproovide mikrokosmides,  $t = -80^{\circ}\text{C}$  säilitatud inokulumide ja puhaskultuuridega,  $t = 37^{\circ}\text{C}$

#### 4.2.2 Gaasiliste metaboliitide kontsentratsioonide muutused kultiveerimiskatses

Katsete gaasiproovidest määrati metaani,  $\text{CO}_2$ , lämmastiku,  $\text{O}_2$  sisaldus (graafikud a kuni h) ja osakaal kogu toodetud gaasist. Kõikide gaaside sisaldus hakkas tõusma samal ajal.

**Metaani** toodeti kõige rohkem (max.  $600 \mu\text{mol}/\text{g}$  argillidi kohta) katsetes 26 ja 28, katsetes 29 ja 30 jäi saagis palju väiksemaks (joonis 22):

Katses 26 tekkis metaani 617  $\mu\text{mol/kg}$  kohta, 60% kogu gaasist.

Katses 28 492  $\mu\text{mol/kg}$  kohta, algul 60% kogu gaasist, langes 40%-le.

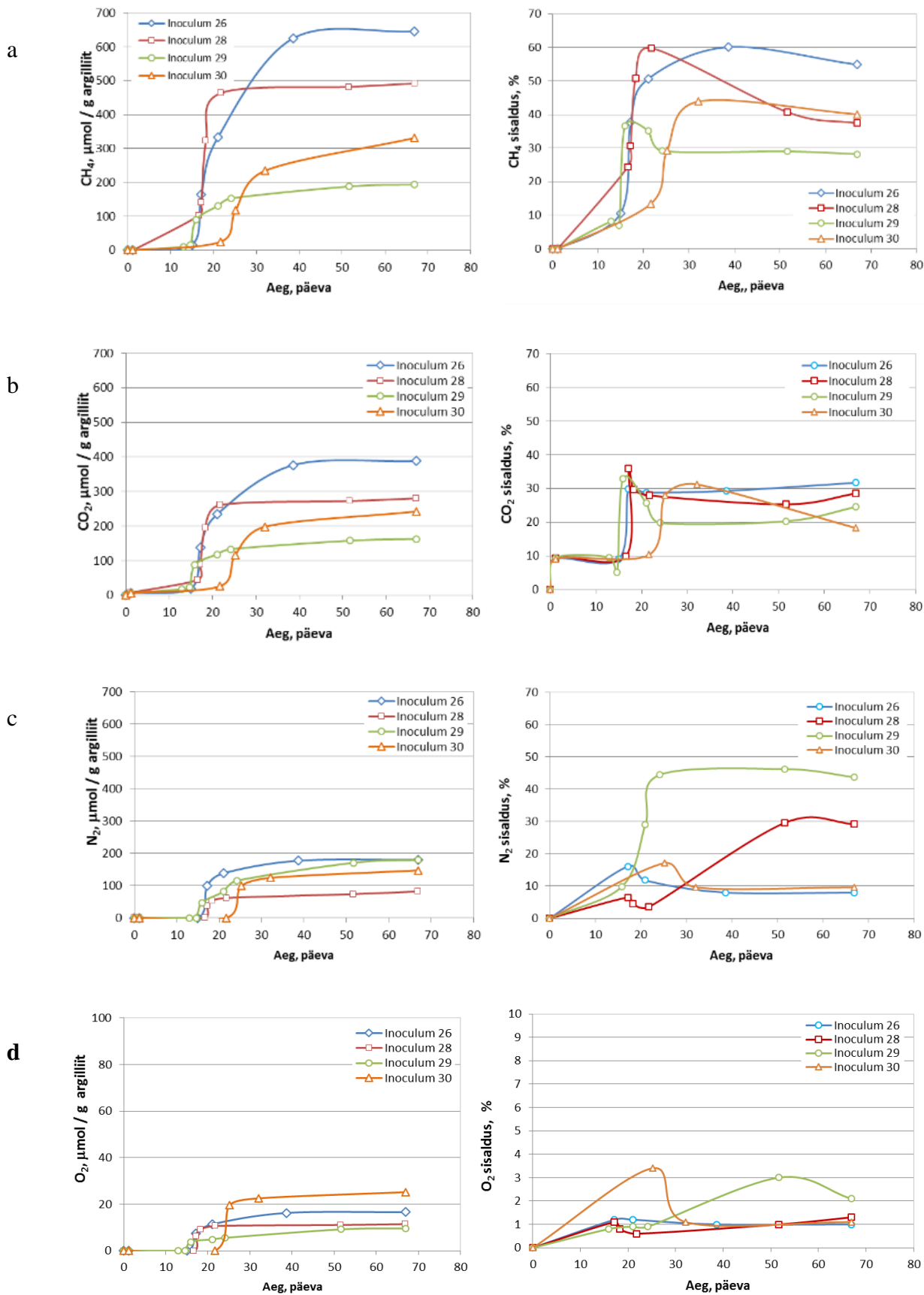
Katses 29 200  $\mu\text{mol/kg}$  kohta, 29% kogu gaasist.

Katses 30 242  $\mu\text{mol/kg}$  kohta, 45% kogu gaasist.

**CO<sub>2</sub>** tekkemuster sarnanes üldiselt kõigis katsetes metaani tekke mustriaga nii ajaliselt kui dünaamika poolest, erinedes vaid koguselt jäädes veidi rohkem kui poole väiksemaks metaani tekkest (max. 600  $\mu\text{mol/ g}$  argillidi kohta). Rohkem tekkis süsihappegaasi katsetes 26 ja 28 (joonis 22).

**Lämmastiku** tekkis erinevate katsete vahel väga suurt erinevust ei olnud (kõigil oli vahemikus 100-200  $\mu\text{mol/ g}$  argillidi kohta) võrreldes metaani ja CO<sub>2</sub> tekkega. Kuid metaani ja CO<sub>2</sub> tootmises silma paistnud katse 28 oli lämmastiku tootmises kõige tagasihoidlikum (joonis 22).

**Hapniku** sisaldus suurenes (NB! katsed viidi läbi argooni keskkonnas) katsetes vähesel määral koos teiste gaaside tekkega, katsetes 26-29 püsis seejärel ühtlasel ja sarnasel tasemel (10-20  $\mu\text{mol/ g}$  argillidi kohta), katses 30 suurenes kõige rohkem (kuni 30  $\mu\text{mol/ g}$  argillidi kohta) (joonis 22).

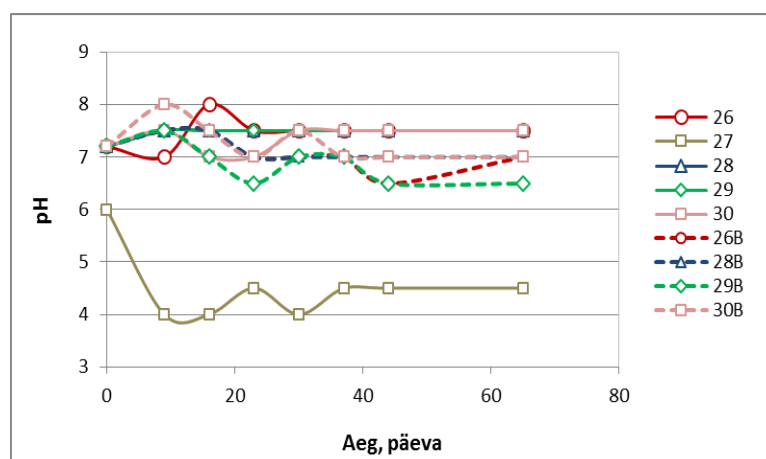


**Joonis 22.** Argilliidi loomuliku kooslusega ja eelnevatest katsetest isoleeritud tüvedega kultiveerimiskatse gaasi koostise ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  ja  $\text{O}_2$ ) analüüsid. Vasakul tekkinud gaasi kogus ( $\mu\text{mol/g}$  argilliit) erinevates katsetes, paremal ühe gaasi osakaal (%) teistest gaasidest erinevates katsetes. a)  $\text{CH}_4$  b)  $\text{CO}_2$  c)  $\text{N}_2$  d)  $\text{O}_2$

#### 4.2.4 Mikroorganismide arvukus, metaani teke ja söötme pH

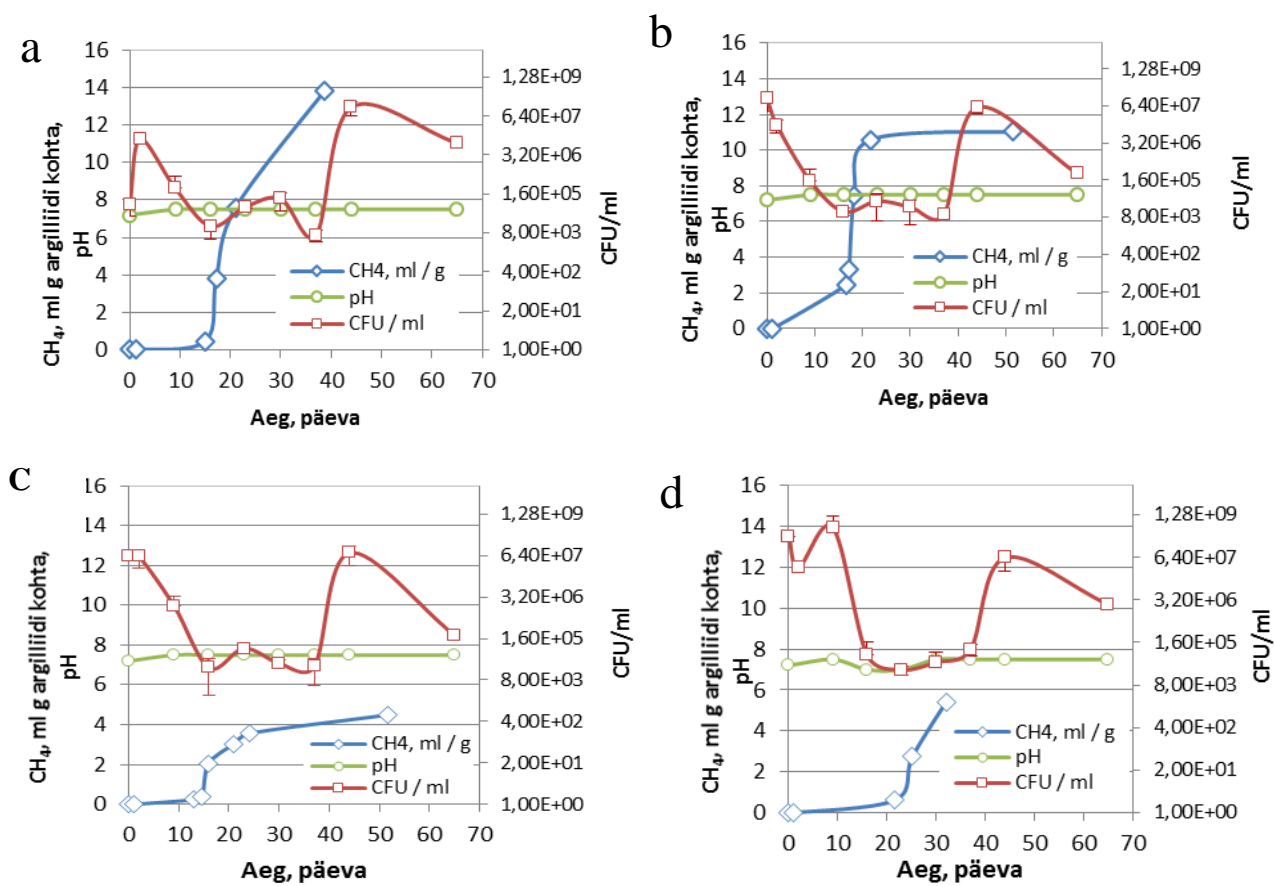
Kultiveerimiskatse käigus määrati vedelikuproovidest väljakülvidega fakultatiivselt anaeroobsete mikroorganismide arvukusi erinevatel ajapunktidel, samadel proovidel mõõdeti ka pH. Gaasiproove võeti siis kui rõhk pudelis oli piisavalt kõrge ( $\geq 200$  hPa).

Kasvukeskkonna pH analüüs näitas, et kõigi söödet sisaldavate katsete pH varieerus vaid vähesel määral neutraalse pH 7 läheduses kuni katse lõpuni (joonis 23) olles seega fakultatiivselt anaeroobsete mikroorganismide arvukuste kõikumistest mõjutamata (Joonis 24). Ilma söötmeta, NaCl lahusega katse 27 pH langes juba esimeste päevadega pH 4 – 4,5 vahemikku.



**Joonis 23.** Söödet (katsed 26, 28-30 ja 26B, 28B-30) sisaldanud kultiveerimiskeskondade pH oli katse jooksul stabiilne.

Jooniselt 24 on näha, et intensiivne metaani teke algab pärast fakultatiivsete anaeroobide arvukuse langust. Aktiivse metanogeneesi ajal püsib aeroobselt kasvatatavate mikroobide arvukus stabiilsena. Katseperioodi viimases kolmandikus taastub fakultatiivsete anaeroobide arv hüppeliselt ning langeb seejärel taas.



**Joonis 24.** Metaani, pH ja fakultatiivsete mikroorganismide tase OxiTop® kultiveerimiskatsetes argilliidi loomuliku kooslusega (a – katse 26) ja eelnevatest katsetest isoleeritud tüvedega (b – katse 28, c – katse 29, d – katse 30).

## 5. ARUTELU

Eesti aluspõhjas olevad suhteliselt kõrge orgaanilise aine sisaldusega kivimid (nt graptoliitargiliit) on elupaigaks erinevatele mikroorganismidele. Käesolevas töös uuriti argilliidist eraldatud ja selle orgaanilist komponenti lagundavat fakultatiivselt anaeroobset mikroobikooslust, et selgitada nende mikroobide võimet seda protsesse läbi viia. Selleks tehti eelnevalt teostatud kultiveerimiskatsetest väljakülvid ja isoleeriti neist puhaskultuurid. Nende omadusi analüüsiti biokeemiliste testidega, määrati nende liigiline kuuluvus 16S rRNA geeni järjestuse põhjal ning erinevate liikide olulisuse hindamiseks lagundamisprotsessis kasutati neid uutes kultiveerimiskatsetes inokulumina lisaks argilliidis olevale loomulikule kooslusele.

Kultiveerimiskatsed 28, 29 ja 30 tehti koos argilliidiga (+ sööde) ja paralleelkatsed 28B, 29B, 30B ilma argilliidita (ainult sööde) ning katsetes 26 ja 26B kasutati inokulumina varem isoleeritud ja adapteeritud 5A konsortsiumi, mis sisaldas mh ka metanogeene. Katse 27 viidi läbi vaid argilliidi ja 0,9% NaCl lahusega (ilma inokulumita). Katse 28 inokulumi kaasati kõik 16s rRNA põhjal määratud tüved (25 isolaati). Katse 29 j 30 inokulumide jaoks jagati isolaadid juhusliku valiku põhjal kahte ossa. Katsetesse 29 ja 30 sattusid mõlemasse *Batsilluseid*, *Stafülokokke* ja *Enterobaktereid*. Katse 29 sisaldas suuremat valikut *Batsilluste* tüvesid ja lisaks veel *Pseudomonaseid*. Katse 30 sisaldas lisaks ühistele liikidele veel hõimkonna *Aktinobakteeria* esindajaid, *Mikrobakteeriumeid* ja *Rothiat*.

Kõigis inokulumi ja argilliiti sisaldavates kultiveerimispudelites tekkis gaasi oluliselt rohkem kui ainult söötme ja inokulumiga kontrollkatsetes. Katsetes 26 ja 28 tekkis gaasi palju enam kui katsetes 28 ja 29, millest võib arvata et:

- a) mitmekesisem kooslus on tõhusam orgaanilise aine lagundamises kui vähendatud mitmekesisusega kooslus
- b) kuigi kõik katsed sisaldasid ka argilliidi loomulikku kooslust, siis juhusliku valiku alusel koostatud inokulumide kooslused võisid ka loomuliku koosluse toimimist häirida.

Kasvukeskkonna pH püsimine pH 7 läheduses kõigis söödete sisaldanud katsetes kogu katse aja on sobilik nii heterotroofsetele fakultatiivsetele anaeroobidele kui ka metanogeenidele. pH stabiilsus näitab söötme piisavat puhverdusvõimet. Katse 27 söödete ei sisaldanud ning selle pH muutus kiiresti happeliseks, mida metanogeenid ei talu. Seepärast ei toimunud seal ka gaasitootmist.

Metaani tekkis kõigis argilliiti ja söödet sisaldanud katsetes. Metaani maksimaalne saagis oli katses 26 ja seda tõenäoliselt seepärast, et katse inokulum, 5A, sisaldas ka metanogeneene jt oblikatoorseid anaeroobe. Kuigi katsete 28, 29 ja 30 inokulumid arhesid ei sisaldanud ning on teada, et ainult arhed on võimelised metanogeneesiks, võib järeldada, et nendes katsetes metaani tootnud arhed pärinesid argilliidist. Metaani osakaal (%) kogu toodetud gaasis tõusis ka katses 28 katsega 26 samaväärsele tasemele. Isotoopanalüüsi tulemuste põhjal oli tekkinud metaan kerogeense päritoluga ehk tekkinud argilliidi orgaanilise aine lagundamise tulemusena.

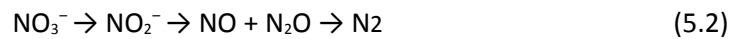
Fakultatiivsetete anaeroobide arvukuse kõikumised ja metaani teke oli kõigis katsetes üldjoontes vastasfaasis – intensiivne metaani tootmine algas siis kui arvukused oli langenud, mis näitab, et fakultatiivsete anaeroobide arvukuse vähenedes kasvas metanogeenide arvukus. Katsetes 28 ja 29 hakkas kultiveerimise lõpupoole metaanisaldus vähema, mida võisid põhjustada argilliidi loomulikus koosluses olevad metanotroofid.

Hapniku teke anaeroobselt käivitatud katse gaasifaasi võib olla põhjustatud porfüriinide lagundamise käigus tekkiva peroksiidi lagundamisel veeks ja hapnikuks mikroobsete katalaaside abil. Isolaatide biokeemiliste testidega selgus, et 50%-l isolaatidest on katalaasne aktiivsus.



Kui üldiselt on metanogeenid oblikatoorsed anaeroobid siis, metanogeenid perekonnast *Methanosarcina* on võrdlemisi aerotolerantsed, sellepärast võimalik nende eksisteerimine keskkonnas kus 0,5-3% O<sub>2</sub>. Varem teostatud argilliidi mikroobikoosluse pürosekvenerimisega leiti koosluse hulgast ka *Metanosarcina* perekond. (Menert *et al*, 2016) *Metanosarcina* kasvu soodustab ka katsete söötmesse lisatud betaiin, mida nad saavad kasutada substraadina metülotroofses metabolismirajas. (Kinnunen, 2013)

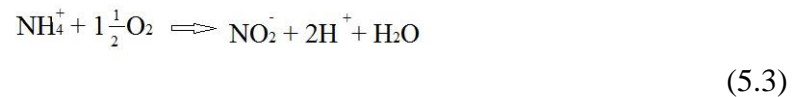
Kõigis katsetes sisaldas gaasiproov ka lämmastikku. Isolaatide mikrobioloogilise analüüsi põhjal olid denitriifitseeriva omadusega vaid *Pseudomonased*, keda sisaldasid katse 28 ja 29 inokulumid. Neis katsetes oligi lämmastiku osakaal märkimisväärselt suurem (vastavalt 30% ja 45%) kui katsetes 26 ja 30 (N<sub>2</sub> sisaldus < 20%). Kirjanduse põhjal olid denitriifitseeriva võimega veel *B.humi*, *B.cereus*, *S.warneri*, *Rothia*, *E.cloacae* ja *S.stutzeri* ehk iga katse inokulumis mitu erinevat liiki. See seletab N<sub>2</sub> tekke kõigis katsetes.



(<https://en.wikipedia.org/wiki/Denitrification>)

Lisaks võis katsetes toimuda ka nitrifikatsioon, milleks kirjanduse põhjal võivad võimalised olla *Bacillus subterraneus* ja *P. stutzeri*, kes juhusliku valiku tulemusena sattusid katsetesse 28 ja 29. Seda võimaldab kultiveerimise käigus tekkinud hapnik.

Nitrifikatsioon toimub kahes faasis:



I faasis oksüdeeritakse ammoniaak või ammoonium nitritiooniks

II faasis oksüdeeritakse nitrit nitraadiks



(<http://mikroobidringetes.weebly.com/nitrifikatsioon.html>)

## 6. JÄRELDUSED

- Argilliidi orgaanilist osa on võimalik argilliidist isoleeritud mikroobikoosluse abil lagundada.
- Algsest mikroobikooslusest eraldatud, fakultatiivsetest anaeroobsete tüvedest koostatud inokulumiga on samuti võimalik argilliidi orgaanilist osa lagundada.
- Argilliidi orgaanilise osa lagundamise efektiivsus sõltub mikroorganismide mitmekesisusest ja konkreetsest koosseisust.

## 7. KOKKUVÕTE

Graptoliitargilliit on raskemetalle sisaldav tavapärase põlevkiviliik, kus metallid esinevad kas sulfiidsete mineraalidena või geopolümeeride (kerogeeni) koosseisus. Muuhulgas on argilliit elupaigaks erinevatele mikroorganismidele. Katsed on näidanud, et argilliidis elavad heterotroofsed fakultatiivsed anaeroobid ja metanogeensed arhed on kooslusena võimelised pH 7 ja anaeroobsetes tingimustes kerogeeni lagundama, mille tulemusena tekib metaan ja CO<sub>2</sub> ning lahustuvad metallid. Protsessi toimumist soodustavad metanogeneesi substraatide lisamine kasvukeskkonda.

Käesoleva töö eesmärk oli iseloomustada argilliidi orgaanilist komponenti lagundavat fakultatiivselt anaeroobset mikroobikooslust ja selgitada isoleeritud mikroobide võimekust seda protsessi läbi viia.

Eelnevalt argilliidist eraldatud loomuliku mikroobikooslusega 5A läbi viidud kultiveerimiskatsetest tehti väljakülvid, isoleeriti aeroobsetes tingimustes 29 tüve, iseloomustati nende biokeemilisi omadusi. 16S rRNA geeni sekveneerimisel saadud järjestuste analüüsiga määrati nende hulgast 25-le isolaadile lähimad tüved.

Uuritud järjestused klasterdusid kolme hõimkonda: grampositiivsed bakterid hõimkondadesse *Firmicutes* (16 isolaati) ja *Actinobacteria* (3 isolaati), gramnegatiivsed *Proteobacteria* hõimkonda (6 isolaati). Kõige rohkem isoleeriti algsest kooslusest *Bacilluseid*, kellele järgnesid *S.warneri*, *P.stutzeri*, *E.cloacae*, *M.oxydans* ja *Rothia*. Biokeemiliste testid näitasid, et 14-l isolaadil oli katalaasne aktiivsus ja 19-l (osaliselt erinevatel) isolaatidel ureaasne aktiivsus, mis on olulised omadused raskesti lagundatava orgaanilise aine metaboliseerimisel. Selleks, et kontrollida kas need tüved toimivad samaväärselt argilliidi orgaanikat lagundava kooslusega ja kas nad toimivad sama hästi koos või teatud kombinatsioonis, tehti uued kultiveerimiskatsed, kus kasutati isoleeritud tüvesid inokulumina ning analüüsiti katse käigus tekkinud gaasi teket ja koostist. Kultiveerimiskatsete tulemused näitasid, et kõige parema inokulumina toimis argilliidi orgaanilise aine lagundamisel algne mh. ka metanogene sisaldanud 5A inokulum katses 26, tootes kõige rohkem ja kõige suurema metaanisaldusega gaasi. Pea-aegu samaväärselt toimis ka kõiki isoleeritud tüvesid sisaldanud ehk mitmekesisema kooslusega inokulum katses 28. Vähendatud isolaatide arvu ja mitmekesisusega kooslused tootsid oluliselt vähem gaas ja metaani sisaldus selles oli väiksem.

## 8. SUMMARY

The explosive growth of humankind and the implementation of various technological tools have significantly increased the demand for them. Technological devices contain metals (including precious metals) for operating. Increasing demand for technology leads to increased demand for metals resources. High grade ores are becoming depleted, and therefore interest for low grade and complex ores is increasing. One of them is black shale that contains U, Mo, V, Pb, Zn, Re, Ni, ten times more than the average of the Earth's crust but not enough to be wise to separate each metal individually.

Metals are in argillite as sulfides or in the composition of organo-metallic compounds. While the role of pyrite oxidation microorganisms in bioleaching of metals is clear, less is known about the microbial decomposition of organometallic complexes. Estonian basement minerals with relatively high content of organic matter (e.g. graptolite argillites) are habitat for microorganisms. Previous studies have shown that heterotrophic facultative anaerobes and methanogenic archaea of argillite community are capable under anaerobic conditions and at pH 7 to decompose the organic matter, which results in a methane and CO<sub>2</sub>, and liberating the metals.

The aim of this thesis is to characterize the biodegradative potential microbial communities of argillite organic matter with methane producing / metal leaching properties, and explain their capability to carry out this process.

29 indigenous strains of argillite from cultivation experiments in anaerobic microcosms (OxiTop) were isolated for microbial identification in aerobic conditions. Various tests were performed with isolates for characterising their biochemical properties. Besides other things results showed that >50% of them had catalase and urease activity what might be necessary for ability of degrading complex organic matter.

For finding the nearest strains the 16S rRNA gene based on Sanger sequencing of argillite indigenous strains was performed for 25 isolates. The analysis of results showed that studied sequences clustered into three phylum: *Firmicutes* (16 isolates) and *Actinobacteria* (3 isolates), *Proteobacteria* (6 isolates). The most of them were nearest to genus *Bacillus*, followed *S.warneri*, *P.stutzeri*, *E.cloacae*, *M.oxydans* and *Rothia*.

These isolates were used for a new cultivation (OxiTop) experiment to define whether these strains function as well as argillite indigenous community (5A), whether they work equally

well together, separately or in some combination. Isolates were used all together and randomly separated in two parts. The gas yield and composition were measured and analysed as parameters for biodegradation of organic matter of argillite. Results showed that the gas and methane yields were higher in cultivation with all isolates than in cultivations with smaller diversity.

Based on results of this study, following conclusions were made:

- Indigenous strains of argillite are able for biodegradation of argillite organic matter.
- Facultative anaerobes isolated from Indigenous strains of argillite are also able for biodegradation of argillite organic matter.
- The effectiveness of biodegradation depends on diversity on microbial community

In further studies the metal analyses of cultivation liquid and isolation of strictly anaerobic strains should be performed.

## 9. TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajat, Anne Menertit, entusiastliku, vankumatult optimistliku ja positiivse suhtumise ja toetamise eest!

Lisaks soovin tänada kõikvõimalikke valmistoidu valmistajaid, mikrolaineahju ja nõudepesumasina leiutajaid, kes aitasid selle töö valmimiseks oluliselt aega kokku hoida. Erilised tänud ka inglastele nende Twinings™ English Breakfast tee eest ja šveitslastele Lindt šokolaadi eest, kes varustasid mind töö valmimiseks oblikatoorse kofeiini- ja energiaallikaga!

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Abou-Shanab, R., Angle, J., Chaney, R. (2006). Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2882-2889. doi:10.1016/j.soilbio.2006.04.045
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M., Starns, A. J. M. (2011) Biomethanation and its potential. *Methods in Enzymology*, 494, 327-351.
- Berger, S., Welte, C., Deppenmeier, U. (2012). Acetate activation in *Methanosaeta thermophila*: characterization of the key enzymes pyrophosphatase and acetyl-CoA synthetase. *Archaea*, 2012, 1-10. doi:10.1155/2012/315153
- Braun, R., Drosig, B., Bochmann, G., Weiß, S., Kirchmayr, R. (2009). Recent Developments in bio-energy recovery through fermentation. *Microbes at Work*, 35-58. doi:10.1007/978-3-642-04043-6\_2
- Carballa, M., Regueiro, L., Lema, J. M. (2015). Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 103-111. doi:10.1016/j.copbio.2015.01.008
- Chou, Y., Chou, J., Lin, K., Lin, M., Wei, Y., Arun, A. B., Young, C.C., Chen, W. (2008). *Rothia terrae* sp. nov. isolated from soil in Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 84-88. doi:10.1099/ij.s.0.65172-0
- Cibis, K. G., Gneipel, A., König, H. (2016). Isolation of acetic, propionic and butyric acid-forming bacteria from biogas plants. *Journal of Biotechnology*, 220, 51-63. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.01.008
- Cluff, M. A., Hartsock, A., MacRae, J. D., Carter, K., Mouser, P. J. (2014). Temporal changes in microbial ecology and geochemistry in produced water from hydraulically fractured Marcellus shale gas wells. *Environmental Science & Technology*, 48(11), 6508-6517. doi:10.1021/es501173p
- Cordero, P. R., Bennett, R. M., Bautista, G. S., Aguilar, J. P., Dedeles, G. R. (2015). Degradation of nickel protoporphyrin disodium and vanadium oxide octaethylporphyrin by Philippine microbial consortia. *Bioremediation Journal*, 19(2), 93-103. doi:10.1080/10889868.2013.827616
- De, V. P. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume three. The Firmicutes*. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W. (Eds.) Dordrecht: Springer, 1317 pp.
- Dempers, C., Breed, A., Hansford, G. (2003). The kinetics of ferrous-iron oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: effect of cell

- maintenance. *Biochemical Engineering Journal*, 16(3), 337-346. doi:10.1016/s1369-703x(03)00113-x
- Fournier, G. P., Gogarten, J. P. (2007). Evolution of acetoclastic methanogenesis in *Methanosarcina* via horizontal gene transfer from cellulolytic *Clostridia*. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1124-1127. doi:10.1128/jb.01382-07
- Glass, J. B., Orphan, V. J. (2012). Trace metal requirements for microbial enzymes involved in the production and consumption of methane and nitrous oxide. *Frontiers in Microbiology*, 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00061
- Heinaru, E. Vedler, E. (2011). *Praktilisi töid mikrobioloogias*. Tartu: AS Atlex.
- Heyrman, J. (2005). *Bacillus arenosi* sp. nov., *Bacillus arvi* sp. nov. and *Bacillus humi* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 111-117. doi:10.1099/ijs.0.63240-0
- Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M. (2010). Microbes in aerobic and anaerobic waste treatment. In: H. Insam et al. (eds.) *Microbes at Work*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2-34. doi:10.1007/978-3-642-04043-6\_1
- Johnson, D. B. (2014). Biomining—biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 24-31. doi:10.1016/j.copbio.2014.04.008
- Kanso, S., Greene, A. C., Patel, B. K. (2002). *Bacillus subterraneus* sp. nov., an iron- and manganese-reducing bacterium from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 869-874. doi:10.1099/00207713-52-3-869
- Kim, J.-S., Crowley, D.E. (2007). Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea tar pits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4579–4591.
- Kinnunen, M., (2013). Identifying archaea in anaerobic digester. Magistritöö, Tallinna Tehnikaülikool, 2013, 61 pp.
- Kriipsalu, M., Maastik, A., Truu, J. Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamine. Tallinna Tehnikaülikooli Kirjastus, Tallinn, 2016, 376 lk.
- Kutschke, S., Guézennec, A., Hedrich, S., Schippers, A., Borg, G., Kamradt, A., Gouin J., Giebner, F., Schopf, S., Schlömann, M., Rahfeld, A., Gutzmer, J., D'Hugues, P., Pollmann, K. Dirlich, S., Bodéan, F. (2015). Bioleaching of Kupferschiefer blackshale – A review including perspectives of the Ecometals Project. *Minerals Engineering*, 75, 116-125. doi:10.1016/j.mineng.2014.09.015

- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdes, E., Palleroni, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 510-547. doi:10.1128/mnbr.00047-05
- Lippmaa, E., Maremäe, E., Pihlak, A., Agurauja, R. (2009). Estonian graptolitic argillites – ancient ores or future fuels? *Oil Shale*, 26(4), 530. doi:10.3176/oil.2009.4.08
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., de Bruijn, F. J. (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295.
- Luna-delRisco, M., Kaja Orupõld, K., Henri-Charles Dubourguier, H.-C. (2011). Particle-size effect of CuO and ZnO on biogas and methane production during anaerobic digestion. *Journal of Hazardous Materials*, 189, 603–608, j.jhazmat.2011.02.085.
- Luo, K., Fu, B., Zhang, L., Liu, H., Liu, H. (2014) Screening of homoacetogen mixed culture converting H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> to acetate. *Chinese Journal of Biotechnology*, 30(12), 1901-1911.
- Matlakowska, R., Narkiewicz, W., Skłodowska, A. (2010) Biotransformation of organic-rich copper-bearing black shale by indigenous microorganisms isolated from Lubin copper mine (Poland). *Environmental Science and Technology*, 44, 2433–2440.
- Matlakowska, R., Skłodowska, A., Nejbert, K. (2012) Bioweathering of Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, SW Poland) by indigenous bacteria: implication for dissolution and precipitation of minerals in deep underground mine. *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 99–110.
- Matlakowska, R., Włodarczyk, A., Słominska, B., Skłodowska, A., (2014), Extracellular elements-mobilizing compounds produced by consortium of indigenous bacteria isolated from Kupferschiefer black shale – implication for metals biorecovery from neutral and alkaline polymetallic ores. *Physicochemical Problems of Mineral Processing* 50(1), 87–96.
- Menert, A.; Kivisaar, M.; Sipp Kulli, S.; Heinaru, A.; Maidre, T. Decomposition of graptolite argillite organic matter by microbial consortium accompanied by bioleaching of metals and production of methane. *Estonian Patent Application P201600003, priority date: 16.02.2016.*
- Menert, T., (2013) Hariliku pilliroo (*Phragmites australis*) biogaasi toorainena kasutamise võimalused, Magistritöö, Tallinna Tehnikaülikool, 2015, 74 lk.
- Merlin Christy, P., Gopinath, L., Divya, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, 167-173. doi:10.1016/j.rser.2014.03.010

- Meslé, M., Périot, C., Dromart, G., Oger, P. (2015). Methanogenic microbial community of the Eastern Paris Basin: Potential for energy production from organic-rich shales. *International Journal of Coal Geology*, 149, 67-76. doi:10.1016/j.coal.2015.07.002
- Nedelkova, M., Merroun, M. L., Rossberg, A., Hennig, C., Selenska-Pobell, S. (2007). Microbacterium isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3), 694-705. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00261.x
- Normak, A., Vollmer, E., Orupõld, K., Kask, Ü. (2009). Biogaasi tootmine ja kasutamine. Käsiraamat. Tartu: Eesti Põllumeeste Keskliit, Tartu, 157 lk.
- Ostrem, K. (2004) Greening waste: Anaerobic digestion for treating the organic fraction of municipal solid wastes. Earth Engineering Center Columbia University. Master's thesis. 51 pp. [http://www.seas.columbia.edu/earth/wtert/sofos/Ostrem\\_Thesis\\_final.pdf](http://www.seas.columbia.edu/earth/wtert/sofos/Ostrem_Thesis_final.pdf).
- Penger, J., Conrad, R., Blaser, M. (2012). Stable carbon isotope fractionation by methylotrophic methanogenic archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7596-7602. doi:10.1128/aem.01773-12
- Petersell, V. Diktüoneemakilt, energia ja keskkond. Keskkonnatehnika, 2008, 8.
- Petsch, S.T. Edwards, K.J., Eglinton, T.I. (2005) Microbial transformations of organic matter in black shales and implications for global biogeochemical cycles. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219, 157– 170.
- Plugge, C. M., Van Lier, J. B., Stams, A. J. (2009). Syntrophic communities in methane formation from high strength wastewaters. *Microbes at Work*, 59-77. doi:10.1007/978-3-642-04043-6\_3
- Purwantini, E., Torto-Alalibo, T., Lomax, J., Setubal, J. C., Tyler, B. M., & Mukhopadhyay, B. (2014). Genetic resources for methane production from biomass described with the gene ontology. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00634
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1) 1-7.
- Rohwerder, T., Sand, W. (2007). Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation. *Microbial Processing of Metal Sulfides*, 35-58. doi:10.1007/1-4020-5589-7\_2
- Rothman, D. H., Fournier, G. P., French, K. L., Alm, E. J., Boyle, E. A., Cao, C., Summons, R. E. (2014). Methanogenic burst in the end-Permian carbon cycle.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), 5462-5467.  
doi:10.1073/pnas.1318106111
- Sadowski, Z., Szubert, A., Maliszewska, I.H., Jazdyk, E., 2007. A view on the organic matter and metalloporphyrins biodegradation as characteristic components of black shale ores. *Advanced Material Research*, 20–21, 95–98.
- Sabumon, P. (2007). Anaerobic ammonia removal in presence of organic matter: A novel route. *Journal of Hazardous Materials*, 149(1), 49-59.  
doi:10.1016/j.jhazmat.2007.03.052
- Scheller, S., Goenrich, M., Boecher, R., Thauer, R. K., Jaun, B. (2010). The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 465(7298), 606-608. doi:10.1038/nature09015
- Schlegel, M. E., McIntosh, J. C., Petsch, S. T., Orem, W. H., Jones, E. J., Martini, A. M. (2013). Extent and limits of biodegradation by in situ methanogenic consortia in shale and formation fluids. *Applied Geochemistry*, 28, 172-184.  
doi:10.1016/j.apgeochem.2012.10.008
- Shah, A.F., Mahmood, Q., Shah, M.M., Pervez, A., Asad, A.S. (2014). Microbial ecology of anaerobic digesters: The key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-21. doi:10.1155/2014/183752
- Shen, S., Bowring, S. A. (2014). The end-Permian mass extinction: a still unexplained catastrophe. *Nat. Sci. Rev*, 1(4), 492-495. doi:10.1093/nsr/nwu047
- Sepp, H. (2013) Holotseeni paleokeskkonna muutused Loode-Eestis järvesetete stabiilsete isotoopide ja jälgelementide põhjal Turvaste Valgejärve läbilõikest. Magistritöö, Tartu Ülikool, 46 lk.
- Souto, T. F., Aquino, S. F., Silva, S. Q., Chernicharo, C. A. (2009). Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation*, 21(3), 411-424.  
doi:10.1007/s10532-009-9311-x
- Toomik, E., (2015), Puidujäätmete komposti mikroobikoosluse kirjeldamine. Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool, 91 lk.
- Zhuang, G, (2014) Methylotrophic methanogenesis and potential methylated substrates in marine sediment. Doctoral dissertation, University of Bremen, 187 pp.
- Ziemiński, K., (2012). Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 11(18). doi:10.5897/ajbx11.054
- Watling, H. (2014). Review of biohydrometallurgical metals extraction from polymetallic mineral resources. *Minerals*, 5(1), 1-60. doi:10.3390/min5010001

- Watling, H., Collinson, D., Shiers, D., Bryan, C., Watkin, E. (2013). Effects of pH, temperature and solids loading on microbial community structure during batch culture on a polymetallic ore. *Minerals Engineering*, 48, 68-76.  
doi:10.1016/j.mineng.2012.10.014
- Vera, M., Schippers, A., Sand, W. (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7529-7541. doi:10.1007/s00253-013-4954-2
- Voolma, M., Soesoo, A., Hade, S., Hints, R., & Kallaste, T. (2013). Geochemical heterogeneity of Estonian graptolite argillite. *Oil Shale*, 30(3), 377.  
doi:10.3176/oil.2013.3.02
- Wuchter, C., Banning, E., Mincer, T. J., Drenzek, N. J., & Coolen, M. J. (2013). Microbial diversity and methanogenic activity of Antrim Shale formation waters from recently fractured wells. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00367
- Yele, V. U., Desai, K. (2014). A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri*; optimization of media and production conditions using statistical methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(2), 855-869.  
doi:10.1007/s12010-014-1331-2

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

ABIS Encyclopedia.

<http://www.tgw1916.net/Bacillus/fusiformis.html> (külastatud 24.05.2016)

ABIS Encyclopedia.

<http://www.tgw1916.net/Bacillus/thermoamylovorans.html> (külastatud 24.05.2016)

ABIS Encyclopedia.

<http://www.tgw1916.net/Bacillus/thermoamylovorans.html> (külastatud 24.05.2016)

ABIS Encyclopedia.

<http://www.tgw1916.net/Enterobacteria/Enterobacter.html> (külastatud 24.05.2016)

ABIS Encyclopedia.

<http://www.tgw1916.net/Pseudomonas/stutzeri.html> (külastatud 24.05.2016)

ABIS Encyclopedia.

<http://www.tgw1916.net/Staphylococcus/warneri.html> (külastatud 24.05.2016)

Bacillus - Medical Microbiology - NCBI Bookshelf.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/> (külastatud 24.05.2016)

Biogaas - Wikipedia, the free encyclopedia

<http://et.wikipedia.org/wiki/Biogaas> (külastatud 01.05.2016)

Biogaas – Energiatalgud

<http://www.energiatalgud.ee/index.php?title=Biogaas> (külastatud 01.05.2016)

Biobleaching - Wikipedia, the free encyclopedia.

<https://en.wikipedia.org/wiki/Biobleaching> (külastatud 24.05.2016)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (külastatud 18.05.2016)

[http://kivid.blogspot.com/2011\\_11\\_01\\_archive.html](http://kivid.blogspot.com/2011_11_01_archive.html) (külastatud 12.04.2016)

Denitrification - Wikipedia, the free encyclopedia.

<https://en.wikipedia.org/wiki/Denitrification> (külastatud 26.05.2016)

Domeen (bioloogia) - Vikipeedia, vaba entsüklopeedia.

[https://et.wikipedia.org/wiki/Domeen\\_%28bioloogia%29](https://et.wikipedia.org/wiki/Domeen_%28bioloogia%29) (külastatud (16.05.2016)

DyP-type peroxidase family - Wikipedia, the free encyclopedia

[https://en.wikipedia.org/wiki/DyP-type\\_peroxidase\\_family](https://en.wikipedia.org/wiki/DyP-type_peroxidase_family) (10.05.2016)

EAS | Ettevõtluse Arendamise Sihtasutus, Uuring Eesti argilliidist biogeense metaangaasi

puuraugus ( in situ ) tootmise võimalikkuse tõestamiseks.

<http://www.eas.ee/images/doc/sihtasutusest/uuringud/ettevotlus/uuring-argilliidist-biogeense-metaangaasi.pdf>. (külastatud 18.05.2016)

Genomes - Genome - NCBI.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1432> (külastatud 24.05.2016)

Maavarad

<http://www.ut.ee/BGGM/maavara/dityoneema.html> (12.04.2016)

Nitrifikatsioon - Mikroobid erinevate ainete ringetes.

<http://mikroobidringetes.weebly.com/nitrifikatsioon.html> (külastatud 26.05.2016)

Porphyrin - Wikipedia, the free encyclopedia

<https://en.wikipedia.org/wiki/Porphyrin> (13.04.2016)

Püriit

<http://www.ut.ee/BGGM/miner/pyriit.html> (12.04.2016)

R2A Broth - Lab M

<http://www.labm.com/products/r2a-broth.asp> (külastatud 23.05.2016)

# LISAD

## LISA 1. Söötmete koostis OxiTop-idele 23.02.2016

Jrk nr	Katsesegu koostis	Katse nr	R2A söödet (3g/L), mL	Betaiin (1,35g/L), mL	NaHCO3 (2,52 g/L), mL	Söötme maht, mL	Argilliit, g	Inokulum, ml
1	R2A (+ NaHCO3 ) + betaiin + argilliit + inokulum (5A-80	26	135	7,5	7,5	150	7,5	7,5
2	NaCl (0,9%) + argilliit	27	0	0	0	0	7,5	0
3	R2A (+ NaHCO3 ) + betaiin + argilliit + isolaadid 1-29	28	135	7,5	7,5	150	7,5	7,5
4	R2A (+ NaHCO3 ) + betaiin + argilliit + isolaadid 1-12	29	135	7,5	7,5	150	7,5	7,5
5	R2A (+ NaHCO3 ) + betaiin + argilliit + isolaadid 13-29	30	135	7,5	7,5	150	7,5	7,5
6	R2A (+ NaHCO3 ) + betaiin + inokulum (5A-80°C)	26B	135	7,5	7,5	150	0,0	7,5
7	R2A (+ NaHCO3 ) + betaiin + isolaadid 1-29	28B	135	7,5	7,5	150	0,0	7,5
8	R2A (+ NaHCO3 ) + betaiin + isolaadid 1-12	29B	135	7,5	7,5	150	0,0	7,5
9	R2A (+ NaHCO3 ) + betaiin + isolaadid 13-29	30B	135	7,5	7,5	150	0,0	7,5
		<b>Kokku</b>	<b>1080</b>	<b>60,0</b>	<b>60,0</b>	<b>1200</b>	<b>37,5</b>	<b>60,0</b>

LISA 2. Isoleeritud tüvede biokeemilised testid

Katse nr	Isolaat	Gram	KOH	Raku kuju, agregatsioon	Sporulatsioon	Denitrifatsioon	KingB	Liikuvus	Ferm/oksüd	Ensümaatiline aktiivsus											
										Oksüdaas	Katalaas	Ureeaas	Indool	Tärklis	Kaseiin	Želatiin	Eskuliin	β-galaktosidaas	ADH	DNaas	
19	1	GN	GN	Ülipisikesed, diplokokid või batsillid?	X	+	-	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	GN	GN	Ülipisikesed, diplokokid või batsillid?	X	+	-	+		+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	3	GN	GN	Ülipisikesed, diplokokid või batsillid?	X	+	-	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	GN	GN	Ülipisikesed, diplokokid või batsillid?	X	+	-	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	7	GP/GN	GP	Väga pisikesed, piklikud, mõned ahelas.	+	-	-	-		-	+	-	-	+	0	-	-	-	-	-	+
	9	GP/GN	GN	Väga väikesed, diplo- või streptokokid?	X	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	10	GP/GN	GP	ovaalsed, osad ahelates, osad (sub)terminaalse sporangiumiga	+	-	-	/		-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	11	GP/GN	GP	Väga väikesed, lühemates ahelates	+	-	-	-		-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	12	GP/GN	GP	Suurtest rakkudest pikad ahelad	+	-	-	-	F, G	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
21	5	GP/GN	GN	Üliväikesed, pulgad	X	-	-	+	F, G	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	6	GP/GN	GN	Üliväikesed pulgad ja ahelad	X	-	-	+	F, G	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	8	GP/GN	GN	Ülipisikesed pulgad, paarispulgad ja ahelad	X	-	-	+	F, G	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
22	13	GP/GN	GP	Väikesed diplokokid ja streptokokid? (pigem pulgad, sh ahelad)	+	-	-	-		-	+	-	-	+	-	-	+		-	-	+
	14	GP/GN	GP	Peenikesed pikad ahelad	+	-	-	-		-	+	-	-	+	-	-	+		-	-	+
16A	15	GP	GP	Väikesed kokid	-	-	-	-	F	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	16	GP/GN	GP	Piklikud	-	-	-	-		-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
	17	GP/GN	GP	Väga väikesed kokid? Mõned vist reas (piklikud?)	+	-	-	+	O	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
	18	GP/GN	GN	Tetrakokid	X	-	-	-	F	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	19	GP/GN	GP	Väikesed, piklikud	+	-	-	-		-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	20	GP	GP	Ülipisikesed kokid	+	-	-	+	F	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
	21	GP/GN	GN	Peenikesed, piklikud	X	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	22	GP/GN	GN	Peenikesed, piklikud	X	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	23	GP/GN	GN	Peenikesed, piklikud, mõned paksemad	X	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
16	24	GP/GN	GP	Peenikesed, piklikud	+	-	-	-		-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	25	GP/GN	GN	Peenikesed, piklikud	X	-	-	+	F	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
	26	GP/GN	GP	Peenikesed, piklikud	-	-	-	-		-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	27	GP/GN	GP	Pikad keskmise paksusega ahelad, hiljem pulgad ja lusikad	+	-	-	-		-	+	-	-	-	0	-	+	+	-	-	+
	28	GP/GN	GN	Peenikesed, piklikud	X	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	29	GP/GN	GN	Peenikesed, piklikud, mõned paksemad	X	-	-	-		-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+

LISA 3. Isoleeritud tüvede biokeemilised testid

Katse nr	Isolaat	C-allikad								VP	Kasv NaCl 2, 5, 7, 10%	pH 5, 7, 9, 11	
		Tsitraat	Sahharoos	Glükoos	Fruktoos	Ksüloos	Arabiinoo	Mannoo	Maltoos				
19	1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	2-5 (7)	7-11	
	2	+	-	+	-	+	+	-	-	-	2-5 (7)	7-11	
	3	+	-	+	-	+	+	-	-	-	2-5	7-11	
	4	+	-	+	-	+	+	-	-	-	2-5 (7)	7-11	
20	7	-	0	0	0	0	0	0	0	-	2-7 (7)	7-11	
	9	-	0	0	0	0	0	0	0	-	2-7	7 (9)	
	10	+	-	-	-	-	-	+	-	-	2-5	(5) 7-11	
	11	-	0	0	0	-	0	0	0	-	2-5		
	12	-	+	+	+	-	-	+	+	+/-	2-7	5-11	
21	5	+	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+/-	2-7	5-11
	6	+	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+/-	2-7	5-11
	8	+	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+G	+/-	2-7	5-11
22	13	-	-	0	0	0	0	0	0		2	(5) 7-9	
	14	-	0	0	0	+	0	0	0	-	2-5	7-9	
16A	15	-	+	+	+	+/-	+/-	+	+	-	2-10	(5-9)	
	16	-	0	0	0	0	0	0	0	-	2-7	7-11	
	17	+	+	+	+	-	-	+	+	-	2-5	5-11	
	18	-	+	+	+	-	-	-	+	+	2-5 (7)		
	19	-	-	0	0	0	-	-	0	-	2-10	5-9 (11)	
	20	-	+	+	+	-	-	+	+	-	2-10	(5) 7-9	
	21	-	0	0	0	0	0	0	0	-	2-7	7-11	
	22	-	0	0	0	0	0	0	0	-	2-5	7-11	
	23	-	0	0	0	0	0	0	0	-	2-5	7-11	
16	24	-	0	0	0	0	0	+		-	2-5	7-11	
	25	+	+	+	-	-	-	+	+	-	2-7	5-11	
	26	-	0	0	0	0	0	0	0	-	2-7	7-9 (11)	
	27	-	-	+	X	X	X	+	+	-	2-10	7-11	
	28	-	0	0	0	0	0	0	0	-	2-5	7-9 (11)	
	29	-	-	-	-	0	-	-	0	-	2-5	7-9	

LISA 4. Isoleeritud tüvede 16S rRNA geenifragmendi järjestus

Katse nr	Isolaat	Määratud tüvi / Tüvi 16S järgi	Identsus	Klassifikatsioon	Katsed 28, 28B	Katsed 29, 29B	Katsed 30, 30B
19	1	CP011854.1 <i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SLG510A3-8	100%	<i>Proteobacteria; Gamma Proteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae</i>	1	1	0
	2	CP011854.1 <i>Pseudomonas stutzeri</i> strain SLG510A3-8	99%	<i>Proteobacteria; Gamma Proteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae</i>	1	1	0
	3	AY571889.1 <i>Pseudomonas sp.</i> HPC26	99%	<i>Proteobacteria; Gamma Proteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae</i>	1	1	0
	4	X	X	X	X	X	X
20	7	KP307815.1 <i>Bacillus subterraneus</i> strain CW27-B11	100%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	1	0
	9	KT380670.1 <i>Bacillus humi</i> strain RHM_120	99%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	1	0
	10	DQ826581.1 <i>Bacillus fusiformis</i> strain LL 58	99%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	1	0
	11	GQ980247.1 <i>Bacillus sp.</i> NBK45	99%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	1	0
	12	KP998178.1 <i>Bacillus cereus</i> strain R-14	100%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	1	0
21	5	CP012165.1 <i>Enterobacter cloacae</i> strain 34978	100%	<i>Proteobacteria; Gamma Proteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	1	1	0
	6	CP012165.1 <i>Enterobacter cloacae</i> strain 34978	100%	<i>Proteobacteria; Gamma Proteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	1	1	0
	8	X	X	X	X	X	X
22	13	LN998066.1 <i>Staphylococcus warneri</i> strain mammoth-17	100%	<i>Firmicutes; Cocci; Bacillales; Staphylococcaceae</i>	1	1	0
	14	KT364469.1 <i>Bacillus thermoamylovorans</i> strain O21	99%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	0	1
16A	15	KP771665.1 <i>Staphylococcus warneri</i> strain SuMS_N03	100%	<i>Firmicutes; Cocci; Bacillales; Staphylococcaceae</i>	1	0	1
	16	GQ980247.1 <i>Bacillus sp.</i> NBK45	99%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	0	1
	17	JQ861547.1 <i>Microbacterium oxydans</i> strain Pp15	100%	<i>Actinobacteria; Actinomycetales; Micrococccineae; Microbacteriaceae</i>	1	0	1
	18	JX869548.1 <i>Rothia sp.</i> R2A-A1X-SW	100%	<i>Actinobacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococccineae; Micrococccaceae</i>	1	0	1
	19	KP771665.1 <i>Staphylococcus warneri</i> strain SuMS_N03	100%	<i>Firmicutes; Cocci; Bacillales; Staphylococcaceae</i>	1	0	1
	20	KP771665.1 <i>Staphylococcus warneri</i> strain SuMS_N03	100%	<i>Firmicutes; Cocci; Bacillales; Staphylococcaceae</i>	1	0	1
	21	CP012167.1 <i>Enterobacter cloacae</i> strain 34998	100%	<i>Proteobacteria; Gamma Proteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>	1	0	1
	22	KT380670.1 <i>Bacillus humi</i> strain RHM_120	99%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	0	1
16	23	X	X	X	X	X	
	24	GQ980247.1 <i>Bacillus sp.</i> NBK45	99%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	0	1
	25	HG934375.1 <i>Microbacterium oxydans</i> isolate M3_17	100%	<i>Actinobacteria; Actinomycetales; Micrococccineae; Microbacteriaceae</i>	1	0	1
	26	GQ980247.1 <i>Bacillus sp.</i> NBK45	99%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	0	1
	27	KC545247.1 <i>Bacillus sp.</i> EF1A-B810	100%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	0	1
	28	X	X	X	X	X	
	29	KT380670.1 <i>Bacillus humi</i> strain RHM_120	99%	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>	1	0	1
<b>Kokku</b>					25	11	14

X - 16S rRNA geeni järgi määramist ei tehtud, sest BOX-PCR-i ja biokeemiliste testide tulemuste põhjal olid väga sarnased mõne teise isolaadiga.

# LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Triin Korb (sünnikuupäev: 10.06.1980),

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

Biodegradatiivse potentsiaaliga mikroobikooslused Eesti grптоargilliidist,

mille juhendaja on Anne Menert,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 30. mai 2019 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016 (*kuupäev*)