

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
Geograafia osakond

Magistritöö keskkonnatehnoloogias

**METAANI TOOTMISE JA OKSÜDEERIMISE
GENEETILINE POTENTIAAL KUDJAPE SULETUD
PRÜGILA METAANILAGUNDUSKATTES**

Krista Kupits

Juhendajad: Marika Truu, PhD
Hiie Nõlvak, PhD

Kaitsmisele lubatud:

Juhendajad:

Osakonna juhataja:

Tartu 2018

Metaani tootmise ja oksüdeerimise geneetiline potentsiaal Kudjape suletud prügilas metaanilagunduskattes

Prügilates toodetakse mikroobide poolt anaeroobsete tingimuste tõttu prügilagaasi, mille peamine koostisosa metaan on tugeva toimega kasvuhoonegaas. Prügilagaasi tekkimine ei lõpe kui prügilad suletakse, kuna bioloogilisi, keemilisi ja füüsikalisi protsesse ei saa lõpetada prügi ladestamise peatamise ja prügilas katmisega. Metaani emiteerub prügilatest atmosfääri kümneid aastaid pärast nende sulgemist. Euroopa Liidu direktiivide ja keskkonnajärelduste tõhususe kasvu tõttu on Eestis suletud sadu prügilaid, mille gaaside emissiooni tuleb pärast sulgemist seirata ning nende sattumist atmosfääri piirata. Käesolev töö annab ülevaate prügilas sulgemisel metaanilagunduskatte kasutamisest, kui ühest perspektiivikast meetodist prügilagaasi emiteerumise vähendamisel. Praktilise töö käigus uuriti Kudjape prügilas metaanilagunduskatte metaani tootmise ja oksüdeerimise geneetilist potentsiaali ning pinnaseparameetrite mõju metanogeensetele arhedele ja metaani oksüdeerivatele bakteritele.

Märksõnad: metaan, metaanilagunduskatte, metanogeensed arhed, metaani oksüdeerivad bakterid

T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

P305 Keskkonnakeemia

T490 Biotehnoloogia

Genetic potential of methane production and oxidation in methane oxidation cover of the closed landfill in Kudjape.

In landfills, due to anaerobic conditions, landfill gas is produced by microbes. The main ingredient in landfill gas is methane which is one of the main greenhouse gases. Production of landfill gas does not stop when landfill sites are closed because biological, chemical and physical processes can't be stopped by just stopping dumping wastes at landfills and covering them. Methane is released from landfill into the atmosphere for decades after the closure. Due to the EU directives and increase in the efficiency of environmental monitoring, hundreds of landfills have been closed in Estonia. After the closure, gas emissions need to be monitored in order to avoid the emissions into the atmosphere. This study gives an overview of the potential of application of the methane oxidation cover, a method for reducing landfill gas emissions. The study analyzed the genetic potential of methane production and oxidation in the methane oxidation landfill cover of the closed landfill in Kudjape. Additionally, the abundances and proportions of methanogenic archaea and methanotrophic bacteria in prokaryotic communities were related to the physical-chemical properties of the cover material.

Keywords: methane, methane oxidation cover, methanogenic archaea, methanotrophic bacteria, landfill

T270 Environmental technology, pollution control

P305 Environmental chemistry

T490 Biotechnology

Sisukord

Lühendid	6
Sissejuhatus.....	8
1. Kirjanduse ülevaade.....	10
1.1. Prügi ladestamine ja sellega seotud keskkonnaprobleemid	10
1.2. Prügilate sulgemine.....	12
1.3. Prügilagaas	13
1.3.1. Metaan.....	15
1.4. Metaanilagunduskate	16
1.4.1. Metaanilagunduskatete omadused.....	17
1.4.2. Metaani bioloogiline tootmine	19
1.4.3. Metaani oksüdeerimine	20
2. Materjal ja meetodika	23
2.1. Prooviala kirjeldus	23
2.2. <i>In situ</i> gaaside kontsentratsiooni mõõtmine.....	25
2.3. Pinnaseproovide kogumine	25
2.4. Proovide keemiline analüüs	25
2.5. DNA eraldamine	26
2.6. Geenide kvantifitseerimine	27
2.6.1. Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni üldised tingimused	27
2.6.2. <i>PmoA</i> geenispetsiifiliste praimerite qPCR reaktsioonitingimuste optimeerimine ja määramispiiri leidmine.....	27
2.6.3. <i>PmoA</i> kaliiberkõvera valmistamine	28
2.6.4. Märklaudgeenide koopiaarvude määramine pinnaseproovidest	29
2.7. PCR produktide ettevalmistamine sekveneerimiseks	32
2.8. Andmete statistiline analüüs	33
3. Tulemused.....	34
3.1. Keemilised ja füüsikalised näitajad	34
3.2. Gaaside kontsentratsioonid prügilagaasis	36
3.3. Bakterite ja arhede arvukus ja proportsioon	38
3.4. Metanogeenid.....	41
3.4.1. <i>McrA</i> geeni arvukus ja proportsioon prokarüootide koosluses	41
3.4.2. Koosluse struktuur.....	43
3.5. Metanotroofid	43

3.5.1. Optimeeritud qPCR programmi ja standardkõvera parameetrid <i>pmoA</i> geeni kvantifitseerimiseks.....	43
3.5.2. <i>PmoA</i> geeni arvukus ja proportsioonid prokarüootide koosluses	44
3.5.3. Koosluse struktuur.....	44
4. Arutelu	46
Kokkuvõte.....	50
Summary	52
Tänuavaldused	54
Kasutatud kirjandus	55
Lisad	61

Lühendid

C – üldsüsinik

CH₄ – metaan

CO₂ – süsihappegaas

C_t – tsükliiläve väärtus

DAMO - denitriifitseeriv anaeroobne metaani oksüdatsioon

DNA – desoksüribonukleiinhape (*deoxyribonucleic acid*)

EC – elektrijuhtivus (*electrical conductivity*)

EDTA - etüleendiamiintetra-äädikhape (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EMTAK – Eesti Majanduse Tegevusalade Klassifikaator

GJK – gaasijaotuskiht

GK – geenikoopia

H₂ – vesinik

IPCC – *Intergovernmental Panel on Climate Change*

K1, K2, K3 – Kolme proovivõtu punkti tähised

KA – kuivaine

LOI – põletuskao kaudu määratud orgaanilise aine kontsentratsioon (*loss on ignition*)

LOQ – kvantifitseerimisläve väärtus (*limit of quantification*)

MCR - metüül-koensüüm M reduktaas (*Methyl coenzyme M reductase*)

McrA – metüül-koensüüm M redukdaasi kodeeriv geen

MDH – metanooli dehüdrogenaas (*methanol dehydrogenase*)

min – minut

MMO – metaan-monooksügenaas (*methane-monooxygenase*)

MOK – metaanioksidatsioonikiht

N – üldlämmastik

n-damo - *nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane*

O₂ – hapnik

OA – orgaaniline aine

P – üldfosfor

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

pMMO – membraaniga seotud metaan-monooksügenaas (*particulate MMO*)

PmoA – membraanile seotud metaan-monooksügenaasi β subühikut kodeeriv geen

ppb – Osakest miljardi kohta (*parts per billion*)

qPCR – reaalaaja polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative polymerase chain reaction*)

rRNA – ribosomaalne ribonukleinhape (*Ribosomal ribonucleic acid*)

sMMO – lahustunud metaan-monooksügenaas (*soluble MMO*)

s – sekund

TAE – Tris-atsetaat

Sissejuhatus

Jäätmeteks nimetatakse mistahes aineid või esemeid, mille valdaja ära viskab (2008/98/EÜ, 2008). Euroopa Liidus tekkis 2014. aastal kokku 2503 miljonit tonni jäätmeid, mis oli suurim kogus, mida Euroopa Liidu kohta on kajastatud ajavahemikus 2004-2014 (Eurostat, 2018). Olmejäätmed, mida ennekõike prügilatesse ladustatakse, on üha kasvav globaalne probleem, mis tuleneb rahvaarvu tõusust ning kiirest tööstuse arengust. Kui 2008. aastal toodeti Eestis 19 miljonit tonni prügi, siis 2014. aastal juba 21 miljonit tonni prügi (EMTAK, 2018). Euroopa Liidu jäätmekäitluspoliitikaga püütakse kahandada jäätmete mõju keskkonnale ja tervisele, pikaajalisem eesmärk on vähendada tekkivate jäätmete kogust ning edendada jäätmete kasutamist ressursina, mis tagaks jäätmete ringlusse võtu ning ohutu kõrvaldamise (Burlakovs, *et al.*, 2017). Tähtsal kohal jäätmete prügilasse sattumise vältimisel on prügi sorteerimine, tänu millele on ka jäätmete ümbertöötlemine efektiivsem. Sellele vaatamata ladestati peaaegu pool (47,4%) Euroopa Liidus käideldud jäätmetest 2014. aastal prügilatesse (Eurostat, 2018). Eurostat-i (2018) andmetel avaldab jäätmekäitlus ja jäätmete kõrvaldamine suurt mõju keskkonnale. Näiteks võtavad prügilad enda alla palju maad ning võivad põhjustada õhu, vee ja pinnase saastumist. Lisaks satub prügilatesse olmejäätmete hulgas palju biolagunevaid jäätmeid. Eestis moodustasid 2014. aastal biolagunevad jäätmed ligikaudu 5% kogu aastasest jäätmete kogusest (EMTAK, 2018). Orgaaniliste jäätmete lagunemisel tekib prügilates suurtes kogustes prügilagaasi (Lohila, *et al.*, 2007). Prügilagaasi emiteerumist prügilatest peetakse üheks olulisemaks keskkonnaprobleemiks, sest prügilagaasi peamine koostisosa on metaan, mis on süsihappegaasi kõrval teine oluline kasvuhooneefekti põhjustav gaas (Majdinasab ja Yuan, 2017). Uuringud on näidanud, et metaani kontsentratsiooni suurenemine atmosfääris toob kaasa kliima muutumise, mis omakorda mõjutab taimede kasvu, ookeani veetaset ning aineringeid (Dean, *et al.*, 2017).

Metaani emissiooni vähendamiseks prügilatest on kasutusel kaks meetodit. Esimese meetodi puhul kasutatakse gaasikogumissüsteeme, mille abil prügilates tekkinud gaas kogutakse ning kasutatakse kütusena või põletatakse. Erinevate uuringute kohaselt on gaasikogumissüsteemidega võimalik koguda 50% - 90% prügilates tekkinud metaanist (Abushammala, *et al.*, 2014). Teiseks meetodiks on prügila katmine pinnasega, milles elavad mikroobid kasutavad prügilagaasi elutegevuseks (Lee, *et al.*, 2017). Sellise nn metaanilagunduskatte (ka biofilter-kattekiht või bioaktiivne kattekiht) rajamine on efektiivne viis metaani emissiooni vähendamiseks just väikeprügilates (Huber-Humer, *et al.*,

2009, 2011) ning vanades prügilates, kus gaasitootmine on vaibumas (Abushammala, *et al.*, 2014). Viimati nimetatud meetod on võimaldanud vähendada suletud prügilatest metaani emissiooni 51% -100% (Majdinasab ja Yuan, 2017).

Metaanilagunduskatte omadusi on uuritud korduvalt ja erinevatest aspektidest. Näiteks on analüüsitud, kas mehhaanilis-bioloogiliselt töödeldud olmejäätmed toetavad metaani bioloogilist oksüdeerimist (Einola, *et al.*, 2007), milline materjal sobib kõige paremini kattekihi loomiseks (Pedersen, *et al.*, 2011) ning kuidas mõjub komposti lisamine metaanilagunduskatte efektiivsusele (Abichou, *et al.*, 2009). Uuritud on ka metaanilagunduskatte füüsikalisi omadusi kuidas mõjutavad metaanilagunduskatte temperatuur, lõimis, ning toitainete ja niiskuse sisaldus metaani oksüdeerimist (Rachor, *et al.*, 2011; Majdinasab ja Yuan, 2017; Gerbert, *et al.*, 2011). Enamus eelpoolmainitud uuringutest on läbi viidud labori tingimustes ning metaanilagunduskattes elavate mikroorganismide koosluste uuringud ei anna ülevaadet, kuidas erinevad keskkonnaparameetrid mõjutavad mikroorganismide kooslust.

Nii metaani tootmine kui ka lagunemine on looduses mikroobsed protsessid, mida viivad läbi enamasti metaani tootvad arhed (metanogeenid) anaeroobsetes tingimustes ja metaani oksüdeerivad bakterid (metanotroofid) aeroobses keskkonnas (Dean, *et al.*, 2017). Kui metanotroofide arvukust, liigilist koosseisu ja nende seost keskkonnafaktoritega on looduslikes (pedogeensetes) muldades suhteliselt palju uuritud (Knief 2015; Kravchenko ja Sukhacheva, 2017; Dean, *et al.*, 2017), siis nende organismide esinemise ja ökoloogia kohta sellist tüüpi antropogeenses pinnases nagu on prügila pinnakatted on avaldatud vaid üksikute uuringute tulemusi (Maanoja ja Rintala, 2015; Xing, *et al.*, 2017).

Käesoleva magistritöö uurimisobjektiks oli Saaremaal, Kudjapel asuv metaanilagunduskattega kaetud prügila, kus kattematerjal on saadud sama prügila materjalist sõelumise teel. Töö eesmärgid olid järgmised:

- 1) optimeerida kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) meetodika metanotroofide määramiseks kasutatava markergeeni *pmoA* arvukuse määramiseks suletud prügila metaanilagunduskattes;
- 2) määrata metaani tootmise ja oksüdeerimise geneetiline potentsiaal kattekihi profiilis;
- 3) analüüsida metaani tootmise ja lagundamise geneetilise potentsiaali seost gaaside (O₂, CO₂ ja CH₄) emissiooni ning keskkonnafaktoritega Kudjape suletud prügila kattekihis.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Prügi ladestamine ja sellega seotud keskkonnaprobleemid

Prügi ladestamine (ingl. *land filling* ehk maa täitmine) on olnud kasutuses juba tuhandeid aastaid enne meie ajaarvamise algust. Prügilate tekkimine on seotud inimeste koondumisega asulatesse, kus suur jäätmete hulk muutus tõsiseks probleemiks. Inglise keelne termin prügi ladestamise kohta viitab sellele, et prügi ladestamiseks kasutati sageli maapinnalohkuseid ja süvendeid (Kriipsalu, *et al.*, 2016).

Käitlemata prügi ladestamine toob endaga kaasa mitmeid keskkonnahäiringuid ning sotsiaalseid probleeme nagu näiteks tolmu ja prügi laialilendamine, lindude ja kahjurite kogunemine, haisu levik ja prügilagaaside levik atmosfääri ning nõrgvee sattumine keskkonda (Kriipsalu, *et al.*, 2016). Probleemi lahendamiseks hakati 20. sajandi algus aastatel prügi ladestamist kontrollima ning prügilaid hooldama. Alustati prügilademe tihendamise, prügilaid ümbritseti aedikutega ning prügilate põhjad tehti vettpidavamad. Mõeldi välja ka keerulisemaid tehnoloogiaid, kuid jõuti järeldusele, et tegelema peaks ka probleemi allikaga. Loodi jäätmekäitlushierarhia, mille olulisimad märksõnad on taaskasutus ning ümbertöötlemine, kuid sellele vaatamata ladestatakse maailmas endiselt suur osa jäätmeid prügilatesse - näiteks USAs üle 50% olmejäätmetest, (Majdinasab ja Yuan, 2017). Euroopas on erinevatel andmetel 150000-500000 prügilat, mis mahutavad hinnanguliselt 30-50 km³ jäätmeid (Hogland *et al.*, 2011; Burlakovs, *et al.*, 2017).

Prügi ladestamine ei ole tänapäeval enam lihtsalt prügimägede loomine, tegu on läbimõeldud tehnoloogilise lahendusega, mida ei nimetata jäätmete kõrvaldamiseks vaid käitlusprotsessiks (Kriipsalu, *et al.*, 2016). Selleks, et vältida ja vähendada jäätmete ladestamisest tulenevat negatiivset mõju keskkonnale, tuleb prügila rajamise, kasutamise, sulgemise ja järelhoolduse perioodil jälgida seadustes etteantud nõudeid. Eelkõige tuleb vähendada mõju pinna- ja põhjaveele ning vältida õhu saastumist. Lisaks tuleb pidurdada kasvuhooneefekti põhjustavate gaaside teket ning levimist atmosfääri. Prügila kavandamisel võetakse arvesse, et koht kuhu prügila luuakse oleks valitud nii, et prügilast lähtuv keskkonnaoht ja keskkonnahäiringud on võimalikult väikesed. Prügila rajamisel lähtutakse maa sihtotstarbest, planeeringust ja haldusjaotusest, maa-ala geoloogilistest ja

hüdrokeoloogilistest tingimustest ning ohust, mida tekitab prügilade põllumajandusmaade ja veekogude läheduses (RTL 2004, 56, 938).

Jäätmekäitlustehnoloogiad prügilates on viimase saja aastaga niivõrd palju arenenud, et tänapäevastele nõuetele vastavates prügilates on enamus senistest probleemidest kas vähenenud või hoopis kõrvaldatud. Tänapäevased nõuetele vastavad prügilad on ümbritsevast keskkonnast eraldatud ning tavakodanik sinna niisama prügi visata ei saagi. Eestis kogutakse jäätmed kõigepealt jäätmejaamadesse ning pärast sorteerimist ladestatakse vaid selline prügi, mida ei ole võimalik taaskasutada ega ümber töödelda (ENVIR, 2014). Sellele vaatamata on potentsiaalsed häiringud samad, mis eelmisel sajandil.

Osa keskkonnanahäiringutest on seotud prügilade ladestamisfaasiga, osa ilmneb või kestab ka pärast prügilade aktiivse kasutuse lõppu ning sulgemist (Kriipsalu, *et al.*, 2016). Keskkonnamõjude hindamiseks tuleb nii prügilade kasutusajal kui ka pärast selle sulgemist erinevaid parameetreid seirata (RTL 2004, 56, 938).

Prügilatega kaasnevaid keskkonnanahäiringuid on mitmesuguseid. Näiteks võib prügilast tekkiv nõrgvesi reostada pinna- ja põhjavett (Kriipsalu, *et al.*, 2016). Nõrgveega seotud probleemide vältimiseks peab prügilade olema rajatud nii, et see on aluspinnasest lahus. Prügilade alus ja küljed peavad olema ehitatud homogeenisest kihist, mille filtratsioonimoodul ning paksus on sellised, mis tagavad pinnase, pinna- ja põhjavee kaitse (RTL 2004, 56, 938). Prügilade regulaarne katmine aitab ka vähendada haisu probleemi ning pidurdab lendprügi laialikandumist. Lendprügi levimist pidurdab ka prügilade pidev tihendamine, mis vähendab ka kahjurite elupaiku ning vähendab lindude kogunemist. Kuid tihendamine toob endaga kaasa rasketehnika kasutamise ning sellest tingitud müra levimise. Pärast prügilade sulgemist on probleemiks ka prügilagaasi emiteerumine, mida leevendatakse gaasikogumissüsteemide või biofilter-kattekihi paigaldamisega (Kriipsalu, *et al.*, 2016).

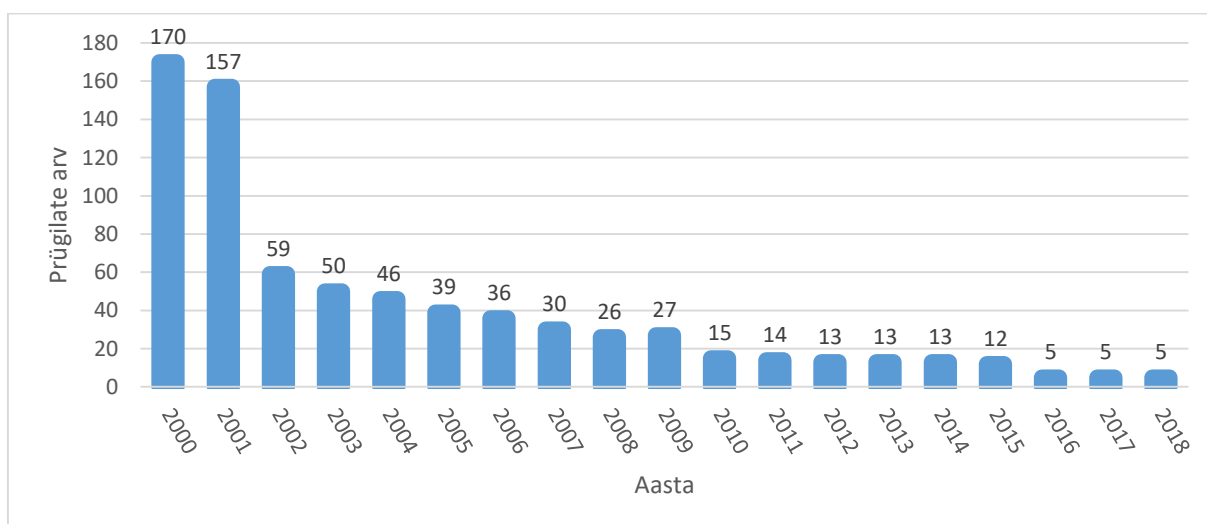
Selleks, et teada, kuidas prügilade keskkonda mõjutab, tuleb jälgida nii seda, mis prügilasse tuuakse kui ka seda, milline on olukord lähedal olevates veekogudes ning kas ja kui palju gaasi prügilast lendub. Prügilade olelusega on määratu pikkusega ning keskkonnamõjud võivad kesta sadu aastaid. Vaatamata sellele, et ladestustehnoloogiaid ning jäätmekäitlusmeetmeid muudetakse aina efektiivsemateks, ei õnnestu kogu prügilates tekkivat prügilagaasi koguda, prügilapiirded ei ole igavesti sama efektiivsed ning pole kindel, kuidas

need aastate jooksul amortiseeruvad ning järelhooldus suletud prügilates võib osutada majanduslikult koormavaks (Kriipsalu, *et al.*, 2016).

1.2. Prügilate sulgemine

Prügila kavandatakse võimalikult pika kasutusajaga. Sobilik kasutusiga on 25-30 aastat (RTL 2004, 56, 938; Kriipsalu, *et al.*, 2016). Prügila suletakse, kui seda ametlikult nõutakse, kui lade on jõudnud projekteerimiskõrguseni või kui prügila on saavutanud projektikohase mahu. Prügila sulgemine on mitme etapiline tegevus. Esmalt koostatakse selleks sulgemisprojekt (Kriipsalu, *et al.*, 2016), millele eelneb prügila käitaja korraldatav suletava prügila keskkonnamõju hindamine (väiksema kui 1,5 hektari suuruse prügila sulgemisel pole see siiski kohustuslik). Prügila sulgemisel tuleb mõelda sulgemistööde ajakavale, selle maksumusele, vastavusele õigusaktidele, tehnilistele lahendustele ja seirele ning järelhooldusele (RTL 2004, 56, 938).

Kunagisi prügilaid on Eestis kokku loetud üle viiesaja (ENVIR, 2014). Sinna hulka kuulusid segajäätmeprügilad, tööstusjäätmeprügilad, setteväljakud ning loomamatmispaigad. Tänu Euroopa Liidu direktiividele ning keskkonnajäreelvalve tõhususe kasvule on Eestis nõuetele mittevastavaid prügilaid hoogsalt suletud. Aastatel 2000 – 2018 on prügilate arv vähenenud 170-lt 5-le (joonis 1).



Joonis 1. Prügilate arvu vähenemine Eestis 2000-2018 aastatel. Allikas: Keskkonnaagentuur.

Eestis on 2018. aastal viis töötavat tavajäätmeprügilat: Tallinna Jäätmete Taaskasutuskeskus, Uikala, Paikre, Väätsa prügila ning Torma prügila, viimase

sulgemistöödega on juba alustatud. Vastavalt jäätmeseadusele lõpetati 2009. aasta 16. juuliks prügi ladestamine keskkonnanõutele mittevastavates prügilates ning kõik mittevastavad prügilad suleti (RT I 2004, Jäätmeseadus). Vastavalt keskkonnaministri määrusele nr 38 (29.04.2004) „Prügila rajamise, kasutamise ja sulgemise nõuded“ (§ 62 lg 2) pidid kõik suletud prügilad olema korrastatud paragrahvides 39–42 sätestatud korras hiljemalt 16. juuliks 2013 (RTL 2004, 56, 938). Prügila sulgemisel tuleb jäätmelade katta. Tavajäätmeprügilal peab olema gaasi kogumise kiht, vettpidav mineraalkiht, drenikiht ning kattepinna (RTL 2004, 56, 938).

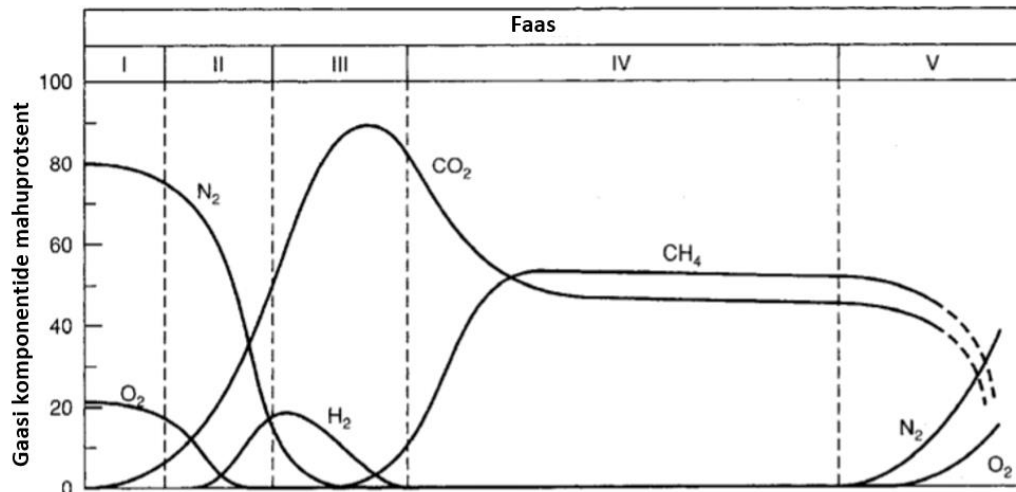
1.3. Prügilagaas

Üks probleemidest, mis suletud prügilatega kaasneb, on see, et prügila sulgemine ei peata sealseid keemilisi, füüsikalisi ning bioloogilisi protsesse ning nende tulemusena tekib prügilas prügilagaas, mis emiteerub atmosfääri. Prügilagaasi toodetakse prügilas mikroorganismide poolt veel 20-30 aastat pärast olmejäätmete prügilasse ladestamist (EPA, 2016). Prügilate tõttu satub Maa atmosfääri tuhandeid tonne kasvuhuone gaase, mis mõjutavad Maa kliimat. Prügilagaas on igasugune gaas, mis tekib prügilasse ladustatud jäätmetest (RTL 2004, 56, 938). Teise definitsiooni kohaselt on prügilagaas (või ka biogaas) anaeroobse kääritamise teel saadud gaasiline kütus, mis koosneb metaanist (CH_4), süsinikdioksiidist (CO_2) ja teistest gaasilistest ainetest (tabel 1) (Cheremisnoff, 2003), mida toodetakse looduslike protsesside käigus soodes ja rabades aga ka prügilates ning spetsiaalsetes kääritites sõnnikust, reoveest, rohtsest biomassist ja teistest biolagunevatest jäätmetest. Prügilagaas võib oma koostise tõttu olla plahvatusohtlik ning tervistkahjustav. Selle kaks mahuprotsendilt olulisemat komponenti on CH_4 ja süsihappegaas CO_2 (tabel 1). Prügilagaasi koostises on molekulaarne lämmastik metaani ja süsihappegaasi kõrval mahuprotsendilt kolmas gaas, kuid lämmastikku võib esineda prügilagaasis veel ka lämmastikoksiidi (NO), dilämmastikoksiidi (N_2O) või ammoniaagina (NH_4) (IPCC 2007). Vähem tekib prügilas bioloogiliste ja keemiliste protsesside tulemusel halogeeniide, sulfiide – nende sisaldus ei ületa 1%. Sealjuures on ammoniaak rasvade ja valkude lagunemise produkt, valkude lagunemisel tekib ka vesiniksulfiid (Fang, *et al.*, 2012).

Tabel 1. Ainete sisaldus prügilagaasis (Cheremisnoff, 2003).

AINE	SISALDUS
Metaan (CH ₄)	35-60%
Süsinikdioksiid (CO ₂)	35-55%
Lämmastik (N ₂)	0-20%
Hapnik (O ₂)	0-2,5%
Vesiniksulfiid (H ₂ S)	<1%
Halogeniidid	<1%
Vee aur (H ₂ O)	1-10%
Orgaanilised ühendid (va metaan)	<1%

Prügilagaasi komponentide vaherkord sõltub prügila vanusest. Prügilast tekkivate gaaside ajaline dünaamika on jagatud viieks etapiks (joonis 2). Algfaasis (faas I) toimub aeroobne bioloogiline lagunemine, mis algab kohe, kui bioloogiline materjal prügilasse ladestatakse. Aeroobseks muudab protsessi tingimus, et prügi vahel on küllaldaselt ruumi, mille täidab õhuhapnik. Selles faasis tekib kõige rohkem lämmastikku ning hapniku osakaal protsessis on suur. Üleminekufaasis (II faas) aeroobne lagunemine aeglustub vähenenud hapniku ning lämmastiku hulga tõttu prügilas. Samas suureneb vesiniku ja süsihappegaasi hulk keskkonnas ning keskkond muutub bioloogiliste protsesside tulemusel happelisemaks. Happelises anaeroobses hüdroolüüsi faasis (III faas) toodetakse kõige rohkem süsihappegaasi, algab metaani tootmine ning vesiniku hulk keskkonnas väheneb. Keskkonnas on kõige arvukamad happed tootvad ehk atsidogeensed mikroorganismid ning metanogeene esineb vähe. Metanogeenid hakkavad domineerima neljandas etapis ehk metaankäärimisfaasis, kus nad toodavad kolmandas faasis moodustunud äädikhapest metaani ja süsinikdioksiidi, mille tõttu tõuseb keskkonna pH. Metaankäärimisfaas on kõige pikem ning kattub ajaliselt prügila sulgemisega. Prügilagaasi tekkimine hakkab vähenema siis, kui kogu orgaaniline materjal on oksüdeeritud metaaniks ja süsihappegaasiks ning viiendas ehk stabiliseerumisfaasis protsessid vaibuvad (Tchobanglous ja Kreith, 2002).



Joonis 2. Prügilagaasi komponentide tekkimise viie-faasiline (I-V) dünaamika prügilates (Tchobanglous ja Kreith, 2002).

Keskonnaministri määrusest nr 38 „Prügila rajamise, kasutamise ja sulgemise nõuded“ (RTL 2004, 56, 938) tulenevalt peab prügila rajamisel, kasutamisel, sulgemisel ja järelhooldusperioodil vältida või vähendada prügilagaasi sattumist atmosfääri. Prügilad, kus ladestatakse biolagunevaid jäätmeid, varustatakse jäätmeseaduse (RT I 2004, 9 52, Jäätmeseadus) järgi gaasipüüde ja –kogumise seadmetega selleks, et vältida prügilagaasi kontrollimatut kogunemist ning väljaimbumist. Prügila käitajal on ülesanne korraldada prügilagaasi emiteerumise seire ning gaasi kogumine. Näiteks on kohustuslik mõõta metaani, süsinikdioksiidi ning hapniku sisaldusi ning kontrollida järelhooldusperioodil gaasieemaldussüsteemi tõhusust. Kogutud prügilagaas taaskasutatakse või kui see ei ole võimalik, siis prügilagaas põletatakse (RTL 2004, 56, 938), kuid need tehnoloogiad ei ole jätkusuutlikud või majanduslikult tasuvad (Kriipsalu, *et al.*, 2016). Uuringud on näidanud, et on prügila kattekihil suur perspektiiv metaani emissiooni vähendamisel väikeprügilates (Huber-Humer *et al.*, 2009; Maanoja ja Rintala, 2015).

1.3.1. Metaan

Prügilagaasi üheks olulisimaks komponendiks on metaan (Cheremisnoff, 2003; Majdinasab ja Yuan, 2017). CH₄ on vähemürgine, kuid lämmatav, lõhnatu, värvitu ning kergestisüttiv gaas, mis tekib orgaanilise aine lagunemisel anaeroobses keskkonnas. Metaan on üks kasvuhoonegaasidest, mille mõju kliimale on järjest tugevnemas. Metaani kontsentratsioon atmosfääris oli 2015. aastal 1834 ppb (Dalsoren, *et al.*, 2016). Viimase kaheksa aastaga on

metaani hulk atmosfääris kahekordistunud (Huber-Humer, 2004). 18. sajandi keskel oli metaani kontsentratsioon atmosfääris 722 ppb (IPCC, 2013). Praeguseks hinnatakse, et metaani lisandub atmosfääri ligikaudu 1% aastas (Xu, *et al.*, 2018).

Inimtekkelise CH₄ allikate hulka kuulub lisaks kariloomade pidamisele, biomassi põletamisele, riisi kasvatamisele ning fossiilsete kütuste kasutamisele ka jäätmete käitlemine (Karakurt, *et al.*, 2012; Bridham, *et al.*, 2013). Ligikaudu 60% - 70% metaani emissioonist on antropogeenset päritolu (Le Mer ja Roger, 2001; Karakurt, *et al.*, 2012) kusjuures jäätmemajandus on suuruselt kolmas antropogeense metaani allikas (Caisis, *et al.*, 2013; USEPA, 2012), mille panus on 3% - 10% globaalsest metaani emissioonist (Bogner ja Matthews, 2003). Euroopa riikides pärineb 82% jäätmemajanduses tekkivast metaanist olmejäätmete prügilatest (EEA, 2014).

Vaatamata sellele, et metaan püsib atmosfääris tunduvalt lühemat aega (12 aastat) kui CO₂ (172 aastat), on sellel gaasilisel ühendil ligi kolm korda kõrgem soojuskiirguse neelamise ja kiirgamise võime ning 23-25 korda suurem globaalse soojenemise tekitamise potentsiaal kui CO₂-l (IPCC, 2007; Lohila, *et al.*, 2007). CO₂ püsib atmosfääris kauem ning tema mõju on pikaajalisem, metaan eemaldatakse atmosfäärist keemiliste protsesside tulemusel. Vaatamata sellele, et metaani mõju atmosfääris on suhteliselt lühiajaline on see mõju märgatav atmosfääri keemilisele koostisele kuna metaan on keemiliselt aktiivne ühend. Näiteks takistab metaan kloro-fluoro süsivesinike looduslikku eemaldamist ning aitab kaasa osoonikihi hävimisele (Le Mer ja Roger, 2001).

1.4. Metaanilagunduskate

Väikeprügilates ei pruugi gaasi kogumine või koha peal põletamine end ära tasuda, sest metaani tekib vähe. Nii keskkonna seisukohalt kui ka majanduslikult on otstarbekas rajada sellistele prügilatele biofilter-kattekiht ehk bioaktiivne kattekiht ehk metaanilagunduskate, mille abil saab prügilagaasi emiteerumist ohjata (Maanoja ja Rintala, 2015; Kriipsalu, *et al.*, 2016). Metaani lagundamine saab toimuda tänu sellele, et kattekihi hõivavad elupaigana metaani bioloogiliselt lagundavad mikroorganismid (Abushammala, *et al.*, 2014).

Biofilter-kattekiht koosneb tavaliselt kahest peamisest osast: prügilademe peale loodud gaasijaotuskihist (GJK) ning metaanioksüdatsioonikihist (MOK) (Nagendran, *et al.*, 2006), mille peal on haljastatav kasvumullakiht. Haljastuskiht pakub kaitset erosiooni eest ning

haljastus võib metaani lagundamist elavdada, kuna taimed seovad liigvee, pakuvad varju otsese päikesekiirguse eest ning hoiavad kuival ajal niiskust. Bioaktiivne kattekiht rajatakse prügilale selle sulgemise ajal ning CH₄ efektiivseks lagundamiseks metaanilagunduskattes peab see olema sobivate omadustega (Maanoja ja Rintala, 2017).

1.4.1. Metaanilagunduskatete omadused

Metaani oksüdeerimise potentsiaal prügila pinnakattes sõltub pinnase orgaanikasisaldusest, lõimisest, niiskusesisaldusest, temperatuurist, pH tasemest, toitainete ja hapniku sisaldusest, taimede olemasolust ja liigilisest koostisest, oksüdatsioonikihi paksusest ning prügilademes toodetud metaani kogustest (Majdinasab ja Yuan, 2017; Maanoja ja Rintala, 2017). Erinevad uuringud kattepinnase materjali kohta (tabel 2) on näidanud metaani oksüdeerimise määra vahemikus 20% - 100%.

Tabel 2. Metaani oksüdatsiooni potentsiaal erinevate orgaaniliste pinnasekomponentidega prügilates (Majdinasab ja Yuan, 2017).

Prügila katte materjal	CH ₄ oksüdatsioonivõime		CH ₄ koormus (g CH ₄ m ⁻² d ⁻¹)	Viide
	Oksüdatsiooni efektiivsus (%)	Oksüdatsiooni aktiivsus (g CH ₄ m ⁻² d ⁻¹)		
Prügila kattepinna	20-100		35,3-84,7	(Gerbert, <i>et al.</i> , 2011)
Kõrge orgaanikasisaldusega mineraalpinna			25-100	(Rachor, <i>et al.</i> , 2011)
Testpinna, ilma kompostita	63	19,5	29,4	(Abichou, <i>et al.</i> , 2009)
Kompostiga kattepinna	100	2,69	2,69	
Aiandusjäätmed, aktiivmuda kompost	23-56	45-112	179-201	(Pedersen, <i>et al.</i> , 2011)
Pinnase segu vihmaussidega	99-100	232	233,6	(Park, <i>et al.</i> , 2008)
Pinnasesegu aktiivsüsiniku lisandiga	99-100	232	233,6	
Lisandita prügila kattepinna	51	118	233,6	
Bioloogiliselt ja mehaaniliselt töödeldud olmeprügi		22-82	30-78	(Einola, <i>et al.</i> , 2008)

Metaani oksüdeerivad bakterid on aeroobsed organismid ning neile tuleb tagada hapniku juurdepääs. Kattematerjalina kasutatav pinna peab olema piisavalt poorne, sest poorne keskkond annab võimaluse allpool (põhiliselt prügilademes) toodetud metaani levimiseks. Uuringud näitavad, et piisava poorsuse tagab kattepinna, kus õhuga täidetud pooride osakaal on 17,5% - 25% (Huber-Humer, *et al.*, 2009; Gerbert, *et al.*, 2011). Erinevate

uuringute põhjal sobib metaani lagundamiseks keskkond, mille pH jääb vahemikku 6,5-8,5 ning sobiva kattepinna niiskussisaldus võiks olla vahemikus 20% - 50% (Huber-Humer, *et al.*, 2009; Wang, *et al.*, 2011). Kõige kõrgemaid oksüdatsiooniefektiivsusi on saadud toitainerikastes pinnakatetes. Nendes uuringutes, kus pinnakattele on lisatud orgaanilist materjali toidainetega rikastamiseks, on suudetud saavutada täielik metaani oksüdatsioon (tabel 2). Näiteks savimuldadel on kümme korda väiksem metaani oksüdeerimise võime kui kõrge toitainesisaldusega materjalil. Väetise lisamisega kattepinna niiskusele on võimalik metaani oksüdeerimist suurendada, kuid pinna niiskuse sisaldus peaks olema üle 15% (Hrad, *et al.*, 2012). Pinnases, kus niiskussisaldus on alla 15%, võib väetiste lisamine metaani oksüdatsioonile mõjuda negatiivselt.

Tavapärane MOK-i tüsedus on 100 cm või rohkem ning selle all on vähemalt 10-15 cm paksune gaasijaotuskiht (GJK) (Abushammala, *et al.*, 2014), mis juhib prügilademes tekkinud gaasi ühtlaselt oksüdatsioonikihi. Tõhusaks CH₄ lagundamiseks peab oksüdatsioonikiht olema homogeenne (Kriipsalu, *et al.*, 2016).

Kuigi metaanilagunduskatte pinnakiht talvel külmub, ei lakka metaani lagunemine, sest paksu oksüdatsioonikihi alumises osas temperatuur alla nulli ei lange. Ehkki metaani oksüdeerimiseks optimaalne temperatuur on umbes 30 °C (Huber-Humer, 2004; Einola, *et al.*, 2007), on uuringud näidanud, et 5 °C välistemperatuuri korral oli temperatuur 80 cm sügavusel kattepinna niiskuses püsivalt 15 °C või rohkem, mis on piisav metaani oksüdeerimiseks (Scheutz ja Kjeldsen, 2004). Kihhi läbikülmumise ohtu vähendab ka see, et metaani lagunemine on eksotermiline – ühe mooli metaani oksüdeerimisel vabaneb ligikaudu 882 kJ soojusenergiat. Hästi ehitatud oksüdatsioonikiht ei lase peaaegu üldse metaani läbi ning metaani õhuheide jääb samasse suurusjärku kui looduslikest ökosüsteemidest (Chiemchaisri ja Chiemchaisri, 2004).

Lisaks kattematerjali omadustele sõltub metaani oksüdeerimise efektiivsus ka metaani hulgast, mis prügilademes tekib. Prügilagaasis metaani kontsentratsiooni kasvuga 0,01%-lt 10%-ni suurenes CH₄ oksüdatsiooni aktiivsus ühes tunnis 0-st kuni 5,5 µmol/g-ni (Wang, *et al.*, 2011). Kõrgematel kontsentratsioonidel oksüdatsioonimäär stabiliseerus ning jäi 6 µmol/g h juurde. Metaanivoo intensiivsus sõltub prügilademe omadustest: ladestatud jäätmehaiguse mahust, orgaaniliste jäätmehaiguse sisaldusest, jäätmehaiguse vanusest ning prügilademe füüsikalistest parameetritest (Scheutz, *et al.*, 2014).

1.4.2. Metaani bioloogiline tootmine

Metaani tootmist nimetatakse metanogeneesiks ning selleks on vaja nii H₂, CO₂, atsetaadi, metanooli kui ka metüülgruppi sisaldavate substraatide olemasolu keskkonnas (Hunger, *et al.*, 2011). Aastane metaani emissioon on ligikaudu 600 Tg, millest 40% on pärit looduslikest allikatest ning 60% inimtekkelistest allikatest (Karakurt, *et al.*, 2012). Metanogenees on süsinikuringes oluline protsess, milles metanogeensed arhed viivad anaeroobsetes tingimustes läbi orgaanilise aine lagunemise viimast faasi, mille lõpp-produktiks on CH₄ (Juottonen, *et al.*, 2006). Metanogeenide elutegevuse käigus tekkinud CH₄ moodustab hinnanguliselt 70% - 85% kogu metaani emissioonist (Karakurt, *et al.*, 2012).

Metanogeensed arhed on fülogeneetiliselt väga mitmekesine grupp anaeroobseid organisme, kes kuuluvad *Euryarchaeota* hõimkonda. Nad on klassifitseeritud nelja klassi (*Methanobacteria*, *Methanomicrobia*, *Methanococci*, *Methanopyri*), kuude seltsi, 12 sugukonda ning 35 perekonda (Nazaries, *et al.*, 2013; Dean *et al.*, 2018)

Metanogeenide elukeskkonnad võivad olla mitmesugused; enamus metanogeneene on mesofiilsed ning elavad neutraalses keskkonnas. Kuigi neid organisme on leitud väga erineva temperatuuriga keskkondadest (4°C - 110°C), jääb enamasti nende organismide kasvuks optimaalne temperatuur vahemikku 20°C - 40°C (Gracia, *et al.*, 2000). Sobivaim pH vahemik on enamustele metanogeenidele 6,0-8,0, kuid on leitud ka organisme, kes eelistavad happelisemaid (5,6-6,2) ning aluselisemaid (8,0-9,2) keskkondi (Gracia, *et al.*, 2000). Metanogeneene on leitud looduslikest märgaladest, riisipõldudelt, prügilatest, ookeanidest, loomade ja inimeste seedekulglast, kuumaveeallikatest, happelistest setetest, õlireservuaaridest ning kivisöest (Brochier-Armanet, *et al.*, 2011; Nazaries, *et al.*, 2013).

Metaani tootmine on neljaastmeline protsess, mis koosneb makromolekulide ja polümeeride esmasest hüdrolyüsist, atsidogeneesist, atsetogeneesist ning alles seejärel metanogeneesist. Sellesse on kaasatud mikroorganisme mitmetest rühmadest. Kuna metanogeenid ise ei suuda kasutada keerulisi orgaanilisi ühendeid, vajavad nad teisi anaeroobseid mikroobe enda ümber, kes muudavad keerulisemad ühendid lihtsateks suhkruteks ning rasvhapeteks (Serrano-Silva, *et al.*, 2014). Süntroofilised bakterid toodavad metanogeenidele vajalikku atetaati, metüülformaati, vesinikku (H₂) ja CO₂ ning metanogeneesi aktiivsus sõltub suuresti sellest, kui palju on kogu protsessi eelnevates etappides tekkinud vesinikku ning atsetaati.

Metaani tootmine metanogeenide poolt on keeruline ning unikaalne anaeroobse hingamise viis, milleks on vaja kuue koensüümi (ferredoksiin, metanofuraan, tetrahüdrometanopteriin, koensüüm F420, koensüüm M ning koensüüm B olemasolu (Ferry, 2010)). Kolm peamist metanogeneesi substraati on CO₂, atsetaat ning metüülgruppi sisaldavad ühendid nagu näiteks metanool, amiinid ning sulfiidid. Vastavalt mikroobide kasutatud metabolismirajale jaotatakse metanogeenid hüdrogenotroofseteks, atsetoklastilisteks ning muid metüülgruppe sisaldavaid ühendeid lagundavateks organismideks. Kuigi ensümaatilised reaktsioonid ning vaheühendid on igal metabolismitüübil erinevad on viimane etapp (metaani teke) kõigil organismidel sarnane (Dean, *et al.*, 2018). Hüdrogenotroofse ning atsetoklastilise toitumistüübi puhul seotakse viimases etapis esmalt metüülgrupp valgulisele kandjale, seejärel toimub metüülgrupi üleviimine membraanseotud koensüümile M ning sealt edasi toimub metüül-koensüümi M redutseerimine metaaniks. Viimast reaktsiooni katalüüsib ensüüm metüül-koensüüm M reduktaas (MCR) ning see etapp on teadaolevalt kõikidel metanogeenidel ühesugune (Narihiro ja Sekiguchi, 2011; Nazaries, *et al.*, 2013).

Ehkki varasemates uuringutes kasutati metanogeenide tuvastamiseks ja kvantifitseerimiseks keskkonnas markergeenina arhede 16S rRNA geeni, on selle geeni kasutus markergeenina osutunud problemaatiliseks suure fülogeneetilise mitmekesisuse tõttu. Tänapäeval on metanogeenide määramiseks markergeenina kasutusele võetud MCR-d kodeeriv geen *mcrA*. MCR koosneb kolmest subühikust: A, väike kofaktor B ja C. Metüüli reduktsioon arvatakse asuvat subühikus C, mis omakorda koosneb kolmest alaühikust α , β ja γ , mida kodeerivad geenid *mcrA*, *mcrB* ning *mcrG* (Juottonen, *et al.*, 2006; Narihiro ja Sekiguchi, 2011). *McrA* kasutamise eeliseks on see, et seda markergeeni on võimalik seostada ka 16S rDNA fülogeneesiga (Juottonen, *et al.*, 2006).

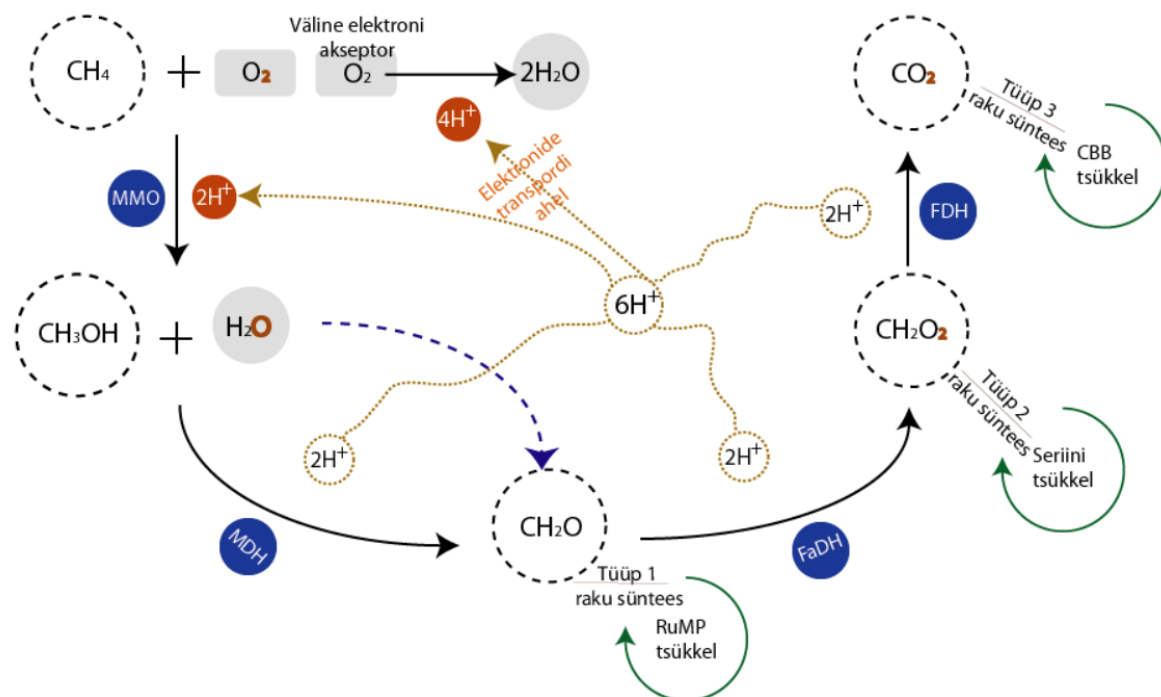
1.4.3. Metaani oksüdeerimine

Metanotroofsed mikroorganismid liigituvad enamasti Gram-negatiivsete aeroobsete bakterite hulka. Neid on kahes hõimkonnas (*Proteobacteria* ja *Verrucomicrobia*), kolmes seltsis (*Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Verrucomicrobiae*) ning neljas sugukonnas (*Methylococcaceae*, *Methylocystaceae*, *Beijernickaceae*, *Methylacidiphilaceae*). Kokku on identifitseeritud 21 perekonda ning 56 liiki metanotroofe. Vastavalt morfoloogilistele, füsioloogilistele ning geneetilistele erisustele on nad jagatud kolme gruppi: tüüp 1 (*Gammaproteobacteria*), tüüp 2 (*Alphaproteobacteria*), tüüp 3

(*Verrucomicrobia*) (Semrau, *et al.*, 2010, Knief, 2015). Kui enamasti on metaani oksüdatsioon aeroobne protsess, kus elektroni aktseptorina kasutatakse hapnikku, siis on olemas ka anaeroobne metaani oksüdeerimine, kus elektroni akseptorina kasutatakse sulfaati, nitraati, nitritit ja metalli okside (Xu, *et al.*, 2018). Anaeroobne metaani oksüdatsioon viiakse läbi tihedalt omavahel seotud anaeroobsete metanotroofsete arhede ning sulfaati redutseerivate bakterite (*Desulfosarcina*, *Desulfococcus*) poolt (Knittel ja Boetius, 2009; Wendlandt, *et al.*, 2010). On leitud ka organismid, kes viivad läbi denitriifitseerivat anaeroobset metaani oksüdatsiooni (DAMO). Hõimkonda *NC10* kuuluvad *Can. Methyloirabilis oxyfera* ja *Can. Methanoperedens nitroreducens* kasutavad anaeroobses keskkonnas metaani oksüdeerimisel elektroni aktseptorina nitritit ning protsessi lõpp-produktideks on N_2 ning CO_2 (Ettwig, *et al.*, 2009, 2010, Xu, *et al.*, 2018). Neid organisme on uuritud vähe, kuna nende detekteerimine on keeruline, sellele vaatamata on neid leitud väga erinevatest keskkondadest: järvedest, jõgedest, märgaladelt ja mullast. Tegu on unikaalse lüluga süsiniku- ning lämmastikuringe vahel, mis vähendab metaani emissiooni atmosfääri (Wendlandt, *et al.*, 2010; Hui, *et al.*, 2017).

Metanotroofid toituvad ainult metaanist või metanoolist, mis on neile nii süsiniku kui energia allikaks. Metanotroofe leidub ka paljudes anoksilistes ja oksilistes keskkondades. Neid on leitud nii rabadest, märgaladest, mullast kui ka prügilatest, kus nad toituvad metanogeneesist tekkinud metaanist ning vähendavad seeläbi metaani emissiooni (Nazaries, *et al.*, 2013). Metanotroofid võivad ära kasutada 10% - 90% toodetud metaanist enne selle atmosfääri jõudmist (Semrau, *et al.*, 2010).

Kõik aeroobsed metanotroofid tarbivad metaani läbi omavahel seotud reaktsioonide, mis toimuvad tänu erinevatele ensüümidele. Esmalt metaan hüdroksüülitakse, reaktsiooni katalüüsib metaan-monooksügenaas (MMO) ning protsessis on vajalik ka ühe hapniku aatomi osalemine, teine hapniku aatom reageerib vesinikuga ning kõrvalproduktiks on vesi. Metaani hüdroksüülimine vajab pidevat vesinikioonidega varustatust, mistõttu on tegu energiat tarbiva reaktsiooniga (AlSayed, *et al.*, 2018). MMO võib olla rakus nii lahustunud kujul ehk sMMO (*soluble* MMO) kui membraaniga seotud ehk pMMO (*particulate* MMO) (Wendlandt, *et al.*, 2010). Metaani esmase oksüdatsiooni käigus tekib metanool (CH_3OH), mis oksüdeeritakse ensüümi metanooli dehüdrogenaas (MDH) abil süsihappegaasiks, kusjuures vaheühenditena tekivad metanool ehk formaldehüüd (CH_2O) ning metaanhape (CH_2O_2) (joonis 3) (Rastogi, *et al.*, 2009; AlSayed, *et al.*, 2018).



Joonis 3. Metaani oksüdeerimise skeem (AlSayed, *et al.*, 2018 järgi)

PmoA geeni, mis kodeerib pMMO β subühikut, peetakse sobivaks markeriks metanotroofide fülogeneetilise kuuluvuse uurimisel erinevates keskkondades ning see geen on kõige sagedamini kasutatav markergeen aeroobsete metanotroofide määramiseks (Knief, 2015). Anaeroobsete metaani oksüdeerivate organismide määramiseks on kasutusel praimerid, mis on alles hiljuti välja töötatud (Ettwig, *et al.*, 2009, Xu, *et al.*, 2018).

Metanotroofsed organismid asustavad prügila oksüdatsioonikihi ühe kuni kahe nädalaga (Bogon ja Kühle-Weidemeier, 2008). Tegu on üsna kohanemisvõimeliste organismidega, kes suudavad toimida ka siis, kui metaani ei ole kuigi palju (Knief, 2015). Oksüdatsioonikihi toime on isereguleeruv: kui gaasi toodetakse rohkem, on ka rohkem metanotroofe (Bogon ja Kühle-Weidemeier, 2008).

2. Materjal ja meetodika

2.1. Prooviala kirjeldus

Käesoleva magistritöö proovimaterjal koguti Saaremaa vallas (endises Lääne-Saare vallas), Kudjape alevikus asuvast suletud prügilast (58.268683 °N, 22.538560 °E) (joonis 4). Kudjape prügila avati 1970. a ning kuni 2000. aastani ladestati jäätmeid prügila 1,5 hektari suurusesse vanemasse ossa. Aastatel 2000-2009 ladestati jäätmeid uuele 2,7 ha suurusele alale. Maksimaalne prügikihi kõrgus prügilas oli 12 meetrit ja ladustatud prügis leidis 65% põlevmaterjali, 30% lagununud orgaanilisi jäätmeid ja 5% muid jäätmeid (Bhatnagar, *et al.*, 2017).



Joonis 4. Kudjape suletud prügila asukoht Saaremaal ning proovivõtukohtade K1, K2, K3 (märgitud punaste täppidega vasakul aerofotol) paiknemine endise prügila territooriumil (Aluskaart: Maa-amet, 2018)

Prügila sulgemise ja korrastamisega hakati tegelema 2005. aastal. Kuna prügilal puudus keskkonnaministri määrusele (RTL 2004, 56, 938) vastav vettpidav kiht prügilademe all, võttis Keskkonnaamet vastu otsuse kaevata prügila lahti, luua vettpidav kiht ning seejärel katta Kudjape prügila metaanioksidatsioonikattega, mille paksus ladestusala uuemas osas oleks 1,2 m ning selle all paikneks 0,5 m paksune gaasijaotuse aluskiht (Ratas, 2011; Bhatnagar, *et al.*, 2017). 2012. aastal alustati sulgemistöodega, mille käigus kaevati

prügilade 80 000 m³ ulatuses läbi ning sorteeriti sealne materjal biofilter-kattekihi, dreanažikihi ja biokütuse tootmiseks, ümbertöötamiseks mittesobiv materjal taasladestati ning tihendati. Prügila katmiseks kulus 60 000 m³ katematerjali: peenfraktsiooni (<40 mm) kasutati prügila biofilter-kattekihi rajamiseks ja väljasorditud suured (>40mm) fraktsioonid (klaas, kivid, kruus jm) leidsid kasutuse gaasi-jaotuskihi rajamisel (Ratas, 2011; Bhatnagar, *et al.*, 2017).

Kudjape prügila ümbertöötlemise ja sulgemise projekteerimis-ehitustööd lõpetati 2013. a oktoobris. Sulgemistöode käigus ladestusala ka haljastati. Haljastamisel kasutati nii hüdrokülvi meetodit kui ka kanti seemned otse kaetud prügila pinnale. Külvati heintaimede segu: aasristikut (*Trifolium pratense*), karjamaa-raiheina (*Lolium perenne*), harilikku keraheina (*Dactylis glomerata*) pilliroogu (*Phragmites australis*) ja aas-rebasheina (*Alopecurus pratensis*), samuti istutati madalamaid põõsaid (verev kontpuid (*Cornus sanguinea*), harilik kuslapuu (*Lonicera xylosteum*), must leeder (*Sambucus nigra*), ning puid (harilik kuusk (*Picea abies*), euroopa lehis (*Larix decidua*), harilik vaher (*Acer platanoides*) ja pensilvaania saar (*Fraxinus pensylvanica*)). Hilisema taimeuringu tulemustest selgus, et prügila pinnalt võib leida 52 taimeliiki ning istutatud puude säilivusprotsent ei ole kuigi kõrge (euroopa lehisel 39,5% ning harilikul kuusel 60,9%), mis võib olla tingitud erinevatest teguritest, näiteks prügilagaasist, kattepinna vähesest hapniku- ja toitainetesisaldusest, pinna kõrgemast temperatuurist ning selle kehvast struktuurist (Tammjärv, 2015). Uuringust selgub ka, et metaanilagunduskattel olev taimestik on liigirikkam kui taimestik tavapinnasel prügila ümber. Prügila pinna on asustanud tüüpilised prügilaliigid, näiteks harilik puju (*Artemisia vulgaris*), harilik kesalill (*Matricaria perforata*) ja harilik hiirekõrv (*Capsella bursa-pastoris*) (Orb ja Sai, 2015). Lisaks haljastusele on kaetud prügila juurde loodud juurdepääsuteed ning koristatud jäätmed prügila ümbrusest (Projekti kood: 2.1.0201.11-0020). Mäele on loodud ka vaba aja veetmise võimalused ning hetkel on tegu mitmekülgse puhkealaga.

Prügila katmisel paigaldati prügila tipuosa kattekihti ka kolm kattekihti läbivat ning prügilademesse ulatuvat torustike süsteemi (joonis 4; lisa joonis 1), mille eesmärk oli seirata gaaside emissiooni ning kontrollida kattekihi efektiivsust pärast sulgemistöode lõppu. Gaasikaevude konstruktsioon valiti selliselt, et mõõtmisi läbi viies annaksid tulemused infot prügilagaasi erinevate komponentide hulgast suletud prügila kattekihi, gaasi-jaotuskihi ja

prügilademe sees (50 – 225 cm sügavusel 25 cm vahedega, lisa joonis 2). Gaasiseiresüsteem paigaldati 2013. aasta juunis (Pehme, 2013).

2.2. *In situ* gaaside kontsentratsiooni mõõtmine

Gaasiemissioonide mõõtmised teostati kohapeal 9. augustil 2017 enne pinnase lahti kaevamist kõigist kolmest statsionaarsest gaasimõõtmispunktist. Määrati CH₄, CO₂ ja O₂ mahuprotsendid prügilagaasis samuti temperatuur ning vee olemasolu torustikus kasutades gaasianalüsaatorit Geotech GA5000. Tulemused märgiti üles analüsaatori stabiliseerumisel ning enne igat uut mõõtmist lasti analüsaatoril õhu käes stabiliseeruda.

2.3. Pinnaseproovide kogumine

Pinnaseproovide kogumiseks kaevati ettevaatlikult prügila kattekiht kõigis kolmes gaasimõõtmispunktis kuni prügilademeni lahti nii, et gaaside kogumistorud oleksid nähtaval (lisa joonis 1). Pinnaseproovid koguti vahetult pärast kattepinna lahti kaevamist. Igas punktis võeti osaproovid (5 tk) iga gaasikogumistoru kõrguselt kaeve seinast spetsiaalselt pinnaseproovide võtmiseks mõeldud eelnevalt autoklaavis steriliseeritud 250 ml mahuga roostevabast terasest rõngastega (Ø 10 cm). Igas proovivõtu punktis võeti pinnaseproovid ka pinnakihist (0-10 cm) ja 25 cm sügavuselt. Kogutud pinnakihis olevad taimejuured koguti eraldi. Iga proovipunkti iga kihi viis osaproovi segati plastikaatkotis kokku (iga koondproov umbes 1 kg) ja kotid suleti õhukindlalt. Kokku koguti 30 koondpinnase ja 3 risosfääri proovi. Proove hoiti kuni laborisse jõudmiseni (1 ööpäev) külmakohades külmakastides. Laboris segati proovid hoolikalt läbi ja jaotati osaproovideks (~1000 g keemilisteks analüüsideks ja ~60 g DNA eraldamiseks), mida säilitati vastavalt +4 °C ja –20 °C juures.

2.4. Proovide keemiline analüüs

Kõik prügila kattekihist võetud proovid sõeluti enne keemilisi analüüse läbi 10 mm-se silmaavaga sõela.

Kuivaine (KA) sisalduse määramiseks kuumutati proove 105 °C juures. Orgaanilise aine (OA) sisaldus määrati põletuskaona, põletades proove 550 °C juures 3 tundi. Orgaaniline

aine määrati kuulveskiga (Mixer Mill M400, Retch) jahvatatud proovist. Orgaanilise aine sisaldus arvutati protsendina kuivainest.

Elektrijuhtivus (EC) ja pH määrati vee-ekstraktidest, mis saadi 5 g proovist ja 50 ml destilleeritud veest. Enne analüüsi loksutati proove tund aega orbitaalloksutil (GFL 3017) kiirusega 140 pööret minutis. Elektrijuhtivus määrati seadmega pH/Cond340i (WTW), pH seadmega Seven Multi (Mettler Toledo). Kõik analüüsid tehti kolmes korduses. Eelpool nimetatud keemilised analüüsid teostati Eesti Maaülikooli põllumajandus- ja keskkonnainstituudi bio- ja keskkonnakeemia laboris Kaja Orupõllu (PhD) poolt.

Süsiniku, lämmastiku ja fosfori sisaldused määrati õhkkuivatatud ja kuulveskiga (Mixer Mill MM400, Retch) jahvatatud proovidest. Üldsüsiniku (C) ja üldlämmastiku (N) sisaldused määrati elementanalüsaatoriga (varioMAX, versioon CNS, Elementar) Eesti Maaülikooli põllumajandus- ja keskkonnainstituudi mullalaboris. Määratud näitajatest arvutati C ja N suhe (C/N) prügilakatte pinnases.

Fosfori analüüsid tehti Eesti Keskkonnauuringute Keskuse Tartu osakonnas. Enne analüüsi proovid mineraliseeriti mikrolaineahjus kontsentreeritud lämmastikhappe ja soolhappe seguga, analüüs teostati aparaadiga ICP-OES (Agilent 5100) lainepikkusel 213,618 nm.

2.5. DNA eraldamine

DNA eraldamiseks pinnase- ja juureproovidest kasutati PowerSoil® DNA Isolation Kit-i (MO BIO, USA) ning eraldamisel lähtuti tootja protokollist. DNA eraldati 250 mg pinnaseproovist. Erinevalt standardsest protokollist teostati homogeniseerimisetapp 5000 pööret minutis 20 sekundi jooksul homogenisaatoril Precellys 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa). DNA saagise suurendamiseks pesti DNA filtrilt välja kahes etapis lisades esmalt filtrile 60 µl C6 lahust ning tsentrifuugiti toatemperatuuril 30 sekundit 10000 x g juures ja seejärel lisati 40 µl C6 lahust ning tsentrifuugiti taas 30 sekundit 10000 x g juures. Eraldatud DNA kontsentratsiooni määramiseks kasutati spektrofotomeetrit Infinite 200 M (Tecan AG, Männedorf, Šveits) ning andmeid töödeldi programmiga i-control™. Eraldatud DNA säilitati sügavkülmikus -20 °C juures.

2.6. Geenide kvantifitseerimine

2.6.1. Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni üldised tingimused

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni abil (*quantitative Polymerase Chain Reaction* - qPCR) määrati proovidest bakterite 16S rRNA, arhede 16S rRNA, metaani mono-oksügenaasi kodeeriva *pmoA* ja metüül-koensüüm M reduktaasi kodeeriva *mcrA* geenide arvukused. Lisaks testiti qPCR-l nitritist sõltuva metaani anaeroobse oksüdatsiooni (*nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane* – n-damo) läbiviijate (*Ca. Methyloirabilis oxyfera*) olemasolu proovialal. Kõik qPCR reaktsioonid viidi läbi RotorGene® Q (QIAGEN, Foster City, CA, USA) masinas, rakendades RotorGene Series Software version 2.0.2 (Qiagen) tarkvara. Reaktsioonisegu, mille lõppmaht oli 10 µl sisaldas 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix reagenti (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Waltham, USA), 0,2 µl geenispetsiifilisi sobiva kontsentratsiooniga praimereid, 1 µl eraldatud DNAd ja ülejäänud mahus (3,6 µl) steriliseeritud destilleeritud vett. Geenispetsiifilised praimerid ja qPCR programmid on toodud tabelis 3. Kõik proovid amplifitseeriti kolmes korduses ja igale mõõtmisele lisati negatiivne kontroll, mis sisaldas kõiki reaktsioonisegu komponente peale proovi DNA. Pärast qPCR amplifikatsioonireaktsiooni määrati sulamiskõver vahemikus 70 °C kuni 90 °C (0,35 °C/3 s) pideva fluorestsentsignaali mõõtmisega. Märklaudgeenide amplifikatsiooni efektiivsusi analüüsiti programmiga LinRegPCR: v. 2016.1 (Ruijter, *et al.*, 2009).

2.6.2. *PmoA* geenispetsiifiliste praimerite qPCR reaktsioonitingimuste optimeerimine ja määramispiiri leidmine

Metaani mono-oksügenaasi kodeeriva *pmoA* geeni amplifitseerimiseks qPCR-l valiti kirjanduse põhjal välja kaks praimeripaari: A189F ja mb661R ning A189F ja mb661modR (Costello ja Lindstorm, 1999; Chang, *et al.*, 2010) (tabel 3). *PmoA* geenispetsiifiliste praimeripaaride reaktsioonitingimuste optimeerimisel kasutati Kudjape katseala proovidest K1-ris ja K1-25 eraldatud DNAd. Sobiva praimeripaari valiku kriteeriumiteks olid: võimalikult madalad amplifitseeritud proovide tsükliläve väärtused (C_t), kõrge proovide amplifikatsiooniefektiivsus (LinRegPCR) ning märklaudjärjestuse amplifikatsioonil tekkivate ebaspetsiifiliste produktide puudumine või väiksem hulk.

Esmalt leiti mõlemale praimeripaarile qPCR-ks sobivaim praimerite kontsentratsioon testides 0,4 μM , 0,6 μM , 0,8 μM , 0,9 μM kontsentratsioonide. Praimerite seondumistemperatuurina kasutati 58 °C ning muud reaktsiooniparameetrid vastasid peatükis 2.6.1. ja tabelis 3 esitatud tingimustele.

Järgnevalt testiti mõlema praimeripaari spetsiifilisust *pmoA* märklaudjärjestuse paljundamisel polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) ja geelivaba elektroforeesi kombinatsioonil kasutades D1000 ScreenTape määramiskomplekti ja 2200 TapeStation süsteemi (Agilent Technologies, USA). PCR reaktsioonisegu sisaldas 10 μl 2x *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix* reagenti (ThermoFisher Scientific, Inc.), 0,5 μl mõlemat praimerit (30 pmol), 7 μl steriliseeritud destilleeritud vett ja 2 μl keskkonnaproovi. PCR programmi parameetrid olid mõlema praimeripaari puhul järgnevad: 98 °C 30 s; 40 tsüklit: 98 °C 10 s, 56-59 °C 30 s, 72 °C 30 s; 72 °C 8 min. Suurema hulga ebaspetsiifiliste amplifikatsiooniproduktide tekke tõttu välistati praimeripaari A189F ja mb661modR edasine kasutamine ning optimeerimist jätkati vaid praimeritega A189F ja mb661R.

Optimaalse praimerite seondumistemperatuuri leidmiseks amplifitseeriti testproove qPCR-il temperatuuridel 57 °C, 58 °C, 59 °C. Muud reaktsiooniparameetrid vastasid peatükis 2.6.1 ja tabelis 3 esitatuile.

Optimeeritud reaktsioonitingimustel määrati ka *pmoA* geeni kvantifitseerimisläve väärtus, (tabel 3). LOQ leidmiseks tehti neljast proovist (K1-ris, K1-25, K1-4, K1-7) lahjenduste rida (10 kuni 10^4 kordsed lahjendused). LOQ väärtuseks loeti kõige suurema lahjenduse tsükliläve väärtus (C_t), millel amplifikatsioon esines kõigis kolmes paralleelis, paralleelide erinevus üksteisest oli <0,5 tsüklit ning sulamiskõverate asukoht vastas korrektselt *pmoA* positiivse kontrolli sulamiskõvera asukohale.

2.6.3. *PmoA* kaliiberkõvera valmistamine

PmoA geeni kvantifitseerimise standardina kasutati vektorisse pEX-A128 kioneeritud *pmoA* geeni järjestust kontsentratsiooniga 10^9 geenikoopiat/ μl (Eurofins MWG, Ebersberg, Saksamaa), millest valmistati 10-kordsete lahjenduste rida vahemikus 10^8 -50 geenikoopiat 10 μl reaktsioonisegu kohta, millele vastavad fluorestsentsi väärtused määrati eelnevalt

optimeeritud reaktsioonitingimustel (tabel 3). Kaliiberkövera *pmoA* geeni kvantifitseerimiseks valmistas töö autor.

2.6.4. Märklaugeenide koopiaarvude määramine pinnaseproovidest

Mikroobikoosluse arvukuse hindamiseks määrati pinnaseproovidest bakterite ning arhede 16S rRNA geenide koopiaarvud. Metanogeenide arvukust hinnati metüül-koensüüm M reduktaasi kodeeriva *mcrA* geeni arvukuse järgi, metanotroofide arvukust metaani mono-oksügenaasi kodeeriva *pmoA* geeni ning n-damo protsessi läbi viiva *Ca. Methyloirabilis oxyfera* 16S rRNA geeni põhjal. Märklaugeenide amplifitseerimistingimused vastasid peatükis 2.6.1. ja tabelis 3 esitatuile. Saadud tulemuste kvaliteeti analüüsiti RotorGene Series Software version 2.0.2 tarkvaraga (Qiagen). Analüüsiti sulamiskõverate paiknemist ja kuju ning amplifikatsioonikõverate ühtsust. Hälbivate amplifikatsiooni- ja sulamiskõveratega proovid elimineeriti edasisest analüüsist. Proovide amplifikatsiooniefektiivsust hinnati programmi LinRegPCR v. 2016.1 abil (Ruijter, *et al.*, 2009) ning proovide grupeerumist amplifikatsiooniefektiivsuste alusel kontrolliti ühefaktorilise dispersioonanalüüsi abil (ANOVA, $p < 0,05$). Amplifikatsiooniefektiivsuste alusel grupeerusid kaeve 1 ja 2 proovid ühte rühma ning kaeve 3 proovid teise rühma.

Uuritud proovides geenikoopiate arvukuse leidmiseks kasutati enamikel juhtudel (va *pmoA*) juba olemasolevaid kaliiberköveraid. Proovidest märklaugeenide koopiaarvude määramiseks kasutati standardvahemikke, mis kattusid proovide C_t väärtustega ning mille puhul proovide tehniliste paralleelide amplifikatsioonide koopiaarvude standardhälbe väärtus oli vähim. Esmalt leiti proovi märklaugeeni kontsentratsiooni (A) ja vastava standardi erinevate punktide kontsentratsioonide (B) vaheline kordusaste vastavalt valemile (1) (Ruijter, *et al.*, 2009)

$$\text{Kordusaste} = N_{0,A}/N_{0,B} = (N_{t,A}/E_{Act,A}) / (N_{t,B}/E_{Bct,B}), \quad (1)$$

kus:

$N_{0,A}$ – märklaugeeni kontsentratsioon proovis fluorestsentsühikutes

$N_{0,B}$ – märklaugeeni järjestuse kontsentratsioon standardlahjenduses

E – amplifikatsiooni efektiivsus

N_t – fluorestsentsi läviväärtus

C_t – läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsükli arv

Märklaudgeenide arvukuse leidmiseks korrutati saadud kordsusaste vastava standardlahjenduse kontsentratsiooniga. Uuritava geeni lõplik arvukus proovis leiti kvantifitseerimisstandardi erinevate punktide alusel saadud koopiaarvude ja proovide paralleelide aritmeetilisel keskmistamisel. Märklaudgeenide koopiaarvud on esitatud ühe grammi kuiva pinnase kohta (koopiat/g KA). Funktsionaalsete geenide osakaalude arvutamiseks prokarüootide koosluses määrati nende protsent bakterite ning arhede 16S rRNA geenide summast.

Tabel 3. Töös kasutatud qPCR praimerid, optimaalsed praimerite kontsentratsioonid ja qPCR programmid ning kasutatud standardite vahemikud.

Märklau d-geen	Praimer	Järjestus 5'-3'	Viide	Praimeri kontsentratsioon (µM)	Produkti pikkus (aluspaari)	qPCR programm	Standardi vahemikud
Bakterite 16S rRNA	Bact517F	GCCAGCAGCCGCGGTAA	Liu, <i>et al.</i> , 2007	0,6	530	95 °C 10 min, 35 tsüklit: 95 °C 30 s, 60 °C 45 s, 72 °C 45 s	10 ⁸ -10 ⁶
	Bact1028 R	CGACARCCATGCASCACCT ¹	Dethlefsen, <i>et al.</i> , 2008				
Arhede 16S rRNA	Arc519F	CAGYCGCCRCGGTAA ¹	Espenberg <i>et al.</i> , 2016	0,6	393	95 °C 10 min, 35 tsüklit: 95 °C 15 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s	10 ⁸ -10 ⁴
	Arch910 R	GAATWGGCGGGGGRGC ¹					
<i>mcrA</i>	METH-F	CASTTYGGHGGWTCHCA ¹		0,8	135	95 °C 10 min, 55 tsüklit: 95 °C 15 s, 51 °C 30 s, 72 °C 30 s	10 ⁶ -50
	mcrAqR	TTCTWYGGHTACGAYCTBCA ¹					
<i>pmoA</i>	A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG ¹	Costello ja Lindstorm, 1999	0,6	510	95 °C 10 min, 35 tsüklit: 95 °C 15 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s	10 ⁷ -10 ²
	Mb661R	CCGGMGCAACGTCYTTACC ¹					
	A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG ¹	Chang <i>et al.</i> , 2010	0,6	510	-	-
	Mb661m odR	GGMGCNACGTCYTTACCG ¹					
<i>M.</i> <i>oxyfera</i> 16S rRNA (<i>n-</i> <i>damo</i>)	Pq2F	GGGGAAGTCCAGCGTCAAG	Ettwig <i>et al.</i> , 2009	0,8	281	95 °C 10 min, 45 tsüklit: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 80 °C 30 s ²	-
	Pq2R	CTCAGCGACTTCGAGTACAG					

¹ – Nukleotiidide tähistused: **R** – A või G; **S** – C või G; **Y** – C või T; **W** – A või T; **M** – A või C; **H** – A, C või T; **B** – C, G või T; **N** – A, T, C või G

² – Fluorestsentsi lugemine toimub teise ekstensiooniastme (80°C 30 s) lõpus

2.7. PCR produktide ettevalmistamine sekveneerimiseks

Pinnaseproovide mikroobikoosluse iseloomustamiseks kasutati amplikonipõhist DNA sekveneerimist rakendades universaalseid, nii bakterite kui arhede 16S rRNA geenile seonduvaid praimereid 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') ja 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') (Parada *et al.*, 2015). Proovide eristamiseks järgneva analüüsi käigus kasutati iga proovi puhul unikaalset F ja R praimerite kombinatsiooni, kus mõlema praimeri 5' otsas oli unikaalne kuue aluspaari pikkune *barcode*-järjestus. Igast proovist teostati PCR kolmes korduses. Reaktsioonisegu (20 µl) sisaldas 10 µl Phusion High-Fidelity PCR Master Mixi (ThermoFisher Scientific, Inc.), 0,2 µM mõlemat praimerit, 1 µl esialgset DNA proovi ning steriilset destilleeritud vett. Märklaud-DNA kogused jäid enamiku proovide puhul vahemikku 2,0-10,8 ng; nelja proovi (K1-ris, K1-0, K2-ris ja K2-0) puhul kasutati reaktsiooni inhibitsiooni vältimiseks DNA koguseid vahemikus 0,07-0,14 ng. Kasutati järgmist PCR programmi: denaturatsioon 98 °C 30s; 25 tsüklit: denaturatsioon 98 °C 10 s, praimerite hübridiseerimine 60 °C 20 s, produkti süntees 72 °C 15s; lisasüntees 72 °C 8 min. PCR produktide õigsust kontrolliti elektroforeetilisel 1,5%-sel agarosgeelil kasutades 1 kb DNA suurusmarkerit (Gene Ruler 1 kb DNA ladder, ThermoFisher Scientific, Inc.). Agarosgeeli valmistamiseks kasutati 1xTAE [50 mM Tris-atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8,2] puhvrit, agarooosi (1,5%, w/v) ja etiidiumbromiidi (0,6 µg/ml). Enne geelile kandmist segati 3 µl PCR produkti Smart 6x Loading Dye Blue värviga. Järgnes PCR-i produktide 25-minutiline elektroforees 1xTAE puhvril 100 V pinge juures. DNA fragmendid visualiseeriti UV valguses.

Lõpuks segati ühe proovi kolm PCR produkti kokku ning segu DNA kontsentratsioon mõõdeti TapeStation 2200 instrumendil, kasutades D1000 ScreenTape-i ® (Agilent Technologies), vastavalt tootja protokollile. Saadud tulemused visualiseeriti TapeStation (Agilent Technologies) tarkvaraga. Sekveneerimiseks segati võrdsetes kontsentratsioonides kokku kõikide proovide PCR produktid ning saadud segu puhastati NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Saksamaa) komplektiga. Amplikonide sekveneerimine teostati Microsyth AG (Šveits) poolt Illumina MiSeq platvormil.

2.8. Andmete statistiline analüüs

Sekveneeritud järjestusi saadi ühe proovi kohta 19283 - 53333 (keskmiselt 32849 ± 7948). Nendest määrati bakterite järjestusteks keskmiselt 98,3% ja arhede järjestusteks 1,3%.

Kvaliteedikontrollis eemaldati järjestused, mille kvaliteediskoor jäi alla 25, homopolümeeride arv oli väiksem kui 8, mis sisaldasid määramata nukleotiide ja minimaalne järjestuse pikkus oli 100 aluspaari. Peale kvaliteedikontrolli jäi alles 84% järjestustest, mille keskmine pikkus oli 390 aluspaari. Kvaliteetsete järjestuste taksonoomia on määratud programmiga Mothur (versioon 1.40.3, Mothur.org) kasutades referentsina SILVA 16S andmebaasi (versioon 132) (Pruesse, *et al.*, 2007).

Pinnase füüsikalise-keemiliste parameetrite ja uuritud geeniparameetrite erinevusi kaevete vahel kontrolliti Kruskal-Wallis testiga ja erinevusi konkreetsete kaevete vahel analüüsiti keskmiste astakute mitmese võrdluse abil. Seoste olulisuse hindamisel geeniparameetrite ja pinnase füüsikalise-keemiliste parameetrite ning gaaside kontsentratsioonide vahel kasutati Spearman'i korrelatsioonikoefitsienti.

3. Tulemused

3.1. Keemilised ja füüsilised näitajad

Prügila rohttaimede risosfääri, metaanioksidatsiooni, gaasijaotuskihi ja prügilademe ülemise kihi füüsilis-keemilised näitajad on toodud tabelis 4. Proovivõtu ajal oli välistemperatuur 21,7 °C ja pinnase temperatuur varieerus erinevatel sügavustel vahemikus 20,9-27,5 °C. Kuigi statistiline analüüs ei leidnud olulist erinevust ($p > 0,05$) proovivõtupunktide vahel, mõõdeti kõige kõrgemad ja ühtlasemad temperatuurid kolmandas proovivõtukoas. MOK-is oli pinnase kuivaine sisaldus vahemikus 46,1% - 87,7% ja väikseim kuivainesisaldus mõõdeti 95-130 cm sügavusel. pH jäi MOK-is vahemikku 7,8-8,7, ning oli kõrgeim kõige alumises (170-180 cm) kihis. GJK-is oli pH keskmiselt peaaegu 0,5 ühikut kõrgem, kui MOK-i alumises ja prügilademe ülemises kihis. EC väärtused olid MOK-is vahemikus 187-1257 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ning ülemises kihis oli see näitaja keskmiselt 3-4 korda madalam kui MOK-i alumistes kihtides. Statistilise analüüsi tulemused näitasid, et K3 kaeves olid oluliselt madalamad EC väärtused kui K1 kaeves ($p < 0,01$). K1 ja K2 vahel selles aspektis olulist erinevust ei esinenud. GJK-s oli EC väärtus madal ja sarnanes MOK-i ülemise kihiga. C sisaldus jäi MOK-is vahemikku 4,6% - 17,8%, varieeruvus oli kõige suurem K3-s ning suurimad väärtused olid MOK-i keskosas. GJK-s ja prügilademes oli C väärtus madalam MOK-ist. LOI väärtused jäid vahemikku 4,8% - 29,7% olles kõige kõrgemad MOK-i keskosas ning madalaimad MOK-i sügavamates kihtides. LOI varieeruvus oli kõige suurem punktis K3. Võrreldes GJK-ga oli LOI MOK-is enamasti kõrgem, kohati 2-3 korda. N sisaldus varieerus MOK-is 0,08% - 0,82%-ni. GJK-is oli N varieeruvus suur tänu K3-e suurele erinevusele K1-st ja K2-st ning suur oli varieeruvus ka K3-e profiilis. Ka prügilademes oli N K3-s 10 korda kõrgem võrreldes teiste punktidega. Süsinik-lämmastik suhe (C/N) varieerus MOK-is 8 ja 63 vahel. K3-s olid väärtused oluliselt madalamad ($p < 0,001$) kui kahes ülejäänud kaeves, mis statistiliselt selles aspektis üksteisest ei erinenud. Kui K1-s ja K2-s olid madalaimad C/N väärtused 0-10 cm kihis, siis K3-s mõõdeti madalaim näitaja (8) just 170-195 cm sügavusel (GJK-i peal). GJK-s oli C/N varieeruvus proovipunktide vahel väga suur, (7,5-424) kusjuures madalaim väärtus (7,5) mõõdeti punktis K3 ja kõrgeim (424) punktis K1. Ka prügilademes eristus K3 C/N suhte poolest kahest teisest punktist (erinevus K1-st 8,2 korda ja K2-st 10,6 korda).

P sisaldus varieerus suuresti nii kihtide kui ka proovivõtupunktide võrdluses jäädes vahemikku 0,4-4,1 g/kg. Kõige kõrgemad väärtused olid MOK-i keskosas 95-105 cm sügavusel. GJK-s olid P sisaldused 2 korda väiksemad nii seda katvast MOK-i alumisest kihist kui ka selle all olevast prügilademest.

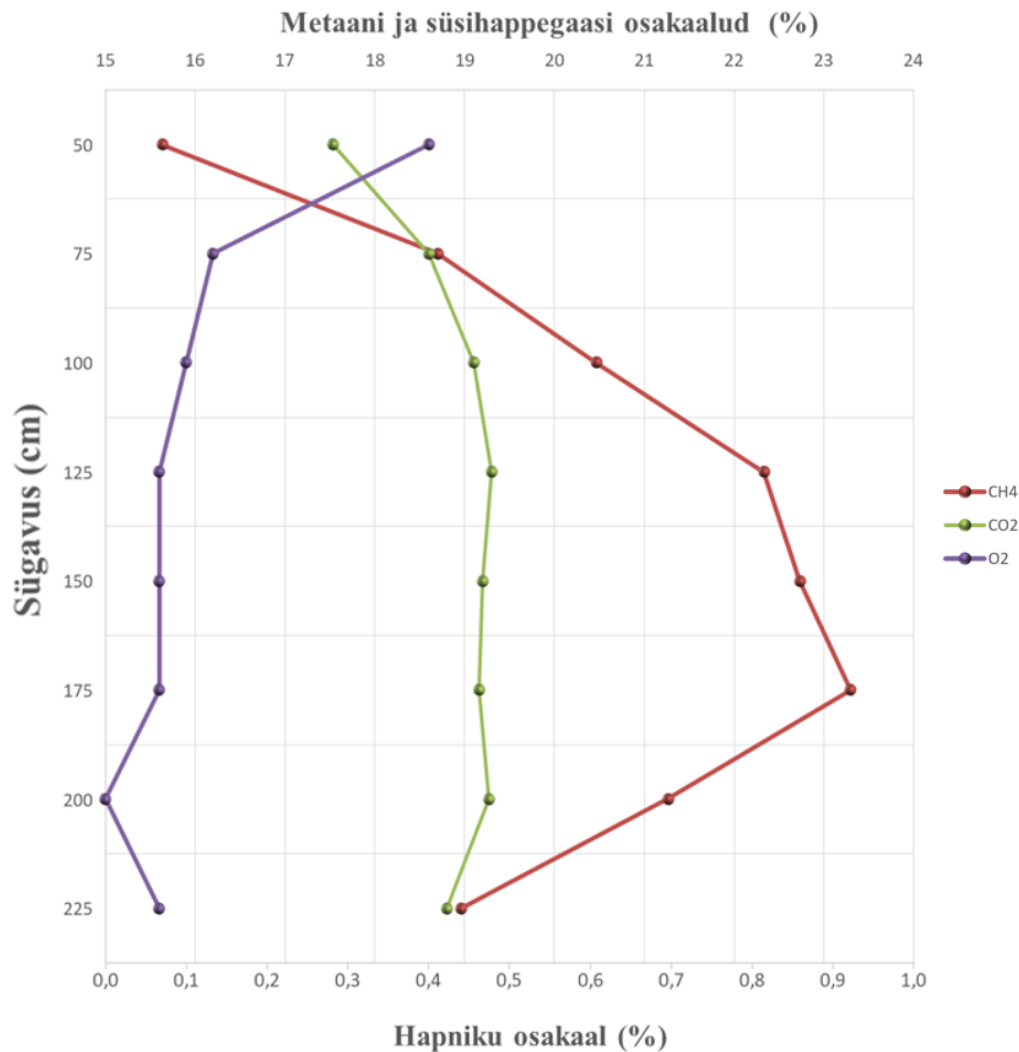
Tabel 4. Füüsikalise-keemiliste parameetrite keskvaartused ja standardhälbed (sulgudes, n=3) Kudjape kaetud prügila metaanilagunduskatte metaanioksidatsioonikihi eri sügavustes ja gaasijaotuskihis (GJK) ning prügilademe ülemises kihis. Toodud on järgmiste parameetrite väärtused: kuivaine (KA), happesus (pH), elektrijuhtivus (EC), üldsisiniku (C), orgaanilise aine (LOI), üldlämmastiku (N) sisaldused, C ja N suhe (C/N) ja üldfosfori (P) sisaldus ja pinnase temperatuur (Temp). Kattekihi kasvavate rohttaimede risosfääris (Risos.) määrati ainult kuivaine sisaldus.

Proovi tüüp	Kiht (cm)	KA (%)	pH	EC (µS/cm)	C (%)	LOI (%)	N (%)	C/N	P (g/kg)	Temp (°C)
Risos.	0-10	70,0 (4,4)	em	em	em	em	em	em	em	em
Metaani oksüdatsioonikiht	0-10	83,9 (5,2)	7,8 (0,4)	214 (108)	9,7 (3,1)	15,8 (5,8)	0,6 (0,2)	18,0 (2,8)	1,4 (1,0)	25,8 (2,6)
	20-30	80,0 (7,6)	8,0 (0,3)	835 (570)	7,9 (3,0)	10,4 (3,8)	0,3 (0,1)	27,4 (6,2)	0,9 (0,3)	em
	45-55	79,1 (7,0)	7,9 (0,3)	676 (391)	6,9 (3,0)	9,2 (4,1)	0,2 (0,1)	31,0 (6,0)	1,0 (0,4)	26,4 (2,0)
	70-80	72,7 (6,8)	7,9 (0,1)	846 (299)	8,3 (1,9)	10,9 (3,7)	0,3 (0,1)	30,8 (13,1)	1,2 (0,4)	27,5 (1,1)
	95-105	62,7 (14,7)	7,8 (0,1)	795 (205)	12,8 (4,7)	17,7 (10,5)	0,4 (0,4)	40,8 (18,3)	2,2 (1,7)	27,1 (0,8)
	120-130	69,9 (3,2)	7,7 (0,4)	864 (133)	8,1 (1,0)	11,3 (1,6)	0,2 (0,1)	34,4 (8,0)	1,3 (0,4)	26,3 (1,0)
	145-155	73,2 (1,5)	7,9 (0,1)	776 (228)	7,5 (0,2)	9,6 (0,2)	0,3 (0,2)	30,0 (15,2)	1,0 (0,2)	24,4 (2,3)
	170-180	78,8 (4,6)	8,2 (0,5)	665 (204)	6,0 (0,8)	6,8 (1,7)	0,4 (0,4)	39,0 (18,3)	0,7 (0,2)	23,9 (3,4)
GJK	195-205	84,4 (2,9)	8,7 (0,5)	385 (72)	5,1 (1,0)	4,3 (1,1)	0,3 (0,5)	227 (209)	0,3 (0,04)	21,5 (4,0)
Prügilade	220-230	77,3 (2,8)	8,1 (0,2)	727 (161)	5,9 (0,6)	6,3 (0,7)	0,5 (0,7)	33,0 (25,0)	0,5 (0,04)	20,9 (4,2)

em – ei määratud

3.2. Gaaside osakaalud prügilagaasis

Hapniku osakaalud jäid kõigis mõõdetud kihtides alla 0,1%, CO₂ sisaldus vahemikku 20,1% kuni 16,6% ning CH₄ sisaldus 0,5% – 44,8% vahele prügilagaasi koostisest MOK-is. O₂ ja CO₂ osakaal varieerus suhteliselt vähe proovipunktide vahel samas kui metaani sisaldus varieerus proovipunktide vahel oluliselt. K3-s olid oluliselt väiksemad CH₄ osakaalud kui K2-s ($p < 0,001$, lisa tabel 1). Mõõdetud gaaside sisalduse muutust metaanilagunduskatte profiilis (alates 50 cm sügavuselt) kuni prügilademe ülaosani proovivõtu päeval on näidatud joonisel 5. Jooniselt on näha järsku O₂ osakaalu langust 50 cm ja 75 cm vahelises kihis, millele järgneb suhteliselt ühtlane pidev langus kuni GJK-ni, kus hapniku sisaldus oli alla 0,01%. Prügilademe ülaosas oli O₂ sisaldus prügilagaasis sarnane MOK-i alumistele kihtidele. CO₂ sisaldus suurenes ligi 2% 50 ja 125 cm vahelises kihis ning jäi siis suhteliselt stabiilseks kuni prügilademeni, kus fikseeriti keskmiselt umbes 0,5% väiksem CO₂ sisaldus kui MOK-i alumistes kihtides ja GJK-s. CH₄ osakaal suurenes ligi 8% piki MOK profiili kuni 175 cm sügavuseni, kust edasi toimus ühtlane (umbes 4%) vähenemine MOK-is O₂ ja CO₂ tulemused ei kõikunud suures ulatuses. Statistiline analüüs näitas, et mitmed pinnase keemilised parameetrid olid seotud gaaside jaotusega prügilakatte pinnases (tabel 5), neist C/N oli seotud O₂ ja CH₄ osakaalu ning KA O₂ ja CO₂ sisaldusega, kuid erinevate gaaside puhul olid seosed erisuunalised.



Joonis 5. Kolme proovivõtupunkti keskmiste hapniku (sinine), metaani (punane) ja süsihappegaasi (roheline) osakaalud (prügilagaasi koostises) ruumiline muutus piki metaanilagunduskatte profiili kuni prügilademe ülemise kihini (225 cm) proovivõtupäeval.

Tabel 5. Statistiliselt olulised seosed (Spearman'i korrelatsioonikordajad) gaaside (O₂, CO₂ ja CH₄) sisalduste (prügilagaasis) ja pinnase füüsikalise-keemiliste näitajate vahel metaanioksüdatsioonikihis (n=21). Lühendid: KA - kuivaine, EC – elektrijuhtivus, N – üldlämmastik, C/N – süsiniku ja lämmastiku suhe.

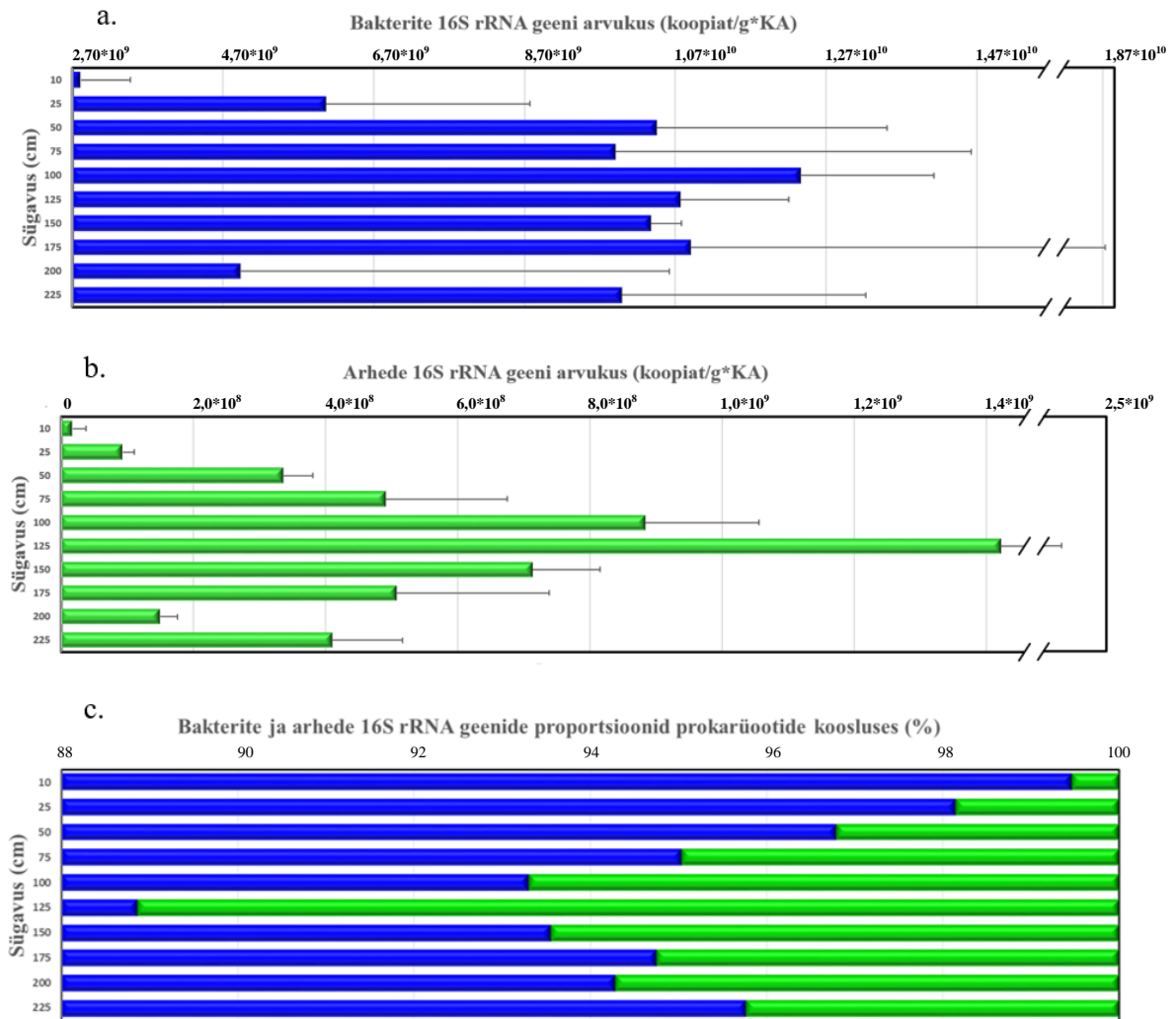
Gaas	Keemiline näitaja			
	C/N	KA	EC	N
O ₂	-0,52 *	0,61 **		
CO ₂		-0,48 *	0,47 *	
CH ₄	0,69 ***			-0,53 *

3.3. Bakterite ja arhede arvukus ja proportsioon

Joonistel 6 on ära toodud bakterite ja arhede 16S rRNA (vastavalt joonise a ja b osad) geeni arvukuste keskväärtused ($n=3$) ja nende standardhälbed uuritud pinnasekihtides. Bakterite 16S rRNA geen oli oluliselt arvukam kui arhede vastav geen kõikides uuritud pinnase proovides moodustades 99% - 82% kogu prokarüootide 16S rRNA geenide arvukusest (joonis 6c). Bakterite 16S rRNA geeni arvukus jäi metaanilagunduskattes vahemikku ($1,34 \cdot 10^9$ - $1,91 \cdot 10^{10}$ GK/g KA). Ülemises (kuni 50 cm) MOK-i kihis oli see näitaja keskmiselt $6,4 \cdot 10^9$ GK/g KA, mis oli oluliselt väiksem kui alumistes MOK-i kihtides, kus näitaja väärtus oli keskmiselt $1,1 \cdot 10^{10}$ GK/g KA. Metaanilagunduskatte 0-10 cm kihis oli bakterite arvukus kuni 10 korda madalam MOK-i keskmisest. GJK-s (195-205 cm) oli selle geeni arvukus ligikaudu 4 korda väiksem kui seda ümbritsevates MOK-i alumises ja prügilademe ülemises kihis. Bakterite 16S rRNA geeni arvukus risosfääri proovis ($4,19 \cdot 10^{10}$ ($\pm 9,23 \cdot 10^8$) GK/g KA) oli kaks korda kõrgem seda ümbritsevast juurevabast mullast (lisa tabel 2).

Arhede 16S rRNA geeni arvukus metaanilagunduskattes oli vahemikus $3,34 \cdot 10^6$ - $2,53 \cdot 10^9$ GK/g KA. Selle geeni arvukus suurenes ühtlaselt pinnalt kuni 130 cm sügavuseni, kus mõõdeti kõige suuremad selle geeni arvukused uuritud kihtides. Sügavuse suurenedes arhede arvukus langes järsult ning GJK-s oli see juba suurusjärgu võrra madalam kui 120-130 cm MOK-i kihis (joonis 6b). Risosfääris oli arhede arvukus $4,25 \cdot 10^7$ ($\pm 2,08 \cdot 10^7$) GK/g KA, mis on kaks korda kõrgem kui seda ümbritsevas juurevabas mullas, kuid madalam kui ülejäänud metaanilagunduskattes. Risosfääris oli bakterite osakaal 99% ning arhed moodustasid 1% prokarüootide kooslusest (lisa tabel 2).

Ehkki varieeruvus kaevete vahel oli nii bakterite kui arhede 16S rRNA geenide arvukustes suur (lisa tabel 2), ei tuvastanud statistiline analüüs kaevete vahel nende parameetrite väärtustes olulist erinevust ($p > 0,05$).



Joonis 6. Bakterite ja arhede 16S rRNA geenide arvukused (vastavalt a ja b) ning nende proportsioonid prokarüootide koosluses (c) Kudjape suletud prügila metaanilagunduskatte eri kihtides (10-175 cm), gaasijaotuskihis (200 cm) ja prügilademe ülemises kihis (225 cm). Sinine tähistab bakterite näitajaid ja roheline arhede vastavaid näitajaid. Geenide arvukuste puhul on näidatud kaevete keskmised koos standardhälvetega ja proportsioonide puhul on ära toodud kaevete keskmised (n=3). Lühend: KA- kuivaine

Korrelatsioonianalüüsi tulemused näitasid, et bakterite ja arhede 16S rRNA geeni arvukuste ja nende geenide proportsioonide ning pinnase füüsikalise-keemiliste parameetrite vahel oli mitmeid olulisi seoseid (tabel 6). Näiteks ilmnes nii bakterite kui ka arhede 16S rRNA geeni arvukuste ja proportsioonide seos proovi sügavuse ja kuivaine sisaldusega. Lisaks oli bakterite arvukus seotud ka EC väärtusega.

Tabel 6. Bakterite ja arhede 16S rRNA geenide (Bakt16S ja Arh16S), *mcrA* ja *pmoA* geenide arvukuste ning proportsioonide (vastavalt Bakt16S%, Arh16S%, *mcrA*% ja *pmoA*%) ja kogu prokarüootide arvukuse (16S summa) statistiliselt olulised seosed (Spearman'i korrelatsioonikordajad) proovi sügavuse ja füüsikalise-keemiliste näitajate ning mõõdetud gaaside osakaaludega metaanioksüdatsioonikihis (n=24). Lühendid: KA - kuivaine, EC – elektrijuhtivus, N – üldlämmastik, C/N – süsiniku ja lämmastiku suhe

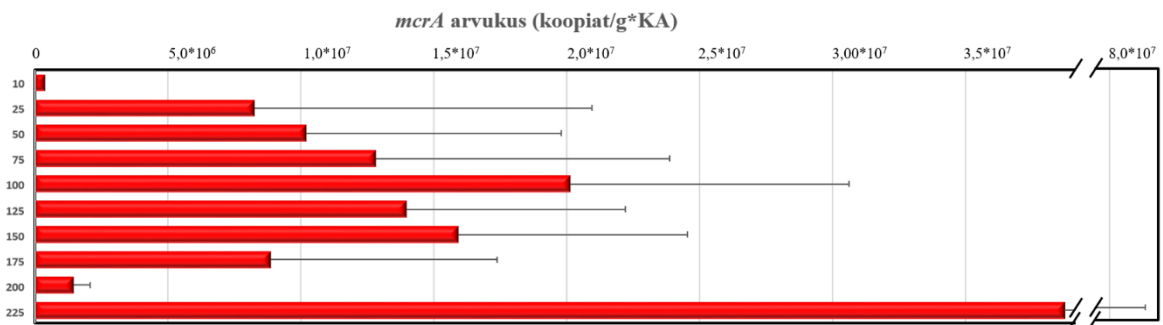
Mikrobiol näitaja	Proovi sügavus	Keemiline näitaja				Gaaside osakaal prügilagaasis		
		KA	EC	N	C/N	O ₂	CO ₂	CH ₄
Bakt16S	0,53 **	-0,54 **	0,51 *					
Arh16S	0,70 ***	-0,77 ***					0,66 **	-0,48 *
<i>mcrA</i>		-0,68 ***	0,65 ***	-0,47 *	0,67 ***	0,58 **	0,46*	-0,59 **
<i>pmoA</i>				0,56 **	-0,75 ***	-0,87 ***		0,51 *
16S summa	0,56 **	-0,59 **	0,514*					
Bakt16S %	-0,71 ***	0,67 ***		0,42 *	-0,48 *		-0,67 ***	0,62 **
Arh16S %	0,71 ***	-0,67 ***		-0,42*	0,48 *		0,67 ***	-0,62 **
<i>mcrA</i> %		-0,59 **	0,60 **	-0,53 **	0,69 ***	0,65 **	-0,46 *	-0,63 **
<i>pmoA</i> %	-0,43 *		-0,42 *	0,57 **	-0,79 ***	-0,91 ***		0,64 **

Kui bakterite 16S rRNA geeni arvukuse ja gaaside osakaalude vahel statistiliselt olulisi seoseid ei esinenud, siis nii arhede 16S rRNA geeni arvukus kui bakterite ja arhede vastavate geenide proportsioon prokarüootide koosluses olid seotud CO₂ ja CH₄ osakaaludega prügilagaasis.

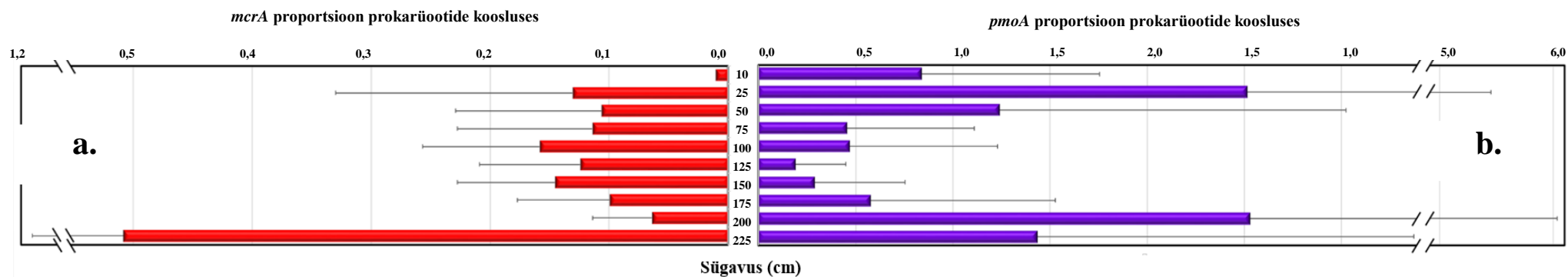
3.4. Metanogeenid

3.4.1. *McrA* geeni arvukus ja proportsioon prokarüootide koosluses

McrA geeni arvukus jäi MOK-is vahemikku $3,11 \cdot 10^5$ - $2,8 \cdot 10^7$ koopiat/g KA. Jooniselt 7 nähtub, et metanogeenide arvukus oli kõrgeim prügilademes ning madalaim GJK-s ja maapinnal. MOK-is olid arvukused suurimad selle keskosas (95-105 cm) (lisa tabel 2). *McrA* geeni proportsioon varieerus uuritud prügilakatte prokarüootide koosluses 0,01% - 0,5% ning selle parameetri muutused piki uuritud profiile olid sarnased selle geeni arvukuse muutustele. Suurimad väärtused leiti prügilademes ning madalaimad tulemused mõlema parameetri puhul maapinna lähedases kihis (10-20 cm) ja GJK-s, olles suurusjärgu võrra madalamad kui GJK all olevas prügilademes. 20-180 cm sügavusel MOK-is varieerus *mcrA* geeni proportsioon suhteliselt väikeses ulatuses (joonis 8a). Taimede risosfääris jäid *mcrA* geeni arvukused allapoole määramispiiri.



Joonis 7. *McrA* arvukus Kudjape suletud prügila metaanilagunduskatte eri kihtides (10-175 cm) gaasijaotuskihis (200 cm) ja prügilademe ülemises kihis (225 cm). Näidatud on keskmised koos standardhälvetega (n=3). Lühend: KA- kuivaine.



Joonis 8. *McrA* ja *pmoA* geenide proportsioonid (vastavalt a. ja b.) Kudjape suletud prügila metaanilagunduskatte eri kihtides (10-175 cm), gaasjaotuskihi (200 cm) ja prügilademe ülemise kihi prokarüootide koosluses (225 cm). Näidatud on keskmised koos standardhälvetega (n=3).

Statistilise analüüsi tulemused näitasid, et *mcrA* gaani arvukus ja proportsioonid olid K3-s oluliselt madalamad kui ülejäänud kahes proovipunktis ($p < 0,05$) ning need näitajad olid seotud prügila kattematerjali EC väärtuse ning KA ja N sisalduse ja C/N-ga pinnases (tabel 6). Samuti ilmnemise olulised seosed *mcrA* geeni arvukuse ja proportsiooni ning kõikide mõõdetud gaaside osakaalude vahel prügila MOK-is.

3.4.2. Koosluse struktuur

16S rRNA geeni järjestuste analüüs leidis, et uuritud prügila metaanilagunduskatte kihtides kuulusid 25,5% kõigist arhedeks klassifitseeritud järjestustest metanogeensetele arhedele hõimkonda *Euryarcheota*. Domineerisid klassi *Methanomicrobia* (0,24% kõikidest arhede järjestustest) kahe seltsi *Methanomicrobiales* (0,05%) ja *Methanosarcinales* (0,19%) esindajaid. Viimatimainitud seltsi esindajatest suudeti 0,15% määrata perekonda *Methanosarcina*. Teine tuvastatud metanogeenide klass oli *Methanobacteria*, millesse kuulus 0,04% arhede järjestusest.

3.5. Metanotroofid

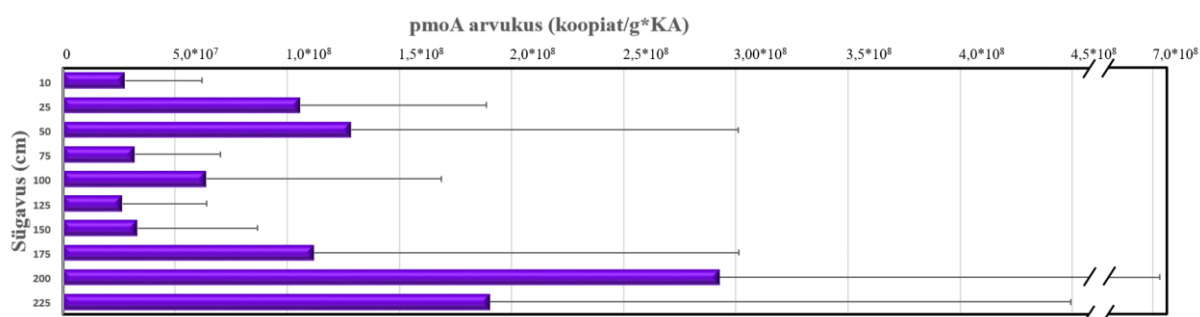
Metanotroofide olemasolu prügila kattepinnases testiti kahe geeni põhjal: *pmoA*, n-damo protsessi läbi viiva *Ca. Methyloirabilis oxyfera* 16S rRNA geeni põhjal. N-damo protsessi läbiviivate metanotroofide arvukus jäi kõikides proovides alla määramispiiri ning metaani oksüdeerivate organismide arvukused ja proportsioon leiti vaid *pmoA* geeni põhjal.

3.5.1. Optimeeritud qPCR programmi ja standardkõvera parameetrid *pmoA* geeni kvantifitseerimiseks

Erinevate testide käigus leiti optimaalsed tingimused *pmoA* geeni kvantifitseerimiseks. Optimaalseks praimerite kontsentratsiooniks oli 0,6 μM ja praimerite seondumistemperatuuriks 57 °C (tabel 3). *PmoA* amplifikatsiooniefektiivsus jäi proovides vahemikku 1,462-1,953 (keskmiselt 1,597 (n=92)). *PmoA* standardi amplifikatsiooniefektiivsus oli keskmiselt 1,846.

3.5.2. *PmoA* geeni arvukus ja proportsioonid prokarüootide koosluses

PmoA geeni arvukus jäi vahemikku $2,65 \times 10^7$ – $2,93 \times 10^8$ koopiat/g KA (lisa tabel 2) ning prokarüootide kooslusest moodustasid metanotroofid 0,2% - 2,5% (joonis 8b ja lisa tabel 2). Selle geeni arvukus ja osakaal prokarüootide koosluses olid tunduvalt kõrgemad 20-55 cm kihis kui selle peal ja all olevates MOK-i kihtides (joonis 9 ja joonis 8b). Alates 145 cm sügavuselt tähendati *pmoA* geeni arvukuse ja proportsiooni olulist suurenemist. Kõige arvukamalt leidis seda geeni GJK-s ja keskmiselt rohkem kui MOK-is ka prügilademe ülemises kihis. Taimede risosfääris oli selle geeni arvukus $6,95 \times 10^6$ – $6,52 \times 10^7$ koopiat/g KA vahel ja proportsioon varieerus proovivõtukohtades 0,18% - 1,23% vahel.



Joonis 9. *PmoA* arvukus Kudjape suletud prügila metaanilagunduskatte eri kihtides (10-175 cm), GJK-s (200 cm) ja prügilademe ülemises kihis (225 cm). Näidatud on arvukuste keskmised koos standardhälvetega (n=3). Lühend: KA- kuivaine

Kruskal-Wallise testi tulemused näitasid, et *pmoA* arvukus ja proportsioon olid K3-s oluliselt kõrgemad kui teistes proovipunktides ($p < 0,001$). *PmoA* arvukus oli seotud pinnase N sisalduse ning C/N-ga. Lisaks ilmsesid olulised seosed *pmoA* arvukuse ja O_2 ja CH_4 kontsentratsioonide vahel. *PmoA* proportsiooni prokarüootide koosluses oli seotud proovi sügavuse ning pinnase EC, N ja C/N väärtustega ning O_2 ja CH_4 osakaaludega prügilagaasis (tabel 6).

3.5.3. Koosluse struktuur

16S rRNA geeni järjestuste analüüs tuvastas uuritud prügila metaanilagunduskattes 0,68% bakterite järjestustest, mis kuulusid 44 erinevasse aeroobset metaani oksüdatsiooni läbiviivasse bakterite perekonda. Kümme nendest perekondadest moodustasid ligi 60% kogu metanotroofide järjestustest. Tuvastatud metanotroofid kuulusid klassidesse

Gammaproteobacteria ja *Alphaproteobacteria*. Enamus esinenud perekondadest liigitusid seltsi *Methylococcales* (tabel 7).

Tabel 7. Kudjape kaetud prügila katepinnasest tuvastatud 10 domineeriva metaani oksüdeerivate bakterite perekonna fülogeneetiline kuuluvus ja järjestuste proportsioonid (sulgudes % kogu bakterite järjestustest).

Hõim- kond	Klass	Selts	Sugukond	Perekond	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Methylococcales</i>	<i>Methylomonaceae</i>	Klassifitseerimata (0,15)	
				<i>Methylomicrobium</i> (0,01)	
				<i>Crenothrix</i> (0,07)	
			<i>Methylobacter</i> (0,05)		
			<i>Methylococcaceae</i>	<i>Methylocaldum</i> (0,03)	
				<i>Methylcoccus</i> (0,02)	
	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>		<i>Methylocystaceae</i>	<i>Methylocystis</i> (0,02)
				<i>Beijernickaceae</i>	<i>Methylocapsa</i> (0,01)
		<i>Methylophilales</i>	<i>Methylophilaceae</i>		Klassifitseerimata (0,03)
					Klassifitseerimata (0,01)

4. Arutelu

Suletud prügilad on antropogeensed maastikuelemendid ja keerulised ökosüsteemid, kus vaid keskkonnaparameetrite muutuste uurimine ei anna kogu infot metaani tootmise ja tarbimise kohta. Prügilagaasi tootmise ja emiteerumise võimalikult heaks mõistmiseks ja täpsemaks kirjeldamiseks eri tüüpi prügilates soovitatakse selliste ökosüsteemide uurimisel siduda keskkonningimused geeniparameetritega (Bridham, *et al.*, 2013).

Metaani tootmise ja oksüdatsiooni potentsiaali uurimiseks keskkonnaproovides on tänapäeval kasutusel DNA-põhised meetodid. Üheks nendest on qPCR, mis võimaldab hinnata funktsionaalsete mikroobirühmade arvukusi keskkonnas (Costello ja Lindstorm, 1999; Ettwig, *et al.*, 2010; Chang, *et al.*, 2010). Usaldusväärsete tulemuste saamiseks peab kasutatavate praimerite sobivus olema kontrollitud ning qPCR-i reaktsioonitingimused optimaalsed (Nõlvak, *et al.*, 2012). Käesolevas magistritöös optimeeriti metanotroofide detekteerimiseks kasutatavete *pmoA* praimerite kontsentratsioon reaktsioonisegus ning qPCR programm selleks, et adekvaatsemalt hinnata metaani oksüdeerumise geneetilist potentsiaali metaanilagunduskattes. Teiste geenide määramiseks kasutatud protokollid olid varem optimeeritud (Espenberg, *et al.* 2016).

Käesoleva uurimuse objektiks oli Kudjape suletud prügila metaanilagunduskate, mis on valmistatud sama prügila läbikaevamisel sõelutud materjalist (Kriipsalu, *et al.* 2016; Burlakovs, *et al.*, 2017). Prügila sulgemise etapis, kui kattepinna ei olnud veel stabiliseerunud, teostatud uuringu tulemused näitasid, et prügila kattekiht sisaldas raskmetalle (arseen, kaadium, kroom, nikkel, plii, tsink, vask, elavhõbe), mille kontsentratsioon jäi alla määratud piirnormide (Pehme, 2013) ning üldorgaanilise aine sisaldus oli alla soovitusliku normi (>8% , Humer 2001). Käesoleva uurimuse käigus tehtud prügilakatte keemiliste analüüside tulemused näitasid, et prügila katte materjal oli kogu profiili ulatuses aluseline, kuid keemiline koostis erines suuresti fosfori sisalduse ja C/N suhte poolest metaanilagunduskihi ja gaasijaotuskihi vahel. MOK kihis oli C/N suhe enamasti (va ülemine 10 cm kiht) ligi kaks korda suurem ja C/P suhe tunduvalt (kuni 33 korda) väiksem kui on näidatud looduslikes muldades keskmiselt (Mooshammer, *et al.*, 2014).

In situ gaasimõõtmiste tulemused näitasid, et hapniku osakaal pinnases vähenes kiiresti kattekihi sügavuse suurenedes samal ajal kui CO₂ sisaldus oli suhteliselt stabiilne. CH₄

osakaal vähenes 180 cm sügavuselt pinnapoole liikudes oluliselt. Mõõtmistulemused näitasid ka, et proovivõtupunktide gaaside sisalduse vahel oli suur erinevus pinnaseproovide kogumise päeval. Gaaside kontsentratsioonid prügilakattes ja prügilademe ülemises kihis on mõõdetud Kudjapel alates 2013. aasta juunist (Pehme, 2013). Need andmed kinnitavad antud töös saadud tulemusi ning lisaks näitavad, et metaani osakaal on aja jooksul K1-e gaaside segus vähenenud. Ka laboriskaalas katseseadmetes, mille sügavus oli 60 cm, olid trendid gaaside osakaaludes sarnased - hapnikku oli rohkem profiili ülaosas ning metaani hulk vähenes profiilis alt üles liikudes (Stralis-Pavese, *et al.*, 2006).

Mikrobioloogiliste analüüside tulemused näitasid, et Kudjape prügila kattekihi mikroobikoosluses olid ülekaalus bakterid ja arhede osakaal oli seal väike. Ehkki metanogeenide arhesid leidis praktiliselt kõikides uuritud MOK-i kihtides ja GJK-s, oli oodatult kõige suurem metaani tootmise potentsiaal prügilademes, kus nii *mcrA* arvukus kui ka proportsioon prokarüootide koosluses olid kõrgeimad. Metaani kõige suurem osakaal prügilagaasis MOK-i kõige sügavamas kihis oli ilmselt tingitud GJK-i lähedusest, kuhu prügilademes toodetud CH₄ võis koguneda. Arhede 16S rRNA geeni järjestuste analüüs näitas, et kõige arvukamalt oli uuritud alal klassi *Methanomicrobia* esindajad. Selle klassi esindajad *Methanomicrobiales* redutseerivad CO₂-e ja metüleeritud ühesüsinikulisi ühendeid ja kasutavad H₂ elektroni doonorina (Nazaries, *et al.*, 2013). Teisel uuritud alal on tuvastatud selle klassi (*Methanosarcinales*) esindajad on metaboolselt kõige mitmekülgsemad metanogeenid kes on võimelised tarbima peaaegu kõiki süsinikuallikaid (Knief, 2015, Dean, *et al.* 2018).

PmoA arvukuse ja proportsiooni analüüsi tulemused näitasid, et metaani oksüdeerimise potentsiaal oli kõrge nii MOK-i ülaosas kui GJK-s. Saadud arvukused olid kõrgemad, kui troopilistes aluselise pH-ga prügilakatetes, kus 20-40 cm sügavusele jäävas kihis *pmoA* arvukus kõikis aasta jooksul $1,25 \cdot 10^3$ - $1,93 \cdot 10^6$ koopiat/g KA vahel (Chang, *et al.*, 2010). Kudjapele sarnaseid, kõrgeid, tulemusi on saadud Kanadas St-Nicephore prügila metaanioksidatsioonikihis, kus metanotroofide arvukus kattekihi ülemises osas oli $1,5 \cdot 10^9$ koopiat/g KA (Ait-Benichou, *et al.*, 2009) ja Saksamaal, kus testitud prügila savigraanulitest metaanioksidatsioonikihis oli metanotroofide arvukus vahemikus $1,3 \cdot 10^8$ - $7,1 \cdot 10^9$ koopiat/g KA (Gebert, *et al.*, 2003). Ehkki kõrgeimaid metaani oksüdeerimise efektiivsusi on saadud eksperimentaalsete kattepinna ülemises 10 cm-s (Bian, *et al.*, 2018; Ait-Benichou, *et al.*, 2009), oli *pmoA* geenide arvukus Kudjape ülemises (0-10 cm) pinnasekihis tunduvalt väiksem kui sellest allpool 20-55 cm kihis. Gaasimõõtmise tulemused näitasid, et

metaani osakaal vähenes oluliselt sügavusprofiilis ülespoole liikudes, kus tingimused muutusid aeroobsemaks. Aktiivset metaani oksüdatsiooni GJK-s ja selle ümbruses tõestavad metanotroofide suur arvukuse kasv, hapniku tarbimine ning CO₂-e sisalduse tõus prügilagaasis. Sellesse kihti jõuab prügilademest ka kõige suurem hulk metaani. Üllatuslikult oli metanotroofide arvukus suur ka prügilademe ülemises kihis, mille gaaside segus mõõdeti rohkem hapnikku kui GJK-s.

Statistilise analüüsi tulemused näitasid, et prügila katte füüsikalised-keemilised omadused mõjutasid oluliselt metaani tootvate ja oksüdeerivate mikroobide arvukust uuritud keskkonnas. Mitmed varasemad uurimused on näidanud olulist seost nii bakterite kui arhede arvukuse ja proportsiooni ning prügila katte paksuse vahel (Abushammala, *et al.*, 2014; Einola, *et al.*, 2007). Lisaks on näidatud, et vaid 5 cm lisamisel kattepinna tüsedusele on võimalik tõsta metaani oksüdatsiooni taset 6% (Albanna, *et al.*, 2007). Prügilakattega, mille GJK-i paksus oli 30-50 cm ning selle peal oleva CH₄ oksüdatsioonikihi paksus oli 1,2 m on suudetud lagundada 95% - 99% tekkinud metaanist (Huber-Humer, *et al.*, 2009). Uuringud on näidanud, et kattepinna orgaaniline osa on kõige olulisem metaani oksüdeerimist mõjutav keskkonnafaktor ning et kõrgema orgaanilise aine sisaldusega kattes on metaani oksüdeerimise aktiivsus kõrgem (Majdinasab ja Yuan, 2017). C/N suhe oli antud uurimistöös oluliselt seotud metaani osakaaluga metaanilagunduskattes. See näitaja iseloomustab orgaanilise aine kvaliteeti ning on üheks oluliseks mulla viljakuse näitajaks (Ostonen, *et al.*, 2017). Andmeanalüüs näitas ka, et nii prokarüootide arvukused ja proportsioonid kui ka CO₂ osakaal prügilagaasis olid oluliselt seotud pinna elektrijuhtivusega. See on kompleksne näitaja, mis iseloomustab mulla tekstuuri, kationide vahetusmahutuvust, dreneažitingimusi, orgaanilise materjali osakaalu, soolade sisaldust ning uuritud pinna omadusi (Grisso, *et al.*, 2009). Ka Bian, *et al.* (2018) on näidanud, et efektiivseks metaani oksüdeerumiseks on olulised kattepinna poorisuurus ning õhuga täidetud pooride hulk kattepinna sügavamates kihtides. Gerbert, *et al.*, (2011) näitas, et metaan, mida toodeti 4g m⁻²h⁻¹, oksüdeerit täielikult kui kattematerjali puistetihedus oli katsekehas 1,35 g/cm³.

Kudjape prügila kattekihist leiti ainult aeroobsete metanogeenide perekondade esindajaid, millest arvukamad (klassist *Gammaproteobacteria*) kuulusid nn I metanogeenide tüüpi. Need organismid kasutavad metaani nii süsiniku- kui energiaallikana (Knief, 2015).

Magistritöö tulemustest võib järeldada, et ehkki metaani tootvaid arhesid leiti peaaegu kogu metaanilagunduskihi ulatuses, oli nende organismide arvukus tunduvalt madalam

prügilademe metanogeenide arvukusest. Metaani oksüdeerivate bakterite arvukus oli sarnane teiste prügilakatetes läbiviidud uuringutes leituga ja nende organismide arvukust mõjutasid kattepinnase kuivaine sisaldus, elektrijuhtivus, lämmastiku sisaldus ning süsiniku ja lämmastiku suhe pinnases. Metanotroofide proportsioon katte mikroobikoosluses sõltus ka prügila kattepinnase paksusest.

Saadud tulemused annavad infot prügila kattepinnase mikroobikoosluse potentsiaalset toota ja tarbida metaani. Selleks, et hinnata tegelikku metanogeenide ja metanotroofide aktiivsust, tuleks edaspidistes uuringutes analüüsida ka geenide ekspressiooni RNA-l põhinevate meetoditega. Põhjalikumalt tuleks uurida ka kogu mikroobikoosluse struktuuri, selle seost metaani tootmise ja oksüdatsiooniga metaanilagunduskatte erinevatel sügavustel. Andmete paremaks mõistmiseks tuleks analüüsi korrata, et näha muutusi ajalises skaalas. Oluline oleks uurida ka prügilakattest emiteeruva metaani koguseid (näiteks kambri meetodil).

Kokkuvõte

Inimeste keskkonnateadlikkus on aja jooksul üha paranenud ning jäätmehierarhias väljatoodud põhimõtteid rakendatakse üha enam. Kasutatud toodete jäätmeteks muutumist vähendatakse ümbertöötlemise ja taaskasutamise ning kõige olulisem, jäätmetekke vältimine on põhimõtte paljude ettevõtete keskkonnapoliitikas. Sellele vaatamata jõuab osa jäätmeid prügilatesse ning aegade jooksul on prügilaid tekkinud väga palju. Prügilate kasutamine on siiski vähenenud ning paljud prügilad on suletud tänu rangematele keskkonnanõuetele. Suletud prügilad ei ole lõplikult isoleeritud neid ümbritsevast keskkonnast, igal ajahetkel toimuvad prügilates erinevad protsessid, mis toovad endaga kaasa muutusi nii prügila sees kui ka sellest väljaspool. Üheks olulisemaks väljakutseks suletud prügilates on prügilademes tekkiva metaani hulga vähendamine prügilagaasis. Prügilagaas tekib mikroorganismide metabolismi käigus ning metanogeensed arhed on organismid, kes toodavad prügilagaasi ühte komponenti - kasvuhooneefekti tekitavat metaani. Üheks võimaluseks vähendada metaani emissiooni suletud prügilatest on katta prügilade metaanilagunduskattega.

Antud magistritöös uuriti metaani tootmise ja – oksüdeerimise geneetilist potentsiaali ning selle potentsiaali seost gaaside sisaldusega prügilagaasis ning katematerjali füüsikaliskemiliste omadustega Kudjape suletud prügila metaanilagunduskattes. Uurimistöös kasutati kvantitatiivset PCR meetodit bakterite ja arhede spetsiifiliste 16S rRNA geenide ning *mcrA* geeni metanogeensete arhede ja *pmoA* geeni metaani oksüdeerivate bakterite arvukuse ja proportsiooni (prokarüootide koosluses) hindamisel. Lisaks analüüsiti metanogeenide ja metanotroofide koosluse struktuuri bakterite ja arhede spetsiifiliste 16S rRNA geenide järjestuste alusel. Võimalikult täpsete *pmoA* arvukuste saamiseks optimeeriti ka vastav qPCR programm ja praimerite kontsentratsioonid. Töö tulemustest selgus, et kuigi metanogeene leidis kogu metaanilagunduskihi ulatuses, oli nende arvukus siiski tunduvalt madalam prügilademe vastavatest arvukustest. Tuvastatud metanogeenidest olid domineerivad klassi *Methanomicrobia* (hõimkonda *Euryarheota*) kahe seltsi *Methanomicrobiales* ja *Methanosarcinales* esindajaid, aga leiti ka klass *Methanobacteria* esindajaid. Metanotroofide arvukus oli samas suurusjärgus mitmete teiste varem uuritud prügilakatetega. Prügila kattest leiti vaid aeroobseid metaani oksüdeerivaid organisme. Metanotroofe leiti 44 perekonnast, 10 nendest perekondadest moodustasid ligi 60% kogu metanotroofide järjestusest, kõige arvukamad (klassist *Gammaproteobacteria*) kuulusid nn

I metanogeenide tüüpi, kes kasutavad metaani süsiniku ja energia allikana. Kõige rohkem metanotroofe leidis gaasijaotuskihis ning prügilakatte ülemistes kihtides, kus oli neile piisavalt substraati ning sobivad elutingimused.

Statistilise analüüsi tulemused näitasid, et metaanilagunduskatte füüsikalise-keemilised omadused sealhulgas kattematerjali veesisaldus ja orgaanilise aine kvaliteet mõjutasid oluliselt mikroorganismide arvukust ning seeläbi metaani tootmise ja oksüdeerimise potentsiaali uuritud prügila kattekihis.

Summary

The environmental awareness of people has increased and the principles of waste hierarchy are being applied more and more. The recycling and reusing of used goods will reduce the amount of waste produced. Moreover, avoiding the waste production completely is now an environmental policy for many companies. Nonetheless, some of the waste will eventually be dumped in to landfills, and there have been a lot of landfills over time. However, the use of landfills has decreased, and many landfills are closed due to more strict environmental requirements. For example, closed landfills are not permanently isolated from the surrounding environment, and over time, there are different processes in landfills that cause changes both inside and outside of the landfill. One of the big challenges related to closed landfills is to decrease emission of methane in landfill gas. Landfill gas develops during the metabolism of microorganisms, and methanogenic archaea are the organisms that produce a landfill gas component called methane, which has high greenhouse effect causing properties. One option to decrease methane emission is to cover closed landfills with a methane oxidation cover.

In this study, an assessment was conducted to determine the genetic potential of methane production and oxidation and their correlations with physical-chemical properties in a methane oxidation cover of the enclosed Kudjape landfill in Saaremaa County, Estonia. In this study, the qPCR method was used to assess abundance and proportion of bacterial and archeal 16S rRNA genes and *mcrA* for methanogenetic archaea and *pmoA* for methane oxidizing bacteria in prokaryotic community. In addition, the methanogenes and methanotrophs community structure was investigated using bacterial and archeal specific 16S rRNA gene sequence. In order to obtain comprehensive methanotrophs abundance data the qPCR program for *pmoA* amplifications were optimized. The results revealed that although there were methanogenic organisms present in all layers of studied landfill cover, the highest abundance of methanogenes were in the waste layer. From the identified methanogens, the most dominating were from order *Methanomicrobia* (phylum *Euryarcheota*) families. *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, and *Methanobacteria* representatives were also found. Only aerobic methane oxidizing bacteria were detected in the studied landfill cover. The study found representatives from 44 different genera that included ten dominating genera (more than 60% of the sequences of methanogenes). The most dominant genera belonged to the class *Gammaproteobacteria*, and it represented one

type of methanogenes known to use methane as a carbon and energy source. The highest abundance and proportion of methane oxidating organisms were found in the gas dividing layer and in the waste layer where they have the most substrate.

Statistical analysis showed that the potential for production and oxidation of methane in the Kudjape enclosed landfill coating was related to the physical-chemical properties of the landfill cover material including water content and organic matter quality.

Tänuavaldused

Soovin tänada kõiki, kes töö valmimisele kaasa aitasid.

Uurimistööd rahastati Haridus- ja Teadusministeeriumi rahastatud Eesti Maaülikooli teadusteemast „Ringmajanduse põhimõtete rakendamine prügilaisse ladestatud ressursi kasutuselevõtuks materjali ja energiana ning stabiliseeritud peenfraktsiooni kasutamine kasvuhoonegaase lagundava kattekihi moodustamiseks“ ning COST Action programmist CA15115 Mining the European Anthroposphere (MINEA).

Eriline tänu juhendajatele Marika Truule ja Hiie Nõlvakule. Lisaks soovin tänada prof. Jaak Truud, prof. Mait Kriipsalu, dr Kaja Orupõldu, Kaur-Mikk Pehmet, Kristjan Oopkaupi, Mikk Espenbergi ja Teele Ligi. Töö ei oleks valminud ilma Agape Kohviku toetavale kollektiivile ning Aaron Meresmaa, Keit Killi, Hanna Vahteri ja Laurina Šinkejeva toetuseta.

Kasutatud kirjandus

- Abichou, T., Mahieu, K., Yuan, L., Chanton, J., & Hater, G. (2009). Effects of compost biocovers on gas flow and methane oxidation in a landfill cover. *Waste Management* Vol. 29(5): 1595-1601
- Abushammala, M., Basiri, N., Irwan, D., & Younes, M. (2014). Methane Oxidation in Landfill Cover Soils: A Review. *Asian Journal of Atmospheric Environment* Vol. 8:1-14
- Ait-Benichou, S., Jugnia, L.-B., Greer, C., & Cabral, A. (2009). Methanotrophs and methanotrophic activity in engineered landfill biocovers. *Waste Management* Vol. 29(9): 2509-2517
- Albanna, M., Fernandes, L., & Warith, M. (2007). Methane oxidation in landfill cover soil; the combined effects of moisture content, nutrient addition, and cover thickness. *Journal of Environmental Engineering and Science* Vol. 6: 191-200
- AlSayed, A., Fergala, A., Khattan, S., & Eldyasti, A. (2018). Kinetics of type I methanotrophs mixed culture enriched from waste activated sludge. *Biochemical Engineering Journal* Vol. 132: 60-67
- Bhatnagar, A., Kaczala, F., Burlakovs, J., Kriipsalu, M., Hogland, M., & Hogland, W. (2017). Hunting for valuables from landfills and assessing their market opportunities A case study with Kudjape landfill in Estonia. *Waste Management & Research*, Vol 35(6): 627-635
- Bian, R., Xin, D., & Chai, X. (2018). A Simulation model for estimating methane oxidation and emission from landfill cover soils. *Waste Management* in Press
- Bogner, J., & Matthews, E. (2003). Global methane emissions from landfills: new methodology and annual estimates 1980-1996. *Global Biogeochemical Cycles* Vol. 17: 1-34
- Bogon, H., & Kühle-Weidemeier, M. (2008). Wirksamkeit von Methanoxidationsschichten auf Deponien. Praxistage Deponie. *Veröffentlicht in Taugungsband* lk 1-25
- Bridham, S., Cadillo-Quiroz, H., Keller, J., & Zhuang, Q. (2013). Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Global Change Biology* Vol. 19: 1325-1346
- Brochier-Armanet, C., Forterre, P., & Gribaldo, S. (2011). Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Current Opinion Microbiology* Vol.14(3): 274-81
- Burlakovs, J; Kriipsalu, M; Klavins, M; Bhatnagar, A; Vincevica-Gaile, Z; Stenis, J; Jani, Y; Mykhaylenko, V; Denafas, G; Turkadze, T; Hogland, M; Rudovica, V; Kaczala, F; Moller Rosendal, R; Hogland, W. (2017). Paradigms on landfill mining: From dump site scavenging to ecosystem services revitalization. *Resources, Conservation and Recycling* Vol. 123: 73-84
- Caisis, P.; Sabine, C.; Bala, G.; Bopp, L.; Brovkin, V.; Canadell, J.; Chhabra, A.; DeFries, R.; Galloway, J.; Heimann, M.; Jones, C.; Le Quere, C.; Myneni, R.; Piao, S.; Thornton, P. (2013). Carbon and other biochemical cycles. *Cambridge University*
- Chang, C.-Y., Tung, H.-H., Tseng, I.-C., Wu, J.-H., Liu, Y.-F., & Lin, H.-M. (2010). Dynamics of methanotrophic communities in tropical alkaline landfill upland soil. *Applied Soil Ecology* Vol. 46: 192-199

- Cheremisnoff, N. P. (2003). Handbook of Solid Waste Management and Waste Minimization Technologies. lk 101
- Chiemchaisri, C., & Chiemchaisri, W. (2004). Effects of vegetation and leachate recirculation on methane oxidation in landfill cover soil. *Environmental Engineering Department, Faculty of Engineering, Kasetsart University, Thailand*
- Costello, A. M., & Lindstorm, M. E. (1999). Molecular Characterization of Functional and Phylogenetic Genes from Natural Populations of Methanotrophs in Lake Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* lk 5066-5074
- Dalsoren, S.B.; Myhre, C.L.; Myhre, G.; Gomez-Pelaez, A.; Sovde, O.A.; Isaksen, I.S.A.; Weiss, R.F.; Harth, C.M. (2016). Atmospheric methane evolution the last 40 years. *Atmospheric Chemistry and Physics* Vol. 16: 3099-3126
- Dean, J.F.; Middelburg, J.J; Röckmann, T; Aerts, R; Blauw, L.G.; Egger, m; Jetten, M.S.M.; de Jong, A.E.E; Meisel, O.H.; Rasigraf, O; Slomp, C.P.; Zandt, M; Dolman, A.J. (2017). Methane Feedbacks to the Global Climate System in a Warmer World. *Reviews of Geophysics* Vol. 56
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sorgin, M., & Relman, D. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLOS Biology*, Vol. 6:280
- EEA, (09 2014. a.). Annual European Union Greenhouse Gas Inventory 1990-2012 and inventory report 2014. *Technical Report*
- Einola, J., Karhu, A., & Rintala, J. (2008). Mechanically–biologically treated municipal solid waste as a support medium for microbial methane oxidation to mitigate landfill greenhouse emissions. *Waste Management* Vol. 28(1): 97-111
- Einola, J.-K., Kettunen, R., & Rintala, J. (2007). Responses of methane oxidation to temperature and water content in cover soil of a boreal landfill. *Soil Biology and Biochemistry* Vol. 39: 1156-1164
- EMTAK. (23. 03 2018. a.). *Jäätmeteke jäätmeliigi ja tegevusala (EMTAK 2008) järgi*. Allikas: <http://andmebaas.stat.ee/Index.aspx?lang=et&DataSetCode=KK068>
- ENVIR. (12. 06 2014. a.). *Olemasoleva jäätmekäitluse kirjeldus*. Allikas: http://www.envir.ee/sites/default/files/jaatmekaitluse_hetkeolukord.pdf
- Espenberg M. (2016) Päiderooga kultiveerimise ja väetamise mõju mulla arhede kooslusele ja selle metaanitootmise potentsiaalile mahajäetud freesturba tootmisalal. Tartu Ülikool Magistritöö
- EPA. (2016). Landfill Gas Energy Project Development Handbook. Landfill Methane Outreach Program (LMOP)
- Ettwig, K.F., Alen, V.T., Pas-Schoonen van de T.K., Jetten, M.S.M, Strous, M. (2009) Enrichment and Molecular Detection of Denitrifying Methanotrophic Bacteria of the NC10 Phylum. *Applied and Environmental Microbiology* Vol 75(11): 3656-3662
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Sutilh, B.E., Zedelius, J., Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H.J.C.T., Alen, T., Luesken, F., Wu, M.L., van de Pas-Schoonen, K.T., Op Den Camp, H.J.M., Janssen-Megens, E.M., Francoijs, K-J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M.S.M., Strous., M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* Vol. 464: 543-548

- Eurostat. (23. 03 2018. a.). *Jäätmestatistika*. Allikas: Eurostat Statistics Explained: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Waste_statistics/et
- Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2008/98/EÜ, 19. november 2008, mis käsitleb jäätmeid ja millega tunnistatakse kehtetuks teatud direktiivid (EMPs kohaldatav tekst). *Euroopa Liidu Teataja L312/3*
- Fang, J., Sun, P.D., Xu, S.J., Luo, T., Luo, J.Q., Han, J.Y., Song, Y.Q. (2012) Impact of Cr(VI) on P removal performance in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) system based on the anaerobic and aerobic metabolism. *Bioresource Tehnology* Vol 121: 379-385
- Ferry, J. (2010). The chemical biology of methanogenesis. *Planetary and Space Science* Vol. 58: 1775-1783
- Gebert, J., Groengroeft, A., & Miehlich, G. (2003). Kinetics of microbial landfill methane oxidation in biofilters. *Waste Management*, Vol. 23: 609-619
- Gerbert, J., Groengroeft, A., & Pfeiffer, E. (2011). Relevance of soil physical properties for the microbial oxidation of methane in landfill covers. *Soil Biology and Biochemistry* Vol. 43 (9): 1759-1767
- Gracia, J.-L., Patel, B., & Ollivier, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Archeaea Anaerobe* Vol. 6: 205-226
- Grisso, R., Alley, M., Holshouser, D., & Thomason, W. (2009). Precision Farming Tools: Soil Electrical Conductivity. *Virginia Cooperative Extension*, lk 442-508
- Hogland, W., Hogland, M., & Marques, M. (2011). Enhanced landfill mining: material recovery, energy utilisation and economics in the EU (Directive) perspective. *in: Jones, P.; Tielemas, Y. International Academic Symposium on Enhanced Landfill Mining*, lk 233-247
- Hrad, M., Huber-Humer, M., Wimmer, B., & Reichenauer, T.-G. (2012). Design of top covers supporting aerobic in situ stabilization of old landfills – An experimental simulation in lysimeters. *Waste Management* Vol. 32(12): 2324-2335
- Huber-Humer, M. (2004). Abatement of landfill methane emissions by microbial oxidation in biocovers made of compost. *Doctoral Thesis at the University of Natural Resources and Applied Life Sciences. Vienna Institute of Waste Management*, lk 377
- Huber-Humer, M., Kjeldsen, P., Sopkas, K., Tintner, J., Böhm, K., & Lechner, P. (2011). Scrutinizing compost properties and their impact on methane oxidation efficiency. *Waste Management* Vol. 31: 871-883
- Huber-Humer, M., Röder, S., & Lechner, P. (2009). Approaches to assess biocover performance on landfills. *Waste Management* Vol 29 (7): 2092-2104
- Hui, C., Guo, X., Sun, P., Lin, H., Zhang, Q., Liang, Y., & Zhao, Y. (2017). Depth-specific distribution and diversity of nitrite-dependent anaerobic ammonium and methane-oxidizing bacteria in upland-cropping soil under different fertilizer treatments. *Applied Soil Ecology*, lk 117-126
- Humer, M. j. (2001). Design of a landfill cover layer to enhance methane oxidation results of a two year field investigation. *Proceedings Sardinia 2001, Eighth International Waste Management and Landfill Symposium*

- Hunger, S., Schmidt, O., Hilgarth, M., Horn, M., Kolb, S., Conrad, R., & Drake, H. (2011). Competing Formate- and Carbon Dioxide-Utilizing Prokaryotes in an Anoxic Methane-Emitting Fen Soil. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 77: 3773-3785
- IPCC, (2013). Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY*
- IPCC, Eds. Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (2007). Summary for policymakers. *Cambridge University Press. Cambridge: The Physical Science Basis*
- Juottonen, H., Galand, P., & Trjälä, K. (2006). Detection of methanogenic Archaea in peat: comparison of PCR primers targeting the mcrA gene. *Research in Microbiology* Vol. 157: 914-921)
- Karakurt, I., Aydin, G., & Aydiner, K. (2012). Sources and mitigation of methane emissions by sectors: A critical review. *Renewable Energy* Vol. 39: 40-48
- Knief, C. (2015). Diversity and Habitat Preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. *Frontiers in Microbiology* Vol. 6: 1346
- Knittel, K., & Boetius, A. (2009). Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annual Review of Microbiology* Vol. 63: 311-334
- Kravchenko, I., & Sukhacheva, M. (2017). Methane oxidation and diversity of aerobic methanotrophs in forest and agricultural soddy-podzolic soils. *Applied Soil Ecology* Vol. 119: 267-274
- Kriipsalu, M., Maastik, A., & Truu, J. (2016). Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamise. Tallinn: Tallinna Tehnikaülikooli Kirjastus
- Le Mer, J., & Roger, P. (2001). Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology* Vol. 37 (1); 25-50
- Lee, U., Han, J., & Wang, M. (2017). Evaluation of landfill gas emissions from municipal solid waste landfills for the life-cycle analysis of waste-to-energy pathways. *Journal of Cleaner Production* Vol. 166: 335-342
- Liu, Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F., & Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35(18), e120
- Lohila, Laurila, T., Tuovinen, J.-P., Aurela, M., Hatakka, J., & Laurila, T. (2007). Micrometeorological Measurements of Methane and Carbon Dioxide Fluxes at a Municipal Landfill. *Environmental Science & Technology*, lk 2717-2722
- Maaamet 2018, <https://geoportaal.maaamet.ee/> (*Viimati külastatud 31.05.2018*)
- Maanoja, S., & Rintala, J. (2015). Methane oxidation potential of boreal landfill cover materials: The governing factors and enhancement by nutrient manipulation. *Waste Management* Vol. 46: 399-407
- Majdinasab, A., & Yuan, Q. (2017). Performance of the biotic systems for reducing methane emissions from landfill sites: A review. *Ecological Engineering* Vol. 104:116-130

www.mothur.org (*Viimati külastatud 30.05.2018*)

- Mooshammer, M., Wanek, W., Zechmeister-Boltenstern, S., & Richter, A. (2014). Stoichiometric imbalances between terrestrial decomposer communities and their resources: mechanisms and implications of microbial adaptations to their resources. *Frontiers in Microbiology* Vol. 5: 1-10
- Nagendran, R., Selvam, A., Joseph, K., & Chiemchaisri, C. (2006). Phytoremediation and rehabilitation of municipal solid waste landfills and dumpsites: A brief review. *Waste Management* Vol. 26(12): 1357-1369
- Narihiro, T., & Sekiguchi, Y. (2011). Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. *Microbial Biotechnology* Vol. 4: 585-602
- Nazaries, L., Murell, J., Millard, P., Baggs, L., & Singh, B. (2013). Methane, microbes and models: fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. *Environmental Microbiology* Vol. 15(9): 2395-2417
- Nõlvak, H., Truu, M., & Truu, J. (2012). Evaluation of quantitative real-time PCR workflow modifications on 16S rRNA and tetA gene quantification in environmental samples. *Science of the Total Environment* Vol. 426: 351-358
- Orb, E-L., Sai, K. (2015). Metaanilagunduskattega prügilä taimestiku tärkamine ja liigirikkus Kudjape prügilä näitel. (Uurimustöö). Aste Põhikool. Aste
- Ostonen, I., Truu, M., Helmisaari, H.S., Lukac, M., Borken, W., Vanguelova, E., Godbold, D.L., Lõhmus, K., Zang, U., Tedersoo, L., Preem, J.K., Rosensvald, K., Aosaar, J., Armolaitis, K., Frey, J., Kabral, N., Kukumägi, M., Leppälammil-Kujansuu, J., Lindroos, A.J., Merilä, P., Napa, Ü., Njöd, P., Parts, K., Uri, V., Varik, M., Truu, J. (2017) Adaptive root foraging strategies along a boreal-temperate forest gradient. *New Phytologist* Vol 215(3): 977-991
- Parada, A.E., Needham, D.M., Fuhrman, J.A. (2015) Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* Vol 18(5): 1403-1414
- Park, S., Lee, I., Cho, C., & Sung, K. (2008). Effects of earthworm cast and powdered activated carbon on methane removal capacity of landfill cover soils. *Chemosphere* Vol. 77(6): 1117-1123
- Pedersen, G., Scheutz, C., & Kjeldsen, P. (2011). Availability and properties of materials for the Fakse Landfill biocover. *Waste Management* Vol. 31(5): 884-894
- Pehme, K.-M. (2013). Kudjape prügilä metaanilagunduskihi keemiliste ja hüdrofüüsikaliste omaduste uuring. Eesti Maaülikool. *Magistritöö*
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F. O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* Vol. 35: 7188-7196
- Rachor, I., Gerbert, J., Gröngroft, A., & Pfeiffer, E. (2011). Assessment of the methane oxidation capacity of compacted soils intended for use as landfill cover materials. *Waste Management* 31(5): 833-842

- Rastogi, G., Ranade, D., Yeole, T., Gupta, A., Patole, M., & Shouche, Y. (2009). Novel methanotroph diversity evidenced by molecular characterization of particulate methane monooxygenase A genes in biogas reactor. *Microbiological Research* Vol. 164: 536-544
- Ratas, R. (2011). Kudjape prügila sulgemistööde käigus tehtava uuema ladestusala läbikaevamine ja jäätmete sorteerimine. *Keskkonnamõju hindamise programm*. Tallinn: AS Tallmac
- RT I 2004, 9. 52. Riigikogu seadus: Jäätmeseadus. *Hetkel kehtiv*
- RTL 2004, 56. 938. Keskkonnaministri määrus: Prügila rajamise, kasutamise ja sulgemise nõuded. *Hetkel kehtiv*
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Googaars, V.M., Karlen, Y., Bakker, O., van dan Hoff, M.J., Moorman, A.F. (2009) *Nucleic Acids Reseach* Vol 37(6): e45
- Scheutz, C., & Kjeldsen, P. Environmental factors influencing attenuation of methane and hydrochlorofluorocarbons in landfill cover soils. *Journal of Environmental Quality* Vol. 33(1): 72-79
- Scheutz, C., Ucendo, I., Pedersen, R., Mønster, J., Samuelsson, J., Jørgensen, J., & Kjeldsen, P. (2014). Mitigation of methane emission from an old unlined landfill in Klintholm, Denmark using a passive biocover system. *Waste Management*. Vol 34(7): 1179-1190
- Semrau, J., DiSpirato, A., & Yoon, S. (2010). Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiology Reviews* Vol. 34: 496-531
- Serrano-Silva, N., Sarria-Guzman, Y., Luna-Guido, M., & Dendooven, L. (2014). Methanogenesis and Methanotrophy in Soil: A Review. *Pedosphere* Vol. 24(3): 291-307
- SILVA andmebaas: <http://www.arb-silva.de/> (viimati külastatud 30.05.2018)
- Stralis-Pavese, N., Bodrossy, L., Reichenauer, T., Weiharther, A., & Sessitsch, A. (2006). 16S rRNA based T-RFLP analysis of methane oxidising bacteria—Assessment, critical evaluation of methodology performance and application for landfill site cover soils. *Applied Soil Ecology* Vol. 31: 251-266
- Tammjärv, K. (2015). Metaanilagunduskattekihi sobivus puude kasvuks Kudjape Prügilal hariliku kuuse ja euroopa lehise näitel. Tartu Maaülikool. *Bakalaureusetöö*
- Tchobanglous, G., & Kreith, F. (2002). Handbook of solid waste management (Kd. Second Edition). New York. lk 679-682: McGraw-Hill
- USEPA, U. S. (2012). Unventory of U.S. greenhouse gas Emissions and sinks: 1990-2010; Washington, DC. *EPA-430-R-12-001*
- Wang, J., Xia, F.-F., Bai, Y., Fang, C.-R., Shen, D.-S., & He, R. (2011). Methane oxidation in landfill waste biocover soil: Kinetics and sensitivity to ambient conditions. *Waste Management* Vol. 31(5): 864-870
- Wendlandt, K.-D., Stottmeister, U., Helm, J., Soltmann, B., Jechorek, M., & Beck, M. (2010). The potential of methane-oxidizing bacteria fot applications in envitonmental biotechnology. *Engineering in Life Sciences* Vol. 10: 87-102
- Xing, Z., Zhao, T., Gao, Y., He, Z., Zhang, L., Peng, X., & Song, L. (2017). Real-time monitoring of methane oxidation in a simulated landfill cover soil and MiSeq pyrosequencing analysis of the related bacterial community structure. *Waste Management* Vol. 68: 369-377

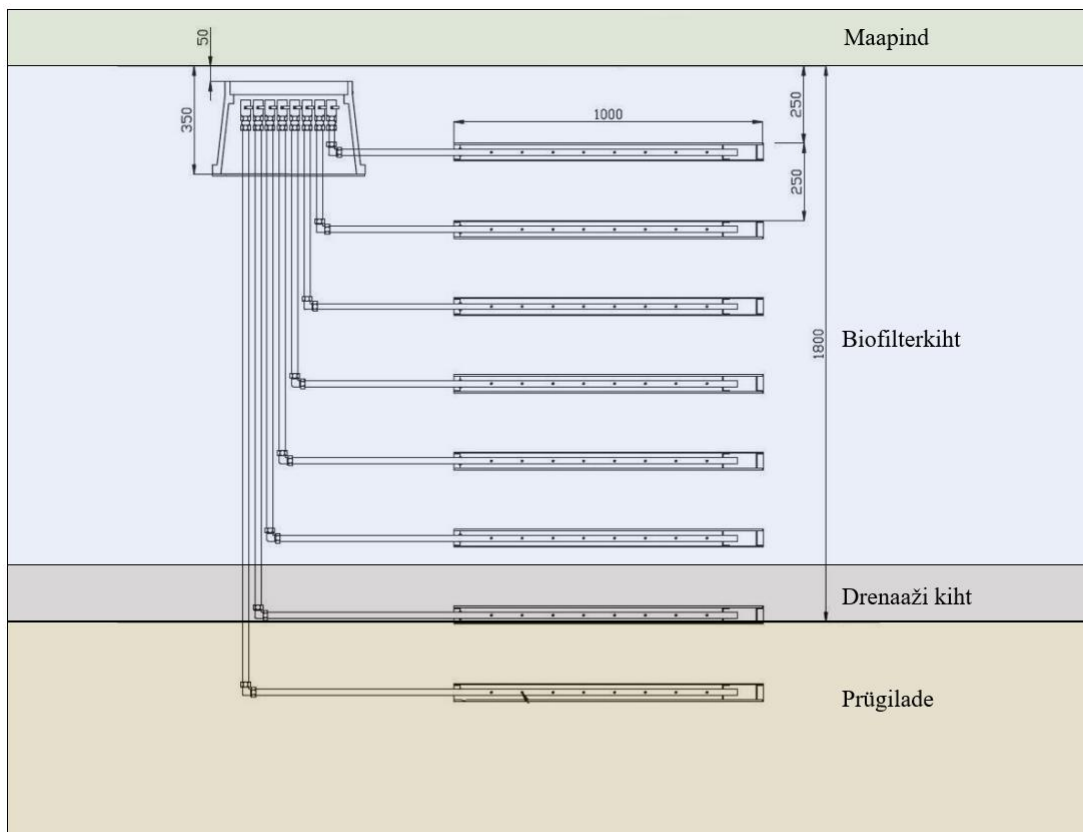
Xu, S., Lu, W., Muhammad, F., Liu, Y., Guo, H., Meng, R., & Wang, H. (2018). New molecular method to detect denitrifying anaerobic methane oxidation bacteria from different environmental niches. *Journal of Environmental Sciences* Vol. 65: 367-374

Lisad

Lisa



Joonis 1. Foto lahti kaevatud prügila metaanilagunduskattest. Pildil on näha statsionaarne gaasivõtukaev ning gaasikogumistorud pinnases



Joonis 2. Gaasiseiresüsteemi skeem

Lisa Tabel 1. Metaani, süsihappegaasi ja hapniku osakaalude keskvaartused (n=3) ja standardhälbed (sulgudes) Kudjape kaetud prügilala risosfääris, metaanilagunduskatte metaanioksidatsioonikihi eri sügavustes ja gaasijaotuskihis (GJK) ning prügilademe ülemises kihis.

Proovi tüüp	Kiht (cm)	CH₄ (%)	CO₂ (%)	O₂ (%)
Risos.	0-10	em	em	Em
Metaani oksüdatsioonikiht	0-10	9,00 (7,9)	9,57 (5,1)	10,80 (6,6)
	20-30	em	em	em
	45-55	15,63 (24,4)	17,53 (0,8)	0,40 (0,4)
	70-80	18,70 (22,7)	18,60 (0,6)	0,13 (0,1)
	95-105	20,47 (21,8)	19,10 (0,9)	0,10 (0,1)
	120-130	22,33 (21,4)	19,30 (0,9)	0,07 (0,06)
	145-155	22,73 (21,3)	19,20 (0,9)	0,07 (0,06)
	170-180	23,30 (21,3)	19,17 (0,8)	0,07 (0,06)
GJK	195-205	21,27 (22,0)	19,27 (0,9)	0,00 (0,0)
Prügilade	220-230	18,97 (21,7)	18,80 (0,8)	0,07 (0,06)

Lisa Tabel 2. Uuritud pinnaseproovide bakterite 16S rRNA geeni, arhede 16S rRNA geeni, *mcrA* geeni ning *pmoA* geeni arvukuse ning osakaalu keskvaartused (n = 9) ja sulgudes standardhälve. Geenikoopiate arv on esitatud grammi kuivaine kohta (GK/g KA) ja osakaal on antud protsendina (%) Kudjape kaetud prügila taimkatte risosfääris (Risos.), metaanilagunduskihi eri sügavustes, gaasijaotuskihis (GJK) ja prügilademe ülemises kihis (Prügi). Lühendid: LOQ - kvantifitseerimislävi; em – ei määratud.

Kiht	Sügavus	Bak 16S rRNA		Arch 16S rRNA		<i>McrA</i>		<i>PmoA</i>	
		Arvukus	Proportsioon	Arvukus	Proportsioon	Arvukus	Proportsioon	Arvukus	Proportsioon
Risos.	0-10	4,19*10 ⁹ (9,23*10 ⁸)	99,02 (0,3)	4,25*10 ⁷ (2,08*10 ⁷)	0,98 (0,3)	<LOQ	em	2,72*10 ⁷ (3,29*10 ⁷)	0,56 (0,6)
Metaani oksüdatsioonikiht	0-10	2,81*10 ⁹ (6,59*10 ⁸)	99,46 (0,5)	1,76*10 ⁷ (1,98*10 ⁷)	0,54 (0,5)	3,81*10 ⁵	0,01	2,78*10 ⁷ (3,43*10 ⁷)	0,84 (0,9)
	20-30	6,07*10 ⁹ (2,70*10 ⁹)	98,14 (1,2)	9,32*10 ⁷ (1,76*10 ⁷)	1,86 (1,2)	8,25*10 ⁶ (1,27*10 ⁷)	0,13 (0,2)	1,06*10 ⁸ (8,30*10 ⁷)	2,52 (2,9)
	45-55	1,05*10 ¹⁰ (3,06*10 ⁹)	96,79 (0,5)	3,37*10 ⁸ (4,44*10 ⁷)	3,21 (0,5)	1,02*10 ⁷ (9,60*10 ⁶)	0,11 (0,1)	1,29*10 ⁸ (1,72*10 ⁸)	1,24 (1,6)
	70-80	9,90*10 ⁹ (4,73*10 ⁹)	95,03 (1,6)	4,92*10 ⁸ (1,83*10 ⁸)	4,97 (1,6)	1,28*10 ⁷ (1,11*10 ⁷)	0,11 (0,1)	3,22*10 ⁷ (3,80*10 ⁷)	0,46 (0,7)
	95-105	1,24*10 ¹⁰ (1,77*10 ⁹)	93,30 (1,1)	8,83*10 ⁸ (1,73*10 ⁸)	6,70 (1,1)	2,01*10 ⁷ (1,05*10 ⁷)	0,16 (0,1)	6,40*10 ⁷ (1,05*10 ⁸)	0,47 (0,8)
	120-130	1,08*10 ¹⁰ (1,44*10 ⁹)	88,87 (5,8)	1,42*10 ⁹ (9,63*10 ⁸)	11,13 (5,8)	1,40*10 ⁷ (8,22*10 ⁶)	0,12 (0,1)	2,65*10 ⁷ (3,74*10 ⁷)	0,19 (0,3)
	145-155	1,04*10 ¹⁰ (4,11*10 ⁸)	93,55 (1,0)	7,14*10 ⁸ (1,02*10 ⁸)	6,45 (1,0)	1,59*10 ⁷ (8,64*10 ⁶)	0,15 (0,1)	3,34*10 ⁷ (5,35*10 ⁷)	0,29 (0,5)
	170-180	1,09*10 ¹⁰ (7,84*10 ⁹)	94,75 (1,8)	5,08*10 ⁸ (2,30*10 ⁸)	5,25 (1,8)	8,87*10 ⁶ (8,52*10 ⁶)	0,10 (0,1)	1,12*10 ⁸ (1,89*10 ⁸)	0,58 (0,9)
	GJK	195-205	4,93*10 ⁹ (5,69*10 ⁹)	94,28 (3,7)	1,51*10 ⁸ (2,53*10 ⁷)	5,72 (3,7)	1,45*10 ⁶ (6,23*10 ⁵)	0,06 (0,1)	2,93*10 ⁸ (4,12*10 ⁸)
Prügi lade	220-230	9,99*10 ⁹ (3,24*10 ⁹)	95,76 (1,6)	4,11*10 ⁸ (1,06*10 ⁸)	4,24 (1,6)	3,87*10 ⁷ (4,42*10 ⁷)	0,51 (0,7)	1,90*10 ⁸ (2,59*10 ⁸)	1,44 (1,9)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Krista Kupits (sünnikuupäev: 28.08.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Mikroobikoosluse struktuur ja metaani oksüdeerimise potentsiaal Kudjape suletud prügila metaanilagunduskattes“, mille juhendajad on vanemteadur Marika Truu ja teadur Hiie Nõlvak,
 - 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 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, 01.06.2018