

Tartu Ülikool  
Loodus- ja täppisteaduste valdkond  
Ökoloogia ja maateaduste instituut  
Geograafia osakond

Magistritöö keskkonnatehnoloogias (30 EAP)

**Elektroonikaromude bioleostumise protsesside uurimine**

Kady Mäesalu

Juhendaja PhD Anne Menert

Kaitsmisele lubatud:  
Juhendaja  
Osakonnajuhataja

Tartu 2021

# Infoleht

## **Elektroonikaromude bioleostumise protsesside uurimine**

Tänapäeva arenenud ühiskond on kaasa toonud hulgaliselt elektri- ja elektroonikaseadmete jäätmeid. E-jäätmetega seotud regulatsioonid muutuvad aina karmimaks ning pooldatakse tehnoloogiaid, mis hõlmavad metallide taaskasutamist ja ringlussevõttu. Metallide taastamiseks e-jäätmetest kasutatakse erinevaid tehnoloogiaid: püro-, hüdro- ja biohüdro metallurgiat. Käesoleva töö eesmärk on uurida purustatud elektroonikaromude kaheastmelist metallide bioleostumise protsesse ning määrata mikroorganismide arvukus anaeroobses ja aeroobses protsessis. Samuti on eesmärgiks uurida, millised väärtuslikud metallid leostusid protsessidest välja.

### **Töö teadusala CERCS kood:**

B320- Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

T490- Biotehnoloogia

**Märksõnad:** elektri- ja elektroonikajäätmed, bioleostumine, anaeroobne ja aeroobne protsess

## **Investigation of WEEE bioleaching processes**

Nowadays developed society has led to a large amount of electrical and electronic equipment waste. Regulations on e-waste are becoming increasingly strict and technologies involving the recovery and recycling of metals are being favored more than ever. Different technologies are used to recover metals from e-waste: pyro-, hydro- and biohydrometallurgy. The aim of this study is to investigate the two-step bioleaching processes of scraped electronic waste and determine the amount of microorganisms in anaerobic and aerobic processes. In addition, the purpose is to figure out which precious metals leached out of the processes mentioned above.

### **CERCS research specialization:**

B320- Microbiology, bacteriology, virology, mycology

T490- Biotechnology

**Keywords:** WEEE, bioleaching, anaerobic and aerobic processes

# Sisukord

Kasutatud lühendid .....	5
Sissejuhatus .....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1. Elektri - ja elektroonikaseadmete jäätmete käitlemine maailmas .....	7
1.2. E-jäätmete voog geograafiliselt .....	8
1.3. E-jäätmete regulatsioonid Euroopas .....	10
1.4. E-jäätmete regulatsioonid Eestis .....	11
1.4.1. E-jäätmete kogumine Eestis .....	12
1.5. E-jäätmete mõju inimesele ja keskkonnale .....	13
1.6. Trükkplaadid .....	15
1.6.1. Trükkplaatide koostis .....	15
1.5. E-jäätmete ringlussevõtu tehnoloogiad .....	17
1.5.1. Pürometallurgia .....	19
1.5.2. Hüdrometallurgia .....	20
2. Biohüdrometallurgia.....	22
2.1. Bioleostamise mikroorganismid .....	25
2.1.1. Kemolitoautotroofsed atsidofiilsed bakterid .....	26
2.1.1.1. Termofiilsed bakterid .....	26
2.1.1.2. Mesofiilsed bakterid .....	26
2.1.2. Heterotroofsed bakterid .....	27
2.1.3. Tsüanogeensed bakterid.....	27
2.2. Mikroorganismide reaktsioonimehhanismid bioleostumisel .....	27
2.2.1. Bioleostamises kasutatavate organismide klassifikatsioon .....	28
2.3. Metallide bioleostamine .....	28
2.3.1. Otsene ja kaudne bioleostamise mehhanism .....	30
2.3.1.1. Metallisulfiidide lahustumise rajad .....	32
3. Uuritava materjali eeltöötlemine .....	34
3.1. E-romu mehhaniline töötlus.....	34
3.2. Eeltöötlus anaeroobse protsessi abil .....	36
3.2.1. Anaeroobse lagunemise astmed .....	38
4. Töö eesmärk.....	41
5. Materjalid ja meetodika.....	41
5.1. Anaeroobsed katsed .....	41
5.1.1. Anaeroobse katse inokulum.....	41
5.1.2. Anaeroobsete katsete proovide kogumine .....	42
5.1.3. Mikroorganismide arvukuse määramine .....	43
5.1.4. Rõhu tõus .....	44
5.2. Reaktorikatse.....	45
3.2.1. Mikroorganismide arvukus reaktoris .....	46
5.2.1. Gaasiproovid.....	49
5.2.2. Metallianalüüs .....	49
6. Aeroobse protsessi katse happelise kasvukeskonnaga .....	49
6.1. Inokulumi ettekasvatamine .....	49

6.2.	Biomassi määramine.....	53
6.3.	Arvukuse määramine vedelfaasis .....	54
6.4.	Reaktorikatse.....	55
6.2.1.	Mikroorganismide arvukuse määramine .....	56
7.	Tulemused.....	58
7.1.	Mikroorganismide arvukus anaeroobses reaktoris .....	58
7.2.	Gaasiproovide tulemused anaeroobses katses.....	59
7.3.	Metallianalüüsid anaeroobses katses .....	60
7.4.	Mikroorganismide arvukus aeroobses katses.....	62
7.4.1.	Petri tasside edasikülv vedelfaasi.....	63
7.5.	Metallianalüüsid aeroobses katses.....	64
8.	Arutelu.....	68
9.	Kokkuvõte.....	70
	Summary.....	71
	Tänuavaldused.....	73
	Lihtlitsents .....	74
	Viidatud allikad.....	75
	Lisad.....	83

## Kasutatud lühendid

WEEE	Elektri-ja elektroonikaseadmete jäätmed ehk <i>waste electrical and electronic equipment</i>
POP	püsivaid orgaanilisi saasteained ehk <i>persistent organic pollutants</i>
PCB	trükkplaadid ehk <i>printed circuit boards</i>
WPCB	trükkplaatide jäätmed ehk <i>waste printed circuit boards</i>
PGM	teised plaatinarühma metallid ehk <i>platinum group metals</i>
CFU/ml	kolooniaid moodustavad ühikud ehk <i>colony forming unit</i>
<i>Af</i>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
<i>Lf</i>	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>
<i>At</i>	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
REED	haruldased muldmetallid
OD	optiline tihedus ehk <i>optical density</i>
Fe	raud
S	väävel
CH <sub>4</sub>	metaan

## Sissejuhatus

Tänapäeva kiire majanduskasv, pidev tehnoloogiline innovatsioon ja elatustaseme paranemine on toonud kaasa hulgaliselt elektri- ja elektroonikaseadmete jäätmeid ehk e-jäätmeid. Kõige väärtuslikumaks peetakse neist jäätmetest väärismetalle sisaldavaid trükkplaate. Metallid üldiselt on kõigi majandussektorite jaoks olulised.

E-jäätmetega seotud regulatsioonid muutuvad aina karmimaks ning nõuetekohane jäätmete taaskasutamine järjest tähtsamaks. Pooldatakse tehnoloogiaid, mis hõlmavad metallide taaskasutust ja ringlussevõttu. Kahjuks on metallide taaskasutamise ja ringlussevõtu puhul peamiseks takistuseks elektri- ja elektroonikaromude jäätmete heterogeensus ning kompleksne koostis, sest elektroonikaseadmed koosnevad paljudest erinevatest ja keerulistest komponentidest. Metallide taaskasutamiseks e-jäätmetest on käigus erinevad tehnoloogiad: püro-, hüdro- ja biohüdrometallurgiat. Neist viimane on üles ehitatud keskkonnasõbralikule ja energiasäästlikule viisile, kuidas e-romudest metalle taaskasutada meetodi aluseks on bioleostumise protsess, milles mikroorganismid muundavad tahked metalliühendid lahustuvateks ja ekstraheeritavateks metalliühenditeks, mida on võimalik taaskasutada.

Töö eesmärk on uurida purustatud elektroonikaromude bioleostumise protsesse anaeroobses ja aeroobses keskkonnas. Kasutades suuremahulist, 20-liitrise katseseadet, seati eesmärgiks kindlaks teha, kuidas mikroorganismid taluvad protsessi erinevates astmetes olevaid tingimusi ning missugused metallid bioleostuvad protsessi käigus välja. Katsed on osa elektroonikaromude leostamise uuringutest projekti „LIFE17/ENV/ES/000216 Elektrooniliste seadmete töötlemisjääkide bioleostamine“ raames ning teostati Tartu Ülikoolis koostöös ettevõttega BiotaTec OÜ.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Elektri - ja elektroonikaseadmete jäätmete käitlemine maailmas

Elektri-ja elektroonikaseadmete jäätmed ehk elektroonilised jäätmed (*WEEE – waste electrical and electronic equipment*) on järjest kasvav jäätmevoog, mida põhjustab elektroonika toodete tarbimise kasv nii tööstusriikides kui ka arengumaades. Elektroonikaseadmeid on palju – peaagu kõiki majapidamis- või kontoritarbeid, millel on vooluahel või toitega elektrilised komponendid, saab nimetada elektri- või elektroonikaseadmeteks. (Mihai, et al. 2019)

Mõiste „e-jäätde“ on lai ja hõlmab endas kuut jäätmekategooriat:

1. soojusvahetusseadmed, mida sagedamini nimetatakse jahutus- ja külmutusseadmeteks (külmkapid, sügavkülmikud, konditsioneerid ja soojuspumbad);
2. ekraanid, monitorid, telerid, laua- ja tahvelarvutid;
3. lambid (fluorestsentslambid, suure intensiivsusega tühjenduslambid ja LED-lambid);
4. suurseadmed (pesumasinad ja -kuivapid, nõudepesumasinad, elektripliidid, trükimasinad, paljundusseadmed ja päiksepaneelid);
5. väikeseadmed (tolmuimejad, mikrolaineahjud, veekeetjad, raadioseadmed, videokaamerad, elektroonilised mänguasjad jne);
6. IT- ja telekommunikatsiooniseadmed (mobiiltelefonid, GPS, kalkulaatorid, ruuterid, printerid, sülearvutid). (Mihai, et al 2019)

Igal kuuel jäätmekategooria tootel on erinev eluiga. See tähendab, et igal tootel on erinevad jäätmekogused, majanduslik väärtus, samuti potentsiaalne oht keskkonnale ja tervisele, kui neid tooteid ebasobivalt ringlusesse võetakse. (Balde, et al. 2017) 2016. aastal tekkis kogu maailmas 44,7 miljonit tonni e-jäätmeid. Ringlusse võeti vaid 8,9 miljonit tonni, mis moodustab ainult 20% kõigist tekkinud e-jäätmetest. Kui 2005. aastaks oli e-jäätmeid kogunenud 20 miljonit tonni, siis aastaks 2016 oli nende jäätmete hulk kahekordistunud. (Mihai, et al. 2019)

Puudulikud olmejäätmete käitlussüsteemid hõlmavad sageli ka e-jäätmete ebaõiget käitlemist. Need kogutakse kokku koos teiste jäätmetega, ilma et neid eelnevalt töödeldaks, ning viiakse munitsipaalprügilatesse, kus toimub saasteainete leostumine keskkonda. Kui e-jäätmete ohtlikud

fraktsioonid satuvad kokku segaolmejäätmete ohtlike fraktsioonidega, võivad nad moodustada püsivaid orgaanilisi saasteained (POP – *persistent organic pollutants*). (Mihai, et al. 2019) POP-d on mürgised kemikaalid, mis mõjutavad inimese tervist ja keskkonda. Need mürgised kemikaalid liiguvad tuule ja vee abil, samuti võivad nad püsida keskkonnas pikka aega ning toiduahela kaudu levida ühelt liigilt teisele ning akumuleeruda. (EPA, 2020) E-jäätmetest võib lekkida järgnevaid ühendeid: polütsükklilised aromaatsed süsivesinikud (PAH), raskmetallid (kaadmium, elavhõbe, plii), broomitud tuleaeglustid (BFR). Vananenud elektri- ja elektroonikaseadmed, näiteks külmkapid, mille eluiga on pikem, võivad sisaldada freoone (CFC ja HCFC). Samas sisaldavad e-jäätmete fraktsioonid väärtuslikke materjale tööstuste jaoks (väärismetallid, Cu) ning kui neid uuesti ringlusesse võtta, vähendatakse sellega metallide ammendumist looduses. Kahjuks mängivad elektri- ja elektroonikajäätmete ringlussevõtu ja käitlemises rolli just need riigid, kus nõuetekohased ametlikud e-jäätmete käitlusteenused ja õigusaktid puuduvad. Ülemineku- ja arengumaades tuleb arendada jäätmekäitlussüsteeme, mis põhineksid jäätmete eraldi kogumisel ja ringlusesse võtul, ning jätkusuutlikku lähenemist elektroonikajäätmete korraldamises. (Mihai, et al. 2019)

E-jäätmete eraldamine ja töötlemine ei ole oluline ainult keskkonnamõjude seisukohast, tähtsal kohal on ka majanduslik komponent. Aastal 2016 oli e-jäätmetes sisalduvate toorainete koguväärtus hinnanguliselt 55 miljardit eurot, mis on suurem kui maailma enamiku riikide sisemajanduse koguprodukt. Samas on peale jäätmekäitlust selle sekundaartooraine väärtus vaid murdosa selle komponentide või kasutatud seadmete algväärtusest. Ringmajanduse mudelid peaksid rohkem julgustama ettevõtjaid jäätmeid paremini ringlusesse võtma, taaskasutama ja töödeldud materjale rohkem kasutama. (Balde, et al. 2017)

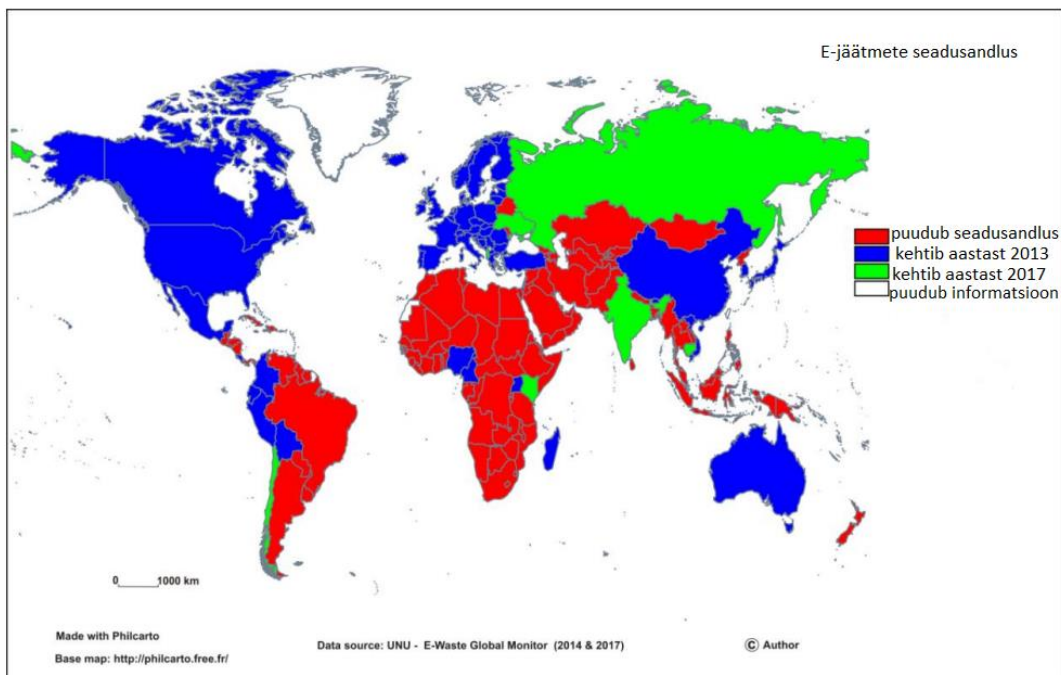
## 1.2. E-jäätmete voog geograafiliselt

Oluline on jälgida WEEE jäätmete voogu nii globaalselt kui ka regionaalselt. See annab ülevaate, kui palju on toodetud, saadakse hinnata toote eluiga ning seda, kui palju jäätmeid tekib. Jäätmekäitlussektoril on kogu maailmas erinevad võimalused, mis sõltuvad tehnoloogiast, majanduslikust ja sotsiaalsest võimekusest ning erinevatest vastuvõetud seadustest. Ebavõrdsus arenenud ja arengumaade jäätmekäitlusteenuste osas on ilmne. Ülemaailmsel tasandil puudub ligi 3 miljardil inimesel juurdepääs jäätmete kogumisteenustele ning samuti on erinevus linna ja maapiirkondade vahel. See omakorda



põhjustab majapidamises tekkinud jäätmete erinevaid kõrvaldamisviise, milleks on sageli põletamine, veekogudesse viskamine või tee äärde jätmine. (Mihai, 2017)

E-jäätmed on spetsiifiline jäätmevoog, millel on keerukas vastastikune mõju riiklikul ja rahvusvahelisel tasandil, ning mida tuleb kindlasti reguleerida konkreetse seadusandlusega. Tulenevalt e-jäätmete käitlemise keerukusest, võimaldab see ebaseaduslikku kaubandust, eriti arengumaades, kus puuduvad ametlikud tagasivõtusüsteemid. Reguleerimine riiklikul tasandil on järgmine samm ametliku ja nõuetekohase e-jäätmekäitluse arendamiseks piirkondlikul ja kohalikul tasandil. Euroopa Liidul on välja töötatud e-jäätmete direktiiv, mille kaudu teostatakse järelvalvet enamikus Euroopa riikides. 2013. aastal võttis 60 riiki kasutusele e-jäätmete määruse ning 2017. aastal liitusid sellega Albaania, Ukraina, Venemaa, India, Keenia, Tšiili ja Kambodža (joonis 1). (Mihai, et al. 2019)



**Joonis 1.** E-jäätmete õigusaktide katvus globaalselt ajavahemikus 2013-2017. (Mihai, et al. 2019)

Enamik arenenud majandusega riike võtsid vastu selle seadusandluse, sest eeldatavasti suureneb nendes riikides e-jäätmete osakaal järgnevatel aastatel. Õigusaktide olemasolu aga ei tähenda tingimata korralike e-jäätmekäitlusüsteemide edukat rakendamist või pakkumist. Aasias on mitmeid riike, kus 2017. aastast kehtivad õigusaktid, aga neid võib võrrelda Lõuna-Ameerikaga, kus tegelikult puudub seadusandlus, sest neid akte ei täideta. Jooniselt 1 on näha, et Aafrika riikidel põhimõtteliselt puuduvad e-jäätmetega seotud

regulatsioonid. Seal mängib rolli riigi majandustase ning jäätmete ladustamine prügilatesse ja nende põletamine. Kõrgema sissetulekuga elanikkonnaga riikides, näiteks USA-s, Austraalias, Kanadas, Lääne- ja Põhja-Euroopas, tekib e-jäätmeid elaniku kohta umbes 20-28,3 kg aastas. Aasias on see number 0,1-1 kg elaniku kohta. Kõige suurem hulk e-jäätmeid inimese kohta aastas tekib Norras, kus see on 28,3 kg. Samas tekib Kongos ja Nigeerias e-jäätmeid elaniku kohta aastas 0,2 kg. (Mihai, et al. 2019)

### 1.3. E-jäätmete regulatsioonid Euroopas

1989. aastal sõlmiti Baseli konventsioon, mis määratleb ohtlike jäätmete impordi, ekspordi ja transiitvedude korra. Konventsioon kohustab riike viima miinimumini ohtlike jäätmete kogused ja tagama, et riikides oleksid jäätmekäitlusettevõtted. Riikides, kus puuduvad nõuetekohased jäätmekäitlusettevõtted, ei tohi jäätmeid eksportida ega importida. Samuti tohib korraldada riikidevahelist jäätmevedu vaid siis, kui asjaomaste riikide pädevad asutused on andnud kirjaliku kooskõlastuse. (Keskkonnaministeerium, 2019) Pärast Baseli konventsiooni tutvustas Euroopa Liidu komisjon 1993. aastal jäätmeveo määrust, mis keelab eksportida ohtlikke jäätmeid riikidesse, mis ei kuulu Majandusliku Koostöö ja Arengu Organisatsiooni (OECD). 8. juunil 2011. aastal andis Euroopa Parlament ja nõukogu välja direktiivi, mis sätestab teatavate ohtlike ainete kasutamise piiramise elektri- ja elektroonikaseadmetes. Direktiivis rõhutati toote disaini ja pakendi muutmise vajalikkust, et vähendada ohtlike ainete kasutamist ning suurendada nende asendamist keskkonnasõbralike materjalidega. Lisaks on seal ka nõue suurendada tekkivate e-jäätmete ringlussevõtu määra. (EUR- Lex, 2011; Patil & Ramakrishna, 2020) 2012. aastal võeti vastu direktiiv 2012/19/EL elektri- ja elektroonikaseadmetest tekkinud jäätmete kohta. Direktiivi eesmärk on säästva tarbimise ja tootmise toetamine elektroonikaromude tekke vältimisel ja nende korduskasutamise, ringlussevõtu ja muude taaskasutamise viiside teel. (Euroopa Liidu Teataja, 2012) Välja on toodud, et kasutuselt kõrvaldatud elektri- ja elektroonikaseadmete süstemaatiline ja eraldi kogumine võimaldab suuremat ringlussevõtu mahtu, mis omakorda soosib e-jäätmete fraktsioonide suuremat käivet. Direktiivis on sätestatud, et töödeldud e-jäätmete üle tuleb pidada riiklikku arvestust. Välja on toodud eraldi ka tootjate laiendatud vastutuse põhimõte. (Patil & Ramakrishna, 2020)

Kõik Euroopa Liidu liikmesriigid ja teised Euroopa riigid, nagu Suurbritannia, Šveits ja Norra on rakendanud siseriiklikke õigusakte, et reguleeria e-jäätmete käitlust vastavalt oma kohalikule ökosüsteemile. Euroopa Liidu komisjon on aidanud ja julgustab teisi Euroopa riike (väljaspool EL) ja

Venemaad rakendama õiguslikku ja institutsioonilist raamistikku e-jäätmete käitlemiseks ja keskkonnaprobleemide lahendamiseks. (Patil & Ramakrishna, 2020)

#### 1.4. E-jäätmete regulatsioonid Eestis

Eesti jäätmevaldkonna eesmärk on taaskasutada võimalikult palju tarbimisest üle jäävaid materjale. Kui jäätmed on tekkinud, tuleks need uuesti materjalina ringlusse võtta. Eestis kehtestati jäätmeseadus 2004. aastal. Seadus sätestas üldnõuded jäätmete tekke ning neist tuleneva tervise- ja keskkonnaohu vältimiseks ning jäätmehoolduse korralduse jäätmete ohtlikkuse ja koguse vähendamiseks. (Jäätmeseadus, 2004) Riigi jäätmekava eesmärk aastatel 2014-2020 oli korrastada ning korraldada jäätmehooldust süsteemselt valdkonna kõigil tasanditel. Keskkonnaministeeriumi andmete kohaselt valmib riigi jäätmekava novembriks 2022, senikaua kehtib veel vana. (Keskkonnaministeerium kodulehekül, 2021) Jäätmetatistika andmetel tekkis 2019. aastal Eestis jäätmeid kokku 20,21 miljonit tonni. (Statistikaameti kodulehekül, i.a)

Jäätmeseaduse vastuvõtmisega kehtestati 2005. aastal määrus nr 376 „Elektri- ja elektroonikaseadmete märgistamise viis ja kord ning elektri- ja elektroonikaseadmetest tekkinud jäätmete kogumise, tootjale tagastamise ning taaskasutamise või korraldamise nõuded ja kord ning sihtarvud ja sihtarvude saavutamise tähtjad“. 2005. aastal kinnitati keskkonnaministri määrus „Elektri- ja elektroonikaseadmete romude käitlusnõuded“. (Keskkonnaministeerium, i.a). Jäätmeseadus määratleb tootjavastutuse põhimõtte ning defineerib probleemtooted, sest need jäätmed võivad põhjustada ohtu keskkonnale ja tervisele. Probleemtoodeteks on elektri- ja elektroonikaseadmed ja nende osad, patareid ja akud, mootorsõidukid ja nende osad, rehvid, põllumajandusplast. Tootjavastutus tähendab seda, et tootjal on kohustus koguda ja suunata probleemtoodet edasisele käitlemisele, taaskasutusse, ringlussevõtuks või kõrvaldamiseks. Tootjatele on sätestatud ka elektroonikaromude kogumise määrad. (SEI, 2015)

Eestis peavad olema elektri- ja elektroonikaseadmed märgistatud. Toodetel peavad olema kirjas järgmised andmed:

1. tootjat identifitseerivad andmed;
2. alates 2005. aastast turule lastavatel seadmetel märgis vastavalt standardile EVS-EN 50419;
3. CE-märgis. (Keskkonnaministeeriumi kodulehekül, 2020)

Toodetele kantavad andmed ja, märgised peavad olema selgelt loetavad ja kustumatud seni, kuni seade muutub jäätmeks. Kui märgis ei mahu seadmele või põhjustab ebamugavusi toote kasutamisel, peab märgise kandma kas seadme kasutusjuhendisse või garantiidokumendile. (Keskkonnaministeerium kodulehekülg, 2020)

#### 1.4.1. E-jäätmete kogumine Eestis

Elektri- ja elektroonikaseadmete tootjad peavad rajama elektroonikaseadmetest tekkinud jäätmetele kogumispunktid igasse Eesti maakonda, võttes arvesse rahvastiku tihedust ning nõuet, et elektroonikaromude üleandmine oleks elektroonikaromude valdajale võimalikult mugav. Tootja peab rajama vähemalt iga üle 3500 elanikuga linna või valla territooriumile e-jäätmete kogumispunkti. (Keskkonnaministeerium kodulehekülg, 2020)

2014. aasta aprillis kinnitas valitsus määruse muudatuse, mille kohaselt peavad suured elektroonikamüüjad kasutuks muutunud koduelektroonika edaspidi vastu võtma tasuta. Määruse muudatus tulenes Euroopa Nõukogu direktiivist 2012/19/EL „Elektri- ja elektroonikaseadmetest tekkinud jäätmete kohta“ ning sellest, et olmejäätmetes leidub liiga palju elektroonikajäätmeid. Määrusekohaselt on kindlaks määratud elektroonikaromude kogumise määrad. Määrad arvutatati välja kalendriaasta jooksul kogutud elektroonikaromude massi jagamisel kolme eelmise aasta jooksul turule lastud elektri- ja elektroonikaseadmete keskmine massiga aasta kohta. 1. jaanuarist 2016. aastal oli see määr vähemalt 45%, 2018. aastal vähemalt 59% ning 2019. aastal vähemalt 65% müügile lastud elektri- ja elektroonikaseadmete keskmisest massist aasta kohta. Eestis on elektroonikaromude kogumise määr olnud pisut kõrgem, sest elektroonikaseadmete turule laskmine on suurenenud. Näiteks perioodil 2016-2018 suurenes Eesti kolme aasta keskmine elektroonikaromude turule laskmine üle 7%. (EUR-Lex,2012; Keskkonnaagentuur, 2020: SEI, 2015)

2013. aastal andis SA Stockholmi Keskkonnainstituudi Tallinna Keskus välja uuringu, milles uuriti Eestis tekkinud segaolmejäätmete, eraldi kogutud paberi- ja pakendijäätmete ning elektroonikaromude koostist. Elektroonikaromude analüüsi teostati perioodil 01.09.2012- 30.06.2013 ja sortimisuuringu viidi läbi põhiliselt viies jäätmejaamas. Sortimisuuringu tulemused näitasid, et jäätmejaamadesse toodud elektroonikaromud koosnevad valdavalt suurtest kodumasinatest, infotehnoloogia- ja kommunikatsiooniseadmetest ning tavatarbijatele määratud seadmetest. (SEI, 2013)

Elektroonika- ja elektrijäätmete koguste paremaks jälgimiseks on Keskkonnaministeeriumi loonud probleemtooteregistri (PROTO). Selles on registreeritud Eestis valmistatud, turule lastud ning, sisse- ja väljaveetud probleemtooted. Keskkonnaagentuur on loonud jäätmearuandluse infosüsteemi (JATS), kust saab infot e-romude kohta. (Keskkonnaministeeriumi kodulehekül, 2020; Probleemtooteregister i.a) Eestis on elektri- ja elektroonikaseadmete ja e-romude kogumine korraldatud tootjate ühenduste kaudu, millest tuntumad on MTÜ Eesti Elektri- ja Elektroonikaseadmete Ringlus (MTÜ EES-ringlus), kuhu kuulub 155 liiget, ja MTÜ Eesti Elektroonikaromu, kus on 588 liiget. (EES-Ringlus kodulehekül, i.a; Eesti Elektroonikaromu kodulehekül, i.a)

Eesti jäätmekäitluse koondtabeli järgi eksporditi 2019. aastal elektri- ja elektroonikaseadmeid 3103,4 tonni, imporditi vaid 1271,9 tonni. Sellest saab järeldada, et Eesti riigil ei ole võimekust ise e-romude töötlemiseks. (Jäätmearuandluse infosüsteemi kodulehekül, i.a)

### 1.5. E-jäätmete mõju inimesele ja keskkonnale

E-jäätmed koosnevad ja sisaldavad vähemalt 57 erinevat perioodilisustabelis leiduvat elementi (joonis 2). Need ained on ohtlikud nii inimese tervisele kui ka loodusele, kui nendega jäätmekäitluses korralikult ei tegelda. Elavhõbedat (Hg) kasutatakse lülitites, patareides ja gaaslahenduslampides, st skannerites ja fotokoopiaimasinates. Elektroonikatööstuses kasutatakse aastas umbes 22% elavhõbedat (Hg). Laetavad patareid sisaldavad pliid (Pb), kaadmiumit (Cd), liitumit (Li) ja niklit (Ni). Vanad telerid, arvutid ja katoodkiiretorud (*cathode ray tubes*, CRT) sisaldavad pliid (Pb). Lülitites leidub kaadmiumit (Cd) ja berülliumit (Be). Kondensaatorid ja trafod sisaldavad polüklooritud bifenüüle (PBB) ning jahutusseadmetes ja isolatsioonivahtudes on klorofluorosüsinikku (CFC). Suitsuandurites on ameriitsiumit (Am), mis on radioaktiivne element. (Kaya, 2016)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18														
	1A	2A	3B	4B	5B	6B	7B	8B	8B	8B	1B	2B	3A	4A	5A	6A	7A	8A														
1	1 H 1.008																	2 He 4.003														
2	3 Li 6.941	4 Be 9.012											5 B 10.81	6 C 12.01	7 N 14.01	8 O 16.00	9 F 18.99	10 Ne 20.18														
3	11 Na 22.99	12 Mg 24.30											13 Al 26.98	14 Si 28.09	15 P 30.97	16 S 32.07	17 Cl 35.45	18 Ar 39.95														
4	19 K 39.1	20 Ca 40.08	21 Sc 44.96	22 Ti 47.87	23 V 50.94	24 Cr 52.00	25 Mn 54.94	26 Fe 55.84	27 Co 58.93	28 Ni 58.71	29 Cu 63.55	30 Zn 65.39	31 Ga 69.72	32 Ge 72.64	33 As 74.92	34 Se 78.96	35 Br 79.90	36 Kr 83.8														
5	37 Rb 85.47	38 Sr 87.62	39 Y 88.91	40 Zr 91.22	41 Nb 92.91	42 Mo 95.94	43 Tc 98	44 Ru 101.1	45 Rh 102.9	46 Pd 106.4	47 Ag 107.9	48 Cd 112.4	49 In 114.8	50 Sn 118.7	51 Sb 121.8	52 Te 127.6	53 I 126.9	54 Xe 131.3														
6	55 Cs 132.9	56 Ba 137.3	57 La 138.9	58 Ce 138.9	59 Pr 140.9	60 Nd 144.2	61 Pm 145	62 Sm 150.4	63 Eu 152.0	64 Gd 157.3	65 Tb 158.9	66 Dy 162.5	67 Ho 164.9	68 Er 167.3	69 Tm 168.9	70 Yb 173.0	71 Lu 175.0	72 Hf 178.5	73 Ta 180.9	74 W 183.8	75 Re 186.2	76 Os 190.2	77 Ir 192.2	78 Pt 195.1	79 Au 197.0	80 Hg 200.6	81 Tl 204.4	82 Pb 207.2	83 Bi 209	84 Po 209	85 At 210	86 Rn 222
7	87 Fr 223	88 Ra 226	89 Ac 227	104 Rf 261	105 Db 262	106 Sg 263	107 Bh 262	108 Hs 265	109 Mt 268	110	111	112																				
				58 Ce 140	59 Pr 141	60 Nd 144	61 Pm 145	62 Sm 150	63 Eu 152	64 Gd 157	65 Tb 159	66 Dy 163	67 Ho 165	68 Er 167	69 Tm 169	70 Yb 173	71 Lu 175															
				90 Th 232	91 Pa 231	92 U 238	93 Np 237	94 Pu 244	95 Am 243	96 Cm 247	97 Bk 247	98 Cf 251	99 Es 252	100 Fm 257	101 Md 258	102 No 259	103 Lr 262															

**Joonis 2.** Väärtuslikud elemendid, mis sisalduvad e-jäätmetes (Kaya, 2016)

Plii kahjustab inimese närvisüsteemi ja vereringet ning neere, mõjutab lapse aju arengut. Kroom põhjustab astmaatilist bronhiiti ja kahjustab DNA-d. Kaadmiumil on toksiline ja pöördumatu mõju inimese tervisele: ta koguneb neerudesse ja maksa, võib põhjustada kopsukasvajad ning tekitada närvikahjustusi. Elavhõbe tekitab kroonilisi kahjustusi hingamissüsteemile ja inimese ajule. Plastid ja polüvinüülkloriidid (PVC) toodavad pärast põletamist dioksiine, mis kahjustavad immuunsust ja võivad põhjustada arenguprobleeme. (Kaya, 2016)

Nõuetekohane e-jäätmete käitlemine on vajalik, kuna e-jäätmed reostavad põhjavett, hapestavad mulda ning põletamisel tekitavad mürgiseid aineid, gaase ja eraldavad kantserogeenseid aineid. Ebaõige jäätmete käitlemine tekitab tõsiseid pinnase, õhu ja vee saasteprobleeme. Ebaõige e-jäätmete käitlemine hõlmab järgmist:

- 1) trükkplaatide ja metallkaablite avatud põletamine;
- 2) väärismetallide eemaldamine happe või tsüaniidi abil;
- 3) CRT-de lõhkumine ja avatud ladestamine prügilas. (Kaya, 2016)

Avatud põletamine ja ladestamine prügilatesse on iseloomulik e-jäätmete kõrvaldamise viis enamikes arengumaades. Jäätmete matmine ja ladestamine võimaldab raskmetallidel leostuda pinnasesse ja põhjavette ning õhku eraldub metaani, mida kokku ei koguta. Jäätmete põletamisel paiskuvad õhku ohtlikud ained. (Kaya, 2016)

## 1.6. Trükkplaadid

Trükkplaadid ehk emaplaadid (*printed circuit boards*, PCB-d) on elektroonikatoodete oluline osa. PCB-sid kasutatakse elektrooniliste komponentide mehaaniliseks toetamiseks ja elektriliseks ühendamiseks. Emaplaadid moodustavad vähemalt 3% elektroonikatoote massist. Hetkel suudetakse töötlemisega taaskasutada vaid 30% metalli, ülejäänud 70% kahjuks ei saa tõhusalt taaskasutada ning see kas põletatakse või ladestatakse prügilasse. (Kaya, 2016) Trükkplaatide jäätmed (*waste printed circuit boards*, WPCB) sisaldavad mitmesuguseid raskmetalle ja ohtlikke aineid, näiteks pliidi, kaadiumi. Lisaks sellele sisaldavad need teisi mittemetallilisi ühendeid: plastikut, klaasi. Seetõttu on vaja WPCB utiliseerida, et vältida keskkonnareostust ning et väärtuslikke materjale saaks ringlusesse võtta. (Zhou & Qui, 2010)

Kasutusel on kahte tüüpi trükkplaat: FR-4 ja FR-2. FR-4 koosneb mitmekihilisest epoksüvaigust, klaaskiust ja on kaetud vase (Cu) kihiga. FR-2 koosneb ühekihilisest klaaskiust või tselluloospaberist ja fenoolist, mis on samamoodi kaetud vasekihiga. FR-4 kasutatakse väikestes seadmetes, näiteks mobiiltelefonides. FR-2 kasutatakse suuremates kodumasinates ja televiisorites. (Kaya, 2016)

### 1.6.1. Trükkplaatide koostis

Emaplaatide põhistruktuur on tugevdatud klaasplastiga ja mitmest metallmaterjalist koosnevast laminaadist, milles on väärismetallid, nagu kuld, hõbe ja plaatina. Samuti on seal mitmeid ohtlikke raskmetalle. Kõik trükkplaadid koosnevad põhiliselt kolmest põhiosast:

- 1) mittejuhtiv substraat või laminaat;
- 2) juhtiv vasesubstraat, mis on tükitud laminaadile või selle sisse;
- 3) aluspinnale kinnitatud komponendid. (Kaya, 2016)

Sõltuvalt struktuurist ja joondusest, võib emaplaate klassifitseerida ühepoolseteks, kahepoolseteks või mitmekihilisteks. Ühe- ja kahepoolsetel PCB-del on juhtiv kiht laminaatidel ühel või mõlemal küljel.

Emaplaatide suurus võib varieeruda 0,2 kuni 7 mm. Vasekihi paksus on vahemikus 17,5-175 µm. (Kaya, 2016)

Tabelis 1 on välja toodud tüüpilised materjalid, mida kasutakse emaplaatide koostises. Materjalid on tabelis toodud massiprotsentidena. Neid materjale saab jagada kolme rühma: orgaanilised materjalid, metallid ja silikaatühendid.

**Tabel 1.** Trükkplaatide materjali koostis (Kaya, 2016)

Metallid 40%		Silikaatühendid 30%		Plastikühendid 30%	
Cu	6-27%	SiO <sub>2</sub>	15-30%	PE	10-16%
Fe	1,2-8,0%	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6,0-9,4%	PP	4,8%
Al	2,0-7,2%	Leelismuldmetallid	6%	PS	4,8%
Sn	1,0-5,6%	Vilgud	3%	Epoksüvaigud	4,8%
Pb	1,0-4,2			PVC	2,4%
Ni	0,3-5,4%			PTPE	2,4%
Zn	0,2-2,2%			Nailon	0,9%
Sb	0,1-0,4%				
Au (ppm)	250-2050%				
Ag (ppm)	110-4500%				
Pd (ppm)	50-4000%				
Pt (ppm)	5-30%				
Co (ppm)	1-4000%				

PCB-d koosnevad suures koguses mitteväärismetallidest (Tabel 1), nagu vasest, rauast ja alumiiniumist. Haruldasematest metallidest võib seal olla tantaali, galliumi ja teisi platinarühma metalle (*platinum group metals*, PGM), väärismetallidest aga kulda, hõbedat ja plaatina. Lisaks on koostises ka ohtlikke metalle: niklit, kroomi, elavhõbedat. Silikaatühenditest esinevad peamiselt ränidioksiid ja alumiiniumsilikaadid.



## 1.5. E-jäätmete ringlussevõtu tehnoloogiad

E-jäätmemajanduses tuleb soodustada tehnoloogiad, mis hõlmavad metallide taaskasutust ja ringlussevõttu. Vanade, kasutuselt kõrvaldatud seadmete ringlussevõtt hõlmab esmaseid eeltöötlemisetappe. Need etapid on e-jäätmete komponentide käsitsi demonteerimine ja eraldamine erinevateks fraktsioonideks, näiteks metall- ja mittemetalseks osaks. (Cui & Zhang, 2008; Guo, et al. 2009). Ringlussevõtt muudab elektri-ja elektroonikaseadmete jäätmed mitte ainult sekundaarseks ressursiks, vaid võimaldab selles sisalduvate metallide taaskasutamist. Praegu kasutusel olevad ringlussevõtu tehnikad on pürometallurgia, hüdrometallurgia ja biometallurgia. (Priya & Hait, 2017)

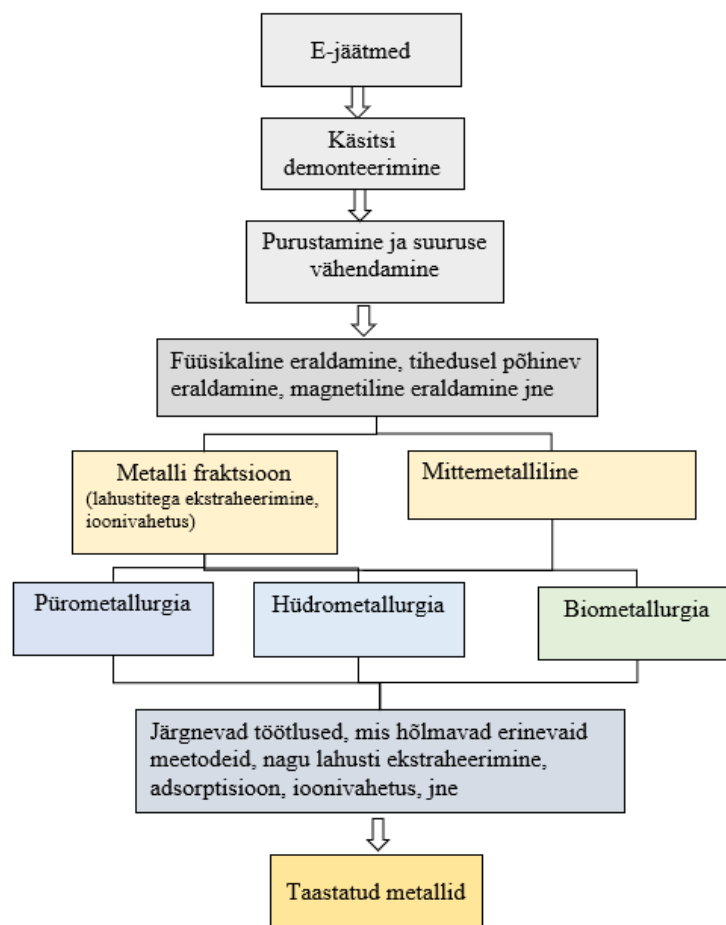
Peamine takistus elektroonikaromude metalli taaskasutamise ja ringlussevõtu puhul on jäätmete heterogeensus ja keeruline olemus. E-jäätmed koosnevad paljudest erinevatest ja keerulistest komponentidest. Skeemil joonisel 3 on välja toodud e-jäätmetest metallide kättesaamiseks tehtavad eeltöötlustetapid. (Priya & Hait, 2017) Metallide taaskasutamine hõlmab mitmeid füüsikalisi, keemilisi ja bioloogilisi protsesse või nende kombinatsioone, mis keskenduvad e-jäätmetes leiduvate sihtmaterjalide taaskasutamisele. (Beolchin, et al. 2012; Brandl, et al. 2008). Väärtuslike metallide (Au, Ag, Pd ja Cu) puhul on kasutama hakatud ekstraheerimisprotsesse, mis hõlmavad füüsikalisi, keemilisi, hürdo- ja pürometallurgilisi eraldamise tehnikaid. (Kaya, 2016)

Füüsikalised meetodid hõlmavad mitmesuguste purustite ja separaatorite kasutamist. Füüsikaliste protsesside hulka kuuluvad kuivpurustamine ja peenestamine ning elektrostaatiline eraldamine. Tolmureostuse vältimiseks kasutatakse kolmeastmelist tolmu eemaldamise seadet, milleks on tsüklon, kott ja õhupuhasti. (Kaya, 2016)

Keemilistes protsessides lagundatakse polümeerijäätmed kemikaalide abil monomeerideks või teisteks kasulikeks kemikaalideks. Kasutatakse nelja protsessi: pürolüüsi, gaasistamist, depolümeriseerimist ja hüdromeenset lagundamist. (Guo, et al. 2009) Keemiline protsess aitab eraldada orgaanilised ja metallilised materjalid. Metallide eraldamist emaplaatide jäätmetest on laboratoorselt palju kasutatud, näiteks pürolüüsi. Ühtlasi laguneb selle käigus PCB mittemetalliline vaigufraktsioon algseteks koostisosadeks. Orgaanilised materjalid lagundatakse madalamolekulaarseteks ühenditeks, kuid anorgaanilised komponendid jäävad suhteliselt muutumatuks. (Kaya, 2016; Zeng, et al. 2012) Keemilise

protsessi kasutamine on tõhus meetod mittemetalliliste fraktsioonide elementide ära kasutamiseks ja ohtlike komponentide eemaldamiseks. (Duan, et al. 2011).

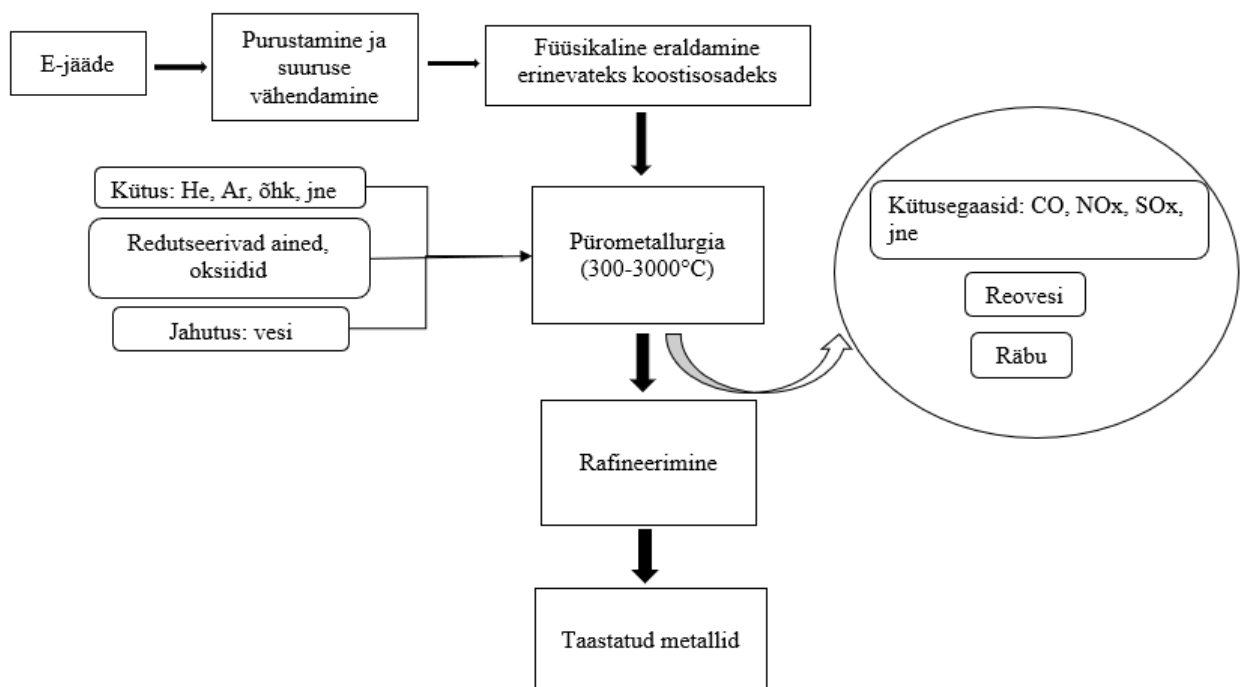
E-jäätmetest metallide taaskasutamise protsessiskeemis on protsessid kasutusel rafineerimise etapis (joonis 3). Metallid sulatatakse kuumusega (pürometallurgilised protsessid) või lahustatakse vedeliku abil (hüdrometallurgilised protsessid), edasi kasutatakse neid nende keemiliste või metalliliste omaduste järgi. Pürometallurgiline töötlemine on võrdlemisi levinud meetod, metallide taastamiseks e-jäätmetest. Hüdrometallurgilise protsessi peamiseks etapiks on materjali leostamine söövitavas lahuses. Lahusesse viidud huvipakkuvad metallid, isoleeritakse ja kontsentreeritakse. (Tsydenova & Bengtsson, 2011).



**Joonis 3.** E-jäätmetest metallide taaskasutamise metallurgiliste protsesside üldine skeem (Priya & Hait, 2017)

### 1.5.1. Pürometallurgia

Pürometallurgiline protsess (joonis 4) on termilise töötuse viis, mis hõlmab põletamist, sulatamist, difusiooni, paakumist. Gaasifaasis toimuvad reaktsioonid kontrollitud kõrgel temperatuuril. (Hoffmann, 1992; Lee, et al. 2007; Priya & Hait, 2017). Kuumutusprotsess viiakse läbi spetsiaalsetes põletusahjudes (kõrgahjus või plasmakaares), kus metallioksiidid reageerivad süsinikdioksiidi vabastava redutseerijaga. E-jäätmete mittemetallilist osa nimetatakse räbuks. Räbu moodustub ränimaterjalide kuumutamisel. Redutseerijaks võib olla süsi, koks, lubi või boor. (Cui & Zhang, 2008; Dalrymple, et al. 2007)



**Joonis 4.** Pürometallurgia skeem (Priya & Hait, 2017)

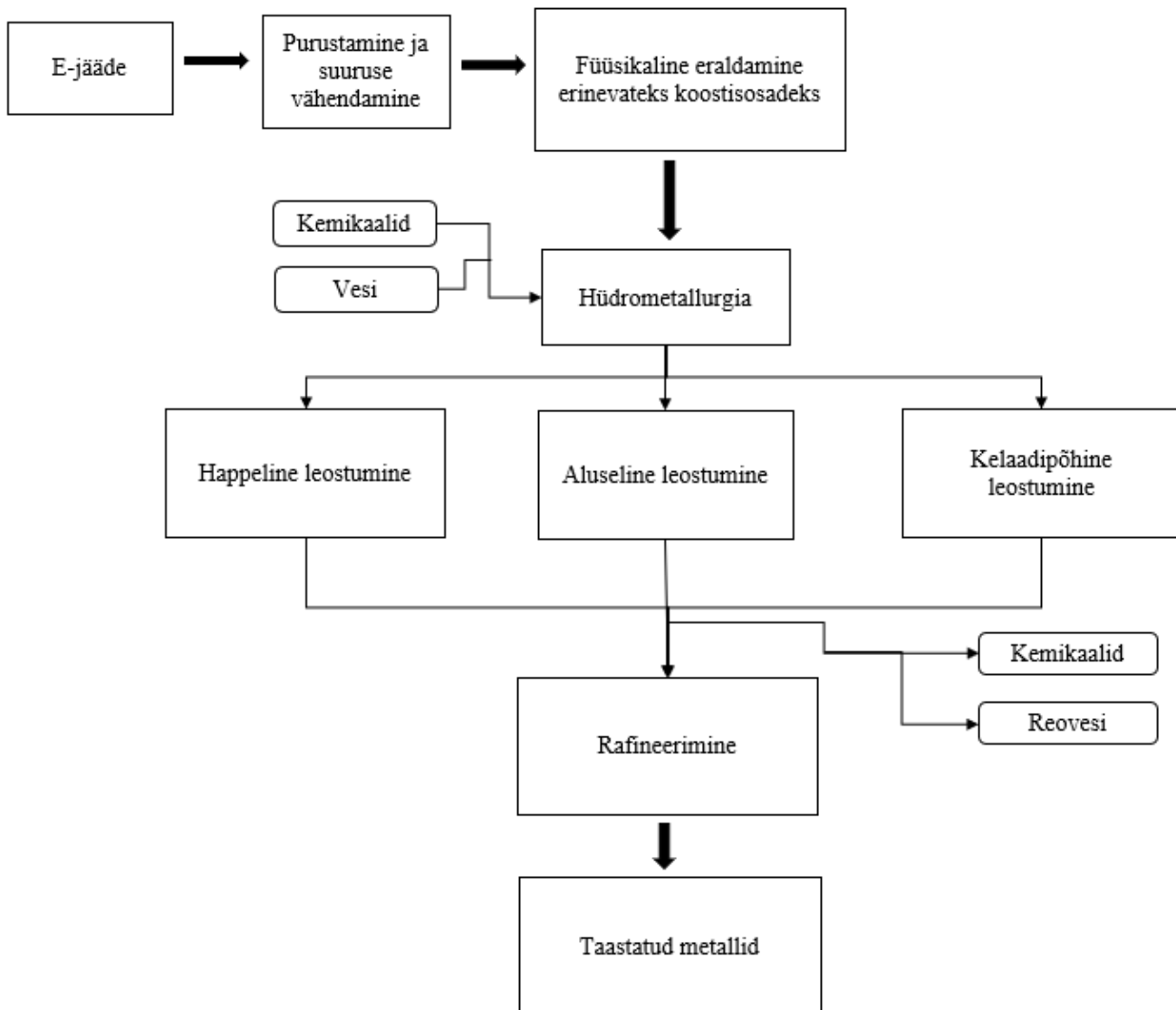
Pürometallurgilise protsessi miinuseks on metallitoodete madal saagis, mis tuleneb e-jäätmetes sisalduva metalli lähteainest. E-jäätmetes puhtal kujul esinevaid metalle saab sulatites hõlpsasti töödelda. Sulamite stabiilsus koos nende halva eraldumiskäitumisega sulamise ajal piirab aga puhaste metallide kättesaamist ja muudab pürometallurgilised protsessid energiamahukaks. (Nakajima, et al. 2010; Reck & Graedel, 2012). E-jäätmete sulatamisel eraldub palju kahjulikke gaase ja ühendeid, näiteks polübroomitud dibensodioksiine (PBDD), PBDFi, fenooli, naftaleeni ja palju teisi ühendeid, mis põhjustavad tõsist

õhusaastet. Pürometallurgilisest töötlemisest tulenevate gaasiliste heitmete haldamine nõuab täiendavaid investeeringuid. (Priya & Hait, 2017) Välja on töötatud uudne ultrahelitehnoloogia, mille emissioon on minimaalne, aga metallide taaskasutamise efektiivsus kõrge. Selle tehnika abil saadi Cu ja Fe metallide taastamise efektiivsuseks vastavalt 95,2-97,5% ja 97,1-98,5%. (Priya & Hait, 2017)

### 1.5.2. Hüdrometallurgia

Pürometallurgiliste protsesside takistused, näiteks suuri investeeringuid ja tegevuskulusid nõudvad toksiliste metalliaurude heitekogused vajavad potentsiaalseid alternatiive. Üheks alternatiiviks on hüdrometallurgiline protsess. (Cui & Zhang, 2008; Das, et al. 2009; Silvas, et al. 2015)

Hüdrometallurgiline protsess (joonis 5) on metallide leostumine, milles kasutatakse sobivaid keemilisi vedelikke, mis viivad e-jäätmete metallifraktsioonide lahustumiseni. Hüdrometallurgilised vedelikud või leostamisreaktiivid sisaldavad happelisi või aluselisi lahuseid, mis lahustavad tahket maatriksit, vabastades metallid vedelfaasi. (Priya & Hait, 2017) Leostamislahustena kasutatakse väävelhapet, lämmastikhapet, kuningvett, tioureat, tiosulfaate, tsüaniide ja halogeniide. (Choubey, et al. 2015; Huang, et al. 2009; Li, et al. 2007; Pant, et al. 2012). Huvipakkuvad põhi- ja väärismetallid lahustatakse e-jäätmetest tavaliselt oksüdatsiooni reaktsioonide abil. Leostavateks anorgaanilisteks oksüdeerivateks hapeteks on HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ja NaClO. (Huang, et al. 2009) Pärast e-jäätmete leostamist sobiva lahusti abil töödeldakse lahust erinevate meetoditega, nagu elektrorafineerimine, absorptsioon ja ekstraheerimine, et seda kontsentreerida ning saada üksikuid puhtaid metalle. (Cui & Zhang, 2008)



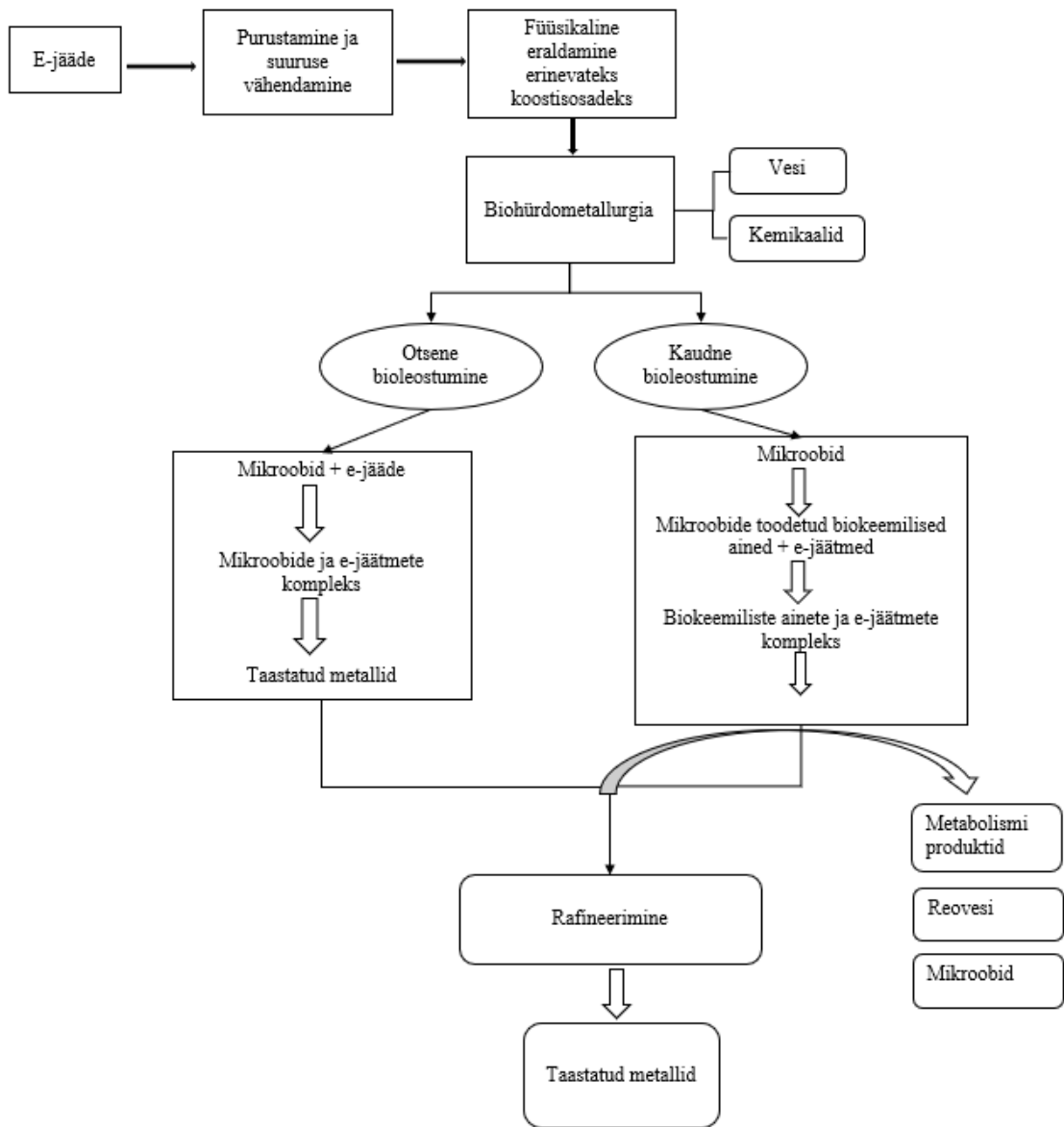
**Joonis 5.** Hüdro metallurgia skeem (Priya & Hait, 2017)

Hüdro metallurgilise meetodi miinuseks on kasutusprotsessi käigus tekkiv ohtlik reovesi, mida on raske taaskasutada ja mis piirab selle protsessi kasutamist. Reovesi sisaldab suurel hulgal happelisi, aluselisi ja tuleohtlikke reagente. (Norgate, et al. 2007; Priya & Hait, 2017). Olemasolevatesse hüdro metallurgilistesse protsessidesse on tehtud mitmeid parandusi ja modifikatsioone. Üks uuringurühm on välja töötanud termoplasma meetodi happega leostamiseks, mille kasutamisel tekib vähem reovett ja töötlemisaeg on lühem. (Rath, et al. 2012) Teise lähenemisviisina on pakutud termilise ja happelise töötlemise kombinatsiooni. See toimib eelkõige kulla lahustamisel ja taastamisel.

(Chmielewski, et al. 1997) Hüdrometallurgilist regenereerimist vedelate keemiliste ühendite abil kasutatakse tööstuslikult suures ulatuses. (Priya & Hait, 2017)

## 2. Biohüdrometallurgia

Biometallurgia ehk biohürdometallurgia tuntud ka kui bioleostamine on keskkonnasõbralik ja energiasäästlik metallide taaskasutamise viis (joonis 6). (Brierly & Brierly, 2001; Krebs, et al. 1997) Bioleostamine põhineb mikroorganismide (bakterid, seened) võimel muundada tahkeid ühendeid. Lahustuvateks ja ekstraheeritavateks ühenditeks, mida saab taaskasutada. Täpsemalt põhineb see atsidofiilsetel autotroofsetel bakteritel, kes suudavad oksüdeerida rauda (Fe) või väävlit (S). (Gadd, 2004). Jäätmete bioleostamine jäljendab looduslike biogeokeemiliste tsüklite protsesse, vähendades sel viisil nõudlust maakides leiduvate uute ressursside järele. (Krebs, et al. 1997) Viimastel aastakümnetel on looduslikes ökosüsteemides avastatud ja kirjeldatud mitmeid mineraalide leostumise eest vastutavaid mikroorganisme. (Beolchin, et al. 2012; Krebs, et al. 1997) Need on enamasti Fe ja S oksüdeerivad bakterid, mis võivad otsese või kaudse mehhanismi abil oksüdeerida metalle tahketest substraatidest. Oksüdeerides ( $Fe^{2+}$  ioone) ( $Fe^{3+}$  ioonideks), saadakse tugev oksüdeeriv ja oksüdeerides väävlit ja selle ühendeid saadakse vajalikud leostamisreaktiivid, nagu väävelhape või muud oksüdeerivad väävliühendid. (Beolchin, et al. 2012; Bosecker, 1997; Krebs, et al. 1997; Sand, et al. 2001) Üldiselt on e-jäätmete bioleostamisega seotud kolm mehhanismi: atsidolüüs, redoksreaktsioonid ja kompleksi moodustumisega seotud mehhanismid. (Banasadi, et al. 2019)

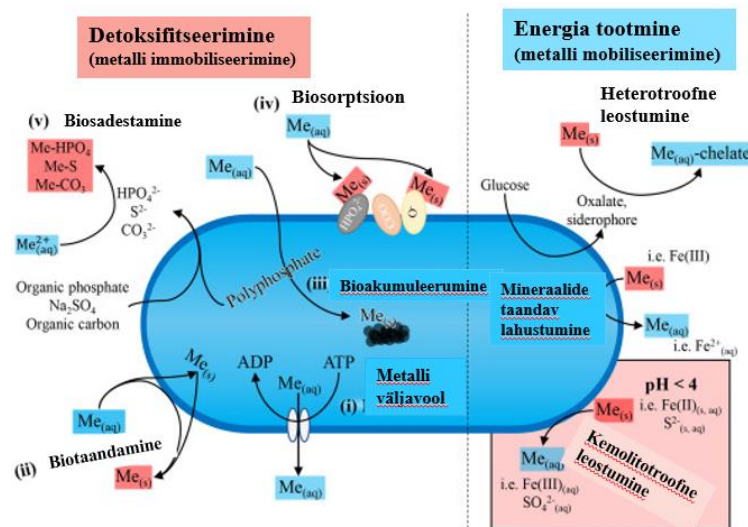


**Joonis 6.** Biohüdrometallurgia skeem (Priya & Hait, 2017)

Mikroorganismidel on paljunemiseks vaja mõningaid metalle, enamasti väga madalas kontsentratsioonis, mistõttu on teatud metallide suhtes spetsiifiline sidumisvõime. Bioloogiliselt olulised metallid (naatrium, magneesium, kaalium, kaltsium, mangaan, raud, koobalt, nikkel, vask ja tsink) on lahutamatud paljudest bioloogilistest funktsioonidest, sealhulgas rakuseina ja valgu struktuuride stabiliseerimisest. Rakumembraanis toimub metalloensüümide moodustumine. Halofiilsed mikroorganismid on välja töötanud strateegiad, kuidas ellu jääda kõrge soolasisaldusega keskkonnas. Samamoodi suudavad mõned happelises keskkonnas olevad mikroorganismid üle elada ja siduda siirdemetalle, st metalle, millel on

mitu keskkonnas stabiilset oksüdatsiooniastet. Mikroorganismidel on samuti geenipõhiseid metalliresistentsuse mehhanisme, mis võivad olla nii kromosomaalsed kui ka plasmiidipõhised. Metalliresistentsusgeenid võivad olla ka transposoonid, mis võimaldavad geneetilist liikuvust ja geenide dubleerimist mikroobide genoomides. (Levett, et al. 2021)

Mikroorganismid kasutavad oma metalliresistentsuse mehhanisme ulatuslikult (joonis 7) Mikroorganismide resistentsust on uuritud rohkem plii ja teiste tavalisemate raskmetallide kohta. Metallide toksilisuse vähendamiseks on mikroorganismidel kasutusel mitmeid passiivseid ja aktiivseid mehhanisme: (i) metallide väljavool, mis viib metalle aktiivselt rakusisestest piirkondadest tagasi väliskeskkonda, (ii) biotaandamine, (iii) bioakumuleerumine, (iv) biosadestumine, mis hõlmab polüfosfaate, ja (v) biosorptsioon, mis võib samas mikroorganismide kahjustada. Lisaks aitavad mikroobid kaasa metallide liikuvusele orgaaniliste hapete tekke kaudu heterotroofsel kasvat, oksiidide taandaval lahustumisel ning autotroofsel raua ja väävli oksüdeerimisel happelises keskkonnas. (Levett, et al. 2021).



**Joonis 7.** Metallide ja mikroobide koostoime (Levett, et al. 2021)

Otseses bioleostamise mehhanismis toimub füüsiline kontakt, kus bakterirakk ja mineraalne sulfiid omavahel kokku puutuvad. Oksüdeerimine sulfaadiks toimub mitteensümaatilisel katalüüsitud etapi kaudu. Kokkupuutumise mehhanismi ja metalli lahustumise alustamist ei ole suudetud täielikult mõista. Selge on see, et bakterid ei kinnitu kogu mineraalse pinna külge, vaid eelistavad konkreetseid kristallide ebatäiuslikkuse kohti ja metalli lahustumine on tingitud elektrokeemilistest interaktsioonidest. Seda otsesest leostamist saab kirjeldada järgneva reaktsiooniga:  $MeS + 2O_2$  bakter  $MeSO_4$ , kus MeS on



metallisulfiidid. Kaudne bioleostumise mehhanisimi käigus tekitavad bakterid vedeliku, mis sulfiidimineraali keemiliselt oksüdeerib. Kaudse leostamise korral ei pea bakterid mineraalse pinnaga kokku puutuma. Neil on ainult katalüütiline funktsioon, mis aitab kiirendada oksüdeerumist. Seega bioleostumine põhineb bioloogiliste ja keemiliste oksüdatsiooniprotsesside koostoimel. (Bosecker, 1997)

Bioleostamisel kasutatakse kolme mikroorganismide rühma: autotroofsed bakterid, heterotroofsed bakterid ja seened. Autotroofsete tiobatsillide kasutamise eelis on see, et nende kasvu jaoks ei ole vaja orgaanilist süsinikuallikat. Teisest küljest – heterotroofseid baktereid ja seeni saab kasutada kõrgema pH juures. Levinumad bakterid, mida kasutatakse metallide lahustamiseks, kuuluvad *Bacilluse* perekonda ja on kemolitoautotroofid, näiteks *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*. Seentest kasutatakse bioleostamisel *Aspergilluse* ja *Penicilliumi* perekondi. (Aung & Ting, 2005; Bosecker, 1997). Lisaks on olemas orgaanilisi happeid eritavaid mikroorganisme, keda on kasutatud metallide madala kvaliteediga lähteainest. (Ilyas, et al. 2007; Le, et al. 2006). Need heterotroofsed bakterid, kasutavad orgaanilise süsinikuallikana süsinikku ja energiat ning eritavad mitmesuguseid metaboolseid kõrvalsaadusi, sealhulgas sidrunhapet, oblikhapet, sipelghapet ja muid biokeemilisi leostumisreaktiive. (Castro, et al. 2000; Krebs, et al. 1997; Natarajan & Deo, 2001)

Bioloogilisi protsesse mõjutavad biotilised ja abiotilised tegurid, mis mõjutavad bakterite käitumist ja metallide ekstraheerimist. (Bosecker, 1997; Krebs, et al. 1997) Inhibiitorite maksimaalne eemaldamine soodustab mikroorganismide kasvu ja parandab metallide lahustumist. Biotilised tegurid on lisaks mikroorganismide liigid ja kultuurivorm, inokulumi suurus. Abiotilised tegurid on temperatuur, pH, hapnikutarve, aereerimise määr, niiskus, ekstraheeritavate e-jäätmete osakeste suurus, inkubatsiooniperiood ja toiteainekeskonna koostis. Kõik need tegurid mõjutavad bioloogilise leostumise protsesse. (Ilyas, et al. 2007; Wang, et al. 2009; Yang, et al. 2009)

## 2.1. Bioleostamise mikroorganismid

Bioleostamist teostavad erinevad mikroorganismid, millel on võime eraldada anorgaanilisi, orgaanilisi happeid ning tsüaniide, mis suurendavad ensümaatilist oksüdatsiooni või redutseerumist. Mikroorganisme saab liigitada kolme rühma: kemolitoautotroofsed, heterotroofsed ja tsüanogeensed bakterid.

### 2.1.1. Kemolitoautotroofsed atsidofiilsed bakterid

Emaplaatide (PCB) bioleostamiseks kasutatakse kõige sagedamini kemolitroofseid baktereid. Need bakterid on sobivad mitteväärismetallide taastamiseks. Kemolitoofsed mikroorganismid moodustavad väävelhappe või biogeense happe, mis lahustab tahkes maatriksis olevad metallid kas atsidolüüsi või redoksolüüsi teel. Enamikul kemolitoautotroofidel on kõrge raskmetallide toksilisuse taluvus ja seeetõttu kasutatakse neid ka elektroonikaromude töötlemisel. (Baniyasi, et al. 2019; Orell, et al. 2010)

Kemolitoautotroofsed liigid kuuluvad *Thiobacilluse* perekonda. Nad on Gram-negatiivsed, mitte-spoore moodustavad bakterid, mis kasvavad aeroobsetes ja aneroobsetes tingimustes. Bioleostamise keskkond on happeline, pH on vahemikus 1,5-3 mille juures enamik metallioone jääb lahusesse. Levinumad metallide lahustumist hõlbustavad bakteriliigid on *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* jne. (Bosecker, 1997; Lee & Pandey, 2012). Energiaallikana kasutavad kemolitoautotroofsed organismid süsinikdioksiidi (CO<sub>2</sub>) ja anorgaanilisi ühendeid, näiteks rauda (Fe<sup>2+</sup>), väävlit (S<sub>0</sub>) või redutseeritud väävliühendeid. (Donati & Sand, 2007) Seda tüüpi bakterite peamised ülesanded on bioleostamise protsessis osalevate Fe<sup>2+</sup> oksüdeerimine Fe<sup>3+</sup>-ks ja väävli oksüdeerimine H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ks. (Lee & Pandey, 2012).

Sõltuvalt temperatuuritaluvusest, liigitatakse kemolitoautotroofsed atsidofiilid termofiilseteks ja mesofiilseteks mikroorganismideks. (Lee & Pandey, 2012).

#### 2.1.1.2. Termofiilsed bakterid

Termofiilsete bakterite optimaalne kasvutemperatuur on 50°C või enam, maksimaalselt kuni 70°C või enam, minimaalselt umbes 20°C. (Deacon Jim, i.a) *Thiobacilluse*-laadsed on termofiilsed mikroorganismid, kes kasvavad püriidil, pentlandiidil ja kalkopüriidil temperatuurivahemikus 50°C. Energiaallikana kasutavad nad rauaühendeid, kuid katsetes on täheldatud, et bakterite kasvuks on vajalik ka pärmiestrakti olemasolu. Hüpertermofiilsed mikroorganismid võivad kasvada temperatuuril 60°C ja üle selle. (Bosecker, 1997). *Sulpholobuse* liigid, näiteks *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* ja *S. brierley* on mikroorganismid, kes on äärmiselt termofiilsed. (Lee & Pandey, 2012)

#### 2.1.1.3. Mesofiilsed bakterid

Mesofiilsed bakterid kasvavad temperatuurivahemikus alates 20°C (või madalam) kuni 45°C. Mesofiilsed mikroorganismid parima kasvutemperatuuriga on vahemikus 25-35 kraadi, on näiteks

*Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* ja *Leptospirillum ferrooxidans*. (Bosecker, 1997) Nimetatud mikroorganismide bioleostamise võimet ongi kõige ulatuslikumalt uuritud. (Modin, et al. 2017)

### 2.1.2. Heterotroofsed bakterid

Heterotroofsed (kemoorganotroofsed) bakterid ja seened, kes vajavad kasvamiseks ja energiaallikana orgaanilisi ühendeid, võivad samuti metallide leostumisele kaasa aidata. Enim on kasutatud heterotroofseid mikroorganisme perekondadest: *Sulfolobus*, *Bacillus* ja *Pseudomonas*. (Bosecker, 1997; Ilyas et al 2007) Nad saavad oma süsiniku- ja energiavajaduse orgaanilisest süsinikust, et toota metaboliite ja kõrvalsaadustena orgaanilisi happeid. (Burgstaller & Schinner, 1993; Liang, et al. 2013)

Heterotroofselt bioleostumisel on suunatud mikroorganisme, kes toodavad orgaanilistest hapetest (tsitraat, glükonaat, oksalaat) või kelaativatest ühenditest koosnevat vedelikku, mille abil on võimalik vesifaasi eraldada. Heterotroofset bioleostamist on soovitatav kasutada esmase allikana majanduslikult tähtsate metallide (Al, Cr, CO, Mn jne) kättesaamiseks. (Hennebel, et al. 2015)

### 2.1.3. Tsüanogeensed bakterid

Tsüanogeenseid baktereid kasutatakse väärismetallide ja platinarühma metallide bioleostumisel, mida mineraalhapped sageli ei leosta. Need bakterid (nt *Cyanobacterium violaceum*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens*) kasvavad leeliselises keskkonnas, eritavad tsüaniidi ja moodustavad vastavate metalliioonidega tsüaniidikompleksi. *Chromobacterium violaceum* võivad kohaneda pH väärtusega kuni 9,5. (Işildar, et al. 2019)

## 2.2. Mikroorganismide reaktsioonimehhanismid bioleostumisel

E-jäätmete bioleostamine hõlmab kolme mehhanismi: atsidolüüsi, redoksolüüsi ja kompleksmehhanismi.

Atsidolüüsi on võimelised teostama heterotroofselt saadud orgaaniliste hapete prootonid ning anorgaanilised bakteriaalsed happed ( $H_2SO_4$ ). Metallide lahustamine redoksolüüsil toimub redoks reaktsioonide abil, kasvuks vajalik energiaülekanne toimub elektronide kaudu. Atsidofiilsetes redoksolüüsi reaktsioonides redutseeritakse rauaioone ensümaatiliselts anaeroobses keskkonnast, kus vesinik või väävel on elektrondonor. Kompleksmehhanism tsüanogeensete bakteritega on veel üks

protsess, millega on võimalik väärimetalle eraldada. Mikroorganismi hilises statsionaarse kasvu faasis moodustub glütsiini dekarboksüülimisel tsüaniid. Paljudel tsüaniidi tootvatel bakteritel on  $\beta$ -tsüanonalaniini süntaasile omane toime tsüaniidi detoksifikatsiooni kaudu muutuda  $\beta$ -tsüanoalaniiniks. (Lu & Xu, 2016; Natarajan, 2018)

### 2.2.1. Bioleostamises kasutatavate organismide klassifikatsioon

Bioleostamisel kasutatakse erinevate mikroobide klasse, nagu bakterid, seened ja pärmid. Kõige sagedamini kasutatakse selliseid mikroorganisme, kes suudavad hapet toota või väävlit ja rauda oksüdeerida. Need mikroorganismid suudavad eritada anorgaanilisi või orgaanilisi happeid või tsüaniide, mis parandavad ensümaatilist oksüdatsiooni-redutseerumist. (Vikilchap, et al. 2016; Xiang, et al. 2010)

Üldiselt võib bioleostamiseks võimelisi mikroorganisme liigitada kolme põhiklassi:

- 1) kemolitoautotroofsed bakterid, kes toimivad atsidolüüsi ja redoksolüüsi mehhanismi abil. *Acidithiobacillus ferrooxidans* ja *Acidithiobacillus thiooxidans* on tuntumad kemolitotroofid, mis katalüüsivad raua ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oksüdeerumist raua ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ioonideks;
- 2) heterotroofseid orgaanilisi happeid tootvad bakterid ja seened, kes toimivad atsidolüüsi ja kompleksmehhanismi abil. Kasutatakse perekonna *Bacilluse* liike, mis on toiminud kõige tõhusamalt, seentest sellist liiki nagu *Aspergillus niger* ja perekonda *Penicillium simplicissimum*;
- 3) tsüanogeensed bakterid, kes toimivad kompleksmehhanismiabil. Katsetes on kõige suuremat lootust näidanud kaks tsüanogeenset bakteriliiki: *Chromobacterium violaceum* ja *Bacillus megaterium*. (Pandey & Natarajan, 2015)

### 2.3. Metallide bioleostamine

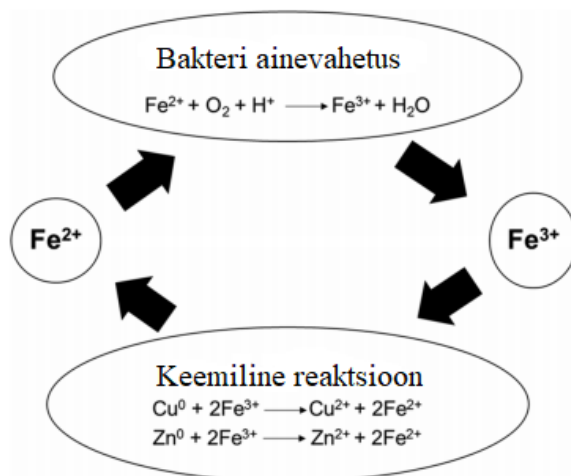
E-jäätmete tähtsamaks koostisosaks on metallijäätmed. Oluline on eraldada jäätmetest orgaanilised fraktsioonid. Metalle sisaldavad anorgaanilisi fraktsioone, ei lagundata, vaid muundatakse ühest vormist teise. Metallühendite kättesaamine jäätmetest on keeruline, sest need lahustuvad erinevatel pH-del, samuti on erinevad redutseerimis- ja oksüdeerimisvõimalused. (Brandl, et al. 2001) Bioleostumine toimub erinevate mikroorganismide abil. Mikroorganismides toimuvad erinevad füsioloogilised reaktsioonid, mis võimaldavad neil kasvada ja areneda, samuti toodavad nad kasvu ja

ainevahetusprotsesside käigus mitmesuguseid ainevahetusprodukte, näiteks orgaanilisi ja anorgaanilisi happeid, mis aitavad eemaldada metallid jäätmetest ja mineraalidest. (Gehrke, et al. 1998)

Võrreldes pürometallurgilisi ja hüdro metallurgilisi meetodeid on biohüdro metallurgiline lahendus keskkonnale parem ja odavam. Kasutades bioleostamist, saab madala kvaliteediga jäätmetest kätte ka metalliühendid. (Sand, et al. 2001)

Metallide bioleostamist saab liigitada nende metallide taastamise mehhanismide alusel, kas otseseks või kaudseks meetodiks. Otseses meetodis bakterid seovad enda füüsilise tahke maatriksiga ja oksüdeerivad ensümaatilisel metalle. Kaudses meetodis bakterid leostavad oksüdeeritud metallid lahusest välja. (Bosecker, 1997; Saidan, et al. 2012; Sand, et al. 2001) Kogu e-jäätmete bioleostamise protsessis lisatakse bakterite kasvu soodustamiseks keskkonda tavaliselt rauda, väävlit, raudsulfaati. Seda peamiselt seetõttu, et e-jäätmetel puudub energivarustus, mida vajavad bakterid oma elutegevuseks. (Brandl, et al. 2001) Mikroobide bioleostumise teooria hõlmab endas oksüdatsiooni- ja redutseerimisreaktsioone, orgaaniliste ja anorgaaniliste hapete tootmist mikroobide metaboliitide, kompleksainete ja kelaatide sekretsiooni. (Bosecker, 1997; Jadhav, et al. 2014)

Bioleostumisel kasutatakse ära bakterite roll oksüdeerijana  $Fe^{3+}$  regeneerimisel (joonis 8). Bioleostumise protsess võimaldab kasutada vähem Fe-d, kui keemiline reaktsioon, saades sama ekstraheerimissaagise. Kui lahuses on  $Fe^{3+}$  metalli lahustamisel muutunud  $Fe^{2+}$ , kasutavad seda mikroorganismid oma populatsiooni ja ainevahetuse suurendamiseks ning bakterid on omakorda valmis metalli edasiseks oksüdeerimiseks. Leostumisprotsess on tsükliline ja  $Fe^{3+}$  omab tähtsust leostamisreaktsiooni jaoks. (Becci, et al. 2020)



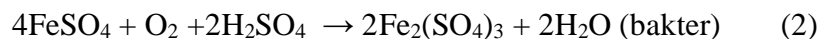
**Joonis 8.** Fe tsükliline protsess, mis on tingitud bakterite ainevahetuse toimest (Becci, et al. 2020)

### 2.3.1. Otsene ja kaudne bioleostamise mehhanism

Otseses bioleostamises toimub bakteriraku ja mineraalse sulfiidi pinna vahel füüsiline kontakt ning oksüdeerumine sulfaadiks toimub mitme ensümaatilisel katalüüsitud etapi kaudu. Otsene mehhanism hõlmab baktereid, mis on füüsiliselt seotud mineraalse sulfiidiga, põhjustades mineraali kristallvõres ebaproportsionaalset oksüdeerumist ning põhjustades seeläbi lahustamist. Seda saab väljendada järgmise üldise reaktsiooniga. (Bosecker, 1997).

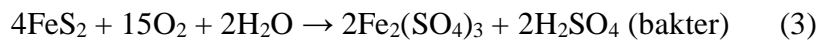


Valemis tähistatud MS on metallisulfiid. Täpsemalt saab selgitada otsest bioleostamist järgmiste reaktsiooni võrrandide abil ehk püriidi otsest oksüdeerumist atsidofiilsete bakterite poolt. (Bosecker, 1997)



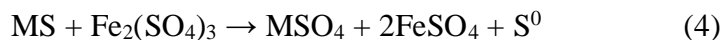
Varasemas teaduskirjanduses eeldati, et bakterid toimivad vee ja hapniku juuresolekul päästikuna, et aidata sulfiidi oksüdeerida sulfaadiks, seeläbi genereerides raudioone ja tekitades väävelhapet

(reaktsioon 1). Moodustunud hape reageerib edasi raudiooniga ja lahustab hapniku saades  $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3]$  raudsulfaadiks (reaktsioon 2), mis on vajalik kaudse oksüdatsiooniprotsessi jaoks. (Bosecker, 1997)



Reaktsioonis 3 ründavad püriiti oksüdeerivad bakterid, mis selgitab bakterite otsest oksüdeerumist. Võrrandis on näidatud bakterite poolt katalüüsitud väävli, raua ja hapniku oksüdeerumise summa. (Bosecker, 1997) Sand ja teised tema uurimisrühma liikmed tegid järelduse, et otsest protsessi ei toimu, see tähendab, et ensümaatilist rünnakut ei toimu. Uuringutes selgus, et metallsulfiidide kristallvõre lagundab metallsulfiide  $\text{Fe}^{3+}$  ionide või prootonite tekitatud keemilise reaktsiooni tagajärjel. Peamised  $\text{Fe}^{2+}$  ionid on bakteri- ja rakuvälised polümeersed ained (EPS). Seega otsene meetod sõltub kaudsest mehhanismist. (Sand, et al. 2001)

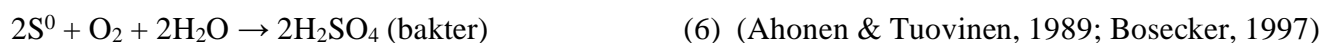
Kaudses bioleostamise mehhanismis tekitavad bakterid vedelikku, mis oksüdeerib keemiliselt sulfiidimineraali. Kaudne mehhanism eeldab esialgu toodetud lahustit ( $\text{Fe}^{3+}$ ), mis mängib olulist rolli mitmesuguste mineraalide bakteriaalse leostumise korral. Raud(III)iooni redutseerimispotentsiaal happelahuses, mille  $\text{pH} = 1,5$  muutub võimsaks oksüdeerijaks paljude mineraalide lahustamisel. Metallide lahustumist saab kirjeldada järgmiste reaktsioonidega:



Kaudse oksüdeerimise korral oksüdeeritakse püriit keemiliselt ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ionide abil. Järgmises reaktsioonis on kirjeldatud  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , kui oksüdeerijat.



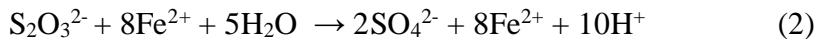
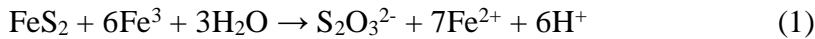
Kaudsel leostamisel ei pea bakterid mineraalse pinnaga kokku puutuma. Raua oksüdeerumine toimub siis kiiresti, kui tegemist on keemilise oksüdeerimisega bakterite juuresolekul ja vedelfaasis on  $\text{pH}$  2-3 vahel. (Ahonen & Tuovinen, 1989) Samaaegselt saab moodustunud väävlit (reaktsioon 5) oksüdeerida väävelhappeks väävlit oksüdeerivate bakterite juuresolekul (reaktsioon 6).



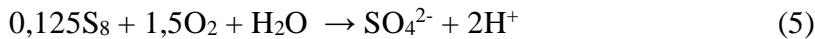
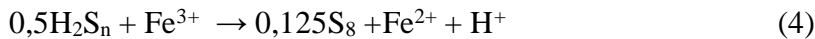
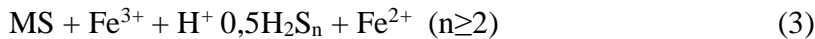
### 2.3.1.1. Metallisulfiidide lahustumise rajad

Metallisulfiidide bioleostamist viivad läbi erinevad bakterid, kuid metallisulfiidide lahustumise (bio)keemia järgib vaid kahte rada, mille määrab sulfiidide happes lahustumatus või lahustuvus. Mõlema rühma peamine oksüdeerija on raud (III). (Dempers, et al. 2003)

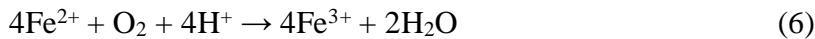
Tiosulfaadi rada (joonis 10) toimub happes lahustumatutele metallisulfiididele ( $\text{FeS}_2$ ,  $\text{MoS}_2$  ja  $\text{WS}_2$ ), kus oksüdeeritakse ainult elektronide ekstraheerimise teel raud (III) ioone. Selles metallisulfiidide rühmas on keemilised sidemed väävli vahel ning metalliosad ei purune enne, kui on läbi viidud kuus järjestikust ühe elektroni oksüdatsioonietappi ja tiosulfaat on vabanenud. (Dempers, et al. 2003; Rohwerder, et al. 2003)



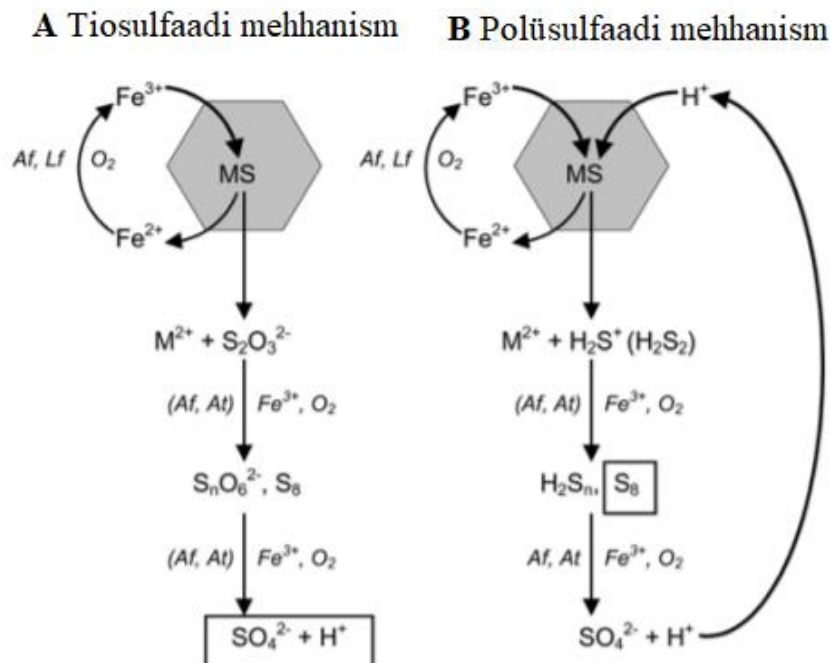
Polüsulfaadi rada (joonis 9) toimub happes lahustuvatele metallisulfiididele ( $\text{ZnS}$ ,  $\text{PbS}$ ,  $\text{FeAsS}$ ,  $\text{CuFeS}_2$  ja  $\text{MnS}_2$ ), kus lahustatakse raud (III) ioonid elektroniekstraktsiooni ja prootonirünnaku koosmõjul. Selles metallisulfiidide rühmas on keemilised sidemed metalli ja väävliosade vahel. Need sidemed katkevad pärast prootonirünnakut ja pärast kahe prootoni sidumist vabaneb vesiniksulfiid ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Raud (III) ioonide juuresolekul oksüdeeritakse väävliosa üheelektronilises etapis samaaegselt prootonirünnakuga. Seetõttu on esimene vaba väävliühend suure tõenäosusega sulfiidkatioon ( $\text{H}_2\text{S}^+$ ), mis võib spontaanselt dimeriseeruda vabaks disulfiidiks ( $\text{H}_2\text{S}_2$ ) ja oksüdeerub kõrgemate polüsulfiidide ja polüsulfiidradikaalide kaudu edasi elementaarväävliks. (Dempers, et al. 2003; Rowerder, et al. 2003)



Raua oksüdeerijad regenereerivad  $\text{Fe}^{3+}$ , siis kui süsteemis leidub raua oksüdeerivaid baktereid. See toimub reaktsioonides (1-5) ehk raud oksüdeeritakse bakterite abil uuesti  $\text{Fe}^{3+}$ . (Dempers, et al. 2003)







**Joonis 9.** Metallisulfiidide bioleostumise tiosulfaadi rada (A) ja polüsulfaadi rada (B) (Rohwerder, et al. 2003)

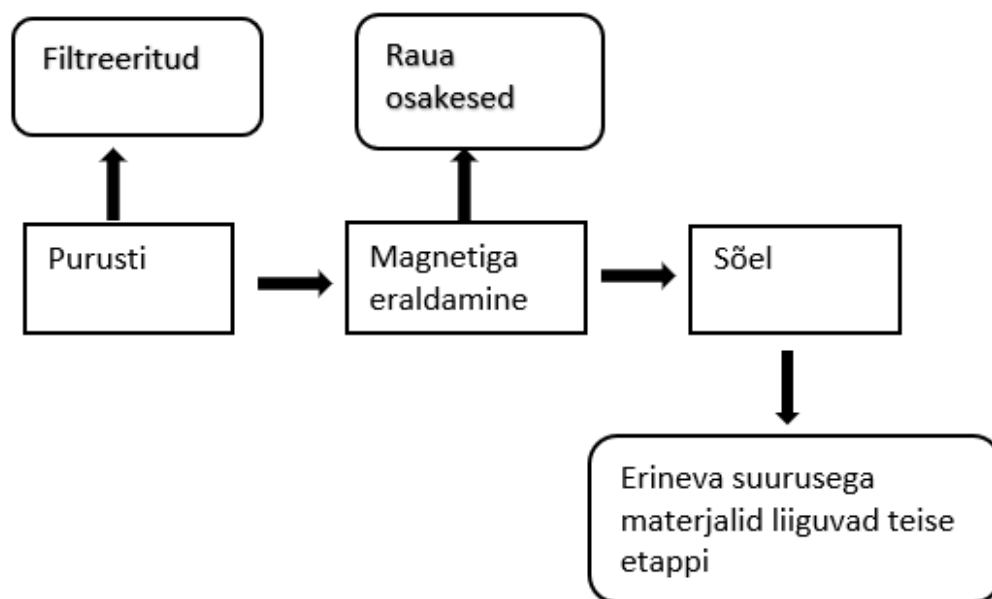
Tiosulfaadi mehhanismis raud (III) ioonid redutseeritakse reaktsioonis metallisulfiididega (MS) raud (II). Selle tulemusena vabanevad metalli katioonid ( $M^{2+}$ ) ja väävli vaheühendid. Raud (II)iooni oksüdeerivad bakterid *Acidithiobacillus ferrooxidans* (lühend Af) ja *Leptospirillum ferrooxidans* (lühend Lf). Nad tagavad raud (III)ioonide regenereerimine happelises keskkonnas. Polüsulfaadi mehhanismi puhul lisandub mikroobsele oksüdatsioonile veel prootonite toime. Vabanenud väävliühendite oksüdatsioon toimub abiootiliselt, kuid on võimalik oksüdatsioon bakterite abil. Nendeks bakteriteks on *Acidithiobacillus ferrooxidans* ja *Acidithiobacillus thiooxidans* (lühend At). Joonisel on näha, et kui bakterite lühendid on sulgudes, toimub protsess peamiselt abiootiliselt. Noolest paremal on näidatud elektronaktseptorid. Reaktsiooni produktid on märgitud kastiga. Tiosulfaadi rajal on see väävelhape ja polüsulfiidi rajal elementaarne väävel. (Rohwerder, et al 2003)

### 3. Uuritava materjali eeltöötlemine

Uuritavaks materjaliks minu töös on purustatud e-romu ehk elektri-ja elektroonikajäätmed (*WEEE – waste electrical and electronic equipment*). E-romu fraktsioonid koosnevad 40% metalliühenditest, 30% orgaanilisest ainest ja 30% silikaatsetest ühenditest. Metallidest suurema osa moodustavad vask, jood, nikkel, raud ja väärismetallid, sest 90% trükkplaatidest sisaldavad kulda ja pallaadiumi. Trükkplaadid jagunevad jäätmekäitluses kolme rühma (A, B, C) selle põhjal, missugune on nende väärismetallide kontsentratsioon jäätmes. A-kategooriga trükkplaadid sisaldavad üle 400 ppm kulda, peamiselt on need elektroonilised trükkplaadid. B-kategooria sisaldab kulda vahemikus 100-400 ppm. C-kategooria sisaldab trükkplaatid, mille kulla sisaldus on vähem kui 100 ppm. Enamasti on need trükkplaadid eraldatud teleritest, raadiotest, toteallikatest. Kahjuks puuduvad trükkplaatide liigitamiseks ühtsed rahvusvahelised standardid. Kokku on lepitud klassid, mis on eelnevalt kooskõlastatud lõppturgudega. Nendeks on trükkplaatide füüsilise koostise (nähtavate kuld-, alumiiniumdetalide jms olemasolu) ja neis sisalduvate metallide valitsev turuväärtus. (BiotaWee, 2018)

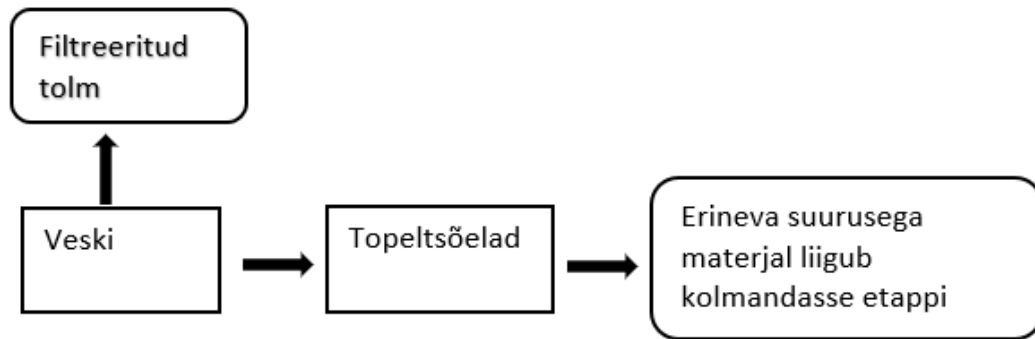
#### 3.1. E-romu mehhaniline töötlus

Materjali töötlemine hõlmab endast mitmeid purustamise ja eraldamise etappe, kuni saadakse mittemetalline fraktsioon, mida saab testida biolagunemise tehnoloogia abil. Esimeseks etapiks on materjali purustamine purustis. Seejärel toimub mustade materjalide magnetiline eraldamine, samuti eraldatakse materjalide suuruse järgi. Joonisel 10 on näidatud materjali skemaatiline läbimine. (BiotaWee, 2018)



**Joonis 10.** Esimese etapi skeem.

Teises etapis toimub materjalide segamine. Joonisel 11 on toodud teise etapi skemaatiline joonis. Purustatud materjal läheb veskisse, kus toimub materjali intensiivne töötlemine. Komposiitosad purustatakse, takerdunud materjalid eraldatakse ja rabedad-kõvad materjalid purustatakse taaskord. Materjale purustatakse senikaua, kuni need on visuaalselt piisavalt väiksed, et edasi liikuda sõelumisribale. Osakesed, mis on suuremad kui 25 mm, liiguvad tagasi purustisse. Edasi liigub veskis purustatud materjal siksakilisele (*zig-zag*) eraldajale. See süsteem eraldab materjale vastavale nende kaalu, kuju ja suuruse järgi. Sealt liigub materjal läbi topeltsõela, et saada vähem heterogeensem tulemus. Eelkõige aitab see protsess järgmises etapis, kus toimub kuivdensimeetriline eraldamine. (BiotaWee, 2018)

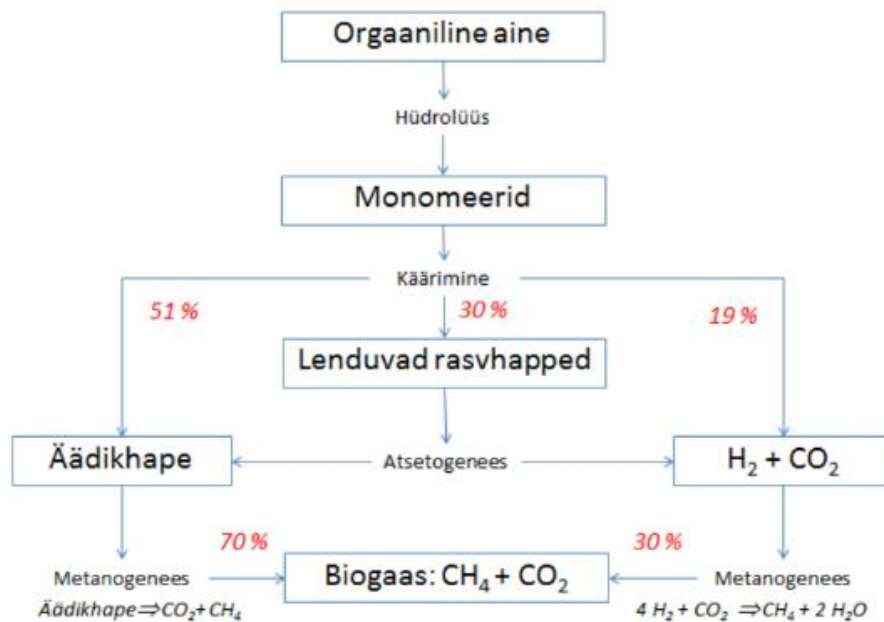


**Joonis 11.** Teise etapi skeem.

Enne kolmandat etappi eraldatakse sobiva bioleostumise materjali saamiseks metalliline fraktsioon mittemetallilisest. See toimub kuivdenismeeetrilise protsessi abil. Protsess näeb välja selline, et materjal on poorsel vibreerival pinnal, kuhu suunatakse õhk. Tihedamad materjalid püsivad kauem pinnaga kontaktis ja lükatakse edasi. Kergemad materjalid jäävad vibreeriva pinnaga kokku ning muutuvad staatiliseks. Süsteem eraldab kõige raskemad osakesed kergematest osakestest. Sellised seadmed sobivad väikese suurusega osakeste (osakeste suurus alla 20 mm) materjali töötlemiseks (BiotaWee, 2018) Selle etapi mittemetallilist osa kasutasin oma katsetes.

### 3.2. Eeltöötlus anaeroobse protsessi abil

Anaeroobne lagundamine (joonis 12) on protsess, mille käigus lagundatakse süsivesinikud mikroorganismide abil metaaniks ja süsihappegaasiks. Anaeroobne lagunemisprotsess on mitmeastmeline kompleksprotsess. Üldiselt kirjeldatakse seda kui neljafaasilist protsessi: hüdrolyüs, fermentatsioon e. atsidogenees, atsetogenees ja metanogenees. Protsess viiakse läbi kolme peamise mikroorganismide rühma koosmõjul. Mikroorganismideks on kääritajad ehk atsidogeenid atsetogeenid ja metanogeenid. (Angelidaki, et al. 2011; Insam, et al. 2010; Kriipsalu, et al. 2013)



**Joonis 12.** Anaeroobse protsessi lagunemine (Kriipsalu, et al. 2013)

Anaeroobse lagunemise protsessi on looduslikes ja konstrueeritud ökosüsteemides põhjalikult uuritud juba üle sajandi, sest selles protsessis. Biogaas koosneb peamiselt metaanist (CH<sub>4</sub>), süsinikdioksiidist (CO<sub>2</sub>). Vähesel määral leidub veeauru, vesiniksulfiidi (H<sub>2</sub>S), süsinikoksiidi (CO) ja lämmastikku (N<sub>2</sub>). Biogaasi koostis sõltub anaeroobselt lagundatavast materjalist, keskmise koostise kontsentratsioon on metaanil 50-75%, süsinikdioksiidil 25-45%, veel vett 2-7%. Vähesel määral leidub vesiniksulfiidi, lämmastiku, hapnikku, vesinikku, süsinikoksiidi, mille kontsentratsioon on alla <2%. (Biogaasi tootmine ja kasutamine, 2009) Tööstuslikult rakendatakse mesofiilset (temperatuurivahemikus 30-38 °C) või termofiilset käärimist (temperatuurivahemikus 50-57 °C). Biogaas tekib ka külmkäärimisel (temperatuurivahemikus < 20 °C). Tööstuslikult ei kasutata seda käärimisfaasi, sest metanogeenid sellisel temperatuuril ei kasva. Termofiilne käärimine on küll mesofiilsest käärimisest kiirem, sest temperatuuri tõusuga biokeemiliste reaktsioonide kiirus kasvab, kuid termofiilsel käärimisel on energiakulu suurem, probleeme on haisuga ning protsess on ebastabiilsem. Samuti nõuab rohkem jälgimist, sest termofiilsed mikroorganismid on temperatuuri kõikumise suhtes märksa tundlikumad. (Insam, et al. 2010; Kriipsalu, et al. 2013)

Erinevate orgaaniliste jäätmete ja jääkide anaeroobsel lagundamisel saadud biogaasil on suur alternatiiv asendada fossiilkütust (Angelidaki, et al. 2011)

### 3.2.1. Anaeroobse lagunemise astmed

Fermenteerivad mikroorganismid lagundavad biopolümeerid (lipiidid, valgud, nukleiinhapped, süsivesikud jne), lahustuvateks monomeerideks (pika ahelaga rasvhapped, glütserool, aminohapped, jne), mis muundavad edasi lühikese ahelaga rasvhapeteks, alkoholideks (etanooliks ja metanooliks), vesinikuks ja süsinikdioksiidideks samade mikroobide toimel. Lühikese ahelaga rasvhapped ja ka alkoholid oksüdeeritakse prootoneid redutseerivate atsetogeenide abil vesinikuks, atsetaadiks, formaatiks ja süsinikdioksiidiks. Need lõppsaadused muundatakse metanogeensete arhede abil lõpuks metaaniks ja süsinikdioksiidiks. (Angelidaki, et al. 2011; Insam, et al. 2010)

Anaeroobse protsessi esimene etapp on hüdrolüüs ning see on suhteliselt aeglane faas. Selles faasis toimub polümeersete orgaaniliste ühendite lagundamine monomeerideks. Kolm peamist hüdrolüüsi substraati on süsivesikud, lipiidid ja valgud, mis hüdrolüüsuvad vastavalt monosahhariidideks, rasvhapeteks ja aminohapeteks. (Merlin Christy, et al. 2014)



Hüdrolüütilised reaktsioonid koosnevad kahest faasist. Esimeses faasis toimub bakterite kolonisatsioon, kus hüdrolüütilised bakterid katavad tahkete ainete pinna. Bakterid vabastavad ensüümid osakeste pinnal ja toodavad monomeere. Teises faasis lagundavad bakterid osakeste pinda. Hüdrolüüsi teostavad obligatoorsed või fakultatiivsed anaeroobid. Nendeks mikroorganismideks on: *Clostridia*, *Micrococci*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Fusobacterium* *Selenomonas*, *Streptococcus*. (Merlin Christy, et al. 2014)

Atsidogenees on kiire happemoodustamisefaas. Selles faasis muudavad happebakterid vees lahustunud ühendid ja esimese faasis tekkinud lagusaadused lühikeseahelalisteks orgaanilisteks hapeteks (äädikhape, propaanhape, sipelghape, butüürhape, pentaanhape), alkoholideks, aldehüüdideks, süsinikdioksiidiks ja vesinikuks. (Merlin Christy, et al. 2014)





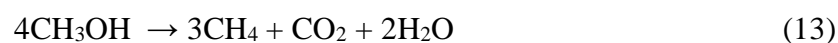
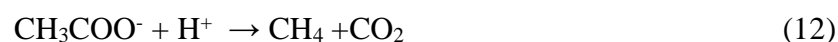
Reaktsioonidest saadud produkte saavad kasutada metanogeenid substraadina ja energiaallikana. Atsetogeneesi viivad läbi mikroorganismid nagu *Clostridium sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* ning hüdrolüüsis osalevad mikroorganismid. (Insam, et al. 2010; Merlin Christy, et al. 2014)

Vesiniku kontsentratsiooni suuremine reaktsioonikeskkonnas põhjustab metanogeenide poolt mittetarbitavate elektronide allikate akumulereerumise. Neid lagundavad edasi atsetogeensed bakterid ja seda faasi nimetatakse atsetogeenseks ehk käärimisfaasiks. (Merlin Christy, et al. 2014) Mikroorganismid perekondadest *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Clostridium* ja *Acetobacterium* muudavad pikema ahelaga orgaanilised happed ja alkoholid äädikhappeks ja molekulaarseks vesinikuks ( $\text{H}_2$ ). (Kriipsalu, et al 2016) Atsetogeenid kasutavad erinevaid elektron doonoreid (süivesikuid, lühikeseahelaga rasvhapped, alkoholid) ja aktseptoreid ( $\text{CO}_2$ , prootoneid, fumarate, püruvaate) ja tekitavad seega mitmeid produkte peale atsetaadi. (Angelidaki, et al. 2011; Merlin Christy, et al. 2014)



Moodustunud atsetaati ja vesiniku kasutavad metanogeenid järgmises faasis toimuva metanogeneesi käigus. Käärimisfaasis vabanenud vesinik on atsetogeneesi läbi viivatele mikroorganismidele toksiline. Toksilisusega toimetulekuks on kujunenud süntroofia atsetogeensete bakterite ja autotroofsete metanogeenide vahel. Atsetogeensed bakterid on ranged anaeroobid, nende optimaalne pH on umbes 6. Nad kasvavad aeglaselt ja on tundlikud keskkonnamuutuste suhtes. Atsetogeneesi faas on tähtis, sest see määrab ära biogaasi tootmise efektiivsuse (Angelidaki, et al. 2011; Merlin Christy, et al. 2014)

Metanogeneesi faasis toodavad metanogeensed arhed metaani. Metaani moodustamise kolm peamist etappi on järgmised: hüdrogenetroofne metanogenees, atsetoklastiline metanogenees ja metüülotroofiline metanogenees. Hüdrogenetroofses metanogeneesis redutseeritakse süsinikdioksiidist ja vesinikust metaani (reaktsioon 11). Atsetoklastilises metanogeneesis lõhustatakse atsetaat metaaniks ja süsinikdioksiidiks (reaktsioon 12). Metüülotroofses metanogeneesis kasutatakse atsetaadi asemel substraadina metüleeritud C1 ühendeid (metanooli, metüülamiini, dimetüülsulfiidi jne) ja muundatakse need metaaniks (reaktsioon 13). (Angelidaki, et al. 2011)



Enamus metanogeneesi käigus eralduvast metaanist toodetakse heterotroofsete metanogeenide poolt ning 30% eralduvast metaanist hüdrogenetroosfel metanogeneessil süsinikdioksiidi taandamisel. (Angelidaki, et al. 2011)



## 4. Töö eesmärk

Töö eesmärk on uurida purustatud e-romu ehk elektri- ja elektroonikajäätmete bioloogilise töötlemise võimalusi, et teada saada, kas selline bioloogiline töötlemisviis sobib nende ulitiliseerimiseks, ning kindlaks teha, missugused mikroorganismid peavad vastu anaeroobsetes ja aeroobsetes tingimustest. E-romu pärineb Hispaania firmalt Reydesa Ltd, kellega firma BiotaTec OÜ teeb projekti raames koostööd.. Tavapäraselt kasutatakse metallide bioleostamiseks autotroofseid mikroorganisme, nt *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* jt. Firma BiotaTec OÜ on välja töötanud metallide leostamise kaheastmelise protsessi, mille abil on e-jäätmete mittemetallilistest fraktsioonidest võimalik välja leostada väärtuslikke metalle. Samuti võimaldab see e-jäätmete orgaanilistest fraktsioonidest anaeroobse protsessi abil biogaasi toota.

## 5. Materjalid ja meetodika

Magistritöö raames teostati katseid anaeroobsetes ja aeroobsetes tingimustes 20-liitrise reaktoris. Anaeroobse etapi katseid tein sügisel. Aeroobseid katseid tehti anaeroobsete katse produktiga alates jaanuarist 2021. Mõlemad katsed tein koostöös firmaga BiotaTec OÜ..

### 5.1. Anaeroobsed katsed

Reaktori katse alustamiseks tehti kõigepealt katseid Oxitop®-i tüüpi süsteemi abil. Süsteem koosneb kolmest osast: hermeetiliselt suletavast katseklaasist, mis oli kaetud manomeetrilise mõõteseadme korgiga ning külgedel hermeetiliste korkidega. Küljekorke kasutati proovide võtmiseks vedel- ja gaasifaasist. Rõhumõõtmisseadmega loeti korkide peal asuvast mõõtjast andmeid ja need kanti analüüsimiseks arvutisse üle. Mõõdetavad parameetrid olid katsetes katsepudelisisene rõhk ja gaasisegu koostis, mille abil oli võimalik koostada mikroorganismide kasvukõver. Anaeroobsel lagunemisel eralduv gaas tõstis rõhku katseklaasis. Proovipudelites saavutati anaeroobsus argooni läbipuhumisega enne katse alustamist. Kultiveerimiskeskkonnana kasutati R2A vedelsöödet, mis autoklaaviti koos katsepudelitega. (Menert. T, 2015)

#### 5.1.1. Anaeroobse katse inokulum

Oxitopi katse alustamisel oli kõigepealt vajalik teha kaalutuste arvutamine. Valmistati ette neli katseklaasi. Kahte katseklaasi lisatati e-romu ja kahte mitte. Katseklaase, kuhu romu ei lisatud, olid

*blankid*. See on vajalik, et näha, kuidas rõhk katseklaasis muutus. Katseproovidesse lisatud komponendid on välja toodud tabelis 2.

**Tabel 2.** Katsepudelitesse lisatud komponendid

Komponendid	600 ml	150 ml
E-romu	6 gr	1,5 gr
NaHCO <sub>3</sub>	1,51 gr	0,38 gr
Betaiin	0,81 gr	0,2 gr
Tsüsteiin	0,27 gr	0,068 g
Na <sub>2</sub> S	0,135 gr	0,034 gr

Komponendid viidi sôotmesse 0,2 µm poorisuurusega filtriga (Sartorius Minisart Syringe Filter). Betaiin ja NaHCO<sub>3</sub> on sôotme süsinikuallikad ja metonogeneesi substraadid. Tsüsteiin ja Na<sub>2</sub>S on anaeroobse keskkonna tekitajad. Tõmbekapi all lisati vajalikud ained katseklaasidesse. Kõige lõpus lisati e-romu ja inokulum. Inokuleerimiseks kasutati –80 kraadi juures glütseroolis säilitatud kooslust 5A. Inokulume kasvatati ette neli päeva. Anaeroobsuse saavutamiseks katse alguses puhuti katseklaasie argooniga, sest see surus välja katsepudelis oleva õhu. Argoon on inertne gaas, mis tähendab, et ta ei reageeri teiste katses olevate komponentidega. Argooniga puhuti katseklaase läbi umbes 5 minutit. Keskkonna segamiseks ja sobiva temperatuuri säilitamiseks viidi katseid läbi termostateerivas loksutis (t=37°C, 100 pöoret minutis). (Menert. A, 2020)

### 5.1.2. Anaeroobsete katsete proovide kogumine

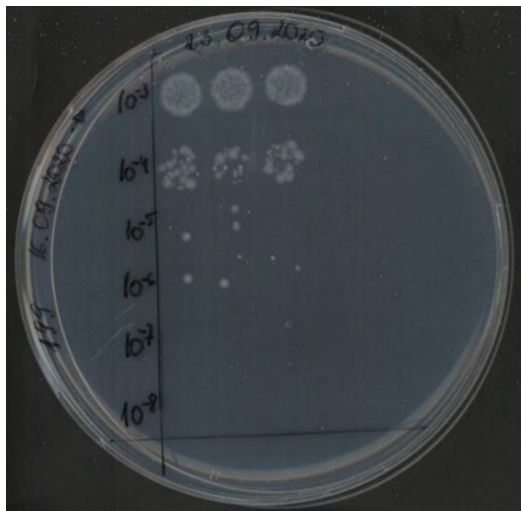
Katseid mõõdeti iga päev Oxitop®-i mõõtjaga ning võeti vedelikuproov. Gaasiproov võeti vajadusel, kui katsepudelis oli rõhk muutunud piisavaks. Gaasiproovi jaoks oli vaja tihendit, mis ühendab vakumeeritud pudelit ja katseproovi. Kõigepealt on vaja avada vakumeeritud pudeli kraan ning siis proovi kraan. Ettevaatlikult tuleb avada katsekraan, et gaas liiguks pudelisse. Seejärel tuleb katseproov üle mõõta dataloggeriga. Vedelikuproovi jaoks valmistati tõmbekapp ette, viies sinna vajalikud esemed.

Vedelikuproovi oli vaja koguda 1,5 ml. Seda tehti süstlaga ning proov pandi epsidesse, mis oli varem märgistatud katse numbri ja kuupäevadega. Märgistatud epsid viidi külmkappi, kus vedelikuproovid säilisid  $-24^{\circ}\text{C}$  juures. See oli vajalik edasiste mikroorganismide külvamiste jaoks.

### 5.1.3. Mikroorganismide arvukuse määramine

Oxitopi katses määrati elurakkude arvukust kaudselt, kasutades väljakülvi meetodit. Katsetest võetud vedelikufaaside proovid külvati detsimaalsete lahendustega R2A söötmega tassile. Kolooniaid moodustavate ühikute loendamise (*colony forming unit* ehk CFU/ml) abil leitud kolooniade arvukuse kohta koostati Exceli tabel, kus on näha mikroorganismide arvukuse muutus ajas. Lahjendused tehti vahemikus  $10^{-3}$  kuni  $10^{-8}$  kolmes paralleelses korduses ning kolooniaid loendati visuaalselt (joonis 14). Väljakülvid viidi termokappi ( $t=37^{\circ}\text{C}$ ) ning 24 tunni möödudes vaadeldi, kas Petri tassidel on toimunud üleskasv. Kui üleskasv puudus, viidi tassid tagasi termokappi. (Heinaru & Naanuri, 2011)

Reaktori katses kasutati kolme erinevat väljakülvi meetodit: tilkkülv (ingl *drop-plate*), pindkülv (ingl *spread-plate*) ja süviskülv (ingl *pour-plate*). Tilkkülviga külvatakse söötmepinnale ehk Petri tassile 12 tilka ja selleks kasutatakse 10  $\mu\text{l}$  pipetti. Oluline on, et peale külvamist tilkkülvet ei liigutata enne, kui vedelik on imendunud söötmesse. Pindkülv korral kasutatakse spaatlit, mille abil hõõrutakse vedelfaasi tilk söötmesse. Enne spaatli kasutamist steriliseeritakse see etanoolis ja tõmmatakse läbi gaasileegi. Spaatel jahutatakse Petri tassi kaane vastu ja alles jahtunud spaatliga hõõrutakse inokulum agarplaadil laiali. Süviskülv meetodil valatakse vedelsööde Petri tassile. Vedelsööde on temperatuuril 50 kraadi ja kogus, mis tassile valatakse, on 15-20 ml. Sööde valatakse tassile ja suletakse Petri tassi kaanega, samal ajal segatakse vedelfaasi tilk söötmesse, tehes tõmbekapi laual ringikujulisi liigutusi. Söötteks kasutatakse R2A (koostis: 0,5 g/l pärmiekstrakti, 0,5 g/l peptooni, 0,5 g/l CAA, 0,5 g/l glükoosi, 0,5 g/l tärklist, 0,3 g/l Na-püruvaati, 0,3 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05 g/l  $\text{MgSO}_4$ , 15 g/l agarit) (Heinaru & Naanuri, 2011)



**Joonis 13.** Mikroorganismide arvukuse määramine väljakülvi meetodil

Mikroorganismide arvukuse määramiseks arvestati keskmist kolooniate arvu, lahendusfaktorit ja külvimäära. Kolooniate loendamine tugineb sellel, et ühest mikroorganismist kasvab välja silmaga nähtavad kolooniaid (vt joonis 13). Lahendusfaktor leitakse (Heinaru & Naanuri, 2011):

$$\text{Lahendusfaktor} = \frac{\text{proovi maht (ml) või kaal (g)} + \text{lahendusvee hulk (ml)}}{\text{proovi maht (ml) või kaal (g)}}$$

Arvukust väljendatakse kolooniaid moodustavate ühikutena (CFU) 1 ml algproovi kohta. Arvukus leitakse valemi järgi (Heinaru & Naanuri, 2011):

$$\text{Arvukus} \left( \frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{kolooniate arv (CFU)} * \text{lahendusfaktor}}{\text{külvimäär (ml)}}$$

#### 5.1.4. Rõhu tõus

Oxitop®-i mõõtja pea mõõdab katseklaaside korkide andurite abil rõhku. Rõhku mõõdetakse hektopaskalites (1 hPa = 102; Pa = 1 mbar). Rõhu muutustest sõltuvalt saab arvutada vabanenud gaasihulka valemiga  $pV = nRT$ , kus

$p$  – gaasi rõhk, N/m<sup>2</sup> või hPa

$V$  – gaasi ruumala, m<sup>3</sup>

R – universaalne gaasikonstant ( $R= 8,314 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ )

T – gaasi absoluuttemperatuur, K

n – moolide arv, gaasi normaaltingimustel  $n=1$  vastab 22,4 l

Oxitopi andmehõive seadme toorikfaili andmetest saab Exceli tabelis arvutada katsepudelis oleva kumulatiivse rõhu (hPa). Kumulatiivset rõhku saab arvutada  $P_{\text{sum},t} = P_{\text{sum},t-1} + P_t - P_{t-1}$ , kus

$P_{\text{sum},t}$  – eelmise katsepunkti kogurõhk, hPa

$P_t$  – praeguse katsehetke rõhk, hPa

$P_{t-1}$  – rõhu hetkeväärtus katse eelnevas punktis, hPa

Gaasi koostis määratakse hiljem gaaskromatograafia Eesti Maaülikoolis.

## 5.2. Reaktorikatse

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

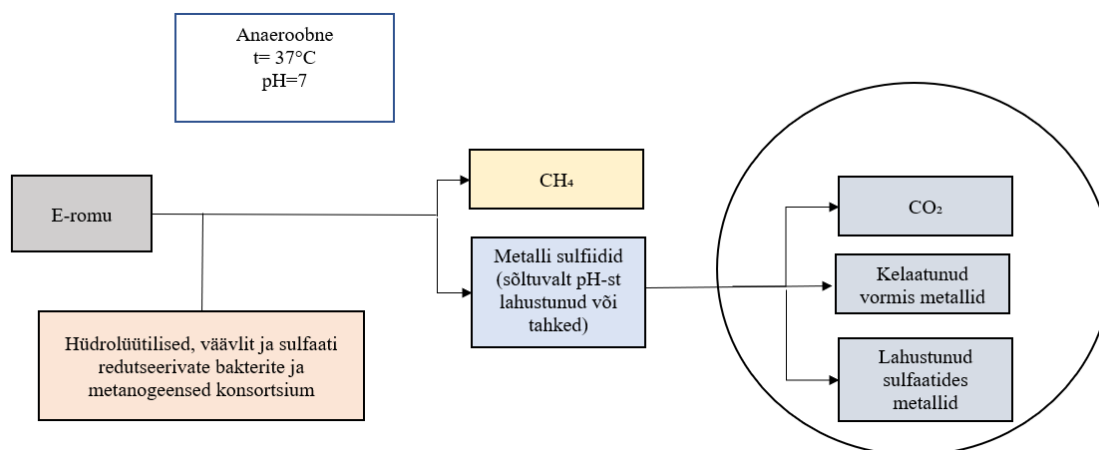
**Tabeli 3.** Reaktori katse jaoks vajalikud komponendid

Komponendid	20 l reaktor
E-romu	150 gr
R2A sööde	45 gr
Betaiin	20,25 gr
$\text{NaHCO}_3$	37,8 gr
$\text{Na}_2\text{S}$	3,375 gr
Tsüsteiin	6,75 gr
Inokulum	600 ml

Katse alustamisel võeti reaktorist liiter destilleeritud vett ( $H_2O$ ), et lahustada vajalikud komponendid enne nende lisamist reaktorisse. Reaktori pH enne komponentide lisamist oli 6,6. Kõigepealt lisati katsesse e-romu, järgmisena  $NaHCO_3$ , mille järel keskkonna pH tõusis 8,28 juurde. Seejärel lisati betaiini, peale seda lisati juurde R2A söödet ning pH langes. Peale söötme lisamist valati keskkonda tsüsteiini ja peale seda inokulum. Kõige viimasena lisati juurde  $Na_2S$ . Seejärel puhuti argooniga reaktori katse läbi. Kui kõik vajalikud toorained olid lisatud, oli keskkonna pH reaktoris 7,79. Katsest võeti vedeliku- ja gaasiproov. Katse tähistati numbriga 200.

Reaktori katset alustati 29.09.2020 ja see lõpetati 26.10.2020. Katse alguses võeti vedelikufaasi proove pidevalt, gaasiproove vastavalt vajadusele, kui andur näitas, et gaasi on piisavalt reaktoris. 07.10.20 oli reaktori pH tõusnud, mis oli vajalik metanogeenide tööks. Ideaalne pH kasvukeskkond metanogeenidele on 7,2.

Kultiveerimiseks ja söötme optimeerimiseks valiti esimeseks faasiks anaeroobne protsess. Orgaanilise aine lagundamisel tekib anaeroobsetes tingimustes metaani. Anaeroobse kääritamise bioleostumise faasi skeem (joonis 14) reaktoris.

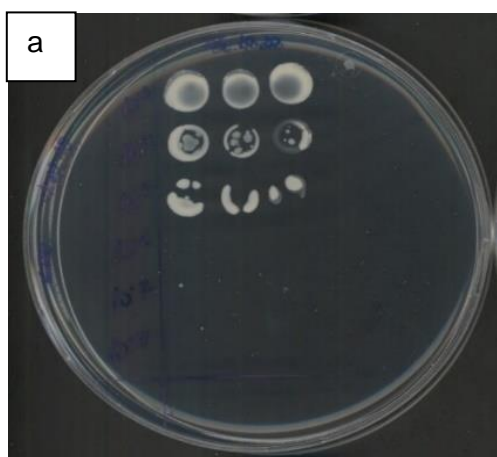


**Joonis 14.** Anaeroobse protsessi skeem (ringiga osa kasutatakse aeroobses reaktori katses)

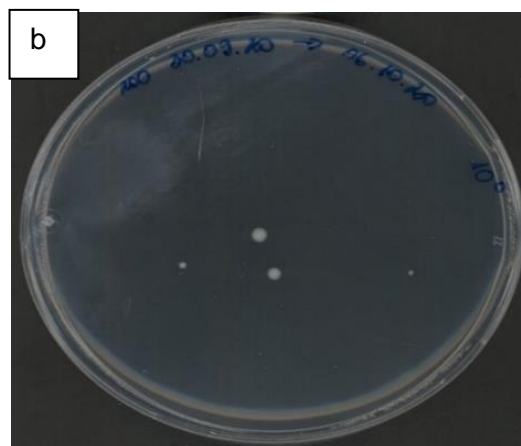
### 3.2.1. Mikroorganismide arvukus reaktoris

Alguses kasutati tilkkülvi meetodit, aga kahjuks see ei andnud vastavaid tulemusi. Bakterikultuurid kasvasid küll tassile, aga neid kolooniaid ei olnud võimalik loendada ja silmaga eristada (joonis 15 a).

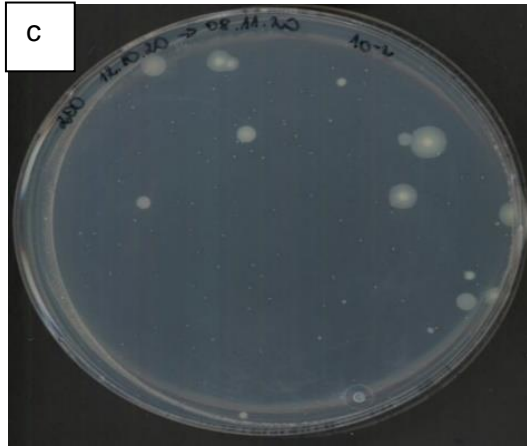
Bakterikultuuri, mida ei saa silmaga eritada, kutsutakse muruks. Joonisel 15 a on võimalik vaadelda, et lahjendusastmetel  $10^{-3}$  kuni  $10^{-5}$  on näha kolooniaid, kuid neid ei ole võimalik silmaga eristada ja kokku lugeda. Oluline oli katse käigus teada saada, kuidas ja kui palju bakterikultuure reaktoris on. Järgmiseks meetodiks oli pindkylv. Pindkylv ei andnud loodetud tulemusi. Tassile kasvasid bakterikultuurid, aga kahjuks ei olnud võimalik neid silmaga eristada ja visuaalselt loendada (joonis 15 b). Sel meetodil tehti lahjendused vahemikus  $10^0$  kuni  $10^{-2}$ . Süviskülvivi meetod andis vajalikud tulemused bakterikolooniate loendamisel. Tassilt sai neid silmaga eristada ja kolooniaid loendada (joonis 15 c). Kõik vedelfaasis võetud katseproovid külvati kuupäevade järgi ja erinevate lahjendusfaktoritega tassidele. Lahjendusvahemik, mis selles külvis tehti, oli  $10^0$  kuni  $10^{-6}$ .



Bakterid külvatud tardsöötmele tilkkülvi meetodiga



Bakterid külvatud tardsöötmele pindkülvi meetodiga



Bakterid külvatud tardsöötmele  
süviskülvi meetodiga

**Joonis 15.** Bakterid külvatud tardsöötmele erinevate meetoditega



### 5.2.1. Gaasiproovid

Gaasiproovide gaasikoostise määras Kaja Orupõld Eesti Maaülikoolis gaaskromatograafia Varian Inc., Model CP-4900 (metaani määramispiirkond 0-100%). Varian Inc., Model CP-4900 on varustatud kahe kolonniga: Molsieve 5A Backflush kuumutatud kolonn (20 m x 0,53 mm), kus kandjagaasina kasutatakse argooni, ning PoraPLOT U kuumutatud kolonn (10 m x 0,53 mm), kus kandjagaasina kasutatakse heeliumi. Esimese kolonni sisestustemperatuur oli 110°C, kolonnitemperatuur 120°C ja rõhk 50 Psi. Teise kolonni sisestustemperatuur oli 110°C, kolonnitemperatuur 150°C ja rõhk 22 Psi. (Korb, 2016)

### 5.2.2. Metallianalüüs

Metallianalüüsid tehti Tartu Ülikooli Chemicumi laboris ja metallide sisalduse määras Päärn Paiste. 26.11.2020 viisin metallianalüüsid Chemicumi laborisse.

## 6. Aeroobse protsessi katse happelise kasvukeskonnaga

Enne aeroobse protsessi alustamist oli vaja ette kasvatada *Acidithiobacillus ferrooxidans* kolleksioonikultuuri kolleksioonist *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*. Valiti *A. Ferrooxidansi* mikroorganismi kultuur, sest see on üks enim kasutatavaid mikroorganisme metallide bioleostamiseks e-romust.

### 6.1. Inokulumi ettekasvatamine

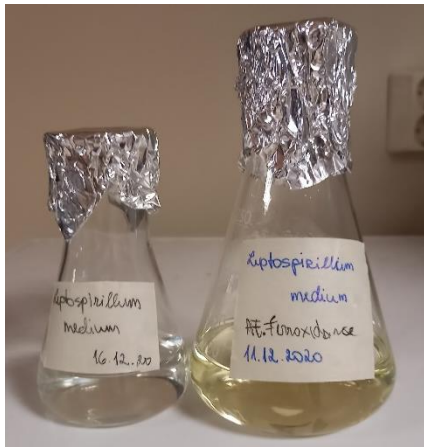
Kultuuri ettekasvatamine toimus kahes osas. Esimese kultuuri ettekasvatamist alustasin 11.12.2020 (joonis 16). Kolleksioonikultuuri inokuleerisin 100 ml *Leptosprillum mediumi* (Lisa 2) söötme kolbi. Söötmes algselt pH-d ei reguleerinud, seega pH oli ~ 1,5. Teise kultuuri ettekasvatamist alustasin 16.12.2020. Kolleksioonikultuuri inokuleerisin 50 ml *Leptosprillum mediumi* söötme kolbi. Selles söötmes reguleerisin pH-d NaOH-ga, pH oli söötmes ~ 2,0. Otsus, miks pH-d oli vaja reguleerida, tulenes sellest, et *Acidithiobacillus ferrooxidans* kultuurile sobib paremini kõrgema pH-ga happeline keskkond.

*Leptosprillum mediumi* söötme valmistamiseks oli vajalik katsekolbid ära autoklaavida. Söötme jaoks arvutasin vajalikud lahused. Tabelis 4 on toodud vajalikud lahuste kogused. Lahused A ja B mõõtsin eraldi falkonitesse ja lahuse C lisasin kolbi pipetiga.

**Tabel 4.** *Leptospirillum medium* söötme kogused

Lahuste kogused	100 ml	50 ml
Lahus A	95 ml	47,5 ml
Lahus B	5 ml	2,5 ml
Lahus C	100 µl	50 µl

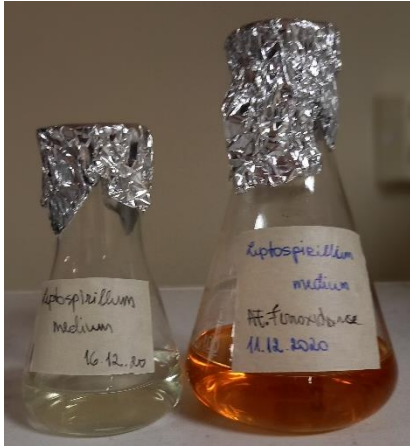
Peale söötme valmistamist inokuleerisin kultuuri söötmesse. Mõlemad söötmed kasvasid termokapis 25 kraadi juures. Esimesena ettekasvatatud sööde oli termokapis 26 päeva, pärast 24 päeva olid bakterid saavutanud optimaalse kasvu. Teisel katsepäeval oli söötmes pH langenud üheni. PH tõus toimus alles 17. päeval, ku pH oli muutunud ~ 1,5. Katse 26. päevaks oli pH muutunud 1,8.



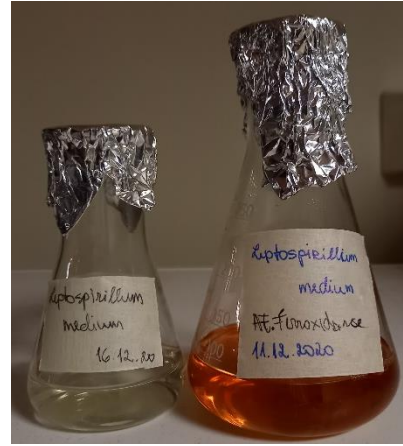
*Leptospirillum medium* söötmesse inokuleeritud *At. ferrooxidans* 6. katsepäeval



*Leptospirillum medium* söötmesse inokuleeritud *At. ferrooxidans* 20. katsepäeval



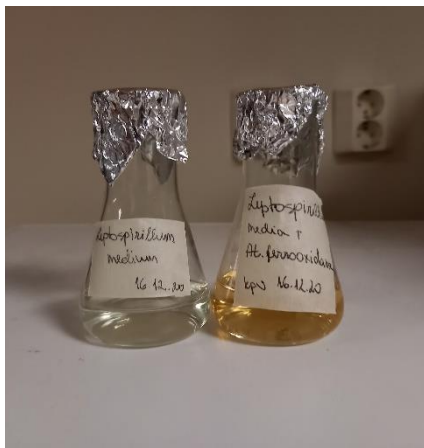
*Leptospirillum medium*  
söötmesse inokuleeritud *At. ferrooxidans* 24. katsepäeval



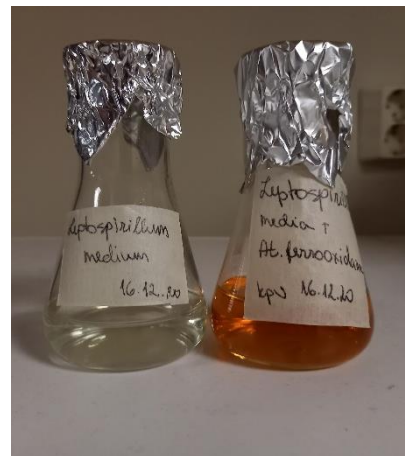
*Leptospirillum medium*  
söötmesse inokuleeritud *At. ferrooxidans* 26. katsepäeval

**Joonis 16.** 11.12.20 külvatud söötme värvuse muutus ajas

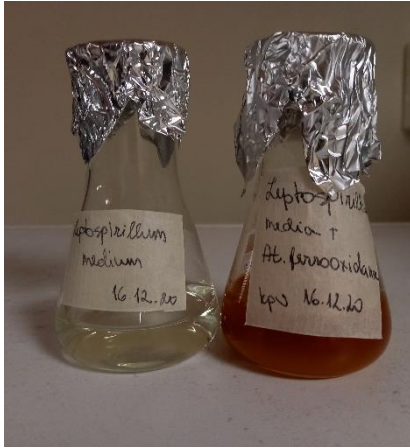
Inokolum, mis pandi kasvama 16.12.20 (joonis 17). Selles katses reguleerisin söötme pH 2-ni. Võrreldes esimese söötmega, kasvas pH 2-ni reguleeritud *At. Ferrooxidans* kultuur kiiremini. Katse oli termokapis 21 päeva, pärast 19. päevad olid bakterid saavutanud optimaalse kasvu.



*Leptospirillum medium*  
söötmesse inokuleeritud *At. ferrooxidans* 7. katsepäeval



*Leptospirillum medium* söötmesse  
inokuleeritud *At. ferrooxidans* 15.  
katsepäeval



*Leptospirillum medium*  
söötmesse inokuleeritud *At. ferrooxidans* 19. katsepäeval



*Leptospirillum medium*  
söötmesse inokuleeritud *At. ferrooxidans* 20. katsepäeval

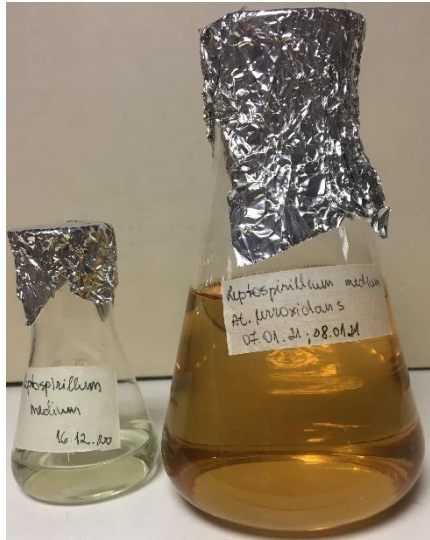
**Joonis 17.** 16.12.2020 külvatud söötme värvuse muutus ajas

Detsembri keskel alustatud söödet oli kahe katse peale kokku 123 ml. Selleks ajaks olid mõlemas katses bakteritel saavutatud eksponentsiaalne kasvufaas, et katsega edasi minna. See inokulum oli vajalik reaktorikatse inokulumi söötme ettekasvatamisel. Reaktorikatse jaoks oli vaja söödet ette kasvatada kolm kolbi, mille mahuks oli 400 ml. *Leptospirillum medium* söötme (tabel 5) pH-d reageerisin NaOH-ga. Katsega alustasin 08.01.21 ning katse kestis 12 päeva.

**Tabel 5.** *Leptospirillum medium* söötme kogus 400 ml

Lahuse kogus	400 ml
Lahus A	380 ml
Lahus B	20 ml
Lahus C	400 µl

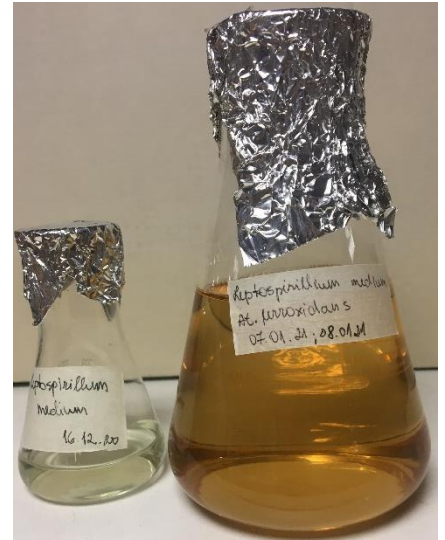
*Leptospirillum medium* söötme valmistasin 07.01.21, kahjuks said samal päeval otsa pH-ribad ning ma ei saanud söödet reguleerida. Boksi all valasin kokku 100 ml ja 50 ml inokulumid. Edasi jagasin 41 ml inokulumi võrdselt kolme kolbi. Inokulumi valasin söötmesse 08.01.2021. Kolme katse peale kokku saavutasid mikroorganismid oma optimaalse kasvu üheksandal või kümnendal katsepäeval. Joonisel 19 olev pilt on tehtud 19.01.21.



Edasikülv kolbi A  
11. katsepäev



Edasikülv kolbi B  
11. katsepäev



Edasikülv kolbi C  
11. katsepäev

**Joonis 18.** 08.01.21 kolme erinevasse kolbi külvatud *At. ferrooxidans* kultuur reaktori katse jaoks

## 6.2. Biomassi määramine

Bakteriaalse kasvu alla mõistetakse mitte ainult raku jagunemist, vaid ka rakumassi suurenemist, mis on seotud kogu rakumaterjali sünteesiga. Kui biomassi suurenemine on proportsionaalne rakkude arvukusega, siis on tegemist balansseeritud kasvuga. Nimelt suureneb lag-faasis raku biomass ilma rakkude arvu kasvuta ja logaritmilises kasvufaasi lõpus toimub raku suuruse vähenemine ning tõuseb põhiliselt rakkude arv. (Heinaru & Naanuri, 2011)

Oma töös kasutasin biomassi määramiseks kaudset meetodit, milleks on raku suspensiooni hägusus. See biomassi määramise viis põhineb spektrofotomeetrilisel meetodil, mis võimaldab määrata mikroobset biomassi küllalt täpselt ja kiiresti. Meetod põhineb suspensioonis olevate rakkude poolt põhjustatud valguse neeldumise mõõtmisel, kus neeldud valguse hulk on proportsionaalne rakkude arvuga. (Heinaru & Naanuri, 2011)

Standardsetest tingimustes nimetatakse neeldumist optiliseks tiheduseks (*optical density*) ehk OD-ks. Alaindeksiks olev arvuline väärtus näitab mõõtmiseks kasutatavat lainepikkust. Valguse lainepikkus peab olema valitud selline, et oleks tagatud maksimaalne absorptsioon. Mikroobisuspensioonide

hägusust mõõdetakse 420-660 nm juures. Pikemalainelist spektriosa kasutatakse põhjusel, et rakud neelavad seda valgust kõige paremini ja söötme värvuse segav toime on minimaalne. (Heinaru & Naanuri, 2011) OD määramisel kasutasin alaindeksina 580 nm. Optilise tiheduse väärtused ei anna otsest teavete rakkude arvukuse kohta, seetõttu loendasin baktereid üldise arvukuse määramiseks.

Vedelfaasist võtsin proove 1,5 ml, et määrata biomassi ja arvukust. 11.12.20 alustatud kultuuril võtsin proove 26 päeva ning 16.12.20 katselt võtsin 21 päeva proove biomassi määramiseks. Samamoodi määrasin biomassi ka 08.01.21 alustatud katsel. 11.12.20 katse puhul toimus mikroobiraku lag-faas 5.-17. katsepäeval. Sellel ajal hakkas suurenema raku biomass, ilma et toimuks veel rakkude eksponentsiaalne kasv. 24.-26. katsepäeval toimus logaritmiline kasvufaas, kus rakud jagunesid kiiresti. 16.12.20 katsel toimus rakkude lag-faas 7.-12. katsepäevadel ning logaritmiline kasvufaas 19.-21. katsepäevadel.

### 6.3. Arvukuse määramine vedelfaasis

Vedelfaasis olevate *At.Ferrooxidans* kultuuri otsese arvukuse määramiseks kasutasin loendamist loenduskambris. Otsene arvukuse määramine mikroobipopulatsioonist teostatakse spetsiaalsete loenduskambrite abil. Loenduskambrid on paksemad mikroskoobi alusklaasid, mille pinnale on graveeritud kahesuguse suurusega ruudukesed: suuremate pindala on 0,04 mm<sup>2</sup> ja väiksematel 0,0025 mm<sup>2</sup>. Ruudustik asub süvendis, mille kõrguseks on 0,1 mm. Tagamaks ühtlast suspensioonikihi paksust, kaetakse kamberkatteklasega nii, et see liibuks tihedalt vastu alusklaasi lihvitud pinda ja servadele tekiks nn Newtoni rõngad. Kambri täitmiseks asetatakse suspensiooni tilk ettevaatlikult katteklase serva juurele nii, et see imenduks kambrisse. Üleliigse suspensiooni kogunemiseks ja ärajuhtimiseks on klaasplaadile graveeritud kanalid. (Heinaru & Naanuri, 2011)

Loenduskamber mikroskoobitakse kuivsüsteemis 40-kordse suurendusega. Vastavalt rakkude tihedusele loendatakse rakud kas suuremates või väiksemates ruutudes. Loendamisele kuuluvad kõik rakud ruudu sees ja lisaks neile veel kahele ruudu piirile jäävad rakud. Statistiliselt on korrektne, kui rakkude arvukus väikses kambris oleks ~ 10 ja suuremas ~ 30 raku. (Heinaru & Naanuri, 2011) Mina loendasin rakke väiksemates ruutudes, sest rakkude tihedus oli väiksem.

11.12.20 katses saavutas bakterikultuur eksponentsiaalse kasvufaasi 24. päeval. 16.12.20 katses saavutas kultuur eksponentsiaalse kasvu 19. päeval. Reaktorikatseks saavutas bakterikultuur oma eksponentsiaalse kasvu üheksandal või kümnendal katsepäeval.

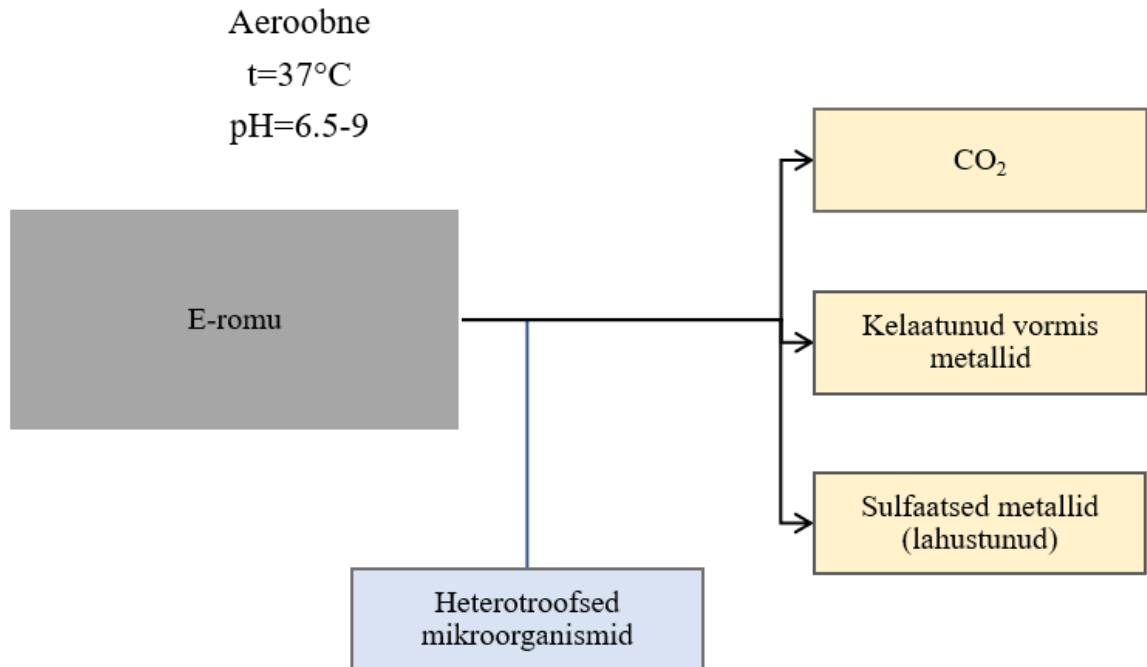
#### 6.4. Reaktorikatse

Aeroobse reaktorikatse jaoks oli vaja kasvatada ette *At. Ferrooxidans* kultuuri. 20 reaktori katsesse alustati kultuuri ettekasvatamist 08.01.21. Reaktori katse käivitati 20.01.21 koos firmaga BiotaTec OÜ ja katse lõppes 04.04.2021. Tabelis 6 on kirjas vastavad toorained, mis mõõdeti välja.

**Tabeli 6.** Reaktorikatse jaoks vajalikud komponendid

Komponendid	20 l reaktor
Anaeroobse katse jääk (e-romu)	150 gr
Lahus A	14250 ml
Lahus B	750 ml
Lahus C	1,5 ml
Inokulum	11572,25 ml

Kõigepealt lisati reaktorisse anaeroobse katse jääk (e-romu), seejärel valati katsesse lahus A, B ja C ning kõige viimasena lisati inokulum. Aeroobses katses (joonis 19) oli temperatuur 37 kraadi ning pH vahemikus 6,2-9. Katses võeti perioodiliselt vedelikuproove ning pH-d mõõdeti *online*-mõõtmise kaudu. Katse tähistati numbriga 207. Võetud vedelikuproovid külvati edasi Petri tassile, et määrata organismide arvukust reaktoris. Temperatuur püsis konstantsena reaktoris. PH saavutas optimaalse taseme 5 päevaga (pH 3,8) edasi langes pH kuni 1,5-ni.

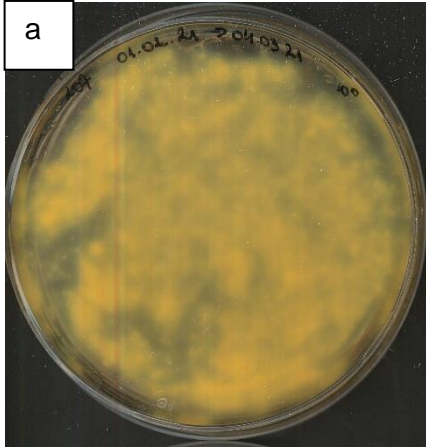


**Joonis 19.** Reaktori aeroobne katse

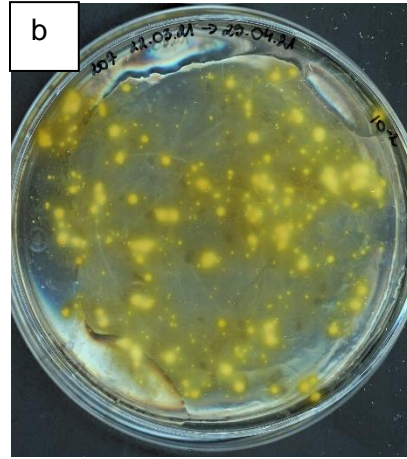
#### 6.2.1. Mikroorganismide arvukuse määramine

Vedelikufaasis võetud proovid külvati Petri tassile, millele oli tehtud *Leptosprillum* ja agarooši sööde. Söötme valmistamine on toodud välja Lisa 1. Külvamiseks kasutasin pindkülvi meetodit lahjendusastmel  $10^0$ - $10^{-3}$ . *Leptosprillum* + agarooši tardsöötme korral peab ootama, kuni spaatel on maha jahtunud (2-3 minutit). Vastasel korral, kui on spaatel liiga kuum ning hakatakse inokulumi agarplaadil laiali hõõruma, läheb tardsööde katki. Suuremal osal tassidel lahjendusastmega  $10^0$ - $10^{-1}$  ei olnud võimalik lugeda kolooniaid (joonis 20 a). Lahjendusastmetel  $10^{-2}$  ja  $10^{-3}$  oli võimalik kolooniad silmaga eristada ja neid loendada (joonisel 20 b).





Katse 207 *At.ferrooxidans*  
kylvamine tardsöötmele  
pindkülvi meetodiga,  $10^0$



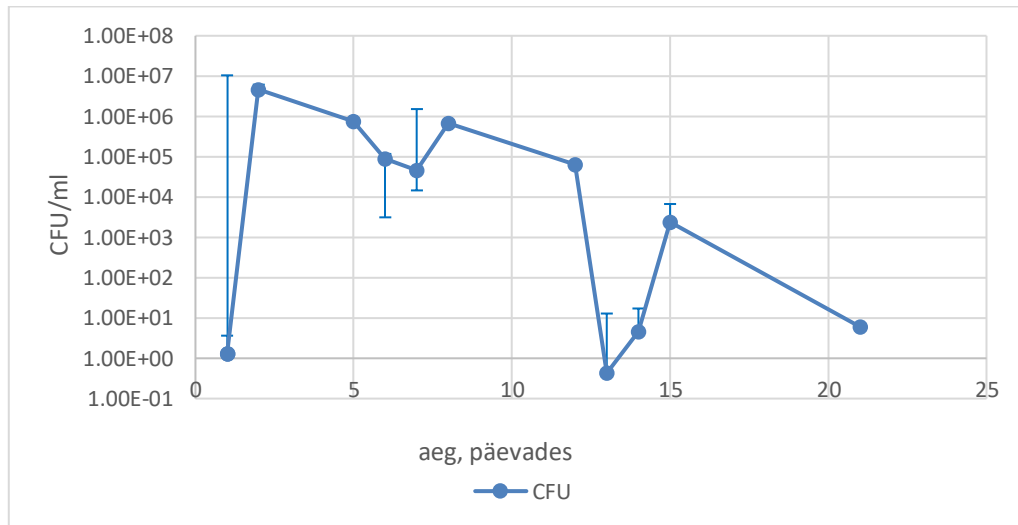
Katse 207 *At.ferrooxidans*  
kylvamine tardsöötmele pindkülvi  
meetodiga,  $10^{-2}$

**Joonis 20.** Reaktori vedelproovi edasikylv tardsöötmele

## 7. Tulemused

### 7.1. Mikroorganismide arvukus anaeroobses reaktoris

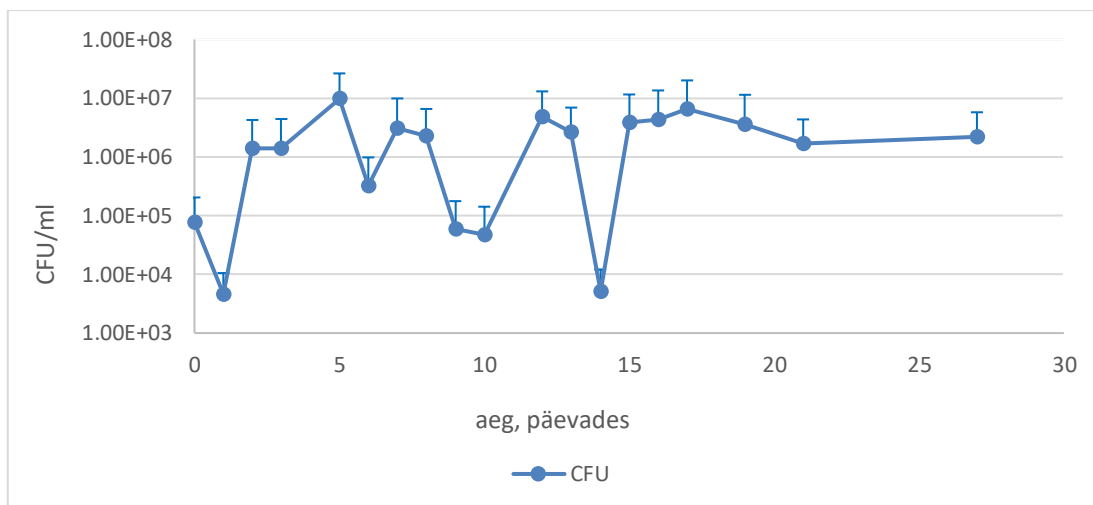
Reaktorikatses võetud vedelfaasi proove sai külvatud Petri tassile igal nädalal. Alguses tegin külve tilk- ja pindkülvivi meetodiga. Mikroorganismide arvukus on näha Exceli tabeli graafikult (joonis 21).



**Joonis 21.** Mikroorganismide arvukus tardsöötmele külvatud tilkkülv ja pindkülvivi meetodiga

Külvamise alguses tundus, et tilk- ja pindkülvivi meetod annab tulemusi, sest reaktoris oli aeroobseid mikroorganisme. Esimesed väljakülvid tegin 01.10.2020. Kahjuks olid need tassid tühjad ja viisin termokappi tagasi. 07.10.2020 sain tassidelt lugeda esimesi külve. Jooniselt 22 on näha aeroobsete mikroorganismide arvukust.

27.10.2020 hakkasin väljakülve tegema süviskülvivi meetodiga. Jooniselt 22 on näha, et alguses toimus anaeroobsetel mikroorganismidel lag-faas, kus toimub kohanemine uute keskkonnatingimustega. Lag-faas kestis umbes 5-6 katsepäeva. Statsionaarne faas on näha katse lõpu poole, kus mikroorganismide arvukus ei muutu otseselt ajas.



**Joonis 22.** Mikroorganismide arvukus tardsöötmele külvatud süviskülvi meetodiga

Tulemused näitasid, et reaktoris oli ka algselt aeroobseid baktereid. Süviskülvi meetodist sain loendada anaeroobseid mikroorganismide kasve. See tähendab, et reaktorisse olid tekkinud heterotroofsed fakultatiivsed anaeroobid ja metanogeensed arhed. Reaktori pH oli terve katse jooksul 7 ringis, mis on metanogeensetele bakteritele ideaalne.

## 7.2. Gaasiproovide tulemused anaeroobses katses

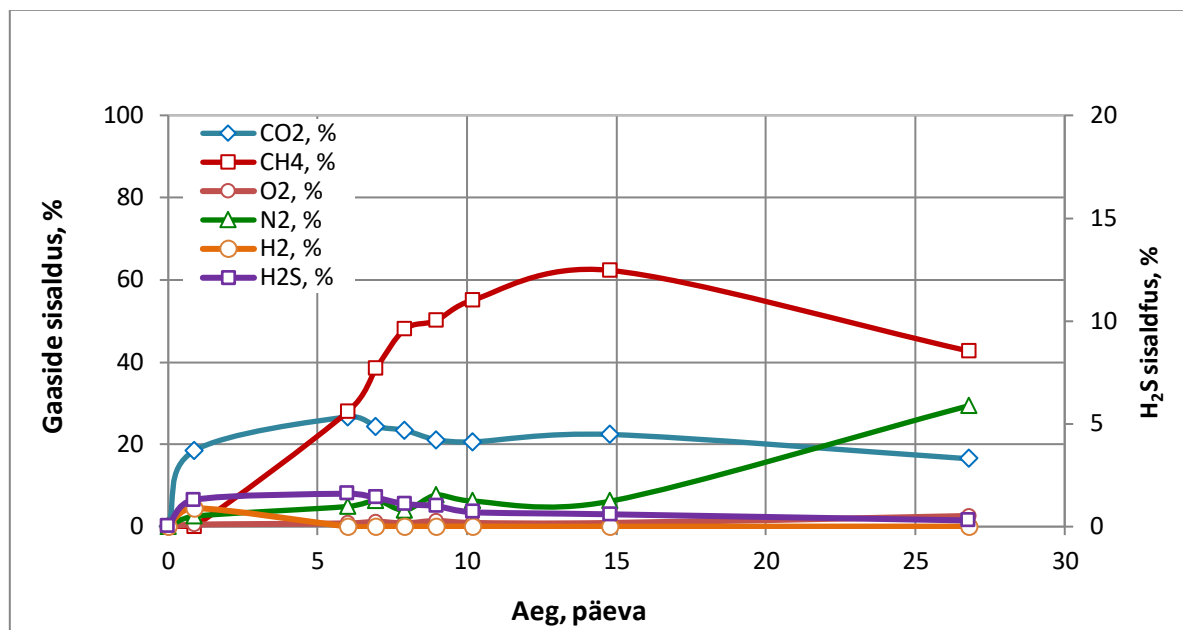
Anaeroobsete katsete gaasifaasi koostist analüüsiti gaaskromatograafia. Esimene gaasiproov võeti katse alguses. Kokku võeti 10 gaasiproovi. 18.10.2020 võetud gaasiproovi ei saanud kasutada, sest gaasipudelisse oli õhk sisse läinud. Puudus, mis katsest välja tuli, oli gaasiflitri ummistumine.

Gaasikoostise graafikult (joonis 23) on näha, et katse alguses sisaldas gaasifaas põhiliselt  $\text{CO}_2$ , mis viitab orgaanilise materjali lagunemisele.  $\text{O}_2$  koostis katse käigus on püsivalt madal, 9. katsepäeval on koostis 1,40%. Pärast 15. katsepäeva stabiliseerus  $\text{CO}_2$  sisaldus 16,50%. Alates 6. katsepäevast hakkas  $\text{CO}_2$  koostis vähenema ning domineerima hakkas  $\text{CH}_4$ . 8. katsepäeval moodustas  $\text{CH}_4$  48% eraldanud gaasist. Metaani eraldumine muutus väga intensiivseks 10.-15. katsepäeva möödudes ja maksimaalne  $\text{CH}_4$  sisaldus oli 62%.

$\text{N}_2$  sisaldus oli katsepäevade alguses kuni katse keskpaigani suhteliselt madal. Üllataval kombel pärast 15. katsepäeva tõuseb järsku  $\text{N}_2$  sisaldus koostises märgatavalt. Eksperimendi lõpuks on  $\text{N}_2$  üsna kõrge

– 29,40%. N<sub>2</sub> kõrge kontsentratsioon on seotud denitrifikatsiooni protsessiga, kus mikroorganismid kasutavad süsiniku allikana metanooli.

Gaasi koostises mõõdeti H<sub>2</sub>S kontsentratsiooni, mis anaeroobse sulfaadi redutseerimisega moodustub ning mis võib pärssida bioprotsesse. H<sub>2</sub>S koostis oli katse lõpus 0,02%.



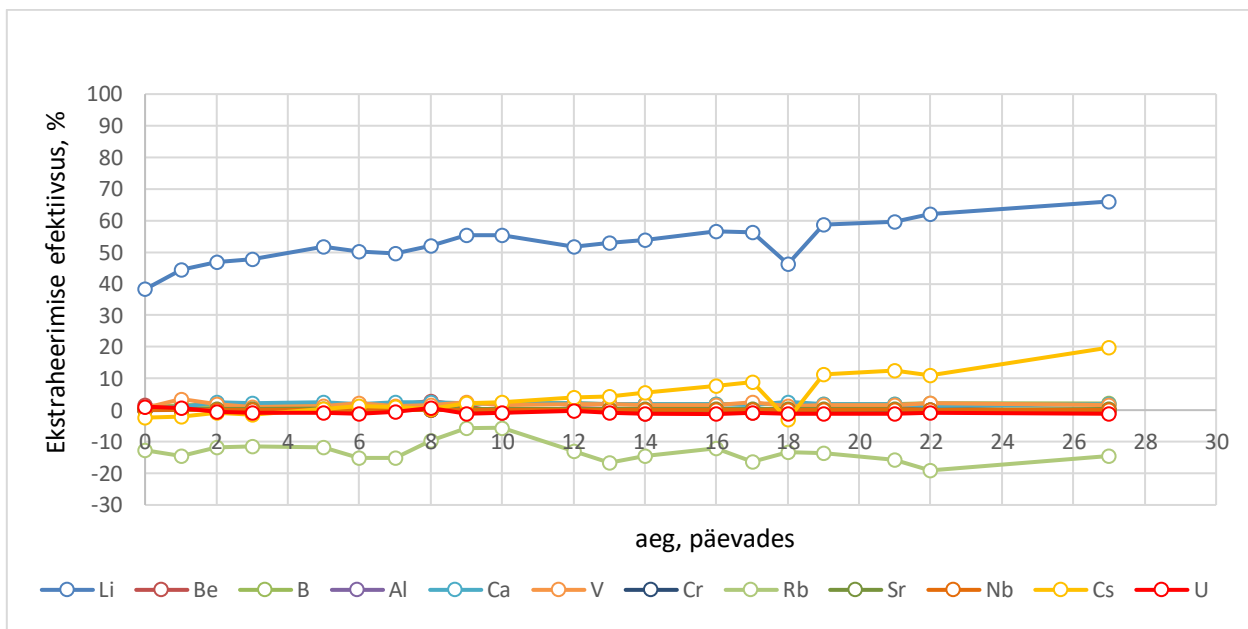
**Joonis 23.** Gaasifaasi koostis anaeroobses reaktorikatses

### 7.3. Metallianalüüsid anaeroobses katses

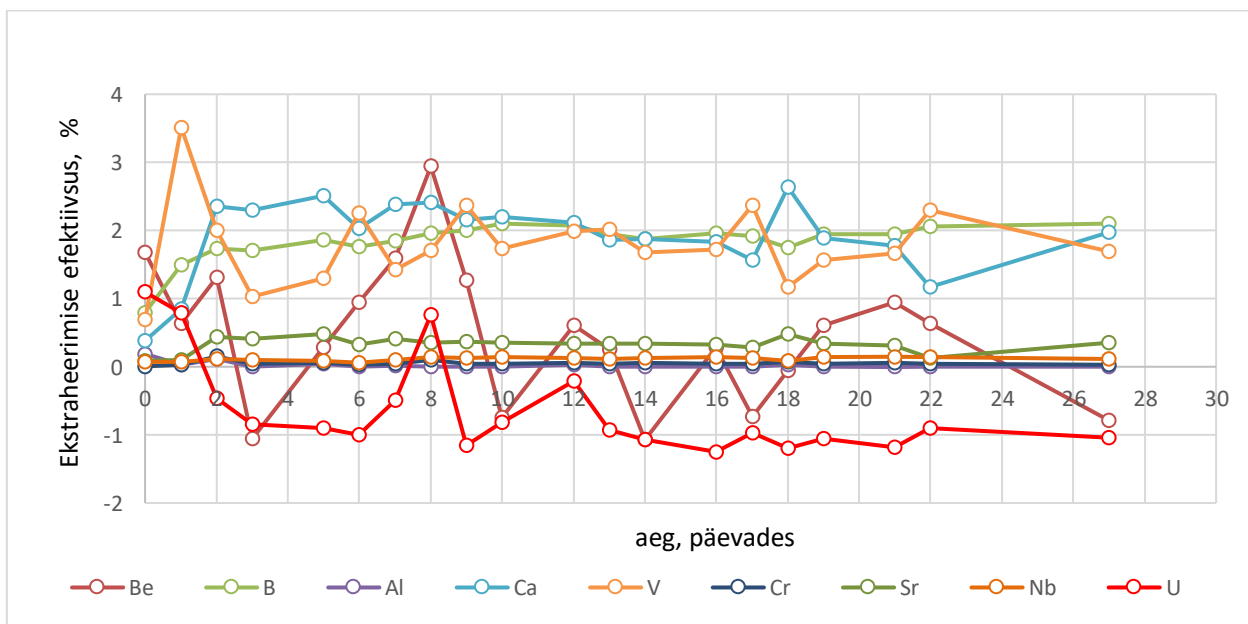
Metallianalüüside graafikud on rühmitatud keemiliste elementide järgi: litofiilseteks, siderofiilseteks, kalkofiilseteks ja atmofiilseteks metalliühenditeks.

Metallianalüüsides selgus, anaeroobses katses leostus kõige rohkem välja liitumit (Li). Kokku leostus Li välja 1055,18%. Graafikul (joonis 24) on näha litofiilsete metallirühmade väljaleostumine. Samalt jooniselt on näha, et rubiidium (Rb) ei leostunud üldse välja. Tseesiumit (Cs) alguses ei leostunud välja, alles 5. katsepäeval hakkas tseesiumi välja leostuma. Litofiilsetest metallirühmadest leostus kõige rohkem välja liitumit. Joonisel 25 on näha litosfiilseid metallirühmi, millest leostusid välja vanaadium (V), boor (B), kaltsium (Ca). Katse lõpuks oli vanaadiumi välja leostunud 36,19%, boori 37% ja kaltsiumi 38,26%.

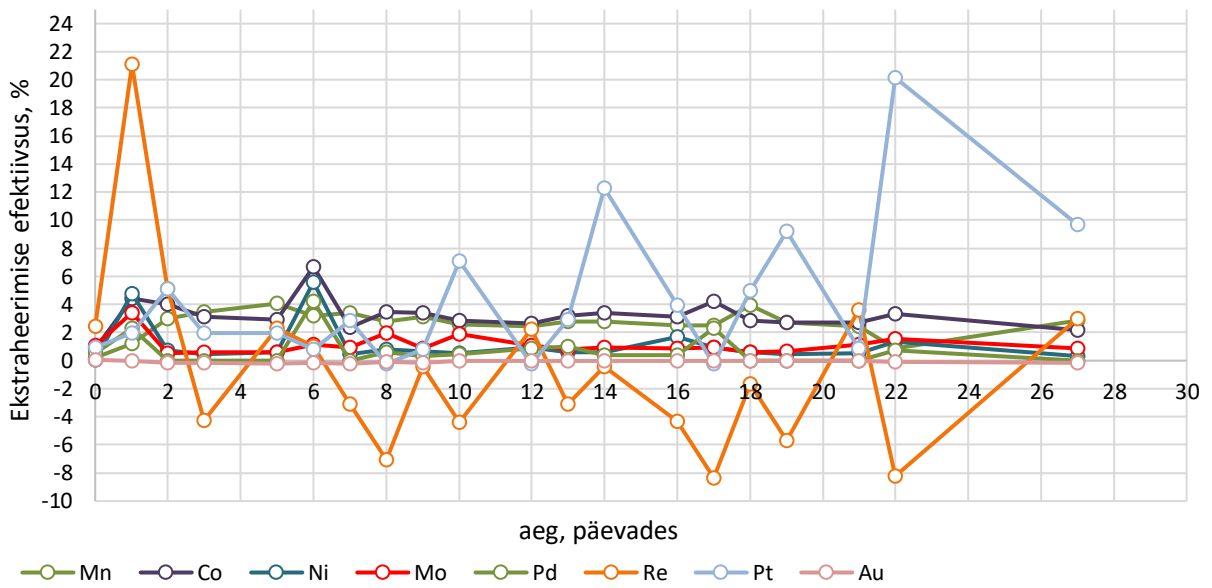
Siderofiilsete metallide väljaleostumine on näha joonisel 26. Katse lõpuks leostus välja kõige rohkem plaatina (Pt) 86,82%, koobaldit (Co) 64,45%, mangaani (Mn) 53,07%. Joonisel 27 on näha kalkofiilsete elementide leostumine. Elektroonikaromudest pärinevate kalkofiilsete elementide leostumine anaeroobsetes tingimuses oli tagasihoidlik. Vaske (Cu) leostus välja 20,30% ja antimoni (Sb) 40,74%.



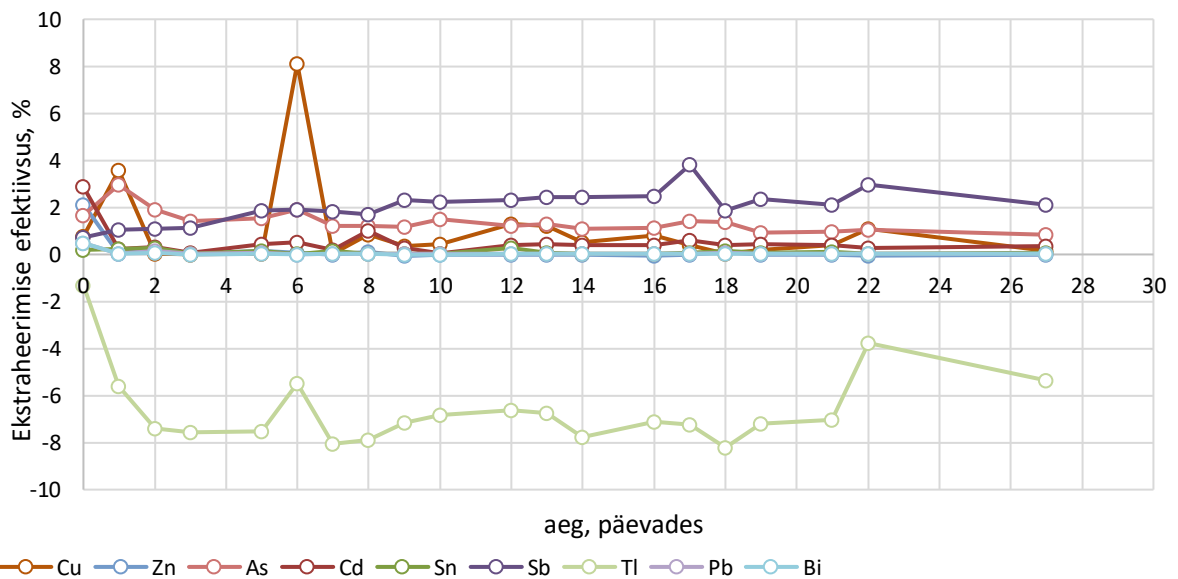
**Joonis 24.** Litofiilsed metallid, mis leostusid anaeroobses protsessist välja



**Joonis 25.** Litofiilsed metallid, mis leostusid anaeroobses protsessist välja



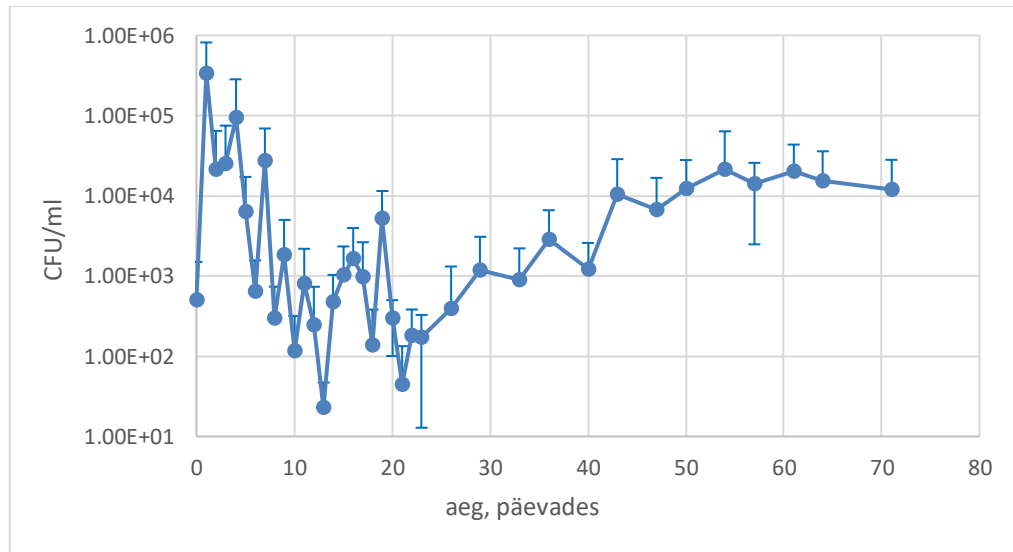
**Joonis 26.** Siderofiilsed metallid, mis leostusid anaeroobses protsessis välja



**Joonis 27.** Kalkofiilsed metallid, mis leostusid anaeroobses protsessis välja

#### 7.4. Mikroorganismide arvukus aeroobses katses

Aeroobse reaktorikatses vedelfaasis võetud proove sai külvatud igal nädalal Petri tassidele pindkülvimise meetodi abil. Mikroorganismid, mida tassidelt loendasin, olid *At. ferrooxidans*'id.

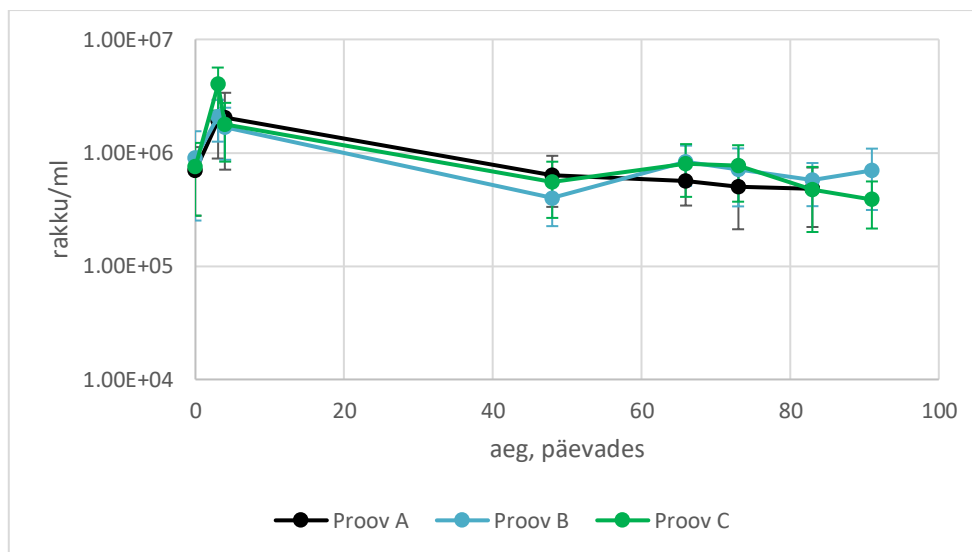


**Joonis 28.** *At. ferrooxidans* arvukus tardsöötmele külvatud pindkülv meetodiga

Aerobne reaktorikatses kestis 71 katsepäeva, mille jooksul võetud vedelikuproovid külvasin Petri tassidele erinevate lahjendusastmetega. Katse alguses on mikroorganismide arvukus väike, sest toimub lag-faas, kus mikroobirakud kohanevad uute keskkonnatingimustega. Logaritmiline kasvufaas toimub mikroorganismidel 20.-50. katsepäeval. Selles faasis on mikroorganismide kasvukiirus konstantne. Statsionaarse faasi saavutasid mikroorganismid 50.-61. katsepäeval, kus juurde tulevaid ja hävinevaid rakke on populatsioonis ühepalju ning bakteripopulatsioon ei muutu ajas.

#### 7.4.1. Petri tasside edasikülv vedelfaasi

Petri tassidelt tegin edasi külve vedelfaasi kaks korda 17.02.2021 ja 06.04.2021. 17.02.2021 vedelfaasi katsed said külvatud 20.01.21, 27.01.21 ja 08.02.21 reaktorikatsetel kasvama pandud Petri tassidele lahjendusega  $10^0$ . Vedelfaasis *Leptospirillum mediumi* reguleerisin NaOH-ga, et pH oleks söötmes 2. *At. Ferrooxidans*'id on vedelfaasis olnud 91 katsepäeva. Ainult 20.01.21 edasi külvatud vedelfaasis olevad mikroorganismid on jõudnud surmafaasi. Seda saab põhjendada sellega, et proov võeti katsepäeva alguses. Bakteritel on lag-faas ja nad kohanevad uue keskkonnaga. Teised proovid (27.01.21 ja 08.02.21) on võetud hiljem ja seal on rohkem mikroorganisme (joonis 29). 27.01.21 ja 08.02.21 on vedelfaasis võimalik mikroskoobi all loendada mikroorganisme. 06.04.21 edasikülvid on tehtud Biotateci vedelfaasi proovist, *At. Ferrooxidans* puhaskultuurist ja 18.02.21 reaktorikatses Petri tassi külvist. Hetkel on need kolm katsekolbi termostaadis olnud 39 katsepäeva.



**Joonis 29.** Vedelfaasi külvati 17.02.2021 mikroorganismide arvukus

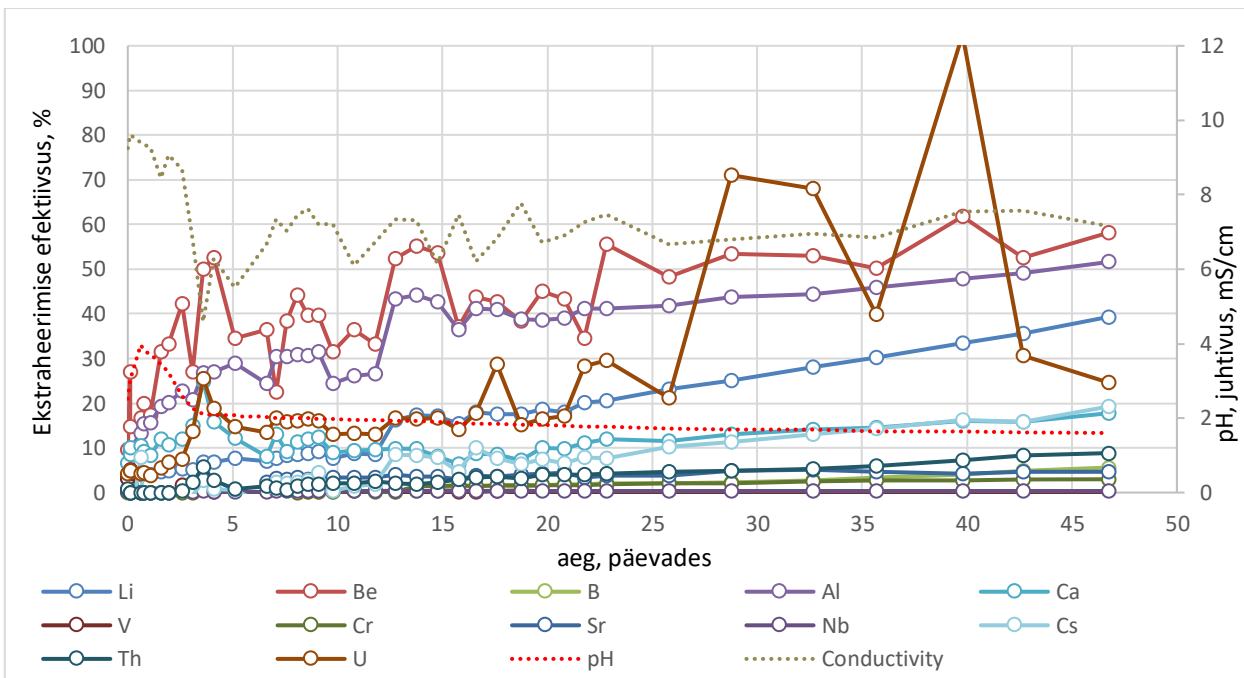
## 7.5. Metallianalüüsid aeroobses katses

Metallianalüüsides selgus, et litofiilsetest metallirühmadest (joonis 30) leostus välja kõige enam berülliumi (Be), alumiiniumi (Al) ja uraani (U). 39. katsepäeval toimus eriti suur väljaleostumine uraanil (102,47%). Kalkofiilsetest elementidest (joonis 31) leostusid *At. ferrooxidansi* mikroorganismidega välja aeroobses katses kõige paremini tina (Sn), tsink (Zn), vask (Cu), kaadium (Cd), titaan (Ti). Sn kõige suurem väljaleostumine toimus 7. katsepäeval – 110,27%. Siderofiilsetest elementidest (joonis 32) leostusid katses välja koobalt (Co), nikkel (Ni) ja mangaan (Mn). Tehnilistel põhjustel puudub kahjuks alates 11. katsepäevast reenumi (re) väljaleostumine.

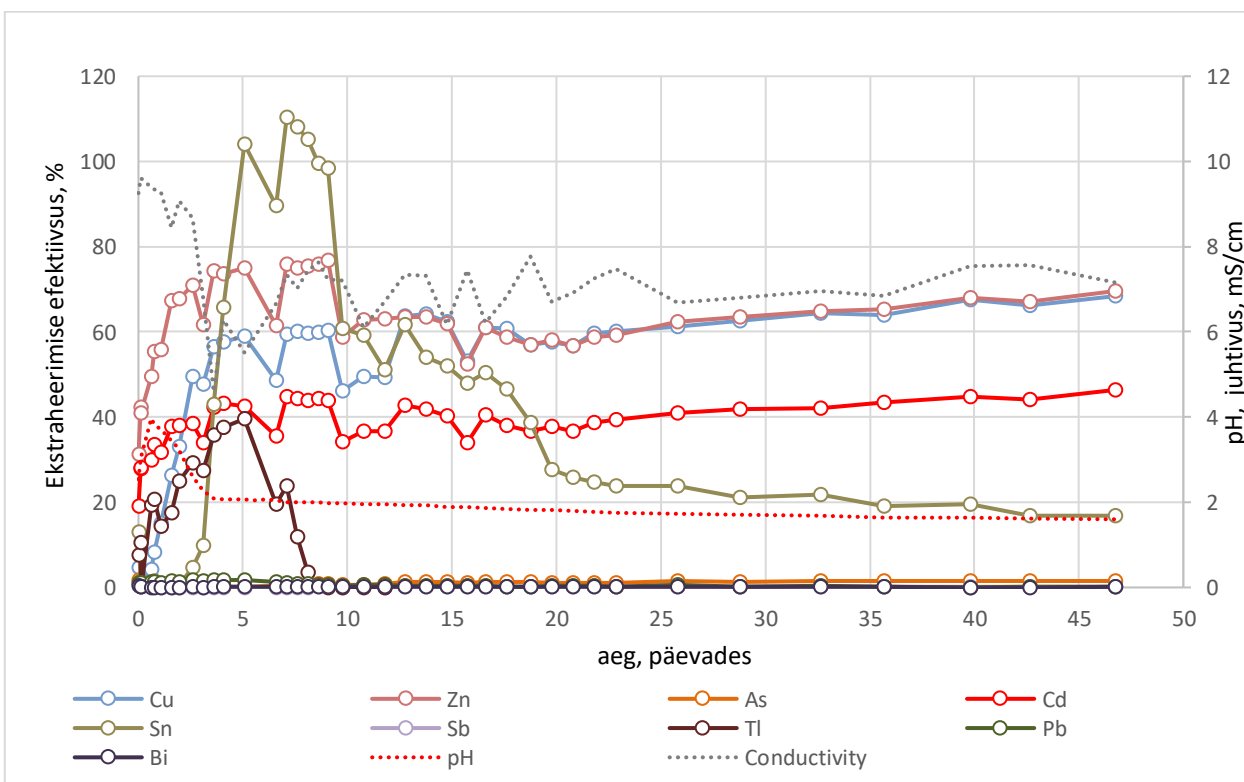
Kergete haruldaste muldmetallid (REEd) (joonis 33) elementidest leostusid katsest välja tserium (Ce), praseodüüm (Pr) ja euroopium (Eu). Rasketest REEd (joonis 34) elementidest leostusid välja kõige enam düsproosium (Dy), holmium (Ho) ja tuulium (Tm).

Kahjuks leostus aeroobses katses väga väike protsent hõbedat (Ag). Terve katse peale ainult 15,36%. Kulda (Au) ja plaatina (Pt) ei leostunudki terve katse vältel elektroonikaromudest.

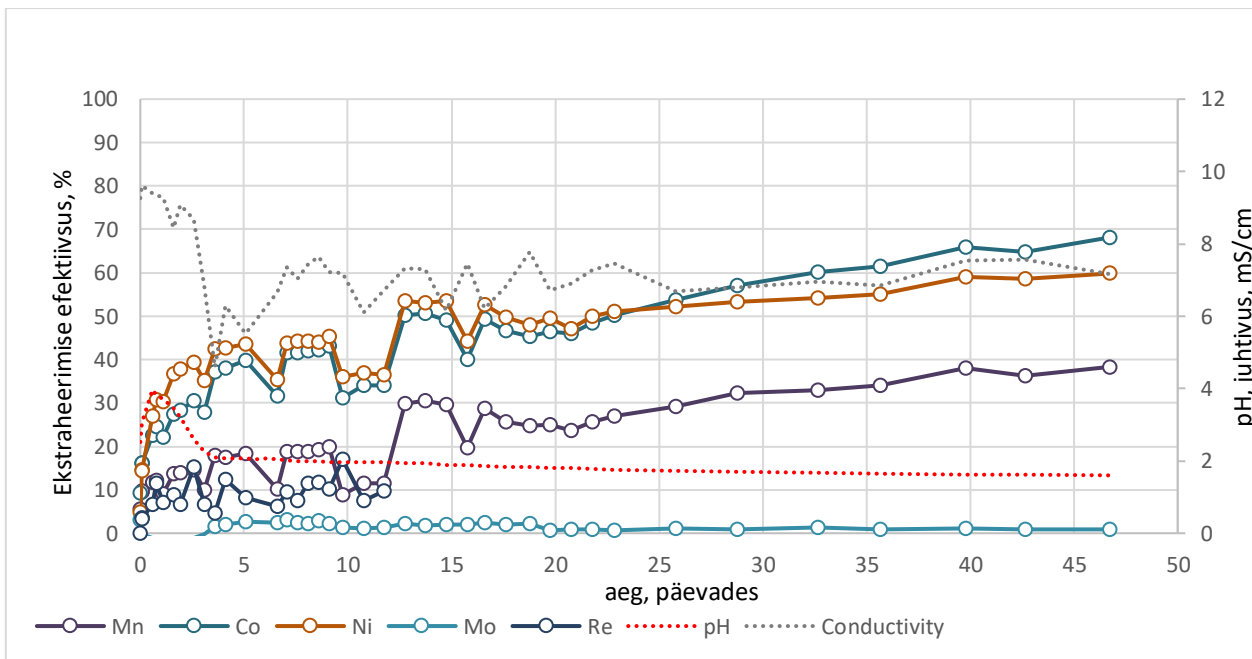




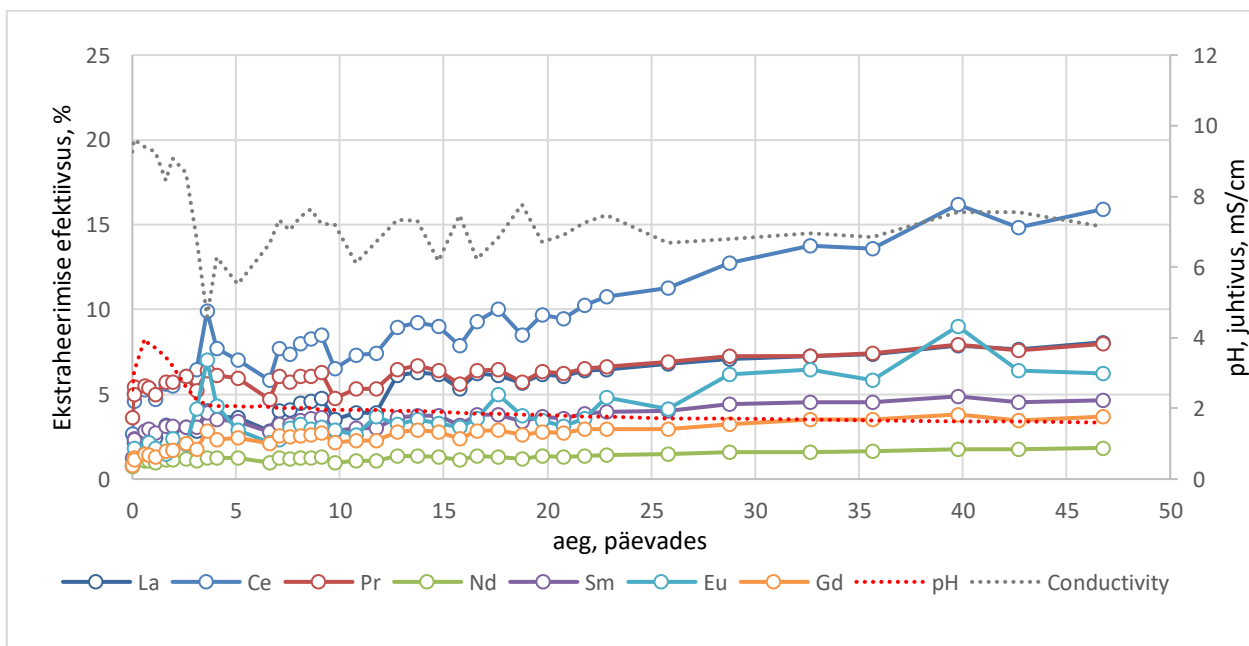
**Joonis 30.** Litofiilsed metallid, mis leostusid aeroobses protsessist välja



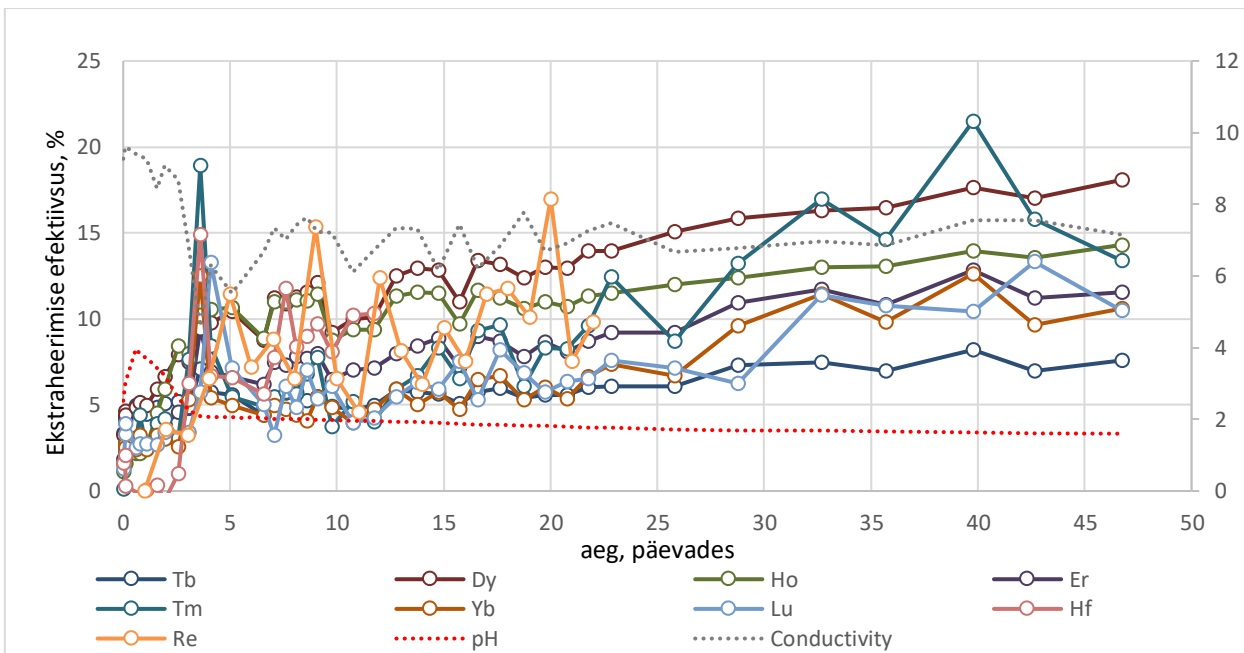
**Joonis 31.** Kalkofiilsed metallid, mis leostusid aeroobses protsessis välja



**Joonis 32.** Siderofiilsed metallid, mis leostusid aeroobses protsessis välja



**Joonis 33.** Kerged haruldased muldmetallid, mis välja leostusid aeroobses protsessi välja



**Joonis 34.** Rasked haruldased muldmetallid, mis välja leostusid aeroobses protsessi välja

## 8. Arutelu

Elektri- ja elektroonikatööstus kasvab iga aastaga ning järjest enam on vaja kasutusele võtta uusi tooraineid, samuti kasvavad selle tööstusega ka elektri- ja elektroonikaromude kogused. Uueks lahenduseks e-romude töötlemisel võiks olla biohüdrometallurgia. Käesolevas töös uuriti elektroonikaromude bioleostamise protsesse. Bioleostumise protsess on kaheastmelisena: esimene on anaeroobne protsess ja teine on aeroobne. Anaeroobse protsessi katse jaoks kasvatati eelnevalt anaeroobne inokulum. Anaeroobse inokulumi kasvatamist alustas 2020.a. suve lõpus firma BiotaTec. Aeroobse inokulumi kasvatamine toimus 2020. aasta novembri keskpaigas, kui Saksamaalt saabus *At. Ferrooxidansi* puhaskultuur. Reaktorikatsete eesmärgiks oli välja uurida, millised metallid leostuvad kaheastmelistes protsessides. Reaktorikatsete vedelfaasidest tehti väljakülve, et määrata mikroorganismide arvukus katsepäevadel.

Anaeroobne reaktorikatse kestis 28 katsepäeva. Selle jooksul võeti vedeliku-, gaasi- ja metalliproove. Mikroorganismide arvukus anaeroobses katses (joonis 22) oli piisavalt suur, et tekiks kõrge metaani eraldamine. Katse 5. päeval oli mikroorganismide arvukus  $9,71E+06$  CFU/ml. Katse lõpus jõudsid mikroorganismid statsionaarsesse faasi. Petri tassidele külvatud tulemused näitasid, et algselt oli reaktoris aeroobseid mikroorganisme. Enne anaeroobse katse algust ei sekveeritud *OxiTopis* olevaid mikroorganisme. Mõned päevad peale katse käivitamist tekkisid reaktoris fakultatiivsed anaeroobid ja metanogeensed arhed. Anaeroobsed mikroorganismid olid reaktoris tekkinud katse kuuendal päeval, sest siis hakkas toimuma metaani tootmine. Metaani tootmine reaktoris oli efektiivne (joonis 23). Näiteks 10. katsepäeval oli reaktoris olevas gaaside segus 55,10%. Katse lõpus  $N_2$  kontsentratsioon gaaside segus tõusis. Lämmastikku ei saa täielikult eraldada anaeroobsetes tingimustes, selleks on vaja anaeroobse ja aeroobse protsesside kombinatsiooni. Anaeroobses protsessis eralduvat metaani saaks kasutada biohüdrometallurgiga tegelev ettevõtte ise, sest biogaasil on energeetiline väärtus. Metallide analüüsist selgus, et kõige rohkem leostus anaeroobsest katsest välja liitumit. Kalkofiilsete metallide väljaleostumine oli tagasihoidlik.

Aeroobne reaktorikatse kestis 71 katsepäeva. Selle aja jooksul võeti vedeliku- ja metalliproove. Mikroorganismide arvukus reaktoris oli alguses madal. Mikroorganismide arvukuse kõikumine on normaalne katsepäevade alguses, sest bakterid kohanevad uue keskkonnaga.

Aeroobses protsessis leostus välja 50 metalli. Lootsime, et reaktorikatses leostuvad välja väärismetallid, nagu plaatina, kuld ja hõbe. Kahjuks selgus analüüsist, et plaatina ja kulda ei leostunud üldse välja. Nende metallide väljaleostumiseks on vaja kasutada tsüanogeenseid baktereid (*Pseudomonas putida*, *Chromobacterium violaceum*). Hõbedat leostus terve katse peale välja 15,36%. Ühe uuringugrupi poolt varem läbiviidud katsetest selgus, hõbedat efektiivseks väljaleostumiseks tuleb kasutada heterotroofseid atsidofiile (*Aspergillus niger*). Katse lahuse pH oli vahemikus 7,0-9 ja temperatuur 25-30 °C. (Diaz-Matinez, et al. 2019) Meie kasutasime oma reaktorikatses kemolitoautotroofseid atsidofiile ja pH oli vahemikus 3,8-1,5.

## 9. Kokkuvõte

Elektri- ja elektroonikajäätmed on oma koostiselt heterogeensed ja keerulised, kuid sisaldavad väärtuslikke metalle, mida saaks taaskasutada. E-romude mittetöötlemine või valede tehnoloogiate kasutamine võivad teha kahju inimeste tervisele loodusele. Elektri- ja elektroonikaromud koossevad ja sisaldavad vähemalt 57 erinevat elementi, mis on leitavad perioodilisustabelis. E-romude töötlemise tehnoloogiateks on hetkel püro-, hüdro- ja biometallurgia.

Antud töö eesmärgiks oli uurida e-romu bioleostumise kaheastmelist protsessi, mille töötas välja firma BiotaTec OÜ. Kaheastmelise protsessi esimene etapp oli anaeroobne protsess. Mikroorganismide inokulumid kasvatamist alustati suve lõpul. Inokulumid pandi kasvama 250 ml ja 600 ml Oxitop®-i pudelitesse. 20-liitrilise reaktori katset alustati 29.09.2020 ja see lõpetati 26.10.2020. Esimeses astmes lagundatakse anaeroobsete mikroorganismide abil suurem osa tooraines olevast orgaanilistest ainetest, millest lõppkokkuvõttes saavad tekkida metaan ja süsihappegaas ning lämmastik. Metaani tootlikkus reaktoris oli märkimisväärne. Tekkivat biogaasi saaks firma ise kasutada, sest sellel on energeetiline väärtus. Üldiselt leostus kaheastmelisest protsessist välja umbes 50 erinevat metalliühendit. Metallide analüüsist selgus, et esimeses etapis leostus välja kõige enam liitumit, mis kuulub litofiilsesse metallirühma. Terve katse peale leostus välja Li 1055,18%. Kalkofiilsete metallide bioleostumine oli tagasihoidlik, näiteks vaske leostus välja anaeroobses protsessist 20,30%.

Kaheastmelise protsessi teine etapp oli aeroobne protsess. Mikroorganismid, mida kasutati aeroobses protsessis oli *At. ferrooxidans* i kultuur. Puhaskultuur saabus Saksamaalt 2020.a. novembri alguses ning inokulumi kasvatamisega vedelfaasis alustasin novembri keskpaigas. 20-liitrist aeroobset reaktorikatset alustati 20.01.2021 ja lõpetati 04.04.2021. Vedelfaasis võetud proovid, mida külvati Petri tassidele, andsid ülevaate, milline on mikroorganismide arvukus reaktoris. Samamoodi õnnestus Petri tassidele külvatud mikroorganismid lahjendusel  $10^0$  edasi külvata vedelfaasi. Metallide analüüsist selgus, et kalkofiilsetest metallelementidest leostus välja tina, tsink, vask, kaadium ja titaan. Katses loodeti, et väärismetallid, nagu kuld, hõbe ja plaatina leostuvad välja, kuid tulemustes selgus, et seda ei juhtunud.

## Summary

Nowadays rapid economic growth, constant technological innovation and the improvement of living standards have led to a large amount of electrical and electronic equipment waste being produced, i.e., e-waste. Regards to this e-waste, printed circuit boards containing precious metals are considered to be the most valuable. Regulations related to e-waste are becoming more strict and proper waste recovery is becoming increasingly important. Technologies which emphasize the recovery and recycling of metals are being encouraged more than ever. Unfortunately, the main obstacle regards to the recovery and recycling of metals is the heterogeneity and complex composition of WEEE, as electronic equipment consists of many different and complex components. Different technologies are being used for the recovery of metals from e-waste: pyro-, hydro- and biohydrometallurgy. The biohydrometallurgy method is based on bioleaching process in which microorganisms convert solid metal compounds into soluble and extractable metal compounds that can be recycled.

The aim of the work is to study the bioleaching processes of shredded WEEE in an anaerobic and aerobic environment. Using a largescale, 20-liter test device, the aim was to determine how the microorganisms tolerate the conditions at different stages of the process and which metals are bioleaching during the process. The experiments are part of the WEEE leaching research project named “LIFE 17/ENV/ES/000216 Bioleaching of electronic equipment processing residues” and were carried out at the University of Tartu in cooperation with BiotaTec OÜ.

The bioleaching process consists of two stages: the first is anaerobic process and the second is aerobic. An anaerobic inoculum was precultured for the anaerobic process experiment. The cultivation of anaerobic inoculum started at the end of 2020 summer at the BiotaTec company. Aerobic inoculum cultivation took place in mid-November 2020, after *At. Ferrooxidans* pure culture arrived from Germany.

The anaerobic reactor process lasted for 28 test days. During this time liquid, gas and metal samples were taken. The number of microorganisms in the anaerobic experiment (fig. 22) was large enough to produce high methane removal. The results plated on Petri dishes shows that aerobic microorganisms were initially present in the reactor. Before we started anaerobic experiment, we did not sequence the microorganisms that were in OxiTop. A few days after the start of the experiment, optional anaerobes and methanogenic arches had developed in the reactor. The anaerobic microorganisms were in the reactor

on the sixth day of the experiment and during that time the methane production started. Methane production in the reactor was efficient (fig 23). For example, on the 10<sup>th</sup> experiment day, the gas mixture in the reactor was 55,10%. Analysis on the metals in anaerobic process showed that the most leached out element was lithium. The leaching of chalcophiles metals was modest.

The aerobic reactor process lasted for 71 test days. During this time fluid and metal samples were taken. Samples taken in the liquid phase and seeded in Petri dishes gave an overview of the number of microorganisms in the reactor. Similarly, the microorganisms inoculated into the Petri dishes were able to inoculate to the liquid phase at a dilution of 10<sup>0</sup>. Analysis of the metals in aerobic process showed that tin, zinc, copper, cadmium, and titanium were leached from the chalcophile metal elements. We expected that during the experiment precious metals such as gold, silver and platinum will leach out, but the results showed that this did not happen.



## Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat, Anne Menertit ja firmat BiotaTec OÜ -d. Lisaks soovin tänada Kalle Kirsimäed ja Päärn Paistet TÜ maateaduste ja ökoloogia instituudist metallianalüüside teostamise eest ja Kaja Orupõldu Eesti Maaülikoolist, kes teostas gaasianalüüsid.

# Lihtlitsents

## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kady Mäesalu,

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

Elektroonikaromude bioleostumise protsesside uurimine,

mille juhendaja on PhD Anne Menert,

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

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **01.06.2021** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

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

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

*Kady Mäesalu*

**01.06.2021**

## Viidatud allikad

- Ahonen, L., Tuovinen, O.,H (1989) Microbiological Oxidation of Ferrous Iron at Low Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (2), lk 312-316
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J.M (2011) Biomethanation and Its Potential. *Methods in Enzymology*, Volume 494, lk 327-351. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385112-3.00016-0>
- Aung, K., M., M., Ting, Y.-P. (2005) Bioleaching of spent fluid catalytic cracking catalyst using *Aspegillus niger*. *Journal of Biotechnology*, Volume 116, Issue 2, lk 159-170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.10.008>
- Balde, C.P., Forti, V., Gray, V., Kuehr, R., Stegmann, P. (2017) The Global E-waste Monitor 2017. United Nations University, *International Telecommunication Union & International Solid Waste Association*, lk 11. Kasutatud 14.02.2021, [http://collections.unu.edu/eserv/UNU:6341/Global-E-waste\\_Monitor\\_2017\\_\\_electronic\\_single\\_pages\\_.pdf](http://collections.unu.edu/eserv/UNU:6341/Global-E-waste_Monitor_2017__electronic_single_pages_.pdf)
- Baniasadi, M., Vakilchap, F., Bahaloo-Horeh, N., Mousavi, S.,M., Farnaud, S. (2019) Advances in bioleaching as a sustainable method for metal recovery from e-waste: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Volume 76, lk 75-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.03.047>
- Becci, A., Amato, A., Fonti, V., Karaf, D., Beolchini, F. (2020) An innovative biotechnology for metal recovery from printed circuit boards. *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 153. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104549>
- Beolchini, F.,Fonti, V., Dell'Anno, A., Rocchetti, L., Velgio, F.(2012) Assessment of biotechnological strategies for the valorization of metal bearing wastes.Waste Management Volume 32, Issue 5, Pages 949-956. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.10.014>
- Bosecker, K. (1997) Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20, lk 591-604
- Brandl, H., Bosshard, R., Wegmann, M. (2001) Computer-muching microbes metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi. *Hydrometallurgy*, Volume 59, Issues 2-3, lk 319-326. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00188-2)
- Brandl, H., Lehmann, S., Faramarzi, M., A., Martinelli, D. (2008) Biomobilization of silver, gold, and platinum from solid waste materials by HCN-forming microorganisms. *Hydrometallurgy*. Volume 94, Issues 1-4, lk 14-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.05.016>
- Brierley, J.A., Brierly, C.L, (2001) Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, Volume 59, Issues 2-3, lk 233-239. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00162-6)

Burgstaller, W., Schinner, F. (1993) Leaching of metals with fungi. *Journal of Biotechnology*, Volume. 27, Issue 2, lk 91-116. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90101-R](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90101-R)

Castro, I.M., Fietto, J.L.R., Vieire, R.X., Tropia, M.J.M., Campos, L.M.M., Pangiago, E.B, et al (2000) Bioleaching of zinc and nickel from silicates using *Aspergillus niger* cultures. *Hydrometallurgy*, Volume 57, Issue 1, lk 39-49. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00088-8)

Chmielewski, A.G., Urbanski, T.S., Migdal, W. (1997) Separation technologies for metals recovery from industrial wastes. *Hydrometallurgy*, Volume 45, Issue 3, lk 333-344. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(96\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(96)00090-4)

Choubey, P.K., Panda, R., Jha, M.K., Lee, J.C., Pathak, D.D. (2015) Recovery of copper and recycling of acid from the leach liquor of discarded Printed Circuit Boards (PCBs). *Separation and Purification Technology*, Volume 156, Part 2, lk 269-275. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.012>

Christy, P.M., Gopinath, L.R., Divya, D. (2014) A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 34, lk 167-173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>

Cui, J., Zhang, L. (2008) Metallurgical recovery of metals from electronic waste: A review. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 158, Issues 2-3, lk 228-256. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.02.001>

Dalrymple, I., Wright, N., Kellner, R., Bains, N., Geraghty, K., Goosey, M. et al (2007) An integrated approach to electronic waste (WEEE) recycling. *Circuit World*, Volume 33, Issue 2: lk 52-58. DOI: <https://doi.org/10.1108/03056120710750256>

Das, A., Vidyadhar, A., Mehrotra, S.P. (2009) A novel flowsheet for the recovery of metal values from waste printed circuit boards. *Resource, Conservation and Recycling*, Volume 53, Issue 8, lk 464-469. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2009.03.008>

Dempers, C.J.N., Breed, A.W., Hansfors, G.S. (2003) The kinetics of ferrous iron oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: effect of cell maintenance. Elsevier, *Biochemical Engineering Journal* 16, lk 337-346

Deacon, J.,(i.a) Temperature ranges of microorganisms. *The Microbial World: Thermophilic microorganisms*. Institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh. Vaadatud 14.04.2021

Dias-Matines, M., Argumedo-Delira, R., Sanches-Viveros, G., Alarocin, A., Mendoza-Lopez, R. (2019) Microbial Bioleaching of Ag, Au and Cu from Printed Circuit Boards of Mobil Phones. *Current Microbiology*, 76, lk 536-544. DOI: [10.1007/s00284-019-01646-3](https://doi.org/10.1007/s00284-019-01646-3)

Duan, H., Hou, K., Li, J., Zhu, X. (2011) Examining the technology acceptance for dismantling of waste printed circuit board in light of recycling and environmental concerns. *Journal of Environmental Management*, Volume 92, Issue 3, lk 392-399. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.057>

EES-Ringlus kodulehekül (i.a). Kasutatud 17.04.21, <https://eesringlus.ee/kuhu-viia-vana-kodutehnika-ja-patareid/>

Eesti Elektroonikaromu kodulehekül (i.a). Kasutatud 17.04.21, <https://elektroonikaromu.ee/tootja-ja-maaletooja/liitunud-tootjad/>

Eesti Põllumeeste Keskliit (2009) Biogaasi tootmine ja kasutamine. OÜ Tartumaa Trükikoda, Tartu, 2009, lk 24

Euroopa Liidu Teataja, Euroopa Parlamendi ja Nõukogu direktiiv 2012/19/EL (EUR-Lex,2012). Kasutatud 26.02.2021, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012L0019&from=EN>

Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2011/65/EL (EUR-Lex). Kasutatud 26.02.2021, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/et/TXT/?uri=CELEX%3A32011L0065>

Gadd, G.M. (2004) Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, Volum 122, Issues 2-4, lk 109-119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.002>

Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W. (1998) Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 64, Issue 7.

Guo, J., Guo, J., Xu, Z. (2009) Recycling of non-metallic fractions from waste printed circuit boards: A review. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 168, Issues 2-3, lk 567-590. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.104>

Heinaru E., Naanuri, E. (2011) Praktilisi töid mikrobioloogias, praktikumi juhend. Tartu Ülikool.

Hennebel, T., Noon, N., Maes, S., Lenz, M. (2015). Biotechnologies for critical raw material recovery from primary and secondary sources: R&D priorities and future perspectives. *New Biotechnology*, Volume 32, Issue 1, lk 121-127. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.08.004>

Hoffmann JE (1992) Recovering precious metals from electronic scrap. *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society*, 44, lk 43-48.

Huang, K., Guo, J., Xu, Z. (2009) Recycling of waste printed circuit boards: a review of current technologies and treatment status in China. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 164, Issues 2-3, lk 399-408. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.08.051>

Ilyas, S., Anwar, M.A., Niazi, S.B., Ghauri, M.A. (2007) Bioleaching of metals from electronic scrap by moderately thermophilic acidophilic bacteria. *Hydrometallurgy*, Volume 88, Issues 1-4 lk, 180-188. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2007.04.007>

Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M., (2010) Microbes in Aerobic and Anaerobic Waste Treatment. *Microbes at Work*, lk 1-34. DOI: 10.1007/978-3-642-04043-6\_1

Işildar, A., van Hullebusch, E.D., Lenz, M., Laing, G.D., Marra, A., Cesaro, A., et al (2019) Biotechnological strategies for the recovery of valuable and critical raw materials from waste electrical and electronic equipment (WEEE) – A review. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 362, lk 467-481. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.050>

Jadhav, U., Hocheng, H. (2014) Use of *Aspergillus niger* 34770 culture supernatant for tin metal removal. *Corrosion Science*, Volume 82, lk 248-254. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2014.01.011>

Jäätmearuandluse infosüsteem kodulehekül (i.a). Kasutatud 17.04.21, <https://jats.keskkonnainfo.ee/main.php?page=content&content=summary>

Jäätmeseadus (01.05.2004). Riigi Teataja I. Kasutatud 17.04.21, <https://www.riigiteataja.ee/akt/711166>

Kaya, M. (2016) Recovery of metals and nonmetals from electronic waste by physical and chemical recycling processes. *Waste Management*, Volume 57, lk 64-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.08.004>

Keskkonnaagentuur (2020) Jäätmekäitlus trendid 2014-2018. Kasutatud 17.04.21, [https://jats.keskkonnainfo.ee/failid/Jaاتمekaitluse\\_trendid\\_2014-2018.pdf](https://jats.keskkonnainfo.ee/failid/Jaاتمekaitluse_trendid_2014-2018.pdf)

Keskkonnaministeerium, (i.a) Elektri- ja elektroonikaseadmete romude käitlemine, koostaja Peeter Eek. Kasutatud 17.04.21

Keskkonnaministeeriumi kodulehekül (2020) Elektri- ja elektroonikaseadmed ning elektroonikaomud. Kasutatud 17.04.21, <https://www.envir.ee/et/eesmargid-tegevused/jaatmed/tootjavastutus-ja-probleemtooted/elektri-ja-elektroonikaseadmed-ning>

Keskkonnaministeerium kodulehekül (2019). Ohtlikke jäätmeid puudutavad konventsioonid. Kasutatud 17.04.2021, <https://www.envir.ee/et/ohtlikke-jaatmeid-puudutavad-konventsioonid>

Keskkonnaministeeriumi kodulehekül (2021) Riigi jäätmekava. Kasutatud 17.04.21, <https://www.envir.ee/et/eesmargid-tegevused/jaatmed/riigi-jaatmekava>

Korb, T., (2016) Biodegradatiivse potentsiaaliga mikroobikooslused Eesti graptoliitargilliidist. Magistritöö, Tartu Ülikool, 2016, lk 32

Krebs, W., Brombacher, C., Bosshard, P.P., Bachofen, R., Brandl, H. (1997) Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 20, Issue 3-4, lk 605-617. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00341.x>

Kriipsalu, M., Maastik, A., Truu, J (2013) Jäätmekäitlus ja pinnasetervendus. Tallinna Tehnikaülikooli Kirjastus, Tallinn, 2016, lk 133-134

Le, L., Ryan, D., Valix, M (2006) Bioleaching nickel laterite ores using multi-metal tolerant *Aspergillus foetidus* organism. *Minerals Engineering*, Volume 19, Issue 12, lk 1259-1265. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2006.02.006>

Lee, J-C., Song, H.T., Yoo, J-M. (2007) Present status of recycling of waste electrical and electronic equipment in Korea. *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 50, Issue 4, lk 380-397. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2007.01.010>

Lee, J.-C., Pandey B. D. (2012) Bio-processing of solid wastes and secondary resources for metal extraction – A review. *Waste Management*, Volume 32, Issue 1, lk 3-18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.08.010>

Levett, A., Gleeson, S.A., Kallmeyer, J. (2021) From exploration to remediation: A microbial perspective for innovation in mining. *Earth-Science Reviews*, Volume 2016 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2021.103563>

Li, J., Lu, H., Guo, J., Xu, Z., Zhou, Y. (2007) Recycle Technology for Recovering Resources and Products from Waste Printed Circuit Boards. *Environmental. Science. & Technology*, 41, 6, lk 1995-2000. DOI: <https://doi.org/10.1021/es0618245>

Liang, G., Tang, J., Liu, W., Zhou, Q. (2013) Optimizing mixed culture of two acidophiles to improve copper recovery from printed circuit boards (PCBs). *Journal of Hazardous Materials*, Volumes 250-251, lk 238-245. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.077>

Lu, Y., Xu, Z. (2016) Precious metals recovery from waste printed circuit boards: A review for current status and perspective. In *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 113, lk 28-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2016.05.007>

Menert, A., (2020) Anaeroobsest katsest võetud provide analüüs (külv) ja andmetöötlus, keskkonnabiotehnoloogia praktikumi juhend, Tartu Ülikool.

Menert, T., (2015) Hariliku pilliroo (*Phragmites australis*) biogaasi toorainena kasutamise võimalused, Magistritöö, Tallinna Tehnikaülikool, 2015, lk 35-37

Mihai. F-C. (2017) One Global Map but Different Worlds: Worldwide Survey of Human Access to Basic Utilities. *Human Ecology*, Springer Verlag, 45 (3), lk 425-429. DOI: 10.1007/s10745-017- 9904-7

Mihai. F-C., Gnoni, M-G., Meidiana, C., Ezeah, C., Elia, V. (2019) Waste Electrical and Electronic Equipment (WEEE): Flows, Quantities, and Management. – A Global Scenario. *Electronic Waste*

*Management and Treatment Technology*, 1-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816190-6.00001-7>

Modin, O., Faud, N., Rauch, S. (2017) Microbial electrochemical recovery of zinc. *Electrochimica Acta*, Volume 248, lk 58-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.07.120>

Nakajima, K., Takeda, O., Miki, T., Matsubae, K., Nakamura, S., Nagasaka, T. (2010) Thermodynamic Analysis of Contamination by Alloying Elements in Aluminium Recycling. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44,14, 5594-5600. DOI: <https://doi.org/10.1021/es9038769>

Natarajan, K.A. (2018). *Biotechnology of Metals: Principles, Recovery Methods and Environmental Concerns*. Indian Institute of Science, Bangalore, India.

Natarajan, K. A., Deo, N. (2001) Role of bacterial intercation and bioreagents in iron ore flotation. *International Journal of Mineral Processing*, Volume 62, Issues 1-4, lk 143-157. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-7516\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0301-7516(00)00049-1)

Norgate, T.E., Jahanshahi, S., Rankin, W.J. (2007) Assessing the environmental impact of metal production processes. *Journal of Cleaner Production*, Volume 15, Issues 8-9, lk 838-848. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2006.06.018>

Orell, A., Navarro, C.A., Arancibia, R., Mobarec, J.C., Jerez, C.A. (2010) Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnology Advances*, Volume 28, Issue 6, lk 839-848. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.003>

Pandey, B.D., Natarajan, K.A. (2015) *Microbiology for Minerals, Metals, Materials and the Environment*. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Pant, D., Joshi, D., Upreti, M.K., Kotnala, R.K. (2012) Chemical and biological extraction of metals present in E waste: A hybrid technology. *Waste Management*, Volume 32, Issue 5, lk 979-990. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.12.002>

Patil, R., A., Ramakrishna, S.(2020) A comprehensive analysis of e-waste legislation worldwide. *Environmental Science and Pollution Research* 27, lk 14412-14431. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07992-1>

Priya, A., Hait, S. (2017) Comparative assessment of metallurgical recovery of metals from electronic waste with special emphasis on bioleaching. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, lk 6989-7008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8313-6>

Probleemtooteregister (i.a). Kasutatud 17.04.21,  
<https://proto.envir.ee/proto/main/welcome?messageKey=error.sessionExpired>

Rath, S.S., Nayak, P., Mukherjee, P.S., Chaudhury, G.R., Mishra, B.K. (2012) Treatment of electronic waste to recover metal values using thermal plasma coupled with acid leaching – A response surface



modeling approach. *Waste Management*, Volume 32, Issue 3, lk 575-583. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.11.001>

Reck, B.K., Graedel, T.E. (2012) Challenges in Metal Recycling. *Science*, Volume 337, Issue 6095, lk 690-695. DOI: [10.1126/science.1217501](https://doi.org/10.1126/science.1217501)

Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W., (2003) Bioleaching review part A: Progress in bioleaching fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, lk 239-248. DOI: [10.1007/s00253-003-1448-7](https://doi.org/10.1007/s00253-003-1448-7)

SA Stockholmi Keskkonnainstituudi Tallinna Keskus, Säästva Eesti Instituut (SEI) (2013) Eestis tekkinud Segaolemejätmete eraldi kogutud paber- ja pakendijätmete ning elektroonikaromu koostise uuring

Saidan, M., Brown, B., Valix, M. (2012) Leaching of Electronic Waste Using Biometabolised Acids. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, Volume 20, Issue 3, lk 530-534. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60215-2](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60215-2)

Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P-G., Schippers, A. (2001) (Bio)chemistry of bacterial leaching – direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, Volume 59, Issues 2-3, lk 159-175. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00180-8](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00180-8)

SEI (2015) Elektri- ja elektroonikaseadmete ning patareide ja akude kogumise ja käitlemise toimumudelite ülevaade. Kasutatud 17.04.21, [https://www.envir.ee/sites/default/files/tootjavastutusmudelid\\_aruanne\\_4.pdf](https://www.envir.ee/sites/default/files/tootjavastutusmudelid_aruanne_4.pdf)

Silvas, F.P.C., Jimenez Correa, M.M., Caldas, M.P.K., de Moraes, V.T., Espinosa, D.C.R., Tenoria, J.A.S. (2015) Printed circuit board recycling: Physical processing and copper extraction by selective leaching. *Waste Management*, Volume 46, lk 503-510. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.08.030>

Statistikaameti kodulehekül (i.a) Jätmed ja ringmajandus. Kasutatud 17.04.21, <https://www.stat.ee/et/avasta-statistikat/valdkonnad/keskkond/jaatmed-ja-ringmajandus>

Zeng, X., Zheng, L., Xie, H., Lu, B., Xia, K., Chao, K., et al (2012) Current Status and Future Perspective of Waste Printed Circuit Boards Recycling. *Procedia Environmental Sciences*, Volume 16, lk 590-597. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.081>

Zhou, Y., Qiu, K. (2010) A new technology for recycling materials from wasted printed circuit boards. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 175, Issues 1-3, lk 823-828. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.083>

Tsydenova, O., Bengtsson, M. (2011) Chemical hazards associated with treatment of waste electrical and electronic equipment. *Waste Management*, Volume 31, Issue 1, lk 45-58. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.08.014>

United States Environmental Protection Agency (EPA) (2020) Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, A Global Response. Kasutatud 14.04.2021, <https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response>

Vakilchah, F., Mousavi, S.M., Shojaosadati, S.A (2016) Role of *Aspergillus niger* in recovery enhancement of valuable metals from produced red mud in Bayer process. *Bioresource Technology*, Volume 213, lk 991-998. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.059>

Wang, J., Bai, J., Xu, J., Liang, B. (2009) Biorecovery of metals from printed wire boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* and their mixture. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 172, Issues 2-3, lk 1100-1105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.102>

Xiang, Y., Wu, P., Zhu, N., Zhang, T., Liu, W., Wu, J., Li, P. (2010) Biorecovery of copper from waste printed circuit by bacterial consortium enriched from acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 184, Issue 1-3, lk 812-818. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.113>

Yang, T., Xu, Z., Wen, J., Yang, L. (2009) Factors influencing biorecovery copper from waste printed circuit boards by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, Volume 97, Issues 1-2, lk 29-32. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.12.011>

## Lisad

### Lisa 1. *Leptospirillum mediumi* tardsöötme valmistamine

**Enne söötme valmistamist:** viia kolvid (4 x 100 ml) autoklaavimisse

#### **Agaroosi valmistamine:**

- 17,5 ml (dest vett) jaoks läheb vaja 4% agaroosi;
- agaroos kaaluda;
- kaalutis valada 4 x 50 ml kolbi;
- 17,5 ml dest vett valada kolbi ja õrnalt segada agaroosi segu, et see lahustuks;
- lahus viia autoklaavimisse.

Kui agaroosi lahus on klaavimisest tulnud, siis see on termokapis (60 °C) juures.

#### ***Leptospirillum mediumi* valmistamine:**

100 ml söötme koguselt saab 5 Petri tassi valada.

Tabel 1. *Leptospirillum medium* söötme kogus 100 ml

Lahuste kogused	100 ml
Lahus A	95 ml
Lahus B	5 ml
Lahus C	100 µl

Kolvid, kindad, falkonid, pipett, pipetiotsad boksi UV-valguse alla. Lahused boksi all kolbi valada ja pH ribadega söötme keskkonda reguleerida (pH > 2). Söödet NaOH-ga reguleerides tuleb olla tähelepanelik. Kui söötme hakkab NaOH välja sadenema, tuleb teha uus sööde, muidu on Petri tassid rikutud. Kui lahused kolbi valatud ja pH reguleeritud, siis söötmed termokappi (60 °C) viia. Söödet tuleb kindlasti termokapis soojendada umbes 15 minutit.

**Petri tasside valamine:**

Samal ajal kui sööde termokapis soojeneb, tuleb ette valmistada Petri tassid. Tassi kaanele kirjutada söötme nimi. Petri tasse tuleb valada boksi all. Boksi alla viia kahe kaupa agaros ja *Leptospirillum* sööde. Agaros valada söötmesse, samal ajal kolbi õrnalt ringjate liigutustega liigutada. *Leptospirillum* + agarosi sööde valada Petri tassile. Ühele tassile tuleb söödet valada 20 ml. Peale söötme valamist Petri tassile kaas kohe peale ja jahtuma jätta.

**Lisa 2.** *Leptospirillum* (HH) *medium* koostis

Lahus A koostis

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132,0 mg
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	53,0 mg
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	27,0 mg
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	147,0 mg
Destilleeritud vesi	950,0 ml

Reguleerida pH 1,8 10 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Lahus B koostis

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	20,0 g
0,25 N $\text{H}_2\text{SO}_4$	50,0 ml

Selle lahuse pH peab olema 1,2.

Lahus C koostis

Mikroelementide lahus (vt allpool)	1,0 ml
---------------------------------------	--------

Valmistamine: Steriliseerige lahus A ja lahus C autoklaavimisega 121 °C juures 20 minutit ja lahus B autoklaavimisega 112 °C juures 30 minutit. Enne kasutamist segage lahused A ja B ning lisage mikroelementide lahus. Lõplik söötme pH peab olema 1,8. Inkubeerida staatiliselt ilma loksutamata.

### Mikroelementide koostis

MnCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	62,0 mg
ZnCl <sub>2</sub>	68,0 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	64,0 mg
H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>	31,0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	10,0 mg
CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	67,0 mg
Destilleeritud vesi	1000,0 ml