

# BIOLAGUNEVATE JÄÄTMETE FERMENTATSIOON TAASTUVATE ENERGIAALLIKATE SAAMISEKS

Anne Menert<sup>1,4</sup>, Merje Michelis<sup>2</sup>, Ergo Rikmann<sup>3</sup>, Viktoria Blonskaja<sup>1</sup>, Mihkel Kaljurand<sup>1</sup>, Tiit Kallaste<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Tallinna Tehnikaülikool, Ehitajate tee 5, Tallinn 19086,  
e-post: amenert@cc.ttu.ee, viktorija.blonskaja@ttu.ee

<sup>2</sup>Keskkonnaministeerium, Narva mnt 7a, Tallinn 15172, e-post: merje.michelis@envir.ee

<sup>3</sup>Tartu Ülikool, Ülikooli 18, Tartu 50090, e-post: rikmannster@gmail.com

<sup>4</sup>SEI Tallinn, Lai 34, Tallinn 10133, e-post: tiit.kallaste@seit.ee

## Annotatsioon

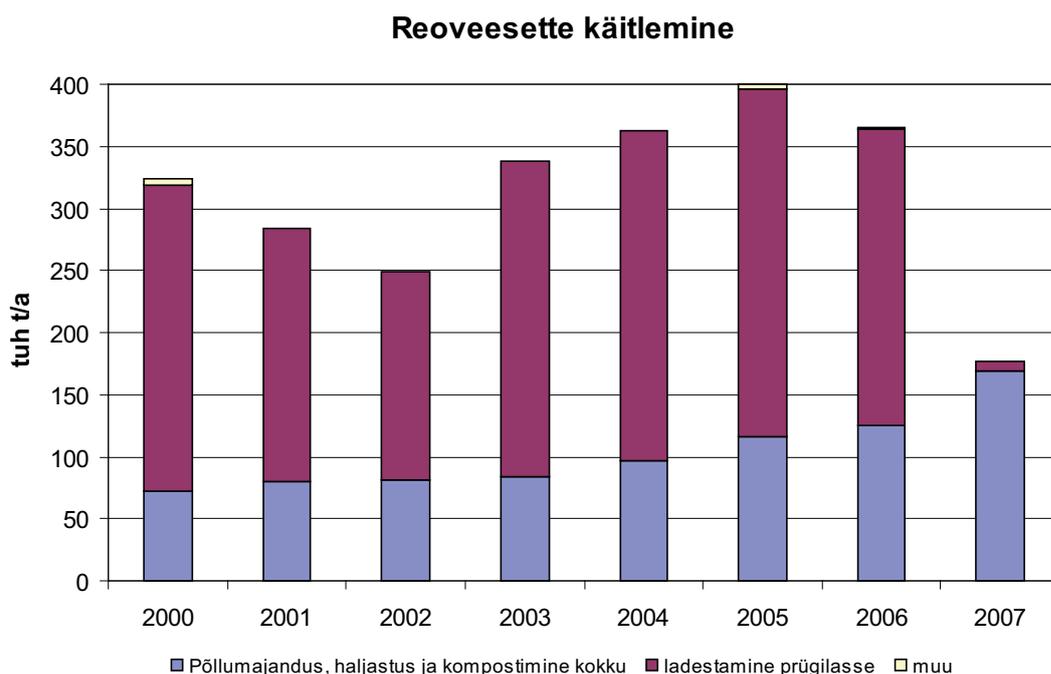
Biolagunevate jäätmete, sh reoveesete anaeroobse stabiliseerimise uurimisega on Tallinna Tehnikaülikoolis tegeldud 1990ndate teisest poolest alates. On vaadeldud näiteks erinevate eeltötlusmeetodite (ultraheli, osoon, temperatuur jne) mõju substraadi anaeroobsele lagundamisele. Seni on keskendunud peamiselt anaeroobse protsessi füüsikalisele mõjutamisele, kuid nimetatud protsessi on võimalik hoopis paremini juhtida, tundes lagundamisprotsessi läbiviivaid mikroorganisme, soodustades või takistades nende kasvu ning mõjutades seeläbi nende poolt läbiviidavate reaktsioonide toimumist. Selle protsessi põhjalik tundmine on oluline ka seetõttu, et reoveesete on üks potentsiaalsetest biogaasi substraatidest. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida termilise eeltötluse mõju biogaasi tootlikkusele sette anaeroobsel lagundamisel, jälgides orgaaniliste ühendite metabolismi; samuti identifitseerida reoveesete anaeroobset lagundamist läbi viivaid mikroorganisme ning uurida sette eeltötluse mõju kooslusele, kasutades 16S rDNA järjestusi koos elektrofooresiga denatureeriva geeli gradiendis (DGGE).

*Märksõnad: anaeroobne kääritamine, biogaas, DGGE, metanogeenid, reoveesete.*

## Sissejuhatus

Reovee puhastamise tagajärjel tekkiv reoveesete, mida Eestis koguneb ligikaudu 20 000 tonni (kuivaine järgi) aastas, on olnud üks enim prügilatesse ladestatavaid biolagunevaid jäätmepuud (Reoveesete...). Jäätmesaaduse § 35 järgi on töötlemata jäätmepuude prügilasse ladestamine keelatud. Jäätmete töötlemiseks loetakse nende mehaanilist, termilist, keemilist

või bioloogilist mõjutamist, kaasa arvatud sortimist ja pakendamist, mis muudab jäätmete omadusi. Töötlemise eesmärgiks on vähendada nende kogust või ohtlikkust, hõlbustada nende käitlemist või kõrvaldamist, tõhustada nende taaskasutamist. Aastaid moodustas Eestis prügilasse ladestatud settest suurima osa Kohtla-Järve linna reoveepuhastis tekkinud sete, mis kuni 2007. a suunati Kohtla-Järve poolkoksimägedele (joonis 1). Sellest alates hakati seal reoveesetet käitlema kompostimise teel (Reoveesette...). Anaeroobne stabiliseerimine (kääritamine) on Eestis seni vähe kasutatust leidnud võimalus biolagunevate jäätmete, sh reoveesette töötlemiseks; headeks näideteks seni vaid AS-i Tallinna Vesi Paljassaare ja Narva linna reoveepuhastusjaamad ning sealägal töötav Jööri biogaa-sijaam Saaremaal. Mitmed projektid ja arendustööd selles suunas on aga käimas.



Joonis 1. Reoveesette käitlemine Eestis.  
Figure 1. Treatment of residual sludge in Estonia.

**Termilise eeltötluse mõju reoveesette anaeroobsele lagundamisele**  
Üheks anaeroobse lagundamise efektiivsuse tõstmise meetodiks on reoveesette eeltötlus enne anaeroobset lagundamist. Eeltötlus kiirendab

hüdrolüüsi kui protsessi limiteerivat etappi, mille tulemusena suureneb substraadi kättesaadavus anaeroobsetele bakteritele. Erinevate eelkäitlusmeetoditena on kasutatud osoonimist, desintegreerimist, eelkäitlust ultraheliga, termofiilset eelkäitlust jms. Läbiviidud katsete tulemusena on selgunud, et kõige efektiivsem ja ökonoomsem on anaeroobne termofiilne käitlus – meetod, mille puhul kasutatakse ära rakulüsaadi stimuleeriv toime toorsetele (Blonskaja jt 2002).

Selle meetodi sünonüümideks on ka eelhapustamine (*pre-acidification*) ja isekääritamine (*self-digestion*). Termilise eeltötluse käigus antakse eelis anaeroobse kääritamise atsidgeensele astmele ja piiratakse metanogeenide kasvu. Üleminekul mesofiilselt temperatuurirežiimilt termofiilsele enamik mesofiilseid bakterikonsortsiume hakkab hukkuma, millele järgneb nende lüüsumine. Kõrgemal temperatuuril on ühtlasi kahjulik toime patogeenidele. Patogeenid eralduvad reoveest mudahelveste koostises, kusjuures nad jäävad eluvõimelisteks kuni sette hügieniseerimiseni (Mölder jt 2000).

### **Katsemetoodika**

Kasutati AS Tallinna Vesi Paljassaare reoveepuhastusjaama toorsetet (segu primaarmudast (kuivainesisaldus 5,2%) ja aktiivmudast (kuivainesisaldus 0,5%) suhtes 3:1), mida enne anaeroobset kääritamist töödeldi temperatuuridel kuni 95 °C (Michelis 2003, 2009; Menert jt 2008). Madaltemperatuurilise eeltötluse käigus toimub mikrofloora mittetäielik hävinemine: suur osa bakteritest küll hävib, kuid paljud ensüümid säilitavad oma biokatalüüsivõime, mille tõttu algab hukkunud bakterite lüüsumine. Viimane muudab substraadi lagunemisprotsessidele kättesaadavamaks (Borja 2005; Mets 2007). Eeltötlus kõrgematel temperatuuridel (üle 100 °C) vajab märkimisväärses koguses lisaenergiat, pealegi võivad tekkida anaeroobsele lagundamisele raskemini alluvad vaheproduktid, nt melanoidiinid.

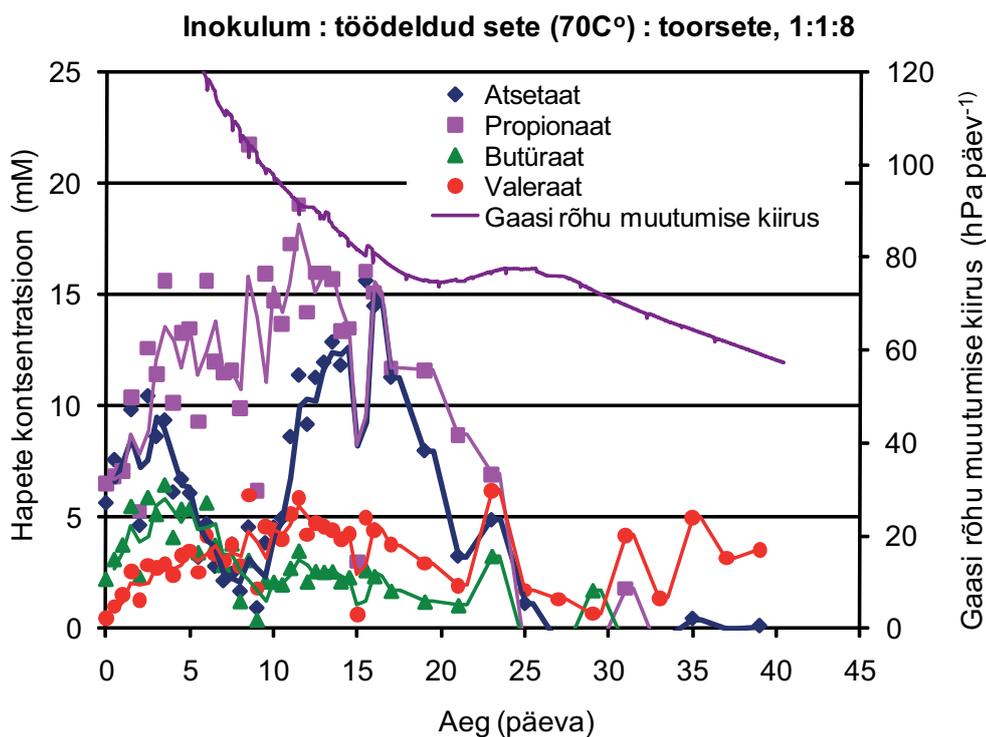
Tabel 1. Katseplaani ja proovide ettevalmistus.  
Table 1. Plan of experiments and preparation of samples.

Katsepudeli nr.	Temperatuur	Nivoo	Suhe	Nivoo
1	+70	-1	1:1:8	-1
2	+70	-1	1:4,5:4,5	0
3	+70	-1	1:8:1	1
4	+85	0	1:1:8	-1
5	+85	0	1:4,5:4,5	0
6	+85	0	1:8:1	1
7	+95	1	1:1:8	-1
8	+95	1	1:4,5:4,5	0
9	+95	1	1:8:1	1

Eeltötluse tingimuste optimeerimiseks kasutati täisfaktoriaalset katseplaani. Kahte näitajat, eeltötluse temperatuuri ja segu üksikute komponentide (inokulum, töödeldud sete, toorsete) suhet, varieeriti kolmel nivool (tabel 1). Katsetes jälgiti erinevate rasvhapete kui metaanfermentatsiooni metaboolse raja oluliste vaheühendite teket olenevalt töötlustemperatuurist, segu koostisest ja ajast. Globaalse optimumi (sihifunktsiooni) leidmiseks kasutati kolme väljundit (ingl k *response factors*): kumulatiivne biogaasi tootlikkus, kumulatiivne orgaaniliste hapete tootlikkus, propionaadi ja atsetaadi suhe.

### Sette eelkäitluse optimaalsed tingimused

Tasakaalustatud anaeroobse protsessi korral on lenduvate rasvhapete tootmine vastavuses nende tarbimisega, seega need ühendid ei kuhju (joonis 2). Protsessi tasakaalu võivad rikkuda mitmesugused häired, näiteks orgaaniline või hüdrauliline ülekoormus, toksiinide olemasolu ja temperatuurimuutused. See omakorda põhjustab mikrobioloogilist stressi, mille tulemusena langeb pH ja häiritud on kogu reaktori töö. Seega võib üksikute lenduvate rasvhapete (äädik-, propioon-, või- ja palderjanhape) kontsentratsioone pidada headeks reaktori tööd iseloomustavateks parameetriteks vedelfaasis. Leiti, et sette optimaalseteks eelkäitluse tingimusteks on eeltötluse temperatuur +70 °C ja komponentide inokulum, töödeldud sete ja toorsete suhe 1:8:1 (joonis 3). Just 70 °C eeltötlus oli erinevate segude korral kõige suurema potentsiaaliga. Segu 1:1:8 andis kõige halvema tulemuse 85 °C eeltötlusega, segu 1:4,5:4,5 andis erinevatel temperatuuridel sarnase tulemuse (Menert jt 2005).

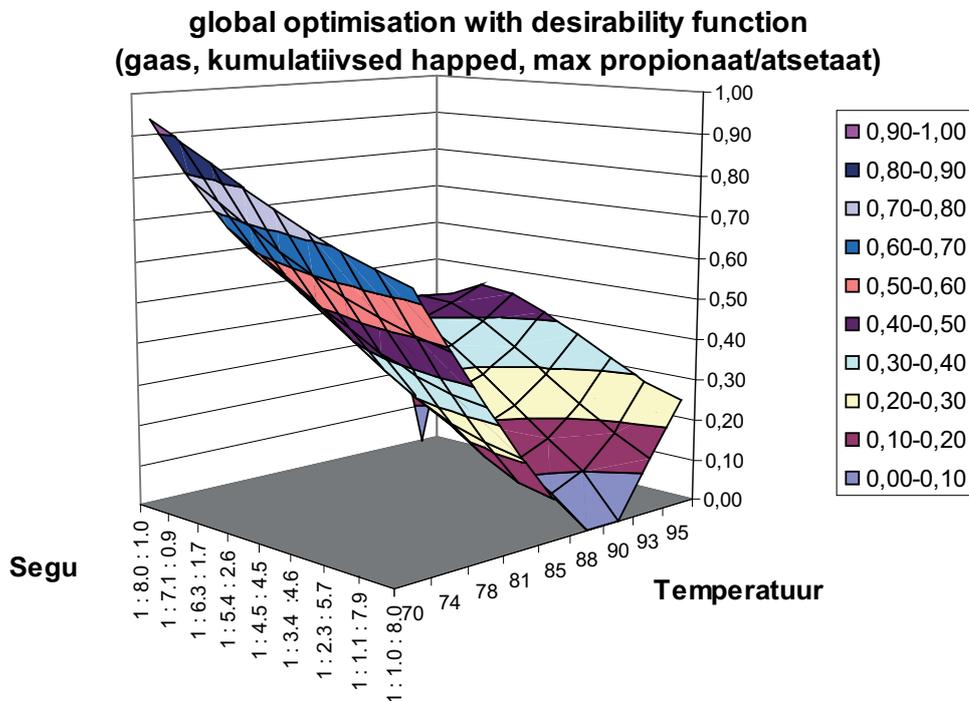


Joonis 2. Lenduvate rasvhapete teke perioodilises katses, substraadiks termiliselt eeltöödeldud reovee sete – tasakaalustatud kasv.

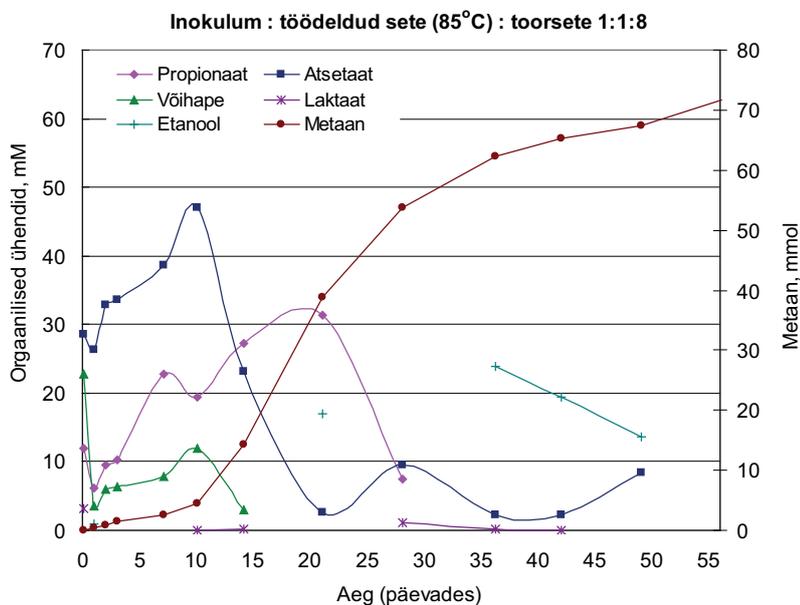
Figure 2. Generation of volatile fatty acids in batch experiment, using thermally pretreated sludge as substrate – balanced growth.

Järgnevalt uuriti erinevate eeltöötlustemperatuuride mõju, kusjuures vaid osa substraadist oli töödeldud – inokulumi, töödeldud toorsete ja toorsete suhteks valiti 1:1:8. Selline segu andis eelnevates katseseeriates kõige vastakamaid tulemusi, samas on see majanduslikult ökonoomsem, sest väheneb eeltöötluks vajalik energiakulu. Selgus, et ka osaline termiline eeltöötlus (10% substraadi kogusest) võib suurendada biogaasi tootlikkust kuni 20%. Kuigi reoainete ärastuselt ja biogaasi tootlikkuselt oli parim +85 °C eeltöötluksuga segu, siis metaani erisaagis oli kõrgeim just +70 °C eeltöötluksuga segu kääritamisel (0,44 m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/kg ärastatud KHT). Üheski segus ei toimunud anaeroobsest lagundamist inhibeerivat hapete akumulereerumist (joonis 4). Metaan hakkas tekkima hüppeliselt 15. päeval atsetoklastilise metanogeneesi teel, mida näitas tugev korrelatsioon äädikhappe vähenemise ja metaani produktsiooni vahel. Enne seda toimus metaani tootmine vesinikust ja sipelghapest hüdrogenotroofse metanogeneesi teel. See metanogenees toimub väga kiiresti, kuna sipelghapet kindlaks teha ei õnnestunud. Kolmekümnendaks-neljakümnendaks päe-

vaks oli tekkinud 90% kogu metaanist, mis näitab anaeroobse käitlemise tehniliselt otstarbekat toimumise aega (Mets, 2007).



Joonis 3. Sette termilise eelkäitluse tingimuste optimeerimine.  
Figure 3. Optimization conditions for thermal pre-treatment of sludge.



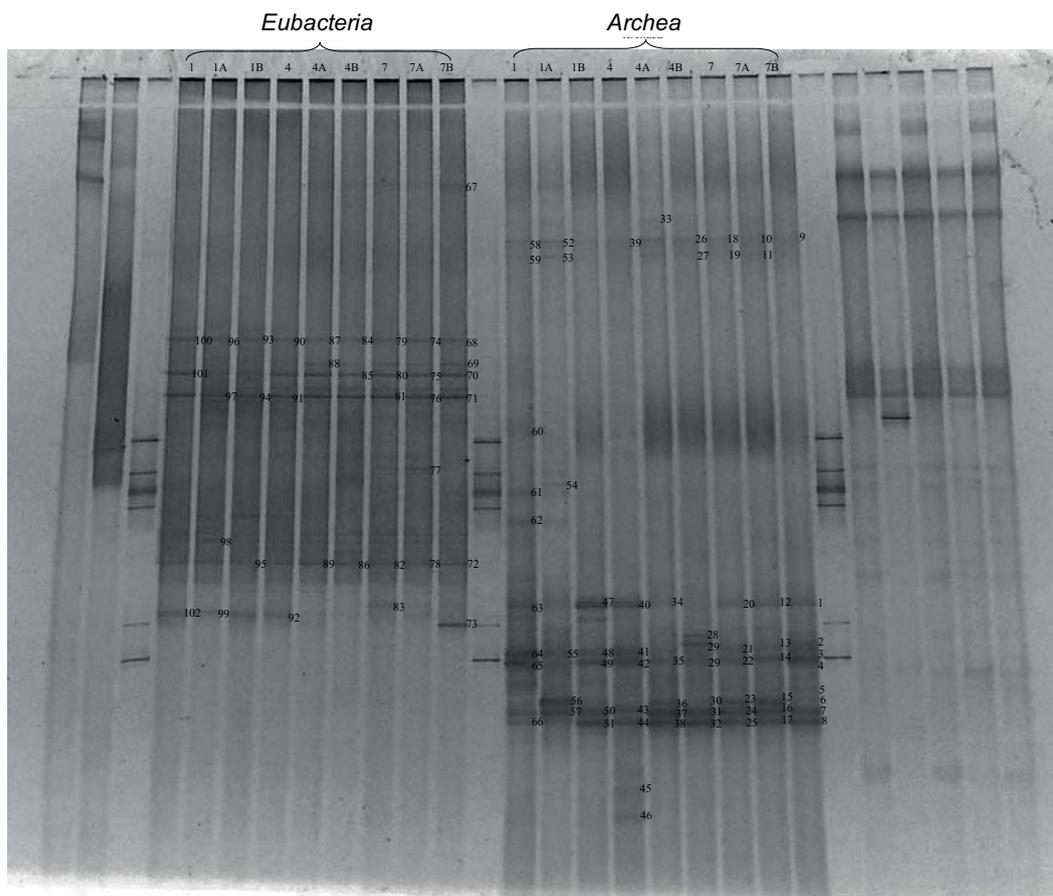
Joonis 4. Orgaaniliste ühendite sisalduse muutused segus 1:1:8 (inokulum : töödeldud sete (+85 °C) : toorsete) mesofiilsel anaeroobsel lagundamisel.  
Figure 4. Changes in the content of organic compounds in the mixture of 1:1:8 (inoculum : treated sludge (+85 °C) : raw sludge) during mesophilic anaerobic digestion.

### **Mikroorganismide identifitseerimine elektroforeesiga denatureeriva geeli gradiendis**

Substraadi lagundamist anaeroobsetes tingimustes teostavad bakterid ja arhed, kes oma kasvukeskkonna tõttu on ranged anaeroobid. Selle tõttu on nende kultiveerimine keeruline ja aeganõudev töö. Lisaks on anaeroobne kääritamine protsess, kus ühe komponendi lagundamiseks on vaja erinevaid anaeroobsete mikroorganismide rühmi – iga järgmise rühma toimimine sõltub eelmise tööst. Mõned anaeroobidel lagundamisel osalevad organismid pole võimelised kasvama tahkestatud keskkonnas, kuigi sellel võib olla sama koostis, mis vedelal valiksöötmel. Seetõttu on potentsiaalsete CH<sub>4</sub> ja H<sub>2</sub> tootvate mikroobikoosluste iseloomustamiseks sobivad eelkõige molekulaarsed meetodid, mis võimaldavad uurida otse keskkonnast eraldatud bakterikoosluste DNA-d. Üheks selliseks meetodiks on PCR-DGGE-meetod, mida kasutati ka antud töös. Meetodi nimi on tuletatud kahest meetodist: PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon (ingl k *Polymerase Chain Reaction*) ning DGGE ehk elektroforees denatureeriva geeli gradiendis (ingl k *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

Amplifitseerimisreaktsioonist (PCR) saadud produktid eraldati, kasutades elektroforeesi denatureeriva geeli gradiendis (DGGE). Analüüsi proove, mis olid võetud katsereaktorist, milles uuriti termilise eeltöötamise mõju AS-i Tallinna Vesi Paljassaare reoveepuhasti reoveesette hüdrolyüsi kiirusele (vt joonis 4). Proovid võeti katse käivitamisel. Uuriti eeltöötamise temperatuuridel +70 °C, +85 °C ja +95 °C inokulumi, töödeldud sette ja toorsette suhtega 1:1:8. Märkimisväärseid erinevusi mikroorganismide koosluste dünaamikas täheldada ei õnnestunud, sest PCR amplifikatsiooniga ei ole võimalik eristada elusaid ja surnud rakke (joonis 5).

Eraldatud bakteritest olid arvukaimalt esindatud hõimkonna *Chloroflexi* esindajad. Määratud järjestustele lähimaks liigiks oli *Levilinea saccharolytica*. *Levilinea saccharolytica* isoleeriti puhaskultuurina algselt suhkrut töötleva tehase reoveepuhastussüsteemi mesofiilsest reaktorist mudagraanulite pinnalt reoveest, milles leidis palju sahharoosi ning kergesti lenduvaid rasvhappeid (Yamada jt 2006). Teise grupi moodustasid bakterid, mille lähimaks liigiks oli *Petrimonas sulfuriphila*. *P. sulfuriphila*



Joonis 5. Reoveesetest eraldatud anaeroobsete bakterite ja arhede DNA fragmendid geelil.

Figure 5. DNA fragments of anaerobic bacteria and archae isolated from residual sludge on the gel.

*hila* on gram-negatiivne mesofiilne mitteliikuv anaeroob. Teisele grupile lähedaseks liigiks oli ka *Proteiniphilum acetatigenes*, mis puhaskultuurina isoleeriti õlletööstuse reovett töötlevast anaeroobsest reaktorist. Kolmandale bakterite grupile olid lähimateks tüüpliidiks *Owenweeksia hongkongensi* ja *Alkaliflexus imshenetskii*. Seevastu selgus eraldatud arhede fülogeneetilistest analüüsist, et kõik määratud arhed osutusid arhede perekonna *Methanosarcina* esindajate tüvedeks, olles kõige lähedasemad liikidele *Methanosarcina mazei* ning *Methanosarcina barkeri*. *Methanosarcinad* on metaboolselt mitmekülgsed metanogeenid, kes on metanogeneesi substraadina võimelised kasutama  $H_2/CO_2$ , atsetaati ja metüülamiine. *Methanosarcinasid* on isoleeritud erinevatest keskkondadest, sealhulgas näiteks prügimägedelt, reoveepuhastitest, merepõhjast ja paljude imetajate (sealhulgas ka inimese) magudest.

## **Järeldused**

*Methanosarcinade* leidumine Tallinna reoveepuhastusjaama settes on ootuspärane, sest kirjanduse põhjal on neid isoleeritud erinevatest keskkondadest, sealhulgas ka reoveepuhastitest. *Methanosarcinadel* on ainulaadne võime toota metaani kolme eri metaboolset rada kasutades. *Methanosarcinade* leidumine AS-i Tallinna Vesi Paljassaare reoveepuhasti settes viitab selle heale kasutusvõimalusele kooskääritamise komponendina või uue kääriti inokulumina. Orgaaniliste jäätmete ja energiataimede anaeroobset kääritamist on maailmas palju uuritud, kuid Eesti jaoks on see suhteliselt uus teema. Seetõttu on hädavajalikud kohalikke tingimusi, substratide omadusi ja nende eeltötlust arvestavad uuringud. Kriitilismateks küsimusteks anaeroobse protsessi puhul on seadme käivitamine ning muutused gaasiproduksioonis ja protsessi efektiivsuses, tulenevalt sisendi kvaliteedi muutustest. Seetõttu on oluline iseloomustada nii kääriti käivitamiseks vajalikku inokulumit kui ka pidevalt jälgida kääritis spontaanselt kujunevat mikroobikooslust. Biogaasi tootmist ei tohiks aga vaadelda kui üksnes energia tootmise vahendit, vaid ka kui üht parimat võimalust biolagunevate jäätmete käitlemiseks ja kasvuhoonegaaside emissiooni vähendamiseks.

## **Tänuavaldus**

Autorid tänavad toetuse eest Eesti Teadusfondi (grant nr 5889), Põhja-maade Energiarahastut (grant nr 06-Hydr-C13) ja Ettevõtluse Arendamise Sihtasutust (grant nr EU27358). A. Menert on tänulik Aita Metsale ja Jaanus Suurvälile tulemusliku koostöö eest.

## **Kasutatud kirjandus**

- Blonskaja, V., Menert, A., Vaalu, T., Vilu, R., Anaerobic mesophilic digestion of sludge with pre-treatment. 3rd International symposium on Anaerobic Digestion of Solid Wastes. Munrich / Garching, Germany, 18.-20. september 2002. Konverentsi kogumik.
- Borja, R., Martin, A., Sanchez, E., Rincon, B., Raposo, F., Kinetic modelling of the hydrolysis, acidogenic and methanogenic steps in the anaerobic digestion of two-phase olive pomace. - Process Bioche-

- mistry nr 40, 2005. Lk 1841–1847.
- Jäätmeseadus. Elektrooniline Riigi Teataja – eRT <https://www.riigiteataja.ee/ert/act.jsp?id=749804> (19.10.2010).
- Menert, A., Michelis, M., Helmja, K., Tahkoniemi, H., Vaalu, T., Malsub, T., Vilu, R., Kaljurand, M., Study of VFAs formation during anaerobic digestion of thermally treated sludge by respirometric Oxitop® method. - Kalmar Eco-Tech '05 Conference on Waste to Energy, Bioremediation and Leachate Treatment. Sweden, 28.-30. november 2005. Toim W. Hogland, T. Broby. Rapport nr 3, 2005. Lk 563-564.
- Menert, A., Vaalu, T., Michelis, M., Blonskaja, V., Rikmann, E., Mets, A., Vilu, R., Influence of thermal pre-treatment on mesophilic anaerobic digestion of sludges. - 7th International Conference Environmental Engineering: Water Engineering. Energy for Buildings: Selected Papers. Toim Cygas, D., Froehner, K. D. Lithuania: VGTU Press „Technika”, 2008. Lk 625-635.
- Mets, A., Termiliselt eelkäideldud reoveesette anaeroobne käitlemine. - Talveakadeemia 2007 kogumik. Talveakadeemia 2007, Roosta puhkeküla, Estonia, 23.-25.02.2007.
- Michelis, M., Paljassaare reoveepuhastusjaama jääkmudast vesiniku eraldamine. Seosed vesiniku kasutamise ja kliimamuutuste vahel. Baka-laureusetöö. Tallinna Tehnikaülikool. Tallinn, 2003.
- Michelis, M. Biolagunevate jäätmete anaeroobne käitlemine. Magistri-töö. Tallinna Tehnikaülikool, Tallinn 2009, 77 lk.
- Mölder, H., Blonskaja, V., Sock, O., Vaalu, T., Tallinna reoveepuhastusjaama jääkmuda koguse vähendamiseks ja metaangaasi koguse suurendamiseks rakendatavate eelkäitlusmeetodite laboratoorne uuring. Lepingulise töö nr 3–407 1. etapi aruanne. Tallinna Tehnikaülikooli Keskkonnatehnika instituut. Tallinn, 2000.
- Reoveesette käitlemine 2000-2007. <http://www.keskkonnainfo.ee/failid/vesi/reovesi06.doc> (27.08.2009)
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Kamagata, Y., *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the

few classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineaceae* classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. Int J Syst Evol Microbiol. nr 56, 2006. Lk 1331-1340.

## **FERMENTATION OF BIODEGRADABLE WASTE FOR PRODUCTION OF RENEWABLE ENERGY SOURCES**

Anne Menert, Merje Michelis, Ergo Rikmann,  
Viktoria Blonskaja, Mihkel Kaljurand, Tiit Kallaste

The efficiency of fermentation of biowaste (yield of biogas, etc) depends on a number of process parameters (kind of substrate, loading rate, hydraulic retention time, etc) of which the hydrolysis rate of organic material has the precedence. Pretreatment of material can be applied for increasing it, resulting in converting the substrate more accessible to anaerobic microorganisms. Generation of volatile fatty acids (VFAs) was studied during anaerobic digestion of thermally pre-treated (+70 °C to +95 °C) sludge. By experimental results the global optimum for mixture content and pre-treatment temperature (on the basis of gas production, total amount of acids and ratio of propionate and acetate) was the mixture inoculum: pre-treated sludge: raw sludge in the ratio of 1:1:8 and pre-treatment temperature +70 °C. It was found that even partial thermal pre-treatment (10% of raw sludge) increased the production of biogas up to 20%. Considering products of metabolism during anaerobic digestion the acetoclastic metanogenesis dominated. Culture independent technique – denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used in order to determine the impact of different pretreatment methods on the microbial community structure. Most of the bacteria identified were representatives of the phyla *Chloroflexi* and *Bacteroidetes*; all the identified archae were shown to represent the genus *Methanosarcina* – anaerobic methanogens, the main biogas producers occurring in landfills, WWTPs, in sea sediments and mammal guts. These archaea are able to produce methane by all three known methanogenic pathways – the hydrogenotrophic, acetoclastic and methylotrophic pathway.