

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Elerin Toomik

Puidujäätmete komposti mikroobikoosluse kirjeldamine

Bakalaureusetöö

Juhendaja Anne Menert PhD

Signe Viggor PhD

TARTU 2015

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Taimeraku kesta ehitus	6
1.1.1 Lignotselluloosi komponendid ja nende lagundamine	7
1.1.1.1 Tselluloos ja selle ensümaatilise lagundamine	7
1.1.1.2 Hemitselluloos ja selle ensümaatilise lagundamine	10
1.1.1.3 Ligniini ja selle ensümaatilise lagundamine	11
1.1.1.4 Teised taimeraku ühendid ja nende lagundamine.....	16
1.2. PUIDUJÄÄTMETE KOMPOSTIMINE.....	19
1.2.1 Kompostimise faasid	19
1.2.2 Kompostimisel olulised füüsikalised-keemilised parameetrid.....	22
1.2.3 Makroorganismid kompostis	24
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	25
2.1 Töö eesmärgid	25
2.2 Materjal ja meetodika.....	25
2.2.1 Kompostimiskatse	25
2.2.2 Bakteritüvede isoleerimine	27
2.2.3 Biokeemilised testid tüvedega	28

2.2.4 Koosluste DNA eraldamine.....	29
2.2.5 Geenifragmentide amplifitseerimine	29
2.2.6 Geelektroforees.....	30
2.2.7 16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogude koostamine.....	31
2.2.8 Sekveneerimine	32
2.2.9 Sekveneeritud järjestuste analüüs.....	32
2.3 Tulemused ja arutelu	33
2.3.1 Kompostimiskatse	34
2.3.2 Kompostisegu ja selle komponentide bakterikooslused.....	37
2.3.2.1 Klooniraamatukogude koostamine ja mitmekesisuse analüüs	37
2.3.2.2 Klooniraamatukogude järjestuste fülogeneetiline analüüs.....	42
2.3.3 Tüvede isoleerimine	50
KOKKUVÕTE.....	58
SUMMARY	61
KASUTATUD ALLIKAD.....	64
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	80
LISAD	82
LIHTLITSENTS.....	89

KASUTATUD LÜHENDID

K, Ka – paralleelkatsed Tallinna Loomaaia kompostisegud kompostimiskatses

KA – kuivaine sisaldus, %

K4A – Tallinna Loomaaia kompostiproov

KL – Tallinna loomaaia kompostisegu kompostimiskatse lõpus

P1 – lehtpuusaepuru kompostimiskatses

P1A – lehtpuusaepuru kompostimiskatse alguses

P1L – lehtpuusaepuru kompostimiskatse lõpus

SISSEJUHATUS

Eestis tegutsevatel puidufirmadel jääb igal aastal üle materjali, mida kehtivad regulatsioonid ei võimalda ära kasutada. Et nõudlus puidutoodetele suureneb, jääb niisuguseid jäätmeid aasta-aastalt üle üha rohkem. Ettevõtete laoplatesidele seisma jäänud puidujäätmed segunevad mulla, liiva ja kruusaga. Niisuguse materjali purustamine vähendab seadmete tööefektiivsust. Muu materjaliga segunenud puidujäätmeid ei saa energia saamiseks põletada ka katlamajades, sest puidu kütteväärtus on vähenenud ning segunenud osakesed tõstavad tuha osakaalu. Väärtuslik puit jääb seega ringlusesse suunamata.

Sellegi poolest on puidujäätmetest võimalik valmistada kaubandusliku väärtusega toodangut. Selleks tuleb, arvestades jäätmete koostist ja omadusi, neid lagundada kas aeroobselt, anaeroobselt, põletada koostootmisjaamades või gaasistada. Aeroobsel lagundamisel saadakse kompost, anaeroobse lagundamise eesmärgiks on biogaasi saamine, kusjuures tekkivat jääki - digestaati on samuti võimalik kompostina kasutada. Koostootmisjaamades saadakse kütte- ja elektrienergia põletamisel ning gaasistamise korral muudetakse pea kogu orgaaniline materjal põlevgaasiks. (AS Enprima Estivo, 2005) Erinevate tehnoloogiate valikul tuleb arvestada ka majandusliku otstarbekusega.

Puidujäätmete kasutuselevõttu ja selle aeroobset kompostimist on eelnevalt uuritud Eesti Maaülikooli Metsanduse- ja maaehitusinstituudi veemajanduse osakonnas (Anderson, 2014). Käesolev bakalaureuse lõputöö valmis seoses projektiga, mille eesmärk oli saada segunenud puidujäätmetest kvaliteedinõuetele vastavat istutusmulda/komposti.

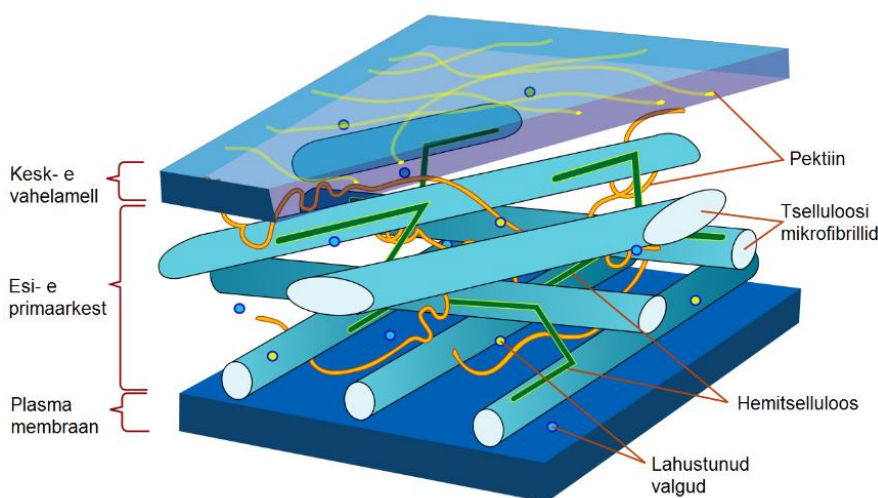
Sooviga kiirendada Eesti niigi jahedas kliimas kompostimise protsessi mikroorganismide abil, eraldati lõputöö käigus Tallinna Loomaia kompostist bakterite kooslused ning tüved. Nende analüüsimisel otsiti kirjandusest ja biokeemilisi teste kasutades puidu lagundamisvõimega baktereid, mida saaks vastavalt puidujäätmete lagundamiseks ära kasutada.

Tahaksin tänada Tallinna Tehnikaülikooli Soojustehnika instituudi ja Eesti Maaülikooli Bio- ja keskkonnakeemia labori töötajaid, katseks vajalike parameetrite määramisel. Tänapäev ka oma juhendajaid Anne Menertit ja Signe Viggorit, ilma kelleleta poleks see töö valmis saanud.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Taimeraku kesta ehitus

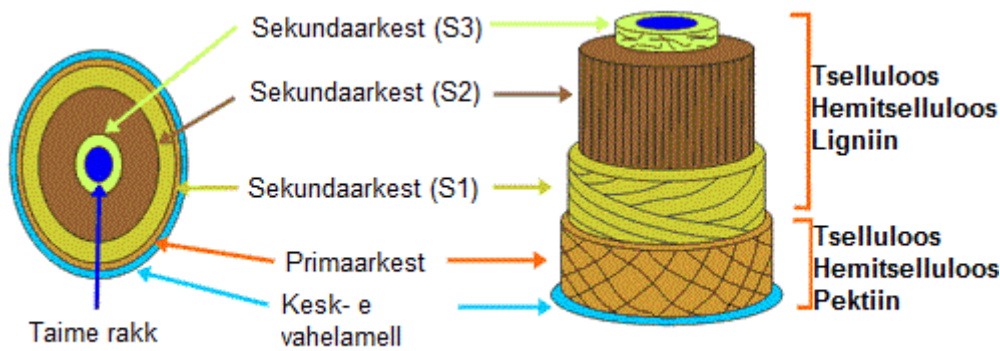
Taime primaarne ehk kasvav rakukest (Joonis 1) (ka esikest) koosneb kolmest biopolümeerist - tselluloosist, hemitselluloosist ning pektiinist, väiksemal hulgal leidub valke. Tselluloos annab taimetele jäikuse, hemitselluloos seob tselluloosi mikrofibrillid ühtseks tervikuks, mille ümber moodustab pektiin poorse keskkonna, et tselluloos-hemitselluloosi võrgustik kokku ei vajuks. (Barton ja Nortup, 2011)



Joonis 1. Taimeraku primaarkesta ehitus ja selle koostisosad (Plant cell wall diagram, 2007).

Taimeraku sekundaarne rakukest (ka teiskest) (Joonis 2), mis moodustub siis kui kasvav rakk enam ei suurene, annab rakule tugevuse ja jäikuse. Lisaks tselluloosile ja hemitselluloosile sisaldab see ligniini. Sekundaarses rakukestas puuduvad enamasti pektiin ja struktuurvalgud. Taimedes esinevad tselluloos, hemitselluloos ja ligniin on saanud üldise koondnimetuse lignotselluloos. (Barton ja Nortup, 2011)

Erinevatel taimeliikidel on tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini osakaal taimses kuivmassis erinev. Nisu (*Triticeae*) õlekõrtes on 30% tselluloosi, 24% hemitselluloosi ja 18% ligniini. Lehtpuudes on tselluloosi ja hemitselluloosi osakaal võrdne, jäädes 30% juurde. Okaspuudes on tselluloosi osakaal märgatavalt suurem kui hemitselluloosi oma. Ligniini on mõlemas umbes 20-30%. (Barton ja Nortup, 2011)



Joonis 2. Taime primaar- ja sekundaarkestad ja nende koostisosad (Lignocellulosic Biomass and Bioenergy).

1.1.1 Lignotselluloosi komponendid ja nende lagundamine

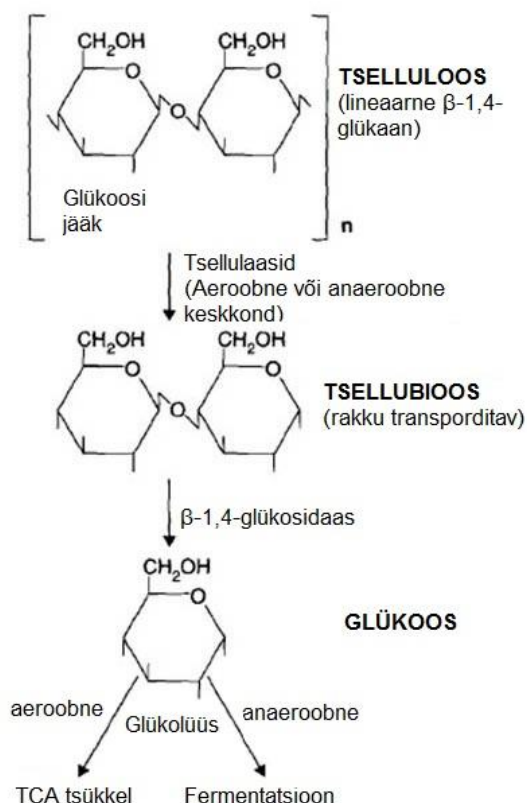
Värskelt varisenud taime rakukesta lagundamine algab, kui protopektinaas eemaldab pektiini kestad ja pektiin lagundatakse pektinaasiga. Järgneb hemitselluloosi ja ligniini lagundamine ning järele jäänud tselluloosi hüdrolyüsimine. (Barton ja Nortup, 2011)

1.1.1.1 Tselluloos ja selle ensümaatilise lagundamine

Taimed toodavad aastas umbes 4×10^7 tonni tselluloosi. Tselluloos on homopolümeer 8000-12000 glükoosi jäägist, mis on omavahel ühendatud β -1,4-glükosiidse sidemega. (Barton ja Nortup, 2011) Tsellulaasid on ensüümid, mis seda sidet lagundavad ning traditsiooniliselt jagatakse nad kahte klassi: endoglükanaasid e. endo-1,4- β -glükanaasid, mis lagundavad amorfset tselluloosi, ja tsellubiohüdrolaasid e. ekso-1,4- β -glükanaasid, mis lagundavad nii amorfset kui kristalliseerunud tselluloosi (Pérez *et al.*, 2002). Amorfset tselluloosi hüdrolyüsitakse palju kiiremini kui kristalliseerunud tselluloosi, sest need tselluloosi ahelad ei ole nii korrapäraselt pakitud ja on ensümaatiliselt kergemini lõhustatavad. Tselluloosi lagundamise kiirus sõltub oluliselt kristalliseerunud tselluloosi osakaalust puidus. (Kumar *et al.*, 2008)

Tselluloosi lagundamine algab endo- β -1,4-glükanaasiga, mis lõikab tselluloosi vabade otstega oligosahhariidideks (Joonis 3). Seejärel ekso- β -1,4-glükanaasid eemaldavad disahhariide (e. tsellubioosi) oligosahhariidide redutseeritud või mitteredutseeritud otstest. Tsellubioos

hüdrolüüsitakse β -glükosidaasiga glükoosiks. (Moat *et al.*, 2002) Kõik kolm ensüümi peavad olema keskkonnas stabiilsed kuni kinnitumiseni substraadile (Pérez *et al.*, 2002).

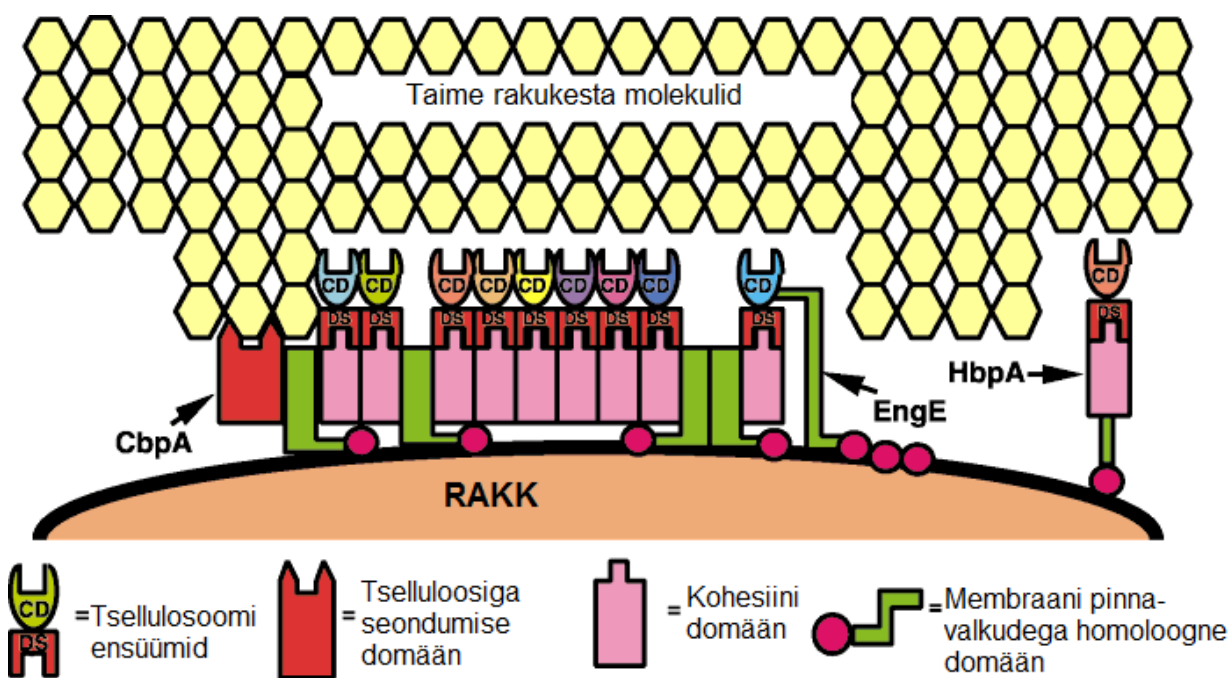


Joonis 3. Tselluloosi lagundamine (Sylvia, 2005).

Tsellulolüütilisi ensüüme toodavad nii aeroobsed (*Cellulomonas filmi*) kui ka anaeroobsed bakterid (*Clostridium thermocellum*, *Thermoactinomyces curvata*), limased hallituselaadsed organismid (riik *Amoebozoa* hõimkond *Mycetozoa*) ja mõned anaeroobsed algloomad (*Protozoa*). Nimetatud mikroorganismid suudavad luua sünergilisi suhteid tselluloosi mitte lagundavate organismidega. Nende kahe rühma koosmõjul toimub tselluloosi täielik lagunemine aeroobselt süsinikdioksiidiks ja veeks või anaeroobselt metaaniks ja veeks. (Pérez *et al.*, 2002)

Kui seened eritavad peamiselt eksoensüüme, mis ei ole seotud seeneniidistikuga, siis bakterid ja arhed toodavad nii ekstratsellulaarseid ensüüme kui ka tsellulosoome, mis on struktuurid raku pinnal. (Barton ja Nortup, 2011) Tsellulosoome on kirjeldatud bakteritel *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Clostridium acetobutylicum*, *C. cellulolyticum*, *C.*

cellulovorans, *C. clariflavum*, *C. josui*, *C. papyrosolvans*, *C. thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* ja anaeroobsetel seentel perekondadest *Neocalimastix*, *Piromyces* ning *Orpinomyces* (Fontes ja Gilbert, 2010). Tsellulosoom kinnitub vees lahustumatule tselluloosile ja lagundab tselluloosi bakterile sobivateks monosahhariidideks. Tsellulosoomis võib paikneda palju erinevaid ensüüme, mis on võimelised lagundama tselluloosi, hemitselluloosi ja teisi polüsahhariide. (Barton ja Nortup, 2011) Anaeroobi *Clostridium cellulovoransi* (Felix ja Ljungdahl, 1993) tsellulosoom koosneb erinevatest tsellulolüütilistest ensüümidest, lisaks on vaja erinevaid valke tsellulosoomi kinnitumiseks rakule ja tselluloosile (Joonis 4) (Doi ja Tamaru, 2001).



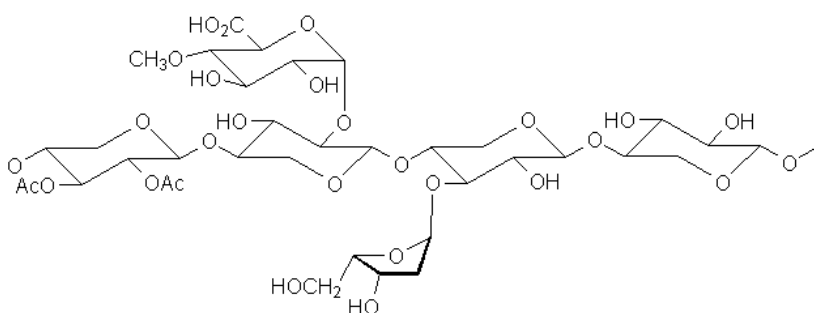
Joonis 4. Tsellulosoomi ehitus, seos tselluloosi ja rakuga (Doi ja Tamaru, 2001).

Kõige paremini on kirjeldatud 41 valgust koosnevat bakteri *Clostridium thermocellum* (Felix ja Ljungdahl, 1993) tsellulosoomi, mis jääb raku pinnaga seotuks olles vahendajaks raku ja vees lahustumatu substraadi vahel (Gold ja Martin, 2007). Tselluloosi hüdrolyüsil vabanenud tsellubioos saab läbida bakteri rakumembraani. *Clostridium thermocellum* vajab kasvuks ja tselluloosi lagundamiseks kõrget temperatuuri. Arvatakse, et looduses laguneb umbes 5-10% tselluloosist anaeroobsetes tingimustes (Pérez *et al.*, 2002).

Aeroobsete mesofiilsete seente *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina* anamorf) (Kirk ja Cullen, 1998) ja *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk ja Cullen, 1998) tsellulolüütillisi ensüüme on palju uuritud, kuid samas on näidatud, et osadel termofiilsetel seentel (kasv temperatuuril kuni 70°C kraadi) on kõrgem aktiivsus kui *T. reesei* lagundamisaktiivsus. Tsellulolüütilliste omadustega baktereid on leitud näiteks perekondadest *Cellulomonas*, *Pseudomonas* ja *Streptomyces* (Béguin ja Aubert, 1994).

1.1.1.2 Hemitselluloos ja selle ensümaatilise lagundamine

Keskmiselt sisaldab taime rakukest 20-25% hemitselluloosi. Hemitselluloos on heteropolümeer, mis koosneb 300-3000 suhkrujäägist (ksüloos, glükoos, mannoos, arabiin, galaktoos ning ka metüülglükuroonhape ja galakturoonhape) (Joonis 5). Suhkrud on omavahel ühendatud β -1,4 ja vahel ka β -1,3-glükosiidse sidemega. Erinevalt tselluloosist on hemitselluloosi molekulid lühemad ja moodustavad hargnenud ahelaid. Katteseemnetaimedes on rohkem glükuroonksülaane (monomeerideks on glükuroonhape ja ksüloos) ning paljasseemnetaimedes on rohkem glükomannaane (monomeerideks on glükoos ja mannoos). (Pérez *et al.*, 2002)



Joonis 5. Hemitselluloosi struktuur (Wood, 2014).

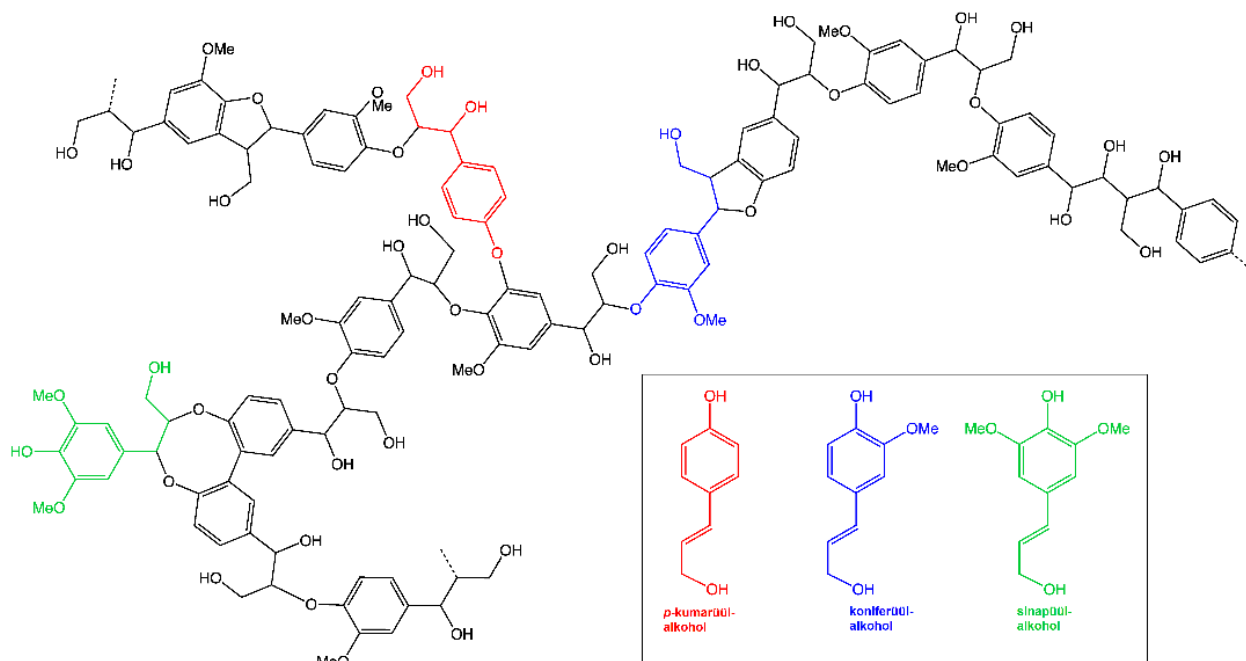
Hemitselluloosi lagundamisel vabanevad keskkonda monomeersed suhkrud ja etaanhape. Ksüloosijääkidest koosnev polüsahhariid ksülaan on peamine hemitselluloosis olev suhkur. Endo-1,4- β -ksülaan või ekso- β -1,4-ksülaan moodustavad ksülaanist oligosahhariide ja ksülaan-1,4- β -ksülosidaas vabastab keskkonda ksüloose. Hemitselluloosi lagundamiseks on vaja ka lisaensüüme, nagu ksülaani, ferrula ja p-kumarüüli esteraase, α -l-arabinofuranosidaase või α -4-O-metüül glükuroonidaase. Need ensüümid aitavad hüdrolüüsida nii puidus esinevaid

ksülaane kui ka mannoosi jääkidest koosnevaid mannaane (Pérez *et al.*, 2002). Teiste suhkrute vabastamiseks on vaja ensüüme, mis suudavad lagundada erinevate suhkrute vahelisi spetsiifilisi sidemeid. Hemitselluloosi hüdrolüüsisel vabanenud pentoosid ja heksoosid omastatakse mikroorganismide poolt kiirelt. (Barton ja Nortup, 2011)

Ksülaanaasset aktiivsust on leitud valgemädanikseenel *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk ja Cullen, 1998) ja ka aeroobsetel mikroorganismidel ning mäletsejate kõhus elavatel anaeroobsetel bakteritel (Blanco *et al.*, 1999). Seente ksülaanaasid on tavaliselt vähem termostabiilsed kui bakterite omad. Ksülaanaaside töötemperatuur on 40-60°C (Pérez *et al.*, 2002). Seente ksülaanaaside pH optimum on 4,5-5,5 ning aktinobakteritel 6,0-7,0 (Jeffries, 1994). On kirjeldatud ka aluselisemate pH optimumidega ksülaanaase bakteritest *Bacillus* sp. ja *Streptomyces viridosporus* (Blanco *et al.*, 1999).

1.1.1.3 Ligniini ja selle ensümaatilise lagundamine

Puitsetes taimedes võib ligniini osakaal olla 15-25% orgaanilisest materjalist. Ligniin koosneb kolmest fenoolsest alkoholist – sinapüül-, koniferüül- ja kumarüülalkoholist (Joonis 6). Need kolm alkoholi moodustavad kolmedimensionaalse maatriksi, mis seob taime rakukestas kovalentselt tselluloosi ja teisi polüsahhariide. (Barton ja Nortup, 2011) Monomeerid ei paikne ligniini molekulis kordusjärjestustena nagu suhkrujäägid tselluloosis, tärklises, pektiinis või inuliinis, vaid läbisegi ning on omavahel ühendatud eeter (C-O-C), C-C jne. sidemetega. Monomeeride osakaal on sõltuvalt taimeliigist erinev; lehtpuupuidus on enam koniferüülalkoholi, okaspuupuidus domineerivad koniferüül- ja sinapüülalkoholid, rohttaimed sisaldavad lisaks koniferüülalkoholile rohkem ka kumarüülalkoholi. (Bugg *et al.*, 2011a)



Joonis 6. Üks arvatav ligniini struktuur, värviliselt on toodud sinapüül-, koniferüül- ja kumarüülalkohol (Lignin, 2011).

Ligniini molekuli suurus, keeruline struktuur, erinevate sidemete rohkus ja halb lahustuvus vees on põhjuseks, miks selle lagundamine on keeruline. Vaatamata sellele on ligniini lagundamisvõimet kirjeldatud nii seentel kui ka bakteritel. Ligninaasid on üldine nimetus ensüümidele, mis lõhuvad ligniini maatriksi kovalentseid sidemeid (Barton ja Nortup, 2011). Komplekse ligniini molekuli lagundamise esimene etapp toimub rakuväliste oksüdatiivsete ensüümide, nagu näiteks mangaani peroksidaas (MnP), ligniini peroksidaas (LiP), lakaas jt., abil (Bugg *et al.*, 2011). Biopolümeeri astmelise lõhustamise käigus tekkinud vaheühendid suunatakse lõpuks tsentraalsetesse metabolismiradadesse.

Mangaani peroksidaasi ja ligniini peroksidaasi tööpõhimõte on sarnane teiste peroksidaaside (tsütokroom C peroksidaas, mädarõika peroksidaas) omaga. MnP on heemi sisaldav glükoproteiin, mida kirjeldati esimest korda valgemädanikku tekitaval basidomütseedil *Phanerochaete chrysosporium*. Nimetatud ensüüm on rakus viie isovormi kujul (Levasseur *et al.*, 2008). Nad katalüüsivad vesinikperoksiidi abil oksaalhappega seotud Mn(II) oksüdeerimist Mn(III), mis omakorda oksüdeerib erinevaid fenoolseid ühendeid tagades sel viisil ligniini depolümeerumise. (Hofrichter, 2002) MnP-ga ehituselt sarnast ligniini

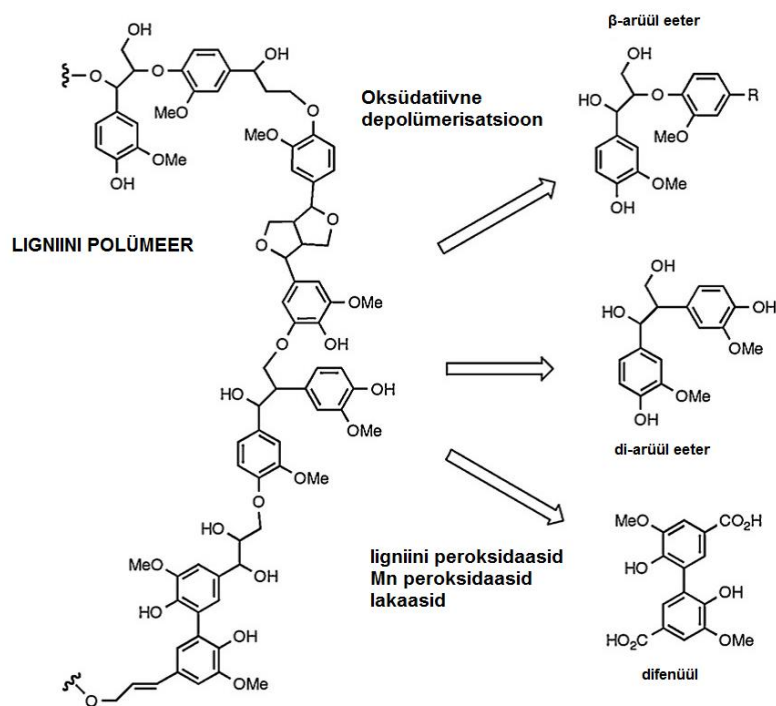
peroksidaasi on rakkudes samuti rohkem kui üks (näiteks *P. chrysosporium* koos isoensüümi (Cai ja Tien, 1993), kuid erinevalt teistest peroksidaasidest on neil väga madal pH optimum ning kõrge redokspotentsiaal. Tänu sellele on LiP võimelised oksüdeerima ka mittefenoolseid metoksurühmi sisaldavaid ligniini subühikuid. (Tien *et al.*, 1986)

Bakterid kasutavad ligniini lõhustamiseks peamiselt peroksidaase, kuid erinevalt põhjalikult uuritud seente vastavatest ensüümidest, on osade bakteriaalsete ensüümide tööpõhimõtted teadmata (Brown ja Chang, 2014). Paljudel aktinomütsetidel (näiteks bakteritel perekondadest *Nocardia* ja *Rhodococcus* (Zimmermann, 1990) jt.) on ekstratsellulaarne peroksidaasne aktiivsus (Bugg *et al.*, 2011a). Aktinomütsetidel leiduvad pleegitava toimega peroksidaasid (DyP) on heemi sisaldavad peroksidaasid, millel võib korraga olla nii kõrge peroksidaas kui ka MnP aktiivsus (Brown ja Chang, 2014). *Amycolatopsis sp.* 75iv2 (endine *Streptomyces setonii* ja *Streptomyces griseus* 75vi2) genoomi uurimine näitas, et sellel mikroorganismil on erinevaid lakaase, peroksidaase, peroksiidi tootvaid ning aromaatsete ühendite lagundamise meta- ja orto-raja ensüüme (Brown *et al.*, 2011). Nimetatud bakteritel leiti kolm DyP geeni, millest üks (DyP3) oli fülogeneetiliselt sarnane aktinomütsetide ning kaks (DyP1-2) seente vastavate järjestustega. *In vitro* analüüsid näitasid, et DyP2 omas kõrget peroksidaas ja MnP aktiivsust, mis olid sama suurusjärguga kui seentel kirjeldatud (Brown *et al.*, 2012). *Streptomyces viridosporus* T7A lagundab ligniini peroksidaasiga, mille tulemusel muutub ligniin lõpuks vees lahustuvaks vaheproduktiks – happes sadestatavaks polüfenoolseks polümeerseks ligniiniks (*acid-precipitable polyphenolic polymeric lignin* (APPL)). Tüve T7A peroksidaas on biokeemiliselt võimeline lagundama mitte-fenoolseid ühendeid, samas jääb selle oksüdeerimisvõime alla seente peroksidaasidele. (Ramachandra *et al.*, 1988) Ligninaase on leitud lisaks grampositiivsetele aktinomütsetidele ka gramnegatiivstest bakteritest hõimkondadest α -, β - ja γ -*proteobacteria* (Pérez *et al.*, 2002). Mõned tööühmad on näidanud, et mäletsejate maos elavad anaeroobsed mikroorganismid võivad ligniini osaliselt lagundada (Hu ja Yu, 2005; Akin, 1980). Bakteriaalsed ligniini lagundamisel osalevad peroksidaasid on seentest leitud ensüümidest sageli madalama aktiivsusega, mis lubab oletada, et nad ei olegi peamised ligniini lagundamise eest vastutavad ensüümid bakterites. Erinevalt seentest on bakteritel erinevaid oksüdatiivseid ensüüme (tsütokroom P450, mitte-heemset rauda sisaldav ensüüm, Mn- ja Cu-sisaldavad oksüdaasid), mis suudavad ligniini lõhustada hüdroksüülimise või demetüleerimise kaudu. Oletatakse, et

seened lagundavad pigem ligniini, et jõuda kergemini lagundatavate tselluloosi ja hemitselluloosini; bakterid aga, et saada energiat lagundamise käigus tekkivatest aromaatsetest ühenditest. (Brown *et al.*, 2014)

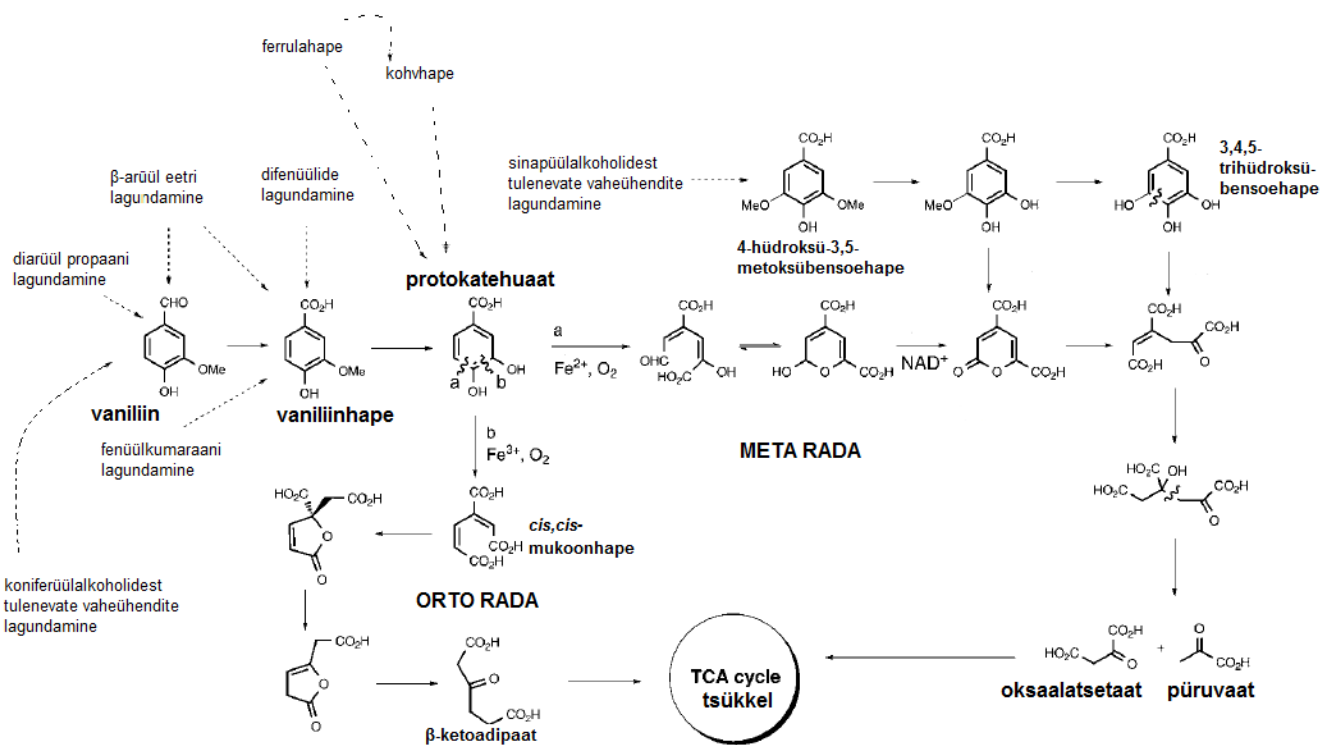
Lakaas on ensüüm, mis sisaldab nelja vase aatomit, mille abil transporditakse elektrone, et redutseerida molekulaarne hapnik veeks ja oksüdeerida substraati (fenoolseid ühendeid). Väikeste mediaatormolekulide juuresolekul suudab lakaas ka mittefenoolseid ühendeid oksüdeerida. (Bugg *et al.*, 2011) Lakaase on uuritud seentel *Aspergillus* ja termofiilsetel seentel *Myceliophora thermophila* ja *Chaetomium thermophilum* (Leonowicz *et al.*, 2001). Bakteriaalsed lakaasid on levinud, kuid vähe uuritud ensüümid, mis arvatakse olevat seotud pigmenteerumisega, sporulatsiooniga ja metallide tolerantsusega (Kellner *et al.*, 2008). Samas võivad neil olla eelised seente lakaaside ees, näiteks bakteri *Thermus thermophilus* lakaasi poolestusaeg 80 °C juures on pikem kui 14 tundi (Miyazaki, 2005), bakteri *Streptomyces psammoticus* lakaas on halotolerantne alkalifiil (Niladevi *et al.*, 2008). Bakterid kasutavad lakaase ka teiste lihtsamate aromaatsete ühendite lagundamiseks (Bugg *et al.*, 2011a).

Pruunmädanikseened (näiteks *Gloeophyllum trabeum*, *Postia placenta* jt.) hüdrolüüsivad lignotselluloosist pigem tselluloosi ja hemitselluloosi, kuid suudavad vähesel määral lõhustada ka ligniini struktuuri kasutades selleks hüdroksüülradikaali, mis on saadud Fenton'i reaktsioonilokinooni, raud(III)oksalaadi ja vesinikperoksiidi vahel. (Bugg *et al.*, 2011a)



Joonis 7. Ligniini depolümeerisatsioonil tekkivad ühendid (Bugg *et al.*, 2011a).

Ligniini depolümeerisatsiooni käigus tekib palju erinevaid madalamolekulaarseid aromaatsaid ühendeid. Näiteks männipuidus leiduva ligniini lagundamisel valgemädanikseene *P. chrysosporium* poolt identifitseeriti 28 madalmolekulaarset ühendit, 13 nendest olid aromaatsete tuumade lõhustamisel tekkinud happed (Chen *et al.*, 1982) ning 10 ühendit olid bensoehappe derivaadid, mis näitab C_{α} - C_{β} sideme lõhustamist ligniini komponentides (Chen *et al.*, 1983). Ligniinist vabanenud ühendid (ferrulahape, β -arüüleeter, di-arüüleeter, difenüül) (Joonis 7) lagundatakse mikroorganismides vaniliinhapeks, mille demetüülatsiooni tulemusel tekkiv protokatehuaat lagundatakse edasi protokatehuaadi orto või meta rajas (Joonis 8). *Actinobacteria* ja α -*proteobacteria* kasutavad pigem orto rada, hõimkondades β - ja γ -*proteobacteria* kuuluvatel bakteritel on olemas kas orto või meta raja, mõnel juhul mõlemad ensüümid. (Bugg *et al.*, 2011) Ligniini lagundavatest bakteritest on kõige rohkem uuritud α -*proteobacteria* hõimkonda kuuluvat *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, kes suudab kasvada ligniini depolümeerisatsiooni vaheühenditel, nagu näiteks difenüülid, β -arüüleetrid, fenüülkumariinid, diarüülpropanid, ferrulahape, vaniliin, vaniliinhape jne, mille lagundamine toimub protokatehuaadi orto rajas (Masai *et al.*, 2007).



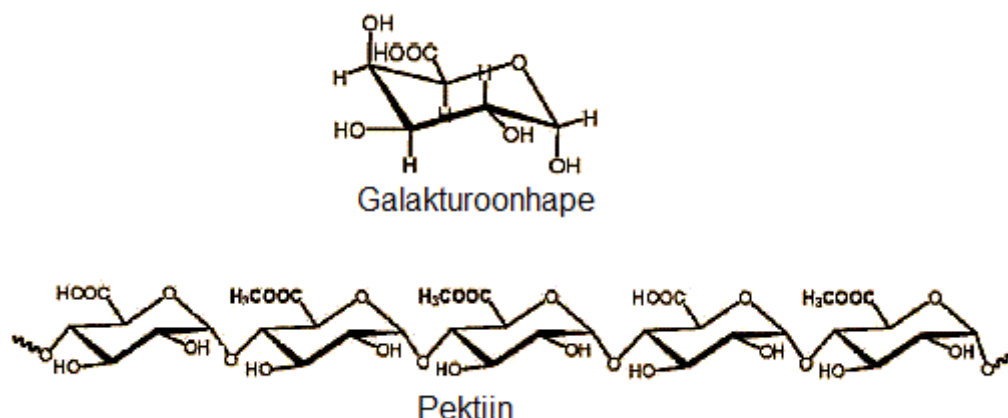
Joonis 8. Ligniini depolümeerisatsioonist tekkivate ühendite lagundamine protokatehhuadi orto ja meta rajas (modifitseeritud, Bugg *et al.*, 2011; Sylvia D. F., 2005).

1.1.1.4 Teised taimeraku ühendid ja nende lagundamine

Pektiin moodustab siduva maatriksi taime rakukestas ning on seotud seal olevate valkude ja teiste struktuursete elementidega (Barton ja Nortup, 2011). Pektiin on lineaarne polümeer, mis on kõrgelt metüleeritud polü- β -1,4-D-galakturoonhappe vorm (Joonis 9) (Moat *et al.*, 2002), milles on galakturoonhapped omavahel seotud α -1,4-glükosiidse sidemega (Barton ja Nortup, 2011). Mõnel juhul võivad pektiinil olla külghelad, siis on galakturoonhappe jääkide vahel ramnoosi jäägid (monomeeride vahel on α -1,2-glükosiidne side), mille külge on seotud arabinoosi ja galaktoosi jäägid (de Souza, 2013). Pektiini lagundavad pektiinaasid, mis on peamiselt polügalakturonidaasi ja esteraasi tüüpi ensüümid, mida toodavad paljud taimepatogeendid (Barton ja Nortup, 2011).

Protopektinaas vabastab pektiini, mille tagajärjel taimerakud eralduvad üksteisest. Protopektinaase, mis töötavad hüdrolyüütiliselt, on kahte tüüpi. Esimesed (A-tüüpi), mis vabastavad pektiini madalmolekulaarsetes segmentides, ja teised (B-tüüpi), mis vabastavad

pektiini kõrge polümeerisatsiooniga kõrgmolekulaarsetes ühendites. Protopektinaase toodavad osad bakterid ja hallitusseened. (Barton ja Nortup, 2011)



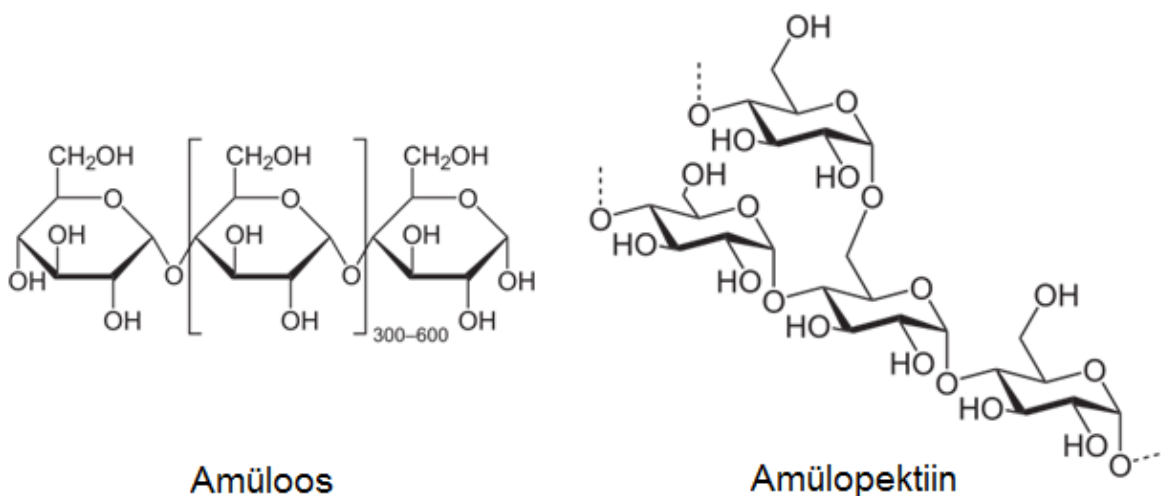
Joonis 9. Galakturoonhappe (üleval) jääkidest koosneva pektiini (all) struktuur (Pectins, 2007).

Pektiini metüülesteras lõikab C-6 metoksürühmad pektiinist, et saada polügalakturonaat. Seda lagundatakse edasi pektiidi lüaasiga, mille tagajärjel moodustub küllastumata digalakturonaat. Digalakturonaat võib moodustuda ka eksopolügalakturonaasi toimel. Digalakturonaat lagundatakse edasi, kuni saadakse 2-keto-3-deoksü-6-fosfoglükonaat, mis lagundatakse edasi Entner-Doudoroffi rajal. (Stutzenberger, 2000)

Peamine varuaine taimedes on tärklis, mida võib leida nii juurtes, lehtedes, vartes, risoomides, mugulates, õites, viljades kui ka seemnetes. Tärklis koosneb kahest glükoosi polümeerist: lineaarse struktuuriga amüloosist (glükoosi jäägid on seotud α -1,4-glükosiidsidemega) ja hargnenud struktuuriga amülopektiinist (Joonis 10) (lisaks α -1,4-glükosiidsidemetele on glükoosi jäägid seotud α -1,6-glükosiidsidemetega). (Barton ja Nortup, 2011)

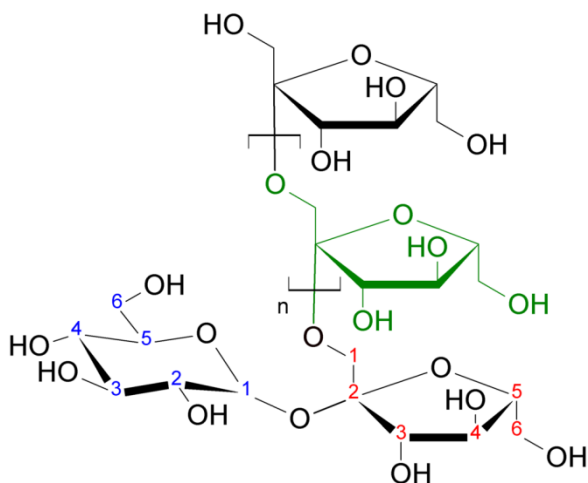
Paljud mullamikroobid eritavad keskkonda α -amülaase, α -1,6-glükosidaase ja glükoamülaase, mis lõhuvad tärklise madalmolekulaarseteks ühenditeks. α -amülaas lõhub tärklisest mitteredutseerunud otsast, mille tagajärjel vabaneb maltoos ja β -dekstriin. α -1,6-glükosidaas hüdrolüüsib ainult α -1,6-glükosiidset sidet, glükoamülaas suudab tärklises hüdrolüüsida mõlemat sidet võrdse efektiivsusega. Glükoamülaasid suudavad peale tärklise lagundada ka

mikroorganismides leiduvat polüsahhariidset varuainet glükogeeni, mille tulemusel vabaneb keskkonda samuti glükoos. (Barton ja Nortup, 2011)



Joonis 10. Amüloosi (vasakul) ja amülopektiini (paremal) struktuurid (Amylopektin, 2008; Amylose, 2007).

Inuliin on samuti üks taime varuainetest, mis koosneb polüfruktoosist ja terminaalsest glükoosijäägist. Erinevalt teistest taimerakus olevatest polüsahhariididest on inuliinis suhkrujäägid omavahel ühendatud β -2,6- ja β -2,1-fruktoossete sidemetega (Joonis 11).



Joonis 11. Inuliini struktuur (Inulin, 2006).

Inuliini molekuli suurus on taime liigiti erinev, jäädes 3500-5500 monomeerühiku vahele. Inulinaasid hüdrolüüsivad β -2,6-fruktooset sidet lineaarses molekulis ja β -2,1-fruktooset sidet inuliini hargnemiste kohast. (Barton ja Nortup, 2011) Inulinaase toodavad pärmseened (*Pichia guilliermondii* 1, *Candida aureus* G7a), samas on täheldatud ka teiste seente (*Penicillium* sp. TN-88, *Aspergillus niger* NK-126) ja bakterite (*Streptomyces* sp. GNDU1, *Staphylococcus* sp.) võimet toota inulinaase (Chi *et al.*, 2009).

1.2. PUIDUJÄÄTMETE KOMPOSTIMINE

Puidu bioloogiline lagunemine on süsinikuringes tähtsal kohal. On arvatud, et süsinikdioksiidi varud ammenduksid 20 aastaga, kui ei toimuks puidu lagundamist. Erinevad putukad uuristavad puitu auke, mis soodustavad bakterite levimist. Puidust toituvad putukad (termiidid) on sümbioosis bakterite ja algloomadega, kes suudavad nende seedekulglas tselluloosi ja hemitselluloosi lagundada. Puidu struktuuri lõhkuvad väikesed augud soodustavad ligniini lagundamist. Puidu mikroobne lagundamine toimub rakuväliste ensüümidega, mille tulemuseks on veeslahustuvad madalmolekulaarsed suhkrud. Peamised puitu lagundavad seened kuuluvad hõimkonda *Basidiomycota* ja põhjustavad kas valgemädanikku, pruunmädanikku või pehmemädanikku. Mullabakterid põhjustavad puidu pehmemädanikku. (Barton ja Nortup, 2011)

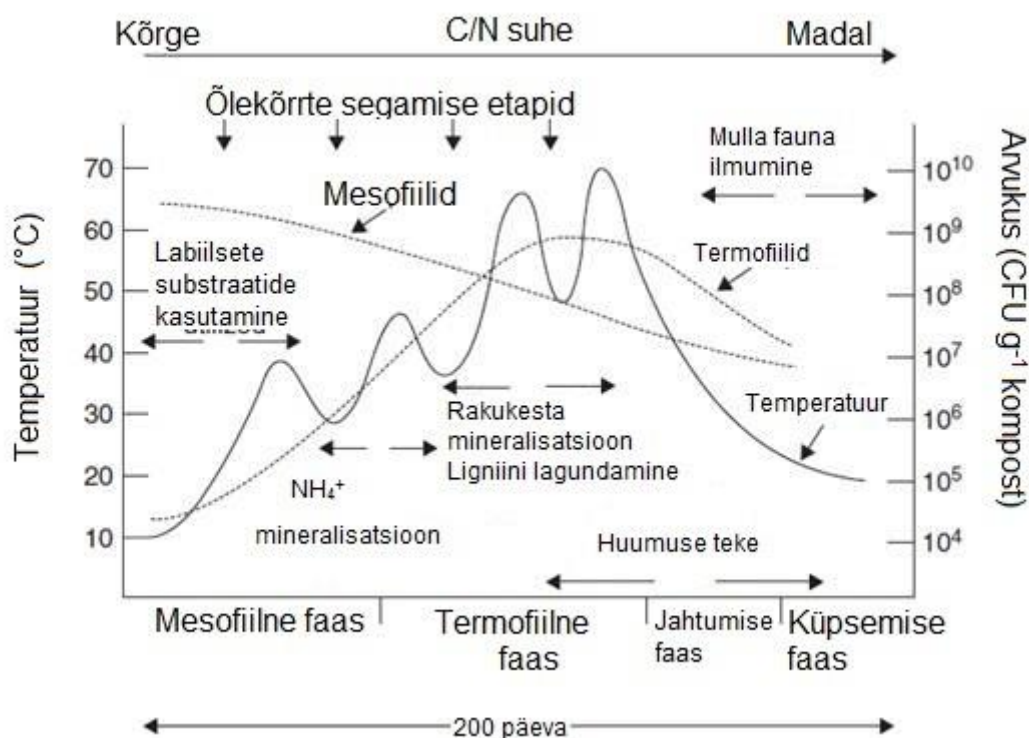
1.2.1 Kompostimise faasid

Mikroorganismide leidub looduses kõikjal, eriti palju aga mullas. Enamasti on gramnegatiivsed bakterid, seened ja ainuraksed (*Protozoa*) ülemistes mullakihtides. Sügavamal elavad grampositiivsed bakterid, ulatudes risosfääris isegi 4 km sügavusele. (Coleman *et al.*, 2004)

Kompostimine on surnud orgaanilise materjali lagunemine, mis eristub mineralisatsioonist selle poolest, et kompostimisel tõuseb temperatuur mikroobse elutegevuse tulemusena. Kompostis elavateks mikroorganismideks on peamiselt bakterid ja seened. Puidu kompostimisel toimub lignotselluloosse materjali (tselluloos, hemitselluloos ja ligniin) osaline muutmine huumuseks alles siis, kui lihtsamalt lagundatavad ja omastatavad ained (suhkrud, varuained, valgud, aminohapped, rasvad taimerakkudest) on ära tarbitud (Pérez *et al.*, 2002). Bakterid, kellel puudub tsellulaasne aktiivsus, aitavad tselluloosi lagundamisele kaasa,

kontrollides keskkonna pH-d, et vältida ensüümide inhibeerimist, ja tarbides lignotselluloosi suhtes metaboliitset repressiooni tekitavaid metaboliite (Wongwilaiwalin *et al.*, 2010).

Kompostimine jagatakse temperatuuri alusel nelja faasi (Joonis 12). Kompostimise esimeses faasis toimub orgaanilisel materjalil olevate mesofiilsete bakterite ja seente kasvamine. Kasvamiseks kasutavad nad taimerakust vabanenud suhkruid, valke, tärklisi ja rasvu. (Barton ja Nortup, 2011) Selle faasi alguses on kõige enam baktereid hõimkondadest *Proteobacteria* ja *Firmicutes*. Faasi lõpus muutub domineerivaks *Actinobacteria* hõimkond. (Chandna *et al.*, 2013) Mullas elavad seened kasvavad samuti orgaanilisel materjalil, kuid nende kasv on bakterite kasvust aeglasem. Aeroobse protsessi käigus kaotavad bakterid kuni 40% metaboolsest elutegevusest soojusena, mille tulemusena kompostihunniku temperatuur tõuseb 40-50°C. Nii kõrgel temperatuuril mesofiilsed mikroorganismid inaktiveeruvad või surevad; alles jäävad need, kes suudavad moodustada spooore. (Barton ja Nortup, 2011)



Joonis 12. Kompostimise faasid õlekõrte kompostimisel 200 päeva jooksul, selle käigus muutuvad mikrobioloogilised ja füüsikalise-keemilised parameetrid (Composting, 2011).

Teine faas ehk termofiilne ehk aktiivne faas on ajaliselt sama pikk kui mesofiilne faas. Selles faasis kasvavad ja paljunevad termofiilsed seened ja bakterid, kes lagundavad surnud orgaanilise materjali CO₂-ks ja huumuseks. (Barton ja Nortup, 2011) Toimub maksimaalne orgaanilise materjali lagundamine (Bernal *et al.*, 2009). Nagu ka esimeses faasis, toodavad aeroobselt kasvavad organismid soojust, mille tõttu tõuseb kompostihunniku temperatuur kuni 60°C kraadini. Niisugusel temperatuuril surevad viirused, inimpatogeenid ja umbrohu seemned. Kõrgenenud temperatuur aitab ensüümidel paremini töötada ja hüdrolyüsida taimset materjali. (Barton ja Nortup, 2011) Termofiilsed mikroorganismid lagundavad kompostis olevad rasvad, tselluloosi, hemitselluloosi ja osa ligniinist. (Bernal *et al.*, 2009) Selles faasis on mikroorganismide poolt toodetud domineerivateks ensüümideks endoglükanaas ja ksülanaas (Wongwilaiwalin *et al.*, 2010). Temperatuuril üle 60°C kraadi vaibub mikroorganismide elutegevus ja kompostihunnik hakkab jahtuma. Termofiilsed ja termotolerantsed seened on kriitilise tähtsusega lignotselluloosi lagundamises. (Pérez *et al.*, 2002) Termofiilses faasis võib hapniku madala kontsentratsiooni tõttu kompostis olla ka fakultatiivseid ja obligatoorseid anaeroobseid mikroorganisme. Hinnanguliselt umbes 1% mikroorganismidest viivad läbi tsellulolüütilist lagundamist anaeroobsetes tingimustes. Mikroaeroofiilsetes tingimustest kõrgetel temperatuuridel domineerivad kompostikooslustes bakterid ja mitte seened. (Wongwilaiwalin *et al.*, 2010)

Kolmandas kompostimise faasis (Joonis 12) hakkavad temperatuuri langedes mesofiilsed bakterid lagundama tselluloosi, ligniini ja pektiini, mille tulemusena moodustub huumus. (Barton ja Nortup, 2011) Antud etapis peetakse kõige tähtsamateks baktereid hõimkonnast *Actinobacteria*, kes suudavad lagundada tselluloosi ja muuta ligniini vees lahustuvaks (Pérez *et al.*, 2002).

Neljandas faasis toimub komposti järelvalmimine ning mesofiilid lõpetavad huumuse kujundamise. Huumus on väärtuslik osa mullast, see sisaldab taimede juurte kasvuks ja mikroobide aktiivsuseks vajalikke toitained, metalli-ioone ja vett. (Barton ja Nortup, 2011) Viimases faasis ilmuvad komposti ka vihmaussid, kelle peamine ülesanne on erinevate kihtide segamine, et tekiks ühtlane mass (Coleman *et al.*, 2004). Valgemädanikseeni on õnnestunud eraldada vaid komposti jahtumise ja valmimise etapis. Kuigi need seened on tähtsal kohal ligniini lagundamises looduses, usuvad osad autorid, et neil puudub oluline tähtsus

kompostimisel. (Pérez *et al.*, 2002) Valmis kompost on stabiilne ja sanitaarne produkt (Bernal *et al.*, 2009).

1.2.2 Kompostimisel olulised füüsikalised-keemilised parameetrid

Erinevate kompostimise parameetrite (põhiosa tihedus, poorsus, osakeste suurus, toitainete sisaldus, C/N suhe, temperatuur, pH, niiskus ja hapnikuvaru) optimumi tagamine aitab kaasa efektiivsele kompostimisele, sest need parameetrid määravad ära mikroorganismide kasvu ja orgaanilise materjali lagundamise kiiruse. Komposti valmimise hindamiseks tuleb mõõta rohkem kui ühte või kahte kompostimisel olulist parameetrit. (Bernal *et al.*, 2009)

Osakeste suurus ja ühtlane jaotus kompostis on tähtis mikroorganismidele, kes saavad osakeste pinnale kinnituda. Samuti tagab ühtlane ja optimaalne osakeste suurus ka piisava hapniku juurdepääsu. Liiga suured tükid kompostis ei lagune hästi, sest temperatuur ei tõuse tüki ulatuses ühtlaselt. Kui tükid on liiga väikesed, vajub kompostihunnik tihedaks ning hapniku juurdepääs sügavamatesse kihtidesse on piiratud. (Bernal *et al.*, 2009)

Kompostimise vältel tuleb parima tulemuse saavutamiseks jälgida komposteeritava materjali niiskustaset, sest bakterite arvukus sõltub niiskusest (Barton ja Nortup, 2011). Komposti niiskustase peaks olema 50-60%, olles üle vastava väärtuse, hakkab kompost veega küllastuma, kompost muutub anaeroobseks (Gajalakshmi ja Abbasi, 2008) ning käivitub käärivamine ja temperatuur tõuseb kiiresti kuni 77°C (surevad ka paljud termofiilsed mikroorganismid) (Barton ja Nortup, 2011).

Erinevate andmete põhjal on välja toodud, et soovituslik C/N suhe kompostis peaks olema 25-35/1 ning mikroobse lagundamise käigus langeb see suhe 10/1 (Bernal *et al.*, 2009). Kompostile kuivade lehtede ja/või saepuru lisamisel on segu C/N suhe sageli kõrgem (50-80/1) ning kompostimise käivitamisel tuleb segule juurde lisada lämmastiku ühendeid (Barton ja Nortup, 2011). Madala algse C/N suhte (<20/1; Barton ja Nortup, 2011) puhul toodavad mikroobid elutegevuse käigus anorgaanilist lämmastikku liias, see lendub või leostub kompostikeskkonnast, (Bernal *et al.*, 2009) ning tõuseb ka segu pH. Intensiivse lõhnaga tiolide, ammoniaagi, amiinide ja orgaaniliste hapete tekkimise vältimiseks tuleks kompostist eemaldada väävlit ja lämmastikku sisaldavad osised. (Barton ja Nortup, 2011)

Kompostimise käigus langeb segus ammoonium ionide kontsentratsioon ja tõuseb nitraatioonide kontsentratsioon. Ko *et al.*, uurimuse järgi tuleks kompostimisel jälgida hoopis $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ suhet, sest C/N suhe sõltub palju algsest komposti materjalist. (Ko *et al.*, 2008) Kõrge NH_4^+ ionide kontsentratsioon saabub termofiilses faasis, kuid langeb kiiresti protsessi jätkumisel. Selles faasis on hapnikutarve kompostis kõige suurem. (Bernal *et al.*, 2009) Samas nitrifikatsiooni selles faasis ei toimu, sest nitrifitseerijad bakterid ei suuda nii kõrgetel temperatuuridel kasvada (de Bertoldi *et al.*, 1982). Temperatuuri langemisel hakkab aga NO_3^- ionide kontsentratsioon tõusma, peamine nitrifikatsioon toimubki komposti valmimise faasis. Valmis kompostil on seega madal $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ suhe. (Bernal *et al.*, 1998) Kompostimise käigus tekivad stabiilsed lämmastiku ühendid, mis kompostist ei lendu ega leostu kergesti kompostist. Põllumajanduslikust vaatepunktist on valmis kompost parem orgaanilise aine (huumuse) ja lämmastiku allikas kui sõnnik. (Pare *et al.*, 1998)

Kompostimise algmaterjali optimaalne pH vahemik jääb 5,5 ja 8,0 vahele (de Bertoldi *et al.*, 1982). Kompostimise käigus langeb komposteeritava materjali pH, sest moodustuvad orgaanilised happed ja keskkonnast eraldub ammoniaak. Kompostimise lõpus orgaanilised happed neutraliseeritakse ja küps kompost saavutab neutraalse või selle lähedal oleva pH väärtuse. Lahustunud soolade hulga määramiseks kompostis kasutatakse elektrijuhtivust. Komposti elektrijuhtivus läbib samasugust tendentsi nagu pH, kus alguses langeb ja seejärel kasvab lõppfaasini järk-järgult. Toitainete hulk väheneb kompostimise alguses ning seejärel hakkab uuesti suurenema, sest tekib huumusaine. (Ko *et al.*, 2008)

Lignotselluloosse materjali mikroobsel lagundamisel muutub ka kompostitava materjali tekstuur, muutudes mulla sarnaseks. Kompostimise peamised eesmärged on huumuse tekkimine, et kasutada saadud mulda taimede väetamiseks. Huumusainete happed nagu humiinhappe ja fulvohappe kontsentratsioonid muutuvad kompostimise käigus. Humiinhapet tekib komposti rohkem ning fulvohappe kontsentratsioon (Ko *et al.*, 2008) ja vees lahustuvate orgaaniliste ainete osakaal langeb lagundamise käigus (Senesi, 1989). Humiinhapped annavad mullale tumeda värvuse ning nad on võimelised siduma metalli-ioone. (Ko *et al.*, 2008)

1.2.3 Makroorganismid kompostis

Mullas ja kompostis elavad peale seente ja bakterite ka teised organismid. Mikrofaunat esindavad erinevad algloomad (*Protozoa*), mesofauna esindajateks on näiteks keriloomad (*Rotifera*), ümarussid ehk nematoodid (*Nematoda*), loimurid ehk tardigaadid (*Tardigrada*), hooghännalised (*Collembola*), leсталised (*Acari*) ja valgeliimuklased (*Enchytraeidae*). Lestalsed ja hooghännalised söövad seente mütseele, mis takistab ühel seeneliigil teistest üle kasvada, ja kannavad edasi seente spore. Osad seeneliigid toituvad hoopis mullas elutsevatest nematoodidest. (Coleman *et al.*, 2004)

Makrofaunast võib välja tuua lülijalgsed (*Arthropoda*) ja väheharjasussid ehk vihmaussid (*Oligochaeta*). Nende hulgas on kahesuguseid organisme. Ühed toituvad taimsest materjalist ehk kõdunevast materjalist, teised aga elusatest organismidest. Vihmaussid, teod, nälkjad ja erinevad lülijalgsed toituvad taimsest materjalist, peenestades seda ning muutes bakteritele veelgi kergemini kättesaadavaks. Nad kaevavad auke, mis aitab kaasa mulla õhutamisele. Vihmaussid on teadatud viljaka mulla indikaatorid. Nende uuristatud käigud õhutavad mulda, teevad seda poorsemaks ning uuristamise käigus segunevad erinevad mullakihid. Vihmaussid eritavad käike luues lima, mis on heaks elukeskkonnaks bakteritele. (Coleman *et al.*, 2004)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud töö valmis koostöös Eesti Maaülikoolis läbiviidud projektiga, mis uuris kvaliteedinõuetele vastava komposti valmistamist puidujäätmetest, mida ei saa ära kasutada küttematerjalina, saepuru toodetena ega reoveesette aunsegamismaterjalina.

Lõputöö eesmärkideks on:

- hinnata Tallinna Loomaaia komposti mõju lehtpuusaepuru kompostimisele kasutades OxiTop katseseadet;
- analüüsida kompostimiskatse alguse ja lõpu proovide bakterikoosluseid;
- isoleerida bakteritüvesid Tallinna Loomaaia kompostist ning kompostimiskatse lõpust;
- testida isoleeritud tüvedel lignotselluloosi komponentide lagundamisvõimet.

Töös isoleeritud tüvesid (üksik või segakultuurina) kasutatakse edasistes uuringutes selgitamaks võimalusi puidujäätmete efektiivsemaks ja kiiremaks kompostimiseks.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kompostimiskatse

Kompostimiskatsed viidi läbi mikrokosmidena OxiTop® OC110 katseseadmetes (ruumala 600 ml), mis olid varustatud rõhu mõõtmise aparatuuriga (Joonis 13). OxiTop katseseadme mõõtepea (OxiTop®-C) registreerib süsteemis toimuvat rõhumuutust piesoelektriliselt ning mõõtesüsteemi kasutatakse hingamisaktiivsuse mõõtmiseks muldadel, kompostisegudel jms.

Komposteeritava materjalina kasutati antud töös lehtpuusaepuru (P1), millele lisati kompostimise kiirendamiseks Tallinna Loomaaia komposti (K4). Enne kompostimiskatse algust määrati segu komponentide füüsikalised-keemilised parameetrid (Tabel 1) Tallinna Tehnikaülikooli Soojustehnika instituudis (vesi%, lenduvaine%, pH) ja Eesti Maaülikoolis Bio- ja keskkonnakeemia laboris (mineraalosa%, Cüld, Nüld, C/N). Kompostimiskatse toimus nelja kuu vältel konstantsel temperatuuril (30°C).



Joonis 13. OxiTop katseseadmed.

Tabel 1. Kompostimiskatsetes kasutatud proovide füüsikalise-keemilised parameetrid

Proov	Vesi %	Kuiv- aine%	Lenduv- aine %	Mineraal- osa, %	Cüld, %	Nüld, %	C/N	pH
K4 Tallinna Loomaaed	42,4	57,6	27,5	72,5	21,86	1,58	13,8	7,4
P1 Lehtpuu- saepuru	45,6	54,4	99,4	0,6	52,7	0,1	527	5,7

Kompostimiskatse skeem on toodud Tabelis 2. Katseplaani tehti, katse käivitati ja viidi läbi Anne Menert'i poolt. Kontrollkatse (P1 ja P1a) käivitamiseks lisati lehtpuusaepurule vett, et saavutada proovis 60% niiskus ja NH_4Cl , et saavutada soovituslik C/N suhe (25-35). Katsetes (K ja Ka), kus uuriti lehtpuusaepuru kompostimist Tallinna Loomaaia inokulumiga, tuli lisada vett, sest C/N suhe jäi soovitatud vahemikku. Kompostitava segu mass mikrokosmi katses oli 50 g. Mikroorganismide elutegevuse käigus eralduva CO_2 sidumiseks lisati iga pudeli mõõtepea all olevasse anumasse NaOH graanuleid. Ühe katse kohta oli kaks paralleelset mikrokosmi (proovid tähistustega P1 ja P1a ning K ja Ka samade parameetritega). Katse lõpus teostati Eesti Maaülikooli Bio- ja keskkonnakeemia laboris gaaskromatograafia proovide gaasifaasi analüüsid (Tabel Lisa).

Tabel 2. Kompostimiskatse segude koostamise skeem

Proov	Saepuru, g	Inokulum, g	Segu niiskuse-sisaldus, %	Lisada H ₂ O kuni 60%, g	Lisada NH ₄ Cl, g	C/N
K (loomaaed+lehtpuu-saepuru)	11,45	24,00	43,43	14,68	0,00	28,06
P1 (lehtpuusaepuru)	36,00	0,00	45,60	12,96	1,24	30,07

OxiTop mõõtepea registreeritud rõhu muutused katseseadmes salvestati arvutisse ning arvutati (Võrrand 1) hingamisaktiivsus (RA4 – *respiration activity*):

$$RA4 \left[\frac{mgO_2}{gKA} \right] = \Delta p \times \frac{M_{O_2}}{R \times T} \times \frac{V_{\text{üld}} - V_{NaOH} - V_{\text{proov}}}{m_{\text{proov}}} \quad (\text{Võrrand 1}),$$

kus Δp on rõhu muutus nelja päeva jooksul (hPa);

M_{O_2} on hapniku molaarmass (31 998 mg/mol);

R on ideaalse gaasi konstant (83 140 ml*hPa/(K*mol));

T on absoluutne temperatuur (293,15 K);

V_{ges} on mõõtmisanuma ruumala (ml), V_{abs} on absorbendi ruumala (ml), V_{proov} on proovi ruumala (ml);

m_{proov} on kuiva mullaproovi mass (g KA).

RA4 arvutatakse liikuva keskmise kaudu kõigi nelja päevaste võimalike perioodide kohta. Hapniku tarbimine ajaühikus kumuleeritakse terve testperioodi kohta (=lag-faas + neli päeva). Nelja päevase perioodi algus, mis annab maksimaalne RA4 väärtuse määrab ära lag-faasi lõpu. (Binner *et al.*, 2012)

2.2.2 Bakteritüvede isoleerimine

Bakteritüved isoleeriti Tallinna Loomaaia kompostist (tüvede tähistus algab tähega A), ja pärast kompostimiskatset, milles loomaaia kompost oli segatud lehtpuusaepuruga (tüvede tähistus algab tähega L). Väljakülvide jaoks tehti esmalt 1g proovist füsioloogilise lahusega suspensioon (lõppmaht 10 ml), mis asetati tunniks loksutile 30°C (180 p/min). Seejärel

proovid seetati 30 min ning supernatantidest tehtud 10^{-1} kuni 10^{-4} lahjendused külvati R2A agarile, kuhu oli lisatud eükariootide kasvu inhibeerimiseks tsükloheksamiidi ($50\mu\text{g/ml}$). Külve inkubeeriti 30°C juures 72h. Puhaskultuuride saamiseks tehti morfoloogiliselt erinevatest kolooniatest lahjenduskülvid R2A agarile. Õvede kõrvaldamiseks analüüsiti puhaskultuuride genoomseid sõrmejälgi BOX-PCR meetodikaga (Louws *et al.*, 1994) ning määrati umbes 500 bp pikkune 16S rRNA geenifragemendi järjestus. Puhaskultuure säilitatakse 30%-lises glütseroolis -80°C juures.

2.2.3 Biokeemilised testid tüvedega

Üleöö (või kuni märgatava biomassi tekkeni) kasvanud tüvedele teostati katalaastest, mis näitab ensüümi, katalaas, olemasolu. Katalaas lagundab vesinikperoksiidi veeks ja hapnikuks. Aktiivsuse tuvastamiseks suspendeeriti rakke H_2O_2 -s ja jälgiti hapnikumullide eraldumist. Sooritati ka oksüdaastest testribadel tsütokroom c oksüdaasi olemasolu tuvastamiseks. Ensüümi määramine põhineb värvitu kunstliku substraadi värvumisel violetseks kui see oksüdeerub oksüdaasi ja hapniku juuresolekul. Kui tsütokroom c oksüdaas tüves puudub, jääb testribale kantud biomassi ümbrus värvumata. (Heinaru ja Vedler, 2011)

Tüvede võimet kasutada metabolismiks sahharoosi, fruktoosi, arabinoosi, ksüloosi, galaktoosi, mannoosi ja glükoosi testiti süsivesikute kasutamise põhisöötmetel (toatemperatuuril). Vastava suhkru kasutamise üle saab otsustada happe kogunemise järgi söötmesse. Antud söötme korral registreeriti happe teke tumepunase indikaatorvärvi muutumisel kollaseks. (Heinaru ja Vedler, 2011)

Vaadeldi tüvede võimet kasvada toatemperatuuril kahe nädala jooksul minimaalsöötmel (Heinaru ja Vedler, 2011), mis sisaldab ainsa süsinikuallikana ligniini lagundamisel tekkivaid aromaatsaid happeid (2mM) - ferrulahape, kaneelhape, vanilliinhape, klorogeenhape, kohvhape ja teistel ligniini lagundamisel tekkivaid aromaatsaid ühendeid (2,5mM) - fenool, salitsülaat ja bensoaat.

Tärglase lagundamiseks vajaliku amülaasi olemasolu testimiseks kasvatati tüvesid neli päeva tärglase söötmel (30°C). Amülaasse aktiivsuse nähtavale toomiseks värviti tassi Grami järgi

värvimisel kasutatava Lygoli lahusega, mis sisaldab joodi. Koloonia ümber tekkinud halo diameeter mõõdeti joonlauaga. (Heinaru ja Vedler, 2011)

Tsellubioosi lagundamist teostava β -glükosidaasi olemasolu uuritud bakteritüvedes registreeriti eskuliini ja rauaioone sisaldaval toiteagari söötmel (toatemperatuuril, 2 päeva). Eksuliini hüdroliüsil tekkiv eskuletiin reageerib söötmes olevate rauaioonidega ning alguses hele ja UV-valguses fluorestseeruv sööde värvub tumedaks ning fluorestsents kaob. (Heinaru ja Vedler, 2011)

Tsellulaasset aktiivsust kontrolliti karboksümetüülselluloosi (CMC) söötmetassil (0,4% CMC, 0,2% NaNO₃, 0,1% K₂HPO₄, 1,025% MgSO₄×7H₂O, 0,05% KCl, 0,02% pepton, 1,7% agar). Pärast ühe või kahe nädalast kasvu (30°C) toodi tsellulaasne aktiivsus nähtavale tasside värvimisega Lygoli lahusega. Koloonia ümber tekkinud halo diameeter mõõdeti joonlauaga. (Kasana *et al.*, 2008)

Summaarset tsellulaasset aktiivsust testiti 5 ml minimaalsöötmes (30°C), kuhu asetati filterpaberi ribad (7x1,5 cm) ja 100 µl LB-s üleöö (või märgatava biomassini) kasvanud rakke. Tsellulaasse aktiivsuse olemasolul filterpaber laguneb, filterpaberi pinnale moodustuvad kolooniad või tekib söötmesse märgatav kogus biomassi. (Maki *et al.*, 2012)

2.2.4 Koosluste DNA eraldamine

Koosluse DNA eraldati lehtpuusaepurust enne (P1A) ja pärast (P1L) kompostimist, Tallinna Loomaia kompostist enne kompostimist (K4A) ning komposti segust (lehtpuusaepuru segatud loomaia kompostiga) pärast kompostimiskatset (KL) MO BIO PowerSoil™ DNA Kit'i abil (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad), järgides tootjapoolset protokollit.

2.2.5 Geenifragmentide amplifitseerimine

Geenifragmentide amplifitseerimiseks kasutati PCR reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl. Segu sisaldas 1x lõppkontsentratsiooniga PCR puhvrit [75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20], 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM igat nukleotiidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,8 µM primereid (Tabel 3), 0,5 U Taq DNA *Polymerase* ja 1 µl DNA-d või 1 µl raku lüsaati (puhaskultuuride korral). Lüüsimiseks kuumutati rakke 10 minutit 96°C juures,

jahutati jääl ning rakukestad eraldati tsentrifuugimisel (13000 x g, 1 min). Amplifikatsiooniprogramm koosnes initsiatsioonietapist 95°C juures 5 minutit, millele järgnes 30 tsüklit. Iga tsükel koosnes kolmest etapist: DNA ahelate denatureerimine 95°C juures 1 minut, praimerite seondumine vastava seondumistemperatuuri (Tabel 3) juures 1 minut, DNA süntees 72°C juures 1 kuni 8 minutit ning pärast 30 tsüklit toimus lõppekstensioon 72°C juures 10 minutit.

Tabel 3. Töös kasutatud praimerid

Praimerite sihtmärklau	Praimerite nimetus	Järjestus 5' – 3'	Viide	Seondumis-temperatuur	Sünteesiaeg (min)	Produkti suurus (bp)
Tüvede iseloomustamiseks/klooniraamatukogu koostamiseks						
16S rRNA	PCR1 Seq1	AGAGTTTGATCATGGCTC AG GTATTACCGCGGCTGCTG G	Weisburg <i>et al.</i> , (1991) Vedler <i>et al.</i> , (2000)	55	2	~450
Kordus-järjestus	BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCT GACG	Louws <i>et al.</i> , (1994)	53→68	1→8	erinev
Kloonide kontrollimiseks						
Vektor pTZ57R/T	M13-F M13-R	CATTTTGCTTGCCGGTCA AACAGCTATGACCATG	Thermo Scientific™, Leedu	50	2	erinev

2.2.6 Geelelektroforees

PCR edukuse kontrollimiseks kasutati 0,8% agarosgeeli 1x TAE puhvril, millele lisati 0,5 µg ml⁻¹ kontsentratsiooniga etiidumbromiidi (EtBr). Geeli hambasse kanti 5 µl proovi segatuna 1 µl laadimispuhvriga (6x MassRuler™ Loading Dye Solution; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,03% broomfenoolsinine; 60% glütserool; 60 mM EDTA; Thermo Scientific™, Leedu). Produkti suuruse hindamiseks kasutati 1 kb DNA suurusmarkerit (GeneRuler™;

Thermo Scientific™; Leedu). Geelektroforees viidi läbi 1x TAE puhvril 100 V juures. Geeli pildistati UV transilluminaatoris.

2.2.7 16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogude koostamine

Amplifitseeritud geeni produktid puhastati geelist kasutades QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) ja ligeeriti vektorisse pTZ57R/T kasutades InsTAclone™ PCR Cloning Kit-i (Thermo Scientific™; Leedu) järgides tootjapoolset protokollit.

Ligaasisead (10 µl) sadestati 25 µl 96% etanooli ja 1 µl 5M NaCl lahuse lisamisega. DNA sadenes temperatuuril -20°C 20 minuti jooksul, sadet tsentrifuugiti 15 minutit temperatuuril 4°C 13 000 x g juures ning pesti kaks korda 150 µl 70% etanooliga. Saadud sade kuivatati ning suspendeeriti 5 µl vees. Sadestatud ligaasisead viidi elektroporatsiooni teel *E. coli* DH5α kompetentsetesse rakkudesse ja plaaditi selektiivsöötmele.

Kompetentsete *E. coli* rakkude saamiseks külvati 130 µl üleöö kultuuri 5 ml LB-vedelsöötmesse ja kasvatati 2 tundi 37°C juures. Rakud tsentrifuugiti söötimest välja (1 min, 13000 x g), pesti kaks korda 0,5 ml destilleeritud veega ja kaks kord 0,2 ml 10% glütserooliga. Seejärel suspendeeriti rakud 50 µl 10% glütseroolis. Rakke ja töölahuseid hoiti pidevalt jääl.

Kompetentsetele rakkudele lisati 2,5 µl vees lahustatud sadestatud ligaasisead ning pipeteeriti elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsioon viidi läbi “BioRad” elektroporaatoriga “*E. coli* pulser” pingel 2500 V. Peale elektroporatsiooni lisati küveti 1,5 ml LB söödet, ühtlustati proov ja valati tagasi katseklaasi. Seejärel kasvatati rakke tund aega temperatuuril 37°C, rakud kontsentreeriti tsentrifuugimisega ja plaaditi Luria Bertani (LB) tardsöötmele, mis sisaldas 150 µg ml⁻¹ ampitsiliini, 48 µg ml⁻¹ isopropüül-β-D-tiogalaktopüranosiidi ja 80 µg ml⁻¹ 5-bromo-4-kloro-3-indolüül-β-D-galaktopüranosiidi. Transformante kasvatati 37°C juures üleöö ja kloneerimise õnnestumist kontrolliti sini-valge testi abil. Edasises töös kasutati valgeid kolooniaid. Väljavalitud kolooniatest tehti külvid steriilse tikuga LB-tardsöötmega tassile, kuhu oli lisatud ampitsiliini (150 µg ml⁻¹) ning kasvatati 37°C juures üleöö. Inserteerunud geeni sisaldava plasmidi olemasolu kontrolliti vektori spetsiifiliste praimeritega M13-F ja M13-R läbi viidud PCR analüüsiga (Tabel 3). LB-ampitsiliini-

tardsöötmele kasvanud rakke lisati PCR segusse steriilselt pipetiotsikuga. PCR edukust kontrolliti geelelektroforeesiga (2.2.6).

2.2.8 Sekvenerimine

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

2.2.9 Sekveneritud järjestuste analüüs

Sekvenerimisjärjestusi analüüsiti BioEdit (v7.2.5) programmiga, neile leiti vasted ja referentstüved BLAST otsingumootorit (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) kasutades, järjestuste joendamiseks ja vastavate fülogeneetiliste puude tegemiseks kasutati Mega (v.6) programmi (<http://www.megasoftware.net/>).

Klooniraamatukogude analüüsiks (kimääride välistamine, akumulatsiooni kõverate koostamine, mitmekesisuse parameetrite leidmine) kasutati programmi RDP pipeline (v.11.3) (<https://rdp.cme.msu.edu/>). Klooniraamatukogude iseloomustamiseks arvutati ka Good's kattuvus (C) vastavalt võrrandile 2.

$$C = 1 - \frac{s}{N} \quad (\text{Võrrand 2}),$$

kus

s on ühe klooniga esindatud rühmade arv (*Cutoff*-väärtus 90%);

N on klooniraamatukogus olevate kloonide arv (Good 1953).

2.3 Tulemused ja arutelu

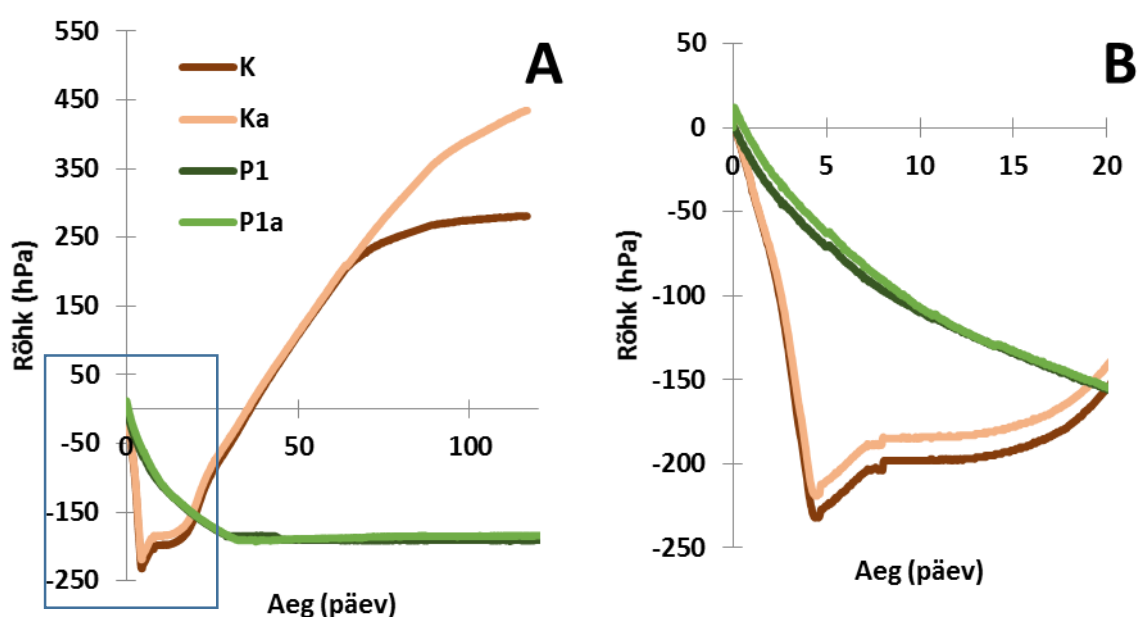
„Eesti metsanduse arengukava aastani 2020“ näeb ette puidukasutuse suurendamist (Metsanduse arengukava 2011-2020, 2010) seoses „Euroopa 2020“ jätkusuutliku ja kaasava majanduskasvu strateegiaga, mis näeb ette 20% energia saamist taastuvatest energiaallikatest (Euroopa 2020. aasta eesmärgid, 2015). Puidukasutuse suurendamine tähendab, et ka puidujäätmete hulk tõuseb. Puiduga tegelevates tööstusettevõtetes jäi 2013. aastal üle umbes 106 000 tonni määratlemata kasutusega puidujäätmeid (Lisa 2) (Avalikud päringud, 2015). Üheks probleemiks on puidujäätmete segunemine pinnase, kivi/betooni vms materjaliga, mille tagajärjel tuleb sellise jäätme ladustamisel prügilates või vastavates instantsides tasuda umbes 45 eurot tonni kohta (puhta jäätme korral on tasu umbes 14 eurot) (Puitjäätmete vastuvõtt, 2015). Seega jääb suur osa väärtuslikust puidust ja selles peituvast energiast kasutamata.

Ühe lahendusena antud jäätme kasutamiseks või väärdamiseks võiks olla kompostimine. Aastate jooksul on välja antud erinevaid artikleid, milles käsitletakse taimse materjali (tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini) lagundamist veiste vms loomade väljaheidetes või puidul leiduvate mikroorganismidega (Fuller, 1943; Maki, 2012; Singh, 2002; Tang, 2011; Wongwilaiwalin, 2010). Taimse massi segamine loomade väljaheidetega tagab kompostimiseks soovitusliku C/N suhte (Huang, 2006). Erinevatele komposti segudele on tehtud ka koosluste kirjeldusi, et välja selgitada organisme, kes on tähtsad orgaanilise aine lagundamises (Chandna *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2011; Wakase *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). Samuti on püütud eraldada organisme, kes lagundavad orgaanilist ainet anaeroobselt ning mille käigus vabaneb keskkonda biogaasi (Koizumi *et al.*, 2003; Schwarz, 2001; Ueno *et al.*, 2001). Parimaks kohaks lignotsellolüütiliste anaeroobide saamiseks on rohtsest ja puitunud taimestikust toituvate mäletsejate seedeelundkond või väljaheidet (Dowd *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2010). Anaeroobse kompostimise eesmärgiks on biogaasi saamine võimalikult suures koguses. Aeroobse kompostimise korral saadakse pigem kvaliteetmulda/komposti. Mõlema protsessi puhul peab algmaterjali purustama ja peenestama, anaeroobse kompostimise korral on see eriti tähtis. Aeroobse kompostimise korral on tarvis järjepidevat segamist ja aereerimist 10-14 nädala (olenevalt kliimast ja kohast, võib võtta aega kuni aasta (Liivik, 2014)) jooksul. Biogaasi produktsiooni korral toimub protsess kuni 3 nädalat, millele järgneb umbes kuue

nädalane aerobne töötus. Anaeroobse protsessi korral lagundatakse umbes 50% orgaanilisest materjalist ning tekib reovesi, mida aerobse kompostimise korral ei teki. Mõlemad protsessid nõuavad kulutusi, samas saab anaeroobse lagundamise muuta isemajandavaks. (Fricke *et al.*, 2005; Chynoweth *et al.*, 2001). Sellega seoses sai antud töö eesmärgiks eraldada kompostist baktereid, kes oleksid suutelised lagundama lignotselluloosseid ühendeid, ning neid edastistes töödes kasutada puidujäätmete lagundamise kiirendamiseks.

2.3.1 Kompostimiskatse

Saepurujäätmete väärindamist kompostiks jälgiti miniatuurses kompostimiskatses, mis viidi läbi Oxitop katseseadmes. Substraadina kasutati lehtpuusaepuru ja inokulumina Tallinna Loomaaia komposti (K ja Ka), kontrollkatses (P1 ja P1a) saepurule inokulumi ei lisatud. Kasutatud inokulumi puhul on tegemist Tallinna Loomaaia kompostiga, mis valiti testimiseks, kuna on valmistatud suures osas mäletsejate sõnnikust, söödajäätmetest, heina, okste ja lehtede segust (Liivik, 2014) ning milles leiduvad mikroobid on tõenäoliselt võimelised lagundama lignotselluloosi. Ka varasemad tööd on näidanud, et osa mikroorganisme, kes

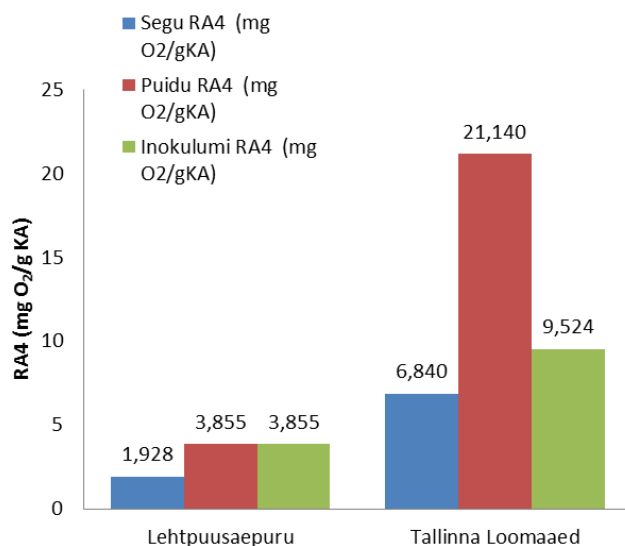


Joonis 14. Rõhu muutus lehtpuusaepuru (P1, P1a) ja loomaaia komposti+lehtpuusaepuru segu (K, Ka) inkubeerimisel 30°C OxiTop katseseadmes (A). Ristkülikuga tähistatud ala on suurendatult esitatud joonisel B.

elutsevad mäletsejate seedetraktis, väljuvad koos väljaheidetega ja suudavad lagundada väljaheidetes olevaid aineid või ka loomade toiduks olnud taimedest pärinevat lignotselluloosi. (Avgustin *et al.*, 1997; Dowd *et al.*, 2008; Hespell *et al.*, 1998)

Nelja kuu vältel registreeriti OxiTop katseseadmega mikroorganismide elutegevuse käigus toimuvat rõhu muutust suletud süsteemis (Joonis 14).

Esimestel päevadel toimus kompostisegu K ja Ka sisaldavates anumates kiire rõhu vähenemine, mis on põhjustatud segus leiduva orgaanilise aine aeroobsest lagundamisest mikroobide poolt (Joonis 14B). Viiendaks päevaks on kompostiseguga katsetes (K ja Ka) enamuse hapnikust tarbitud ning suurt rõhu muutust järgmise kümne päeva jooksul katses ei registreerita. Ilmselt toimusid sel perioodil olulised muutused komposti koosluses – aeroobsete mikroobide elutegevus vaibus ning kasvama hakkasid fakultatiivsed ja obligatoorsed anaeroobid. Viimaste elutegevuse käigus hakkas katseseadmes kogunema metaani, mistõttu rõhk süsteemis tõusis (Joonis 14A). Katse lõpus katseseadmes oleva õhu koostise analüüsil saadi metaani kontsentratsiooniks proovides K ja Ka vastavalt 29 ja 37% (Lisa 1). Tallinna Loomaia kompostisegu (K) keskmine hingamisaktiivsus (RA4) on



Joonis 15. Lehtpuusaepurul (P1) (vasakul) ja Tallinna Loomaia kompostisegul (K) (paremal) nelja päeva maksimaalne keskmine hingamisaktiivsus (RA4) kuivaine (KA) kohta

tunduvalt suurem võrreldes lehtpuusaepuru (P1) hingamisaktiivsusega, eriti arvestatuna puidu kuivaine kohta (Joonis 15). Hingamisaktiivsuse erinevused segu, puidu ja inokulumi kohta tulenevad RA4 ühikväärtusest, mis arvestab konkreetset katses kasutatud segu, puidu või inokulumi kaalutist. Hapniku tarbimine proovides P1 ja P1a jõudis platoole kolmekümnendal päeval, kuid rõhu tõusu ei järgnenud. Võib oletada, et lehtpuusaepurul elanud organismid olid kõik aeroobid ning hapniku lõppemisel ei suutnud mikroorganismid enam edasi kasvada.

Erinevates kompostimisfaasides domineerivad erinevad kooslused, mis on kohanenud kindlate keskkonna parameetritega. Esimeses mesofiilses faasis on kõige tähtsamad bakterid ja seened. (Yu, 2007) Mesofiilsete mikroorganismide elutegevuse tõttu kiirenes hapniku omastamine kompostiseguga mikrokosmidest (Joonis 14). Kompostisegus olevad polüsahhariidid hüdrolüüsitakse monomeerseteks suhkruteks, valgud aminohapeteks ja lipiidid rasvhapeteks. Järgmise sammuna muudetakse saadud lihtsamad ained mikroorganismide poolt erinevateks lühikesteks hapeteks ja/või alkoholideks ning happed omakorda atsetaadiks. Kui keskkonnas on piisavalt palju vaba atsetaati ja vähe hapnikku, saavad hakata kasvama metanogeensed mikroorganismid, kes toodavad atsetaadist metaani. (Chandra *et al.*, 2012) Anaeroobsed seened toodavad suhkruid kääritades näiteks atsetaati, formaati, vesinikku, süsihappegaasi, laktaati, suktsinaati ja etanooli, millest neli esimest on substraadiks metanogeenidele. (Jin *et al.*, 2011) *In vitro* katsed on näidatud, et anaeroobsed seened ja metanogeenid kasvavad kultuuris sümbioosis - metanogeenid suudavad suunata seente tööd nii et, viimased lagundavad efektiivselt lignotselluloosi, tootes samal ajal rohkem atsetaati, mis on omakorda lähteaineks metaani tootmiseks metanogeenidele (Marvin-Sikkema *et al.*, 1990; Teunissen *et al.*, 1992). Ilmselt oli ka kompostisegudes K ja Ka kasutatud inokulumis säilinud mikroorganisme, kes mikrokosmis hapniku lõppemisel hakkasid kasvama (Joonis 14A) ja metaani tootma (Lisa 1).

Mikrokosmkatsed lehtpuusaepuru ja Tallinna Loomaia kompostiga näitasid, et aeroobsete mesofiilsete bakterite arvukus segus on kõrgem (ehk hapnikutarbe kiirus on suurem) kui ainult saepuru sisaldanud katses (Joonis 15). Töö järgmises etapis iseloomustatakse kompostisegu komponentide kooslusi katse algul ja segu kooslust katse lõpus, et hinnata potentsiaalsete lignotsellolüütiliste bakterite olemasolu.

2.3.2 Kompostisegu ja selle komponentide bakterikooslused

2.3.2.1 Klooniraamatukogude koostamine ja mitmekesisuse analüüs

OxiTop katseseadmes läbi viidud mikrokosmikatses käigus toimunud koosluse mitmekesisuse muutumise hindamiseks koostati Tallinna Loomaaia komposti (kloonide tähis K4A), lehtpuusaepuru katse alguse (P1A) ja lõpu (P1L) ning kompostisegu lõpu (KL) proovidest eraldatud koosluse DNA-lt amplifitseeritud ~450 bp suuruse 16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogud. Peale kimäärade välistamist (RDP pipeline ja Blast otsingu mootorit kasutades) jäi edasiseks analüüsiks K4A, P1A, P1L ja KL klooniraamatukogudesse vastavalt 32, 24, 23 ja 35 järjestust (Lisa 4), mille põhjal koostati koos GenBank andmebaasist leitud referentsjärjestustega fülogeneetiline puu (Joonis 17). Klooniraamatukogudest pärinevad järjestused moodustasid fülogeneesipuul ühiseid klastreid järjestustega riik *Bacteria* hõimkonda *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (klassid *Alpha*-, *Beta*- ja *Gammaproteobacteria*), *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes* või riik *Archaea* hõimkonda *Thaumarchaeota* kuuluvate tüvedega. Kaheksale järjestusele Tallinna Loomaaia komposti klooniraamatukogust (K4A) leiti GenBank andmebaasist lähim vaste klassifitseerimata bakteri järjestusega (identsus protsent 83-88, Lisa 4).

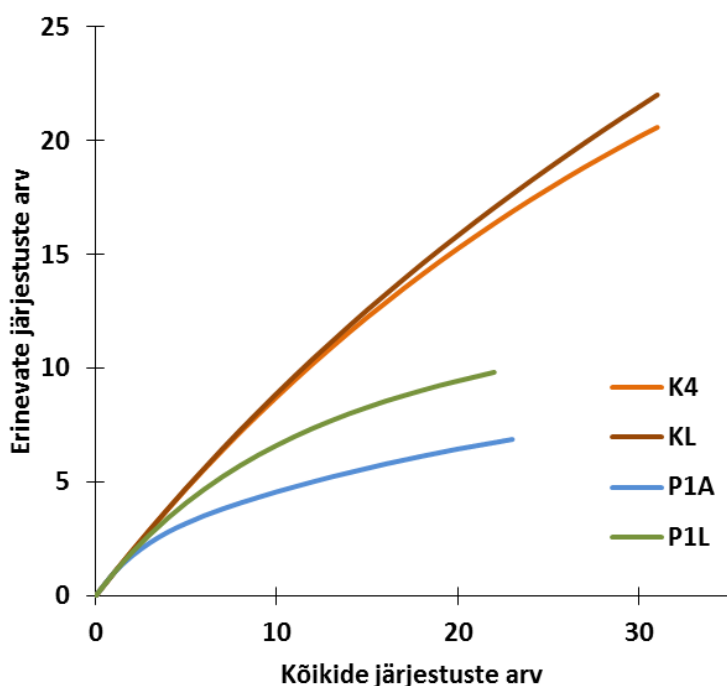
Tabel 4. 16S rRNA geeni klooniraamatukogude mitmekesisuse analüüsi tulemused. Esitatud on analüüsitud kloonide, erinevate järjestuste ja teoreetiliselt võimalike järjestuste (S_{Chao}) arvud ning Good's kattuvuse väärtused

Proov	Järjestuste arv	Erinevate järjestuste arv	Teoreetiliselt võimalike järjestuste arv (S_{Chao})	Good's kattuvus
K4A	32	21	32	0,59
KL	35	24	51	0,51
P1A	24	7	8	0,88
P1L	23	10	12	0,83

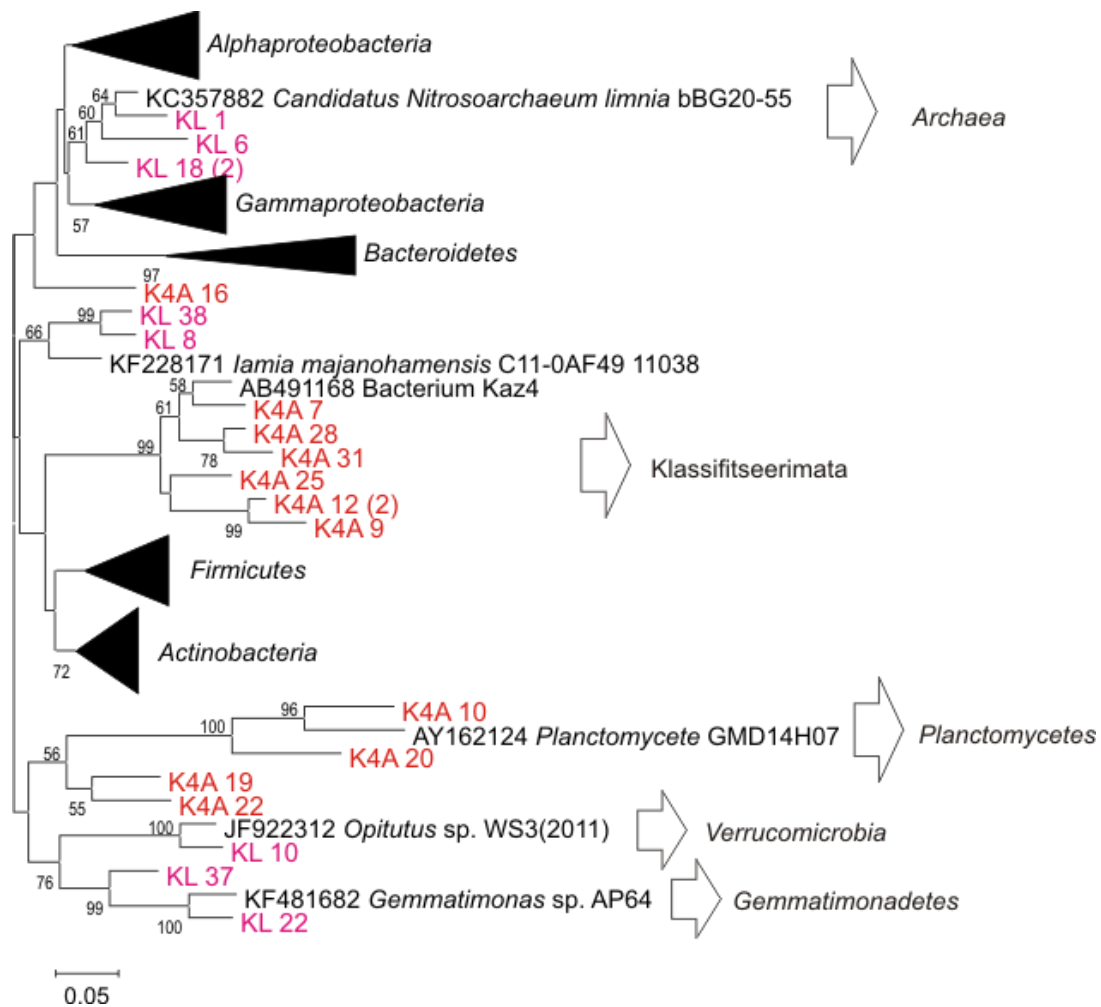
Programmi RDP pipeline abil koostati klooniraamatukogude mitmekesisuse hindamiseks akumulatsioonikõverad (Joonis 16), mis kirjeldavad erinevate järjestuste arvu sõltuvust

kõikide analüüsitud järjestuste arvust. Tabelis 4 on esitatud ka antud programmi poolt leitud erinevate järjestuste arv ning teoreetiliselt võimalike järjestuste arv S_{Chao} indeksina.

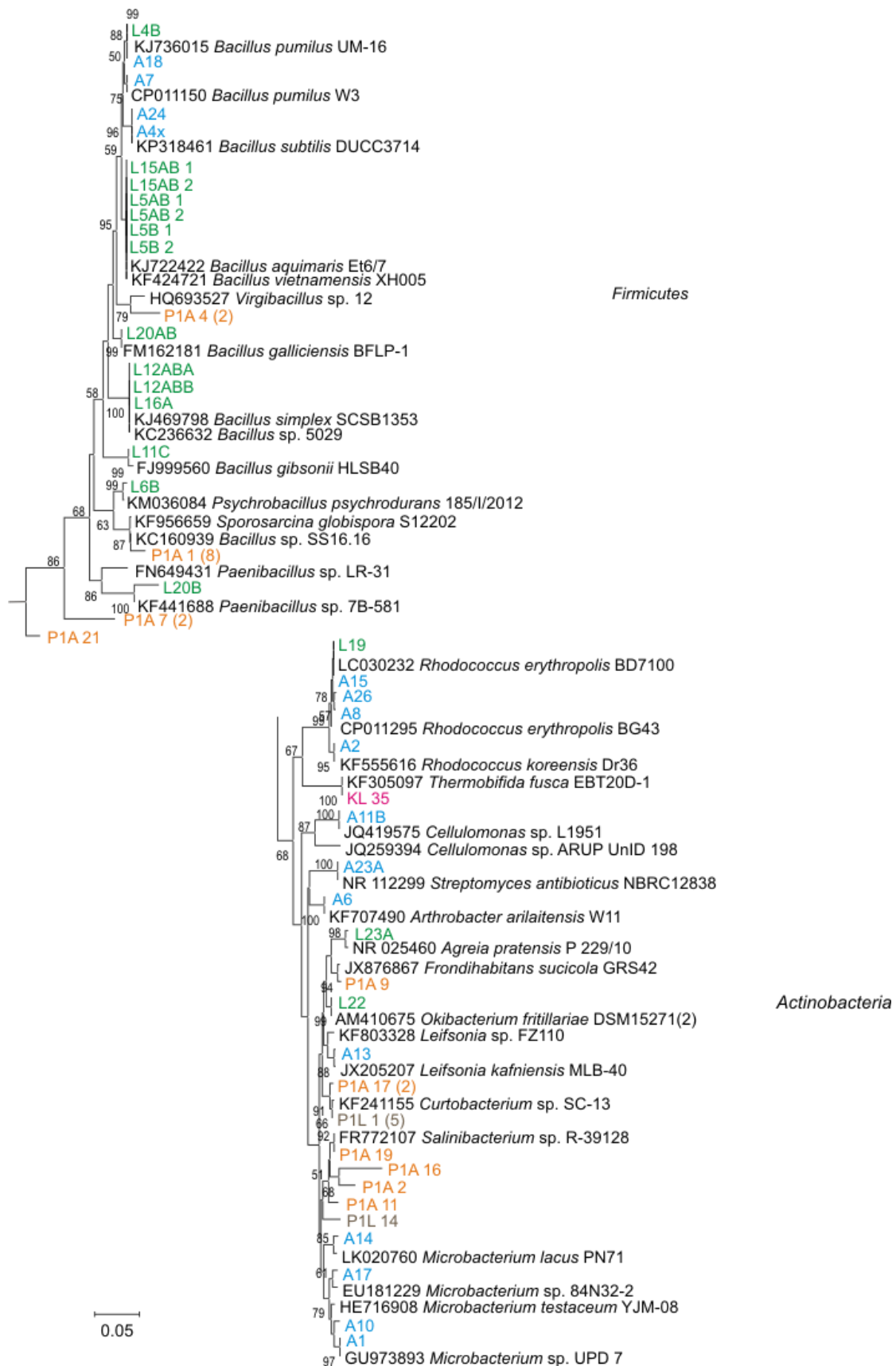
Nii Joonisel 16 kui ka Tabelis 4 esitatud andmed on saadud järjestuste rühmitamisel kasutades *Cutoff*-väärtusena 90%. *Cutoff*-väärtus näitab kui suur peab olema ühte gruppi rühmitatud erinevate järjestuste vaheline identsus ning antud töös kasutatud 90% peaks tagama usaldusväärse klassifitseerimise hõimkonna ning perekonna tasemel (Yarza *et al*, 2008). Akumulatsioonikõveratelt on näha, et lehtpuusaepuru klooniraamatukogude P1A ja P1L mitmekesisus on väiksem (akumulatsioonikõver läheneb platoole, erinevate järjestuste arv väike) kui Tallinna Loomaaia komposti (K4A) ja mikrokosmikitse kompostisegu (KL) mitmekesisus (Joonis 16). Lehtpuusaepuru lingotselluloos on raskesti lagundatav, samuti on saepuru mineraalne osa (Tabel 1) madal, mis tähendab, et mikroobide kasvuks vajalikke erinevaid toitelemente on vähe, lisatud NH_4Cl võimaldas seal esinevatel mikroorganismidel saepurul siiski kasvama hakata. Inokulumina kasutatud Tallinna Loomaaia komposti



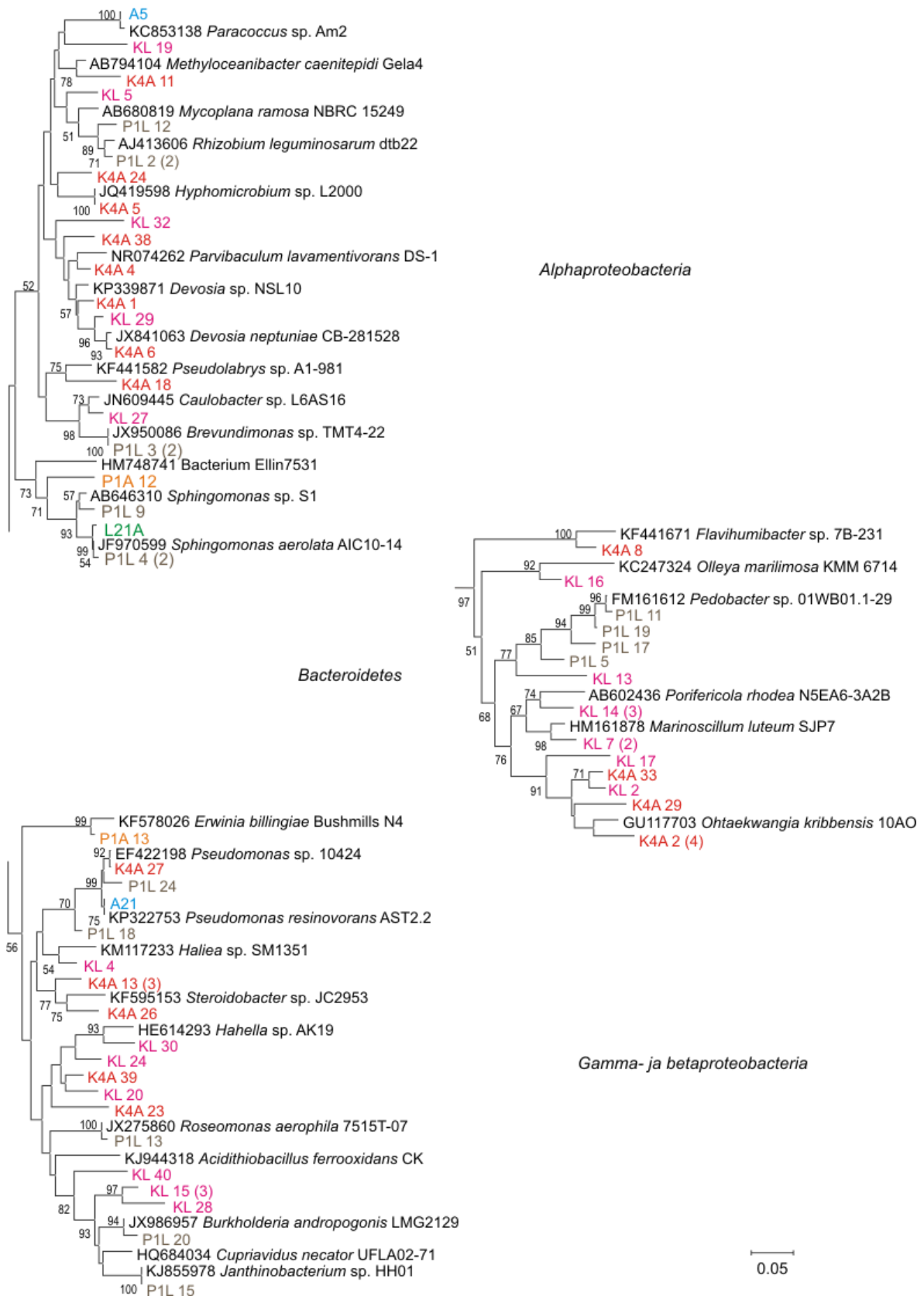
Joonis 16. 16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogude järjestuste analüüsi põhjal koostatud akumulatsioonikõverad (*Cutoff*-väärtus 90%).



Joonis 17. Tallinna Loomaia komposti (K4A), lehtpuu saepuru enne (P1A) ja pärast (P1L) kompostimist ning kompostimisegu (lehtpuu saepuru+loomaaia kompost, KL) koosluste klooniraamatukogude ja Tallinna Loomaia kompostist (tüvede nimed algavad tähega A) ning kompostimiskatse lõpus võetud proovist (tüvede nimed algavad tähega L) eraldatud tüvede 16S rRNA geeni järjestuste alusel koostatud fülogeneetiline puu. GenBank andmebaasist võetud järjestuste puhul on toodud bakteri nimi ja GenBank ID number. Fülogeneetiline puu koostati kasutades *neighbour-joining* meetodit (Saitou ja Nei, 1987). Harude kõrval on toodud korduvate puude protsentväärtus (suuremad kui 50%), mis näitab seotud taksonite klasterdumist *bootstrap* testiga (1000 kordust) (Felsenstein, 1985). Evolutsioonilised kaugused arvutati Jukes-Cantor meetodit (Jukes ja Cantor, 1969) kasutades. Gamma jaotusega modelleeriti kõikumiste erinevus saitide hulgas (kuju parameeter = 0,79). Kokku analüüsiti 190 nukleotiidset järjestust ja lõppandmestik sisaldas kokku 345 positsiooni. Evolutsioonilised analüüsid koostati programmiga MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).



Joonis 17 (järg). Hõimkondade *Firmicutes* ja *Actinobacteria* klastrid.



Joonis 17 (järg). Hõimkondade *Aphaproteobacteria*, *Bacteroidetes* ning *Gamma- ja Betaproteobacteria* klastrid.

mineraalne osa on aga suurem, seal on rohkem toitaineid ning mikroorganismide arvukus ja mitmekesisus suurem kui saepurus, sest ka komposti osakeste kogupindala, kuhu nad saavad kinnituda, on suurem kui saepuru tükidel. Tabelis 4 esitatud andmed kinnitavad tehtud oletust- antud töö klooniraamatukogudesse kuuluvate järjestuste rühmitamisel saadud erinevate järjestuste ning teoreetilisel võimalike erinevate järjestuste (S_{Chao}) arvude (*Cutoff*-väärtus mõlemal juhul 90%) väärtused on P1A ja P1L raamatukogudel sarnased. Good's kattuvuse väärtused (Good, 1953) on klooniraamatukogude K4A ja KL puhul madalad, mis näitab, et analüüsitud kloonide arv ei ole piisav koosluse täielikuks kirjeldamiseks.

2.3.2.2 Klooniraamatukogude järjestuste fülogeneetiline analüüs

Proovide K4A, KL, P1A ja P1L koosluste 16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogudest jäi peale kimäärade eemaldamist analüüsimiseks kokku 114 järjestusest. Kui 109 järjestustele leiti lähim vaste järgmistesse hõimkondadesse *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia* kuuluvate bakterite järjestuste hulgas, siis viie järjestuse (1 kloon K4A ja 4 klooni KL proovist) korral oli lähimaks vasteks hõimkonda *Thaumarchaeota* kuuluva arhe järjestused (Joonis 17; Lisa 4). Nimetatud hõimkonda kuuluvad arhesid on leitud madala toitaine sisaldusega veekogudest ja ka mullast, kus nad saavad energiat ammoniaagi oksüdeerimisest (kemolitoautotroofid) ning on näidatud, et neil on kanda oluline roll N- ja C-ringis (Kim *et al.*, 2011).

Ainult Tallinna Loomaaia komposti (K4A) klooniraamatukogu kloonide hulgas oli 8 klooni, mille järjestustega lähim vaste oli klassifitseerimata bakteri *Bacterium Kaz4* järjestus. Arvatakse, et kõigist olemasolevatest bakteritest osatakse kultiveerida erinevatel hinnangutel 1-10% (Hu *et al.*, 1999), siis koosluste analüüsimistel DNA-põhiste meetoditega leitakse sageli uusi järjestusi, millele kultiveeritavate tüvede hulgas vasted puuduvad. Kuna Tallinna loomaaia kompost on tehtud loomade väljaheidetest ja põhust, heinast, söödamaterjalist, võib sealt leida erinevate loomade mikrofloora esindajaid.

Mäletsejate vatsa mikroflooras domineerivad obligatsed anaeroobsed bakterid, seened, ainuraksed ja arhed, kes sünergiliselt lagundavad taimede rakukestas leiduvaid polüsahhariide (Flint ja Bayer, 2008). Metsiku jaki (*Bos mutus*) vatsa mikroflooras on kõige enam madala GC-sisaldusega grampositiivseid baktereid ja hõimkonna *Bacteroidetes* esindajaid, vähem on

Archaea riigi ning *Spirochaetes* ja *Fibrobacteres* hõimkonna baktereid. Osa vatsas elavatest bakteritest on lignotsellulolüütiliste omadustega (*Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*). Erinevalt jaki vatsa kooslusest on veise (*Bos taurus*) vatsa koosluses suur osakaal ka bakteritel klassist γ -*Proteobacteria*, mis tuleneb veise ja jaki söötade erinevusest. (An *et al.*, 2005)

Veiste väljaheidetest on eraldatud klostriide (madala GC-sisaldusega, hõimkond *Firmicutes*), mille osad liigid põhjustavad loomadel erinevaid haigusi (*Clostridium tetani*, *C. botulinum*) (Songer, 1998), teised osalevad samas tselluloosi lagundamises või toimivad probiootikumidena (Dowd *et al.*, 2008). Anaeroobid hõimkonnast *Bacteroidetes* perekonnast *Prevotella* suudavad lagundada vatsas olevaid süsivesikuid ja kääritada valke (Avgustin *et al.*, 1997). Sigade väljaheidetest eraldatud bakterid on peamiselt obligaatseid anaeroobid madala GC-sisaldusega grampositiivsed bakterid hõimkonnast *Firmicutes* perekondadest *Clostridium*, *Eubacteriae*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* ja *Streptococcus* või fülogeneetilistest nendega lähedastest perekondadest. Nimetatud bakterid fermenteerivad süsivesikuid ning osad ka laktaati ja aminohappeid analoogselt mäletsejate vatsas elavatele bakteritele (Hespell *et al.*, 1998).

Lehtpuusaepuru koosluste (P1A ja P1L) mitmekesisused võrreldes teiste analüüsitud kooslustega olid madalad. Proovi P1A klooniraamatukogu kloonide järjestused olid sarnased kolme hõimkonda (millest iga üks oli esindatud ühe seltsiga) kuuluvate bakterite järjestustega. 120 päeva väldanud kompostimiskatse järel koosluse mitmekesisus tõusis, kloonide järjestused olid küll sarnased kolme hõimkonda kuuluvate bakterite järjestustega, aga kokku oli esindatud 8 seltsi. Algses koosluses (P1A) domineerinud *Firmicutes* (24 kloonist 12) ja *Actinobacteria* (24 kloonist 14) hõimkondadest jäi katse lõpu proovis (P1L) suurema osakaaluga alles hõimkond *Actinobacteria* (23 kloonist 6), suurenes hõimkonna *Proteobacteria* osakaal (P1A - 24 kloonist 1; P1L - 23 kloonist 13) ning lisandusid kloonid (23 kloonist 4), mille järjestused olid identsed hõimkonna *Bacteroidetes* esindajate järjestustega (Joonis 18).

Tallinna Loomaaia komposti (K4A) ja mikrokosmkatse lõpus (KL) võetud kompostisegu proovide koosluste 16S rRNA geeni mitmekesisus oli nii hõimkonna kui ka seltside tasemel suurem kui lehtpuusaepuru kooslustel (Joonis 18). Tallinna Loomaaiast saadud kompost on

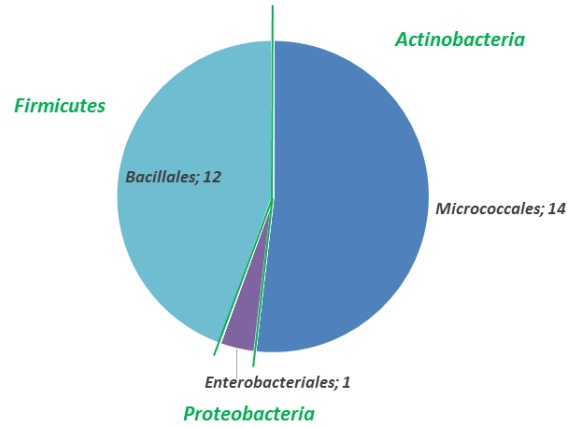
valmistatud erinevate loomade väljaheidetest, söödajääkidest ja põhust, selle mikrofloora on arvukam ja mitmekesisem kui saepurul. Antud proovis on arvatavasti bakterite poolt kergemini omastatavate ainete hulk suurem kui lehtpuu saepurul, mille orgaanilise osa moodustab peamiselt lignotselluloos. Saepuru (P1) segamisel kompostiga (K4) hakkasid bakterid aktiivselt lagundama segus olevaid aineid (Joonis 14), arvatavasti ka lignotselluloosi, kuna inokulum oli valmistatud suures osas mäletsejate väljaheidetest, kus võiks leida ka lignotselluloosi lagundavaid baktereid ja seeni. Hapniku tarbimine oli katseseadmes väga intensiivne, katse viiendaks päevaks oli keskkond muutunud anaeroobseks ning alates kümnendast päevast algas metaani tootmine. Samas ei leitud ühtegi metaani tootja 16S rRNA geeni järjestusega identset järjestust proovide K4A ega KL kooslustest koostatud klooniraamatukogudest, mis on ilmselt seotud testitud kloonide ebapiisava arvuga ning koosluste suure mitmekesisusega. Mõlema proovi klooniraamatukogust leiti järjestus, mis oli 91% ulatuses identne *Methylococcus* seltsi kuuluva metaani siduva bakteri järjestusega.

Osad bakterid hõimkonnast *Actinobacteria* on suutelised lagundama raskesti lagundatavaid lignotselluloosi komponente lihtsamateks/momomeerseteks suhkruteks ning on võimelised üle elama kompostimisel toimuvat temperatuuri tõusu (Kausar *et al.*, 2011), mistõttu on nende roll puidujäätmete kompostimisel väga oluline. Enamus *Actinobacteria* esindajaid on kas taimedelt leitavad või saprotroofsed mikroorganismid. *Micrococcales* selts (Lisa 4) oli esindatud *Microbacteriaceae* sugukonnaga, kes on enamasti aeroobsed grampositiivsed bakterid, neid esineb palju nii maismaa kui ka vee ökosüsteemides ning nad on seotud taimede, seente ja loomadega (Evtushenko ja Takeuchi, 2006). Ka *Frigoribacterium* perekonna esindajaid on eelnevalt õnnestunud eraldada taimedelt ja taimejäänustelt, näiteks heinast või põhust (Kämpfer *et al.*, 2000). Mõnel selle perekonna liigil on täheldatud ka tsellubioosi ja tärklise lagundamise võimet (Dastager *et al.*, 2008). *Curtobacterium* perekonna esindajaid on leitud peamiselt surnud taimede jäänustel, samas ei suuda need tüved lagundada tärklist. Perekonna *Leifsonia* esindajad esinevad taimedel kas patogeenide või saprofüütidena. (Evtushenko ja Takeuchi, 2006) Osad antud perekond kuuluvatest bakteritest omavad võimet lagundada taimseid komponente ja moodustada mõnel juhul spore, mis võib olla üheks põhjuseks, miks leiti nii P1A ja P1L proovidest hõimkonna esindajaid. *Streptosporangiales* seltsi kuuluv *Nocardiopsaceae* sugukonna esindajad on saprotroofsed seene hüüfilaadse kasvuga spore moodustavad mullabakterid (Kroppenstedt ja Evtushenko, 2006). Võib arvata,

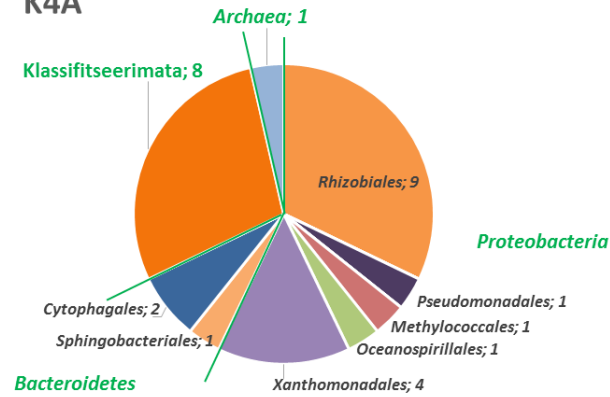
et nad on tähtsad ka komposti seisukohalt. K4A proovidest ei eraldatud klooniraamatukokku ühtegi *Actinobacteria* hõimkonna esindajat, selle tulemuse taga võib olla liiga vähene kloonide arv. Erinevalt eelnevalt loetletud aktinobakteritestei ole järgmistel sellesse hõimkonda kuuluvatel bakteritel, kelle 16S rRNA järjestustega identseid järjestusi leiti ka antud töös koostatud klooniraamatukogudest, kirjeldatud võimet lagundada tärklisi ega tsellulaasi. *Micrococcales* seltsi kuuluv perekond *Okibacterium* on alles hiljuti kirjeldatud ning nende kohta pole väga palju kirjandust ilmunud, esimene tüvi (*Okibacterium fritillariae* VKM Ac-2059T) isoleeriti seemnete pealt (Evtushenko et al., 2002). Perekonda *Frondehabitans* kuuluvaid tüvesid on õnnestunud eraldada samblikelt (Cardinale et al., 2011) ja mulla risosfäärist, kuid nad ei suuda lagundada ei tärklisi ega tselluloosi (Lee, 2010). *Acidimicrobiales* seltsi kuuluvad bakterid elavad happelistes, väävlis või sulfiidmineraalide rikastes kasvukeskkondades (Kurahasi et al., 2009).

Firmicutes hõimkonna esindajad omavad tsellulaasest aktiivsust ning võimelised elama üle anaeroobseid tingimusi, mistõttu on nad tähtsad puidujäätmete kompostimisel. *Bacillales* seltsi (Lisa 4) esindajate üks peamisi tunnuseid on endosporide moodustamine (De Vos et al., 2009). Sporulatsioon (ehk (endo)spooride moodustamine) toimub toitaine vaeses keskkonnas, tänu millele elatakse üle ebasoodsad keskkonnatingimused (Parades-Sabja et al., 2011). *Bacillus* perekonna esindajaid võib leida mullast või mullaga saastunud materjalidelt. Osad liigid (*B. hemicellulosilyticus*, *B. vedderi*, *B. agaradhaerens*) suudavad hüdrolyüsida tselluloosi, *B. subtilis* tüvedel on näidatud võimet lagundada erinevaid taime polüsahhariide ja pektiini. (De Vos et al., 2009) Analüüsitud 16S rRNA klooniraamatukogudest leiti ka järjestusi, mis olid identsed hapnikuvabas keskkonnas kasvavate bakterite järjestustega. Näiteks *Sporosarcina* perekonna mõned esindajad suudavad kasvada anaeroobsetes tingimustes, kuid enamus seni kirjeldatud tüvedest tärklisi lagundada ei suuda. *Virgibacillus* perekonna esindajad on halofiilsed bakterid, kellel osadel esineb võime elada anaeroobselt ning näiteks *V. dokdonensis*, *V. necropolis* ja *V. salexigens* suudavad kasvamiseks kasutada tsellulioosi. (De Vos et al., 2009) Samas ei leitud P1L klooniraamatukogust ühtegi hõimkonna *Firmicutes* esindajat, kuigi P1A omas olid nad domineerivaks. Neid ei leitud ka proovide K4A ega KL klooniraamatukogudest.

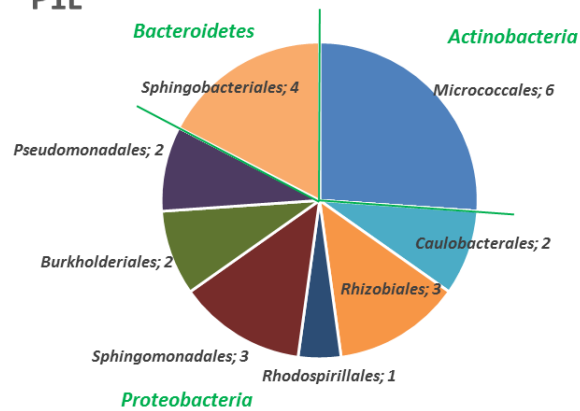
P1A



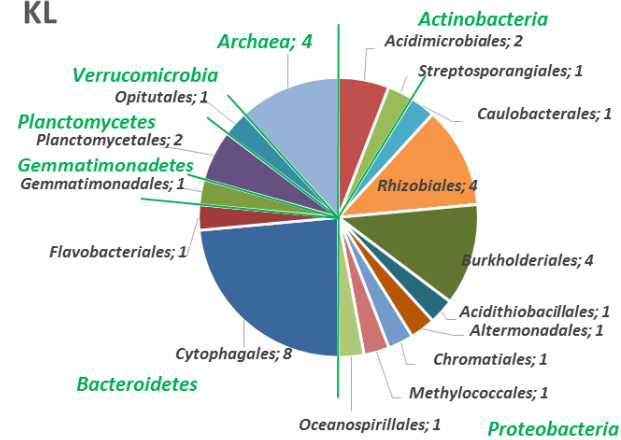
K4A



P1L



KL



Joonis 18 Sektordiagrammidel on näidatud lehtpüüsaepuru enne (P1A; üleval, vasakul) ja pärast (P1L; all, vasakul) kompostimist, Tallinna Loomaaia komposti (K4A; üleval, paremal), ning kompostimise (lehtpüüsaepuru+loomaaia kompost, KL; all, paremal) katse lõpuproovi koosluste 16S rRNA geeni klooniraamatukogude järjestuste fülogeneetiline kuuluvus (hõimkond, selts).

Bacteroidetes hõimkonda kuuluvate bakterite 16S rRNA geeni järjestustega identsete järjestuste suur osakaal peale anaeroobset kompostimiskatset võetud proovi klooniraamatukogus võib olla seotud nende bakterite võimega saada hakkama hapnikuta keskkonnas. Osadel liikidel antud hõimkonnast on täheldatud ka tsellulaasset aktiivsust. Klooniraamatukogudest leiti järjestusi, mis olid identsed kolmest erinevast seltsist pärit bakterite järjestustega. *Sphingobacteriales* seltsi (Lisa 4) kuuluv *Sphingobacteriaceae* sugukonna bakterid on obligaatsete aeroobid, sugukonda kuuluva perekonna *Pedobacter* tüved endospore ei moodusta, neid võib leiduda mullas, aga ka vees või puude vaigus. (Krieg *et al.*, 2010) Perekonna *Pedobacter* tüvedel on näidatud amülaasset ja β -glükosidaasset aktiivsust, mõni tüvi suudab kasvamiseks kasutada inuliini (Margesin *et al.*, 2003) ja tsellubioosi, mõned tüved lagundavad ka tärklisi (Steyn *et al.*, 1998). *Chitinophagaceae* sugukonna bakterid on aeroobsed või fakultatiivsed anaeroobid (Krieg *et al.*, 2010), perekond *Flaviumibacter* esindajad suudavad kasutada tärklisi, kuid mitte tsellubioosi (Zhang *et al.*, 2010). Seltsist *Flavobacteriales* sugukond *Flavobacteriaceae* esindajad suudavad kasvada anaeroobsetes tingimustes, kuid spore ei moodusta. Enamus liike suudavad lagundada valke, lipiide, aga ka lihtsamaid ja keerulisemaid süsivesikuid (tärklisi, karboksümetüülselluloosi), aga mitte kristalliseerunud tselluloosi (näitaks filterpaberit). *Cytophagales* seltsi kuuluvatel *Cytophagaceae* sugukonna aeroobsed bakterid võivad kasvada mikroaeroobsetes kuni anaeroobsetes tingimustes. (Krieg *et al.*, 2010) Sugukond *Flammeovirgaceae* esindajad on suutelised kasvama anaeroobsetes tingimustes, oksüdeerivad süsivesikuid (k.a tärklisi ja karboksümetüülselluloosi), kuid mitte kristalliseerunud tselluloosi. Perekond *Ohtaekwangia* tüved ei hüdrolüüsi tärklisi (Yoon *et al.*, 2011). Perekond *Belliella* tüved on eraldatud Balti merest, nad on aeroobsed bakterid, võimelised lagundama tärklisi, kuid mitte tselluloosi (Krieg *et al.*, 2010).

Nitrifikatsioon (protsess, kus ammoniaak muudetakse nitritioonideks) ja denitrifikatsioon (protsess, kus nitritioonid muudetakse molekularseks lämmastikuks) on tähtsad nii vee puhastusel kui ka kompostimisel. ***Proteobacteria*** hõimkonnas on baktereid, kes suudavad läbiviia mõlemaid protsesse (Aoi *et al.*, 2000), lisaks sellele leidub nende hulgas ka baktereid, kes suudavad lagundada aromaatsid ühendeid, nagu näiteks ligniini (Suenaga *et al.*, 2007). *Proteobacteria* hõimkonna klooniraamatukogusse saadud järjestused (Lisa 4) olid bakterid, kes suudavad lagundada aromaatsid ühendeid, mida peaks olema kompostimiskatse lõpus,

kuna kergesti omastatavad ained on selleks ajaks otsa lõppenud. *Pseudomonales* seltsi kuuluva perekonna *Pseudomonas* esindajad on enamasti aeroobid, kuid osad on ka fakultatiivsed anaeroobid, kes hapniku puudumisel kasutavad elektronakseptorina nitraati. *Pseudomonas* perekonna esindajad on suutelised aeroobselt lagundama aromaatsaid ühendeid, baktereid leidub palju taimede risosfääris (juurteil ja nende lähedal mullas). *Burkholderiales* seltsi kuuluvad *Burkholderiaceae* sugukonna tüvede seas on nii aeroobe kui ka fakultatiivseid anaeroobe, kes kasutavad energiaallikana paljusid erinevaid orgaanilisi ühendeid, lagundades isegi erinevaid aromaatsaid ühendeid. Üle poolte liikidest on patogeensed loomadele ja taimedele, kutsudes esile mädanemist. (Brenner *et al.*, 2005) *Janthinobacterium* perekonda kuuluvad bakterid on obligatsed aeroobid, kes võivad tekitada seente viljakehade mädanemist (Lincoln *et al.*, 1999). Seltsi *Sphingomonadales* kuuluvad *Sphingomonas* bakterid on obligatsed aeroobid, kes suudavad kasvada kemikaalidega (näiteks di-bensoe-*p*-dioksiini või teised raskesti lagundatavad ühendeid (k.a aromaatsed ühedid)) saastunud mullas või vees. Seltsi *Rhizobiales* kuuluvad bakterid on aeroobsed taimede sümbiondid, kes moodustavad taime juurtele nooduleid lämmastiku sidumiseks. *Beijerinckiaceae* sugukonna bakterid suudavad kasutada aromaatsaid ühendeid (bensoehape, katehool), kuid samas tärklis hürdolüüsida ei suuda. Sugukonnast *Brucellaceae* perekond *Mycoplana* tüved on samuti suutelised lagundama aromaatsaid ühendeid, nagu näiteks fenool. (Brenner *et al.*, 2005) Osad töös analüüsitud klooniraamatukogude järjestused olid identsed järjestustega bakteritest, kes tekitavad taimedel mädanikke või on patogeensed. Näiteks P1A proovi klooniraamatukogust leiti üks järjestus, mis oli identne seltsi *Enterobacteriales* sugukonda, *Enterobacteriaceae* kuuluva bakteri järjestusega, kellel on nii aeroobsed kui fermentatiivsed metabolismirajad. Paljud antud sugukonna esindajad on taimepatogeendid, kes tekitavad maisil, kartulil, õuntel ja teiste taimede viljadel pehmemädanikku. Patogeensus võib avalduda ka loomadel ja putukatel. *Rhodospirillales* seltsi kuuluv *Roseomonas* perekonna tüved tekitavad inimestel haigusi, teiste loomade ega ka taimede puhul patogeensusust ei ole märgatud. (Brenner *et al.*, 2005) *Proteobacteria* hõimkond oli klooniraamatukogus esindatud paljude erinevate seltsidega, samas mitte kõik neist ei oma aromaatsete ühendite lagundamisvõimet. Näiteks seltsi *Caulobacteriales* perekond *Brevundimonas* kuuluvad bakterid on obligatoorsed aeroobid, kes suudavad kasvada atsetaadil, butüraadil, fumaraadil ja suktsinaadil, mõned suudavad lagundada tärklis. *Acidithiobacillales* seltsi kuuluvad bakterid on atsidofiilsed aeroobsed autotroofsed bakterid, kes redutseerivad keskkonnas väävlit. *Alteromonadales*

seltsi kuuluvad bakterid on võimelised kasvama aeroobsetes kui ka anaeroobsetes keskkondades, peamiselt merede ökosüsteemides. *Chromatiales* seltsi kuuluv *Thiocapsa* perekonna esindajaid on leitud reoveega saastunud kohtades, sest seal on palju orgaanilist materjali. Mõned liigid suudavad kasvada pimedas mikroaerofiilsetes keskkondades, olles fototroofsed valguse käes. *Oceanospirillales* seltsi kuuluv *Hahella* perekonna bakterid on fakultatiivsed anaeroobid, kes suudavad erinevaid suhkruid tarbida (Baik *et al.*, 2005). *Xanthomonadaceae* seltsi kuuluvad bakterid on mullas esinevad obligatoorsed aeroobid (Brenner *et al.*, 2005). Proovide K4A ja KL klooniraamatukogudest leiti järjestused, mis olid identsed seltsi *Methylococcales* perekonda *Methylocaldum* kuuluvate metanotroofide järjestustega. Antud bakterid kasutavad aeroobsetes tingimustes metaani ainukese süsinikuallikana muutes selle süsinikdioksiidiks. Perekonna esindajad kasvavad temperatuuridel 20-50°C, neid esineb nii mullas kui ka kuumavee allikates. (Brenner *et al.*, 2005) Võib arvata, et Tallinna Loomaaia jäätmete kompostimisel toimus ka mingil perioodil metaani eraldumine, mida siis vastavad bakterid kihtides, kus olid kätte saadavad nii hapnik kui ka metaan, ära kasutasid. Seltsi *Methylococcales* esindajad moodustavad tsüste (puhkestaadiumis kuivust taluvad inklusioonikehakesed) kui keskkonnas on vähe metaani (Whittenbury *et al.*, 1970). See on ka ilmselt põhjuseks, miks antud seltsi kuuluvate bakterite järjestustega identsed järjestusi leiti nii kompostimiskatse lõpus võetud proovi kui ka Tallinna Loomaaia komposti klooniraamatukogudest.

Verrucomicrobia hõimkonna bakterite järjestustega identsete järjestuste leidumine proovi KL klooniraamatukogus võib olla tingitud nende sünergilistest suhetest metanogeenidega. *Opitutales* seltsi kuuluvad perekonna *Opitutus* (Lisa 4) bakterid on anaeroobsed spoore mitte moodustavad bakterid, kes käärivad mono-, di- ja polüsahhariide, mille tulemusena tekib keskkonda atsetaati, propionaati, CO₂ ja H₂. (Krieg *et al.*, 2010) Termiidi seedeelundkonnast on leitud perekonna *Opitutus* esindajaid, kes suudavad kasutada tsellubioosi ja tärklisi (Stevenson *et al.*, 2004) ***Gemmatimonadetes*** hõimkonnas *Gemmatimonadales* seltsi kuuluv perekonna *Gemmatimonas* esindajad on aeroobsed bakterid, kes kasvavad bensoehappel, suksinaadil, atsetaadil, kuid ei kasuta süsinikuallikana arabinoosi, ksüloosi, mannoosi ja veel teisi suhkruid. (Krieg *et al.*, 2010) Selle perekonna tüvede järjestuste leidmine KL klooniraamatukogu kooslusest annab alust arvata, et keskkonda oli hakanud ilmuma rohkem raskesti lagundatavaid aroomaatseid ühendeid. Kompostimisega kompostikatse lõpus võetud

proovist leiti ka hõimkond *Planctomycetes* seltsi *Planctomycetales* (Lisa 4) kuuluvaid baktereid, keda on isoleeritud nii veekogudest (merest, mageveest, põhjaveest) kui ka mullast, kompostist, väljaheidetest ning loomade (täide, termiitide, korallide, käsnade) kudedest. (Krieg *et al.*, 2010)

Antud töös analüüsitud proovide koosluste 16S rRNA klooniraamatukogudes, kuigi ebapiisavate kloonide arvuga, toimunud muutused on sarnased nendele, mis on välja toodud kirjanduses taimsete jäätmete kompostimisel. Erinevate taimeliikide või olmejäätmete kompostimisel on kooslustes esindatud hõimkondade osakaalud erinevad, kuid suurem osakaal enamasti järjestustel, mis on identsed *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ja *Firmicutes* kuuluvate bakterite järjestustega. (Maki *et al.*, 2011 Ventorino *et al.*, 2014) On näidatud, et hõimkonna *Firmicutes* perekondadest *Bacillus* ja *Exiguobacterium* pärit tüvedel ja hõimkonna *Proteobacteria* perekondadesse *Pseudomonas*, *Aeromonas* ja *Duganella* kuuluvatel tüvedel on karboksümetüülselluloosi lagundamise võime (Maki *et al.*, 2012). Puidust toituva mardika (*Holotrichia parallela*) vastse seedekulglast on õnnestunud eraldada bakterid, kellest enamus kuuluvad hõimkonda *Proteobacteria* perekonda *Pseudomonas*, väiksem osakaal oli hõimkonna *Actinobacteria* perekonna *Microbacterium*, hõimkonna *Bacteroidetes* ja hõimkonna *Firmicutes* perekonna *Bacillus* kuuluvatel tüvedel (Huang *et al.*, 2012).

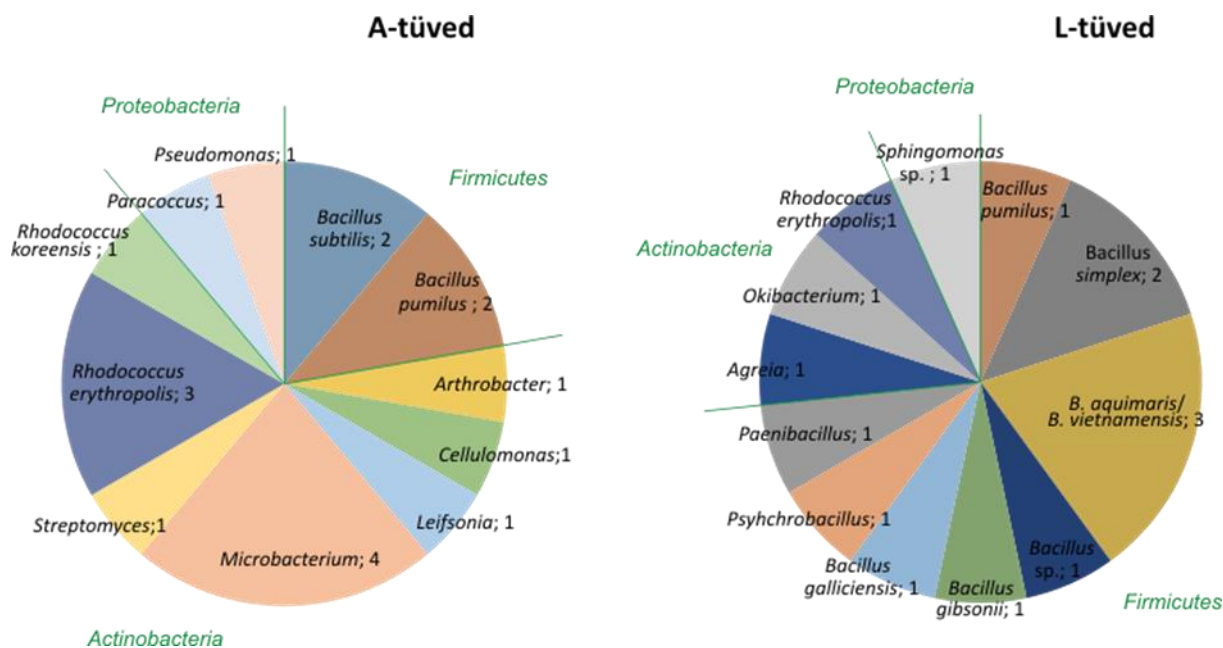
Koosluste 16S rRNA geeni klooniraamatukogude analüüsimisel selgus, et uuritud proovides on baktereid, kellel on kirjeldatud tsellulaasset aktiivsust või aromaatsete ühendite lagundamise võimet. Käesoleva töö põhieesmärgiks on isoleerida Tallinna Loomaia kompostist ja kompostisegust mikrokosmkatse lõpus võetud proovidest bakteritüvesid ja kirjeldada nende lignotselluloosi lagundamise võimet.

2.3.3 Tüvede isoleerimine

Algsetest Tallinna Loomaia komposti (K4, K4a) ja saepuru (P1) proovidest (A-tüved) ning kompostimiskatse lõpus võetud lehtpuusaepuru ja loomaia komposti segu proovidest K ja Ka (L-tüved) eraldati kokku 57 tüve, millest peale BOX-PCR-i ja 16S rRNA geenifragmendi järjestuse analüüsi jäi põhjalikumaks uurimiseks 33 tüve. Käesolevas töös eraldati vaid aeroobseid bakteritüvesid. Isolaatide 16S rRNA geenifragmendi järjestusi võrreldi

otsingumootori BLAST abil GenBank andmebaasis olevate järjestustega (Lisa 3) ning koostati fülogeneetiline puu (Joonis 17). Uuritud tüvede järjestused klasterdusid nelja klastrisse, gramnegatiivsed bakterid klasterdusid ühte klastrisse klassi *Alphaproteobacteria* ja *Gammaproteobacteria* ning grampositiivsed bakterid hõimkondadesse *Firmicutes* ja *Actinobacteria* kuuluvate bakterite järjestustega. Fülogeneetilisel puul on näha, et isoleeritud A- ja L-tüved paigutuvad erinevatesse klastritesse (Joonis 17). A-tüvede hulgas on enam hõimkonna *Actinobacteria* perekondadesse *Rhodococcus* ja *Microbacterium* kuuluvaid tüvesid, L-tüvede seas aga hõimkonna *Firmicutes* perekonna *Bacillus* esindajaid. Suur batsilluste osakaal (15 tüvest 11) L-tüvede hulgas on ilmselt seotud nende võimega moodustada endospore halbade keskkonnatingimuste üle elamiseks. Mikrokosmikatses lõpul oli katseseadmes aeroobsed tingimused asendunud anaeroobsetega ning paralleelkatsetes mõõdeti gaasifaasis metaani sisalduseks 29 ja 37%, seega saavadki L-tüvede (isoleerimine aeroobsetes tingimustes) hulgas olla vaid aeroobid ja fakultatiivsed anaeroobid, kes suutsid sellistes tingimustes ellu jääda. Samas ei leitud mikrokosmikatses lõpus võetud kompostisegu proovi (KL) 16S rRNA geenifragmendi klooniraamatukogu järjestuste hulgas perekonna *Bacillus* tüvede järjestustega identseid järjestusi, mida võib põhjendada mitmekesise koosluse kirjeldamiseks kasutatud ebapiisava arvu kloonidega (Tabel 4). Samas leidub lehtpuusaepuru katse alguse proovi (P1A) kloonide hulgas nii hõimkonna *Firmicutes* kui ka *Actinobacteria* kuuluvate tüvede järjestustega identseid järjestusi (Joonis 19). Antud töös koosluse kirjeldamiseks kasutatud DNA-põhine meetod koos kultiveerimispõhise meetodiga annavad koos parema pildi puidu kompostimisel toimunud koosluste muutustest.

16S rRNA järjestuste alusel fülogeneetilisel puul hõimkonda *Firmicutes* klasterdunud tüvesid eraldati kokku 15 (A-tüved 4, L-tüved 11). Kui A-tüvede järjestused olid kõige lähemad perekonna *Bacillus* liikide *pumilus* ja *subtilis* kuuluvate tüvede järjestustega, siis perekonda *Bacillus* liigitunud L-tüved olid identsed tüvedega liikidest *pumilus*, *simplex*, *gibsonii* ja *galliciensis*. Tüvedel L15AB, L5B ja L5AB leiti kaks 16S rRNA geenifragmendi järjestust, mis olid >98% identsed vastavalt *B. aquimaris* ja *B. vietnamensis* järjestustega. L-tüvede hulgas leidis ka kaks tüve (L6B ja L20B), mille järjestused olid vastavalt 99% ja 96% identsed hõimkonna *Firmicutes* perekondade *Psychrobacillus* ja *Paenibacillus* pärit tüvede 16S rRNA geeni järjestusega. *Paenibacillus* sp. on endospore moodustav fakultatiivne



Joonis 19. Isoleeritud A-tüvede (kokku 18; vasakul) ja L-tüvede (kokku 15; paremal) fülogeneetiline jaotumine hõimkonna ja perekonna tasemel.

anaeroob (De Vos *et al.*, 2009), tänu millele ta suutis anaeroobse kompostimise üle elada. *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 (endine *Bacillus circulans* B-6 (Wealnutkul *et al.*, 2003)) tüvel on täheldatud head tsellulolüütilist ja ksülanolüütilist aktiivsust (Pason *et al.*, 2006). Kirjandusest on näidatud, et osad *Firmicutes* hõimkonda kuuluvad bakterid omavad sporulatsiooniks vastavaid geene (Onyenwoke *et al.*, 2004), see seletab põhjust, miks suudeti kompostimiskatse lõpu proovist eraldada palju rohkem perekonda *Bacillus* kuuluvaid baktereid.

Hõimkonda *Actinobacteria* kuuluvate bakteritega ühte klastrisse kuuluvaid isolaate eraldati kokku 15, millest kolm olid L-tüved ja 12 A-tüved. Erinevalt hõimkonnast *Firmicutes* oli antud hõimkond esindatud lausa 8 erineva perekonnaga.

A-proovidest isoleeriti 11 tüve: kolm *Microbacterium* sp. isolaati A1, A10, A17 ja *M. lacus* A14, kelle kõigi identsus protsent jäi 98-100% juurde. *Microbacterium* perekonna esindajatel on täheldatud võimet lagundada tselluloosi, mõni tüvi on isegi eraldatud termiitide seedekulglast (Wenzel *et al.*, 2002), osad on kõrge filterpaberi lagundamisvõimega (Okeke ja Lu, 2010). Isolaatide A8, A15 ja A26 ning A2 16S rRNA geeni järjestused olid 99-100%

identsed *Rhodococcus erythropolis* ning *R. koreensis* järjestustega. Kirjandusest leitud mullast eraldatud *R. erythropolis* A5.1 on suuteline lagundama aromaatsset ühendit difenüüli (Taylor *et al.*, 2012), *Rhodococcus jostii* RHA1 omab ligniini peroksidaasi (Ahmad *et al.*, 2011). Tüve A6 järjestus oli 99% identne *Arthrobacter arilaitensis* järjestusega. Perekonda *Arthrobacter* kuuluvatel tüvedel on näidatud protokatehuaadi ja bensoaadi kasutamist ainsa süsiniku allikana (Irlinger *et al.*, 2005). Tüve A11B oli GenBank andmebaasi otsingu järgi kõige lähedasem (identsus protsent 100%) perekonna *Cellulomonas sp.* järjestusega. Nagu ka perekonna nimi vihjab on selle perekonna liikmetel näidatud tselluloosi lagundamise võimet, nad suudavad näiteks nisu kõrtel kasvades produtseerida karboksümetüültsellulaasi, tsellubiaasi, ksülanaasi, amülaasi, mangaani peroksidaasi ning filterpaberi lagundamise jaoks vajalikku ensüümi (Emtiazi ja Nahvi, 2000). *Leifsonia kafniensis* tüvi A13 ja *Streptomyces antibioticus* tüvi A23A 16S rRNA geeni järjestused olid 99% ja 100% identsed referentstüvede järjestustega (Lisa 3). *Streptomyces* tüved on suutlelised produtseerima unikaalseid tsellulaase, millest osad võivad olla termoalkotolerantsed (George *et al.*, 2010; Alani *et al.*, 2008), kirjandusest võib leida ka viiteid nende sünergilistest suhetest lignotsellulolüütiliste seentega (Jung *et al.*, 1993).

L-proovidest eraldati kolm tüve: *Argeia pratensis* L23A, *Okibacterium fritillariae* L22 ja *Rhodococcus erythropolis* L19. Seni kirjeldatud *Argeia pratensis* (endine *Subtercola pratensis*) tüved ei oma võimet lagundada tärklist ega tselluloosi (Behrendt *et al.*, 2002; Schuman *et al.*, 2003). Perekonda *Okibacterium* tüved on mesofiilsed mullabakterid, kellest osad omavad ka amülaasid ja β -glükosidaasid aktiivsust (Evtushenko *et al.*, 2002).

Kompostimise puhul on näidatud, et *Actinobacteria* hõimkonna osakaal suureneb kompostimise valmimise faasis (Steger *et al.*, 2007). Grampositiivsed bakterid töötavad seentega kompostimise viimastes faasides koos (Yu *et al.* 2007). On teada, et Tallinna Loomaaia kompost oli läbinud erinevad kompostimise faasid (ehk oli valmis kompost) ning selle segamine antud töös kasutatud lehtpuusaepuruga aktiveeris kompostis olnud mesofiilsed mikroorganismid, kes suudavad elutegevuseks kasutada raskesti lagundatavaid ühendeid. Lehtpuupuit sisaldab 25-35% ligniini, 45-50% tselluloosi ja 25-35% hemitselluloosi (Jorgensen *et al.*, 2007), mis tähendab, et komposti segusse tuli juurde sobivaid substraate, mida said vastavad mikroorganismid ära kasutada.

Hõimkonda *Proteobacteria* kuulus kolm tüve - L-proovist isoleeriti klassi *Alphaproteobacter* kuuluv *Sphingomonas* sp. L21A (16S rRNA geeni järjestuse identsus referentjärjestusega 98%) ja A-proovist klassi *Gammaproteobacteria* kuuluvad *Pseudomonas resinovorans* A21 ja *Paracoccus* sp. A5 (identsusprotsent referent järjestusega vastavalt 100% ja 99%) (Lisa 3). *Sphingomonas* sp. tüved on kirjandusest tuntud kui erinevate aromaatsete ühendite lagundajad (Tao *et al.*, 2007; Keck *et al.*, 1997; Wilkes *et al.*, 1996), samamoodi suudavad *Pseudomonas* (Maeda *et al.*, 2003; Yang ja Lee, 2007) ja *Paracoccus* tüved (Teng *et al.*, 2010) lagundada aromaatsid ühendeid.

2.3.4 Biokeemilised testid

Tüvedele (33), tehti järgnevaid erinevaid biokeemilisi teste (Lisa 3): suhkrute (sahharoos, fruktoos, arabinoos, ksüloos, galaktoos, mannoos, glükoos) kasutamine, ensümaatilise aktiivsuse (β -glükosidaasi, amülaasi, tsellulaasi suhtes), jälgiti kasvu erinevatel aromaatsedel ühenditel (ferrulahape, kaneelhape, vaniliinhape, klorogeenhape, kohvhape, salitsüülhape, bensoehape, fenool), katalaas ja oksüdaas reaktiivsused ning filterpaberi lagundamise test. Biokeemilised testid valiti kooskõlas tselluloosi ja hemitselluloosi lagundamisel tekkivate suhkrutega (vastavalt glükoos ja ksüloos, glükoos, mannoos, arabinoos, galaktoos). Ensümaatilised aktiivsused valiti, kuna β -glükosidaas lagundab tsellulioosi glükoosiks, amülaas lõhub tärklise ja tsellulaasid suudavad hüdrolüüsida tselluloosi. Filterpaberi lagundamise test valiti summaarse tsellulaase aktiivsuse. Aromaatsid ühendeid valiti lähtudes kirjanduses toodud ligniini lagundamisel tekkivatest vaheühenditest.

Antud töös eraldatud hõimkonda *Firmicutes* kuuluvate isolaatide seas esineb nii suhkrute kasutajaid kui ka aromaatsedel ühenditel kasvajaid. (Lisa 3). Enamus isolaatidest omab amülaasit ja tsellulaasit aktiivsust (Joonis 20). Tüved *Bacillus pumilus* A7 ja A18 ning *B. subtilis* A24 ja A4x kasutavad kõiki testimiseks väljavalitud suhkruid. *B. subtilis* tüvedel on kõik testitud ensümaatilised aktiivsused, ands kusjuures neil on isoleeritud tüvedest kõige suuremad (40-50 mm diameetrised) halod nii tärklise kui CMC tassidel. Oluline on märkida, et tsellulaase aktiivsuse määramisel kasvasid *B. subtilis* tüved CMC tassil vaid 7 päeva. *B. pumilus* tüvedel tsellulaasne ja amülaasne aktiivsus puuduvad, need tüved on õrna kuni keskmise kasvuga ligniini lagundamisel tekkivatel ühenditel.

Bacillus sp. tüvi L16A, *Bacillus aquimaris* / *B. vietnamensis* tüved L5B, L5AB ja L15AB kasutavad enamust testitud suhkrutest, omavad testitud ensümaatiliseid aktiivsuseid (v.a *Bacillus sp.* L16A, kel puudub β -glükosidaasne aktiivsus) ja on õrna kasvuga osadel ligniini lagundamisel tekkivatel ühenditel. *B. gibsonii* L11C tüvi kasutab samuti kõiki testitud suhkruid, aga amülaasne ja tsellulaasne aktiivsus puuduvad ning ta ei suuda kasvada ligniini depolümeerisatsioonil tekkivatel aromaatsel ühenditel. Isolaatidel *B. simplex* L12ABA ja L12ABB on tsellullaasne aktiivsus, halo diameetrid vastavalt 30 mm 7 päevaga ja 35 mm alles kahe nädalaga (Joonis 20), ning aromaatsel ühenditel on külvihoone jälg tugev. (Lisa 3). *Paenibacillus sp.* L20B kasutab vaid üksikuid suhkruid, annab CMC tassil ainult 5 mm halo ja õrna kasvujälje ligniini lagundamisel tekkivatel aromaatsel ühenditel. *Psychrobacillus psychrodurans* L6B suudab kasutada metabolismiks vaid sahharoosi ja galaktoosi, kõik ensümaatilised aktiivsused tüvel puuduvad. Aromaatsel ühenditel annab tüvi L6B õrna külvihoone. (Lisa 3).

Tüved hõimkonnast *Actinobacteria* on pigem suhkrute tarbijad ja omavad β -glükosidaasset, amülaasset ja tsellulaasset aktiivsust (v.a *Arthrobacter arilaitensis* A6), kuid aromaatsel ühenditel on kasvujäljed õrnad (Lisa 3). Samasse hõimkonda, kuid perekonda *Rhodococcus* kuuluvad tüved L19, A15, A26, A8 annavad tugeva kasvujälje aromaatsel ligniini lagundamisel tekkivatel ühenditel (v.a *R. koreensis* A2, kel on õrn kuni keskmine kasv), aga suhkrutest kasutavad vaid glükoosi ja fruktoosi. Neil on olemas β -glükosidaasne aktiivsus, kuid amülaasne ja tsellulaasne aktiivsus puuduvad (v.a *R. erythropolis* A26 ja *R. koreensis* A2 omavad tsellulaasset aktiivsust).

Aktinomütseedid perekonnast *Microbacterium* jagunevad suhkrute kasutamise alusel kaheks: A1 ja A17 ei kasuta ning A10 ja A14 kasutavad kõiki suhkruid. Kui *Microbacterium sp.* A1 ja A10 omavad kõiki testitud ensümaatilisi aktiivsusi, siis *Microbacterium sp.* A17 ja *M. lacus* A14 puudub tsellulaasne aktiivsus. Kõikidel isolaatidel perekonnast *Microbacterium* on kasv testitud aromaatsel ühendeid sisaldavatel minimaalsöödetel õrn ja ükski neist ei kasva klorogeenhappel.

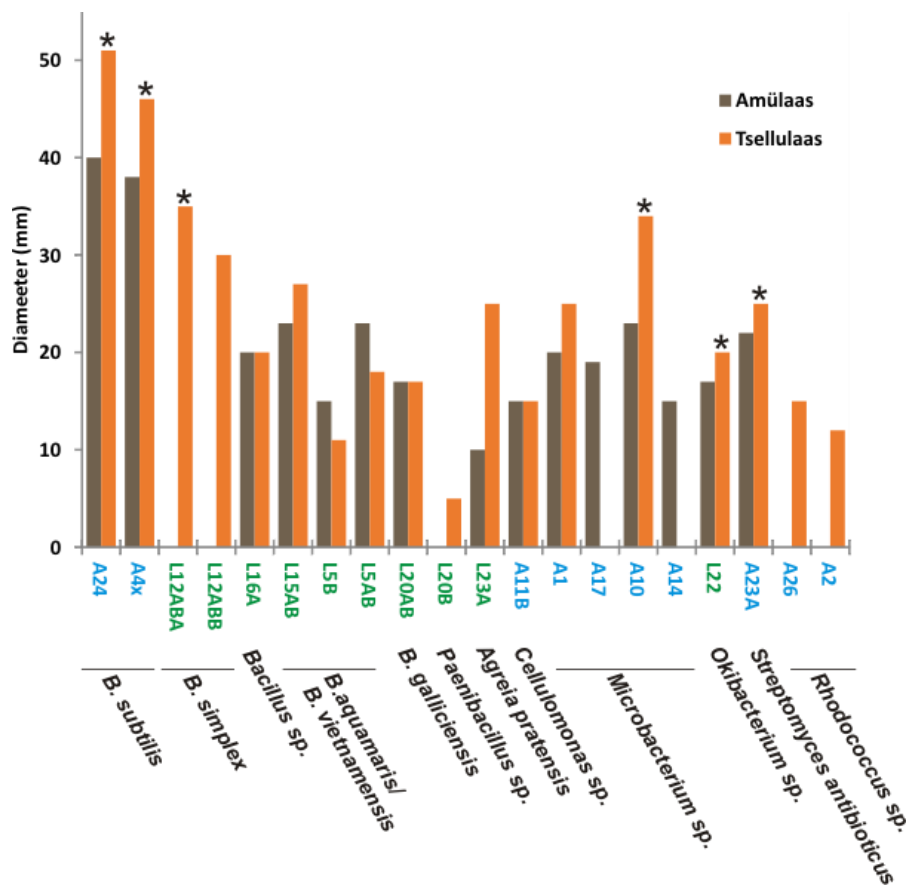
Agreia pratensis L23A, *Okibacterium fritillariae* L22, *Cellulomonas sp.* A11B ja *Leifsonia kafniensis* A13 kasutavad kõiki testimiseks valitud suhkruid, samas *Arthrobacter arilaitensis* A6 ja *Streptomyces antibioticus* A23A kasutavad vastavalt vaid kahte ja kolme suhkrut.

Nimetatud tüvedest omavad tsellulaasset aktiivsust *Agreia pratensis* L23A ja *Streptomyces antibioticus* A23A, andes mõlemad söötmetassil peale 7 päevast kasvatust 25 mm diameetriga halo, tsellulaasne aktiivsus esineb ka *O. fritillariae* L22 ja *Cellulomonas sp.* A11B tüvedel. Antud rühma tüvedest annab kõige tugevama kasvu salitsülaadil, bensoaadil ja fenooli *S. antibioticus* A23A. *Arthrobacter arilaitensis* A6 tüvel ei esine ühtegi testitud ensümaatilist aktiivsust ning kasv aromaatsel ühenditel on nõrga külvijäljega.

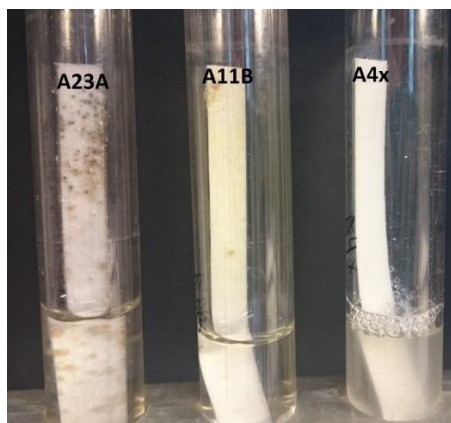
Hõimkonda *Proteobacteria* kuuluvad isolaadid (*Paracoccus sp.* A5, *Pseudomonas resinovorans* A21, *Sphingomonas sp.* L21A) kasutavad vaid mõnda testimiseks valitud suhkrut, testimiseks valitud ensümaatilised aktiivsused puuduvad (või ei toimunud kasvu vastavatel söötmetassidel). *Paracoccus sp.* A5 ja *Sphingomonas sp.* L21A annavad õrna kasvujälje aromaatsel ühenditel, kuid *P. resinovorans* A21 kasvab tugevalt vastavatel söötmetassidel.

Kõik isoleeritud tüved on oksüdaas negatiivsed ja katalaas positiivsed, erandiga *Paenibacillus sp.* L20B ja *P. resinovorans* A21, kes on mõlema suhtes positiivsed.

Filterpaberi testiga testiti 3 nädala jooksul komplekset tsellulaasset aktiivsust tüvedel, kellel esines tsellulaasne aktiivsus CMC tassil. Tüvedel *Streptomyces antibioticus* A23A ja *Cellulomonas sp.* A11B esines kasv filterpaberil (Joonis 21). *Bacillus subtilis* A4x tüvel esines kasv minimaalsöötmes. Teistel tüvedel oli kasv väga õrn või puudus. Filterpaberi lagunemist nn kokkukukkumist ei esinenud, mistõttu võib oletada, et testitud tüvedel puudus kristalse tselluloosi lagundamise võime. Kuigi osadel testitud isolaatidel esines tsellulaasne ja amülaasne aktiivsus, ei vajunud ükski kasutatud filterpaberitest kokku, nagu on seda täheldatud eelnevates töödes (Maki *et al.*, 2011; Maki *et al.*, 2012).



Joonis 20. Kompostimiskatse alguse (sinise kirjaga) ja lõpu (roheline kirjaga) proovidest eraldatud tüvede amülaasid (pruun) ja tsellulaasid (oranž) aktiivsused. Külvihoone ümber tekkinud värvivaba tsooni diameeter (mm) mõõdeti Lygoli lahusega värvitud söötmeplaadilt, mida eelnevalt oli inkubeeritud 14 päeva (tärniga tähistatud katsetes 7 päeva) 30°C juures.



Joonis 21. Summaarse tsellulaasse aktiivsuse testimine filterpaberil, pildil toodud tüved vasakult paremale: *Streptomyces antibioticus* A23A, *Cellulomonas sp.* A11B, *Bacillus subtilis* A4x.

KOKKUVÕTE

Eestis jäi 2013. aastal määratlemata kasutusega puidujäätmeid üle ligikaudu 106 000 tonni, et mitte raisata väärtusliku ressursi, tuleb leida lahendusi selle jäätme väärdamiseks. Üheks võimaluseks on kompostimine, kus olulist rolli omavad mikroorganismid. Looduses on palju loomi (näiteks mäletsejad) ja putukaid (näiteks termiidid, mardikad, sipelgad ja mesilased), kes toituvad vaid taimsest materjalist. Ilma vastavate mikroorganismideta taimne materjal nende seedekulglas ei laguneks piisavalt. Leidmaks erinevaid lignotsellulolüütilise võimega baktereid (ja teisi mikroorganisme), tuleks uurida nende loomade seedekulgla või selle läbinud väljaheidete mikrofloorat / mikrobiomi.

Käesoleva lõputöö eesmärkideks oli hinnata Tallinna Loomaia komposti, mis koosneb peamiselt taimsest materjalist toituvate mäletsejate väljaheidetest, põhust, heinast ja erinevatest söödamerjalijäätmetest, mõju saepuru kompostimisele. Seejärel eraldada kompostimiskatsetest koosluse DNA ja analüüsida koosluste mimekesisust kasutades 16S rRNA geeni klooniraamatukogusid. Isoleerida baktereid ning testida nende võimet lagundada erinevaid lignotselluloosi komponente. Saadud tulemuste põhjal tehti järgnevat järeldusi:

- Tallinna Loomaia komposti hingamisaktiivsus oli kordades suurem kui ainult lehtpuusaepuru kompostil.
- Saepurul endal on väiksem mikroorganismide koosluse mitmekesisus kui seda on Tallinna Loomaia kompostil. Viimase suurem mitmekesisus tuleneb loomade väljaheidetes olevatest bakteritest ning suuremast mineraalosa väärtusest, mis võimaldab rohkematel bakteritel kompostis kasvada.
 - Lehtpuusaepuru komposteerimise käigus muutus koosluse tasakaal; *Firmicutes* hõimkond kadus ning *Proteobacteria* hõimkond muutus domineerivaks, ilmusid ka *Bacteroidetes* hõimkonna esindajaid kompostimiskatse lõppu. *Actinobacteria* hõimkonna hulk vähenes kompostimisel.
 - Tallinna Loomaia kompostimisel lehtpuusaepuruga ei saa välja tuua erinevate hõimkondade vahetumist, kuid enne kompostimist leiti hulk klassifitseerimata baktereid, kes võivad olla seotud loomade mikroflooras esindatud bakteritega.

Nii kompostimise alguse proovist kui lõpu proovist eraldati ka *Archaea* riiki kuulunud tüvesid.

- Tallinna Loomaaia komposti kasutamisel lehtpuusaepuru neljakuulise kompostimisel saab vaid vaatluse põhjal öelda, et saepuru hulk oli vähenenud ja muutunud mulla sarnaseks. Tegelikuses toimunud keemilised muutused lignotselluloosi komponentides on teadmata, kuna seda ei testitud antud töö käigus.
- Isoleeritud tüvesid eraldati 33, millel testiti erinevate lignotselluloosi komponentide lagundamisvõimet. Tallinna Loomaaia kompostist eraldati enne kompostimiskatset 15 tüve *Actinobacteria* hõimkonnast, kompostimiskatse lõpust eraldati aga 15 *Firmicutes* hõimkonnast. Ülejäänud kolm olid *Proteobacteria* hõimkonnast.
 - 58% tüvedest on happe moodustamine suhkrute kasutamisel jälgitav; sahharoosi kasutavad 76%, fruktoosi ja glükoosi 70%, galaktoosi 64%, mannoosi 52%, arabinoosi ja ksüloosi kasutavad 39% tüvedest.
 - β -glükosidaasne aktiivsus on 73% tüvedest, amülaasne aktiivsus esineb 45% tüvedel ja tsellulaasne 55% tüvel. Kõige parem tsellulaasne aktiivsus täheldati isoleeritud *Bacillus subtilis* A4x ja A24, *Bacillus simplex* L12ABA, *Streptomyces antibioticus* A23B, *Okibacterium fritillariae* L22 ja *Microbacterium sp.* A10 tüvedel.
 - Ligniini lagundamisel tekkivatel aromaatsel vaheühenditel kasvasid 70% tüvedest; kaneelhappel on kasv jälgitav 88%, vaniliinhappel 82%, ferrulahappel 67%, kohvhappel 61%, klorogeenhappel 55%, tüvedel. Teistel aromaatsel ühenditel oli kasv jälgitav bensoehappel 97%, fenoolil 85% ja salitsüülhappel 79% tüvedel. Kõige tugevama kasvujäljega tüved olid isoleeritud *Rhodococcus erythropolis* A26, A8, A15, L19, *Pseudomonas resinovorans* A21, *Bacillus simplex* L12ABA ja L12ABB.
 - Summaarse tsellulaasse aktiivsuse kontrolliks läbi viidud filterpaberi testist ei toimunud ühegi isoleeritud tüve juuresolekul kuskil filterpaberi kokkukukkumine.

Antud bakalaureuse lõputööst järeldub, et Tallinna Loomaaia kompostist isoleeritud tüvedel esineb tsellulaasne aktiivsus ning võib arvata, et need tüved on tähtsal kohal kompostis

lignotselluloosi komponentide lagundamises. Tüvede seas esines ka ligniinist tekkivate aromaatsete ühenditel kasvajaid.

Järgnevates töödes võiks edasi kasutada isoleeritud tüvesid, testimaks näiteks üksik- kultuuride ja kooskultuuride võimet lagundada puitu. Testida ka tüvedel ligniini, kui terve aine, lagundamise võimet. Samuti võiks testida kompostimise katses toimunud komposti keemilise koostise muutust, et saada paremat pilti Tallinna Loomaaia komposti võimekusest. Edaspidi on plaanis eraldada ka anaeroobseid mikroorganisme, arvestades seentega sümbioosis elavate bakterite olulisust lignotselluloosse materjali lagundamisel.

Characterization of the microbiota of waste wood compost

Elerin Toomik

SUMMARY

In Estonia there was 106 000 tons of wood waste with unspecified usage in 2013. Not to waste valuable resource, it should be degraded or used in some other ways. Microorganisms are necessary for the degradation of the wood waste. There are animals (ruminant animals) and insects (termites, beetles, carpenter ants and bees) who feed of the plant material. Without the necessary microorganisms the material would not be degraded efficiently. To easily find these organisms, who possess lignocellulose degrading abilities, one must turn to these animals' digestive tract or excrements.

The aim of this study was

1. to value Tallinn's Zoo compost impact on the composting of the hardwood sawdust. Tallinn's Zoo compost is a final product of the composted ruminant animals' excrements, different bedding materials and hay, and feeding wastes.
2. To isolate bacteria and bacteria communities before and after the composting process from the composts.
3. Analyze those bacterial communities via clone libraries and test for the ability to use or degrade lignocellulose's components.

Based on the results obtained from this study the following conclusions can be made:

- Respiratory activity was much higher when composting the hardwood sawdust with Tallinn's Zoo compost than the hardwood sawdust alone.
- Hardwood sawdust has a lower microbial community diversity than Tallinn's Zoo compost. From which the latter has higher diversity because of the bacteria in the animals' excrements and higher mineral content than sawdust. Higher mineral content able more bacteria to grow in the compost.
 - The balance of microbial community changes during the composting of the hardwood sawdust. The predominant *Firmicutes* phylum disappeared during

composting and the *Proteobacteria* became dominant. The portion of the phylum of *Actinobacteria* decreased. Some of the *Bacteroidetes* phylum sequences were found in the end of the composting.

- It is hard to draw similar conclusions for the hardwood sawdust composting inoculated with Tallinn's Zoo compost. There were some unclassified bacteria from the Tallinn's Zoo compost, who had might been associated with ruminant animals' microflora. There were also sequences from the *Archaea* kingdom from the beginning and the end of composting period.
- After the four month composting of the hardwood sawdust with Tallinn's Zoo compost, the visible amount of the sawdust had decreased and become soil-like. These are only observations, the real chemical changes in the lignocelluloses' components are unknown because these parameters were not tested during this study.
- The ability to degrade different lignocelluloses' components was tested on 33 isolated bacteria, which 15 came from Tallinn's Zoo compost and classified in the *Actinobacteria* phylum and 15 from the end of composting Tallinn's Zoo compost with hardwood sawdust which classified in the *Firmicutes* phylum. The other 3 were from *Proteobacteria* phylum.
 - The production of acid from different sugars was observed from the 58% of the bacteria. Sucrose is used by 76%, glucose and fructose by 70%, galactose by 64%, mannose by 52%, arabinose and xylose are used by 39% of the isolates.
 - 73% of the bacteria had β -glucosidase activity, 55% and 45% of the bacteria had cellulase and amylase activity, respectively. The best cellulase activity was observed from *Bacillus subtilis* A4x and A24, *Bacillus simplex* L12ABA, *Streptomyces antibioticus* A23B, *Okibacterium fritillariae* L22 and *Microbacterium sp.* A10 isolates.
 - 70% of the bacteria were able to grow on aromatic compounds, which are degradation intermediates of lignin. 88% of the isolates can grow on cinnamic acid, 82% on vanillic acid, 67% on ferulic acid, 61% caffeic acid, and 55% on chlorogenic acid. Growth on the other aromatic compounds are 97%, 85% and 79% on benzoic acid, phenol and salicylic acid, respectively.

- Isolates displaying cellulase activity were further screened for total cellulase activity, which was tested of the ability to degrade filter paper. None of the isolates were able to visually degrade filter paper.

The results of this bachelor's thesis show that bacteria isolated from Tallinn's Zoo compost have cellulase activity and they might have an important role in degrading lignocellulose. Also, there were bacteria, who were able to grow on aromatic compounds that are intermediates of the lignin degradation process.

In the future studies the isolates should be tested on wood as mono and mixed cultures, lignin as a substrate should also be tested. The chemical changes that happened during composting should also be measured to assess the real ability of Tallinn's Zoo compost abilities. Also the isolation of anaerobic strains is planned considering the importance of symbiotic relationships between bacteria and fungi in the degradation of lignocellulose.

KASUTATUD ALLIKAD

- Adav, S. N. (2010). Quantitative iTRAQ secretome analysis of cellulolytic *Thermobifida fusca*. *Proteome Res*, 9, 3016-3024.
- Ahmad, M., Roberts, J. N., Hardiman, E. M., Singh, R., Eltis, L. D., Bugg, T. D. H. (2011). Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. *Biochemistry*, 50, 5096-5107.
- Akin, D. E. (1980). Attack on lignified grass cell walls by a facultatively anaerobic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 40, 809-820.
- Alani, F., Anderson, W. A., Moo-Young, M. (2008). New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol Lett*, 30, 123-126.
- Alexandre, G. Z. (2000). Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol*, 18, 41-42.
- An, D., Dong, X., Dong, Z. (2005). Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe*, 11, 207-215.
- Anderson, K. (2014) Puidujäätmete kompostimise uuring ja kompostimisplatsi projekteerimine. *Eesti Maaülikool, Metsanduse-ja maaehitusinstituut, veemajanduse osakond*, Tartu, Retrived 20.mai 2015
- Aoi, Y., Miyoshi, T., Okamoto, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Kitayama, A., Nagamune, T. (2000). Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by fluorescence *in situ* hybridization. *J Biosci Bioeng*, 90, 234-240.
- Avgustin, G., Wallace, R. J., Flint, H. J. (1997). Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotell bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 47, 284-288.

- Baik, K. S., Seong, C. N., Kim, E. M., Yi, H., Bae, K. S., Chun, J. (2005). *Hahella ganghwensis* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 681-684.
- Barton, L. L., Nortup, D. E. (2011). *Microbial ecology*. Hoboken, USA: John Wiley & Sons Inc.
- Béguin, P. A. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev*, 25-58. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x>
- Behrendt, U., Ulrich, A., Schumann, P., Naumann, D., Suzuki, K-I. (2002). Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1441-1454.
- Bernal, M. P., Albuquerque, J. A., Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technol*, 100, 5444-5453.
- Bernal, M. P., Paredes, C., Sánchez-Monedero, M. A., Cegarra, J. (1998). Maturity and stability parameters of composts prepared with a wide range of organic wastes. *Bioresource Technol*, 63, 91-99., 63, 91-99.
- Binner, E., Böhm, K., Lechner, P. (2012). Large scale study on measurement of respiration activity (AT4) by Sapromat and OxiTop. *Waste Managment*, 32, 1752-1759.
- Blanco, A. D., Dí'az, P., Zueco, J., Parascandola, P., Pastor, J. F. (1999). A multidomain xylanase from a *Bacillus* sp. with a region homologous to thermostabilizing domains of thermophilic enzymes. *Microbiology*, 145, 2163-2170.
- Brenner, D. J., Krieg, N, R., Staley, J. (Ed.) (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. Two "The Proteopacteria. Part B: The Gammaproteobacteria, Part C: The Aplha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria"). USA: Springer.

- Brown, M. E., Barros, T., Chang, M. C. Y. (2012). Identification and characterization of a multifunctional dye peroxidase from a lignin-reactive bacterium. *J Am Chem Soc*, 7, 2074-2081.
- Brown, M. E., Walker, M. C., Nakashige, T. G., Iavarone, A. T., Chang, M. CY (2011). Discovery and characterization of heme enzymes from unsequenced bacteria: application to microbial lignin degradation. *J Am Chem Soc*, 112, 18006-18009.
- Brown, M. E., Chang, M. C-Y. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Curr Opin Chem Biol*, 19, 1-7.
- Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat Prod Rep*, 28, 1883–1896.
- Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., Singh, R. (2011a). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr Opin Biotechnol*, 22, 394-400.
- Cai, D. T., Tien, M. (1993). Lignin-degrading peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biotechnol*, 30, 79-90.
- Cardinale, M., Grube, M., Berg, G. (2011). *Fronidhabitans cladoniophilus* sp. nov., an actinobacterium of the family *Microbacteriaceae* isolated from lichen, and emended description of the genus *Fronidhabitans*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61, 3033-3038.
- Chandna, P., Nain, L., Singh, S., Kuhad, R. C. (2013). Assessment of bacterial diversity during composting of agricultural byproducts. *BMC Microbiology* 13:99. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/99>
- Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T. (2012). Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renew Sust Energ Rev*, 16, 1462-1476.

- Chen, C-L., Chang, H-M., Kirk, T. K. (1982). Aromatic acids produced during degradation of lignin in spruce wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung*, 36, 3-9.
- Chen, C-L., Chang, H-M., Kirk, T. K. (1983). Carboxylic acids produced through oxidative cleavage of aromatic rings during degradation of lignin in spruce wood. *J Wood Chem Technol*, 35-57.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Yue, L. (2009). Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82, 211-220.
- Chynoweth, D. P. (2001). Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renew Energ*, 22, 1-8.
- Coleman, D. C., Crossley, D. A., Jr., Hendrix, P. F. (2004). *Fundamentals of soil Ecology* 2nd Edition. San Diego, USA: Elsevier Academic Press.
- Cotta, M. A., Whitehead, T. R., Zeltwanger, R. L. (2003). Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Env Microbiol*, 5, 737-745.
- de Bertoldi, M., Vallini, G., Pera, A., Zucconi, F., (1982). Comparison of three windrow compost systems. *Biocycle*, 23, 45-50.
- de Souza, W. R. (2013). Microbial degradation of lignocellulosic biomass. In D. A. Chandel, *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization* (pp. 207-247). InTech.
- De Vos, P, Garrity, M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K-H., Whitman, W. B. (Ed.) (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. Three "The Firmicutes"). New York: Springer.
- Doi, R. H., Tamaru, Y. (2001). The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. In *The Chemical Record* (pp. 24-32). John Wiley & Sons, Inc.

- Dowd, S. E., Callaway, T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R. G., Edrington, T. S. (2008). Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol*, 8, 125-133.
- Emtiazi, G., Nahvi, I. (2000). Multi-enzyme production by *Cellulomonas* sp. grown on wheat straw. *Biomass Bioenergy*, 19, 31–37.
- Euzéby, J. P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 590-592. Retrieved from <http://www.bacterio.net/>
- Evtushenko, L. I., Dorofeeva, L. V., Krausova, V. I., Gavrish, E. Y., Yashina, S. G., Takeuchi, M. (2002). *Okibacterium fritillariae* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Microbacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 987-993.
- Evtushenko, L. I., Takeuchi, M. (2006). The Family *Microbacteriaceae*. *Prokaryotes*, 3, 1020-1098.
- Felix, C. R., L. G. Ljungdahl (1993). The cellulosome: the exocellular organelle of *Clostridium*. *Ann Rev Microbiol*, 47, 791-819. doi:10.1146/annurev.mi.47.100193.004043
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Flint, H. J., Bayer, E. A. (2008). Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Ann NY Acad Sci*, 1125, 280-288.
- Fontes, C. M. G. A., Gilbert, H. J. (2010). Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Ann Rev Biochem*, 79, 655-681. doi:10.1146/annurev-biochem-091208-085603
- Fricke, K. S. (2005). Comparison of selected aerobic and anaerobic procedures for MSW treatment. *Waste Manag*, 25, 779-810.

- Fuller, W. H., Norman, A. G. (1943). Cellulose decomposition by aerobic mesophilic bacteria from soil. I. isolation and description of organisms. *J Bacteriol*, 46, 273-280.
- Gajalakshmi, S. A., Abbasi, S.A. (2008). Solid waste management by composting: state of the art. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 38, 311-400.
- George, J., Arunachalam, R., Paulkumar, K., Wesely, E. G., Shiburaj, S., Annadurai, G. (2010). Characterization and phylogenetic analysis of cellulase producing *Streptomyces noboritoensis* SPKC1. *Interdiscip Sci*, 2, 205-212.
- Gold, N. D., Martin, V. J. J. (2007). Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis. *J Bacteriol*, 6787-6795. doi:doi:10.1128/JB.00882-07
- Good, I. J. (1953). The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 40, 237–264.
- Grigatti, M., Pérez, M. D., Blok, W. J. , Ciavatta, C., Veeken, A. (2007). A standardized method for the determination of the intrinsic carbon and nitrogen mineralization capacity of natural organic matter sources. *Soil Biol and Biochem*, 39, 1493–1503.
- Heinaru, E. Vedler, E. (2011). *Praktilisi töid mikrobioloogias*. Tartu: AS Atlex.
- Hespell, R. B., Akin, D. E., Dehority, B. A. (1998). Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. In Vol 2. , (eds). New York: Chapman. In R. I. Mackie, *Gastrointestinal Microbiology, Gastrointestinal Microbes and Host Interactions* (Vol. 2nd, pp. 59-141). New York: Chapman & Hall.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *En Microbial Technol*, 30, 454-446.
- Hu, H. Y., Fujie, K., Nakagome, H., Urano, K., Katayama, A. (1999). Quantitative analyses of the change in microbial diversity in a bioreactor for wastewater treatment based on respiratory quinones. *Water Ressearch*, 3263-3270.

- Hu, Z-H., Yu, H-Q. (2005). Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. *Proc Biochem*, 40, 2371–2377.
- Huang, G. F., Wu, Q. T., Wong, J. W. C., Nagar, B. B. (2006). Transformation of organic matter during co-composting of pig manure with sawdust. *Bioresource Technol*, 97, 1834–1842.
- Huang, S., Sheng, P., Zhang, H. (2012) Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Int J Mol Sci*, 13, 2563-2577
- Irlinger, F., Bimet, F., Delettre, J., Lefèvre, M., Grimont, P. A. D. (2005). *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, 457-462.
- Jeffries, T-W. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In C. Ratledge, *Biochemistry of microbial degradation* (pp. 233-277). Dordrecht: Kluwer.
- Jin, W., Cheng, Y-F., Mao, S-Y., Zhu, W-Y. (2011). Isolation of natural cultures of anaerobic fungi and indigenously associated methanogens from herbivores and their bioconversion of lignocellulosic materials to methane. *Bioresource Technol*, 102, 7925-7931.
- Jorgensen H., Kristensen J. B., Felby C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Journal of Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 1, 119-134.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In H. N. Munro, *Mammalian Protein Metabolism* (pp. 21-132). New York: Academic Press.
- Jung, E. D., Lao, G., Irwin, D., Barr, B. K., Benjamin, A., Wilson, D. B. (1993). DNA sequences and expression in *Streptomyces lividans* of an exoglucanase gene and an endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*. *Appl Environ Microbiol*, 59, 3032-3043.

- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for using detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology*, 57, 503-507.
- Kausar, H., Sariah, M., Mohd Saud, H., Zahangir Alam, M., Razi Ismail, M. (2011). Isolation and screening of potential actinobacteria for rapid composting of rice straw. *Biodegradation*, 22, 367-375.
- Keck, A., Klein, J., Kudlich, M., Stolz, A., Knackmuss, H. J., Mattes, R. (1997). Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3684-3690.
- Kellner, H. L., Luis, P., Zimdars, B., Kiesel, B., Buscot, F. (2008). Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biol Biochem*, 40, 638-648.
- Kim, B. K., Jung, M-Y., Yu, D. S., Park, S-J., Oh, T. K., Rhee, S-K., Kim, J. K. (2011). Genome sequence of an ammonia-oxidizing soil Archaeon, “*Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis*” MY1. *Journal of Bacteriology*, 5539-5540.
- Kirk, K., Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white rot fungi. In R. A. Young, *Environmental friendly technologies for pulp and paper industry* (pp. 273-307). New York: Wiley.
- Ko, H. J., Kim, K. Y., Kim, H. T., Kim, C. N., Umeda, M. (2008). Evaluation of maturity parameters and heavy metal contents in composts made from animal manure. *Waste Management*, 28, 813-820.
- Koizumi, Y., Takii, S., Nishino, M., Nakajima, T. (2003). Vertical distributions of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 101-108.

Krieg, N. R., Staley, J. T., Brown, D. R., Hedlund, B. P., Paster, B. J., Ward, N. L., Ludwig, W., Whitman, W. (Ed.) (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. Four "The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (Mollicutes), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*). New York: Springer.

Kroppenstedt, R. M., Evtushenko, L. I. (2006). The family *Nocardiopsaceae*. *Prokaryotes*, 754-795.

Kumar, R., Singh, S., Singh, O. V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 377-391.

Kämpfer, P., Rainey, F. A., Andersson, M. A., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Ulrych, U., Busse, H.-J., Weiss, N., Mikkola, R., Salkinoja-Salonen, M. (2000). *Frigoribacterium faeni* gen.nov., sp. nov., a novel psychrophilic genus of the family *Microbacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 355-363.

Lee, S. D. (2010). *Fronidihabitans peucedani* sp. nov., an actinobacterium isolated from rhizosphere soil, and emended description of the genus *Fronidihabitans* Greene et al. 2009. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 1740-1744.

Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiology*, 41, 185-227.

Levasseur, A., Piumi, F., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Asther, M., Delattre, M., Henrissat, B., Pontarotti, P., Asther, M., Record, E. (2008). FOLy: An integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. *Fungal Genet. Biol.*, 45, 638-645.

- Liivik, M. (2014). *Biolagunevatest jäätmetest kvaliteedinõuetele vastava komposti tootmine ja turundamise võimalused Eestis*. Tallinna Tehnikakõrgkool, Arhitektuuri ja keskkonnatehnika teaduskond, Tallinn. Retrieved 18.mai 2015
- Lin, C-W., Wu, C-H., Tran, D-T., Shih, M-C., Li, W-H., Wu, C-F. (2011). Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. *Process Biochemistry*, 46, 489-493.
- Lincoln, S. P., Fermor, T. R., Tindall, B. J. (1999). *Janthinobacterium agaricidamnorum* sp. nov., a soft rot pathogen of *Agaricus bisporus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 49, 1577-1589.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., de Bruijn, F. J. (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2286-2295
- Maeda, K., Nojiri, H., Shintani, M., Yoshida, T., Habe, H., Omori, T. (2003). Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676. *Journal of Molecular Biology*, 326, 21-33.
- Maki, M. L., Idrees, A., Leung, K. T., Qin, W. (2012). Newly isolated and characterized bacteria with great application potential for decomposition of lignocellulosic biomass. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 22, 156-166.
- Margesin, R., Spröer, C., Schumann, P., Schinner, F. (2003). *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 1291-1296.
- Martin, C., Morgavi, D. P., Doreau, M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, 4, 351-365.

- Marvin-Sikkema, F. D., Richardson, A. J., Stewart, C. S., Gottschal, J. C., Prins, R. A. (1990). Influence of hydrogen-consuming bacteria on cellulose degradation by anaerobic fungi. *Appl Env Microbiol*, 56, 3793-3797.
- Masai, E., Katayama, Y., Fukuda, M. (2007). Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for ligninderived aromatic compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71, 1-15.
- McSpadden Gardener, B. B. (2004). Ecology of of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 94, 1252-1258.
- Miyazaki, K. (2005). A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*, 9, 415-425.
- Moat, A. G., Foster, J. W., Spector, M. P (2002). Microbial physiology (4th ed.). New York, USA: Wiley-Liss, Inc.
- Moora, H. (2013). *Eestis tekkinud segaolmejäätmete, eraldi kogutud paberi- ja pakendijäätmete ning elektroonikaromu koostise uuring*. Retrieved from SEIT: http://www.envir.ee/sites/default/files/sortimisuuring_2013loplik.pdf
- Niladevi, K. N., Jacob, N., Prema, P. (2008). Evidence for a halotolerantalkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization. *Process Biochem*, 40, 645-660.
- Okeke, B. C., Lu, J. (2010). Characterization of a defined cellulolytic and xylanolytic bacterial consortium for bioprocessing of cellulose and hemicelluloses. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;163:869–881, 163, 869-881.
- Onyenwoke, R. U., Brill, J. A., Farahi, K., Wiegel, J. (2004). Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (*Firmicutes*). *Arch Microbiol*, 182, 182-192.

- Parades-Sabja, D., Setlow, P., Sarker, M. R., (2011). Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiol*, 19, 85-94.
- Pare, T., Dinel, H., Schnitzer, M., Dumontet, S. (1998). Transformations of carbon and nitrogen during composting of animal manure and shredded paper. *Biol. Fert. Soils*, 26, 173-178.
- Pason, P., Kyu, K. L., Ratanakhanokchai, K (2006). *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Appl Env Microbiol*, 72, 2483-2490.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, J., Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*(5), 53-63. doi:10.1007/s10123-002-0062-3
- Ramachandra, M., Crawford, D-L., Hertel, G. (1988). Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Appl Env Microbiol*, 54, 3057-3063.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4, 406-425.
- Schumann, P., Behrendt, U., Ulrich, A., Suzuki, K-I. (2003). Reclassification of *Subtercola pratensis* Behrendt et al. 2002 as *Agreia pratensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 2041-2044.
- Schwarz, W. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *AppMicrobiol Biotechnol*, 56, 634-649.
- Senesi, N. (1989). Composted materials as organic fertilisers. *Sci. Total Environ.*, 81/82, 521-542.
- Singh, A., Sharma, S. (2002). Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. *Bioresource Technol*, 85, 107-111.

- Songer, J. G. (1998). Clostridial diseases of small ruminants. *Vet Res, BioMed Central*, 29, 219-232.
- Steger, K., Jarvis, A., Vasara, T., Romantschuk, M., Sundh, I. (2007). Effects of differing temperature management on development of *Actinobacteria* populations during composting. *Res Microbiol*, 158, 617-624.
- Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M., Breznak, J. A. (2004). New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *App Env Microbiol*, 70, 4748-4475.
- Steyn, P. L., Segers, P., Vancanneyt, M., Sandra, P., Kersters, K., Joubert, J. J. (1998). Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family *Sphingobacteriaceae* fam. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 48, 165-177.
- Stutzenberger, F. (2000). Pectinases. In J. Lederberg, *Encyclopedia of Microbiology* (2nd ed., Vol. 1, pp. 562-579). San Diego: Academic Press.
- Suenaga, H., Ohnuki, T. and Miyazaki, K. (2007). Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Env Microbiol*, 9, 2289–2297.
- Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., Zuberer, D. A. (2005). One possible pathway of lignin decomposition. In *Principles and Applications of Soil Microbiology* (p. 304). New Jersey: Prentice Hall.
- Zhang, N. N., Qu, J. H., Yuan, H. L., Sun, M. Y., Yang, J. S. (2010). *Flaviumibacter petaseus* gen. nov., sp. nov., isolated from soil of a subtropical rainforest. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 1609-1612.
- Zimmermann, W. (1990). Degradation of lignin by bacteria. *Biotechnol*, 13, 119-130.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30, 2725-2729.
- Tang, J-C., Inoue, Y., Yasuta, T., Yoshida S., Katayama, A. (2011). Chemical and microbial properties of various compost products. *Soil Sci Plant Nutr*, 49, 273-280.
- Tao, X-Q., Lu, G-N., Dang, Z., Yang, C., Yi, X-Y. (2007). A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas* sp. GY2B isolated from contaminated soils. *Process Biochem*, 43, 401-408.
- Taylor, C. R., Hardiman, E. M., Ahmad, M., Sainsbury, P. D., Norris, P. R., Bugg, T. D. H. (2012). Isolation of bacterial strains able to metabolize lignin from screening of environmental samples. *J App Microbiol*, 113, 521–530.
- Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., Christie, P. (2010). Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technol*, 101, 3437-3443.
- Teunissen, M. J., Kets, E. P. W., Op den Camp, H. J. M., Huis in't Veld, J. H. J., Vogels, G. D. (1992). Effect of co-culture of anaerobic fungi isolated from ruminants and nonruminants with methanogenic bacteria on cellulolytic and xylanolytic enzyme activities. *Arch Microbiol*, 157, 176-182.
- Tien, M., Kirk, T. K., Bull, C., Fee, J. A. (1986). Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *J Biol Chem*, 261, 1687-1693.
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y. (2001). Microbial community in anaerobic hydrogen-producing microflora enriched from sludge compost. *App Microbiol Biotechnol*, 57, 555-562.
- Ventorino, V., Aliberti, A., Faraco, V., Robertiello, A., Giacobbe, S., Ercolini, D., Amore, A., Fagnano, M., Pepe, O. (2014) Exploring the microbiota dynamics related to vegetable

biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application. *Scientific Reports*, 5, doi:10.1038/srep08161

Wakase, S., Sasaki, H., Itoh, K., Otawa, K., Kitazume, O., Nonaka, J., Satoh, M., Sasaki, T., Nakai, Y. (2008). ; Investigation of the microbial community in a microbiological additive used in a manure composting process. *Bioresource Technol*, 99, 2687-2693.

Wang, W., Yan, L., Cui, Z., Gao, Y., Wang, Y., Jing, R. (2011). Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresource Technol*, 102, 9321-9324.

Wealnukul, R., Rattanakhonchai, K., Kyu, K. L. (2003). Production of extracellular multi-cellulases and -xylanases by *Bacillus circulans* B6 during growth on Avicel. *Abstr. BioThailand 2003: Technology for Life*, abstr. 204, 204.

Wenzel, M, Schonig, I, Berchtold, M, Kampfer, P, Konig, H. (2002). Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J App Microbiol*, 92, 32-40.

Whittenbury, R., Phillips, K. C., Wilkinson, J. F. (1970). Enrichment, Isolation and some Properties of Methane-utilizing Bacteria. *J Gen Microbiol*, 61, 205-218.

Wilkes, H., Wittich, R., Timmis, K. N., Fortnagel, P., Francke, W. (1996). Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *App Env Microbiol*, 62, 367-371.

Wongwilaiwalin, S., Rattanachomsri, U., Laothanachareon, T., Eurwilaichitr, L., Igarashi, Y., Champreda, V. (2010). Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *En Microb Technol*, 283-290.

Yang, C-F., Lee, C-M. (2007). Enrichment, isolation, and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas resinovorans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. strain P-6. *International Biodeter Biodegr*, 59, 206-210.

Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K-H., Ludwig, W., Glöckner, F. O., Rosselló-Móra, R. (2008). The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Syst Appl Microbiol*, *31*, 241-250.

Yoon, J-H., Kang, S-J., Lee, S-Y., Lee, J-S., Park, S. (2011). *Ohtaekwangia koreensis* gen. nov., sp. nov. and *Ohtaekwangia kribbensis* sp. nov., isolated from marine sand, deep-branching members of the phylum *Bacteroidetes*. *Int J Syst Evol Microbiol*, *61*, 1066-1072.

Yu, H., Zeng, G., Huang, H., Xi, X., Wang, R., Huang, D., Huang G., Li, J. (2007). Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation*, *18*, 793-802.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Amylopektin. (2008, Aprill 29). Retrieved from Wikipedia:
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amylopektin_Sessel.svg

Amylose. (2007, Mai 3). Retrieved from Wikipedia:
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amylose2.svg>

Avalikud päringud. (2015). Retrieved from Keskkonna info:
<https://jats.keskkonnainfo.ee/main.php?page=statquery2public>

Composting. (2011, Mai 5). Retrieved from Development of e-courses for B.Sc (Agriculture): <http://agridr.in/tnauEAgri/eagri50/AMBE101/lec20.html>

AS Enprima Estivo (2005, juuni 6). *Biolagunevad jäätmed.* Retrieved from Keskkonna ministeerium: http://www.envir.ee/sites/default/files/biolagunevad_ii_etapp_2005.pdf

Euroopa 2020. aasta eesmärgid. (2015). Retrieved from Euroopa Komisjon:
http://ec.europa.eu/europe2020/europe-2020-in-a-nutshell/targets/index_et.htm

Inulin. (2006, Juuli 17). Retrieved from Wikipedia:
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inulin_strukturformel.png

Lignin. (2011, August 7). Retrieved from Wikipedia:
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lignin.png>

Lignocellulosic Biomass and Bioenergy. (n.d.). (BESC-CCRC) Retrieved Mai 4, 2015, from Bioenergy Science Center website:
<http://bioenergy.crc.uga.edu/Background/background.htm>

Metsanduse arengukava 2011-2020. (2010). Retrieved from Keskkonna ministeerium:
http://www.envir.ee/sites/default/files/elfinder/article_files/mak2020vastuvoetud.pdf

Olmejäätmete teke ja käitlemine käitlusmeetodi järgi. (n.d.). Retrieved Mai 19, 2015, from Eesti statistika: <http://www.stat.ee/29985>

Oras, K. (2014, Juuli 25). *Keskkond*. Retrieved from Eesti statistika:
<http://www.stat.ee/78401>

Pectins. (2007, September). Retrieved from Look for Diagnosis:
http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Pectins&lang=1

Plant cell wall diagram. (2007, Oktoober 7). Retrieved Mai 4, 2015, from Wikipedia:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plant_cell_wall_diagram.svg

Puitjäätmete vastuvõtt. (2015). Retrieved Mai 16, 2015, from Selmet:
<http://www.selmet.ee/puitjaetaetmete-vastuvott>

Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., Zuberer, D. A. (2005, Märts 15). *Principles and Applications of Soil Microbiology* (2 ed.). New Jersey: Prentice Hall. Retrieved Mai 5, 2015, from Microbewiki:
https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:CelluloseDecomp_edited.jpg

Wood. (2014, Aprill 9). Retrieved Mai 4, 2015, from Department of Chemistry, University of Maine, Orono: <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood14.html>

LISAD

LISA 1

Tabel 5. Kompostimiskatse lõpus proovide gaasifaasi gaaside sisalduse analüüs (töö teostatud Eesti Maaülikooli Bio- ja keskkonnakeemia laboris)

Proov	O ₂ , %	N ₂ , %	CH ₄ , %*
LPS	1	97	nd
LPSa	3	95	nd
K4	<1	70	29
K4a	<1	62	37

*nd- *not detected* – ei suudetud tuvastada.

LISA 2

Tabel 6. 2013. aastal tekkinud puidu töötlemisel tekkivate jäätmete hulk tonnides (Avalikud päringud, 2015).

Jäätme- liik	Jäätmete põhigrupi nimi	Jäätmete nimetus	Materjali kood	Materjali nimetus	Koguteke (sh kogutud)	Taas- kasutatud	Ladestatud prügilasse	Määratlemata käitlemine
3	PUIDU TÖÖTLEMISEL, PLAATIDE JA MÖÖBLI NING TSELLULOOSI, PABERI JA KARTONGI TOOTMISEL TEKKINUD JÄÄTMED	Saepuru, sh puidutolm, laastud, pinnud, puit, laast- ja muud puidupõhised plaadid ning vineer, mida ei ole nimetatud koodinumbriga 03 01 04	7,52	Saepuru ja laastud	427802,788	322862,7	121,5	103638,8
3	PUIDU TÖÖTLEMISEL, PLAATIDE JA MÖÖBLI NING TSELLULOOSI, PABERI JA KARTONGI TOOTMISEL TEKKINUD JÄÄTMED	Puukoore- ja puidujäätmed	7,53	Muud puidujäätmed	47926,7	44285,6	0	0
3	PUIDU TÖÖTLEMISEL, PLAATIDE JA MÖÖBLI NING TSELLULOOSI, PABERI JA KARTONGI TOOTMISEL TEKKINUD JÄÄTMED	Puukoore- ja korgijäätmed	7,53	Muud puidujäätmed	209364,292	208996,6	362,04	2279,308
				Kokku:	685093,78	576144,8	483,54	105918,108

Tabel 7 (järg) Isoleeritud tüvede (A, L) 16 rRNA geenifragmeni järjestus ja biokeemilised testid

Tüvi	16S rRNA geenifragmendi sekveneerimisel GenBank andmebaasist leitud lähim vaste	Identsus %	Oksüdaas	Katalaas	Suhkrute (1%) kasutamine happe tekkega								β-glükosidaas	Amülaas	Tsellulaas	Kasv ligniini lagundamisel tekkivatel aromaatsedel hapetel (2mM)					Kasv aromaatsedel ühenditel (2,5mM)			Hõimkond											
					Sahharoos	Fruktoos	Arabiinoo	Ksüloos	Galaktoos	Mannoo	Glükoos	Eskuliin				Diaameeter (mm)	Diaameeter (mm)	Ferrulaahape	Kaneelhape	Vanilliinhape	Klorogeenhape	Kohvhape	Salitsiülhape		Bensoehape	Fenool									
A6	KF707490 <i>Arthrobacter arilaitensis</i> W11	417/418(99%)	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	++	+	Actinobacteria												
L23A	NR_025460 <i>Agreia pratensis</i> P 229/10	416/418(99%)	-	+	+	+	-	+	+	+	+	10	25	-	+	+	-	-	-	+	-	-		Actinobacteria											
A11B	JQ419575 <i>Cellulomonas</i> sp. L1951	419/419(100%)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	15	15	-	+	+	-	-	+	+	+	Actinobacteria													
A13	JX205207 <i>Leifsonia kafiensis</i> MLB-40	416/422(99%)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+++	+				Actinobacteria										
A1	GU973893 <i>Microbacterium</i> sp. UPD 7	419/419(100%)	-	+	+	-	-	-	-	-	+	20	25*	+	+	+	-	+	+	+	+					Actinobacteria									
A17	EU181229 <i>Microbacterium</i> sp. 84N32-2	415/424(98%)	-	+	+	-	-	-	-	-	+	19	-	+	+	+	-	-	+	+	+						Actinobacteria								
A10	JN680175 <i>Microbacterium</i> sp. IGS127	413/418(99%)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	23	34*	+	+	+	-	-	+	+	-							Actinobacteria							
A14	LK020760 <i>Microbacterium lacus</i> PN71	415/418(99%)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	15	-	-	+	+	-	-	+	+	+								Actinobacteria						
L22	AM410675 <i>Okibacterium fritillariae</i> DSM15271	418/418(100%)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	17	20*	+	+	+	+	+	+	+	+									Actinobacteria					
A23A	NR_112299 <i>Streptomyces antibioticus</i> NBRC 12838	414/414(100%)	-	+	-	-	-	+	+	+	+	22	25*	+	+	-	-	+	++	+++	++										Actinobacteria				
A8	CP011295 <i>Rhodococcus erythropolis</i> BG43	413/414(99%)	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++											Actinobacteria			
A15	LC030232 <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD7100	414/414(100%)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	++	+++	+++												Actinobacteria		
L19	LC030232 <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD7101	414/414(100%)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++													Actinobacteria	
A26	LC030232 <i>Rhodococcus erythropolis</i> BD7100	413/414(99%)	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	15	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++														Actinobacteria
A2	KF555616 <i>Rhodococcus koreensis</i> Dr36	411/414(99%)	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	12	-	+	+	-	-	+	++	+														
A5	KC853138 <i>Paracoccus</i> sp. Am2	381/386(99%)	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+		Actinobacteria												
A21	KP322753 <i>Pseudomonas resinovorans</i> AST2.2	416/416(100%)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+	+++	-	-	++	++			Proteobacteria											
L21A	JQ396560 <i>Sphingomonas</i> sp. MN6-6	429/439(98%)	-	+	-	-	+	+	+	-	+	nd	nd	-	+	-	+	+	+	-	+	Proteobacteria													

* - tärniga tähistatud tüvedel halo diaameeter mõõdetud peale 7 päevast kasvatust;

nd - ei määratud (not determined);

+, ++, +++ tähistavad külvijoone erinevat tugevust ja - kasvu puudumist erinevatel aromaatsedel ühenditel; teistel juhtudel tähistab + positiivset ja - negatiivset testi tulemust.

LISA 4

Tabel 8. 16S rRNA klooniraamatukogude analüüs. Ühte rühma on grupeeritud kloonid, mille järjestuste identsus oli >98%

Rühmas kloone	Kloon või kloonide rühm	16S rRNA geenifragmendi sekveneerimisel GenBank andmebaasist leitud lähim vaste	Identsus %	Klassifikatsioon
	<i>Actinobacteria</i>			
	KL_38	KF228171_ <i>Iamia majanohamensis</i> C11-0AF49_11038	371/426(87%)	<i>Actinobacteria; Acidimicrobiia; Acidimicrobiales; Acidimicrobineae; Iamiaceae</i>
	KL_8	KF228171_ <i>Iamia majanohamensis</i> C11-0AF49_11038	374/424(88%)	<i>Actinobacteria; Acidimicrobiia; Acidimicrobiales; Acidimicrobineae; Iamiaceae</i>
	PIL_14	KF803328_ <i>Leifsonia</i> sp. FZ110	400/421(95%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
3	PIA_17, PIA_20, PIA_24	KF241155_ <i>Curtobacterium</i> sp. SC-13	416/419(99%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
5	PIL_1, PIL_16, PIL_21, PIL_22, PIL_7	KF241155_ <i>Curtobacterium</i> sp. SC-13	418/419(99%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
	PIA_11	AB272779_ <i>Frigoribacterium</i> sp. j22	409/421(97%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
	PIA_9	JX876867_ <i>Fron dih abitans sucicola</i> GRS42	408/419(97%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
	PIA_21	AM410675_ <i>Okibacterium fritillariae</i> DSM15271	385/428(90%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
	PIA_23	FM161352_ <i>Rhodoglobu s</i> sp. 01WB01.1-49	390/420(93%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
	PIA_16	FR772107_ <i>Salinibacterium</i> sp. R-39128	394/420(94%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
	PIA_19	FR772107_ <i>Salinibacterium</i> sp. R-39128	415/421(99%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
	PIA_2	FR772107_ <i>Salinibacterium</i> sp. R-39128	389/410(95%)	<i>Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae</i>
	KL_35	KF305097_ <i>Thermobifida fusca</i> EBT20D-1	419/419(100%)	<i>Actinobacteria; Streptosporangiales; Nocardio psaceae</i>
	<i>Firmicutes</i>			
8	PIA_1, PIA_10, PIA_14, PIA_22, PIA_25, PIA_3, PIA_5, PIA_6	KC160939_ <i>Bacillus</i> sp. SS16.16	417/433(96%)	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>
2	PIA_4, PIA_8	HQ693527_ <i>Virgibacillus</i> sp. 12	411/447(92%)	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae</i>
2	PIA_7, PIA_18	KF956659_ <i>Sporosarcina globispora</i> S12202	391/418(94%)	<i>Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Planococcaceae</i>
	<i>Gemmatimonadetes</i>			
	KL_22	KF481682_ <i>Gemmatimonas</i> sp. AP64	370/408(91%)	<i>Gemmatimonadetes; Gemmatimonadales; Gemmatimonadaceae</i>
	KL_37	KF228166_ <i>Gemmatimonas aurantiaca</i> H9-0AF4E_11038	371/412(90%)	<i>Gemmatimonadetes; Gemmatimonadales; Gemmatimonadaceae</i>
	<i>Planctomycetes</i>			
	K4A_10	AY162124_ <i>Planctomycete</i> GMD14H07	330/389(85%)	<i>Planctomycetes; Planctomycetia; Planctomycetales; Planctomycetaceae</i>
	K4A_20	AY162124_ <i>Planctomycete</i> GMD14H07	309/388(80%)	<i>Planctomycetes; Planctomycetia; Planctomycetales; Planctomycetaceae</i>
	<i>Verrucomicrobia</i>			
	KL_10	JF922312_ <i>Opiritutus</i> sp. WS3(2011)	390/440(89%)	<i>Verrucomicrobia; Opiritutae; Opiritutales; Opiritutaceae</i>

Tabel 8 (järg). 16S rRNA klooniraamatukogude analüüs. Ühte rühma on grupeeritud kloonid, mille järjestuste identsus oli >98%

Rühmas kloon	Kloon või kloonide rühm	16S rRNA geenifragmendi sekveneerimisel GenBank andmebaasist leitud lähim vaste	Identsus %	Klassifikatsioon
	<i>Alphaproteobacteria</i>			
	K4A_1	KP339871_ <i>Devosia</i> sp. NSL10	371/399(93%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae</i>
	K4A_6	FR691414_ <i>Devosia</i> sp. R-43424	385/388(99%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae</i>
	K4A_4	KP339871_ <i>Devosia</i> sp. NSL10	370/394(94%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae</i>
	KL_29	JX841063_ <i>Devosia neptuniae</i> CB-281528	380/390(97%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae</i>
2	P1L_3 , P1L_6	JX950086_ <i>Brevundimonas</i> sp. TMT4-22	390/390(100%)	<i>Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>
	KL_27	JN609445_ <i>Caulobacter</i> sp. L6AS16	368/379(97%)	<i>Alphaproteobacteria; Caulobacterales; Caulobacteraceae</i>
	KL_32	NR074262_ <i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1	357/389(92%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhodobiaceae</i>
	K4A_18	KF441582_ <i>Pseudolabrys</i> sp. A1-981	346/381(91%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Xanthobacteraceae</i>
	K4A_16	FM252035_ <i>Methylovirgula ligni</i> BW872	343/379(91%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Beijerinckiaceae</i>
	K4A_38	FM252035_ <i>Methylovirgula ligni</i> BW872	356/380(94%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Beijerinckiaceae</i>
	KL_5	AB680819_ <i>Mycoplana ramosa</i> NBRC 15249	358/376(95%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae</i>
	K4A_24	KJ541680_ <i>Hyphomicrobium denitrificans</i> FJNU-6	355/389(91%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae</i>
	K4A_5	JQ419598_ <i>Hyphomicrobium</i> sp. L2000	390/390(100%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae</i>
	K4A_11	AB794104_ <i>Methyloceanibacter caenitepidi</i> Gela4	371/397(93%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methyloceanibacter</i>
	KL_19	AB794104_ <i>Methyloceanibacter caenitepidi</i> Gela4	350/403(87%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methyloceanibacter</i>
	P1L_12	AJ413606_ <i>Rhizobium leguminosarum</i> dtb22	367/376(98%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Rhizobium/Agrobacterium group</i>
2	P1L_2 , P1L_8	FM161356_ <i>Rhizobium</i> sp. 01WB01.4-5	387/388(99%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; Rhizobium/Agrobacterium group</i>
	P1L_13	JX275860_ <i>Roseomonas aerophila</i> 7515T-07	388/390(99%)	<i>Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae</i>
	P1A_12	JQ659520_ <i>Sphingomonas koreensis</i> R1-50	353/375(94%)	<i>Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae</i>
2	P1L_4 , P1L_23	JN990378_ <i>Sphingomonas faeni</i> ISY_1396	388/390(99%)	<i>Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae</i>
	P1L_9	AB646310_ <i>Sphingomonas</i> sp. S1	380/390(97%)	<i>Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae</i>
	<i>Betaproteobacteria</i>			
	P1L_15	KJ855978_ <i>Janthinobacterium</i> sp. HH01	412/416(99%)	<i>Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae</i>
	P1L_20	JX986957_ <i>Burkholderia andropogonis</i> LMG2129	406/418(97%)	<i>Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae</i>
3	KL_15 , KL_23, KL_26	HQ684034_ <i>Cupriavidus necator</i> UFLA02-71	378/404(94%)	<i>Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae</i>
	KL_28	HQ684034_ <i>Cupriavidus necator</i> UFLA02-71	362/398(91%)	<i>Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae</i>

Tabel 8 (järg). 16S rRNA klooniraamatukogude analüüs. Ühte rühma on grupeeritud kloonid, mille järjestuste identsus oli >98%

Rühmas kloone	Kloon või kloonide rühm	16S rRNA geenifragmendi sekveneerimisel GenBank andmebaasist leitud lähim vaste	Identsus %	Klassifikatsioon
	<i>Gammaproteobacteria</i>			
	KL_20	KJ944318_ <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> CK	365/417(88%)	<i>Gammaproteobacteria; Acidithiobacillales; Acidithiobacillaceae</i>
	KL_4	KM117233_ <i>Halieta</i> sp. SM1351	378/403(94%)	<i>Gammaproteobacteria; Alteromonadales; Alteromonadaceae</i>
	KL_40	NR041729_ <i>Thiocapsa roseopersicina</i> 1711	363/404(90%)	<i>Gammaproteobacteria; Chromatiales; Chromatiaceae</i>
	PIA_13	KF578026_ <i>Erwinia billingiae</i> Bushmills N4	394/401(98%)	<i>Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae</i>
	K4A_39	AJ868426_ <i>Methylocaldum</i> sp. E10a	374/409(91%)	<i>Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae</i>
	KL_24	AJ868426_ <i>Methylocaldum</i> sp. E10a	380/418(91%)	<i>Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae</i>
	K4A_23	HE614293_ <i>Hahella</i> sp. AK19	374/411(91%)	<i>Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Hahellaceae</i>
	KL_30	KF228172_ <i>Hahella chejuensis</i> E10-0AF48_11038	372/404(92%)	<i>Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Hahellaceae</i>
	K4A_27	EF422198_ <i>Pseudomonas</i> sp. 10424	414/416(99%)	<i>Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae</i>
	PIL_18	AB688758_ <i>Pseudomonas</i> sp. RH-20	395/406(97%)	<i>Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae</i>
	PIL_24	KP314233_ <i>Pseudomonas putida</i> BB1	415/416(99%)	<i>Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae</i>
3	K4A_13 , K4A_35, KL_34	AB681264_ <i>Dyella koreensis</i> NBRC100831	374/414(90%)	<i>Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae</i>
	K4A_26	KF595153_ <i>Steroidobacter</i> sp. JC2953	389/417(93%)	<i>Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Sinobacteraceae</i>
	<i>Bacteroidetes</i>			
	KL_13	NR102864_ <i>Belliella baltica</i> DSM15883	349/421(83%)	<i>Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Cyclobacteriaceae</i>
4	K4A_2 , KL_3, K4A_30, KL_36	GU117703_ <i>Ohtaekwangia kribbensis</i> 10AO	381/421(90%)	<i>Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Cytophagaceae</i>
	K4A_29	GU117703_ <i>Ohtaekwangia kribbensis</i> 10AO	368/424(87%)	<i>Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Cytophagaceae</i>
	K4A_33	GU117703_ <i>Ohtaekwangia kribbensis</i> 10AO	377/422(89%)	<i>Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Cytophagaceae</i>
	KL_17	GU117703_ <i>Ohtaekwangia kribbensis</i> 10AO	350/403(87%)	<i>Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Cytophagaceae</i>
	KL_2	GU117703_ <i>Ohtaekwangia kribbensis</i> 10AO	354/403(88%)	<i>Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Cytophagaceae</i>
2	KL_7 , KL_9	HM161878_ <i>Marinoscillum luteum</i> SJP7	390/409(95%)	<i>Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Cytophagaceae</i>
3	KL_14 , KL_33, KL_41	AB602436_ <i>Porifericola rhodea</i> N5EA6-3A2B	376/423(89%)	<i>Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Flammeovirgaceae</i>
	KL_16	KC247324_ <i>Olleya marilimosa</i> KMM 6714	362/401(90%)	<i>Bacteroidetes; Flavobacteriia; Flavobacteriales</i>
	PIL_11	FM161612_ <i>Pedobacter</i> sp. O1WB01.1-29	416/419(99%)	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae</i>
	PIL_17	AM988947_ <i>Pedobacter</i> sp. AKB-2008-JO45	408/418(98%)	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae</i>
	PIL_19	HE603499_ <i>Pedobacter</i> sp. R-41842	412/423(97%)	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae</i>
	PIL_5	FM161612_ <i>Pedobacter</i> sp. O1WB01.1-29	392/410(96%)	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae</i>
	K4A_8	KF441671_ <i>Flaviumibacter</i> sp. 7B-231	391/431(91%)	<i>Bacteroidetes; Sphingobacteriia; Sphingobacteriales; Chitinophagaceae</i>

Tabel .(järg) 16S rRNA klooniraamatukogude analüüs. Ühte rühma on grupeeritud kloonid, mille järjestuste identsus oli >98%

Rühmas kloonid	Kloon või kloonide rühm	16S rRNA geenifragmendi sekveneerimisel GenBank andmebaasist leitud lähim vaste	Identsus %	Klassifikatsioon
	<i>Archaea</i>			
	K4A_19	KC357882_Candidatus Nitrosoarchaeum limnia bBG20-55	340/387(88%)	<i>Archaea; Thaumarchaeota; Nitrosopumilales; Nitrosopumilaceae</i>
	KL_1	KC357882_Candidatus Nitrosoarchaeum limnia bBG20-55	358/407(88%)	<i>Archaea; Thaumarchaeota; Nitrosopumilales; Nitrosopumilaceae</i>
2	KL_18 , K4A_32	KC357882_Candidatus Nitrosoarchaeum limnia bBG20-55	377/416(91%)	<i>Archaea; Thaumarchaeota; Nitrosopumilales; Nitrosopumilaceae</i>
	KL_6	KC357882_Candidatus Nitrosoarchaeum limnia bBG20-55	343/410(84%)	<i>Archaea; Thaumarchaeota; Nitrosopumilales; Nitrosopumilaceae</i>
	Klassifitseerimata			
2	K4A_12 , K4A_14	AB491168_Bacterium Kaz4	366/429(85%)	unclassified
	K4A_22	HM748741_Bacterium Ellin7531	353/401(88%)	unclassified
	K4A_25	AB491168_Bacterium Kaz4	354/411(86%)	unclassified
	K4A_28	AB491168_Bacterium Kaz4	350/413(85%)	unclassified
	K4A_31	AB491168_Bacterium Kaz4	365/425(86%)	unclassified
	K4A_7	AB491168_Bacterium Kaz4	375/425(88%)	unclassified
	K4A_9	AB491168_Bacterium Kaz4	356/429(83%)	unclassified

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Elerin Toomik (sünnikuupäev: 17.03.1993),

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

Puidujäätmete komposti mikrobioomi kirjeldamine,

mille juhendajad on Anne Menert ja Signe Viggor,

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

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

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

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

Tartus, 25.05.2015 (*kuupäev*)