

(11) **EE 201600003 A**

(51) Int.Cl.
C22B 3/18 (2017.01)
E21B 43/22 (2017.01)
C12P 5/02 (2017.01)

(12) **PATENDITAOTLUS**

<p>(21) Patenditaotluse number: P201600003</p> <p>(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev: 16.02.2016</p> <p>(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev: 15.09.2017</p>	<p>(71) Patenditaotleja:</p> <p>BiotaTec OÜ Mäealuse 4, 12618 Tallinn, EE</p> <p>(72) Leiutise autorid:</p> <p>Anne Menert Vaksali 3-24, 50410 Tartu, EE</p> <p>Sirli Sipp Kulli Hämariku tee 15, Tabasalu, 76901 Harju maakond, EE</p> <p>Maia Kivisaar Mõisavahe 42-47, 50708 Tartu, EE</p> <p>Ain Heinaru Riia 5-8, 51010 Tartu, EE</p> <p>Tiit Maidre Linnamäe tee 5-18, 13912 Tallinn, EE</p>
--	---

(54) **Meetod graptoliitargilliidi metallorgaanilise aine lõhustamiseks mikroobikoosluse abil**

(57) Leiutises kirjeldatakse meetodit, mis seisneb stabiilse adapteeritud mikroobikoosluse toimel graptoliitargilliidi metallorgaanilise aine lõhustamises anaeroobses keskkonnas, millega kaasneb metallide bioleostumine ja metaani eraldumine. Esitatakse leiutist kinnitavad katsetulemused ja näidatakse betaiini toimet kasvukeskkonnas argilliidi metallorgaaniliste ühendite lagundamisel. Iseloomustatakse neid protsesse läbi viivat mikroobikooslust.

(57) The present invention describes a method which consists in decomposition of graptolite argillite organometallic matter in anaerobic environment by a stable adapted microbial consortium, accompanied by bioleaching of metals and methane generation. Supporting experimental data is presented and the effect of betaine in biodegradation of argillite organometallic compounds is demonstrated. Microbial communities provoking these processes are characterized.

Meetod graptoliitargilliidi metallorgaanilise aine lõhustamiseks mikroobikoosluse abil**Tehnikavaldkond**

Käesolev leiutis kuulub biotehnoloogia, bioremediatsiooni ja hüdrobiometallurgia valdkonda. Leiutises kirjeldatakse meetodit mikroobikoosluse abil metallorgaanilist ainet sisaldava argilliitmaagi lagundamiseks, millega kaasneb metallide bioleostumine ja metaani eraldumine, ning nendeks protsessideks sobivaid keskkonnatingimusi ja toitelahuseid. Argilliidist eraldatud mikroobikoosluse biodegradatsioonivõimet saab kasutada argilliidi keskkonnakahjuliku toime kõrvaldamiseks ja selle käigus tekkivate kasulike produktide tootmiseks.

10 Tehnika tase

Suhteliselt sügaval paiknevad ja vähese küpsusega kildad on teatavasti biogeense metaani tekke allikad. Metaan tekib kilda orgaanilisest osast – kerogeenist. Niisugustesse kivimitesse rajatud puuraukude probleemiks on aga madal tootlikkus, mida on võimalik bioloogiliste meetoditega tõsta [*Patent WO 2006/118569 A1*; *U.S. Pat. No. 8,302,683*; *Patent application WO2008/041990*; *Patent application CA2801558 A1*]. Eesti must kilt (graptoliitargilliit eargilliit) koosneb põhiliselt orgaanilisest ainest (kerogeenist) koos päevakivi, kvartsi, savimineraalide, väikese koguse Fe-sulfiidide ja kipsiga [Maremäe, 1988]. Kerogeeni on aga väga raske uurida, sest ta praktiliselt ei lahustu enamikes orgaanilistes lahustites [Aaloe jt., 2006].

20 Fosforiit on Eesti loodusvara, mille varud on suurimad Euroopas [Reinsalu, 2012]. Tema ohutu kaevandamine on aga seotud lasundiga kohakuti asuvate põlevkivi- ja argilliidikihtide kasutusvõimaluste ja -tehnoloogiatega. Eelkõige on probleem graptoliitargilliidis. Graptoliitargilliit on eritüübiline põlevkivi, olemuselt kõvastunud ja orgaaniline ainega segunenud savikivim, mille varuks Eestis loetakse 60 miljardit tonni [Bauert, Kattai, 1997].

25 Seda pole aga võimalik kasutada kütuseliigina, sest temas leiduva orgaanilise aine sisaldus on madal (12-17%; kütteväärtus 1500-1600 kcal/kg e. 5-7 MJ/kg). Graptoliitargilliit sisaldab 2-6% ulatuses hajusalt või pesadena raudsulfiidset mineraali – püriiti (FeS_2). Tema keskkonnaohtlikkus seisneb püriidi, orgaanilise aine, vee, hapniku ja bakterite koostoimes. Nimelt reageerib püriit hapnikuga, mille tulemusel eraldub soojus. Raua- ja väävlibakterid

30 aktiveeruvad, olles aktiivsed 50-60 °C-ni, millele järgneb aktiivne orgaanilise aine oksüdeerumine (argilliidi isesüttimine) ja temperatuuri tõus 1000-1500 °C-ni. Üheks

reaktsioonisaaduseks on väävelhape ja mürgiste gaaside eraldumine [Puura jt., 1999]. Seega tuleb argilliidi töötlemisel piirata hapniku juurdepääsu.

Eesti argilliit sisaldab märkimisväärses koguses raskmetalle [Lippmaa jt., 2009], olles rikastatud uraani (minimaalne rikastusväärtus, *minimum enrichment value*, *m.e.v.* 30 ppm),
5 molübdeeni (*m.e.v.* 200 ppm), vanaadiumi (*m.e.v.* 1000 ppm), plii (*m.e.v.* 100 ppm) ja koobaltiga (*m.e.v.* 30 ppm), aga ka tsingi, reenumi, nikli jt. elementidega [Petersell, 2008; Voolma jt., 2013]. Metallid esinevad argilliidis kas sulfiidsete mineraalidena või metallorgaaniliste ühendite (geopolümeeride) koosseisus. Traditsiooniliselt eraldatakse metalle argilliidist hapetega, oksüdeerimise või hüdrogeenimisega [Lippmaa jt., 2011]. Sel
10 juhul on aga suureks probleemiks maakides sisalduvad orgaanilised ühendid, mis seovad metalle. Aastatel 1949-1952 toodeti Sillamäel 250 000 tonnist argilliidist üle 69 tonni uraaniühendeid [Aaloe jt., 2006]. Metallorgaaniliste komplekside mikrobioloogiline lagundamine ja metallide bioleostamine võimaldaks vääridada argilliiti kui fosforiidikaevandamisel kaasnevat keskkonnaohtlikku kõrvalprodukti. Vastavad uurimused
15 aga senini kirjanduses puuduvad.

Geopolümeeride mikrobioloogilist lagundamist koos metaangaasi moodustamisega stimuleeritakse mitmete metanogeensete substraatidega [Meslé jt., 2013; Urios jt., 2012, 2013; Jones jt., 2008; Harris jt., 2008, *U.S. Patent No. 9004162 B2*, *U.S. Patent No. 7696132*], sealhulgas metanooli ja trimetüülamiini abil [Wuchter jt., 2013; *Patent application*
20 *WO2009/140313*; *Patent application US 20130116126 A1*], kuid puuduvad viited betaiini kasutamise kohta selleks otstarbeks. Samas on hiljuti kirjeldatud betaiini (trimetüülglütsiini) tarbivaid metanogeene [Watkins jt., 2014; Ticak jt., 2015]. Betaiini roll võib seisneda metanogeneesi stimuleerimises metülotroofsete metanogeenide täiendava substraadiga varustamise kaudu [Asakawa jt., 1998; Ticak jt., 2015].

25 **Leiutise olemus**

Leiutises kirjeldatakse meetodit, mis seisneb stabiilse adapteeritud mikroobikoosluse toimetel graptoliitargilliidi metallorgaanilise aine lõhustumises anaeroobsetes tingimustes, millega kaasneb metallide bioleostumine ja metaani eraldumine.

Kõigepealt valitakse välja tõhusaim argilliidi orgaanilise aine (kerogeeni) lagundamist
30 soodustav kasvukeskkond. Metanogeensete mikroorganismide kasvatamisel segakultuuris on eriti oluline toitainelahuse piisav puhverduisvõime, sest fermentatiivsete mikroorganismide

metabolismiproduktide tõttu hapustub kasvukeskkond kiiresti, metanogeenidele on aga soodne vaid aluseline kasvukeskkond (vahemikus pH 7–9). Oluline on mikroelementide ja vitamiinide lisand, samuti soodustab metanogeenide kasvu metabolismi vaheproduktide ja metanogeenide substraatide lisamine. Seetõttu on metallorgaanilisi komplekse lagundava mikroobikoosluse eraldamiseks argilliidist sobiv kasutada vedelsöödet R2A (pärmiekstrakt 0,5 g/L; Difco pepton 0,5 g/L, CAS-aminohapped 0,5 g/L, glükoos 0,5 g/L, lahustuv tärklis 0,5 g/L, K₂HPO₄ 0,3 g/L, MgSO₄·7H₂O 0,05 g/L, Na-püruvaat 0,3 g/L), millele on lisatud betaiini ning anaeroobset kasvatamist perioodilises reaktoris (argooni keskkonnas) temperatuuril 37 °C. Söötmel esialgne pH 7,5 peaks säilima kultiveerimise lõpuni. Kui valitud toitelahusega on saadud argilliidi orgaanilist osa efektiivselt kasutatav mikroobikooslus, siis viitab sellele metaani teke gaasifaasi (mõõdetav gaaskromatograafia). Esialgu eraldatud mikroobikoosluse kasutamisel inokulumina värskete argilliidiproovide kultiveerimisel vedelsöötmes R2A pluss betaiin on võimalik sellest kooslusest selekteerimise ja adapteerimisega saada uus, parema biodegradatsioonivõimega kooslus, millega saavutatakse suurem metaani saagis ning ühtlasi metallide parem bioleostumine.

Metaani eraldumine gaasifaasi on argilliidi metallorgaaniliste komplekside lagunemise üheks tõendiks. Mikroorganismide abil võib argilliidist eralduda 10-250 µmol CH₄ /g kivimi kohta [Wuchter jt., 2013; Meslé jt., 2015]. Kui gaasifaasi eraldunud metaani saagis on suurem, näitab see, et eraldatud kooslus on efektiivne metallorgaaniliste komplekside lagundaja. Metaani päritolu argilliidi orgaanilisest osast kontrollitakse isotoopanalüüsiga δ¹³C meetodil. Stabiilsete isotoopide omavaheline suhe määratakse võrrelduna standardiga.

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{proov}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ ‰}$$

Süsinikuanalüüsi tulemuste esitamisel karbonaatsetest kivimitest ja setetest kasutatakse PDB (*Belemnitella Americana*, *Peedee Formation*, *Cretaceous Period*, *South Carolina*) skaalat, kus null-punktiks on võetud fossiilne karbonaat. δ¹³C iseloomustab stabiilsete isotoopide ¹³C ja ¹²C erinevust tuhande ühiku kohta (per mil, ‰), kus positiivne tulemus näitab, et proov on võrreldes standardiga raskemast isotoobist küllastunud ning negatiivne, et raskemast isotoobist vaesunud [Sepp, 2013]. Kerogeensest materjalist pärit metaani tüüpilised väärtused on -50 kuni -70 ‰.

Argilliidi metallorgaaniliste komplekside lõhustumise teiseks tõendiks on metallide leostumine kasvukeskkonda, mida on võimalik mõõta aatomabsorptsioonspektromeetria (AAS) või induktiivsidedstatud plasma-mass-spektromeetria (ICP-MS) abil. Argilliidis sisalduvatest metallidest on metallorgaanilistes kompleksides Mo, Ni, Re, U, V, Co.

- 5 Kolmandaks tõendiks argilliidi metallorgaaniliste komplekside lõhustumise kohta on iseloomulik mikroorganismide kooslus. Selle määramiseks kultiveerimiskeskonnast võetud proov tsentrifuugitakse, et eraldada mikroorganismide biomass, millest omakorda eraldatakse DNA ja sekveneeritakse 16S rRNA geeni järgi, kasutades mass-sekveneerimise tehnikaid (454 Life Sciences pürosekveneerimine, MySeq Illumina jms). Argilliidi metallorgaanilisi
- 10 komplekse lagundavas ja metaani moodustumist stimuleerivas kasvukeskkonnas on ülekaalus klassi *Bacilli* esindajad ning leidub metanogeenide perekonna *Methanosarcina* liikmeid. Kasvukeskkondades, milles metaanitootmine puudub võivad olla ülekaalus klassi *Clostridia* esindajad, peamiselt väävli metabolismiga seotud perekond *Desulfotomaculum*. Metaani tekkeks on oluline tasakaal sulfaadi redutseerijate ja metanogeenide vahel, nii et protsess
- 15 läheks metanogeneesi suunas.

Reeglina on maailmas teostatud kiltade bioleostamise katsed olnud hapniku juurdepääsuga – sellisel jääb juhul “lihtne orgaaniline aine” (orgaanilised happed, aromaatsed ja alifaatsed süsivesinikud) aeroobses keskkonnas lahusesse, kus see võib takistada metallide bioleostumist [Matlakowka jt., 2013]. Käesolevas leiutises kirjeldatud meetodi puhul

20 tekitatakse aga anaeroobses keskkonnas “lihtsast orgaanilisest ainest“ mikroorganismide abil metaangaas.

Leiutise teostusvormid

Leiutises kirjeldatud meetodi – graptoliitargilliidi metallorgaaniliste komplekside lõhustamine stabiilse mikroobikoosluse toimel, millega kaasneb metallide bioleostumine ja

25 metaangaasi eraldumine kohta esitame järgmised tõendid.

Leiutises kasutatud mikroobide toitelahusega R2A (1,5-3,0 g/L), millele oli lisatud betaiini (0,675-1,35 g/L) ja kasutades inokulumina adapteeritud mikroobikooslust eraldus temperatuuril 37 °C läbiviidud anaeroobses kultiveerimiskatses argooni keskkonnas gaasifaasi kuni $7,92 \pm 0,39$ liitrit metaani kg ($354 \pm 17 \mu\text{mol}$) argilliidi kohta (FIG 1b). Argilliidi

30 orgaanilise aine lagundatav osa moodustas kuni $19.86 \pm 0.98\%$ kogu orgaanilisest ainest.

Adapteeritud kultuur toimis ilma lag-faasita, kuid samaväärselt adapteerimata kultuuriga (lag-faas kuni 50 päeva) (FIG 1a).

Metaani päritolu argilliidi orgaanilisest osast tõestati isotoopanalüüsiga $\delta^{13}\text{C}$ meetodil. Argilliidisisaldusega söötmega proovide ja ilma argilliidita söötmega proovide (tühiproovide) metaani keskmised $\delta^{13}\text{C}$ -väärtused olid vastavalt $-51,99 \pm 4,60 \text{ ‰}$ ja $-72,86 \pm 5,35 \text{ ‰}$ (FIG 2). Teatavasti on kerogeensest materjalist pärit atsetiklastiliselt tekkinud metaani tüüpiline väärtus -50 ‰ .

Leiutises kasutatud mikroobide toitelahusega R2A (3,0 g/L) bioeostus argilliidist kasvukeskkonda anaeroobsetes tingimustes argooni keskkonnas kasvatamisel 26,2 % koobaltit ja 9,14 % niklit nende metallide maksimaalsest sisaldusest argilliidis (FIG 3). Mõlemad elemendid on vajalikud bakterite ja arhede ensüümide kofaktoritena.

Tõendiks argilliidi metallorgaaniliste komplekside lagunemise kohta on ka kivimi väliste omaduste muutus. Katseteks purustati kivimit sisaldav puursüdamik 1 ($\text{Ø}10 \text{ cm}$, FIG 5a) tükikesteks mõõtmetega 1-2 cm (FIG 4). Metaani eraldumisega katsetes murenes kivim kultiveerimise käigus liivasarnaseks materjaliks, moodustades kultiveerimiskeskkonnas musta värvusega suspensiooni 3, milles oli märgatav gaasimullide eraldumine (FIG 5a). Kultiveerimiskatsetes, milles metaani eraldumine oli tagasihoidlik või puudus üldse, jäi kultiveerimiskeskond läbipaistvaks (FIG 5b) sarnaselt tühiproovidega 2, mis sisaldasid üksnes kultiveerimiskeskkonda (FIG 5a).

Pürosekvenerimise tulemuste põhjal olid metaani moodustumist stimuleerivas kasvukeskkonnas R2A pluss betaiin ülekaalus klassi *Bacilli* esindajad – bakterite 16S rRNA geenile spetsiifiliste praimerite järgi perekond *Ureibacillus* ja arhede 16S rRNA geeni praimerite järgi sugukond *Bacillaceae*, kuid samuti metanogeenide perekond *Methanosarcina* (FIG 6 ja FIG 7). Ni-ensüümi ureaas sisaldav perekond *Ureibacillus* moodustas 87,43% ning Co- ja Ni-ensüüme sisaldav perekond *Methanosarcina* 3,69% kõigist taksonitest. Seevastu kasvukeskkondades R2A ja R2A pluss metanool olid ülekaalus klassi *Clostridia* esindajad, peamiselt väävli metabolismiga seotud perekond *Desulfotomaculum*, kes moodustasid 50-85% kõigist määratud taksonitest.

Kirjeldatud mikroobikooslus püsib eluvõimelisena säilitamisel argilliidiga kasvukeskkonnas temperatuuril 37 °C kuni neli kuud ning sobib stabiilseks uute kultuuride inokuleerimiseks (1/20 mahus) ja pikaajaliseks säilitamiseks glütseroolikultuurina temperatuuril -80 °C.

Siin kirjeldatud tunnused ja eelised ei ole kõikehõlmavad ning vaadates jooniseid, detailset kirjeldust ja nõudluspunkte on ka tavaspetsialisti jaoks ilmsed paljud lisatunnused ja -eelised. Veel enam, tuleb märkida, et kirjelduse keel on põhimõtteliselt valitud loetavuse ja juhendamise eesmärgil ega piira leiutise ulatust.

Jooniste ja muu illustreeriva materjali loetelu

FIG 1 – metaani eraldumise dünaamika ja saagis argilliidist, kasutades söödet R2A pluss betaiin: a) kasvukeskkonnaga adapteerumata, argilliidile omase mikroobide kultuuriga; b) kasvukeskkonnaga adapteeritud mikroobide kultuuriga.

FIG 2 – metaani päritolu määramine isotoopanalüüsil ($\delta^{13}\text{C}$ meetod).

FIG 3 – metallide bioleostumine argilliidist erinevates kasvukeskkondades; Y-teljel on metallide saagis metalli maksimaalsest sisaldusest argilliidis (rikastusväärtus).

FIG 4 – kultiveerimiskatseks ettevalmistatud argilliidiproov tükikeste mõõtmetega 1-2 cm.

FIG 5 – Graptoliitargilliidi väliste omaduste muutus kasvukeskkonnas kultiveerimisel: a) metaani eraldumisega katsetes tekkis mustjas suspensioon; b) katsetes, milles metaani eraldumine oli tagasihoidlik või puudus üldse, jäi kasvukeskkond läbipaistvaks. 1 – argilliidi puursüdamik, 2 – reaktor toitelahuse ja mikroobikooslusega, 3 – reaktor toitelahuse, argilliidi ja mikroobikooslusega.

FIG 6 – kooslustest pürosekvenerimisel tuvastatud liigid bakterite 16S rRNA V2 piirkonnale sobiva praimeripaariga BSR357-BSF8 [McKenna jt., 2008] erinevates kasvukeskkondades: a) erinevate taksonite (*operational taxonomic unit, OTU*) protsentuaalne jaotus; b) tähtsamate taksonite osa koosluses.

FIG 7 – kooslustest pürosekvenerimisel tuvastatud liigid arhede 16S rRNA V2 piirkonnale sobiva praimeripaariga Arch349F-A934b [Takai jt., 2000; Grosskopf jt., 1998] erinevates kasvukeskkondades: a) erinevate taksonite (*OTU*) protsentuaalne jaotus; b) tähtsamate taksonite osa koosluses.

Leiutise teostamise näited

Näide 1. Leiutises kirjeldatud meetodil initsieeriti graptoliitargilliidile omase adapteerimata mikroobikoosluse ja söötmega R2A pluss betaiin anaeroobses kultiveerimiskatses argooni keskkonnas 500 ml katsepudelis 2 (FIG 5) temperatuuril 37 °C ja pH 7,5 juures biogeense metaani eraldumine gaasifaasi. Gaasifaasi rõhku mõõdeti manomeetrilise süsteemiga OxiTop (WTW, Saksamaa) ja gaasifaasi koostist analüüsiti gaaskromatograafia GC-2014 (Shimadzu, Jaapan; metaani määramispiirkond 10ppb – 30%). Kasutades substraadina 25 g purustatud argilliiti (tükikeste mõõtmed 1-2 cm) saadi 90 päeva jooksul 417 ml gaasi metaanisisaldusega gaasifaasis 15-28%, saagisega 3,1 liitrit metaani 1 kg argilliidi kohta (FIG 1a). Maksimaalselt eraldus 671 ml biogeenset gaasi metaanisisaldusega kuni 37,5%, mis teeb saagiseks 6,4 liitrit metaani 1 kg kivimi (argilliidi) kohta. 77. päeval võeti kultiveerimiskeskonnast vedelfaasi proov metallide sisalduse määramiseks leek-AAS-meetodil (ISO 8288). Graptoliitargilliidile omase mikroobikoosluse toimel oli kivimist kasvukeskkonda eraldunud 26,2% koobaltit ja 9,14% niklit nende metallide maksimaalsest sisaldusest esialgses proovis (FIG 3). Samal päeval võeti kultiveerimiskeskonnast proov mikroorganismide identifitseerimiseks. Proov tseentrifuugiti (5000 p/min, 10 min), et eraldada mikroorganismide biomass, millest omakorda eraldati DNA Powersoil komplekti (MoBio, USA) abil ning sekveneeriti 16S rRNA geenide järgi, kasutades 454 Life Sciences pürosekveneerimise tehnoloogiat ja praimereid, vastavalt [Uuring Eesti argilliidist..., 2014]. Kasvukeskkonnas R2A pluss betaiin moodustas bakterite 16S rRNA geenile sobiva praimeripaariga BSR357-BSF8 määratuna kõigist taksonitest perekond *Ureibacillus* 87,43%, klass *Clostridia*, selts D8A-2 2,72% ja perekond *Thermacetogenium*, liik *Firmicutes bacterium* 3,07% (FIG 6). Arhede 16S rRNA geenile sobiva praimeripaariga Arch349F-A934b määratuna moodustas kõigist määratud taksonitest arhede perekond *Methanosarcina* 3,69% ning bakteritest selts *Bacillaceae* 36,25%, perekond *Desulfotomaculum* 16,7% ja klass *Clostridia* 10,5%. (FIG 7).

Näide 2. Kasutades värskelt jahvatatud argilliiti ja söödet R2A pluss betaiin käivitati Näites 1 kirjeldatud katse kultiveerimiskeskonnast 129. päeval võetud prooviga (5% inokulum) uus katse anaeroobsetel tingimustel argooni keskkonnas 1000 ml katsepudelis 3 (FIG 5a) temperatuuril 37 °C pH 7,5 juures. Gaasifaasi rõhku mõõdeti manomeetrilise süsteemiga OxiTop (WTW, Saksamaa) ja gaasifaasi koostist analüüsiti gaaskromatograafidega GC-2014

(Shimadzu, Jaapan, metaani määramispiirkond 10ppb -30%) ja Varian Inc., Model CP-4900 (metaani määramispiirkond 1-100%). Kasutades substraadina 50 g purustatud argilliiti (tükikeste mõõtmed 1-2 cm) eraldus gaasifaasi 7,92±0,39 liitrit metaani kg (354±17µmol) argilliidi kohta (FIG 1b). Metaan pärines argilliidi orgaanilisest osast, sest
5 argilliidisisaldusega söötmega proovide ja ilma argilliidita söötmega proovide (tühiproovide) metaani keskmised $\delta^{13}\text{C}$ -väärtused olid vastavalt $-51,99 \pm 4,60 \text{ ‰}$ ja $-72,86 \pm 5,35 \text{ ‰}$ (FIG 2). Argilliidi orgaanilise aine lagundatav osa moodustas 36,40±1,80% kogu orgaanilisest ainest. Seega saadi adapteerunud mikroobikultuuriga kultiveerimiskatses söötmega R2A pluss betaiin, kasutades värskelt jahvatatud argilliiti 1,4 korda enam metaani kui varasemalt
10 on sarnastest mustadest kildast eraldatud. Metaan hakkas kasvukeskkonnast eralduma kohe, ilma kohanemisfaasita (FIG 1b) ning argilliit lagunes peensuspensioniliseks materjaliks 3 (FIG 5a).

Viited

1. Aaloe, A.; Bauert, H.; Soesoo, A. Kukersiit – Eesti põlevkivi. MTÜ GEOGuide Baltoscandia, Tallinn. 2006.
2. Asakawa, S.; Karin Sauer, K.; · Werner Liesack , W.; Thauer, R. K. (1998)
5 Tetramethylammonium:coenzyme M methyltransferase system from
Methanococcoides sp. *Arch Microbiol* , 170, 220–226.
3. Ashby, M; Wood, L.; Lidstrom, U.; Clarke, C.; Gould, A.; Strapoc, D.; Lambo, A.J.;
Huizinga, B.J. (2013) Compositions and methods for identifying and modifying
carbonaceous compositions *Patent application US 20130116126 A1*.
- 10 4. Bauert, H.; Kattai, V. (1997). Kukersite oil shale. Kogumikus A. Raukas & A.
Teedumäe (Toim.). Geology and mineral resources of Estonia. Estonian Academy
Publishers, Tallinn. 436 pp. ISBN 9985-50-185-3.
5. Clement, B.G.; Ferry, J.G.; Underwood, S. (2011) Methods to stimulate biogenic
methane production from hydrocarbon-bearing formations. *Patent application*
15 *CA2801558 A1*.
6. Grosskopf, R.; Janssen, P.H.; Liesack, W. (1997) Diversity and structure of the
methanogenic community in anoxic rice paddy soil Microcosms as Examined by
Cultivation and Direct 16S rRNA Gene Sequence Retrieval. *Applied and*
Environmental Microbiology, 64, 960–969.
- 20 7. Harris, S.H.; Smith, R.L.; Barker, C.E. (2008) Microbial and chemical factors
influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface
coals. *International Journal of Coal Geology*, 76, 46–51.
8. Jones, E.J.P.; Voytek, M.A.; D. Warwick, P.D.; Margo D. Corum, M.D.; Cohn, A.;
Bunnell, J.E.; Clark, A.C.; William H. Orem, W.A. (2008) Bioassay for estimating the
25 biogenic methane-generating potential of coal samples. *International Journal of Coal*
Geology, 76, 138–150.
9. Lippmaa, E., Maremäe, E., Pihlak, A.-T., Aguraiuja, R. (2009) Estonian graptolitic
argillites – ancient ores or future fuels? *Oil Shale*, 26(4) 530–539.

10. Lippmaa, E., Märemäe, E., Pihlak, A.-T. (2011) Resources, production and processing of Baltoscandian multimetal black shales. *Oil Shale*, 28(1) 68–77.
11. Märemäe, E. (1988) Utilization of Estonian Alum Shale in the national economy. *Oil Shale*, 1988, 5(4), 407-417.
- 5 12. Matlakowka, R.; Ruszkowski, D.; Sklodowska, A. (2013) Microbial transformations of fossil organic matter of *Kupferschiefer* black shale – elements mobilization from metalloorganic compounds and metalloporphyrins by a community of indigenous microorganisms. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 49 (1), 223 -231.
- 10 13. McKenna, P.; Hoffmann, C.; Minkah, N.; Aye, P.P.; Lackner, A.; Liu, Z.; Lozupone, C.A.; Hamady, M., Knight, R.; Bushman, F.D. (2008). The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathogens* 4(2), e20.
14. Meslé, M.; Periot, C.; Dromart, G.; Oger, P. (2013) Biostimulation to identify microbial communities involved in methane generation in shallow, kerogen-rich shales. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 55-70, doi:10.1111/jam.12015.
- 15 15. Meslé, M.; Périot, C.; Gilles Dromart, G.; Oger, P. (2015) Methanogenic microbial community of the Eastern Paris Basin: Potential for energy production from organic-rich shales. *International Journal of Coal Geology*, 149, 67–76.
- 20 16. Newell, C.J; Adamson, D.T.; Connor, J.A.(2008) Methods and systems for stimulating biogenic production of natural gas in the subsurface. *Patent application WO2008/041990*.
17. Petersell, V. Diktüoneemakilt, energia ja keskkond. Keskkonnatehnika, 2008, 8.
18. Pfeiffer, R.S.; Ulrich, G.; Vanzin, G.; Dannar, V.; Debruin, R.P.; Szaloczi, E.L. (2006) Methanogenesis stimulated by isolated an aerobic consortia. *Patent WO 2006/118569 A1*.
- 25 19. Pfeiffer, R.S.; Ulrich, G.A.; Finkelstein, M. (2010) Chemical amendments for the stimulation of biogenic gas generation in deposits of carbonaceous material. *U.S. Patent No. 7696132*.

20. Pfeiffer, R.S.; Ulrich, G.; Vanzin, G.; Dannar, V.; Debruin, R.P.; DeBruyn, R. P.; Dodson, J. B. (2011) Biogenic fuel gas generation in geologic hydrocarbon deposits. *U.S. Pat. No. 8,302,683*.
21. Puura, E., Neretnieks, I., Kirsimäe, K. (1999) Atmospheric oxidation of the pyritic waste rock in Maardu, Estonia. 1. Field study and modelling. *Environmental Geology* 39 (1), 1-18.
22. Reinsalu, E. (2012). Fosforiit kui Eesti loodusvara. *Eesti Loodus*, 2012/3.
23. Sepp, H. (2013) Holotseeni paleokeskkonna muutused Loode-Eestis järvesetete stabiilsete isotoopide ja jälgelementide põhjal Turvaste Valgejärve läbilõikest. Magistritöö, Tartu Ülikool, 2013.
24. Sevinsky J.R.; Vanzin, G.F.; Haveman, S.A.; Kotter, N.R.; Mahaffey, W. (2015) Methods of stimulating acetoclastic methanogenesis in subterranean deposits of carbonaceous material. *U.S. Patent No. 9004162 B2*
25. Takai, K.; Horikoshi, K. (2000) Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5066–5072.
26. Ticak, T.; Hariraju, D.; Bayron Arcelay, M.; Arivett, B.A.; Fiester, S.E.; Ferguson Jr, D.J. (2015) Isolation and characterization of a tetramethylammonium degrading *Methanococoides* strain and a novel glycine betaine utilizing *Methanlobus* strain. *Archives of Microbiology*, 197(2), 197-209.
27. Toledo, G.V.; Richardson, T.H.; Stingl, U.; Mathur, E.J., Venter, J.C. (2009) Methods to stimulate biogenic methane production from hydrocarbon-bearing formations. *Patent application WO2009/140313*.
28. Urios, L.; Marsal, F.; Pellegrini, D.; Magot, M. (2012) Microbial diversity of the 180 million-year-old Toarcian argillite from Tournemire, France. *Applied Geochemistry*, 27 (7), 1442-1450, doi: 10.1016/j.apgeochem.2011.09.022.
29. Urios, L.; Marsal, F.; Pellegrini, D.; Magot, M. (2013) Microbial diversity at iron-clay interfaces after 10 years of interaction inside a deep argillite geological formation

(Tournemire, France), *Geomicrobiology Journal*, 30:5, 442-453, doi: 10.1080/01490451.2012.705227.

30. Uuring Eesti argilliidist biogeense metaangaasi puuraugus (in situ) tootmise võimalikkuse tõestamiseks. Lõppraport. Vastavalt lepingule nr 4.3 _2.14.420, sõlmitud 8.03.14 Ettevõtluse Arendamise Sihtasutuse ja Biotap OÜ vahel. Tallinn, 2014. 22.08.2014
5 <http://www.eas.ee/images/doc/sihtasutusest/uuringud/ettevotlus/uuring-argilliidist-biogeense-metaangaasi.pdf> (külastatud 20.10.2016)
31. Voolma, M.; Soesoo, A., Hade, S., Hints, R., Kallaste, T. (2013) Geochemical heterogeneity of Estonian graptolite argillite. *Oil Shale*, 30(3) 377–401.
10
32. Watkins, A.J.; Roussel, E.G.; R. Parkes, R.J. Sass, H. (2014) Glycine betaine as a direct substrate for methanogens (*Methanococoides* spp.). *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (1), 289–293.
33. Wuchter, C.; Banning, E.; Mincer, T.J.; Drenzek, N.J.; Coolen, M.J.L. (2013) Microbial diversity and methanogenic activity of Antrim Shale formation waters from recently fractured wells. *Frontiers in Microbiology*, 4, 367, doi: 10.3389/fmicb.2013.00367.
15

Patendinõudlus

1. Meetod graptoliitargilliidi metallorgaanilise aine lõhustamiseks mikroobikoosluse abil, millega kaasneb biogeense metaani eraldumine, mis erineb selle poolest, et metaani produktsiooniks kasutatakse vedelat toitekeskkonda R2A pluss betaiin ning anaeroobses keskkonnas toimub metallide bioleostumine.
5
2. Meetod vastavalt nõudluspunktile 1, mis erineb selle poolest, et bioleostuvad metallid on nikkel ja koobalt.
3. Meetod vastavalt nõudluspunktidele 1-2, mis erineb selle poolest, et biogeense metaani eraldamiseks metallorgaanilisest ainest ja sellega kaasnevaks metallide leostamiseks kasutatakse graptoliitargilliidile omast mikroobikooslust.
10
4. Meetod vastavalt nõudluspunktidele 1-3, mis erineb selle poolest, et värskete argilliidiproovide inokuleerimisel graptoliitargilliidile omase mikroobikooslusega saadakse uus, parema biodegradatsioonivõimega adapteeritud kooslus, mis annab suurema metaanisaagise.

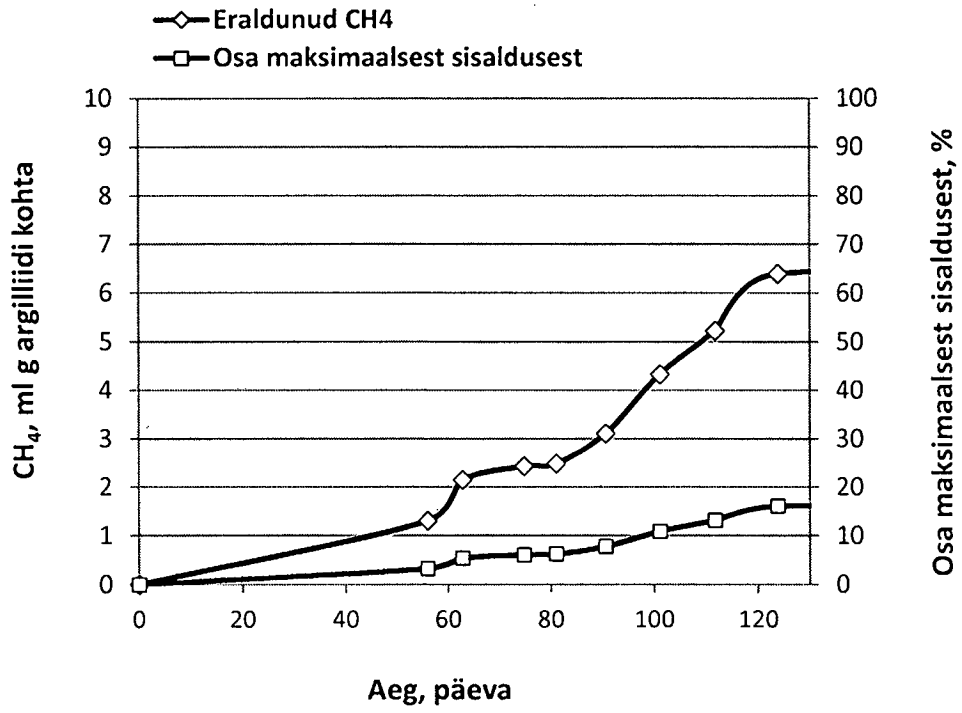


FIG 1a

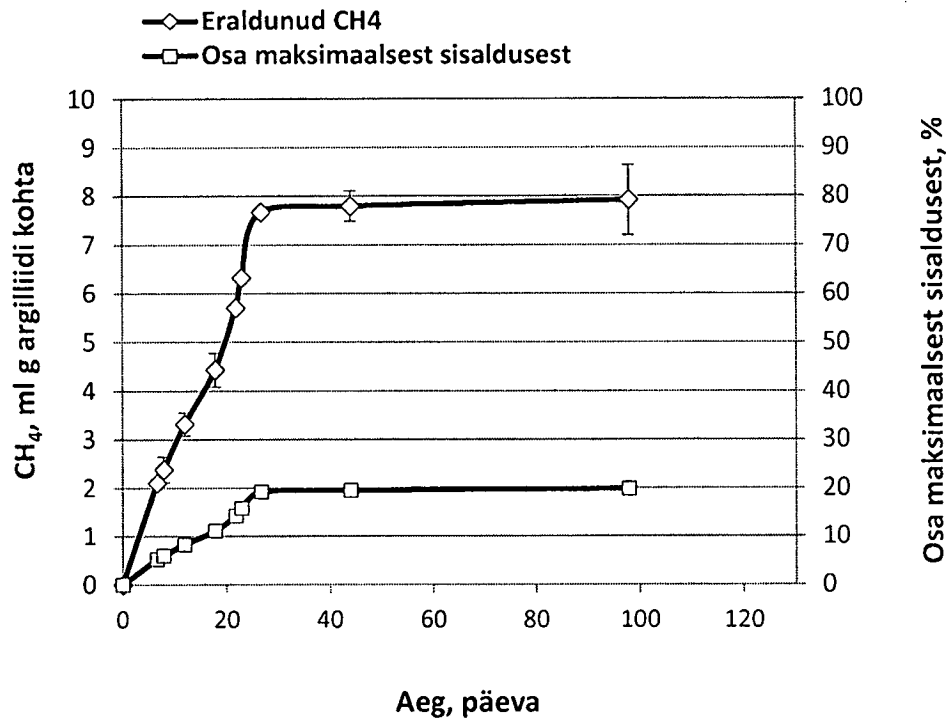


FIG 1b

Jrk	Proov	Kasvukeskkonna koostis	$\delta^{13}\text{C}$ (VPDB), %	CH_4 gaasifaasis, %
1	Adapteerunud kultuur	argilliit, R2A (3,0g/L) pluss betaiin (1,35 g/L)	-49,40 ± 2,43,	40,70 ± 4,62
		argilliit, R2A (1,5g/L) pluss betaiin (0,675g/L)	-53,93 ± 5,17,	15,78 ± 5,10
		Keskmine	51,99 ± 4,60	26,45 ± 14,04
2	Adapteerunud kultuur	R2A (3,0g/L) pluss betaiin (1,35g/L)	-71,47 ± 3,30,	13,16 ± 9,04
		R2A (1,5g/L) pluss betaiin(0,675g/L)	-74,95 ± 8,84	5,73 ± 1,34
		Keskmine	72,86 ± 5,35	10,19 ± 7,61

FIG 2

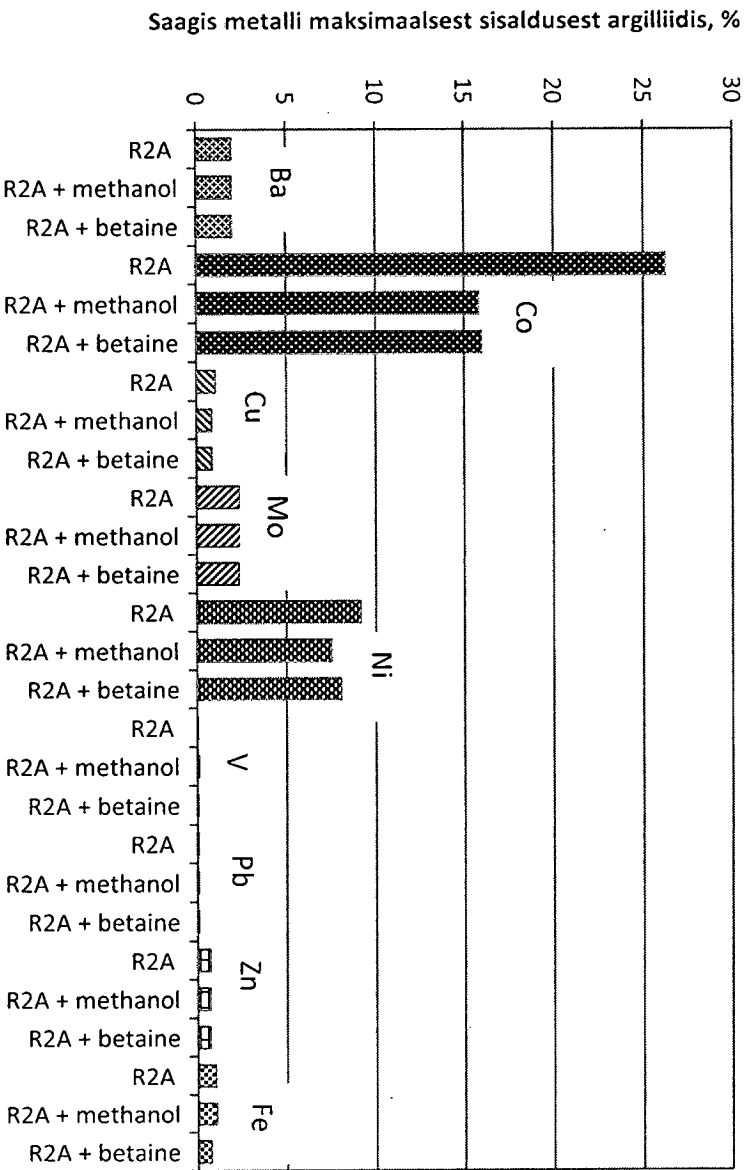


FIG 3



FIG 4

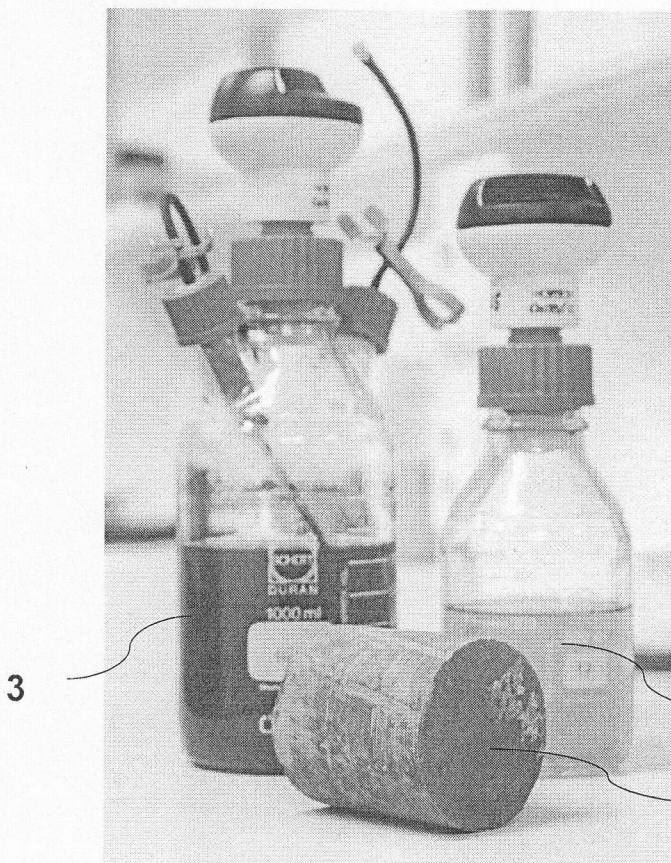


FIG 5a

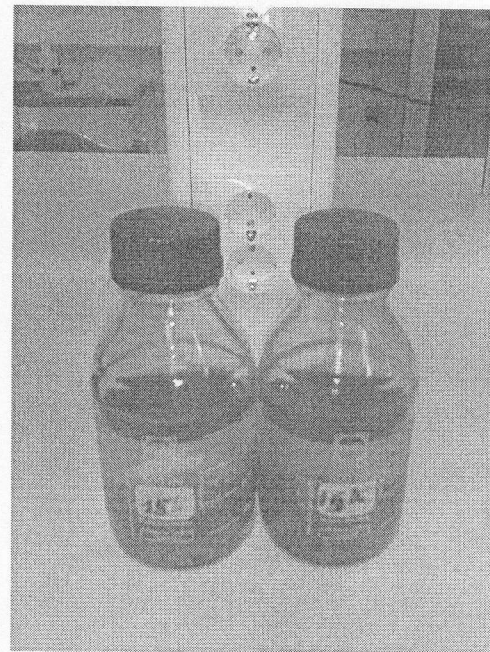


FIG 5b

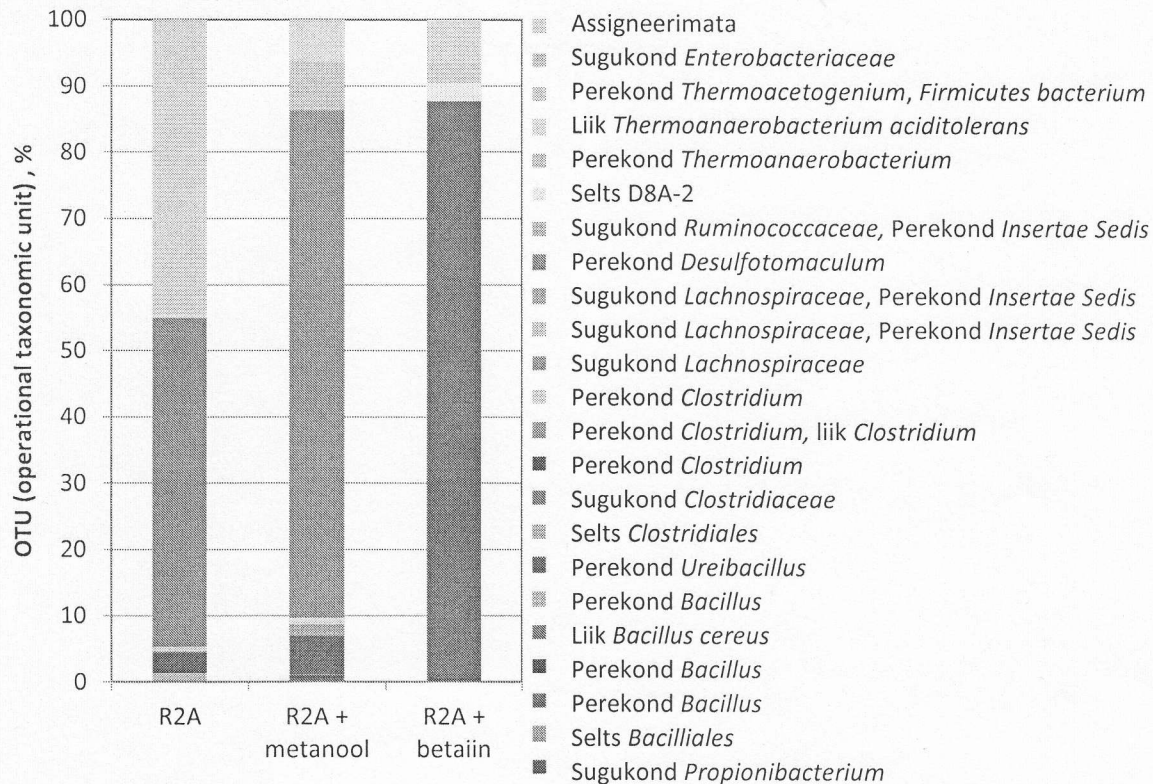


FIG. 6a

Kasvukeskkond	Tähtsamad taksonid ja nende osa koosluses
R2A	Perekond <i>Desulfotomaculum</i> (49,71%); Assigneerimata (44,41%); Perekond <i>Bacillus</i> (1,21%).
R2A pluss metanool	Perekond <i>Desulfotomaculum</i> , (76,56%); Sugukond <i>Enterobacteriaceae</i> (7,36%); Perekond <i>Clostridium</i> (5,78%).
R2A pluss betaiin	Sugukond <i>Bacillaceae</i> , perekond <i>Ureibacillus</i> (87,43%); Klass <i>Clostridia</i> , selts D8A-2 (2,72%); Perekond <i>Thermacetogenium</i> , <i>Firmicutes bacterium</i> (3,07%).

FIG 6b

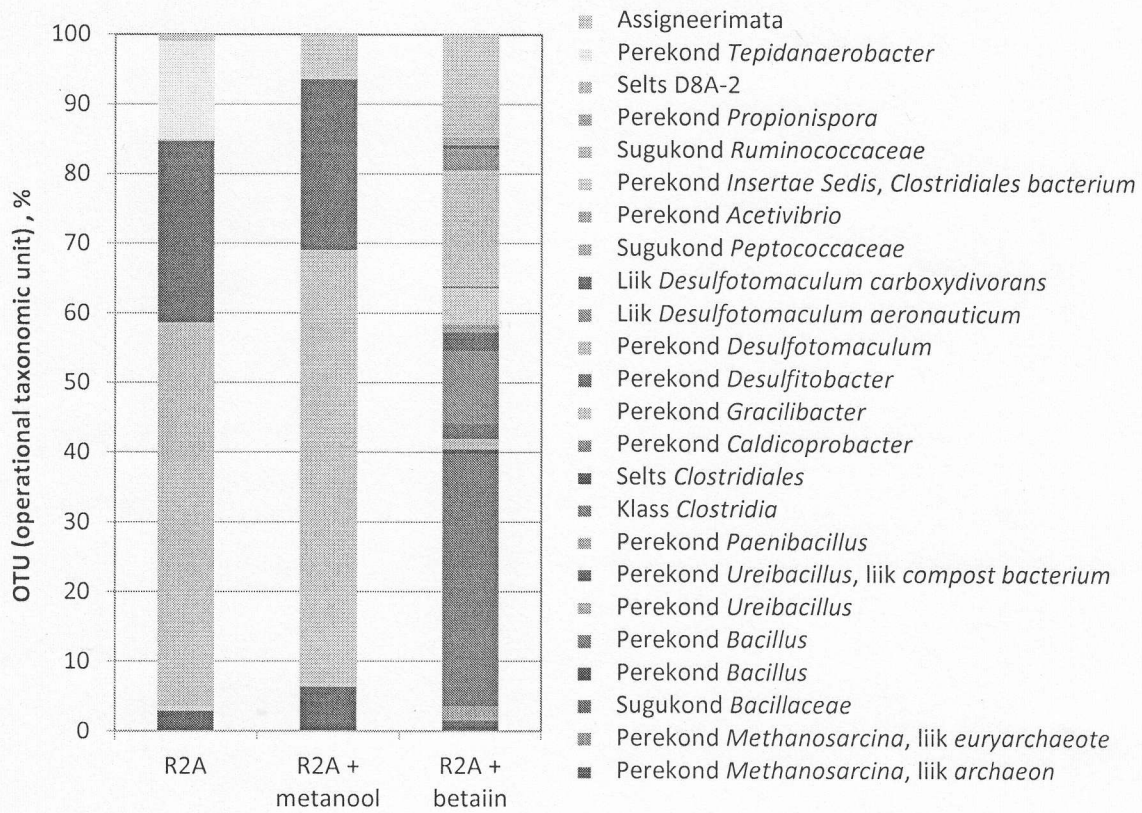


FIG 7a

Kasvukeskkond	Tähtsamad taksonid ja nende osa koosluses
R2A	Perekond <i>Desulfotomaculum</i> (55,03%); Liik <i>Desulfotomaculum carboxydivorans</i> (26,10%); Liik <i>Tepidanaerobacter</i> (14,06%).
R2A pluss metanool	Perekond <i>Desulfotomaculum</i> (62,58%); Liik <i>Desulfotomaculum carboxydivorans</i> (24,58%); Perekond <i>Bacillus</i> (6,39%).
R2A pluss betaiin	Sugukond <i>Bacillaceae</i> (36,19%); Perekond <i>Desulfotomaculum</i> (16,68%); Klass <i>Clostridia</i> (10,51%).

FIG 7b