

# Jätevesipuhdistamon lietteen ravinteet kiertoon

## LieRaKi –raportti

28.9.2023

Noora Risku, Jussi Vesamäki ja Sami J. Taipale

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Jyväskylän yliopisto

## Tiivistelmä

Jätevesilietteen ja kotitalousbiojätteen soveltuvuutta kierrätyslannoitteen raaka-aineeksi kartoitettiin analysoimalla muovipartikkelit (>2 mm) ja taudinaiheuttajat. Tämän lisäksi tutkimme jätevesilietteen hygienisointia tuhkan avulla sekä mittasimme jätteen biokaasun tuotantoa mädättämällä. Hygienisointi tuhalla perustuu jätteen pH:n säätöön, sillä emäksinen ympäristö rajoittaa useiden bakteerien kykyä kasvaa ja pysyä hengissä. Tutkimuksessamme havaitsimme, että > 10 pH vähentää merkittävästi taudinaiheuttajien kasvua, mutta samalla vapautuu ammoniakkikaasua. Tässä tutkimuksessa pH 10,7 (50 % tuhkaa lietteen tuorepainosta) rajoitti *Escherichia coli* -bakteerin kasvua merkittävästi ja viljelykokeella päästiin lainsäädännön asettamaan tavoitteeseen (< 1000 pmy/g). Taudinaiheuttajia tutkittiin myös bakteeriyhteisöanalyysillä. Taudinaiheuttajien määrä oli lajitasolla tarkasteltuna jätevesilietteessä hyvin alhainen (< 0,05 % kaikesta geneettisestä materiaalista). Biojätteen sekoittaminen jätevesilietteeseen ei lisännyt biokaasun tuotantoa mädätyskokeessa. Muoviroskan määrä oli kaikissa tutkituissa näytteissä reilusti alle lainsäädännön määrittämän raja-arvon (0,5 % tuorepainosta).

# Sisällysluettelo

<b>1 Tutkimuskysymykset ja metodit</b> .....	3
<b>2 Raaka-aineet</b> .....	4
<b>3 Jätevesilietteen pH:n muutos tuhkakäsittelyssä</b> .....	4
<b>4 Kosteuden, orgaanisen kuiva-aineen ja ammoniumtypen osuus näytteissä</b> .....	6
<b>5 Kaasuntuottopotentiali ja hiilidioksidin sekä metaanin osuus kaasun koostumuksesta</b> .....	7
<b>6 Ammoniumin määrä lietesekoitteen tuhalla käsitellyssä mädätejäännöksessä</b> .....	10
<b>7 Taudinaiheuttajat</b> .....	11
<b>7.1 Bakteeriyhteisöanalyysi</b> .....	11
<b>7.2 pH:n vaikutus taudinaiheuttajien kasvuun</b> .....	13
<b>7.3 Tuhkan vaikutus koliformisiin taudinaiheuttajiin</b> .....	15
<b>8 Mikromuovin (&gt; 2 mm) määrä näytteissä</b> .....	16
<b>9 Johtopäätökset</b> .....	17
<b>Kirjallisuus</b> .....	18
<b>Liite 1 Taudinaiheuttajien nimet</b> .....	19

# 1 Tutkimuskysymykset ja metodit

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää jätevesilietteen ja jätevesilietteestä sekä erilliskerätystä kotitalousbiojätteestä tehdyn sekoitteen soveltuvuutta kierrätyslannoitteen raaka-aineeksi. Tutkimuksen tärkeimpänä tavoitteena oli tarkastella jätteen taudinaiheuttajia ja jätteen hygienisointia kemiallisesti tuhkan avulla. Lisäksi tutkittiin jätteen mädätyksessä syntyvän biokaasun määrää ja laatua, jotta jätteen hyödynnystä energiantuotannossa voidaan kartoittaa.

Jätteen soveltuvuutta kierrätyslannoitteen raaka-aineeksi tarkasteltiin lainsäädännön näkökulmasta, selvittämällä taudinaiheuttajien määrää, kemiallisen hygienisoinnin tehokkuutta ja vierasaineiden (> 2 mm muovipartikkeleiden) määrää. Kemiallista hygienisointia testattiin käyttämällä lentotuhkaa, jonka potentiaali hävittää taudinaiheuttajia perustuu raaka-aineen happamuuden säätöön. Tuhkan avulla jätteestä saadaan emäksisempää, jolloin mikrobien kasvu hidastuu tai lakkaa. Myös jätteen kokonaistyyppiä ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) sekä liukoisten ammoniumionien ( $\text{NH}_4^+$ ) määrää tarkasteltiin, sillä happamuus vaikuttaa typen käyttäytymiseen.

Näytteet olivat koontinäytteitä kolmesta eri jätevesien käsittelylaitoksesta sekä Kuusamon seudun erilliskerättyä kotitalousbiojätettä. Näytteistä kerättiin 16S rRNA-näytteet ennen kokeiden aloitusta, mädätyskokeiden jälkeen ja tuhkan lisäyksen jälkeen. Niistä tarkastettiin taudinaiheuttajat ja niiden suhteelliset osuudet kaikista löydetyistä mikrobeista.

Mädätyskokeet tehtiin kolmen eri laitoksen jätevesilietteistä tehdyille sekoitteelle sekä jätevesiliettesekoitteelle, johon oli lisätty erilliskerättyä biojätettä. Kaasunäytteitä, joista mitattiin hiilidioksidin ja metaanin määrä, otettiin mädätyskokeiden aikana. Mädätyskokeiden lopuksi mitattiin kaasuntuotanto kokonaisuudessaan. Tuhkan vaikutusta taudinaiheuttajien suhteelliseen määrään mikrobiyhteisössä testattiin lisäämällä sitä jätevesilietteen mädätejäännökseen. Samalla tarkasteltiin tuhkan vaikutusta kaasuntuotantoon.

Taudinaiheuttajien kykyä kasvaa erilaisissa pH-olosuhteissa tutkittiin vielä erikseen kahdella bakteerikannalla, sillä siten voitiin laskea pesäkkeiden määrä tarkasti. Ensin kasvatettiin puhtasviljeltyjä bakteereita (*Bacillus* sp. ja *Escherichia coli*) maljoilla, joiden pH:ta oli säädetty. Tämän tarkoituksena oli tarkastella kahden tunnetun kannan avulla pH:n vaikutusta bakteeripesäkkeiden määrään. Tämän jälkeen tarkasteltiin näytteiden koliformisten bakteeripesäkkeiden määrää, kun näytteisiin sekoitettiin jälleen eri konsentraatit, lentotuhkaa. Tarkastelu rajattiin koliformisiin bakteereihin, sillä niihin kuuluva *E. coli* toimii lannoitevalmisteasetuksessa (nro 24/11) indikaattorilajina, jolle on ilmoitettu raja-arvoksi 1000 pesäkettä grammassa tuorepainoa kohden.

Lannoitevalmisteasetuksessa (nro 24/11) ilmoitetaan myös sallitun roskan (kivet, metallit, luut ja muovi) määräksi 0,5 % tuorepainossa. Roskat määritetään yli 2 mm kokoisista partikkeleista, joten myös tässä tutkimuksessa keskityttiin tähän kokoluokan muovipartikkeleiden suhteen. Partikkelit poimittiin mikroskoopin alla vetyperoksidilla (30 %) käsitelystä näytteestä 2 mm silmäkoon siivilältä. Poimitut partikkelit todennettiin muoviksi Raman-spektroskoopilla.

## 2 Raaka-aineet

Tekstissä ja taulukoissa viitataan tutkittuihin raaka-aineisiin seuraavilla nimillä:

### Lietesekoite

Kuivatusta jätevesilietteestä koontinäyte:

- Mäntyselän jätevesipuhdistamo 66 %
- Rukan jätevesipuhdistamo 21 %
- Kuusamon Juusto, meijerijätevesiliete 13 %

### Liete ja biojäte

- Jätevesilietteen koontinäyte 67 %
- Erilliskerätty biojäte Kuusamosta (käsittelemätön) 33 %

### Tuhka

Koontinäyte:

- Torangin voimalaitoksen A-suodattimen lentotuhka (näyte otettu 7.2.2023) 50 %
- Torangin voimalaitoksen A ja B suodattimen lentotuhka (näyte otettu 22.3.2023) 50 %

Tutkimuskysymykset määrittivät mitä raaka-aineita käytettiin näytteinä eri kokeissa. Kaikille listatuille seoksille ei siis tehty samoja toimenpiteitä. Tuhkaa lisättiin lietesekoitteeseen pH-mittausta varten, lietesekoitteen mädätejäännökseen sekä taudinaiheuttajien viljelykokeessa liete ja biojäte sekoitukseen. Tuhkan määrä suhteutettiin jätteen tuorepainoon.

## 3 Jätevesilietteen pH:n muutos tuhkakäsittelyssä

Lietesekoitteen pH mitattiin maaperän pH:n mittaukseen tarkoitetun laboratoriostandardin (ISO 10390:1994E) mukaisesti. Mittaus tehtiin pelkälle lietesekoitteelle, lietesekoitteelle, johon lisättiin tuhkaa (suhteutettuna tuorepainoon) ja pelkälle tuhkalle (Taulukko 1). Lietesekoitteet olivat mahdollisimman tuoreita. Rinnakkaisnäytteitä oli kaksi jokaisesta

näytteestä. Mittauspisteet olivat 2 h tuhkan lisäyksen jälkeen sekä 24 h tuhkan lisäyksen jälkeen. Lietesekoitteen pH oli neutraali (6,9) ja tuhka vahvan emäksinen (12,6). Jo 5 % tuhkaa lietteen tuorepainosta nosti seoksen pH:ta tehokkaasti.

**Taulukko 1.** Lietesekoitteen pH:n muutoksen keskiarvo ja keskihajonta (n=2) eri tuhkakonsentraatioiden kanssa. Tuhkan osuus on suhteutettu lietteen tuorepainoon.

Näyte	pH (2 h)	pH (24 h)	pH (keskiarvo 2 h & 24 h)
Lietesekoite	7,1 ± 0,01	6,6 ± 0,2	6,9
Lietesekoite + 5 % tuhkaa	8,7 ± 0,2	7,9 ± 0,08	8,3
Lietesekoite + 10 % tuhkaa	8,6 ± 0,07	8,2 ± 0,05	8,4
Lietesekoite + 20 % tuhkaa	9,4 ± 0,1	9,1 ± 0,2	9,2
Lietesekoite + 25 % tuhkaa	9,7 ± 0,07	9,6 ± 0,01	9,6
Lietesekoite + 30 % tuhkaa	9,9 ± 0,09	9,6 ± 0,05	9,7
Lietesekoite + 40 % tuhkaa	10,7 ± 0,02	10,0 ± 0,02	10,3
Lietesekoite + 50 % tuhkaa	11,0 ± 0,5	10,3 ± 0,1	10,7
Lietesekoite + 60 % tuhkaa	11,4 ± 0,06	10,5 ± 0,08	10,9
Lietesekoite + 80 % tuhkaa	11,8 ± 0,07	11,2 ± 0,02	11,5
Tuhka	12,7 ± 0,02	12,6 ± 0,01	12,6

Mädätyskokeen jälkeen mitattiin myös näytteiden pH. Jätevesilietesekoitteen pH nousi mädätysprosessissa, mutta korkeammissa tuhkapitoisuuksissa mädätejäännöksen pH oli matalampi kuin tuoreella sekoitteella tehdyssä kokeessa (taulukko 2).

**Taulukko 2.** Lietesekoitteen mädätejäännöksen pH:n muutoksen keskiarvo ja keskihajonta (n=4) eri tuhkakonsentraatioiden kanssa. Tuhkan osuus on suhteutettu lietteen tuorepainoon.

Tuhkan osuus lietteen tuorepainosta	pH
Lietesekoitteen mädätejäännös	7,5 ± 0,06
Lietesekoitteen mädätejäännös + 10 % tuhkaa	8,7 ± 0,07
Lietesekoitteen mädätejäännös + 25 % tuhkaa	9,2 ± 0,05
Lietesekoitteen mädätejäännös + 50 % tuhkaa	10,0 ± 0,1
Lietesekoitteen mädätejäännös + 80 % tuhkaa	10,7 ± 0,08

## 4 Kosteuden, orgaanisen kuiva-aineen ja ammoniumtypen osuus näytteissä

Lietesekoitteen sekä lietesekoitteen, johon oli sekoitettu biojätettä, kosteus ja orgaanisen aineen määrä mitattiin. Neljä rinnakkaisnäytettä punnittiin upokkaissa, ja asetettiin 105 °C noin 8 h. Kuivatut näytteet punnittiin, ennen kuin niitä hehkutettiin 500 °C 1 h, jonka jälkeen näytteet punnittiin uudestaan. Näin saatiin selville orgaanisen aineksen osuus kaikesta kuiva-aineesta (TVS, *total volatile solids*, Taulukko 3).

**Taulukko 3.** Lietesekoitteen sekä biojätettä ja lietettä sisältävän seoksen keskimääräinen kosteus ja orgaanisen aineen määrä (n=4). Orgaanisen aineen määrä on ilmoitettu sekä mg/g ja osuutena.

Näyte	Kosteus (%)	Orgaanisen aineen määrä (TVS, mg/g)	Orgaanisen aineen osuus kuivapainosta (TVS, %)
Lietesekoite	71,3 ± 0,7	11,2 ± 0,3	78,3 ± 0,6
Liete + biojäte	62,0 ± 10,6	78,1 ± 5,2	96,5 ± 0,3

Typpi on jätevesilietteessä liukoisena ammoniumionina (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) sekä kaasumuodossa ammoniakkina (NH<sub>3</sub>). Lisäksi typpeä on sitoutuneena materiaalin aminohappoihin, joista se voi vapautua molekyylien pilkkoutuessa mikrobitoiminnan seurauksena. Ammoniakkikaasun määrä riippuu lietteen lämpötilasta sekä pH:sta, sillä ammonium kaasuuntuu lämpötilan tai pH:n noustessa.

Ammoniumtyppi (NH<sub>4</sub>-N) määritettiin lietesekoitteesta ennen mädätystä, mädätyksen jälkeen (1 kk) sekä mädätejäännöksestä, jota oltiin inkuboitu tuhkan kanssa viikon ajan (taulukko 4). Ammonium-typpi määritettiin myös biojätteen ja lietteen sekoituksesta. Lietesekoitteesta (ennen mädätystä ja mädätyksen jälkeen) ja biojätteen ja lietteen sekoituksesta tarkasteltiin kolme rinnakkaisnäytettä. Tuhkalla käsitellyistä mädätejäännöksistä tarkasteltiin ammonium-typen määrää vain yhdestä näytteestä tuhkakäsittelyä kohden.

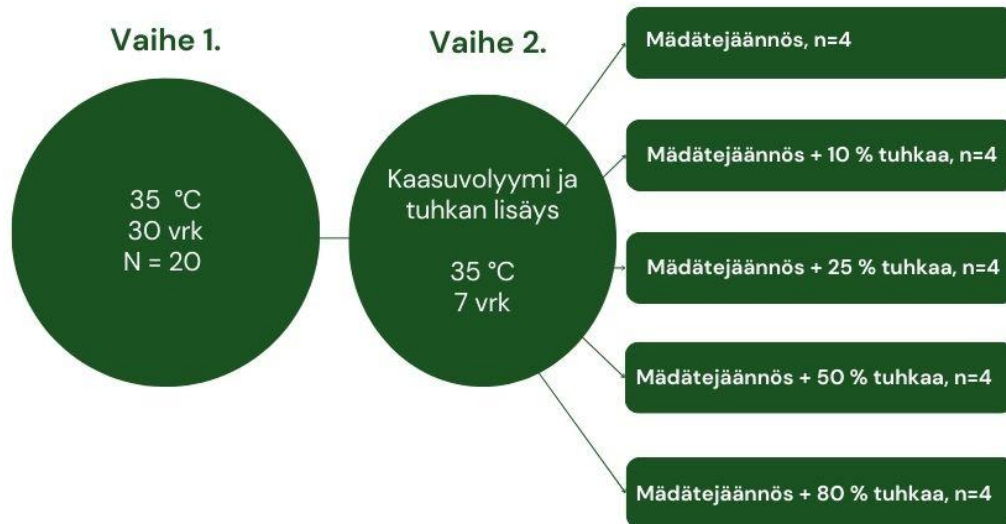
Ammonium-typen määrä vähentyi merkittävästi, kun lietesekoitetta mädätettiin (taulukko 4). Mädätysprosessin aikana lietteen lämpötilan noustessa ja biologisten prosessien muuttaessa jätteen rakennetta sekä happamuutta, ammonium siis kaasuuntuu. Tuhkan vaikutus mädätejäännöksen ammonium-typen määrään ei ollut merkittävä.

**Taulukko 4.** Lietesekoitteen, sen mädätejäännöksen, eri tuhka konsentraatioilla käsitellyn lietesekoitteen mädätejäännöksen ja lietteen ja biojätteen sekoituksen ammonium-tyyppi (NH<sub>4</sub>-N) pitoisuus mg/l. Pitoisuus on ilmoitettu keskiarvona ja keskihajonnan kanssa näytteissä ilman tuhkaa (n=3).

Näyte	NH <sub>4</sub> -N, mg/l
Lietesekoite	42,8 ± 4,3
Lietesekoitteen mädätejäännös	10,3 ± 0,5
Liete ja biojäte	37,6 ± 4,0
<b>Tuhkalla käsitellyt lietesekoitteen mädätejäännökset</b>	
Lietesekoite + 10 % tuhkaa	9,6
Lietesekoite + 25 % tuhkaa	7,1
Lietesekoite + 50 % tuhkaa	11,3
Lietesekoite + 80 % tuhkaa	7,5

## 5 Kaasuntuottopotentiali ja hiilidioksidin sekä metaanin osuus kaasun koostumuksesta

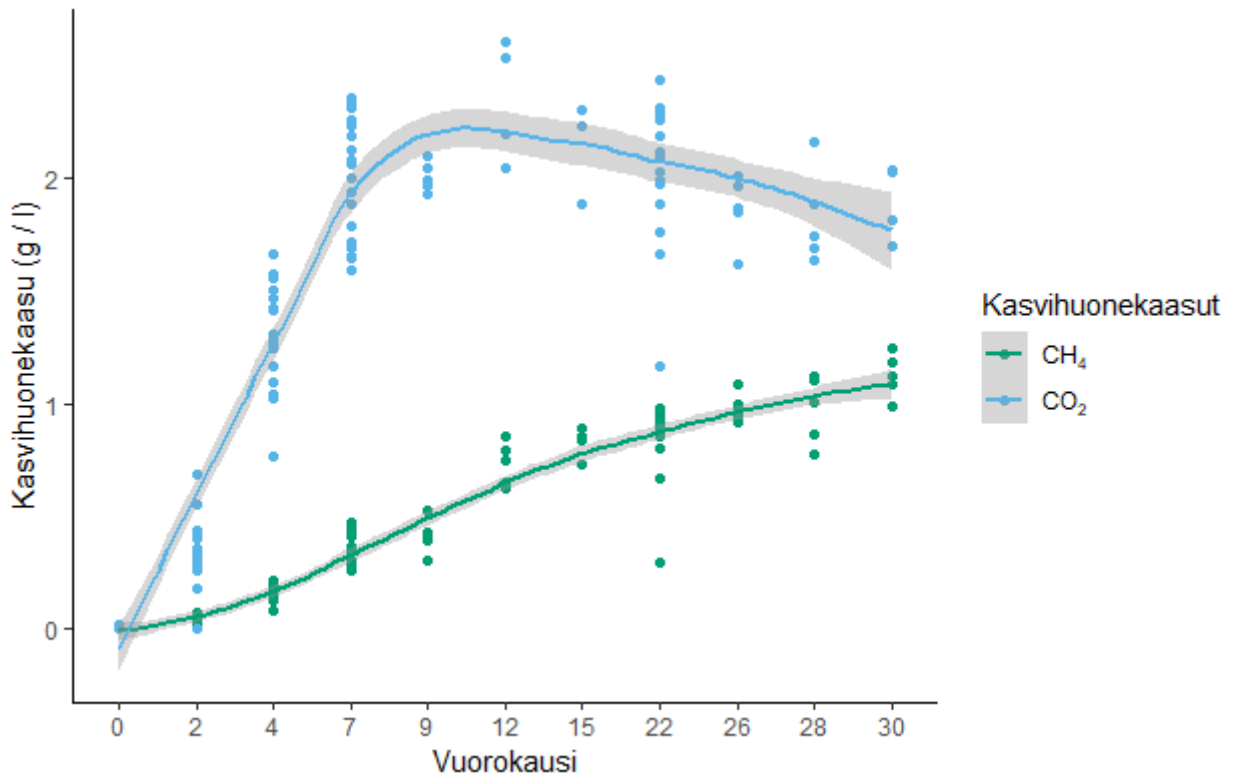
Mädätyskoe tehtiin jätevesilietesekoitteelle sekä jätevesilietesekoitteelle, jonka joukkoon oli lisätty erilliskerättyä biojätettä. Mädätys tehtiin 1 l lasipulloissa, jotka tyytettiin ennen kokeen aloitusta. Jätteen lisäksi pulloihin lisättiin ultrapuhdasta vettä 200 ml. Kokeen aikana kerättiin 5 ml kaasunäytteitä noin 2 vuorokauden välein. Näytteiden keräys tapahtui ruiskulla silikonisen kannen läpi, jolloin se ei häirinnyt mädätysprosessia. Näytteistä mitattiin hiilidioksidin (CO<sub>2</sub>) ja metaanin (CH<sub>4</sub>) määrä kasvihuonekaasukromatografialla. Lisäksi koepulloissa oli kiinni 20 L pussit, joihin kerättiin kaikki kokeen aikana syntyvä kaasu. Kaasun kokonaisvolyymi mitattiin kokeen purun yhteydessä ja tulokseen lisättiin 5 ml kaasunäytteet. Mädätyskoe kesti 30 vuorokautta ja se tapahtui 35°C (kuva 1). Mädätyskokeen jälkeen lietesekoitteen mädätejäännökseen sekoitettiin tuhkaa ja tarkasteltiin tuhkan vaikutusta kaasuntuotantoon. Tuhka lisättiin suoraan koepulloon mädätyskokeen jälkeen ja sekoitettiin hyvin. Jotta, tuhka ja mädätetty liete saatiin tasaiseksi massaksi, lisättiin ultrapuhdasta vettä kuhunkin koepulloon. Pullot tyytettiin ja kaasunäytteet kerättiin samalla tavalla kuin mädätyskokeessa. Sen annettiin inkuboitua 7 vuorokautta. Inkubaatio tapahtui myös 35°C:ssa. Tuhkaa ei lisätty jätevesilietteen ja biojätteen mädätteeseen.



**Kuva 1.** Mädätyskokeen ja tuhkainkubaation koeasetelma. Ensimmäinen mädätyskoe tehtiin lietesekoitteelle ja aluksi koepulloja oli 20. Kokeen jälkeen mitattiin kaasun kokonaistuotanto ja pulloihin lisättiin tuhka. Kutakin tuhkakonsentraatiota kohden oli neljä rinnakkaisnäytettä (kuvassa “n=4”). Kontrollina toimi mädätejäännös ilman tuhkalisäystä.

Lietesekoitteen kokonaiskaasuntuotanto oli kuukauden aikana keskimäärin  $2,4 \pm 1,2$  l. Kuukauden inkuboinnin aikana mädätys lähti puutteellisesti käyntiin, sillä hiilidioksidin tuotanto oli koko ajan korkeampaa kuin metaanin tuotanto. Hiilidioksidin tuotanto oli suurinta noin 15 vuorokauden jälkeen kokeen aloittamisesta, jonka jälkeen sen tuotanto alkoi kääntyä laskuun (kuva 2). Metaanin tuotanto nousi tasaisesti kokeen loppuun asti. Mädätys on herkkä prosessi ja hyvin pienikin määrä happea voi haitata sen toimintaa. Koeasetelmaa on käytetty aikaisemmin onnistuneesti. Yksittäisten pullojen välillä oli eroja kaasun tuotannossa. Tämä johtuu materiaalin heterogeenisyydestä, jonka takia jokaisessa pullossa oli hiukan omanlaisensa mikrobiyhteisö.

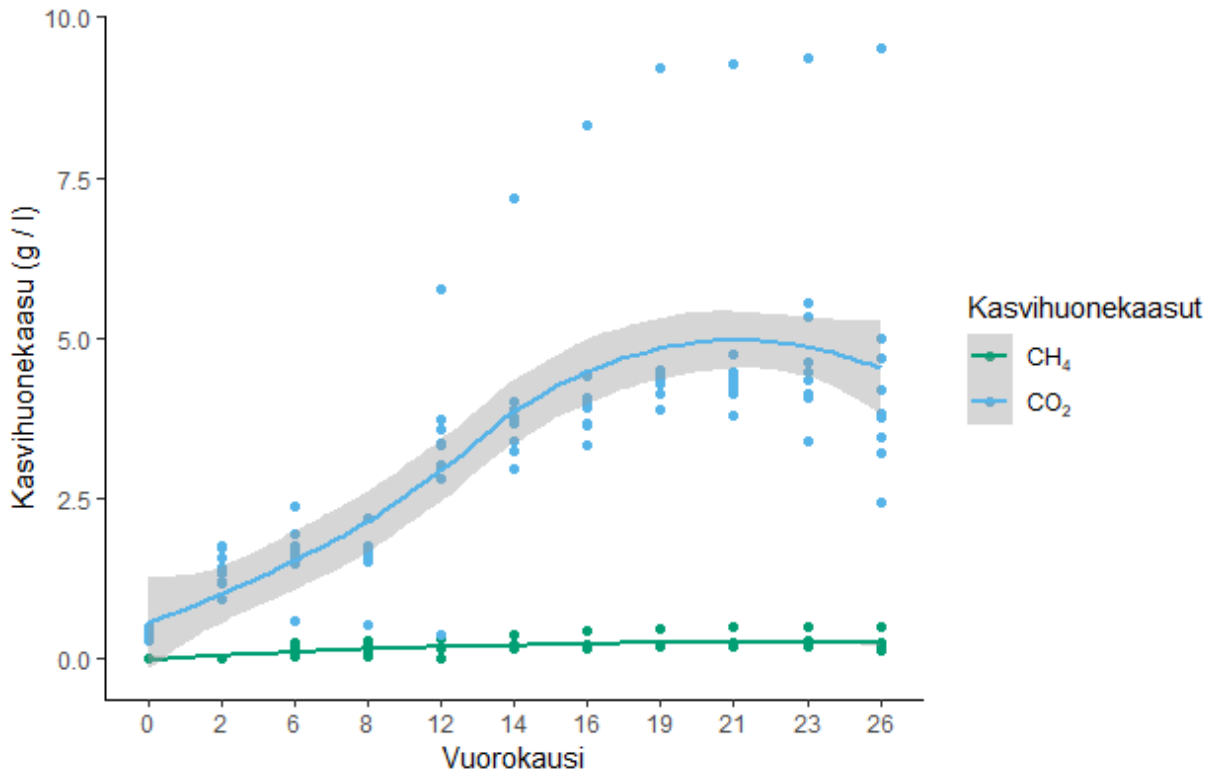




**Kuva 2.** Biokaasun koostumus jätevesiliettesekoituksen mesofiilisessa mädätyksessä (35 ° C) 30 vuorokauden aikana (n=20). Kuvan viiva näyttää keskimääräisen kasvihuonekaasujen määrän. Kuvassa näkyy myös hajonta rinnakkaisnäytteiden välillä (pisteet).

Mädätejäännökseen lisättiin tuhkaa. Tuhkan lisäyksen jälkeen kaasun tuotanto oli  $0,7 \pm 0,3$  l (7 vrk). Erilaiset tuhkakonsentraatiot eivät tehneet merkittävää eroa kaasuntuotantoon käsittelyiden välillä ("vaihe 2", kuvassa 1). Erot kaasuntuotannossa olivat yksittäisten pullojen välillä suurempia kuin eri tuhkakäsittelyiden välillä.

Biojätteen lisäys jätevesilietteeseen ei myöskään lisännyt kaasun tuotantoa. Tässä toisessa mädätyskokeessa kaasun kokonaistuotanto oli  $0,6 \pm 0,3$  l (26 vrk). Määrä oli siis huomattavan alhainen, mikä kielii, ettei mädätysprosessi ole lähtenyt oikealla tavalla käyntiin. Tämä näkyy myös kaasujen sisällössä, sillä metaanin tuotanto ei juurikaan noussut koko kuukauden kokeen aikana (kuva 3). Suurin selittävä tekijä mädätyksen epäonnistumiselle biojättekokeessa oli jätteen happamuus. Jätteen pH oli 5,4 kokeen lopussa. Han ym. (2019) havaitsivat tutkimuksessaan, että pH 5,5 ja sitä happammat olosuhteet rajoittavat metanogeenisten bakteerien toimintaa. Heidän mukaansa tämä onkin yleisin syy jätevesilietteen mädätyksen epäonnistumiselle.

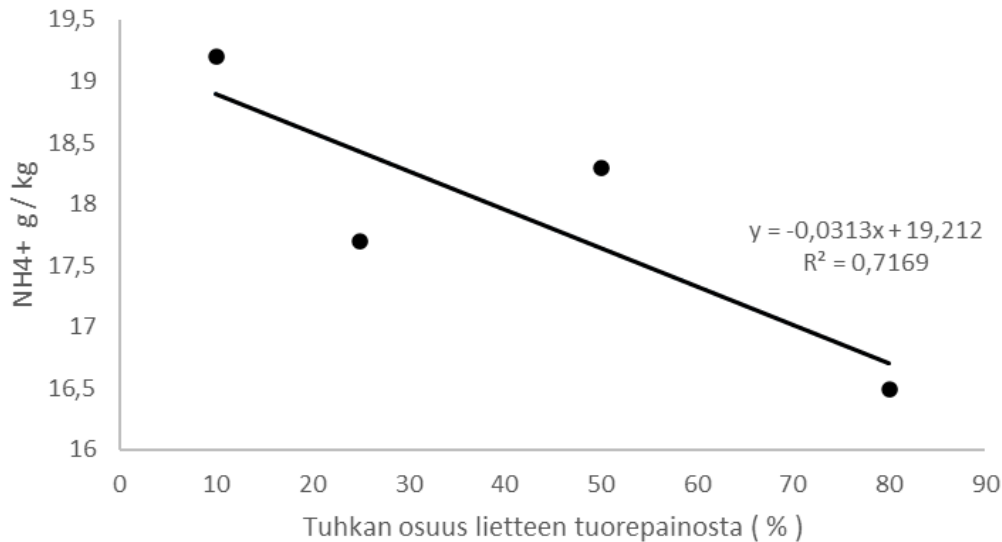


**Kuva.3** Biokaasun koostumus jätevesiliete sekoituksen ja biojätteen mesofiilisessa mädätyksessä (35 ° C) 26 vuorokauden aikana (n=9). Kuvassa näkyy kasvihuonekaasujen keskimääräinen määrä sekä hajonta.

## 6 Ammoniumin määrä lietesekoitteen tuhkalla käsitellyssä mädätejäännöksessä

Liuenneen tyyppi eli ammoniumionien ( $\text{NH}_4^+$ ) määrä mitattiin lietesekoitteen mädätejäännöksestä sekä mädätejäännöksestä johon oli sekoitettu tuhkaa. Mittaukseen käytettiin UV-vis-spektroskopiaa (650 nm). Standardiliuokset ja näytteisiin sekoitettavat liuokset valmistettiin Zaffaron ym. (2020) kuvaamalla tavalla juuri ennen mittausta. Mädätejäännös, johon sekoitettiin tuhkaa, kestävästi lisäämällä 4 M rikkihappoa ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Happoa lisättiin, kunnes näytteen pH oli 2–4. Kestävänti ei vaikuttanut ammoniumionien mittaukseen.

Mädätejäännöksessä oli ammoniumioneja keskimäärin  $21,6 \pm 8,9$  g/kg (n=20). Tuhkan lisäys muutti ammoniumionien määrää näytteissä (kuva 4). Emäksinen tuhka muuttaa näytteiden tyyppiä ammoniakiksi ( $\text{NH}_3$ ), jolloin liuenneen tyyppi määrä vähenee. Kun näytteiden pH oli 10,7 (50 % tuhkaa) ammoniumionin määrä oli 18,3 g/kg.



**Kuva 4.** Ammoniumionien määrän muutos jätevesilietteen mädätejäännöksessä (keskiarvo, n=4), joka on käsitelty eri määrillä tuhkaa. Tuhka muuttaa jätteen pH:ta. 10 % tuhkaa on pH 8,7, 25 % on pH 9,2, 50 % on pH 10 ja 80 % on pH 10,7.

## 7 Taudinaiheuttajat

### 7.1 Bakteeriyhteisöanalyysi

Näytteiden taudinaiheuttajat analysoitiin 16S rRNA -analyysillä. Näytteet otettiin ennen tuhkan lisäystä mädätejäännökseen ja mädätejäännöksestä, joka oli käsitelty tuhkalla. Saaduista tuloksista etsittiin mahdolliset taudinaiheuttajat. Taudinaiheuttajia arvioitiin sukutasolla sekä lajitasolla. Esimerkiksi *Clostridium* -sukuun kuuluu useita taudinaiheuttajia, mutta myös laaja kirjo harmittomia bakteereita. Taudinaiheuttajat onkin valittu siten, että myös normaalit suolistobakteerit, jotka voivat aiheuttaa terveysongelmia otollisissa olosuhteissa, on otettu mukaan. RNA-analyysin avulla saatiin selville jätteen eri taudinaiheuttajien lajikirjon lisäksi niiden suhteellinen osuus kaikesta geneettisestä materiaalista. Tällaisten sukujen suhteellinen osuus kaikesta geneettisestä materiaalista oli kokonaisuudessaan todella alhainen (taulukko 5). Niiden osuus oli korkeimmillaankin vain 1,7 % (*Bacillus*). Havaitut suvut, joita löytyi kaikista näytteistä vain alle 0,01 % on poistettu tuloksista. Tuhkan lisäys näytti joidenkin sukujen kohdalla lisäävän niiden mahdollisuuksia kasvaa. Tämä voi johtua esimerkiksi kilpailun vähentymisestä, tuhkan rajoittaessa taas toisten bakteerisukujen kasvua.

**Taulukko 5.** 16S rRNA- analyysin tulokset jätevesilietesekoitteesta ennen mädätystä (taulukossa: "alku"), mädätejäännöksestä (taulukossa "MJ") ja mädätejäännöksestä johon sekoitettiin eri määrät tuhkaa, suhteessa jätteen tuorepainoon. Taulukossa on bakteerisuvut, joihin kuuluu taudinaiheuttajia ja löydettyjen bakteerien suhteellinen osuus kaikesta geneettisestä materiaalista.

Suku	OTU %					
	Alku	MJ	MJ + 10 % tuhkaa	MJ + 25 % tuhkaa	MJ + 50 % tuhka	MJ + 80 % tuhkaa
<i>Bacillus</i>	0	0,17	0,34	0,15	1,67	1,47
<i>Bacteroides</i>	1,14	0,23	0,16	0,19	0,38	0,48
<i>Chryseobacterium</i>	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>Citrobacter</i>	0,03	0,05	<0,01	0	<0,01	<0,01
<i>Clostridium</i>	0,13	0,61	0,6	0,99	1,84	0,66
<i>Coxiella</i>	<0,01	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03
<i>Enterococcus</i>	0,18	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>Erysipelothrix</i>	0,12	0,02	0,02	0,03	0,02	0,05
<i>E.Shigella</i>	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>Legionella</i>	0,01	0,03	0,02	0,04	0,03	0,06
<i>Mycobacterium</i>	0,03	0,06	0,07	0,06	0,06	0,05
<i>Pseudomonas</i>	0	0,07	<0,01	0	0	0
<i>Ruminococcus</i>	0,21	0,03	0,01	0,02	0,01	0,02
<i>Streptococcus</i>	0,03	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>Yersinia</i>	0,08	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01

Myös lajitasolla tarkasteltuna taudinaiheuttajien suhteellinen osuus kaikesta geneettisestä materiaalista oli vähäinen (taulukko 6). Suhteellinen osuus antaa osviittaa patogeenien määrästä, mutta ei kuitenkaan suoraan kerro onko niitä paljon tai vähän. Tuhkan lisäyksellä ei ollut juurikaan vaikutusta taudinaiheuttajien osuuksiin. Tähänkin voi vaikuttaa näytteen heterogeenisyys, sekä se, että taudinaiheuttajien määrä oli ylipäätään hyvin alhainen. Miltein kaikkia lajilleen tunnistettuja taudinaiheuttajia oli alle 0,01 % geneettisestä materiaalista. *Pseudomonas aeruginosa*, *Chryseobacterium hominis* ja *Escherichia coli* vähentyivät tuhkan lisäyksen johdosta.

**Taulukko 6.** 16S rRNA- analyysin tulokset jätevesilietesekoitteesta ennen mädätystä (taulukossa: "alku"), mädätejäännöksestä (taulukossa "MJ") ja mädätejäännöksestä johon sekoitettiin eri määrät tuhkaa, suhteessa jätteen tuorepainoon. Taulukossa on bakteerisuvut, joihin kuuluu taudinaiheuttajia ja löydettyjen bakteerien suhteellinen osuus kaikesta geneettisestä materiaalista. *E.coli* on korostettu, sillä sitä käytetään lainsäädännössä indikaattorilajina. Lyhentämättömät nimet on listattu liitteeseen 1. Taulukkoon 1.

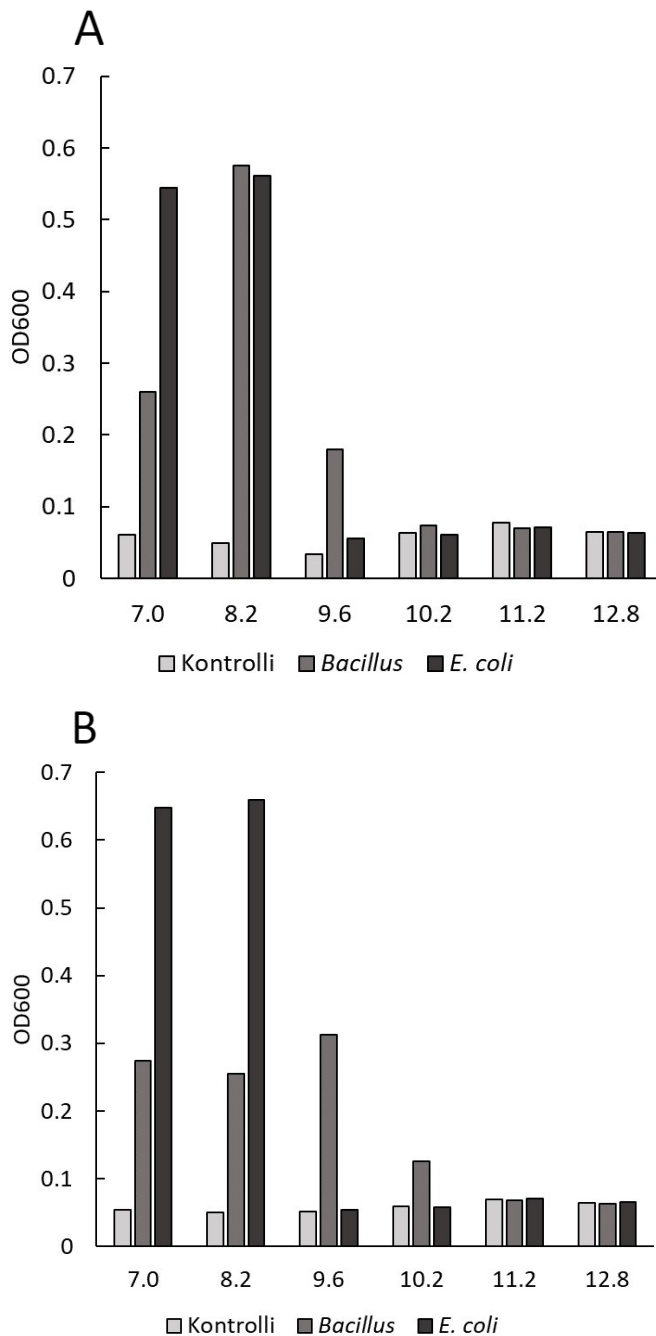
Laji	OTU %					
	Alku	MJ	MJ + 10 % tuhkaa	MJ + 25 % tuhkaa	MJ + 50 % tuhkaa	MJ + 80 % tuhkaa
<i>P. aeruginosa</i>	0	0,07	<0,01	0	0	0
<i>C. hominis</i>	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<b><i>E. coli</i></b>	<b>0,02</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>
<i>P. yeei</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>B. ovatus</i>	<0,01	<0,01	0	<0,01	<0,01	<0,01
<i>N. aromaticivorans</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>G. balaenopterae</i>	0,01	<0,01	<0,01	0	<0,01	0
<i>B. thetaiotaomicron</i>	0,01	0	0	<0,01	0	<0,01
<i>E. faecalis</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>B. cereus</i>	0	0,02	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>C. paraputrificum</i>	0	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>C. difficile</i>	0	0	0	0	<0,01	0
<i>C. Legionella jeonii</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>B. ovatus</i>	<0,01	<0,01	0	0	<0,01	0
<i>C.sartagoforme</i>	0	0	0	<0,01	<0,01	<0,01
<i>B. cohnii</i>	0	0	0	0	<0,01	<0,01
<i>A. johnsonii</i>	<0,01	0	<0,01	0	<0,01	0
<i>D. nishinomiyaensis</i>	0	0	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>S. mutans</i>	0	<0,01	0	<0,01	0	0
<i>E. cloacae</i>	0	<0,01	<0,01	0	<0,01	0
<i>P. citronellolis</i>	0	<0,01	0	0	0	0

## 7.2 pH:n vaikutus taudinaiheuttajien kasvuun

*Escherichia coli* ja *Bacillus* sp. bakteereja kasvatettiin puhdasviljelmistä Luria Broth-agarmaljoilla, joiden pH:ta säädettiin natriumhydroksidilla (NaOH) vastaamaan tuhkan aiheuttamaa pH:n muutosta lietesekoitteessa. Nämä bakteerit valittiin, sillä *E.coli* toimii lannoitevamistusasetuksessa (nro 24 /11) indikaattorilajina ja *Bacillus*-sukuun kuuluu useita

taudinaiheuttajia. Lisäksi *Bacillus* pärjää hyvin monenlaisissa kasvuolosuhteissa. Bakteritiheys mitattiin spektrofotometrisesti 600 nm aallonpituudella 24 tunnin ja 48 tunnin inkuboinnin jälkeen.

Havaittiin, että sekä *Bacillus sp.* että *E.coli* kasvavat neutraalin pH:n lisäksi pH:ssa 8.2 (kuva 5 a ja b). *Bacillus* -bakteerilla kasvua havaittiin 48 h jälkeen myös pH:ssa 9.6 ja 10.2. *E.coli* vaikuttaisikin siis olevan herkempi kasvualustan emäksisyydelle, ja siten myös tuhkan lisäykselle, kuin *Bacillus sp.*



**Kuva 5.** A) *E.coli* ja *Bacillus sp.* -bakteereiden pesäkkeiden tiheyden muutokset 24 tunnin jälkeen. B) pesäkkeiden tiheyden muutokset 48 tunnin jälkeen.

### 7.3 Tuhkan vaikutus koliformisiin taudinaiheuttajiin

Koliformisten bakteerien määrää näytteissä ja tuhkan vaikutusta niihin tutkittiin viljelemällä bakteereita jätevesilietesekoitteesta, jossa oli mukana erilliskerätty biojäte. Näytteisiin sekoitettiin myös tuhkaa, jotta voitiin tarkastella tuhkan vaikutusta taudinaiheuttajien kasvuun. Näytettä punnittiin 25 g kuhunkin pulloon ja tuhkan osuus suhteutettiin tuorepainoon. Pulloihin lisättiin ultrapuhdasta vettä, niin, että kaikkien pullojen koostumus oli samanlainen. Pullot laitettiin inkuboitumaan 35 °C 7 vuorokaudeksi.

Viljelyyn käytettiin Coliform ChromoSelect –agareita (Sigma-Aldrich). Ne toimivat selektiivisena kasvualustana vain koliformisille bakteereille ja eri bakteerit esiintyivät niillä tunnistamista helpottavina värillisinä pesäkkeinä. Näytteet laimennettiin ennen maljausta Woods Hole mediumilla, joka on steriiliä. Maljat inkuboituivat 37 °C ja pesäkkeet laskettiin 24 tunnin jälkeen.

Vaaleanpunaiset pesäkkeet olivat *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ja *Klebsiella pneumoniae*. Ne luetaan patogeeneisiin bakteereihin, vaikka ne ovat myös osa normaalia suolistofaunaa. 25 % tuhkaa (pH 9,6) näytti lisäävän juuri näiden bakteerien kasvua (taulukko 7). Lievästi emäksinen ympäristö näyttäisi siis tämän kokeen perusteella sopivan näille lajeille, mutta kun tuhkan määrä oli 50 % jätteen tuorepainosta (pH 10,7) ne eivät enää kasvaneet. Myös alustavissa kokeissa havaittiin, että yli 10 pH vähentää kaikkien bakteerien kasvua merkittävästi.

**Taulukko 7.** Koliformisen sekaviljelmän *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ja *Klebsiella pneumoniae* pesäkkeitä muodostavat yksiköt grammassa lietettä ja biojätettä.

Näyte	pmy / g
Jätevesiliete ja biojäte	780
Jätevesiliete ja biojäte + 10 % tuhkaa	120
Jätevesiliete ja biojäte + 25 % tuhkaa	1920
Jätevesiliete ja biojäte + 50 % tuhkaa	0

*E.coli* esiintyi kasvualustalla tummansinisinä pesäkkeinä. Lannoitevalmisteasetuksessa nro 24/11 määritellään taudinaiheuttajien suhteen seuraavasti: "Ei todettavissa 25 grammassa näytettä (*salmonella*), *Escherichia coli* 1000 pmy/g ja alle 100 pmy/g ammattimaiseen kasvihuoneviljelyyn tarkoitetuissa kasvualustoissa, joissa syötävät kasvinosat ovat suoraan kosketuksissa kasvualustaan".

*E.coli* -pesäkkeitä muodostavia yksiköitä oli alle tämän raja-arvon, kun jätteeseen sekoitettiin 25 % tuhkaa (pH 9,6) eikä yhtään pesäkettä havaittu, kun jätteeseen sekoitettiin 50 % tuhkaa (pH 10,7)(Taulukko 8).

**Taulukko 8.** Koliformisen sekaviljelmän *E.coli* -pesäkkeitä muodostavat yksiköt grammassa lietettä ja biojätettä.

Näyte	pmy /g
Jätevesiliete ja biojäte	1080
Jätevesiliete ja biojäte + 10 % tuhkaa	1170
Jätevesiliete ja biojäte + 25 % tuhkaa	780
Jätevesiliete ja biojäte + 50 % tuhkaa	0

## 8 Mikromuovin (> 2 mm) määrä näytteissä

Suuret mikromuovit laskettiin Mäntyselän ja Rukan jätevesilietteestä erikseen, sekä jätevesilietteen sekoitteesta, johon oli edellä mainittujen lisäksi sekoitettu Kuusamon juuston jätevesilietettä. 25 g näytettä käsiteltiin vetyperoksidilla (30 %) yön yli ja näyte siivilöitiin 2 mm silmäkoon metallisiivilällä. Siivilään jäänyt aines tarkasteltiin valomikroskoopin alla ja kaikki mahdollisesti muoviset partikkelit otettiin sivuun jatkotarkastelua varten. Ne todennettiin muoviksi Raman-spektroskopiolla, jolla tarkastellaan materiaalin funktionaalisia ryhmiä, jotka näkyvät laitteen piirtämässä spektrissä uniikin Raman-sirontansa ansiosta. Tunnistus perustui laitteen kirjastoon sekä spektrin tarkasteluun. Tunnistetut muovipartikkelit punnittiin.

Kaikissa näytteissä oli muovia alle lainsäädännön määrittämän raja-arvon (0,5 % tuorepainossa). Taulukossa 9 esitetään > 2 mm kokoisten muovipartikkeleiden määrä kappalemääränä, niiden paino sekä niiden osuus lietteen tuorepainoon nähden. Kokonaisuudessaan partikkeleita oli vähän, vain 29 partikkelia, joista 21 löytyi Rukan jätevesilietteestä. Yleisin löydetty muovilaatu oli eteenivinyylisetaatti (EVA), jota oli yhteensä 15 partikkelia. Muut löydetyt muovilaadut olivat polyvinyylisetaatti (PVA), polypropeeni (PP) ja polyakryyliamidi (PAM).

**Taulukko 9.** Eri jätevesilietteiden keskimääräinen mikromuovipartikkelien määrä (>2 mm) 25 g näytettä sekä niiden painon keskiarvo ja osuus tuorepainoa kohden.

Näyte	kpl	g	% / g
Mäntyselkä	2	0,001	0,004
Ruka	7	0,001	0,006
Lietesekoite	3	0,003	0,01



## 9 Johtopäätökset

Tutkimuksessa tarkasteltiin eri lähteistä kerätyn jätevesilietteen sekä siihen sekoitetun erilliskerätyn biojätteen soveltuvuutta kierrätyslannoitteen raaka-aineeksi. Tutkimuksessa keskityttiin kartoittamaan, kuinka tuhka soveltuu raaka-aineen kemialliseen hygienisointiin. Tuhkan hygienisoiva vaikutus perustuu materiaalin happamuuden säätämiseen emäksisemmäksi. Lannoitevalmisteasetuksen (nro 11/24) indikaattorilaji *Escherichia coli* -bakteerin pesäkkeiden määrä oli alle lainsäädännön asettaman raja-arvon, kun tuhkaa oli 25 % lietteen tuorepainosta (pH 9,6). Vaikka *E. coli* -bakteerin kasvu voi hidastua jo pH:ssa 9,6, muut bakteerit voivat olla sinnikkäämpiä. Tutkimuksen tärkein havainto olikin, että 50 % tuhkaa jätevesiliettesekoitteen tuorepainosta (pH 10,7) rajoittaa useimpien taudinaiheuttajien kasvua.

## Kirjallisuus

Han, W., He, P., Lin, Y., Shao, L., & Lü, F. 2019. A methanogenic consortium was active and exhibited long-term survival in an extremely acidified thermophilic bioreactor. *Frontiers in microbiology*, 10, 2757. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02757>

International Organization for Standardization. 1994. Soil quality – Determination of pH. ISO Standard No. 10390:1994E. Saatavilla osoitteessa: <https://www.iso.org/standard/18454.html>

Maa- ja metsätalousministeriö. 2011. Asetus nro 24/11 lannoitevalmisteista. Saatavilla osoitteessa: <https://www.finlex.fi/fi/viranomaiset/normi/400001/37638>

Zaffaroni, R., Ripepi, D., Middelkoop, J., & Mulder, F. M. 2020. Gas Chromatographic Method for *In Situ* Ammonia Quantification at Parts per Billion Levels. Supporting info. *ACS Energy Letters*, 5(12), 3773-3777. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsenergylett.0c02219>

## Liite 1 Taudinaiheuttajien nimet

Raportin taulukossa 6 esitettyjen taudinaiheuttajien nimet ilman lyhennystä (taulukko 1). Taulukon bakteerit olivat lajilleen tunnistetut taudinaiheuttajat 16S rRNA-analyysissä jätevesilietesekoitteesta.

**Taulukko 1.** Jätevesilietesekoitteesta lajilleen tunnistettujen taudinaiheuttajien nimet lyhennettynä sekä kokonaisuudessaan.

<b>Lyhenne</b>	<b>Koko nimi</b>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>C. hominis</i>	<i>Chryseobacterium hominis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. yeei</i>	<i>Paracoccus yeei</i>
<i>B. ovatus</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>
<i>N. aromaticivorans</i>	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i>
<i>G. balaenopterae</i>	<i>Granulicatella balaenopterae</i>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>C. paraputrificum</i>	<i>Clostridium paraputrificum</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
<i>C. Legionella jeonii</i>	<i>Candidatus Legionella jeonii</i>
<i>B. ovatus</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>
<i>C.sartagoforme</i>	<i>Clostridium sartagoforme</i>
<i>B. cohnii</i>	<i>Bacillus cohnii</i>
<i>A. johnsonii</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
<i>D. nishinomiyaensis</i>	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>P. citronellolis</i>	<i>Pseudomonas citronellolis</i>

