

**YHDISTETYSSÄ BIOETANOLI- JA BIOKAASUTUOTANNOSSA
SYNTYVÄN MÄDÄTYSJÄÄNNÖKSEN PROSESSOIMINEN
LANNOITETUOTTEIKSI**

Mädätysjäännöksen pH-säädön vaikutus *Escherichia coli* -bakteeriin ja lannoitetuotteiden typpipitoisuuteen



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Visamäki, Bio- ja elintarviketekniikka

Syksy, 2018

Santtu Onikki

Bio- ja elintarviketekniikka
Visamäki

Tekijä	Santtu Onikki	Vuosi 2018
Työn nimi	Yhdistetyssä bioetanoli- ja biokaasutuotannossa syntyvän mädätysjäännöksen prosessoiminen lannoitetuotteiksi – Mädätysjäännöksen pH-säädön vaikutus <i>Escherichia coli</i> -bakteeriin ja lannoitetuotteiden typpipitoisuuteen	
Työn ohjaaja	Helena Kautola	

TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyössä selvitettiin biokaasureaktorin mädätysjäännöksen pH-säädön vaikutuksia *Escherichia coli* -bakteeriin ja lannoitetuotteiden – konsentroitujen reaktiivien ja kiinteä maanparannusaine – typpipitoisuuteen. Työn toimeksiantaja oli St1 Renewable Energy Oy:n Hämeenlinnan tuotantolaitos. Työn tarkoituksena oli selvittää, soveltuuko natriumhydroksidilla toteutettu pH-säätö sellaiseksi ratkaisuksi, joka takaisi prosessihygienian pysymisen lannoitevalmisteasetuksessa määritetyllä tasolla.

Menetelmän soveltuvuuden selvittämiseksi laitoksen biokaasureaktorin mädätysjäännöksestä otettiin kesän 2018 aikana kaksi näyte-erää. Näytteiden pH:t säädettiin kirjallisuuden perusteella päätetyille tasoille. Tämän jälkeen näytteet ympättiin laskennallisella määrällä laitokselta eristettyä *E. coli* -kantaan tavoitteena 1 000 pmy ml⁻¹ lähtötaso. Näytteille tehtiin mikrobiologiset määritykset. Toisen näyte-erän yhteydessä määritettiin myös ympin *E. coli* -pitoisuus. Lisäksi määritettiin pH-säädetyin ja -säättämättömän näytteen kokonais- ja ammoniumtyppipitoisuus.

Vaikka pH-säädöllä vaikutti olevan *E. coli* kasvuun inhiboivia vaikutuksia, voitiin todeta, että menetelmää ei bakteerin sopeutumiskyvyn vuoksi voida suositella käytettäväksi. pH-säädön vaikutuksista lannoitetuotteiden typpipitoisuuksiin ei voitu tehdä suoranaista johtopäätöksiä, koska analyysimenetelmät poikkesivat teollisuuden prosesseista varsin paljon.

Avainsanat Lannoite, reaktiivien, *Escherichia coli*, typpi, laadunvalvonta

Sivut 49 sivua

Degree Programme in Biotechnology and Food Engineering
Visamäki

Author	Santtu Onikki	Year 2018
Subject	Processing the Digestate of a Combined Bioethanol and Biogas Production Plant into Fertilizer Products – How Adjusting the Digestate pH Affects <i>Escherichia coli</i> and Nitrogen Concentration of Fertilizer Products	
Supervisor	Helena Kautola	

ABSTRACT

The thesis was commissioned by St1 Renewable Energy Ltd production plant in Hämeenlinna and the purpose was to examine how adjusting the pH of the biogas-digestate affects the *Escherichia coli* and nitrogen concentration of both reject water and soil conditioner. Furthermore, the aim was to find out whether the pH adjustment could guarantee the fulfillment of the production hygiene regulations.

To examine the effects of the pH adjustment, two sets of microbiological samples were gathered and analyzed in the summer of 2018. The pH of the samples was adjusted to several different levels using sodium hydroxide and the samples were contaminated with *E. coli* in order to reach a bacterial concentration of 1000 CFU ml⁻¹ to start with. The samples were analyzed microbiologically and with the second set of samples, the concentration of *E. coli* used to contaminate the samples, was analyzed, too. In addition, the N_{tot} and NH₄-N concentrations were examined.

In conclusion, even though the pH-adjustment seemed to inhibit the growth of *E. coli*, the method cannot be considered suitable for eliminating *E. coli* from the process, because of the capability of the bacteria to adapt to many different levels of pH. In addition, conclusions could not be drawn from the effects of the pH adjustment into the nitrogen concentrations of the fertilizer products, because the methods used in this thesis differ from the ones used in the industry processes.

Keywords Fertilizer, reject water fertilizer, *Escherichia coli*, nitrogen, quality control

Pages 49 pages

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	ANAEROBINEN HAJOAMISPROSESSI	3
2.1	Päävaiheet.....	3
2.2	Prosessiolosuhteet	4
3	MÄDÄTYSJÄÄNNÖKSEN KÄSITTELY JA HYÖDYNTÄMINEN.....	7
4	HYGIENIA JA HAITTA-AINEET	9
4.1	Taudinaiheuttajat	10
4.2	Orgaaniset haitta-aineet ja lääkeaineet.....	12
5	YMPÄRISTÖOLOSUHTEIDEN VAIKUTUS MIKROBIEN ELINKYKYYN.....	13
6	LAINSÄÄDÄNTÖ JA ASETUKSET	17
7	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	20
7.1	Näytteenotto.....	20
7.2	pH-säätö	20
7.3	Mikrobiologiset analyysit	21
7.4	Sentrifugointi, haihdutus ja Kjeldahl-menetelmä	21
8	TYÖN TOTEUTUS – ENSIMMÄINEN KOE.....	22
8.1	Titrauskoe.....	22
8.2	Mikrobiologiset määritykset	23
8.2.1	pH-säätö ja <i>E. coli</i> -ymppäys.....	23
8.2.2	<i>E. coli</i> -pitoisuuden määrittäminen	25
8.2.3	Kuiva-aineen ja orgaanisen kuiva-aineen määrittäminen.....	26
8.3	Dekantterilingon ja MVR:n simulointi.....	27
8.3.1	Sentrifugointi ja haihdutus	27
8.3.2	Typipitoisuuden määrittäminen.....	31
9	TYÖN TOTEUTUS – TOINEN KOE.....	32
10	TULOKSET	34
10.1	pH-säädön vaikutus <i>E. coliin</i>	34
10.1.1	Ensimmäinen koe – pintaviljelytekniikka	34
10.1.2	Toinen koe – maljavalutekniikka	36
10.2	Konsentroidun rejektiveden ja kiinteän maanparannusaineen typipitoisuus	39
11	TULOSTEN TARKASTELU, POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET	42
	LÄHTEET	44

1 JOHDANTO

Uusiutuvien energianlähteiden tutkimuksella ja kehittämisellä sekä uusiutuvan energian tuotantomenetelmien jalostamisella tähdätään kotitalouksien ja teollisuuden hiilidioksidipäästöjen sekä jätteiden syntymisen vähentämiseen. Eräs lähestymistapa tähän on kiertotalousajattelu: toisen jäte on toisen raaka-aine. Tätä lähestymistapaa hyödyntää St1 Renewable Energy Oy, joka on tämän opinnäytetyön toimeksiantaja. Yhtiön visiona on olla johtava CO₂-hyvän energian valmistaja ja myyjä.

St1 Renewable Energyn tuotantokonseptit voidaan jakaa kolmeen kategoriaan: pääsääntöisesti juoma- ja leipomoteollisuuden sivuvirtoja hyödyntävään Etanolixiin, erilliskerättyjä kotitalouksien ja teollisuuden biojätteitä hyödyntävään Bionolixiin sekä sahanpurua, jätepuuta ja muuta lignoselluloosaa sisältäviä jätelajeita hyödyntävään Cellunolixiin. Tässä opinnäytetyössä keskitytään Hämeenlinnassa, Karanojan jätteidenkäsittelyalueella, sijaitsevaan Bionolix-laitokseen, jossa tuotannon lopputuotteina ovat bioetanoli ja biokaasu sekä kaasuntuotannon sivuvirtoina syntyvät lannoitevalmisteet: konsentroidu reaktivesi eli nestemäinen lannoite ja mädäte eli kiinteä maanparannusaine.

Opinnäytetyön taustalla oli laitoksen biokaasureaktorin poisteen, eli mädätysjäännöksen, jatkokäsittelyssä – toisin sanoen lannoitteeksi ja maanparannusaineeksi prosessoimisessa – ilmenneet ongelmat, joiden vuoksi tuotteiden Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen (24/11) mukainen *Escherichia coli* -pitoisuus on paikoitellen ylittänyt sallitut raja-arvot. Opinnäytetyön aihe on ajankohtainen ja ongelma halutaan ratkaista kestävästi mahdollisimman pian, sillä raja-arvojen ylittäminen on johtanut sekä kasvaneisiin tuotantokustannuksiin – muun muassa henkilöstökulujen ja lannoite-erien takaisinvetojen muodossa – että tuotannon keskeytymisistä johtuvaan tuotantokapasiteetin huononemiseen.

Opinnäytetyössä tarkasteltiin pH-säädön vaikutuksia *E. coliin* sekä konsentroidun reaktiveden ja kiinteän maanparannusaineen typpipitoisuuteen. Tutkimuskysymyksinä olivat seuraavat:

- Voidaanko *E. coli* kasvu inhiboida säätämällä mädätysreaktorin poisteen pH:ta emäksisempään suuntaan?
- Kuinka emäksiset olosuhteet ja kuinka pitkä viipymäaika tarvitaan *E. coli* inhiboimiseksi?
- Mikä on pH-säädetyistä mädätysreaktorin poisteesta prosessoitujen lannoitetuotteiden typpipitoisuus verrattuna pH-säätämättömästä poisteesta prosessoitujen lannoitetuotteiden typpipitoisuuteen?

Työssä koottiin kirjallisuuskatsauksen muodossa mädätysprosessin ja mädätysjäätännöksen käsittelyn teoriataustaa sekä lopputuotteiden lannoitekäyttöön liittyviä riskejä ja lainsäädäntöä siten, että lukija saa selkeän kokonaiskuvan biokaasutuotannon perusteista ja prosessiin vaikuttavista olosuhteista. Lisäksi työssä syvennettiin, tutkimuskysymysten mukaisesti, koliformisten bakteerien mikrobiologisia ominaisuuksia ja pH-säädön vaikutuksia tutkiviin julkaisuihin.

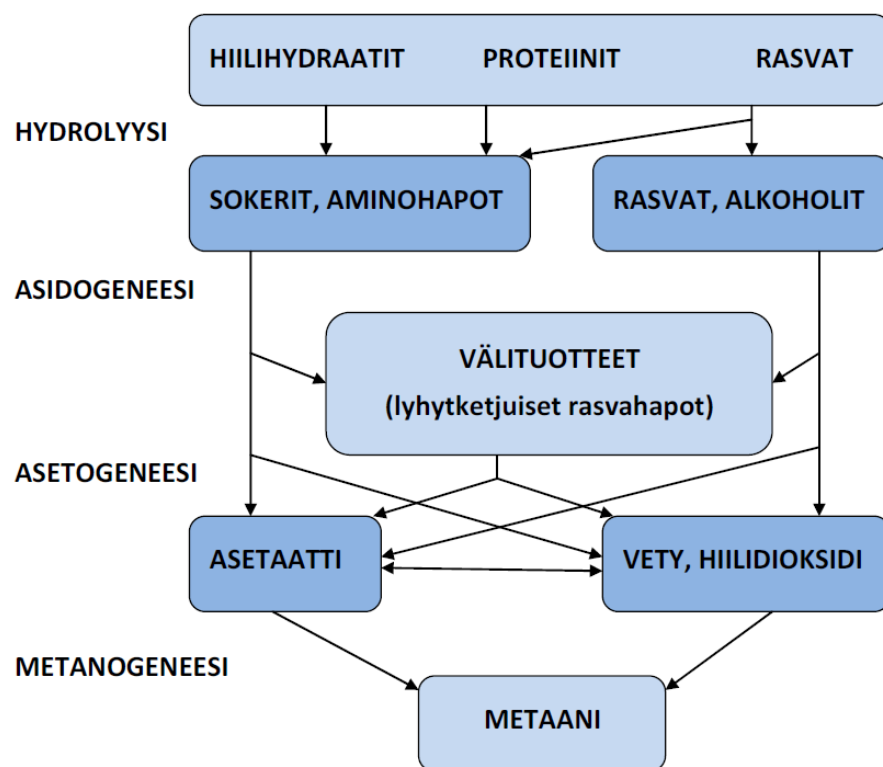
Työn tavoitteena oli tuottaa informaatiota pH-säädön vaikutuksista *E. coliin* ja lannoitetuotteiden typpipitoisuuteen. Työn valmistuttua toimeksiantajayrityksellä on käytössään koottua tietoa Hämeenlinnan tuotantolaitoksen prosessimuutosten suunnittelun tueksi.

2 ANAEROBINEN HAJOAMISPROSESSI

Anaerobisessa hajoamisprosessissa biokaasureaktorin syötteet hajoavat hapettomissa olosuhteissa. Hajoamisprosessin tuotteena on metaanista (CH_4) ja hiilidioksidista (CO_2) muodostuva biokaasu. Prosessissa hajomatonta ainesta nimitetään mädätysjäännökseksi, joka prosessoidaan usein neste- ja kuivajakeeksi. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 59, 99.)

2.1 Päävaiheet

Anaerobinen hajoamisprosessi (kuva 1) koostuu neljästä päävaiheesta, jotka ovat hydrolyysi, asido-, aseto- ja metanogeneesi. Jokaisessa päävaiheessa eri mikrobit saavat aikaan erilaisia biokemiallisia reaktioita. (Luorinen 2011, 5.)



Kuva 1. Anaerobinen hajoaminen (Luostarinen 2013, 10).

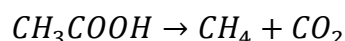
Hydrolyysissä tapahtuu suurien orgaanisten molekyylien, kuten hiilihydraattien, proteiinien ja rasvojen pilkkoutuminen yksinkertaisiksi, liukoisiksi yhdisteiksi. Hajottamisprosessin mahdollistamiseksi hydrolyyttisiksi bakteereiksi kutsutut mikrobit erittävät ulkopuolelleen hiilihydraatteja hajottavia amylaasientsyymejä, proteiineja hajottavia proteaaseja ja rasvoja hajottavia lipaaseja. Hajotusprosessien tuotteena syntyy sokereita ja aminohappoja sekä pitkäketjuisia rasvahappoja (LCFA, long chain fatty acids) ja glyserolia. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 61; Lehtomäki, Paavola,

(Luostarinen & Rintala 2007, 22.) Hydrolyysiä pyritään tehostamaan raaka-aineen esikäsittelyllä, kuten pilkkomisella tai jauhamisella. Tällöin hydrolysoitavien materiaalien entsyymien kanssa kosketuksissa oleva pinta-ala saadaan maksimoitua hydrolyysin tehostamiseksi. (Luostarinen 2013, 11.)

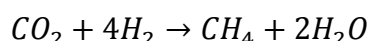
Asidogeneesissä, eli happokäymisessä, haponmuodostajamikrobit jatkavat ensimmäisen päävaiheen lopputuotteena syntyneiden yksinkertaisten sokereiden, aminohappojen sekä glyserolin ja alkoholien pilkkomista oman kasvunsa ja metaboliensa ravinnonlähteenä. Asidogeneesin lopputuotteina muodostuu erilaisia lyhytketjuisia, haihtuvia rasvahappoja (VFA, volatile fatty acids), kuten voihamppo, propionihappo ja valeriinihamppo. (Luostarinen 2013, 11.)

Asetogeneesissä haihtuvat rasvahapot hajoavat vetyä tuottavien bakteerien ansiosta asetaatiksi (etikkahappo) sekä vedyksi (H) ja hiilidioksidiksi. Asetogeneesissä tapahtuvat reaktiot ovat anaerobisia – asetogeeniset bakteerit toimivatkin symbioosissa vetyä kuluttavien metanogeenien kanssa. Tätä asetogeenien ja metanogeenien välistä yhteyttä kutsutaan syntrofiseksi yhteydeksi: vetyä siis kuluu ja muodostuu tasapainoisesti. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 62.)

Metanogeneesissä obliigaattianaerobit, eli hapellisessa elinympäristössä kuolevat metanogeenit, muodostavat metaania asetoklastisella (70 %) ja hydrogenotrofisella (30 %) metanogeneesillä. Asetoklastisesta metanogeneesistä vastaavat asetotrofiset metanogeenit pilkkovat asetaattia metaaniksi ja hiilidioksidiksi seuraavan reaktioyhtälön mukaisesti (Janhunen 2012, 19).



Hydrogenotrofiset metanogeenit, puolestaan, muuttavat hiilidioksidia ja vetyä metaaniksi ja vedeksi seuraavasti (Janhunen 2012, 19).



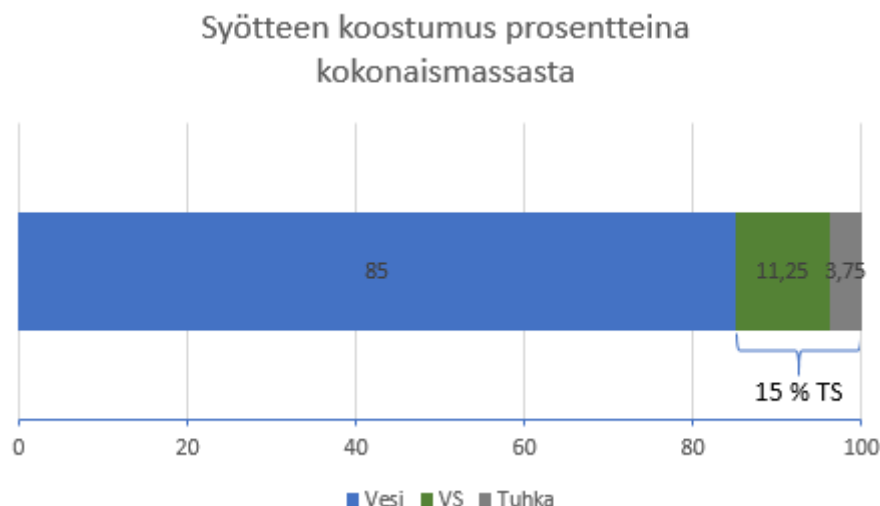
Asetotrofiset metanogeenit kahdentuvat hitaasti – kerran 2–12 vuorokaudessa. Tämä on otettava huomioon muun muassa jatkuvatoimisen biokaasureaktorin viipymäaika määritettäessä, sillä liian lyhyt viipymäaika saat-
taa johtaa asetotrofisten metanogeenien uloshuuttoutumiseen. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 62–63.)

2.2 Prosessiolosuhteet

Anaerobisen hajoamisprosessin tehokkuus ja tasapaino, toisin sanoen anaerobisten mikro-organismien kasvunopeus ja aktiivisuus, riippuu prosessiolosuhteista. Merkittävimmät mädätysprosessiin vaikuttavat tekijät ovat hapettomuuden lisäksi sopiva lämpötila ja pH. Prosessin ravitsemukselliset

olosuhteet määräytyvät syötteiden koostumuksen ja hajoamisen seurauksena. (Al Seadi ym. 2008, 23; Kymäläinen & Pakarinen 2015, 63.)

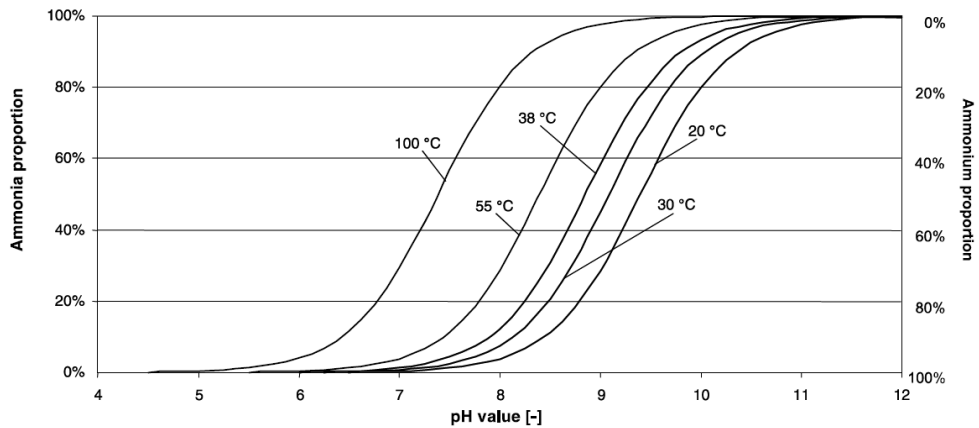
Mädätysprosessi voidaan toteuttaa, syötteen kuiva-ainepitoisuudesta riippuen, joko kuiva- tai märkäprosessina. Lisäksi prosessi voi olla jatkuvatoiminen tai panosluonteinen. Märkäprosessissa, joka on kuivaprosessia huomattavasti yleisempi biokaasuntuotantoprosessi Suomessa, reaktorin kokonaismassasta vähintään 85 % on vettä (kuva 2) ja loput kuiva-ainetta (TS). Kuiva-aineesta 75 % on orgaanista ainesta (VS) ja loput 25 % tuhkaa. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 23, 94; Luostarinen 2009.)



Kuva 2. Syötteen koostumus prosentteina kuiva-aineesta (mukailtu lähteestä Kymäläinen & Pakarinen 2015, 23, 94).

Biokaasuprosessien operointi tapahtuu useimmiten joko mesofiilisella (35–38 °C) tai termofiilisellä (n. 55 °C) lämpötila-alueella. Myös psykrofiilinen käsittely on mahdollista – tällöin prosessilämpötila on ≤ 20 °C. (Lehtomäki ym. 2007, 31.) Prosessilämpötilasta riippuen metabolisista reaktioista vastaavia metanogeenibakteereja kutsutaan vastaavasti joko mesofiileiksi, termofiileiksi tai psykrofiileiksi (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 64).

Mesofiilisen prosessin etuna on sen vakaa toiminta verrattuna lämpötilan ja pH:n muutoksille sekä inhibiittorien vaikutuksille herkkään termofiiliseen prosessiin. Lämpötilan ja pH:n kohotessa metaanintuottoa inhiboivan ammoniakin määrä nousee (kuva 3, s. 6), joten mesofiilisessä prosessissa ammoniakin määrä on termofiilistä vähäisempi vastaavilla typpipitoisuuksilla. Lisäksi termofiilisessä prosessissa käsiteltävän jätteen mesofiilistä prosessia nopeampi hajoaminen voi johtaa liukoisen orgaanisen aineen määrän kasvuun ja metaanintuottoa inhiboivien rasvahappojen kertymiseen. (Lehtomäki ym. 2007, 32.)



Kuva 3. Lämpötilan ja pH:n vaikutus ammoniakkin (ammonia, NH_3) ja ammoniumionin (ammonium, NH_4^+) väliseen tasapainoon (Fricke, Santern, Wallmann, Hüttner & Dichtl 2007, 32).

Termofiilisen prosessin eduiksi voidaan lukea käsiteltävän jätteen nopeammasta hajoamisesta johtuva pienempi reaktoritilavuuden tarve. Lisäksi mesofiilisen prosessin lämpötilaa korkeampi prosessilämpötila hygienisoi käsiteltävän materiaalin tehokkaammin. Suuremmasta reaktorin lämmitystarpeesta huolimatta termofiilisen prosessin energiasaanto voi olla mesofiilisen prosessin saantoa suurempi. (Lehtomäki ym. 2007, 31–32.)

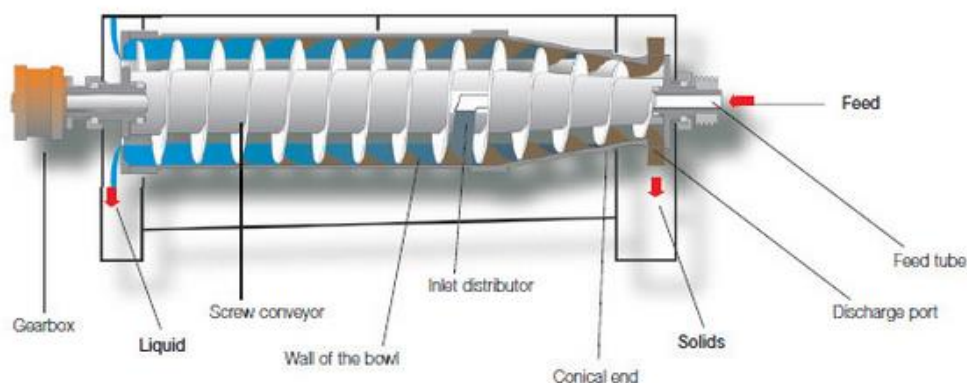
Lämpötilan lisäksi toinen mädätysprosessin tehokkuuteen eniten vaikuttava tekijä on pH. Mesofiilisessa biokaasuprosessissa parhaaseen metaanituottoon päästään pH:n ollessa 7–8 metanogeenien toimiessa parhaiten pH:n ollessa 6,5–8. (Jayaraj, Deepanraj & Sivasubramanian 2014; Sibiya, Muzenda & Tesfagiorgis 2014). Mädätysreaktorin pH:ta alentavat hiilihydraattipitoisten syötteiden hajoamistuotteena syntyvät VFA-hapot ja hiilidioksidi. Proteiinipitoiset syötteet puolestaan nostavat pH:ta niiden hajoamisprosessissa syntyvän ammoniakkin vuoksi. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 65; ks. myös Sibiya, Muzenda & Tesfagiorgis 2014).

Anaerobisesta hajoamisprosessista vastaavat mikro-organismit tarvitsevat ravinteita sekä energianlähteeksi että solukasvun ravintoaineeksi. Näiden mikro-organismien pääravinteita ovat hiili (C), typpi (N), fosfori (P) ja rikki (S), mutta välttämättömän entsyymitoiminnan ylläpitämiseksi tarvitaan myös hivenaineita ja vitamiineja. Mädätysprosessin solujen tarvitsemista hivenaineista tärkeimpiä ovat muun muassa nikkeli (Ni), koboltti (Co), rauta (Fe), sinkki (Zn) ja kupari (Cu). Optimaalisesti toimivassa biokaasuprosessissa hiilen ja typen suhdeluku on välillä 15–25, mutta käytännössä syötteen hiili ja typpi ovat usein eri tavoin sitoutuneina yhdisteinä mahdollistaen prosessin toimivuuden C/N-suhteen ollessa aina viidestä jopa 50:een saakka. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 26–27, 66–67.)

3 MÄDÄTYSJÄÄNNÖKSEN KÄSITTELY JA HYÖDYNTÄMINEN

Tyypillisesti alle 10 % reaktorin syötteen massasta muuttuu biokaasuksi ja yli 90 % poistuu reaktorista mädätysjäännöksenä. Mädätysjäännös soveltuu lannoitevalmistekseksi sellaisenaan, mutta sen jatkojalostaminen on tarpeen käytettävyyden, varastoinnin ja kuljetettavuuden parantamiseksi. Mädätysjäännöksen jatkojalostaminen alkaa useimmiten sen erottamisesta rejektivedeksi kutsutuksi nestejakeeksi ja kuivajakeeksi. Prosessissa jakeiden ravinnepitoisuudet muuttuvat, kun mädätysjäännöksen sisältämästä tyydestä valtaosa päättyy nestejakeeseen ja valtaosa fosforista kuivajakeeseen. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 99; Marttinen ym. 2014, 12.)

Mädätysjäännöksen mekaanisessa erottelussa käytetään muun muassa ruuvipuristinta ja suotonauhakuivainta, mutta linkous on erottelukeinoista yleisimmin käytetty sen tehokkuuden – erityisesti ravinteiden erotuksen kannalta – vuoksi. Yleisimmin käytetty linkotyyppi on dekantterilinko (kuva 4), jonka toiminta perustuu niin kutsutun keskipakovoiman ja lingon rummun sisällä pyörivän ruuvikuljettimen yhteistoimintaan. Lingon pyörimisnopeutta kasvattamalla voidaan saavuttaa jopa 1 000–4 000-kertainen kiihtyvyys verrattuna maan vetovoimaan. Veden erottamisen tehostamiseksi prosessoitavaan lietteeseen lisätään usein kemikaaleja. Yleensä kemikaalilisänä käytetään flokkautumista parantavia polymeereja. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 100–102.)



Kuva 4. Dekantterilinko (DC Solids Control 2016).

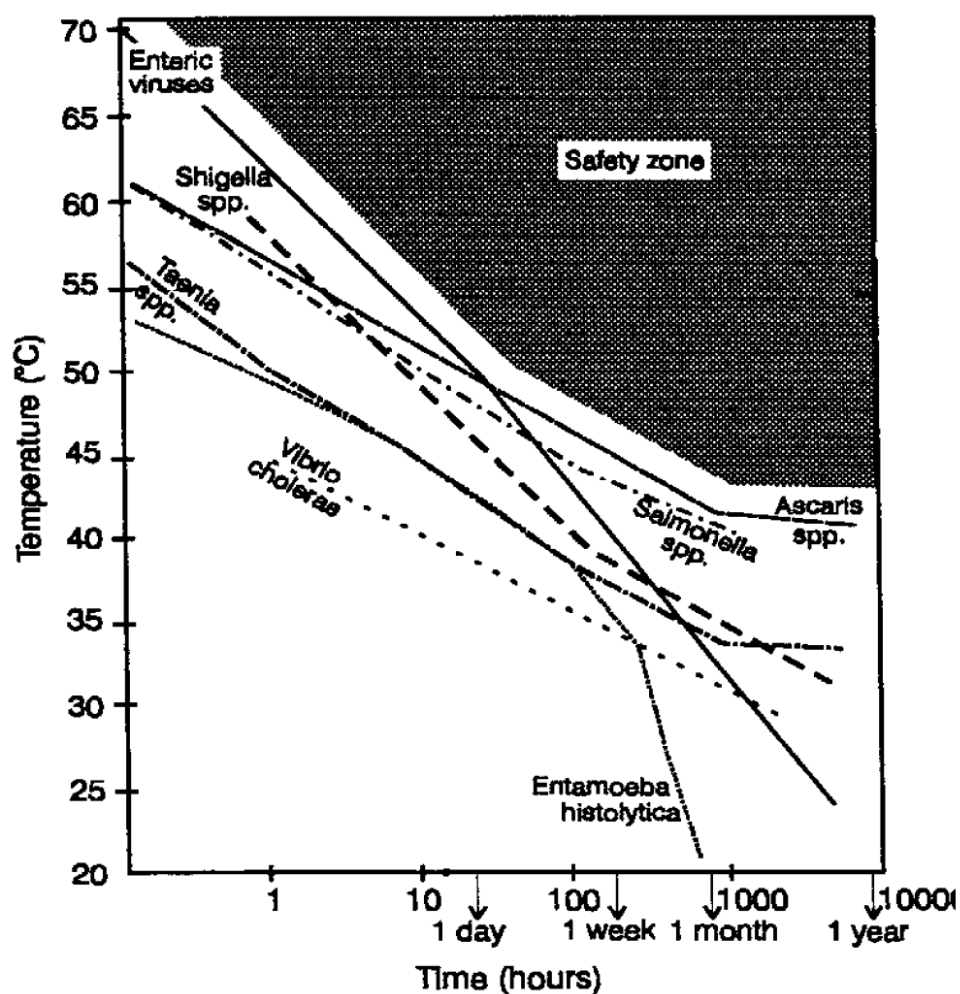
Rejektivesiä käsitellään usein joko strippaamalla, haihduttamalla tai kemiallisella saostuksella. Näiden tavoitteena on konsentroida lannoitteen sisältämät ravinteet pienempään nestetilavuuteen. Strippauksessa nesteen sisältämä ammoniumtyppi konvertoidaan haihtuvaksi ammoniakkikaasuksi, joka voidaan ottaa talteen kaasunpesurin avulla tai lauhduttamalla ammoniakkia sisältävä vesihöyry takaisin nestemäiseen muotoon. Typen erottamistehokkuuteen ammoniakkina vaikuttavat kuvan 3 (s. 6) mukaisesti pH ja lämpötila. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 103; Marttinen ym. 2013, 12.)

Haihduttamisessa rejektivedestä haihtunut neste lauhdutetaan jäähdyttämällä lauhdevedeksi. Haihtuneen veden mukana haihtuu pH:sta riippuen erilainen määrä orgaanisia happoja ja ammoniakkia – mitä alhaisempi pH, sitä vähemmän haihtuu ammoniakkia, mutta enemmän happoja ja päinvastoin. Alhaisen typpipitoisuuden omaavaa lauhdevettä voidaan hyödyntää esimerkiksi biokaasuprosessin syötteen laimennukseen ja ylimäärä voidaan johtaa jätevedenpuhdistamolle, mikäli erittäin laimea vesi ei häiritse sen puhdistusprosessia. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 107.) Haihdutus voidaan toteuttaa myös perinteisiä haihdutusmenetelmiä energiatehokkaammalla MVR-haihdutuksella (mechanical vapor recompression), joka erottelee rejektiveden volyymistä 90 % tislatuksi vedeksi ja lopputuotteena syntyy ravinnerikasta, lannoitteeksi soveltuvaa rejektivettä (Adven n.d.).

Eri tuotteet soveltuvat eri käyttötarkoituksiin, mutta käytettävyyden kannalta oleellista on se, että tuotteet ovat sekä ravinnepitoisuudeltaan, ravinteiden käyttökelpoisuudeltaan, stabiilisuudeltaan että hygieeniseltä laadultaan käyttökohteeseensa sopivia. Tuotteiden tulee olla myös helposti levitettäviä ja tasalaatuisia, eivätkä ne saa sisältää ympäristön kannalta haitallisia määriä haitta-aineita. Biokaasulaitokselta saatavan lopputuotteen laatuun vaikuttavat raaka-aineen lisäksi käytössä olevat prosessit. (Marttinen ym. 2014, 13.)

4 HYGIENIA JA HAITTA-AINEET

Teollisuuden sivuvirroista ja yhdyskuntien biohajoavista jätteistä muodostuva raaka-ainepohja tuo mukanaan erilaisia prosessia inhiboivia aineita ja yhdisteitä sekä tuotantoon liittyviä riskitekijöitä, kuten taudinaiheuttajia, orgaanisia haitta-aineita, haitallisia metalleja, lääkeaineita ja hormonijäämiä. Muun muassa eläimistä ihmisiin tarttuvia taudinaiheuttajia, zoonooseja, on tunnistettu käsittelemättömästä, jättepohjaisesta raaka-aineesta yli 150 lajia. Taudinaiheuttajien tuhoutuminen voidaan varmistaa lämpökäsittelyllä (kuva 5), mutta muut edellä mainitut riskitekijät voivat kulkeutua osittain tai kokonaan prosessin läpi päätyen valmistettavaan lopputuotteeseen. (Marttinen ym. 2013, 31.)



Kuva 5. Patogeenien tuhoutuminen lämpötilan ja ajan funktiona (Carrington 2001, 12).

Mädätysprosessin hygieniariskit hallitaan useimmiten erillisellä hygienisointikäsittelyllä, jossa materiaaleja lämpökäsitellään alle 12 mm:n palakoossa tunnin ajan vähintään 70 °C:n lämpötilassa. Hygienisoinnista vastaava hygienisointiyksikkö voidaan sijoittaa joko ennen tai jälkeen mädätysprosessin. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 97.)

4.1 Taudinaiheuttajat

Orgaanisesta jätteestä koostuvan raaka-aineen käsittelyyn liittyvä, ihmis-, eläin- tai kasviperäisestä lähteestä oleva, tautiriski tulee huomioida orgaanista ainesta käsiteltäessä. Orgaanisessa jätteessä esiintyviä taudinaiheuttajia ovat muun muassa bakteerit, virukset, loiset ja sienet. Näistä tunnettuja, tauteja aiheuttavia, bakteerisukuja ovat esimerkiksi *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Clostridium* ja *Yersinia*. Näistä *Salmonella* spp. voi säilyä elinkykyisenä jopa 8–12 kuukautta maaperässä ja yli 77 vuorokautta lietteessä, lisääntyen lämpötilan ollessa 6–47 °C. (Marttinen ym. 2013, 31.) Suomessa esiintyvistä salmonellan serotyypeistä *Salmonella* Typhimurium on tärkein. Maailmanlaajuisesti tärkeimmät serotyypit ovat: *Salmonella* Enteritidis ja *Salmonella* Infantis (Evira 2018a). Salmonellabakteerit tuhoutuvat varmuudella lämpökäsittelyssä lämpötilan ollessa 70 °C 60 minuutin ajan (Bagge 2009, 49).

Baggen (2009, 32) mukaan *Listeria monocytogenes* on bakteeri, jota esiintyy kaikkialla: muun muassa maaperässä, säilörehussa, ulosteessa ja jätevesissä. *L. monocytogenes* säilyy täysin elinkykyisenä maaperässä useita viikkoja ja lietteessä useita kuukausia, mutta se ei selviä anaerobisissa olosuhteissa 60 vuorokautta pidempää. *L. monocytogenes* selviää alkaalisessa pH:ssa, mutta tuhoutuu 70 °C:n lämpötilassa muutamissa sekunneissa (Nemeth ym. 2011, 162).

Escherichia coli -bakteerit ovat fakultatiivisesti anaerobisia gram-negatiivisia sauvoja, jotka tuottavat happoa ja kaasua laktoosista (Evira 2012a). *E. coli* -bakteerin muotoja on useita ja niitä esiintyy ihmisen ja tasalämpöisten eläinten suoliston normaalifloorassa. Niiden tehtävä on estää tautia aiheuttavia mikrobeja tarttumasta isännän suolistoon tai lisääntymästä siellä. Osa *E. coli* -bakteereista on kuitenkin muuntunut ominaisuuksiltaan siten, että ne pystyvät aiheuttamaan suolistotulehduksia. Yksi *E. coli* suolistotulehduksia aiheuttava muoto on Enterohemorraginen *E. coli* (EHEC). Kolibakteerit eivät kestä korkeita lämpötiloja ja ne kuolevatkin 70 °C:n lämpötilassa. Lämpökäsittelyssä on kuitenkin huomioitava, että kuumennettavan kappaleen on oltava kauttaaltaan vähintään tässä lämpötilassa. (Evira 2016a).

Lämpökestoiset kampylobakteerit, *Campylobacter jejuni* ja *Campylobacter coli*, ovat yleisiä tasalämpöisten eläinten ja lintujen suolistobakteereja, jotka kasvavat parhaiten noin 40 °C:n lämpötilassa vähähappisessa ympäristössä. Kampylobakteeria voi esiintyä myös luonnonvesissä, säilyen elinkykyisenä jopa useita viikkoja tai kuukausia. Bakteeri kuolee *E. coli* tavoin 70 °C:n lämpötilassa. (Evira 2016b.)

Bacillus spp. ja *Clostridium* spp. ovat itiöllisiä bakteereja, joiden vegetatiiviset solut voivat muodostaa erittäin pysyviä sisäitiömuotoja. Itiöt säilyvät elinkykyisinä vaikeissakin olosuhteissa sietäen hyvin myös kuumuutta. Bakteerien itiömuodot voivat säilyä maaperässä vuosikymmenien ajan.

(Marttinen ym. 2013, 33.) *Bacillus* spp. ja *Clostridium* spp. -sukujen bakteerien muodoista useimmat ovat vaarattomia. Tautia aiheuttavia lajeja ovat esimerkiksi *B. anthracis*, *C. botulinum*, *C. chauvoei*, *C. haemolyticum*, *C. septicum*, *C. sordellii* ja *C. tetani* sekä tietyissä olosuhteissa *B. cereus* ja *C. perfringens*. *Bacillus* ja *Clostridium* -sukujen bakteereja on eristetty lannasta, teurastamon sivutuotteista ja biojätteistä. Lisäksi *Clostridium* spp. -bakteereja on eristetty myös maatuneesta kasvimateriaalista. Kestäviä itiömuotoja muodostavista bakteereista muun muassa *C. perfringens* ja *Bacillus* spp. -bakteerien on osoitettu selviytyvän tunnin kestäneestä lämpökäsittelystä 70 °C:n lämpötilassa. (Bagge 2009, 24–28, 56.)

Yersinia-suvun bakteereista *Yersinia enterocolitica* ja *Yersinia pseudotuberculosis* ovat yleisiä maaperässä ja vesistöissä esiintyviä bakteereja. *Yersinia*-bakteereja on eristetty linnuista, kaloista, sammakkoeläimistä ja nisäkkäistä. *Y. enterocolitica* -bakteeri kuuluu sian ruoansulatuskanavan, etenkin nielun, normaaliin bakteeristoon. *Y. enterocolitica* pääsee lihaan huonon teurastushygienian seurauksena. Bakteeri saadaan tuhottua pastöroimalla. (Evira 2016c.)

Ihmis- ja eläinperäisten jätteiden lisäksi myös kasviperäisissä jätteissä voi esiintyä taudinaiheuttajia: sien-, bakteeri- ja virusperäisiä. Useat sienilajit selviävät hygienisointiprosessista, mutta anaerobinen biokaasuprosessi vähentää sienilajistoa. Lajimäärän vähentyessä elinkykyisten lajien pesäkkeitä muodostava määrä ei kuitenkaan vähene. Mesofiilisessa mädätysprosessissa selviävät lähinnä lämpökestävät *Talaromyces* ja *Paecilomyces*-sukujen lajit. Termofiilisessä prosessissa puolestaan selviävät vain *T. crustaceus* ja *T. lanuginosus*. Prosessin jälkeinen mädätysjäännöksen kuu-kauden mittainen jälkivarastointi vähentää sienten määrää. (Marttinen ym. 2013, 34.)

Kasveista peräisin olevia bakteeri- ja virustauteja silmällä pitäen termofiilinen mädätysprosessi on mesofiilistä parempi vaihtoehto, sillä esimerkiksi Möhöjuuren (*Plasmodiophora brassicae*) infektointikyky ei heikenny mesofiilisessä prosessissa lainkaan, mutta termofiilinen prosessi 14 vuorokauden viipymällä heikentää sitä huomattavasti. Möhöjuuren on osoitettu eliminoituvan termofiilisessä prosessissa täydellisesti jopa vain kymmenen tunnin viipymäajalla. (Marttinen ym. 2013, 34.)

Möhöjuuren tapaan 14 vuorokauden viipymäaika ja termofiilistä mädätysprosessia suositellaan myös esimerkiksi tylppälehtihierakan (*Rumex obtusifolius*), verihirssin (*Digitaria sanguinalis*) ja tomaatin (*Lycopersicon lycopersicum*) siementen itämiskyvyn täydellisen eliminoitumisen kannalta. Tupakan mosaiikkivirus (TMV) tarvitsee tuhoutuakseen lisäksi vähintään 19 vuorokauden jälkikompostoinnin. (Marttinen ym. 2013, 34.)

4.2 Orgaaniset haitta-aineet ja lääkeaineet

Prosessikemikaalijäämien ja raskasmetallien lisäksi biokaasuprosessissa saattaa esiintyä erilaisia orgaanisia haitta-aineita ja lääkeaineita, jotka päätyvät teollisuuden ja kotitalouksien jätevesien mukana vedenpuhdistamoille ja sieltä puhdistamolietteen mukana biokaasulaitoksille ja edelleen lannoitevalmisteiden mukana ympäristöön. Lääkeaineita saattaa päätyä prosessiin myös yhdyskuntien biojätteiden mukana, mikäli lajittelua ei ole jätteiden syntypaikalla tehty oikein. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 97–98.)

Haitalliset orgaaniset yhdisteet ja lääkeaineet sisältävät ominaisuuksiltaan hyvin erilaisia yhdisteitä, jotka käyttäytyvät erilaisissa käsittelyvaiheissa ja prosessoinnissa hyvin eri tavoin. Osa hajoaa jätevedenpuhdistamolla, osa päätyy purkuvesien mukana vesistöihin, osa sitoutuu lietteeseen ja osa hajoaa biokaasuprosessissa. Jäljelle jääneet yhdisteet jakautuvat mahdollisissa jatkoprosesseissa ominaisuuksiensa mukaan eri jakeisiin ja päätyvät loppukäytössä ympäristöön. Ympäristöön päätyneistä yhdisteistä osa hajoaa auringon UV-säteilyn vaikutuksesta, mutta esimerkiksi dioksiinit, PBDE ja PCF ovat hyvinkin pysyviä ja voivat kertyä maaperään ja päätyä sieltä edelleen ravintoketjuun. Kuitenkin, suurimmalla osalla Biosafe-hankkeen loppuraportissa (Marttinen, Suominen, Lehto, Jalava & Tampio 2014) tutkituista kemikaaliryhmistä, biokaasulaitosten lopputuotteiden peltolevityksen ja ilmalaskeuman kuormituksen (taulukko 1) ei arvioitu vaarantavan elintarviketurvallisuutta. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 98.)

Taulukko 1. Haitallisten kemikaalien pitoisuudet biokaasulaitosten käsittelyjäännöksissä kuiva-ainetta kohti (Marttinen, Suominen, Lehto, Jalava & Tampio 2014, 32)

Aineryhmä	Materiaali	n	Minimi	Maksimi	Keskiarvo	Mediaani	Yksikkö
Dioksiini	Mädätysjäännös	21	<LOQ	22,0	3,88	1,49	ng TEQ/kg
	Kuivajae	3	0,008	10,4	4,17	2,04	
	Rejektivesi	2	0,013	0,47	0,24	0,24	
PCB(7)	Mädätysjäännös	11	<50	<50	<50	<50	µg/kg
	Kuivajae	0	e.a.	e.a.	e.a.	e.a.	
	Rejektivesi	0	e.a.	e.a.	e.a.	e.a.	
PBDE	Mädätysjäännös	16	6,4	11300	1780	1040	µg/kg
	Kuivajae	9	6,6	2640	1330	1570	
	Rejektivesi	9	6,8	569	187	99	
HBCD	Mädätysjäännös	7	<1000	<1000	<1000	<1000	µg/kg
	Kuivajae	0	e.a.	e.a.	e.a.	e.a.	
	Rejektivesi	0	e.a.	e.a.	e.a.	e.a.	
TBBPA	Mädätysjäännös	7	0,7	62	24,5	8,00	µg/kg
	Kuivajae	0	e.a.	e.a.	e.a.	e.a.	
	Rejektivesi	0	e.a.	e.a.	e.a.	e.a.	
PAH(16)	Mädätysjäännös	20	0,10	20,6	2,11	0,68	mg/kg
	Kuivajae	6	0,41	21,9	5,20	1,97	
	Rejektivesi	4	0,06	2,1	0,69	0,30	
PFC	Mädätysjäännös	19	0,97	168	42,3	18,5	µg/kg
	Kuivajae	10	1,56	120	27,6	12,5	
	Rejektivesi	9	4,00	282	58,9	23,9	
NP+NPEO	Mädätysjäännös	20	<LOQ	54,0	11,2	7,5	mg/kg
	Kuivajae	4	2,10	130	40,9	13,9	
	Rejektivesi	3	5,35	20,3	14,9	19,0	
DEHP	Mädätysjäännös	20	1,00	107	22,9	9,50	mg/kg
	Kuivajae	5	1,30	106	43,1	30,0	
	Rejektivesi	4	4,00	7,00	5,35	5,00	
LAS	Mädätysjäännös	20	<100	2000	975	1100	mg/kg
	Kuivajae	4	<100	3400	1420	1140	
	Rejektivesi	2	<LOQ	400	200	200	
AOX	Mädätysjäännös	20	<5	2100	284	100	mg/kg
	Kuivajae	3	130	1100	500	270	
	Rejektivesi	1	22	22	22	22	

n: analyysien lukumäärä; <LOQ: tulos alle määrittärajän; e.a.: ei analysoitu

5 YMPÄRISTÖOLOSUHTEIDEN VAIKUTUS MIKROBIEN ELINKYKYYN

Ympäristön kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet, kuten ravinteet, lämpötila, aktiivisen veden määrä, pH ja happipitoisuus vaikuttavat suuresti mikrobien elinkykyyn. Mikrobien lisääntyminen hidastuu tai estyy, jos jokin näistä tekijöistä puuttuu tai on mikrobin näkökulmasta kaukana normaalista arvosta. Osa mikro-organismeista pystyy kuitenkin elämään hyvin ankarissa elinolosuhteissa. Tällaisia organismeja kutsutaan ekstreemofiileiksi. Ekstreemofiilit voivat elää muun muassa äärimmäisissä lämpötiloissa, erittäin kuivissa sekä hyvin happamissa ja emäksisissä olosuhteissa. (Evira 2017; Solunetti n.d.a.)

Energianlähteestä riippuen mikro-organismit voidaan jakaa kahteen metaboliseen luokkaan: kemiallisista yhdisteistä energiansa saaviin kemotrofeihin ja valosta energiansa saaviin fototrofeihin. Tämän lisäksi organismit voidaan luokitella tärkeimmän makroravinteensa, hiilen, lähteen perusteella orgaanisia yhdisteitä hiilenlähteenään käyttäviksi heterotrofeiksi tai hiilidioksidin epäorgaanista hiiltä käyttäviksi autotrofeiksi. Hiilen lisäksi toinen mikro-organismien tärkeä makroravinne on organismien nukleiinihappojen ja proteiinien rakenteeseen vaikuttava typpi. (Solunetti n.d.b.)

Lämpötila on mikrobien lisääntymisnopeuteen oleellisesti vaikuttava olosuhdetekijä. Jokaisella mikrobilla on oma optimilämpötilansa, mutta useat mikrobit voivat lisääntyä myös epäoptimaalisissa lämpötiloissa. Alle 0 °C:n lämpötilassa mikrobit eivät lisäännä, mutta ne säilyvät pääsääntöisesti lisääntymiskykyisinä. (Evira 2017; Ruokatieto n.d.)

Aktiivisen veden (a_w) määrällä tarkoitetaan kemiallisesti sitoutumatonta vettä, joka on vapaata mikrobien käytettäväksi. Veden aktiivisuus ilmaistaan asteikolla 0–1. Mitä pienempi arvo, sitä harvemman mikrobin lisääntymisedellytykset täyttyvät. Useimpien bakteerien lisääntymiskyky heikkenee a_w -arvon ollessa 0,95. Tällöin solun sisällä oleva vesi siirtyy osmoosissa diffuusion avulla solun sisältä sitä ympäröivään, väkevämpään ainekseen. (Taimisto A-M 2006; Solunetti n.d.c.)

Mikro-organismien suhde hapteen vaihtelee: toiset pystyvät kasvamaan ainoastaan hapellisissa ja toiset hapettomissa olosuhteissa. Osa mikro-organismeista pystyy kasvamaan kummassakin. Näiden ominaisuuksien mukaan organismit jaotellaan aerobeihin ja anaerobeihin ja edelleen obligatorisiin ja fakultatiivisiin aerobeihin sekä ehdottomiin ja aerotolerantteihin anaerobeihin. (Solunetti n.d.d.)

Luonnollisten elinympäristöjen pH vaihtelee pääsääntöisesti välillä 5–9, joka on neutrofiileiksi kutsutuille organismeille yleisin pH-optimalue. Hyvin matalassa pH:ssa (pH 1–5) eläviä organismeja kutsutaan asidofiileiksi ja korkeassa (pH 9–12) vastaavasti alkalofiileiksi. Mikro-organismeilla voi kuitenkin olla useampikin pH-optimalue riippuen muista sen hetkisistä

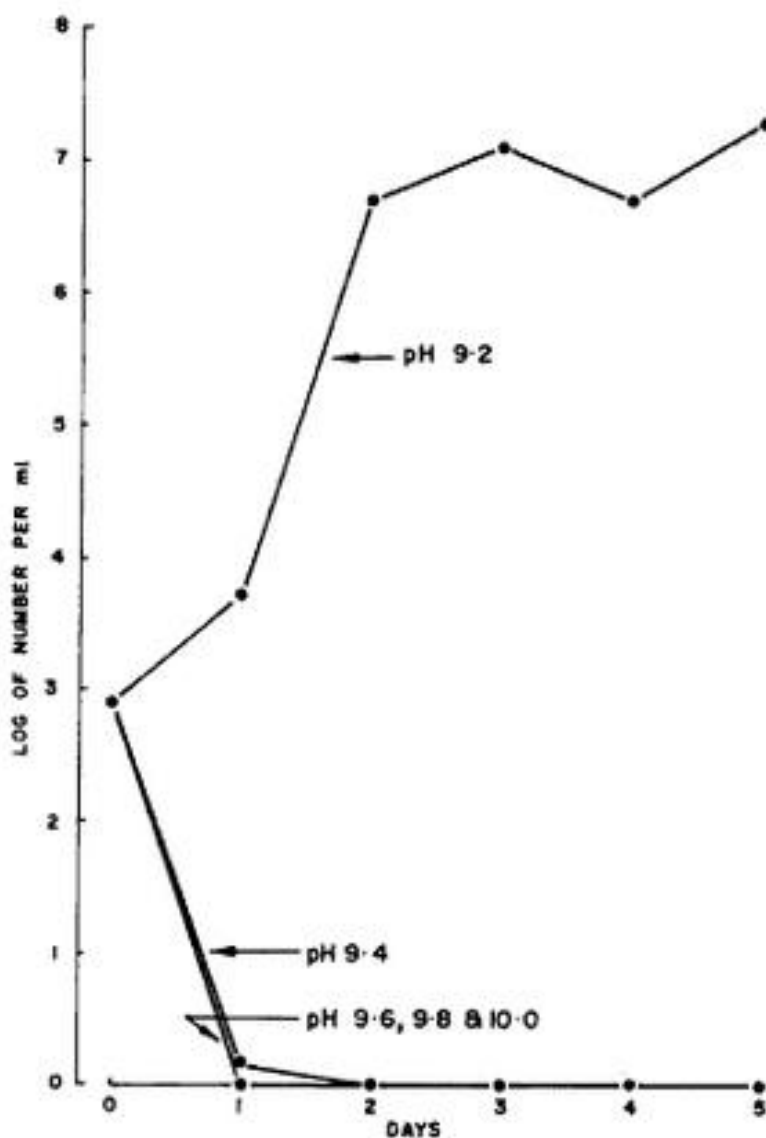
kasvuolosuhteista, kuten lämpötilasta ja ravinteiden saatavuudesta. (Solunetti n.d.e.)

Ympäristön pH:sta riippumatta solun sisäisen pH:n tulee pysytellä lähellä neutraalia makromolekyylien stabiiliuuden säilyttämiseksi (Solunetti n.d.e). Neutrofiilit pystyvät säätämään sytoplasmansa pH:ta happamammaksi tai emäksisemmäksi ympäristön pH:n mukaisesti (Padan, Bibi, Masahiro & Krulwich 2005).

Asidofiilit suojautuvat ympäristön happamuudelta erittämällä puskuroivia molekyylejä ja pumppaamalla vetyioneja aktiivisesti ulos solusta muuttaen näin solukalvonsa koostumusta. Alkalofiilit puolestaan säilyttävät sisäisen homeostaasin (tasapaino) aktiivisen ja passiivisen säätelyn avulla. Alentunut solukalvon läpäisevyys ja sytoplaskan (solulima) runsas positiivisesti varautuneiden orgaanisten yhdisteiden määrä, polyamiinipitoisuus, puskuroivat sytoplasmaa. Lisäksi plasmolemman (solukalvo) ionikanavat osallistuvat aktiivisesti solun pH:n alentamiseen. (Solunetti n.d.e.)

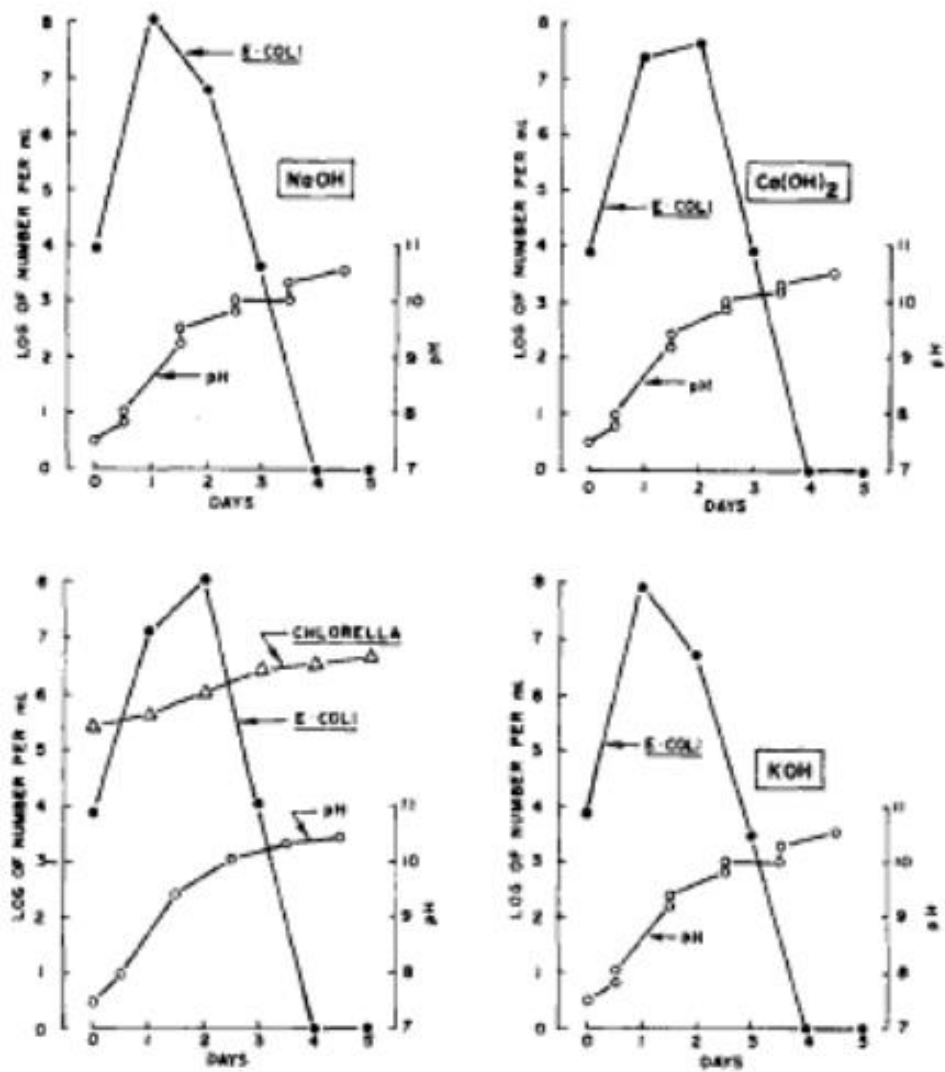
*E. coli*n tapauksessa elinympäristön pH:n muutos on stressitekijä, johon bakteeri reagoi säätämällä aineenvaihduntaansa. Esimerkiksi *E. coli*n aineenvaihdunnassa sen mielisimmän hiilen lähteen, glukoosin, fermentaatio tuottaa lyhytketjuisia happoja, jotka bakteeri poistaa sisältään, mutta happojen määrän lisääntyessä ne palaavat solulimaan aiheuttaen solun sisäistä happamuustason nousua. (Maurer, Johannes, Bondurant, Radmacher & Slonczewski 2005; Aidberg ym. 2014.) Bakteeri sopeutuu happamiin olosuhteisiin sytoplasmaa emäksisempään suuntaan muuttavien dekarboksylaasien avulla (Gale & Epps 1942, 603). Emäksisissä olosuhteissa, puolestaan, bakteerin useat aminohappoaineenvaihdunnan entsyymit, kuten tryptofaanideaminaasi (TDA) ja seriinideaminaasi (SDA), lisääntyvät muodostaen happoa tuottavan mekanismin näin mahdollistaen bakteerin sopeutumisen (Padan, Bibi, Masahiro & Krulwich 2005). Luonnollisessa elinympäristössään, ihmisen ruuansulatuksessa, bakteerin täytyy sopeutua sekä happamiin että emäksisiin olosuhteisiin (Maurer ym. 2005). Bakteerin on raportoitu selviävän erittäin happamissa olosuhteissa, pH:n ollessa 3, jopa useita vuorokausia (Jordan, Oxford & O'Byrne 1999).

Tutkittaessa jätevedestä eristetyn *E. coli*n kasvamista ja selviytymistä fluidin pH:n noustessa (kuva 6, s. 15) on kyetty osoittamaan, että bakteeri pystyy kasvamaan vielä pH:n ollessa 9,2, mutta pH:n noustessa 9,4:ään *E. coli*n kasvu ei ainostaan pysähtynyt vaan bakteeri kuoli yhden vuorokauden kuluessa täysin. (Parhad & Rao 1974, 983.) Toisaalta Small, Blankenhorn, Welty, Zinser & Slonczewski (1994) ovat raportoineet *E. coli*n kykenevän sopeutumaan erilaisiin ympäristön pH-arvoihin kyeten selviytymään jopa pH:n ollessa 10,2.



Kuva 6. pH-säädön vaikutus *E. coli* kasvuun (Parhad & Rao 1974, 1983).

Parjad & Rao (1974, 1982–1983) selvittivät myös pH-säätöön käytetyn emäksen kationin (positiivisesti varautunut ioni) vaikutuksia *E. coli* kasvuun (kuva 7, s. 16). Emäksinä käytettiin 1 M lipeää (NaOH), kaliumhydroksidia (KOH) ja kalsiumhydroksidia $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Tutkimuksen perusteella voitiin todeta, että emäkseen sitoutuneella kationilla ei ollut merkittävää vaikutusta tuloksiin, sillä *E. coli* saatiin eliminoidua kaikissa tapauksissa lähestulkoon identtisesti. (Parhad & Rao 1974, 1982–1983.)



Kuva 7. *E. coli*in kasvu eri emäksillä toteutetun keinotekoisin pH-säädön aikana (Parhad & Rao 1974, 983).

6 LAINSÄÄDÄNTÖ JA ASETUKSET

Biokaasulaitoksen mädätysjäännös katsotaan joko raakalannaksi tai lannoitevalmisteksi laitoksen toimintaperiaatteesta riippuen. Käytännössä raakalannaksi katsotaan ainoastaan maatilakohtaisen biokaasulaitoksen mädätysjäännös, mikäli laitoksella käsitellään vain tilan omia jätteitä ja mädätysjäännös hyödynnetään sen omilla pelloilla. Mikäli laitoksella valmistettuja lannoitevalmisteita luovutetaan tilan ulkopuolelle, katsotaan tämä lannoitevalmisteiden markkinoille saattamiseksi, jolloin lopputuotteiden on täytettävä lannoitevalmistelainsäädännön (lannoitevalmistelaki 2006/539) vaatimukset. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 184–186.)

Lannoitevalmisteiden ja soveltuvien osin niiden raaka-aineiden valmistukseen markkinoille saattamista varten, markkinoille saattamiseen, käyttöön, kuljettamiseen, maahantuontiin sekä maastavientiin sovelletaan lannoitevalmistelakia (2006/539), jonka tavoitteena on elintarvikkeiden ja ympäristön laadun turvaamiseksi edistää hyvälaatuisten, turvallisten ja kasvintuotantoon sopivien lannoitevalmisteiden tarjontaa, lannoitevalmisteiksi soveltuvien sivutuotteiden hyötykäyttöä sekä riittävien, lannoitevalmisteita koskevien, tietojen antamista niiden ostajille ja käyttäjille (Lannoitevalmistelaki 2006/539 § 1, 2.)

Lannoitetuotteiden tyypeistä, tyyppinimiryhmistä, tyyppinimikohtaisista vaatimuksista, lannoitevalmisteiden laatu-, merkintä-, pakkaus-, kuljetus-, varastointi-, käyttö- ja muista vaatimuksista sekä lannoitevalmisteiden raaka-aineista puolestaan säädetään Maa- ja metsätalousministeriön asetuksessa (2011/24/11). Asetuksessa (2012/11/12) puolestaan säädetään toiminnanharjoittajan ilmoitusvelvollisuudesta, tiedostonpitämisvelvollisuudesta, omavalvontavelvollisuudesta, ennakoilmoitusvelvollisuudesta, laboratoriohyväksynnästä, lannoitevalmisteiden sisämarkkinakaupasta ja maahantuonnista koskien lannoitevalmisteita. Lisäksi asetuksessa säädetään orgaanisia lannoitevalmisteita tai niiden raaka-aineita valmistavan, teknisesti käsittelevän tai varastoivan laitoksen hyväksynnästä sekä lannoitevalmisteita koskevan valvonnan järjestämisestä. (Maa- ja metsätalousministeriö 2011/24/11 § 1, 2012/11/12 § 1.)

Omavalvontavelvollisuuden toteuttamiseksi toiminnanharjoittajan on ilmoitusvelvollisuuden mukaisesti toimitettava omavalvontasuunnitelma Elintarviketurvallisuusvirastolle (MMA 2012/11/12 § 1, 4). Omavalvontasuunnitelman tulee sisältää soveltuvien osin muun muassa tuotekohtaiset tiedot markkinoille saatettavan lannoitevalmisteen raaka-aineista, niiden alkuperästä ja laadusta sekä toimenpiteistä, joilla varmennetaan eräkohtainen jäljitettävyyden. Suunnitelman tulee sisältää myös raaka-aineita, tuotantoa ja lopputuotetta koskeva laadunvalvonta- ja näytteenottosuunnitelma sekä toimenpiteet, joihin ryhdytään, mikäli lannoitevalmiste tai sen raaka-aine ei täytä sille asetettuja laatuvaatimuksia tai on vanhentunut. Lisäksi suunnitelman tulee sisältää kuvaus lannoitevalmisteiden ja niiden

raaka-aineiden maahantuonti-, varastointi-, säilytys- ja kuljetusjärjestelyistä sekä näihin liittyvien dokumenttien sisällöstä ja arkistoinnista. Valmistusprosessissa valvottavat kohteet painottuvat raaka-aineiden ja tuotteiden ominaisuuksiin ja prosessiparametreihin. (Evira 2016d.) Omavalvontavelvollisuuden toteutumista seurataan vuosittain laadittavalla omavalvontaraportilla, josta käyvät ilmi kriittisten valmistus- ja käsittelyvaiheiden valvonnan tulokset sekä omavalvonnassa havaitut ongelmat ja puutteet sekä se, kuinka ne on ratkaistu (Lannoitevalmistelaki 2006/539 § 15). Omavalvontaan liittyvien analyysien virallisena laboratoriona toimii joko Elintarviketurvallisuusviraston oma, tai viraston hyväksymä, laboratorio (Lannoitevalmistelaki 2006/539 § 19).

Orgaanisia lannoitevalmisteita tai niiden raaka-aineita valmistavalla, teknisesti käsittelevällä tai varastoivalla on ennen toimintansa aloittamista oltava Elintarviketurvallisuusviraston myöntämä laitoshyväksyntä (Lannoitevalmistelaki 2006/539 § 14). Hyväksyntää haetaan Eviran lomakkeella ja hyväksynnän edellytyksenä on, että laitoksen toiminta täyttää lannoitevalmistelaissa asetetut vaatimukset. Lisäksi eläimistä saatavia sivutuotteita käsittelevän laitoksen on täytettävä sivutuoteasetuksen (EY 2009/1069) vaatimukset. Laitoshyväksynnän hakijan on osoitettava, että laitoksella syntyvä lannoitevalmiste tai sen raaka-aine on turvallista ja käyttöön soveltuvaa. Hakemuksen liitteenä on toimitettava yksityiskohtainen kuvaus toiminnasta ja laitoksesta, omavalvontasuunnitelma, ympäristölupa tai lupahakemus. (Evira 2016e.)

Ympäristölupa tarvitaan ympäristönsuojelulain (2014/527) mukaisesti ympäristön pilaantumisen vaaraa aiheuttaville toiminnoille. Lupa voidaan vaatia muun muassa jätevesipäästöjen ja muun toiminnan aiheuttamien vesistövaikutusten sekä naapurille aiheutuvien haittojen vuoksi. Ympäristölupa on hallintapäätös, jossa määritellään hankkeelle tapauskohtaisesti arvioiden hyväksyttävät, ympäristön käyttöön ja rasitukseen liittyvät, mallit ja rajat. Ympäristölupaa haetaan kirjallisesti ympäristönsuojeluasetuksen (2014/713) määräämältä lupaviranomaiselta. (MTK 2017.)

Lannoitevalmistelain ja sivutuoteasetuksen (EY 2009/1069) perusteella laitoksella muodostuvien lannoitevalmisteiden markkinointi ja myynti edellyttää Eviran tuotehyväksyntää. Tuotehyväksynnän tarkoitus on varmistaa tuotteiden ja valmisteiden turvallisuus, laatu ja aitous. Hyväksynnän kriteereinä on, että lannoitevalmisteille on laadittu tuoteselosteet ja niiden hygieeninen laatu on todennettu hyväksytyssä laboratoriossa. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 184–186.)

Mikäli lannoitevalmistaja valmistaa, maahantuo tai käyttää prosesseissaan kemikaaleja, tulee yrityksen Euroopan parlamentin ja neuvoston REACH-asetuksen (EY 2006/1907) mukaan rekisteröidä aineensa ja tehdä siinä yhteistyötä muiden samoja aineita rekisteröivien yritysten kanssa. Asetuksen tarkoituksena on varmistaa, että yritykset tunnistavat ja hallitsevat riskit, jotka liittyvät niiden Euroopan unionissa valmistamiin ja markkinoimiin

aineisiin. Rekisteröinnit vastaanottaa kemikaalivirasto, jolle toimijan on osoitettava, miten ainetta voidaan käyttää turvallisesti. Mikäli riskejä ei voida hallita, voivat viranomaiset rajoittaa aineiden käyttöä ja pitkällä aikavälillä kaikkein vaarallisimmat aineet on korvattava vähemmän vaarallisilla. (ECHA n.d.; Kemikaalivirasto n.d.)

Suomessa myytävissä ja käytettävissä lannoitteissa ja muissa lannoitevalmisteissa haitallisten aineiden sallittu enimmäispitoisuus (taulukko 2) ei saa ylittää niille asetettuja rajoja. Lisäksi Suomessa myytävien ja käytettävien lannoitevalmisteiden tautia aiheuttavien tai siitä indikoivien mikro-organismien sallituille määriksi on säädetty enimmäismäärät: biokaasulaitoksen lannoitevalmisteissa ei saa esiintyä lainkaan salmonellaa ja *E. coli* -pitoisuuden on oltava alle 1 000 pmy g⁻¹. (Evira 2018b; ks. myös MMA 2011/24/11.)

Taulukko 2. Haitallisten aineiden enimmäispitoisuus Suomessa myytävissä ja käytettävissä lannoitteissa ja muissa lannoitevalmisteissa (Evira 2018b)

Alkuaine	Enimmäispitoisuus mg/kg ka.	Enimmäispitoisuus mg/kg kuiva-ainetta metsätaloudessa käytettävissä tuhkalannoitteissa ja niiden raaka-aineissa
Arseeni (As)	25	40
Elohopea (Hg)	1,0	1,0
Kadmium (Cd)	1,5	25
Kromi (Cr)	300	300
Kupari (Cu)	600	700
Lyijy (Pb)	100	150
Nikkeli (Ni)	100	150
Sinkki (Zn)	1500	4500

7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Opinnäytetyön kokeellista osuutta varten laadittiin erillinen työsuunnitelma, jossa kaikki ennakkotietojen mukaiset työvaiheet eriteltiin ja aika-aulutettiin. Kokeellisessa osuudessa selvitettiin, taustaselvitykseen nojaten, mädätysjäännöksen pH-säädön vaikutuksia *E. coli* -bakteeriin. Työssä selvitettiin, voidaanko *E. coli* kasvu inhiboida säätämällä mädätysjäännöksen pH:ta emäksisempään suuntaan. Tämän selvittämiseksi pH-säädetty mädätysjäännös ympätettiin St1:n Hämeenlinnan tuotantolaitokselta eristetyllä *E. coli* -kannalla ja inkuboinnin jälkeen näytteille suoritettiin mikrobiologiset määritykset. Lisäksi opinnäytetyössä selvitettiin pH-säädön vaikutuksia mädätysjäännöksestä jalostettujen lannoitetuotteiden, kiinteän maanparannusaineen ja konsentroidun rejektiveden, typpipitoisuuteen.

7.1 Näytteenotto

Näytteenotto suoritettiin laboratoriotöiden aloituspäivän aamuna prosessin ollessa normaalitilassa. Näytteet otettiin mädätysreaktorilta lähtevästä linjasta mahdollisimman läheltä reaktoria, jotta esimerkiksi putkistoihin kertyvää struviittia (magnesiumammoniumfosfaatti) ja muita epäpuhtauksia päätyisi näytteisiin mahdollisimman vähän.

Ennen näytteenottoa näytteenottoputken suu desinfioitiin noin 70-prosenttisella etanoliliuoksella (EtOH). Tämän jälkeen mädätysjäännöstä valutettiin näytteenottoputkesta jätesaaviin reilun parin litran verran, jotta varsinaiset näytteet olisivat edustavia.

Näytepurkeista yksi sijoitettiin HAMK:n laboratorion jääkaappiin alkuvuoden analyysjä varten ja loput näytepurkit pakastettiin. Pakastettuja näytteitä sulatettiin jääkaapissa noin vuorokauden verran myöhempiä analyysjä varten.

7.2 pH-säätö

Näytteiden pH-säätö toteutettiin kolmessa osassa siten, että ensimmäinen säätö on lähinnä koetitraus ja seuraavat kaksi varsinaisten, mikrobiologisesti analysoitavien näytteiden säätöä. Titrauskokeen perusteella laskettiin näytteiden pH-säätöön tarvittavan 1molaarisen natriumhydroksidin määrä seuraavien työvaiheiden nopeuttamiseksi. Titraus suoritettiin byrettien, automaattisekoittajan ja jatkuvaan mittaukseen kykenevän pH-mittarin avustuksella. Titrauskemikaaleina käytettiin 1-molaarisen natriumhydroksidin lisäksi 16,63 massaprocenttista rikkihappoa (H_2SO_4), sekä vaahdonestoaineena polypropyleeniglykolia (Polypropylene glycol 2000).

7.3 Mikrobiologiset analyysit

Mikrobiologisissa analyyseissä sovellettiin Eviran (2012b) toimintaohjetta (LAB 728/1). Mikrobiologiset maljaviljelyt suoritettiin ensimmäisessä ko-
keessa pintaviljelymenetelmällä Chromocult-elatusainetta (Chromocult Coliform Agar ES) käyttäen. Toinen koe tehtiin pintaviljelyn sijaan maljava-
lumenetelmällä. Kasvatusalustat valmistettiin Chromocult-elatusainetta sisältävän purkin ohjeiden mukaisesti. Pintaviljelymenetelmää varten val-
mistetut maljat valettiin mahdollisimman pian valmistuksen jälkeen alus-
tojen pilaantumisen välttämiseksi. Maljojen valamista varten alustat tem-
peroitiin 45–50 °C:ssa. Valmiita maljoja säilytettiin pohja ylöspäin auto-
klaavipusseihin suljettuna jääkaapissa, josta ne otettiin lämpiämään huo-
neenlämpöön mikrobiviljelypäivän aamuna. Näytteiden homogenisointiin
ja laimennokseen käytettiin steriiliä Buffered Peptone Water -liuosta
(BPW).

7.4 Sentrifugointi, haihdutus ja Kjeldahl-menetelmä

Mädätysjäännöstä käsiteltiin dekantterilinkoa ja MVR-menetelmää simu-
loiden. Dekantterilinkoa simuloitiin Thermo Scientific Sorvall Lynx 4000 -
sentrifugilla, jolla mädätysjäännös eroteltiin neste- ja kiintojakeeksi. Tä-
män jälkeen nestejake, rejektivesi, konsentroidiin haihduttamalla keittole-
vyllä. Sekä konsentroidulle rejektivedelle että kiintoainekselle suoritettiin
Kjeldahl-menetelmällä (NMKL 6, 4 laitos, 2003) analyysit niiden sisältämän
kokonaistypen (N-tot) ja ammoniumtypen (NH₄-N) määrittämiseksi.

8 TYÖN TOTEUTUS – ENSIMMÄINEN KOE

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, voidaanko *E. coli* kasvu inhiboida säätämällä mädätysjäännöksen pH:ta emäksisempään suuntaan, ja että kuinka emäksiset olosuhteet tähän vaadittaisiin. Lisäksi haluttiin selvittää *E. coli* kasvun inhiboivalle pH-tasolle säädetyn, mädätysjäännöksestä prosessoidun, kiinto- ja nestejakeen kokonais- ja ammoniumtyppipitoisuus.

Kokeet suoritettiin Hämeen ammattikorkeakoulun (myöhemmin HAMK) Visamäen kampuksen B-rakennuksen laboratorioissa aikavälillä 11.–26.6.2018 Mikrobiologiset määritykset näyttivät kuitenkin kaikkien näytteiden *E. coli* -pitoisuudeksi 0 pmy ml⁻¹, joten määritykset päätettiin tehdä tältä osin uudestaan ajanjaksolla 3.–9.7.2018.

8.1 Titrauskoe

Pienelle näytemäärälle suoritettiin titrauskoe, jonka tarkoituksena oli määrittää laskennallinen NaOH-määrä myöhemmin suoritettavan pH-säätökokeen näytteille. Koe suoritettiin vetokaapin sijaan kohdeimun alla, sillä kokeessa käytetyt byretit olivat niin korkeita, että niiden mahdollinen vetokaappiin olisi ollut mahdotonta – puhumattakaan byrettien täyttämisestä vetokaapissa. Kokeessa käytettiin byrettien lisäksi CAT M5 magneettisekoitinta sekä WTW Inolab pH 720 -pH-mittaria, joka kalibroitiin ennen kokeen aloitusta käyttäen pH 7,00 ja pH 10,00 puskuriliuoksia. Jääkaapissa säilytettyä näytettä punnittiin koetta varten Mettler Toledo PB5001 -vaa’alla 200 grammaa kolmeen 250 ml:n dekantterilasiin.

Näytteiden aloitus-pH:n mittaamisen jälkeen niihin lisättiin vaahdonestoainetta, jonka tarkoituksena oli estää vaahdon muodostumista ja mittaus-ten vääristymistä säätökemikaalin tarttuessa vaahtokupliin ja jäädessä kelmumaan näytteen pinnalle. Vaahdoneston jälkeen näytteisiin annosteltiin NaOH:a byretillä tippa kerrallaan. Näytteen pH:n saavutettua arvon 8,00 byretistä merkattiin muistiin pinnan korkeus, jonka jälkeen pH-säätöä jatkettiin samoin metodein pH-arvoihin 9,00 ja 10,00.

NaOH-titrauksen (taulukko 3, s. 23) jälkeen näytteiden pH:t säädettiin takaisin neutraalille tasolle (pH 7,00) 16,63-massaprosenttisella rikkihapolla. Tässä merkattiin ylös vain rikkihapon kokonaiskulutus, sillä tarkemmat, näytekohtaiset, kulutukset aiottiin selvittää myöhemmässä työvaiheessa.

Taulukko 3. Määtysjäännöksen titrauskoe

Määtysjäännöksen titrauskoe							
Näyte	m (g)	pH alussa	NaOH (ml), kumulatiivinen			pH (1 h)	H ₂ SO ₄ (ml)
			pH 8,00	pH 9,00	pH 10,00		
1	201,5	7,57	2,00	8,90	28,15	10,07	31,95
2	200,0	7,63	1,30	8,00	26,00	10,06	14,20
3	200,0	7,68	1,30	7,80	26,35	10,05	10,40
Keskiarvo	200,50	7,63	1,53	8,23	26,83	10,06	12,30

Taulukosta voidaan huomata ensimmäiseen näytteeseen lisätyn rikkihapon määrän poikkeavan selvästi verrokinäytteistään, minkä vuoksi tulos merkattiin punaisella värillä. Titrauskokeen tulosten perusteella määritettiin laskennallinen näytteiden pH-säätöön tarvittavan NaOH:n määrä (taulukko 4).

Taulukko 4. 1 M NaOH:n laskennallinen tarve aloitus-pH:n ollessa 7,63

1 M NaOH:n laskennallinen tarve/200 ml määtysjäännöstä		
pH, aloitus	pH, tavoite	NaOH (ml/200 g), laskennallinen
7,63	8,00	1,53
	8,50	4,86
	9,00	8,21
	9,50	17,44
	10,00	26,76

8.2 Mikrobiologiset määritykset

Näytteille tehdyillä mikrobiologisilla määrittelyillä oli tarkoitus tutkia pH-säädön vaikutuksia *E. coli* -bakteerin kasvuun. Tässä eritellään määrittelyihin liittyneet, aseptisesti tehdyt, työvaiheet.

8.2.1 pH-säätö ja *E. coli* -ymppäys

Mikrobiologisia määrittelyjä varten näyte jaettiin Mettler Toledo PB5001 -vaa'alla 16:een 200 gramman erään (taulukko 5, s. 24). Alustava tarkoitus oli käyttää 18:aa 200 gramman erää, mutta sulatettu näytemäärä ei ollut tähän riittävä. Kirjallisuuskatsauksen perusteella voitiin olettaa, että kaikkein emäksisimmässä näytteessä *E. coli* kasvaisi huonosti, jos ollenkaan ja toisaalta pH-säätämättömän verrokinäytteen oletettiin olevan tasalaatuisia. Täten katsottiin, että määrittelyissä voitaisiin näiden kahden kohdalla tyytyä kahteen rinnakkaiseen näytteeseen. Lopputulemana sekä pH-säätämättömälle verrokkille että pH-arvoon 10,00 säädettävälle näytteelle saatiin kaksi rinnakkaista näytettä ja pH-arvoihin 8,00; 8,50; 9,00 sekä 9,50 säädettävälle näytteelle kolme rinnakkaista näytettä.

Taulukko 5. Määtysjäännöksen pH-säätö ja *E. coli* -ymppeys mikrobiologia määrittämiä varten

Ensimmäisen näyte-erän pH-säätö (pH alussa 7,36)					
Näyte	Näytteen pH (tavoite)	Näytemäärä (g)	NaOH (ml)/200 g	pH inkuboinnin (24 h/37 °C) jälkeen	16,63 m-% H ₂ SO ₄ (ml)/200 g
1	Säätämätön	200,7	0,00	7,80	1,20
2		200,3	0,00	7,81	1,20
3	8,00	201,7	1,53	7,81	1,98
4		200,0	1,53	7,83	2,00
5		200,0	1,53	7,86	2,00
6	8,50	200,0	4,86	8,16	2,65
7		200,2	4,86	8,26	2,65
8		200,0	4,86	8,27	2,65
9	9,00	200,1	8,21	8,63	2,95
10		200,2	8,21	8,66	2,95
11		200,1	8,21	8,58	2,95
12	9,50	200,4	17,44	9,27	4,04
13		200,0	17,44	9,31	4,05
14		200,1	17,44	9,36	4,05
15	10,00	200,8	26,76	9,74	6,13
16		199,9	26,76	9,77	6,15
* Rikkihapon ja NaOH:n määrät ilmoitettu millilitroina/200 g näytettä. Kokeessa rikkihapolla säädettyjen näytteiden massat olivat koetitrausten vuoksi 75 % alkuperäisen näytemäärän massaista.					

Näytteiden säilöpulloihin jakamisen jälkeen pulloihin pipetoitiin neljä tip-paa eli noin 100 µl vaahdonestoainetta. Tämän jälkeen pulloihin pipetoitiin aiemmin tehdyn titrauskokeen (taulukko 3, s. 23) perusteella lasketut mää-rät NaOH:a (taulukko 4, s. 23). Pulloja sekoitettiin kevyesti pH-säätökemi-kaalin tasaisen jakautumisen takaamiseksi. Näytteiden annettiin asettua noin tunnin verran ennen *E. colilla* ymppeämistä.

Näytteiden ymppeämiseen käytettiin St1:n Hämeenlinnan tuotantolaitok-selta eristettyä *E. coli* -kantaa. Ymppe siirrettiin pakastimesta jääkaappiin lämpiämään ymppeäspäivän aamuna. Ymppeampullin *E. coli* -pitoisuudeksi oli määritetty 136 000 000 pmy ml⁻¹, joten ymppeä täytyi laimentaa (kaava 1) koesuunnitteluvaiheessa lasketulla tavalla:

$$c_1 = \text{Ympin } E. coli \text{ -pitoisuus} = 136\,000\,000 \text{ pmy ml}^{-1}$$

$$c_2 = \text{Tavoiteltava } E. coli \text{ -pitoisuus} = 1\,000 \text{ pmy ml}^{-1}$$

$$V_1 = ?$$

$$V_2 = \text{Näytteen määrä} = 200 \text{ ml}$$

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2 \quad (1)$$

$$V_1 = \frac{c_2 * V_2}{c_1}$$

$$V_1 = \frac{1\,000 \frac{\text{pmy}}{\text{ml}} * 200 \text{ ml}}{136\,000\,000 \frac{\text{pmy}}{\text{ml}}} \approx 0,00147 \text{ ml}$$

Tämä vastaa noin 0,15 %:a millilitrasta, joten näytettä täytyi laimentaa kolmeen otteeseen ennen ymppäämistä (taulukko 6). Ympin täytyi riittää 14:ään näytteeseen, joten kolmatta laimennosta tehtiin kolme 10 millilitran erää.

Taulukko 6. *E. coli* -ympin laimentaminen

<i>E. coli</i> -ympin laimentaminen		
Laimennos	Laimennossuhde	Pitoisuus laimennoksen jälkeen (pmy/ml)
1	1:10	13 600 000
2	1:10	1 360 000
3	1:10	136 000

Kun viimeistä laimennosta pipetoitiin kuhunkin näytteeseen 1,5 millilitraa, saatiin näytteiden laskennalliseksi *E. coli* -pitoisuudeksi 1 020 pmy ml⁻¹, joka on melko lähellä Suomessa myytävillä ja käytettävillä lannoitevalmisteille säädettyä *E. coli* -pitoisuuden ylärajaa: 1 000 pmy ml⁻¹. Pipetoinnin jälkeen näytteitä sekoitettiin kevyesti ja niitä inkuboitiin 24 tuntia 37 °C:n lämpötilassa.

8.2.2 *E. coli* -pitoisuuden määrittäminen

Näytteiden *E. coli* -pitoisuuden oletettiin olevan suuri, joten näytteitä täytyi esikäsittellä ja laimentaa ennen maljaviljelyä. Esikäsittelyyn ja laimennokseen, sekä viljelyyn liittyvät työvaiheet suoritettiin aseptisesti Eviran (2012b) toimintaohjeen (LAB 728/1) mukaisesti. Sekä näytteiden homogenisoinnissa että laimennossarjoissa käytettiin laimennosliuoksena BPW-liuosta.

Ennen homogenisointia, laimennossarjojen valmistusta ja maljoille viljelyä täytyi näytteiden pH säätää takaisin neutraaliin arvoon (pH 7,00), sillä elatusaineena käytetty Chromocult Coliform Agar ES antaa luotettavan tuloksen vain näytteen pH:n ollessa välillä 6,80–7,20. Näytteiden pH-säätöä varten kustakin näytteestä punnittiin neljäsosa dekantterilasiin. Laseissa olevien näytteiden pH:t säädettiin kohdassa 8.1 (s. 22) esitetyn menetelmän mukaisesti titraten arvoon 7,00 jatkuvatoimisen pH-mittauksen ja magneettisekoittimen avulla. Ennen rikkihapon lisäämistä kuhunkin näytteeseen pipetoitiin neljä tippaa vaahdonestoainetta. Kun näytteiden pH:t saavuttivat tavoitearvon, merkittiin rikkihapon kulutus muistiin. Lopuksi kunkin näytteen pH-säätöön kuluneen rikkihapon määrä kerrottiin kolmella – näin saatu lukema vastaisi säilöpulloihin jäljelle jääneen näytemäärän vaatimaa rikkihappomäärää.

Säilöpulloihin pipetoitiin neljä tippaa vaahdonestoainetta ja laskennallinen määrä rikkihappoa. Näytteiden annettiin asettua ja niiden pH tarkistettiin pipetoimalla pieni määrä näytettä pH-paperille, jonka asteikko oli 5,5–9,0. Paperin mukaan jokaisen näytteen pH oli tavoitetasolla, joten pH-säädön voitiin katsoa onnistuneen.

Näytteiden homogenisointi suoritettiin Interscience MiniMix® -laitteella. Homogenisointia varten näytettä ja laimennosliuosta punnittiin steriiliin homogenisointipussiin 50 grammaa suhteessa 1:10 siten, että näytteen osuus oli viisi grammaa ja laimennosliuoksen osuus 45 grammaa kokonaismassasta. Homogenointiaikana käytettiin kahta minuuttia ja laitteen tehona max-arvoa.

Homogenisoitua näytettä pipetoitiin yksi millilitra koeputkeen, johon oli pipetointivaihetta valmisteltaessa pipetoitu 9 millilitraa BPW-liuosta. Tämän jälkeen koeputken sisältö sekoitettiin IKA Mixer Vortex MS2 -sekoittimella ja koeputkesta pipetoitiin yksi millilitra liuosta seuraavaan koeputkeen jatkaen samalla tavalla aina kuudenteen koeputkeen asti saaden koeputkien laimennoskertoimiksi 10^{-3} – 10^{-8} .

Laimennettujen näytteiden maljaviljely suoritettiin pintaviljelytekniikalla, käyttäen kullekin koeputkelle kahta rinnakkaista, laboratoriotöiden aloituspäivänä valmistettua, Chromocult-maljaa. Kunkin maljan reunalle pipetoitiin 0,1 millilitraa näytettä maljaa vastaavasta koeputkesta laimeimmasta näytteestä aloittaen – tällöin pipetin kärkeä ei tarvinnut vaihtaa siirryttäessä koeputkesta toiseen. Maljojen pinnalle pipetoitu näyte levitettiin steriloiduilla ja kertakäyttöisillä, L-kirjaimen muotoisilla muovisauvoilla aloittaen, sauvojen säästämiseksi, jälleen laimeimmasta näytteestä. Viljelyn jälkeen maljojen annettiin kuivua, kunnes niiden pinnat olivat silmämääräisesti tarkastellen kuivia. Lopuksi maljat pinottiin ylösalaisin käännettynä lämpökaappiin inkuboitumaan. Inkubointiaika oli 24 tuntia ja -lämpötila 37°C.

Inkuboinnin jälkeen maljoilla kasvaneiden pesäkkeiden huomattiin olevan väriltään läpikuultavia tai vaaleita, joten niiden todettiin olevan jotain muuta kuin *E. coli*a, jonka kuuluisi kasvaessaan muodostaa maljoille tumman sinisiä tai violetteja pesäkkeitä. Tässä vaiheessa voitiin todeta, että mikrobiologiset määritykset tulisi tehdä uudestaan, jos mahdolliset epäonnistumiseen johtaneet seikat olisi saatu kartoitettua. Epäonnistuneiden viljelmien määrittämättömien, gram-negatiivisten pesäkkeiden määrät kuitenkin laskettiin ja niiden perusteella määritettiin näytteille näiden gram-negatiivisten bakteerien pitoisuudet.

8.2.3 Kuiva-aineen ja orgaanisen kuiva-aineen määrittäminen

Kun näytteisiin 3–16 oli lisätty pH-säätöön tarvittava, laskennallinen, määrä NaOH:ia suoritettiin näytteille standardin SFS 3008 mukaiset määritykset kuiva-aineen ja orgaanisen kuiva-aineen pitoisuuden selvittämiseksi (taulukko 7, s. 27).

Taulukko 7. Ensimmäisen näyte-erän mädätysjäännösnäytteiden TS- ja VS-pitoisuudet

Mädätysjäännöksen kuiva-aineen (TS) ja orgaanisen kuiva-aineen (VS) määrittäminen				
			Keskiarvo	
Näyte	TS (%)	VS (%)	TS (%)	VS (%)
1	3,61	2,56		
2	3,67	2,60	3,64	2,58
3	3,69	2,58		
4	3,76	2,68		
5	3,70	2,60	3,72	2,62
6	3,72	2,56		
7	3,74	2,58		
8	3,65	2,50	3,70	2,55
9	3,64	2,45		
10	3,69	2,49		
11	3,75	2,52	3,69	2,49
12	3,76	2,43		
13	3,83	2,43		
14	3,82	2,42	3,80	2,43
15	3,79	2,43		
16	3,69	2,36	3,74	2,40

8.3 Dekantterilingon ja MVR:n simulointi

Mikrobiologisten määrittysten jälkeen mädätysjäännöstä prosessoitiin dekantterilinkoa ja MVR-menetelmää simuloiden, tavoitteena mahdollisimman totuudenmukaisen typpipitoisuuden määrittäminen sekä neste- että kiintojakeelle. Dekantterilingon simulointi toteutettiin sentrifugoimalla ja MVR-menetelmän simulointi haihduttamalla.

8.3.1 Sentrifugointi ja haihdutus

Kirjallisuuteen ja ensimmäisiin mikrobiologisiin määrittäksiin nojaten mädätysjäännöksen pH säädettiin bakteerien kasvun inhiboivalle tasolle. Kirjallisuuden perusteella pH 9,4 voisi olla riittävä *E. coli*n tuhoamiseksi, joten pH-arvoksi valittiin ensimmäisessä kokeessa gram-negatiivisten bakteerien kasvun estänyt ja siten lupaavalta vaikuttanut pH 9,27. Verrokkina käytettiin pH-säätämätöntä mädätysjäännöstä. Happamuustason säätö (taulukko 8, s. 28) toteutettiin jatkuvan pH-mittauksen ja magneettisekoituksen avulla käyttäen titrauslaitteena – titrauskokeesta poiketen – digitaalilla näytöllä varustettua Brand® Digital Bürette III bottle-top -byrettiä.

Taulukko 8. Määtysjäännöksen pH-säätö typpimäärityksiä varten

Määtysjäännöksen pH-säätö typpimäärityksiä varten			
	pH alussa	1 M NaOH (ml)	pH lopussa
pH-säädetty	7,55	97,85	9,27
pH-säätämätön	7,55		7,55

pH-säädön jälkeen näytteet jaettiin kuuteen 500 millilitran sentrifugiputkeen siten, että sekä pH-säädetyistä että -säätämättömistä näytteistä tuli kolme rinnakkaista putkea. Sentrifugiputket punnittiin saaden niiden massaksi tasaisesti noin 400 grammaa. Lopuksi näyteputket asetettiin Thermo Scientific Sorvall Lynx 4000 -sentrifugin roottoriin ja roottori kiinnitettiin paikalleen. Laitteen kierrosnopeudeksi asetettiin 12 000 rpm ja pyörimisajaksi 10 minuuttia. Kun näytteitä tultiin, noin 15–20 minuutin kuluttua, noutamaan huomattiin, että sentrifugi oli pysähtynyt ennen aikaansa. Syyksi selvisi putkien punnituksessa tapahtuneen epätarkkuuden vuoksi epätasaisesti jakautunut kuorma. Ennakoon kuitenkin tiedettiin, että sentrifugi todennäköisesti erottelisi jakeet jopa liian hyvin, joten näytteiden näyttäessä silmämääräisesti tarkasteltuna siltä, että ne olivat jakautuneet neste- ja kiintojakeeseen varsin kelpollisesti, päätettiin työtä jatkaa suunnitelman mukaisesti.

MVR:n simuloiminen suunniteltiin alun perin toteutettavaksi Rotavapor® -haihduttimella. Laitetta ei kuitenkaan kontaminaatoriskin vuoksi saatu lainaan toimeksiantajayrityksen laboratoriosta, joten simulointi toteutettiin haihduttamalla. Haihdutusta varten sentrifugilla kiintojakeesta erotetut nestejakeet kaadettiin 1 000 millilitran keittopulloihin siten, että pH-säädetyille ja -säätämättömälle näytteelle oli oma pullonsa. Kummankin näytteen massaksi punnittiin 700 grammaa ja keittopullojen asteikon mukaan näytteiden tilavuudet olivat lähellä 700 millilitraa. Nestejakeiden kuiva-ainepitoisuudet (taulukko 9) analysoitiin Precisa SM60 IR-kuivaimella lähtötason selvittämiseksi. Kuiva-ainepitoisuus analysoitiin myös haihdutuksen aikana ja haihdutuksen loputtua.

Taulukko 9. Precisa SM60 IR-kuivaimen ilmoittamat nestejakeen kuiva-ainepitoisuudet ennen haihdutusta, haihdutuksen aikana ja haihdutuksen jälkeen

Nestejakeen kuiva-ainepitoisuudet ennen haihdutusta, haihdutuksen aikana ja haihdutuksen jälkeen				
Näyte	Kuiva-ainepitoisuus (%)			
	Alussa	Tavoite	300 ml haihdutuksen jälkeen	Haihdutuksen loputtua
pH-säätämätön	0,96	14	2,15	13,37
pH-säädetty	1,58	14	2,45	17,68

Kuiva-ainepitoisuudessa päästiin pH-säätämättömän näytteen osalta lähelle tavoiteltua 14 %:n kuiva-ainepitoisuutta (St1 2018a) mutta pH-säädetyt näytteet kuiva-ainepitoisuus nousi liian suureksi. Tarkemman kuiva-ainepitoisuuden selvittämiseksi sekä neste- että kiintojakeelle suoritettiin haihdutuksen jälkeen standardin SFS 3008 mukaiset määritykset (taulukko 14, s. 39).

Haihdutus toteutettiin vetokaapissa magneettisekoitteen lämpölevyn avustuksella. Haihdutettavan nesteen määrä laskettiin (kaava 2) pH-säätämättömälle nestejakeelle seuraavalla tavalla (Internetix n.d.):

$$\frac{zM-x}{M-x} = y \quad (2)$$

$$\frac{0,9904M - x}{M - x} = 0,86$$

$$0,9904M - x = 0,86M - 0,86x$$

$$x = \frac{0,1304M}{0,14}$$

, missä

M = alkuperäinen kokonaismassa,
 x = haihdutettavan veden määrä ja
 y = tavoiteltava nestepitoisuus
 z = alkuperäinen nestepitoisuus

Tällöin haihdutettavan veden määräksi prosentteina alkuperäisen veden määrästä saatiin

$$\frac{\frac{0,1304M}{0,14}}{0,9904M} * 100 \% \approx 94,05 \%$$

Alkuperäisen veden massaksi saatiin siis

$$0,9904 * 700 \text{ g} = 693,28 \text{ g}$$

, alkuperäisen kuiva-aineen massaksi

$$(700 - 693,28) \text{ g} = 6,72 \text{ g}$$

ja haihdutettavan veden massaksi

$$0,9405 * 693,28 \text{ g} \approx 652,03 \text{ g}$$

Kun nesteen tiheyden oletettiin olevan 1 g ml^{-1} , saatiin haihdutuksen jälkeiseksi nestetilavuudeksi

$$(700 - 652,03 + 6,72) \text{ ml} = 54,69 \text{ ml} \approx 55 \text{ ml}$$

pH-säädetylle nestejakeelle laskutoimitukset olivat seuraavanlaiset:

$$\frac{0,9842M - x}{M - x} = 0,86$$

$$0,9842M - x = 0,86M - 0,86x$$

$$x = \frac{0,1242M}{0,14}$$

Tällöin haihdutettavan veden määräksi prosentteina alkuperäisen veden määrästä saatiin

$$\frac{\frac{0,1242M}{0,14}}{0,9842M} * 100 \% \approx 90,14 \%$$

Alkuperäisen veden massaksi saatiin siis

$$0,9842 * 700 \text{ g} = 688,94 \text{ g}$$

, alkuperäisen kuiva-aineen massaksi

$$(700 - 688,94) \text{ g} = 11,06 \text{ g}$$

ja haihdutettavan veden massaksi

$$0,9014 * 688,94 \text{ g} \approx 621,01 \text{ g}$$

Kun nesteen tiheyden oletettiin olevan 1 g ml^{-1} , saatiin haihdutuksen jälkeiseksi nestetilavuudeksi

$$(700 - 621,01 + 11,06) \text{ ml} = 90,05 \text{ ml} \approx 90 \text{ ml}$$

Haihdutuksessa käytetyt keittopullot olivat varsin suuria, joten nestepinnan laskiessa alemmas näytteet siirrettiin pienempiin pulloihin, joista ne nestepintojen laskiessa siirrettiin vielä pienempiin pulloihin. Näin nestepinnan korkeutta pystyttiin tarkkailemaan paremmin.

Ennen haihdutusta keittopulloihin lisättiin vaahdonestoa ja haihdutuksen aikana sitä jouduttiin lisäämään useaan otteeseen. Tästä huolimatta pH-säädetyistä näytteistä erotettu nestejake vaahtosi jatkuvasti hankaloittaen nestepinnan tarkkailua. Haihdutuksen lopuksi huomattiin, että pH-säädetyistä näytteistä oli haihtunut hieman liikaa nestettä, jolloin näytteen kuiva-ainepitoisuus nousisi jonkin verran tavoitearvoa korkeammaksi. Tämän ei kuitenkaan uskottu vaikuttavan typpipitoisuuden määrittämisessä saataviin tuloksiin merkittävästi.

8.3.2 Typpipitoisuuden määrittäminen

Sentrifugoinnin ja haihdutuksen jälkeen näytteille suoritettiin kokonaistyyppipitoisuuden määrittäminen Kjeldahl-menetelmällä. Työvaihe aloitettiin asettamalla 15 Kjeldahl-putkea telineeseen ja annostelemalla niihin pieni määrä kiehumakiviä. Tämän jälkeen putket asetettiin yksitellen vaakalle pystyasentoon, vaaka taarattiin ja putkiin punnittiin noin 1-2 grammaa kutakin näytettä siten, että jokaisesta näytteestä tuli kolme rinnakkaista putkea. Näytteiden tarkat painot kirjattiin muistiin. Seuraavaksi jokaiseen näytettiin sisältävään putkeen mitattiin mittalasilla 45 millilitraa RO-vettä, sekä kahteen tyhjään putkeen 50 millilitraa RO-vettä ja yhteen 50 millilitraa 10-prosenttista glysiiniä (standardi). Lopuksi kuhunkin Kjeldahl-putkeen lisättiin yksi Kjeldahl-tabletti ja 8,00 millilitraa väkevää (93 %) rikkihappoa. Lopuksi putket asetettiin vetokaappiin sijoitettuna, FOSS Labtec™ Line Digestorista ja SR 210 Scrubberista koostuvaan, Kjeldahl-polttolaitteeseen. Näytteiden polton ja jäähtymisen jälkeen näytteiden sisältämä kokonaistyyppi määritettiin FOSS Kjeltec™ 8400 Tecator™ Line -tisluslaitteella. Tässäkin vaiheessa käytettiin näyteputkien lisäksi kahta pelkkää RO-vettä sisältävää putkea ja yhtä pelkkää glysiiniä sisältävää standardiputkea.

Kokonaistyyppipitoisuuden määrittämisen jälkeen näytteille tehtiin ammoniumtyppimääritykset samaisella tisluslaitteistolla. Kutakin näytettä punnittiin Kjeldahl-putkiin noin 2–3 grammaa, jonka jälkeen putkiin mitattiin jälleen 45 millilitraa RO-vettä. Lisäksi kahteen tyhjään putkeen mitattiin 50 millilitraa RO-vettä ja yhteen standardiputkeen 50 millilitraa ammoniumsulfaattiliuosta.

9 TYÖN TOTEUTUS – TOINEN KOE

Kokeellisen osuuden mikrobiologiset määritelmät päätettiin tehdä uudelleen, sillä ensimmäisen, pintaviljelymenetelmällä tehdyn, maljaviljelyn todettiin epäonnistuneen – maljoilla kasvaneiden bakteeripesäkkeiden todettiin olleen *E. coli*n sijaan muita, määrittämättömiä gram-negatiivisia pesäkkeitä. Tarpeettoman toistamisen välttämiseksi toisiin mikrobiologisiin määrittäisiin liittyneet työvaiheet käydään läpi tyypistetysti.

Uusien määrittäysten onnistumiseksi mahdolliset aiempien määrittäysten epäonnistumiseen johtaneet seikat käytiin läpi toimeksiantajayrityksen tutkimusinsinööri Tarmo Hautalaa konsultoiden. Epäonnistumisen todettiin todennäköisesti johtuneen joko inkuboinnin jälkeisen pH-säädön tai ympäryksen epäonnistumisesta – myös pintaviljelymenetelmän soveltuvuutta epäiltiin. Uudet määrittäykset päätettiin tehdä pintaviljelymenetelmän sijaan maljavaluna ja ympin *E. coli* -pitoisuus päätettiin tarkistaa tekemällä viljely myös siitä. Lisäksi rikkihapolla toteutettavaan, inkuboinnin jälkeiseen, pH-säätöön päätettiin kiinnittää erityistä huomiota.

Uudet määrittäykset aloitettiin hakemalla uusi näyte-erä St1:n Hämeenlinnan tuotantolaitokselta. Näytettä otettiin kaksi kahden litran näytepurkista kohdan 7.1 (s. 20) mukaisin, aseptisin metodein. Tällä kertaa päätettiin viljelyiden määrän vähentämiseksi käyttää kunkin näytteen kohdalla kolmen sijaan kahta rinnakkaista näytettä. Ennen pH-säätöä ja ympäristä näytteitä säilytettiin vuorokauden verran HAMK:n kellarissa sijaitsevan laboratorion jääkaapissa. Näytteiden aloitus-pH (7,65) oli lähestulkoon identtinen aiemman näyte-erän (pH 7,63) kanssa, joten pH-säätö (taulukko 10) päätettiin toteuttaa aiempien laskelmien mukaisesti (taulukko 4, s. 23).

Taulukko 10. Toisen näyte-erän pH-säätö

Toisen näyte-erän pH-säätö (pH alussa 7,65)					
Näyte	Näytteen pH (tavoite)	Näyttemäärä (g)	NaOH (ml)/200 g	pH inkuboinnin (24 h/37 °C) jälkeen	16,63 m-% H ₂ SO ₄ (ml)/200 g
1	Säätämätön	200,00	0,00	8,10	1,73
2		200,00	0,00	8,12	1,73
3	8,00	200,00	1,53	8,23	1,73
4		200,00	1,53	8,37	2,13
5	8,50	204,50	4,86	8,63	2,48
6		200,00	4,86	8,63	2,53
7	9,00	200,00	8,21	9,12	3,33
8		200,10	8,21	9,05	3,33
9	9,50	200,10	17,44	9,64	5,73
10		200,00	17,44	9,63	5,73
11	10,00	202,80	26,76	9,90	7,23
12		200,10	26,76	9,74	7,33

* Rikkihapon ja NaOH:n määrät ilmoitettu millilitroina/200 g näytettä. Kokeessa rikkihapolla säädettyjen näytteiden massat olivat koetitrausten vuoksi 75 % alkuperäisen näyttemäärän massoista.

pH-säädön jälkeen näytteille suoritettiin standardin SFS 3008 mukaiset määritykset TS- ja VS-pitoisuuden selvittämiseksi (taulukko 11) ja näytteille suoritettiin *E. coli* -ympäys, jonka jälkeen näytteitä inkuboitii 24 tuntia 37 °C:ssa.

Taulukko 11. Toisen näyte-erän mädätysjäännöksen TS- ja VS-pitoisuus

Mädätysjäännöksen kuiva-aineen (TS) ja orgaanisen kuiva-aineen (VS) pitoisuus				
			Keskiarvo	
Näyte	TS (%)	VS (%)	TS (%)	VS (%)
1	3,27	2,24		
2	3,18	2,23	3,23	2,23
3	3,20	2,18		
4	3,35	2,28	3,27	2,23
5	3,32	2,26		
6	3,33	2,28	3,33	2,27
7	3,44	2,36		
8	3,39	2,31	3,42	2,33
9	3,53	2,27		
10	3,54	2,44	3,54	2,36
11	3,43	2,13		
12	3,43	2,22	3,43	2,18

E. colilla ympättyjen näytteiden inkuboinnin jälkeen kustakin näytteestä punnittiin edellisen näyte-erän pH-säädön mukaisesti neljäsosa pH-säätötestiin käytettäväksi. Testin tarkoituksena oli määrittää se rikkihapon määrä, jolla näytteiden pH saataisiin asettumaan mahdollisimman lähelle arvoa 7,00. Testissä käytettiin jatkuvatoimista pH-mittausta ja magneettisekoitusta. Tavoite-pH:n saavuttamisen jälkeen käytetty rikkihapon määrä kirjattiin muistiin ja se kerrottiin kolmella. Täten saatiin selville jäljelle jääneen näytemäärän vaatima rikkihapon määrä.

Rikkihapon näytteisiin pipetoinnin jälkeen näytteitä sekoitettiin kevyesti ja niiden annettiin asettua hetken. Näytteiden pH:t tarkistettiin pH-paperilla ja näytteitä punnittiin kahden näytteen erissä 5 g/45 g BPW-liuosta homogenointia varten. Homogenoinnin jälkeen näytteestä tehtiin laimennossarjat ja kutakin laimennosta pipetoitiin petrimaljalalle yksi millilitra käyttäen kahta rinnakkaista maljaa. Maljoille pipetoitujen näytteiden päälle kaadettiin noin 15 millilitraa lämpöhauteessa 47 °C:n lämpötilaan säädettyä Chromocult-elatusainetta. Maljoja sekoitettiin kevyesti kahdeksikon muotoista rataa pyörittäen. Maljojen annettiin asettua tasaisella alustalla sen aikaa, että elatusaine jähmettyi. Kun kaikki näytteet oli saatu valettua, tehtiin ympistä laimennossarja ympin *E. coli* -pitoisuuden määrittämiseksi. Ympä valettiin maljoille näytteiden tavoin. Alustojen jähmettyttyä ne pinottiin lämpökaappiin ylösalaisin ja niitä inkuboitii 24 tuntia 37 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen huomattiin maljoilla olevan tumman sinisiä *E. coli* -pesäkkeitä, joten viljelyjen todettiin onnistuneen edellisistä paremmin.

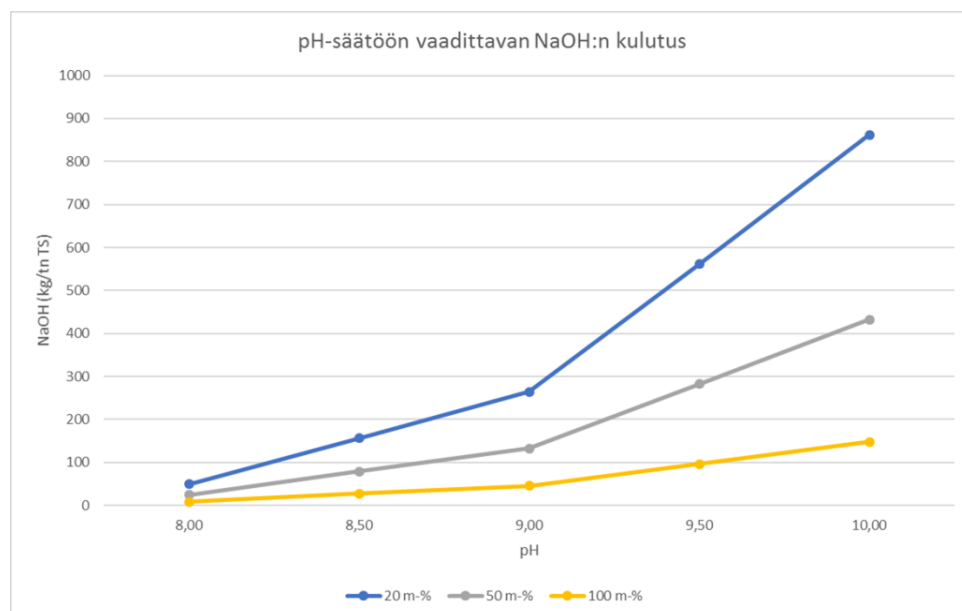
10 TULOKSET

Tässä luvussa esitetään HAMK:n laboratoriossa suoritettujen määritysten tulokset ja tuloksista tehdyt havainnot. Tulokset esitetään joko taulukoin, graafisesti tai kuvin.

10.1 pH-säädön vaikutus *E. coli*n

Mädätysjäännöksen pH-säädön *E. coli*n kasvua inhiboivia vaikutuksia tarkasteltiin ensimmäisessä kokeessa pintaviljelytekniikalla suoritettulla maljaviljelyllä. Toisessa kokeessa viljelyt päädyttiin tekemään pintaviljelyn sijaan maljavaluna.

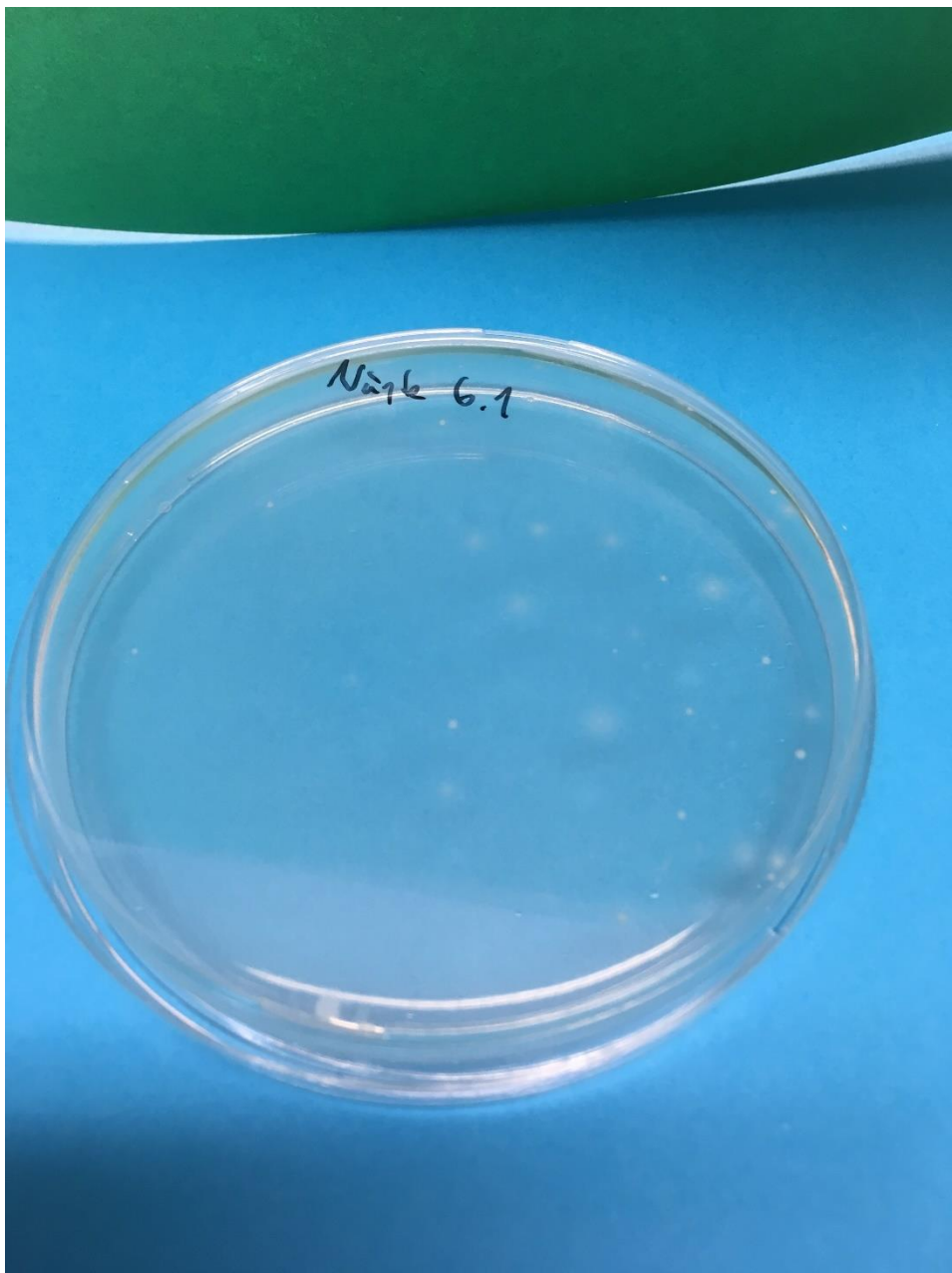
pH-säädössä käytetyn 1 M NaOH:n kulutuksen perusteella laskettiin pH-säätöön tarvittavan NaOH:n määrät, mikäli käytössä olisi 20, 50 tai 100 massaprosenttinen NaOH (kuva 8).



Kuva 8. pH-säätöön tarvittavan NaOH:n kulutus kilogrammoina kuiva-ainetonna kohden.

10.1.1 Ensimmäinen koe – pintaviljelytekniikka

Maljaviljely osoittautui epäonnistuneeksi, sillä maljoilla ei kasvanut ainutakaan tumman sinisenä tai violetina esiintyvää *E. coli* -pesäkettä. Sen sijaan maljoilla kasvoi muiden gram-negatiivisten bakteerien muodostamia värittömiä ja läpikuultavia pesäkkeitä (kuva 9, s. 35). Maljaviljelyn laimennuskertoimet olivat 10^{-3} – 10^{-8} .



Kuva 9. Gram-negatiivisia pesäkkeitä petrimaljalla laimennoskertoimen ollessa 10^{-3} .

Maljoilla kasvaneet pesäkkeet kuitenkin laskettiin ja niiden perusteella määritettiin maljojen bakteeripitoisuus (pmy mg^{-1}). Pitoisuudet on esitetty taulukossa 12 (s. 36).

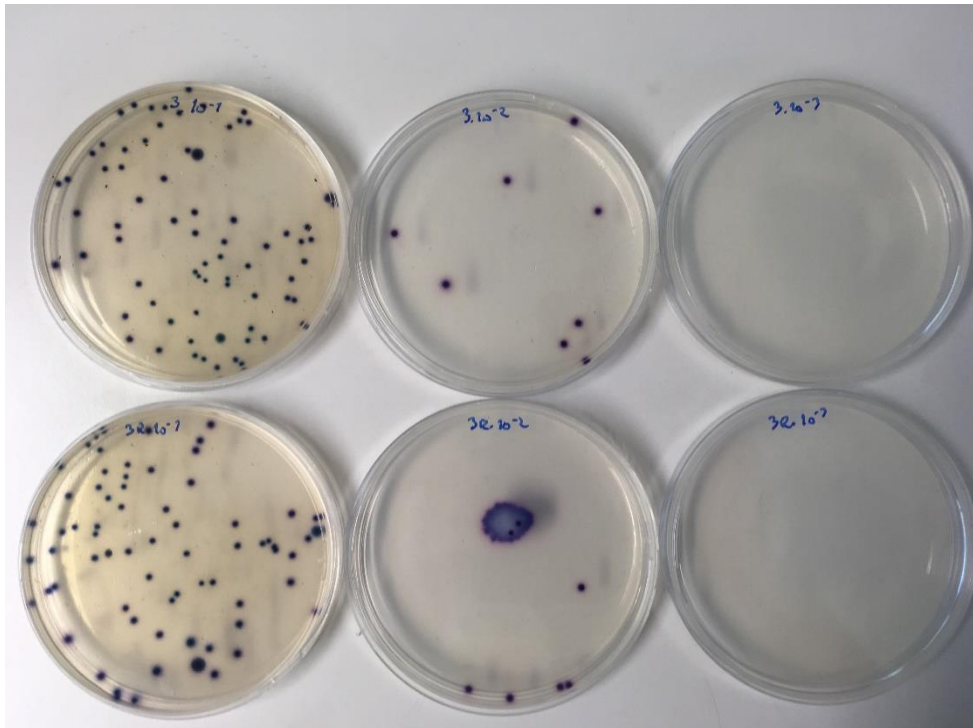
Taulukko 12. Ensimmäisen näyte-erän pH-säädettyjen näytteiden gram-negatiivisten bakteerien pitoisuus

Näytteiden bakteeripitoisuus			
Näyte	pH	(pmy/mg)	Keskiarvo
1	7,80	47273	
2	7,81	55000	51136
3	7,81	10000	
4	7,83	0	
5	7,86	36000	23000
6	8,16	33000	
7	8,26	8000	
8	8,27	0	20500
9	8,63	12000	
10	8,66	8500	
11	8,58	14000	11500
12	9,27	0	
13	9,31	0	
14	9,36	0	0
15	9,74	0	
16	9,77	0	0

Pesäkelaskennassa jätettiin huomiotta kaikki alle viiden pesäkkeen maljat, sillä niin pienet pesäkemäärät saattavat johtua esimerkiksi ilman mukana näytteisiin päätyneistä epäpuhtauksista tai maljaviljelyyn tai pipetointiin liittyvistä virheistä. Lisäksi pitoisuuksien keskiarvoja laskettaessa jätettiin huomiotta selvästi poikkeavat rinnakkaisnäytteet (näyte 4 ja näyte 8).

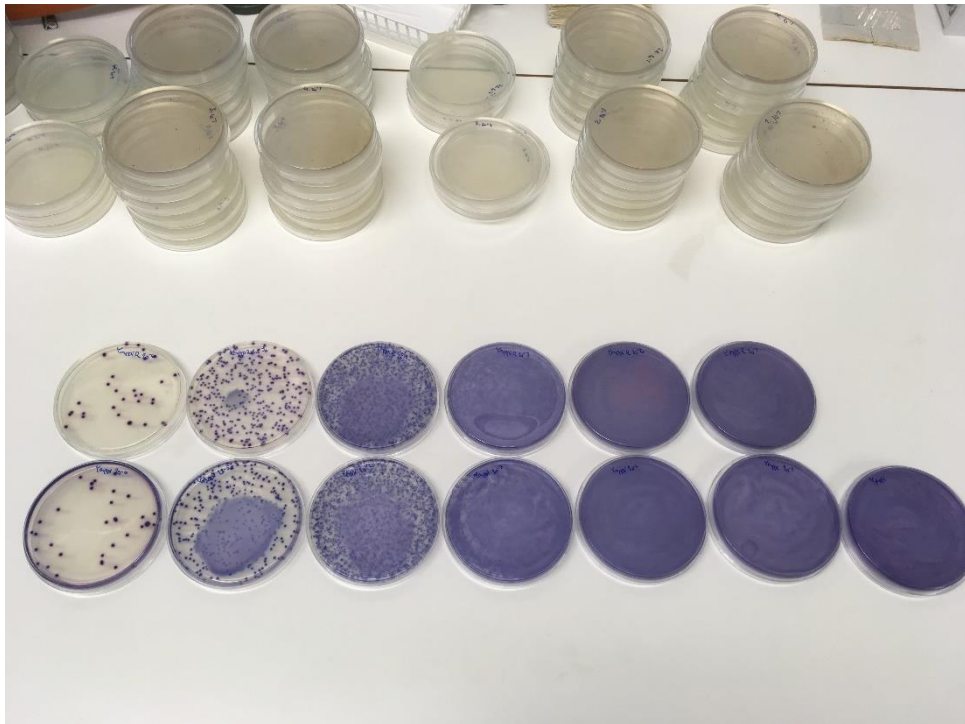
10.1.2 Toinen koe – maljavalutekniikka

Toisen näyte-erän maljaviljely suoritettiin maljavalutekniikalla. Viljelyssä käytetyt laimennoskertoimet olivat 10^{-1} – 10^{-6} . Lisäksi suoritettiin maljavalu *E. coli* -ympille käyttäen laimennoskertoimia 10^0 – 10^{-6} . Tällä kertaa osalle maljoista saatiin selkeitä, tumman sinisiä *E. coli* -pesäkkeitä (kuva 10, s. 37).



Kuva 10. Kolmannen näytteen ja tämän rinnakkaisviljelmän *E. coli* -pesäkkeitä maljoilla laimennuskerrointen ollessa 10^{-1} – 10^{-3} .

Pesäkkeiden määrät olivat kuitenkin maljoilla varsin vähäisiä ja epäjohdonmukaisia (taulukko 13, s. 38). Tämä johtunee osittain siitä, että ympin *E. coli* -pitoisuus osoittautui huomattavasti luultua pienemmäksi: ympin *E. coli* -pitoisuus oli $136\,000\,000\text{ pmy mg}^{-1}$ sijaan vain $30\,500\,000\text{ pmy mg}^{-1}$. Pesäkkeiden vähäinen määrä saattoi toki johtua myös siitä, että *E. coli* kasvu oli onnistuttu inhiboimaan pH-säädöllä tehokkaasti. Ympistä tehty viljelmä on nähtävissä kuvassa 11 (s. 38).



Kuva 11. *E. coli* -ympistä tehty viljelmä (alempi) ja sen rinnakkaisviljelmä (ylempi) laimennoskertoimin 10^{-6} – 10^0 ja 10^{-6} – 10^{-1} .

Viljelmistä tehdyn pesäkelaskennan perusteella näytteille laskettiin *E. coli* -pitoisuudet. Tulokset on esitetty taulukossa 13. Ympin huomattavasti ennakkotietoa ($136\,000\,000\text{ pmy ml}^{-1}$) vähäisemmän *E. coli* -pitoisuuden vuoksi näytteiden ympppäämisen jälkeiseksi *E. coli* -pitoisuudeksi saatiin vain noin 230 pmy ml^{-1} . Kun tätä vertaa näytteiden 3 ja 6 (taulukko 13) *E. coli* -pitoisuuteen voidaan todeta, että bakteerin kasvu on ollut näytteissä likimain olematonta.

Taulukko 13. Toisen näyte-erän pesäkelaskennan tulokset

<i>E. coli</i> -pitoisuus		
Näyte	pH	(pmy/mg)
1	8,10	0
2	8,12	0
3	8,23	700
4	8,37	0
5	8,63	0
6	8,63	209
7	9,12	0
8	9,05	0
9	9,64	0
10	9,63	0
11	9,90	0
12	9,74	0
Ymppi	Ei mitattu	30 500 000

10.2 Konsentroidun rejektiveden ja kiinteän maanparannusaineen typpipitoisuus

Mädätysjäännöksestä sentrifugilla erotellusta kiinto- ja nestejakeesta analysoitiin sekä kokonais- että ammoniumtyppipitoisuus. Analyysijä varten nestejakea konsentroidiin haihduttamalla tavoitteena tuoteselosteen (St1 2018a) mukainen 14 % kuiva-ainepitoisuus. Jakeiden, standardin SFS 3008 mukaan tehtyjen analyysien mukaiset, kuiva-ainepitoisuudet on esitetty taulukossa 14.

Taulukko 14. Mädätysjäännöksen kiintojakeen ja konsentroidun nestejakeen TS- ja VS-pitoisuus

Mädätysjäännöksen kiinto- ja nestejakeen kuiva-aineen (TS) ja orgaanisen kuiva-aineen (VS) määrittäminen							
			Keskiarvo				
			TS (%)	VS (%)	TS (%)	VS (%)	VS/TS (%)
Nestejake	pH-säätämätön	7	12,91	5,37			
		8	13,96	6,37			
		9	14,59	7,28	13,82	6,34	45,88
	pH-säädetty	10	15,48	6,06			
		11	15,61	6,54			
		12	15,85	6,54	15,65	6,38	40,78
Kiintojake	pH-säätämätön	1	16,16	13,45			
		2	16,23	13,55			
		3	16,37	13,61	16,25	13,54	83,29
	pH-säädetty	4	15,34	12,37			
		5	15,31	12,36			
		6	15,43	12,46	15,36	12,40	80,71

Nestejakeen kuiva-ainepitoisuudessa päästiin keskimäärin varsin lähelle tavoitteena ollutta, tuoteselosteen mukaista 14 %:n kuiva-ainepitoisuutta, vaikkakin pH-säädetyin nestejakeen kuiva-ainepitoisuus pääsi nousemaan hieman liian suureksi haihdutuksessa esiintyneen vaahtoamisen ja siitä seuranneen nestepinnan laskun tarkkailun vaikeutumisen vuoksi. Myös nestejakeen orgaanisen aineen osuus kuiva-aineesta (VS/TS) asettui varsin lähelle tavoitteena ollutta 45 prosenttia.

Kiintojakeen kohdalla tavoitteena oli 80 prosenttia sekä kosteuspitoisuuden että VS/TS-suhteen osalta (St1 2018b). Kosteuspitoisuus jäi hieman tavoiteltua suuremmaksi kuiva-ainepitoisuuden jäädessä 20 prosentin sijaan noin 16:een (pH-säätämätön) ja 15:een (pH-säädetty) prosenttiin. VS/TS-suhteen osalta kuitenkin päästiin lähelle tavoitetta. Kiintojakeiden koostumus oli kuitenkin silmin nähden varsin vetistä johtuen siitä, että kokeessa ei käytetty flokkautumista parantavaa polymeeria.

Kaiken kaikkiaan, käytössä olleiden menetelmien epätarkkuus huomioon ottaen, sekä kiintojakeen että konsentroidun nestejakeen koostumuksien voitiin katsoa vastanneen tavoitteita erittäin hyvin. Jakeiden kokonaistypipitoisuudet on esitetty taulukossa 15 (s. 40).

Taulukko 15. Sentrifugilla erotellun ja haihduttamalla konsentroidun nestejakeen sekä kiintojakeen kokonaistyyppipitoisuus

Kokonaistyyppi, pH-säädetty ja -säättämätön kiinto- ja nestejake					
		Näyte	mgN/g, kerroinkorjattu	gN/kg ka	gN/kg ka, keskiarvo
Nestejake	pH-säättämätön	1	4,3749	31,66039	
		2	4,1193	29,81032	
		3	4,2534	30,78088	30,7505
	pH-säädetty	4	6,0780	38,84593	
		5	0,0000	0,00000	
		6	6,0331	38,55916	38,7025
Kiintojake	pH-säättämätön	7	13,4353	82,66132	
		8	13,8709	85,34178	
		9	14,1088	86,80550	84,9362
	pH-säädetty	10	11,7850	76,72534	
		11	11,9173	77,58672	
		12	11,7819	76,70528	77,0058

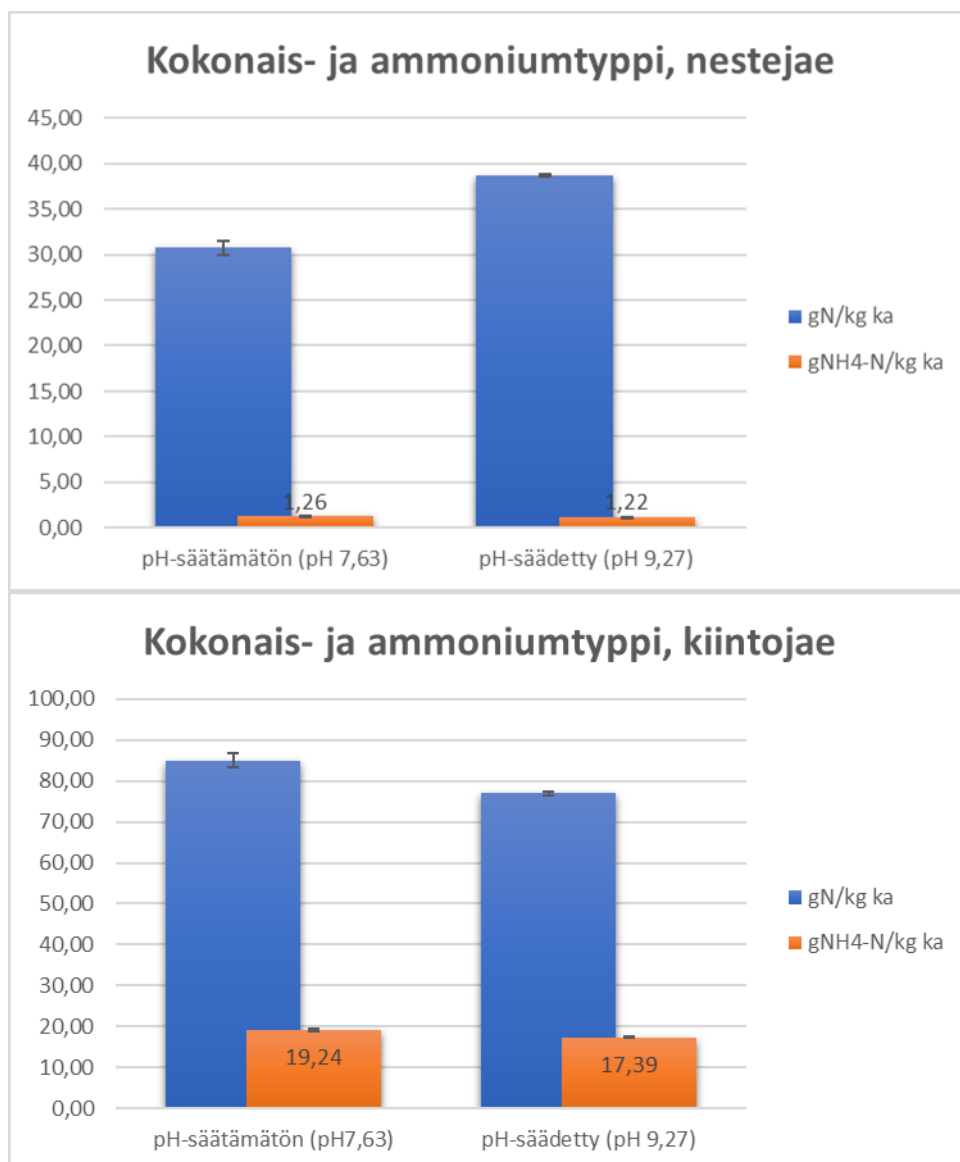
Tuoteselosteen mukainen tavoite sekä konsentroidun nestejakeen että kiintoaineksen kokonaistyyppipitoisuudelle oli 85 gN/kg ka. Tavoitteesta jäätiin konsentroidun nestejakeen tapauksessa selkeästi, mutta kiintojakeen tapauksessa tavoitteen voidaan katsoa toteutuneen.

Kokonaistyyppipitoisuuden määrittämisen jälkeen jakeista haluttiin selvittää myös ammoniumtyypipitoisuus. Analyysien tulokset on esitetty taulukossa 16.

Taulukko 16. Sentrifugilla erotellun ja haihduttamalla konsentroidun nestejakeen sekä kiintojakeen ammoniumtyypipitoisuus

Ammoniumtyppi, pH-säädetty ja -säättämätön kiinto- ja nestejake					
		Näyte	mgNH ₄ -N/g, kerroinkorjattu	gNH ₄ -N/kg ka	gNH ₄ -N/kg ka, keskiarvo
Nestejake	pH-säättämätön	1	0,1947	1,40865	
		2	0,1633	1,18146	
		3	0,1647	1,19159	1,2606
	pH-säädetty	4	0,1895	1,21098	
		5	0,1959	1,25191	
		6	0,1877	1,19967	1,2209
Kiintojake	pH-säättämätön	7	3,1138	19,15767	
		8	3,1995	19,68494	
		9	3,0664	18,86648	19,2364
	pH-säädetty	10	2,7035	17,60110	
		11	2,6828	17,46585	
		12	2,6262	17,09754	17,3882

Neste- ja kiintojakeen kokonais- ja ammoniumtypen määrät on esitetty graafisesti kuvassa 12 (s. 41). pH-säädetyt näytteet pH-säättämätöntä korkeampi kokonaistyyppipitoisuus voi selittyä sillä, että pH-säätö on liukoistanut näytteestä jotain ei-ammoniumtyppeä (Kannisto 2018). Erot kokonaistyyppipitoisuuksissa voivat selittyä myös sillä, että näytteitä sentrifugoitiin liian lyhyen ajan, jolloin mädätysjäännöksen tyyppi ei jakautunut neste- ja kiintojakeen kesken odotusten mukaisesti.



Kuva 12. Neste- ja kiintojakeen kokonais- ja ammoniumtypen määrät.

11 TULOSTEN TARKASTELU, POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Työn kokeellinen osuus oli monivaiheinen ja haastava, mutta erittäin mielenkiintoinen ja opettavainen – tulihan työn puitteissa työskenneltä laboratorioissa todennäköisesti enemmän kuin mitä koko opiskeluaikana yhteensä. Työn edetessä tehtiin aikataulussa pysymistä silmällä pitäen useita yksittäisiä ratkaisuja, jotka vaikuttivat osaltaan työn lopputulokseen.

Työn tulosten perusteella *E. coli* kasvu näyttäisi olevan NaOH:lla säädettyssä mädätysjäännöksessä heikkoa tai olematonta. Tuloksien luotettavuutta arvioitaessa täytyy kuitenkin huomioida, että ympin *E. coli* -pitoisuus poikkesi lähtötiedoista huomattavasti ollen 136 000 000 pmy ml⁻¹ sijaan vain 30 500 000 pmy ml⁻¹. Tästä syystä, luonnollisesti, näytteiden ympppäämisen jälkeinen *E. coli* -pitoisuus jäi vain noin yhteen neljäsosaan tavoitellusta 1 000 pmy ml⁻¹ -pitoisuudesta. Lisäksi näytteiden maljaviljelystä edeltänyt, rikkihapolla toteutettu, pH-säätö saattoi joidenkin näytteiden kohdalla jäädä Chromocult -kasvatusalustan vaatiman pH -alueen (pH 6,80–7,20) ulkopuolelle, sillä lopulliset pH-arvojen tarkistukset tehtiin aseptisuuden vuoksi pH-paperilla. Tarkistuksessa käytetyn pH-paperin skaala oli 5,5–9,0, eikä täten välttämättä riittävän tarkka. Tämän epäluotettavuustekijän poistamiseksi näytteitä olisikin ollut hyvä tutkia jollain vaihtoehtoisella, vähemmän pH-arvosta riippuvaisella, elatusalustalla. Työ sisälsi myös erittäin paljon käsin tehtyä pipetointia, mikä puolestaan voi tuoda mukanaan sekä pipettien tarkkuuteen liittyviä kysymyksiä että inhimillisten virheiden mahdollisuuksia.

Konsentroidun rejektiveden ammoniumtyyppipitoisuus oli erittäin pieni ja kokonaistyyppipitoisuus jäi huomattavasti alle tavoitetason. Tyyppipitoisuuksien määrittämisessä epätarkkuustekijät liittyvät pitkälti käytettyihin menetelmiin, joita olivat sentrifugointi ja haihduttaminen. Haihduttamisessa epätarkkuus korostui, sillä haihdutettavan nesteen määrä oli laskennallisesti selvitetty ja nestepinnan tarkkailu toteutettiin silmämääräisesti keittopullojen mitta-asteikkoja apuna käyttäen. pH-säädetyt näytteen kokonaistyyppipitoisuus oli ennako-odotuksista poiketen pH-säätämätöntä verrokkia suurempi. Tämä saattaa johtua esimerkiksi pH-säädön aiheuttamasta näytteen ei-ammoniumtypen liukoistumisesta. On myös mahdollista, että näytteitä ei onnistuttu jakamaan sentrifugoimalla kiinto- ja nestejakeeseen riittävän hyvin. Tästä indikoisi pH-säädetyt näytteen, sentrifugoinnin jälkeinen, yllättävän suuri kuiva-ainepitoisuus. Kiintojakeen osalta kokonaistyyppipitoisuus vastasi tavoitteita varsin tarkasti ja ammoniumtyyppipitoisuus vaikutti jopa yllättävän suurelta.

Kaiken kaikkiaan laboratoriokokeiden ja kirjallisuuden perusteella voidaan todeta pH-säädön olevan käytännössä toimimaton lähestymistapa hygieniangelman ratkaisemiseksi, sillä Small, Blankenhorn, Welty, Zinser & Slonczewski (1994) ovat todenneet *E. coli* kykenevän sopeutumaan hyvinkin happamiin ja emäksisiin olosuhteisiin ja toisaalta pH-säätö vaatisi

huomattavia määriä pH-säätökemikaalia (kuva 8, s. 34). pH-säädön vaikutuksista lannoitetuotteiden typpipitoisuuteen ei laboratoriokokeiden perusteella voida vetää suoranaisia johtopäätöksiä, sillä käytetyt menetelmät poikkesivat laitoksen prosesseista varsin paljon. Teoriatasolla voidaan kuitenkin todeta, että pH-tason nosto lisää lannoitteen typen haihtumista ammoniakkinä. Alentunut typpipitoisuus aiheuttaa pH-säädetyä, konsentroidun rejektiveden lannoitearvon alenemista.

Hygieniäongelman kestäväksi ratkaisumenetelmäksi voidaan ehdottaa bakteerin varmasti tuhoavaa 70 °C:n lämpötilassa tapahtuvaa, tunnin kestävää lämpökäsittelyä, jonka tulisi tapahtua mädätysreaktorin jälkeen, mutta ennen mädätysjäähdytyksen jatkoprosessointia. Lisäksi olisi hyvä tutkia struviitin talteenottomenetelmän, kuten Ostara Pearl®:n ja siihen liitetyn WASSTRIP® (Waste Activated Sludge to Remove Internal Phosphorous) -laitteiston käyttökelpoisuutta osana prosessihygienian takaamista (Ostara Pearl® n.d.).

LÄHTEET

Adven (n.d). Biopolttoaineiden tuotantoa voidaan tehostaa – Biokraft AS ja Adven Oy aloittavat yhteistyön Norjassa. Haettu 6.6.2018 osoitteesta https://www.adven.fi/fi/uutishuone/ajankohtaista/biopolttoaineiden-tuotantoa-voidaan-tehostaa-biokraft-ja-adven-oy-aloittavat-yhteistyon-norjassa/?ccm_paging_p_b2026=6

Aidelberg, G., Towbin, B. D., Rothschild, D., Dekel, E., Bren, A. & Alon, U. (2014). Hierarchy of non-glucose sugars in *Escherichia coli*. *BMC systems biology*, 8(1), 133. Haettu 16.5.2018 osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4304618/>

Bagge, E. (2009). *Hygiene aspects of the biogas process with emphasis on spore-forming bacteria* (Vol. 2009, No. 28). Haettu 30.4.2018 osoitteesta <https://pub.epsilon.slu.se/1980/>

Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S. & Janssen, R. (2008). Biogas handbook Esbjerg. *Denmark, October*. Haettu 6.6.2018 osoitteesta <http://www.lemvigbiogas.com/BiogasHandbook.pdf>

Carrington, E. G. (2001). Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction – final report. *European Commission report no. CO, 5026.1*. Haettu 1.5.2018 osoitteesta http://ec.europa.eu/environment/archives/waste/sludge/pdf/sludge_eval.pdf

DC Solids Control (2016). Share of Dachuan decanter centrifuge operation principle. Haettu 4.6.2018 osoitteesta <http://www.dcsolidcontrol.com/share-of-dachuan-decanter-centrifuge-operating-principle/>

ECHA (n.d.). REACH-asetus tutuksi. Haettu 5.7.2018 osoitteesta <https://echa.europa.eu/fi/regulations/reach/understanding-reach>

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 2006/1907. Haettu 5.7.2018 osoitteesta <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1907-20140410&from=EN>

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 2009/1069. Haettu 3.5.2018 osoitteesta <https://publications.europa.eu/fi/publication-detail/-/publication/cd2b6c68-b889-46b0-8edc-5787397a0a40/language-fi>

Evira (2012a). *Escherichia coli* –bakteerin lukumäärän määrittäminen elävistä simpukoista. Menetelmäohje Evira 3506/2. Haettu 2.7.2018 osoitteesta https://www.evira.fi/globalassets/tietoa-evirasta/esittely/toiminta/vertailulaboratoritoiminta/ohjeet_vert_labr_toiminta/evira_3506_v2_escherichia_coli.pdf

Evira (2012b). Näytteen esikäsittely ja laimentaminen kvantitatiivista mikrobiologista tutkimusta varten. Toimintaohje LAB 728/1. Haettu 20.6.2018 osoitteesta https://www.evira.fi/globalassets/tietoa-evirasta/esittely/toiminta/vertailulaboratoritoiminta/ohjeet_vert_labr_toiminta/lab_728_v1_naytteen_esikasitt_ja_laimentaminen_.pdf

Evira (2016a) *Escherichia coli* / EHEC (VTEC / STEC) ruokamyrkytysten aiheuttajana. Haettu 1.5.2018 osoitteesta <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/escherichia-coli/>

Evira (2016b). *Kampylobakteeri*. Haettu 1.5.2018 osoitteesta <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/kampylobakteeri/>

Evira (2016c). *Yersiniabakteerit*. Haettu 1.5.2018 osoitteesta <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/ruokamyrkytyksia-aiheuttavia-bakteereja/yersiniabakteerit/>

Evira (2016d). Omavalvontasuunnitelmaan kuuluvat asiat. Haettu 5.7.2018 osoitteesta <https://www.evira.fi/yhteiset/omavalvonta/lannoitevalmisteet/omavalvontasuunnitelma/>

Evira (2016e). Lannoitevalmistelaitosten hyväksyntä. Haettu 5.7.2018 <https://www.evira.fi/kasvit/viljely-ja-tuotanto/lannoitevalmisteet/laitoshyvaksynta/>

Evira (2017). Mikrobin kasvua edistävät tekijät. Haettu 4.7.2018 osoitteesta <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/ruokamyrkytykset/yleista-mikrobeista/mikrobien-kasvua-edistavat-tekijat/>

Evira (2018a). *Salmonellatartunnat*. Haettu 30.4.2018 osoitteesta <https://www.evira.fi/elaimet/elainten-terveys-ja-elaintaudit/elaintaudit/usealle-elainlajille-yhteiset-taudit/salmonellatartunnat/>

Evira (2018b). Haitalliset aineet ja hygienia. Haettu 3.5.2018 osoitteesta <https://www.evira.fi/kasvit/lannoitevalmisteet/lannoitteet-ja-lannoitevalmisteet/haitalliset-aineet-ja-hygienia/>

Fricke, K., Santen, H., Wallmann, R., Hüttner, A. & Dichtl, N. (2007). Operating problems in anaerobic digestion plants resulting from nitrogen in MSW. *Waste Management*, 27(1), 30–43. Haettu 27.4.2018 osoitteesta <https://cues.rutgers.edu/bioreactor-landfill/pdfs/13-Frickeetal2007WasteManagementANaerobicdigestionN.pdf>

Gale, E. F., & Epps, H. M. (1942). The effect of the pH of the medium during growth on the enzymic activities of bacteria (*Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*) and the biological significance of the changes produced. *Biochemical journal*, 36(7-9), 600–618. Haettu 17.5.2018 osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1266844/>

Internetix (n.d.). Prosenttiyhtälöistä – prosentin käyttäytymisestä yhtälöissä. Haettu 30.6.2018 osoitteesta http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/mab/mab01/3_prosenttilaskenta/mab1_3.5._prosenttiyhtaloista.pdf?C:D=hNot.hv3A&m:sel-res=hNot.hv3A

Janhunen, M. (2012). *Jäteveden biokaasutus ja lietteen kaasun tuottavuuden määrittäminen*. Opinnäytetyö. Energiatekniikan koulutusohjelma. Savonia-ammattikorkeakoulu. Haettu 26.4.2018 osoitteesta <http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-201205076733>

Jayaraj, S., Deepanraj, B. & Sivasubramanian, V. (2014). Study on the effect of pH on biogas production from food waste by anaerobic digestion. In *9th International Green Energy Conference* (pp. 25-26). Haettu 3.7.2018 osoitteesta https://www.researchgate.net/publication/264545493_STUDY_ON_THE_EFFECT_OF_pH_ON_BIOGAS_PRODUCTION_FROM_FOOD_WASTE_BY_ANAEROBIC_DIGESTION

Jordan, K. N., Oxford, L. & O’Byrne, C. P. (1999). Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157: H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3048–3055. Haettu 3.5.2018 osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91455/>

Kannisto, L. (2018). Tiedustelu koulun laboratorion käytöstä. Sähköposti-viesti tekijälle 18.7.2018.

Kemikaalivirasto (n.d.). REACH-asetus ja sen liitteet. Haettu 5.7.2018 osoitteesta <https://kemikaalineuvottelukunta.fi/reach-asetus>

Kymäläinen, M. & Pakarinen, O. (2015). *Biokaasuteknologia: Raaka-aineet, prosessointi ja lopputuotteiden hyödyntäminen*. Forssa: Forssa Print Oy.

Lannoitevalmistelaki 2006/539. Haettu 30.5.2018 osoitteesta <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2006/20060539#Pidp450250640>

Lehtomäki, A., Paavola, T., Luostarinen, S. & Rintala, J. (2007). Biokaasusta energiaa maatalouteen – raaka-aineet, teknologiat ja lopputuotteet. Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen tiedonantoja 85. Haettu 26.4.2018 osoitteesta

<https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/47694/978-951-39-3075-2.pdf?sequence=1>

Luoranen, M. (2011). *Biokaasun valmistus kasvibiomassasta laboratorio-mittakaavan biokaasureaktorilla*. Insinööriytyö. Kemiantekniikan koulutusohjelma. Metropolia ammattikorkeakoulu. Haettu 26.4.2018 osoitteesta

<http://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-201104144285>

Luostarinen, S. (2009). Biokaasun tuotantoprosessi ja –teknologiat. Haettu 4.7.2018 osoitteesta [https://jukuri.luke.fi/bitstream/han-](https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/538734/Luostarinen-Sari-2009-10-22-20339595.pdf?sequence=1)

[dle/10024/538734/Luostarinen-Sari-2009-10-22-20339595.pdf?sequence=1](https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/538734/Luostarinen-Sari-2009-10-22-20339595.pdf?sequence=1)

Luostarinen, S. (2013). Biokaasuteknologiaa maataloilla 1. Biokaasulaitoksen hankinta, käyttöönotto ja operointi – käytännön kokemuksia MTT:n maatilakohtaiselta laitokselta. Haettu 26.4.2018 osoitteesta [http://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/481263/mttraportti113.pdf?se-](http://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/481263/mttraportti113.pdf?sequence=1)

[quence=1](http://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/481263/mttraportti113.pdf?sequence=1)

Maa- ja metsätalousministeriön asetus lannoitevalmisteista 2011/24/11.

Haettu 30.5.2018 osoitteesta [https://www.finlex.fi/data/nor-](https://www.finlex.fi/data/normit/37638/11024fi.pdf)

Maa- ja metsätalousministeriön asetus lannoitevalmisteita koskevan toiminnan harjoittamisesta ja sen valvonnasta 2012/11/12. Haettu 2.7.2018 osoitteesta <https://www.finlex.fi/data/normit/39201/12011fi.pdf>

Marttinen, S., Paavola, T., Ervasti, S., Salo, T., Kapuinen, P., Rintala, J., Vikman, M., Kapanen, A., Torniainen, M., Maunuksela, L., Suominen, K., Sahlström, L. & Herranen, M. (2013). Biokaasulaitosten lopputuotteet lannoitevalmisteina. Haettu 30.4.2018 osoitteesta

<http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-487-432-8>

Marttinen, S., Suominen, K., Lehto, M., Jalava, T. & Tampio, E. (2014). Haitallisten orgaanisten yhdisteiden ja lääkeaineiden esiintyminen biokaasulaitosten käsittelyjäänöksissä sekä niiden elintarvikeketjuun aiheuttaman vaaran arviointi. BIOSAFE-hankkeen loppuraportti. Haettu 1.8.2018 osoitteesta <http://www.mtt.fi/mttraportti/pdf/mttraportti135.pdf>

Maurer, L. M., Yohannes, E., Bondurant, S. S., Radmacher, M. & Slonczewski, J. L. (2005). pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 187(1), 304–319. Haettu 16.5.2018 osoitteesta <http://jb.asm.org/content/187/1/304.full>

MTK (2017). Ympäristö. Ympäristölupa. Haettu 5.7.2018 osoitteesta https://www.mtk.fi/ymparisto/ymparistoluvat/fi_FI/ymparistoluvat/

Nemeth, C. S., Friedrich, L., Pásztor-Huszár, K., Pipoly, E., Suhajda, Á., & Balla, C. S. (2011). Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liquid egg products with heat treatment at lower temperature and longer than pasteurization. *African Journal of Food Science*, 5(3), 161–167. Haettu 30.4.2018 osoitteesta <http://www.internationalegg.com/wp-content/uploads/2015/11/Nemeth%20-%202011.pdf>

Ostara Pearl® (n.d.). Nutrient Recovery Technology Customised To Meet Your Needs. Haettu 24.7.2018 osoitteesta <http://ostara.com/nutrient-management-solutions/>

Padan, E., Bibi, E., Masahiro, I., Krulwich, T.A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New Insights. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes*, 1717(2), 97–88. Haettu 2.5.2018 osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3072713/>

Parhad, N.M., Rao, N.U. (1974). Effect of pH on Survival of *Escherichia coli*. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 980–986. Haettu 2.5.2018 osoitteesta <http://www.istor.org/stable/25038739>

Ruokatieto (n.d.). Mikrobiologia. Lämpötila. Haettu 4.7.2018 osoitteesta <https://www.ruokatieto.fi/ruokakasvatus/lupa-kokata-elintarvikehygienian-perusteet/mikrobiologia/lampotila>

Sibiya, N. T., Muzenda, E., & Tesfagiorgis, H. B. (2014). Effect of temperature and pH on the anaerobic digestion of grass silage. Int'l Conf. on Chemical Engineering & Advanced Computational Technologies (ICCEACT). Haettu 3.7.2018 osoitteesta https://www.researchgate.net/publication/281837326_Effect_of_Temperature_and_pH_on_the_Anaerobic_Digestion_of_Grass_Silage

Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E. & Slonczewski, J. L. (1994). Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of

rpoS and growth pH. *Journal of bacteriology*, 176(6), 1729-1737. Haettu 10.7.2018 osoitteesta <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205261/pdf/jbacter00024-0187.pdf>

Solunetti (n.d.a.). Mikrobipopulaation kasvuvaiheet. Ympäristötekijät. Haettu 2.5.2018 osoitteesta http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/ymparistotekijat_1/2/

Solunetti (n.d.b.). Mikrobipopulaation kasvuvaiheet. Ravinteet. Haettu 4.7.2018 osoitteesta http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/ravinteet_1/3/

Solunetti (n.d.c.). Mikrobipopulaation kasvuvaiheet. Osmoottiset tekijät. Haettu 4.7.2018 osoitteesta <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/vesi/3/>

Solunetti (n.d.d.). Mikrobipopulaation kasvuvaiheet. Happipitoisuus. Haettu 4.7.2018 osoitteesta http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/happipitoisuus_1/3/

Solunetti (n.d.e.). Mikrobipopulaation kasvuvaiheet. pH. Haettu 2.5.2018 osoitteesta <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/vesi/3/>

St1 intranet (2018a). Tuoteseloste. St1 Bionolix lannoite.

St1 intranet (2018b). Tuoteseloste. St1 Bionolix Maanparannusaine.

Taimisto A-M. (2006). Tuotteen veden aktiivisuuden tunteminen auttaa riskinarvioinnissa. *Kehittyvä Elintarvike* 3/2016. Haettu 4.7.2018 osoitteesta <http://kehittyvaelintarvike.fi/teemajutut/40-tuotteen-veden-aktiivisuuden-tunteminen-auttaa-riskinarvioinnissa>

Valtioneuvoston asetus ympäristönsuojelusta (2014/713). Haettu 5.7.2018 osoitteesta <https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/2014/20140713>

Ympäristönsuojelulaki (2014/527). Haettu 5.7.2018 osoitteesta <https://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2014/20140527>