



TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL  
INSENERITEADUSKOND

Tartu kolledž

# REOVEESETTE KOMPOSTI SATTUNUD RAVIMITE MÕJU HINDAMINE VIHMAUSSIDELE

EARTHWORM AVOIDANCE TEST FOR ASSESSING THE IMPACT OF  
PHARMACEUTICALS IN THE SEWAGE SLUDGE COMPOST

MAGISTRITÖÖ

Üliõpilane: Doris Järv

Üliõpilaskood: 176912NAEM

Juhendaja: PhD, Egge Haiba, lektor

Tartu 2019

*(Tiitellehe pöördel)*

## **AUTORIDEKLARATSIOON**

Olen koostanud lõputöö iseseisvalt.

Lõputöö alusel ei ole varem kutse- või teaduskraadi või inseneridiplomit taotletud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud.

“.....” ..... 201.....

Autor: .....

/ allkiri /

Töö vastab bakalaureusetöö/magistritööle esitatud nõuetele

“.....” ..... 201.....

Juhendaja: .....

/ allkiri /

Kaitsmisele lubatud

“.....” .....201....

Kaitsmiskomisjoni esimees .....

/ nimi ja allkiri /

Tallinna Tehnikaülikool Tartu kolledž

LÕPUTÖÖ ÜLESANNE

Üliõpilane: Doris Järv, 176912NAEM  
Õppekava, peeriala: NAEM06/15 Tööstusökoloogia  
Juhendaja(d): Egge Haiba, PhD, lektor, +372 6204808

**Lõputöö teema:**

Reoveesette komposti sattunud ravimite mõju hindamine vihmaussidele  
Earthworm avoidance test for assessing the impact of pharmaceuticals in the sewage sludge  
compost

**Lõputöö põhieesmärk:**

1.Vihmausside *Dendrobaena veneta* tundlikkuse kontrollimine kolme ravimi (metformiin, diklofenak ja karbamasepiin) ning ühe antibakteriaalne aine (triklosaan) abil reoveesette kompostis, mille tulemusnäitajaks on vihmausside vältimiskäitumine.

**Lõputöö etapid ja ajakava:**

Nr	Ülesande kirjeldus	Tähtaeg
1.	Kirjanduse läbitöötamine ja katse ettevalmistamine.	31.03.19
2.	Katse läbiviimine, tulemuste analüüs ja arutelu koostamine.	03.05.19
3.	Lõputöö vormistamine ja esitamine.	27.05.19

Töö keel: eesti keel      Lõputöö esitamise tähtaeg: "....." ..... 201..a

Üliõpilane: Doris Järv .....  
"....." .....201....a  
/allkiri/

Juhendaja: Egge Haiba .....  
"....." .....201....a  
/allkiri

# SISUKORD

EESSÖNA	5
SISSEJUHATUS	6
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1Ravimitööstus	7
1.2Ravimite sattumine looduskeskkonda	8
1.2.1 Ökotoksilisus ja mõju keskkonnale	9
1.3 Enim kasutatavad ravimid ja isikuhooldusvahendid	10
1.3.1 Diklofenak	11
1.3.2 Metformiin	12
1.3.3 Karbamasepiin	13
1.3.4 Triklosaan	14
2. REOVEESETE JA KOMPOST	16
2.1 Kasutamiseiga seotud eelised ja puudused	17
3. VIHMAUSSID JA NENDE ROLL KESKKONNAS	21
4. MATERJAL JA METOODIKA	24
4.1 Materjal	24
4.1.1 Ravimid	24
4.1.2 Vihmaussid	25
4.2 Metoodika	26
5. TULEMUSED JA ARUTELU	28
KOKKUVÕTE	34
SUMMARY	36
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	38

## EESSÕNA

Järjest rohkem satub ravimijääke looduskeskkonda. Ravimijäägid võivad sattuda looduskeskkonda, kas reoveega, heitveega, reoveesette ja/või selle kompostiga väetades. Looduskeskkonnas võivad ravimijäägid mõjuda toksiliselt erinevatele organismidele ning jõuda lõpuks mööda toitumisahelat inimese toidulauale. Ravimijäägid võivad akumuleeruda ka vihmaussidesse. Vihmaussidel on võime saastunud alasid vältida. Vältimistesti abil saab tuvastada piirmäärasid, millal vihmaussid hakkavad saastunud alasid vältima ning kuidas toksiline ühend neile mõjub. Lõputöö teema sõnastati juhendaja lektor Egge Haiba algatusel ning vältimiskatse viidi läbi Tallinna Tehnikaülikooli Tartu kolledži mullabioloogia laboris. Lõputöö eesmärgiks oli kontrollida vihmausside *Dendrobaena veneta* tundlikkust kolme ravimi (metformiin, diklofenak ja karbamasepiin) ning ühe antibakteriaalse aine (triklosaan) abil reoveesette kompostis, mille tulemusnäitajaks on vihmausside vältimiskäitumine. Lõputöö valmimisele aitas kaasa juhendaja lektor Egge Haiba.

Töö autor avaldab suured tänusõnad oma juhendajale Egge Haibale, kes andis soovitusi, vastas küsimustele ja oli alati olemas. Lisaks tänan oma perekonda ja lähedasi, kes olid lõputöö valmimisel abiks ja toeks.

Võtmesõnad: vältimistest, *Dendrobaena veneta*, ravimijäägid, magistritöö

## SISSEJUHATUS

Ravimiteks nimetatakse aineid või siis nende kombinatsioone, mis on loodud mõjutama inim- ja loomorganismis toimuvaid biokeemilisi ja füsioloogilisi funktsioone (Lillenberg jt., 2012; Ravimiamet, 2016). Ravimid on nii inimese kui ka loomade tervise ja heaolu jaoks hädavajalikud (Zandaryaa, 2017), need aitavad ära hoida, leevendada ja ravida erinevaid haigusi (Lillenberg jt., 2012).

Rahvastiku kasvu ning vananemise tõttu on ravimite tarbimine aastatega kasvanud. Mida rohkem ravimeid tarvitatakse seda rohkem nende jääke looduskeskkonda jõuab (Zandaryaa, 2017). Läbi heitvee, töötlemata reovee, reoveesette ja selle komposti jõuavad ravimijäägid, sealhulgas nende metaboliidid looduskeskkonda. Samuti võivad keskkonda jõuda veterinaarravimid, kas otse läbi loomorganismi või siis saastunud sõnnikuga väetades (Carter jt., 2016a; Zandaryaa jt., 2017).

Keskkonda jõudes võivad ravimid mõjuda toksiliselt nii keskkonnale endale kui organismidele. Lisaks võivad ravimid mööda toitumisahelat jõuda ka inimese toidulauale. Ravimijääkide olemasolu keskkonnas on globaalne probleem ning nende pikaajaline mõju inimese tervisele ja elustikule on suuresti teadmata (Zandaryaa jt., 2017; Maculak jt., 2019).

Antud töö eesmärgiks oli uurida vihmausside *Dendrobaena veneta* tundlikkust kolme ravimi (metformiin, diklofenak ja karbamasepiin) ning ühe antibakteriaalse aine (triklosaan) abil, mille tulemusnäitajaks on vihmausside vältimiskäitumine. Töö eesmärgi täitmiseks püstitas töö autor järgmised uurimisülesanded:

1. Anda kirjanduse põhjal ülevaade reoveesette kompostimisest ning ravimite ökotoksilisusest keskkonnale.
2. Viia läbi laboritingimustes vältimiskatse.
3. Võrrelda üksikute ravimite ja nende kombinatsiooni mõju vihmausside käitumisele.
4. Teha läbiviidud katse põhjal järeldused, kas ja kuidas mõjutavad katsesse valitud kolm ravimit ning üks antibakteriaalne aine vihmausside käitumist.

# 1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1Ravimitööstus

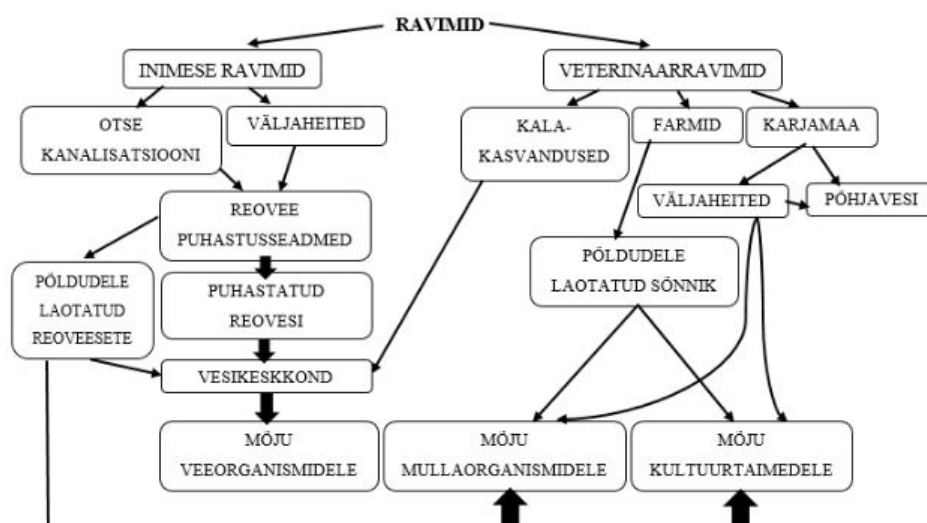
Ravimitööstus on üks suuremaid ja kiiremini kasvavaid tööstusharusid maailmas. Ravimite kasutamine on viimastel aastakümnetel kasvanud hüppeliselt. Ravimitega saab erinevaid haigusi nii ravida, leevendada, kui ka ära hoida (Lillenbergt., 2012; Lockwood jt., 2016). On ravimeid, mida inimesed kasutavad igapäevaselt, lisaks on selliseid, mida tarvitatakse teatud perioodi vältel (näiteks antibiootikumid). Olenevalt haigusest võib arsti määratud antibiootikumide kuur kesta, kas näiteks kolm viis, seitse või kümme päeva, kuid selle perioodi jooksul peab ravimit võtma, kas üks kord päevas või hoopiski kolm korda ööpäevas (Entsik-Grünberg, 2014). Igal aastal tuleb turule uusi ravimeid ning tarbijateni jõudvate uute ravimite arv on alates viimasest aastakümnest kahekordistunud (Lockwood jt., 2016). Hetkel on maailmas kasutusel umbes 4000 erinevat ravimit ja 1500 toimainet (Bartrons ja Peñuelas, 2017; Oldenkamp, 2019).

Maailma mastaabis on Euroopa Liit (EL) teisel kohal ravimite müügi edetabelis. Umbes 25% inimravimite ja 31% veterinaarravimite kogu maailma ravimite müügist müüakse ELs. ELi ravimitööstuse väärtuseks on hinnatud 225 miljardit eurot ning selle väärtus aina kasvab. Eesti ravimituru väärtus on samuti aasta aastalt kasvanud. Näiteks 2017.aastal oli Eestis ravimituru väärtuseks 301 miljonit eurot, mis oli 3,8% rohkem kui aastal 2016 (Lockwood jt., 2016; Sammul jt., 2018)

28 liikmesriigiga ELs on umbes 4200 farmaatsiatööstuse ettevõtet ning enamik neist asub sellistes riikides nagu Saksamaa, Suurbritannia, Itaalia, Prantsusmaa ja Hispaania (Lockwood jt., 2016). Ravimiameti tegevuslubade registri alusel on Eestis kokku 35 ettevõtet, kes omavad ravimite tootmise tegevusluba sealhulgas verekeskused ja ettevõtted, kes tegelevad pakendamise ja pakendite ümbermärgistamisega. Neist üheksa ettevõtet toodavad ravimivorme või toimeaineid. Lisaks on Eestis 62 hulgimüüjat, millest kolm ettevõtet katsid veerandi Eesti ravimituru mahust. Enamus Eestis tegutsevatest hulgimüüjatest kuuluvad välismaiste ettevõtete gruppi. (Ravimiamet, 2018)

## 1.2 Ravimite sattumine looduskeskkonda

Reoveepuhastusjaamad on peamine allikas, mille kaudu erinevad ühendid satuvad keskkonda (Ferrari jt., 2003; Sandaryaa, 2017). Kanalisatsiooni võivad ravimijäägid sattuda, kas tootmisel, tarbimisel või siis inimeste hooletuse tõttu (Lockwood jt., 2016). Kõige rohkem satub ravimijääke sealhulgas ka nende metaboliite reovette läbi inim- ja loomorganismide (Lockwood jt., 2016) (joonis 1.1). Umbes 15 000 tonni antibiootikume jõuab igal aastal Euroopas keskkonda (Bartrons ja Peñuelas, 2017). Kõige rohkem on tuvastatud ravimite ja isikuhooldusvahendite jääke veekeskkonnas (pinnavees, joogivees, reovees) vahemikus nanogrammi liitri kohta-mikrogrammi liitri kohta (ng/L (ppt)-µg/L (ppb)) (Yang jt., 2017). Lisaks tarbimisele viskavad inimesed kasutamata ja/või aegunud ravimeid sanitaarseadmetest alla või siis majapidamises tekkinud olmejäätmete hulka (Kümmerer, 2009; Sandaryaa, 2017).



Joonis 1.1 Inim- ja veterinaarravimite sattumine looduskeskkonda (Lillenberg jt., 2012; Piiskoppel, 2016)

Ravimid, mida inimene on tarbinud võivad organismis, kas laguneda täielikult või siis väljuda muutmata kujul ning sattuda reovette (Lillenberg jt., 2012). Umbes 30-90% suukaudu manustatud ravimitest väljub organismist muutmata kujul (Lockwood jt., 2016). Sellised ravimite rühmad nagu valuvaigistid, antibiootikumid, põletikuvastased ravimid, antidepressandid ja epilepsiaravimid ei lagune inimkehas täielikult. Need ravimite rühmad on ka ühed enim kasutatavad preparaadid ELis (Lockwood jt., 2016). Ravimid, mis on kanalisatsiooni sattunud võivad osaliselt laguneda, kas siis reovees või reoveepuhastis toimuvate protsesside tagajärjel. Need ravimid, mis ei lagune täielikult võivad puhastatud reoveega või saastunud reoveesetega väetades sattuda edasi



looduskeskkonda. (Lillenberg jt., 2012) Ravimite ja isikuhooldusvahendite sorptsioon reoveesetesse või pinnasesse sõltub mitmetest teguritest nagu näiteks saasteaine omadustest (molekulaarne struktuur, keemilised omadused) ning reoveesette või pinnase omadustest (pH, reoveesette retentsiooniaeg) (Verlicchi ja Zambello, 2015).

Veterinaarravimid võivad sattuda keskkonda, kas siis otse loomorganismist väljudes või siis sõnnikuga väetamisel (Carter jt., 2016a) (joonis 1.1). Veterinaarravimid võivad jõuda mulda, põhjavette ning pinnavette. Pinnavette võivad veterinaarravimid jõuda, kas otse loomorganismist väljudes, pinnalt äravooluga või siis läbi põhjavee (Lockwood jt., 2016).

### **1.2.1 Ökotoksilisus ja mõju keskkonnale**

Keskkonda sattunud ravimijääkide mõju keskkonnale sõltub nende kontsentratsioonist ja kogusest. Ühe ravimi kontsentratsioon võib looduskeskkonnas olla madal ning mõju keskkonnale võib olla väike, aga kui keskkonda satub mitu ravimit, mille toimemehhanism on sarnane, siis mõju looduskeskkonnale võib olla märkimisväärne (Daughton ja Ternes, 1999; Haiba ja Nei, 2017). Kõik ravimid ja isikuhooldusvahendid ei ole looduskeskkonnas püsivad, kuid nende pidev kasutamine ja keskkonda sattumine muudab nad nn pseudo-püsivateks. Pseudo-püsiv tähendab, et sellistel preparaatidel on suurem võimalus muutuda keskkonnas püsivaks, sest nende koguste sattumine keskkonda suureneb. (Ebele jt., 2017) Need ravimid, mis on looduskeskkonnas püsivad võivad keskkonda jääda aastateks (Lillenberg jt., 2012).

Keskkonda sattunud ravimijäägid võivad bioakumulatsiooni tõttu koguneda organismi. Ravimijääkide kogus organismis võib ajapikku tõusta toksilise kontsentratsioonini või siis biomagnifikatsiooni teel liikuda mööda toitumisahelat edasi. Mööda toiduahelat võivad ravimijäägid jõuda inimorganismi. (Straub, 2015; Haiba ja Nei, 2017) Keskkonda sattunud ravimi või ravimijäägi struktuur võib, kas osaliselt või täielikult muutuda, laguneda või mineraliseeruda. Mõnikord ravimijäägid ei lagune keskkonnas täielikult ning ka mineralisatsiooni protsess jääb poolikuks. Sellised vaheühendid ehk biotransformatsiooni tõttu tekkinud stabiilsed ühendid võivad olla veel vastupidavamad ning nendel jääkidel on veelgi suurem tõenäosus kuhjuda organismi kui algsetel keskkonda sattunud ravimijääkidel. (Kümmerer, 2009) Ka mõned lagunemisest tekkinud ained võivad olla bioaktiivsemad kui algsetel keskkonda sattunud ravimid (Daughton ja Ternes, 1999).

Ravimijäägid, mis on mulda sattunud näiteks reoveesetega, ravimijääke sisaldava sõnnikuga väetades või saastunud veega niisutamisel võivad koguneda taimedesse. See sõltub taimest

endast, ravimite füüsilis-keemilistest omadustest ning mulla omadustest. Läbi taimede võivad ravimijäägid sattuda loomade, lindude organismi ning inimese toidulauale (Al-Farsi jt., 2017; Yang jt., 2017). Kultuurtaimedes olevad ravimijäägid võivad olla ohuks inimese tervisele, aga see sõltub ravimijääkide kogusest, taimest ning kui tihti süüakse saastunud kultuurtaimi. On leitud, et ravimijäägid, mis satuvad läbi kultuurtaimede inimese toidulauale, ei kujuta suurt ohtu inimese tervisele, samas pikaajalist toimet ei ole teada. (Prosser ja Sibely, 2015)

Ravimijääke sisaldava reoveesette või sõnniku kasutamine väetisena on ravimite resistentsuse üheks peamiseks põhjustajaks. Geenid, mis määravad ravimite resistentsuse võivad ohututelt mullamikroobidelt edasi kanduda patogeensetele mikroobidele. Mullas olevad antibiootikumid võivad koguneda taimedesse, hävitada mulla mikroorganisme ning muutuda ravimiresistentseks. (Haiba ja Nei, 2017) Antibiootikumi resistentsete geenidega bakterid paljunevad ning tekivad antibiootikumiresistentsed bakterid. Kui antibiootikumiresistentsed bakterid satuvad inimorganismi (läbi joogivee, mulla, toidu), siis nad võivad muuta inimese mikrobioomi ning inimesel tekib antibiootikumiresistentsus. Inimese soolestiku mikrobioomi muutumise tagajärjel on inimene vastuvõtavam erinevatele haigustele ning võivad tekkida häired soolestikus. Tekkinud antibiootikumiresistentsuse tõttu, ei pruugi haigestunud inimene enam ravile alluda, mille tulemusena võib inimene surra. (Ben jt., 2019)

### **1.3 Enim kasutatavad ravimid ja isikuhooldusvahendid**

Ravimiturul on müügil lai valik erinevaid ravimeid ja isikuhooldusvahendeid, mida inimesed igapäevaselt kasutavad. Zandaryaa (2017) toob HELCOMi (*Baltic Marine Environment Protection Commission*) ja UNESCO (*United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*) ühises aruandes välja, et kolm kõige enam müüdavat ravimit andmeid jaganud riikides (Eesti, Rootsi, Saksmaa, Soome, Venemaa Sankt Peterburgi ala) on:

1. paratsetamool- 529 935 kg/aastas;
2. metformiin- 346 888 kg/aastas;
3. makrogool- 273 687 kg/aastas.

OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) ja ELi (2018) ühise aruande järgi kulutasid ELis aastal 2016 kõige rohkem ravimite peale sakslased (572 eurot inimese kohta). Sakslaste kulutused ravimite peale olid 40% EL keskmisest kõrgemad. Kõige vähem kulutasid, aga taanlased (203 eurot). Eesti inimesed seevastu kulutasid aastal 2017 ravimite peale keskmiselt 259

eurot. Ravimiameti koostatud statistika näitab, et defineeritud päevatoosi järgi tuhande elaniku kohta (DPD/1000/ööpäev) olid kolm enim kasutatavat ravimirühma (Sammul jt., 2018):

1. kardiovaskulaarsüsteemi ravimid- 418 DPD/1000/ööpäev;
2. seedekulgla ja ainevahetuse ravimid-170 DPD/1000/ööpäeva;
3. närvisüsteemi ravimid- 123 DPD/1000/ööpäeva.

Keskkonnast leitud enim kasutatavate ravimite rühmad on peamiselt: antibiootikumid (amoksitsiin, tsiprofloksatsiin, sulfametsiin); epilepsivastased ravimid (karbamasepiin); antidepressandid (fluoksetiin); kõrgvererõhuravimid; kolesterooli langetavad; diabeedivastased (metformiin) ning mittesteroidsed põletikuvastased ravimid (diklofenak, ibuprofeen); beetablokaatorid (atenolool, metroprolool); valuvaigistid ja lipiidide regulaatorid (klo-fibriinhape, bezafibraat) (Jjemba, 2006; Fent jt., 2006; Lockwood jt., 2016; Yang jt., 2017) Isikuhooldusvahenditest on keskkonnas tuvastatud kõige rohkem antibakteriaalseid aineid (triklosaan, triklokarbaan), parabeene (metüülparabeen, propüülparabeen), lõhnained (galaksoliid, atsetüülheksametüül-tetraliin) (Yang jt., 2017).

Käesolevasse tööse valiti kolm ravimit-diklofenak (DCF), metformiin (MET), karbamasepiin (CBZ) ja üks antibakteriaalne aine-triklosaan (TCS). Kõik need ained kuuluvad enim kasutatavate ravimite ja isikuhooldusvahendite hulka. Nende jälgi on leitud nii pinnaveest, põhjaveest, reoveest, heitveest, reoveesetest, pinnasest, taimedest ning loomadest (sealhulgas veeloomadest) (Oosterhuis jt., 2013; Wu jt., 2013; Chen, W jt., 2013; Sui jt., 2015; Verlicchi ja Zambello, 2015; Ebele jt., 2017; Mezzelani jt., 2018; Yang jt., 2017; Bartrons ja Peñuelas, 2017; Klampfl, 2019).

### **1.3.1 Diklofenak**

Diklofenak (DCF) on populaarne mittesteroidne valu ja põletikuvastane ravim (NSAID), mida kasutatakse näiteks liigesepõletiku korral. DCF saab manustada peamiselt, kas suukaudu või määrada geelina nahale (Lonappan jt., 2016). Üle maailma on ravimi jälgi leitud veekeskkonnast vähemalt 50 riigist (Weber jt., 2014). Euroopas tuvastatakse seda kõige sagedamini looduslikest veekogudest (jões, järved) (Patrolecco jt., 2013b). Magevees võib DCF keskmine kontsentratsioon jääda vahemikku <12- >160 ng/L (Aucuna jt., 2015; Maculak jt., 2019).

Euroopas on DCF jääke reoveejaama väljavoolust tuvastatud vahemikus 0,03-1,8 µg/L (Oosterhuis jt., 2013; Loos jt., 2013). Antud ravimil on madal eemaldamise protsent ja ta on veekeskkonnas väga püsiv. Näiteks ühest Hollandi reoveejaama sissevoolust tuvastati 0,34 µg/L DCF ja ainult 41% sellest suudeti eemaldada (Oosterhuis jt., 2013). Samas Bourdat-Deschamps jt., (2017) tulemused

näitasid, et 75% ravimist suudeti reoveepuhastusjaamas eemaldada. DCF on mittesteroidsetest põletikuvastastest ravimitest kõige mürgisem vetikatele ja selgrootutele (Fent jt., 2006). Ravimijäägid võivad kahjustada kalade DNA-d, põhjustades sellega immunosupressiooni (Ribas jt., 2014). Ravimi keemiline struktuur sisaldab kloori aatomit ning selletõttu ta keskkonnas bioloogiliselt ei lagune (Haiba jt., 2017).

DCF järgi on leitud ka reoveesettes. Kontsentratsioon võib jääda vahemikku  $\leq 10-627 \text{ ng/g}^{-1}$  (Loos jt., 2013; Thelusmond jt., 2017; Fijalkowski jt., 2017). Eestis on ravimit tuvastatud Räpina reoveepuhasti töötlematta settes ( $930 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ) (Lemmiksoo, 2015a). Saastunud reoveesette laotamisel pinnasele võib ravim akumulereuda mulda, kus see on toksiline mullas olevatele selgrootutele nagu näiteks *Folsomia candida* liigile. DCF põhjustab nende surma, mis omakorda mõjutab nende paljunemist (Chen, G jt., 2015). DCF on võime akumulereuda vihmaussidesse, kuid ta ei mõjuta negatiivselt vihmausside kaalu (Carter jt., 2014a, 2016a). Samas Pino jt., (2015) leidsid, et DCF mõjub vihmaussidele toksiliselt, surmavaks kontsentratsiooniks oli  $90,49 \text{ mg/kg}$ .

Lisaks võib antud ravim akumulereuda taimedesse, samas on DCF vähem toksiline kaunviljadele kui näiteks mõni teine ravim (sulfametsiin). DCF akumulereub ka näiteks salatilehe ja lehtkapsa juurtesse (Dodgen jt., 2013). Kuigi ravim võib akumulereuda kultuurtaimedesse ei pärsi ta taimede kasvu (Carter jt., 2014b; Lonappen jt., 2017).

Pinnases, kus on palju orgaanilist materjali imendub DCF mulda ning võib seal olla resistente nii aeroobsele kui ka anaeroobsele lagunemisele. Kui DCF on mulda sattunud võib ta koguneda veel sügavamale ehk põhjavette ning jõuda inimeseni (Lonappen jt., 2017). Kontrollitud aeroobsetes tingimustes võib DCF laguneda pinnases seitsme päeva jooksul, kuid mitte anaeroobsetes tingimustes (Al-Rajab jt., 2010; Thelusmond jt., 2018). DCF poolestusaeg võib olla  $< 5$  päeva (Al-Rajab jt., 2010; Carter jt., 2014b). Lisaks kaladele, taimedele ja mullaelustikule võib DCF akumulereuda ka lindudesse. Hussain jt., (2008) leidsid, et kogus, mis mõjub toksiliselt tuvidele on  $0,25 \text{ mg/kg}^{-1}$  ja kanadele on  $2,5 \text{ mg/kg}^{-1}$ .

### 1.3.2 Metformiin

Metformiin (MET) on laialdaselt kasutusel olev suhkrutõve teise tüübi ravim (Oosterhuis jt., 2013). Diabeet on maailmas üks levinumaid haigusi. 2017. aastal oli üle maailma hinnanguliselt 425 miljonit diabeeti põdevat inimest (Briones jt., 2018). Nii Eestis, Rootsis, Soomes ja Saksmaal müüdi aastal 2014 kokku 346 888 kg METi (Zandaryaa jt., 2017). Antud ravim ei lagune täielikult inimese organismis. 30-50% suukaudu manustatud ravimist väljub esimese 24 tunni jooksul muutmata

kujul uriiniga. Ülejäänud 20-30% väljub muutmata kujul väljaheidete kaudu (Briones jt., 2018). Tuvastatud METi kogus reovees jääb üldiselt vahemikku 111,8-129 µg/L (Oosterhuis jt., 2013; Trautwein jt., 2014; Tisler ja Zwiener, 2018). Heitvees võib ravimi kontsentratsiooni jääda vahemikku 1-130 µg/L<sup>-1</sup> ning pinnaveest on ravimit leitud vahemikus 12 ng/L<sup>-1</sup>-234 µg/L<sup>-1</sup> (Niemuth ja Klapper, 2015, 2018; Markiewicz jt., 2017; Shraim jt., 2017; Tisler ja Zwiener, 2018). Reoveepuhastusjaamades lagundavad bakterid METi aineks nimega guanüüluurea (GUA). Keskkonda jõudes võivad MET ja GUA akumulereida kultuurtaimedesse nagu tomat, oad, porgand, kartul (Briones jt., 2016). MET ja GUA on keskkonnas väga liikuvad, seetõttu võivad nad mullast jõuda edasi põhjavette (Briones jt., 2016).

Briones jt., (2018) uurisid METi ja GUA lagunemist aktiivmudas. Leiti, et kui aktiivmudale on lisatud glükoosi, siis GUA laguneb täielikult. MET lagunes kiiresti, kuid selle tulemusena tekkis metaboliit GUA. Kui aktiivmudasse oli lisatud nii MET, GUA kui ka glükoos, siis MET ei lagunenu. Reoveesettes võib ravimi kogus olla kuni 237 ng/g<sup>-1</sup>-1160 µg/kg (Thomaid jt., 2016; Straub jt., 2019). METi poolestusaeg võib aeroobsetes tingimustes olla 1-5 päeva (Mrozik ja Stefańska, 2014; Haiba, 2017)

Isastele kaladele võib MET põhjustada vahesoolisust, vähendada viljakust ning pärssida kalade kasvu (Niemuth ja Klapper, 2015). METi mõju looduskeskkonnale ja organismidele on vähem uuritud, kui teisi töös kirjeldatud ravimeid ning seetõttu leidub METi toksilisuse kohta kirjanduses vähem materjali.

### 1.3.3 Karbamasepiin

Karbamasepiin (CBZ) on krampidevastane ravim, mida kasutatakse epilepsia, kolmiknärv neuralgia ja bipolaarse depressiooni ravimiseks (Ferrari jt., 2003; Valdés jt., 2016). CBZ on veekeskkonnas väga püsiv (Ferrari jt., 2003; Yang jt., 2017). Antud ravimi eemaldamise protsent reoveepuhastusjaamades on madalam kui 20% (Oosterhuis jt., 2013). CBZi ei saa täielikult reoveest eemaldada ka bioloogiliste puhastus meetoditega (Bourdat-Deschamps jt., 2017). Reoveest on leitud antud ravimit koguses 1100 ng/L-6,88 µg/L<sup>-1</sup> (Patrolecco jt., 2015; Ekpeghere jt., 2018; Palli jt., 2019). Euroopas võib CBZ kogus heitvees olla kuni 0,46 µg/L (Loos jt., 2013). Umbes 72% suukaudu manustatud ravimist imendub organismi ning ülejäänud 28% väljub muutmata kujul organismist. Juba keskkonda sattunud CBZ põhjustab toksilisust ning võib koguneda taimedesse (Haiba jt., 2018).

Reoveesettes jääb CBZ kontsentratsioon vahemikku 5-258 ng/g<sup>-1</sup> (Thomaidi jt., 2016; Thelusmond jt., 2018). Kui ravim satub saastunud reoveesetega mulda, siis tema biolagunemine on mullas väga aeglane. Tema poolestusaeg võib jääda vahemikku 130-900 päeva (Huang jt., 2015; Bourdat-Deschamps jt., 2017; Thelusmond jt., 2018). Mullas on leitud CBZ jääke vahemikus 1,8-7,5 ng/g<sup>-1</sup> (Verlicchi ja Zambello, 2015; Thelusmond jt., 2018). Läbi pinnase võib CBZ akumulereuda ka taimedesse. Ravimijäägid võivad taime juurtest liikuda edasi taime lehtedesse või vartesse. Ravimi jälgi on leitud näiteks porgandist ja sellerist. (Li jt., 2018)

CBZ on potentsiaalselt ohtlik veeorganismidele (vetikad, selgrootud), ägeda mürgistuse tase organismides on jäänud alla 100 mg/L (Fent jt., 2006). Valdés jt., (2016) uurisid laboratoorses katsetes CBZi ja tema kahe metaboliidi (CBZ-EP ja 2-OH-CBZ) võimet akumulereuda kaladesse. Uuringu tulemused näitasid, et ravimijääke ja tema kahte metaboliiti leiti kalade lõpustest, soolestikust, maksast, ajust ning lihastest.

### 1.3.4 Trikloosan

Trikloosan (TCS) on antibakteriaalne aine, mida võib leida erinevatest isikuhooldusvahenditest (hambapastad, seebid, kreemid, deodorandid, kosmeetika), majapidamispuhastusvahenditest, meditsiinilistes desinfitseerimisvahenditest ning erinevatest toodetest nagu tekstiilidest, plastikust mänguasjadest, plastikust lõikelaudadest, arvuti seadmetest, hambaharjadest, vinüülist ning põranda vahaemulsioonidest (Lozano jt., 2010, 2012; Pintado-Herrera jt., 2014; Guo ja Iwata, 2017; Ma jt., 2017). Antud antibakteriaalne aine on olnud kasutusel juba 40.aastat ning Euroopas tarbitakse seda igal aastal umbes 350 tonni. TCS reoveest eemaldamise protsent võib jääda vahemikku 90-95% (Pintado-Herrera jt., 2014; Huang jt., 2015). Umbes 90% TCSist on võimalik reoveest kättesaada, kui reoveepuhastamiseks kasutada membraani bioreaktorit (Pintado-Herrera jt., 2014). Reoveejaamades tekib bioloogilise metüülimise käigus TCSi metaboliit metüül-trikloosan (Gaume jt., 2012). Metaboliit ei lagune biolagunemise ja fotolüüsi käigus ning on rasvlahustuv aine, mistõttu on see keskkonnale veel kahjulikum kui algne aine (Marques jt., 2016). Töödeldud reoveesettes jääb TCSi kogus üldiselt vahemikku 4601 µg/kg-55 mg/kg<sup>-1</sup> (Butler jt., 2012; Bourdat-Deschamps jt., 2017). Reoveepuhastusjaamadest on antibakteriaalset ainet leitud vahemikus <213 ng/L-4,26 µg/L ja metüül-triklosaani vahemikus 0,3-10 ng/L (Huang jt., 2015; Ebele jt., 2017).

Ying jt., (2007) leidsid laboritingimustes läbiviidud katses, et TCSi biolagunemine toimub pinnases, kus on head aeroobsed tingimused. Aine poolestusajaks oli 18 päeva. Huang jt., (2015) leidsid, et mida suurem on sette adsorptsioonikoefitsient, seda kauem aine laguneb. TCS poolestusajad jäid

vahemikku 25–239 päeva. Ozaki jt., (2017) andmetel on TSC lagunemine reoveesette kompostis on väga aeglane ning aine laguneb reoveesette kompostis ainult 35% võrra. Samas Haiba (2017) leidis, et reoveesette ja haava saepuru kompostis, kus vahekord 1:2 lagunes 55% ja 1:3 korral lagunes 81% ainest. Kuna TSC laguneb aeglaselt, siis saastunud reoveesette lisamisel pinnasele võib TCS bioakumuleeruda mullas elavatesse organismidesse ning võib läbi toiduahela mõjuda kõrgema taseme organismidele toksiliselt. Näiteks võib antud aine akumulereuda vihmaussidesse (Higgins jt., 2010; Huang jt., 2015; Ma jt., 2017). Ma jt., (2017) leidsid, et vihmaussi akumulereunud TCS mõjutab negatiivselt vihmaussi soolestikus olevate bakterite arvu. Samuti võib TCS negatiivselt mõjutada ka pinnases olevaid mikroobe. On leitud, et TCS võib negatiivset mõju avaldada vihmaussidele kontsentratsioonil  $>1 \mu\text{g/g}^{-1}$ . Vihmaussidesse akumulereudes, vähendab TCS nende kaalu ning mõjutab negatiivselt vihmausside soolestikus olevate mikroobide arvu ning põhjustab neile oksüdatiivset stressi ja kahjustab DNA-d (Reiss jt., 2009; Lin jt., 2010; Macherius jt., 2014). TCS jälgi on vihmaussidest leitud isegi pärast nelja aasta tagust reoveesette laotamist pinnale (Macherius jt., 2014). Reiss jt., (2009) leidsid, et vihmaussile *Eisenia fetida* on surmav kontsentratsioon TCSi pärast 14 päeva kokkupuudet  $>1626 \text{ mg/kg}^{-1}$  (KA).

TSC võib akumulereuda ka kultuurtaimesse. Wu jt., (2013) kasvasid nelja üldtuntud köögivilja (paprikat, kurki, aedsalatit ja aedspinatit) lahuses, kuhu oli lisatud 20 ravimit kontsentratsioonil  $0,5 \mu\text{L}^{-1}$ . Leiti, et TSC kogus nelja taime juurtes ja lehtedes oli üks kõrgemaid ( $0,2\text{-}69 \text{ ng/g}^{-1}$ ). Chen, W jt., (2013) leidsid, et kui pinnast niisutada saastunud heitveega korduvalt läbi 10 aastase perioodi, siis TCS akumulereub kuni 20 cm sügavusele ning aine kogus võib jääda vahemikku  $82\text{-}138 \text{ ng/g}^{-1}$ . Samas katses leiti antud antibakteriaalse aine jälgi ka 90 cm sügavusel olevast põhjaveest.

## 2. REOVEESETE JA KOMPOST

Reoveesete on reoveest füüsikaliste, keemiliste või bioloogiliste meetoditega eraldatud suspensioon (Reoveesete põllumajanduses, haljastuses ja rekultiveerimisel kasutamise nõuded, 2003). Sete koosneb veest, orgaanilisest materjalist, surnud ja elavatest mikroorganismidest ning anorgaanilistest mürgistest saasteainetest (Kacprzak jt., 2017). Eestis tekib umbes 150 000 m<sup>3</sup> märgkaalus reoveesetet. Tekkinud reoveesete kuhjub reoveepuhastusjaama juurde, sest et vee-ettevõtted ei ole leidnud lahendusi, kuidas reoveesetet edukalt ringlusesse kaasata ning inimesed suhtuvad reoveesete komposti kasutamisesse väetisena eelarvamustega (Keskkonnaministeerium, 2017).

Globaalne nõudlus taastuvate energiatega ja orgaanilise materjali järgi kasvab. Setet saab moodsate tehnoloogiate abil suunata taaskasutusse - kasutades energia tootmiseks ning väetisena. Reoveesete taaskasutamine on majanduslikult otstarbekas ning keskkonnasõbralik (Kacprzak jt., 2017). Eestis saab töödeldud reoveesetet kasutada põllumajanduses, haljastuses ja rekultiveerimisel. Ehitusmaterjalide tootmiseks tekib Eestis reoveesetet liiga vähe (Keskkonnaministeerium, 2017). Kogu Euroopas kasutatakse põllumajanduseks umbes 40% terves Euroopas toodetud settest (Kacprzak jt., 2017).

Enne kui reoveesetet saab kasutada tuleks seda töödelda nii, et see oleks ohutu looduskeskonnale (põhja- ja pinnaveele, mullale), taimedele, inimestele ja loomadele (Kõrgmaa, 2010). Eestis peab reoveesetet töötleva vähemalt ühe toiminguga abil olgu selleks, siis kas aeroobne või anaeroobne stabiliseerimine, sealhulgas kompostimine või keemiline või termiline töötlemine (Reoveesete põllumajanduses, haljastuses..., 2003). Kompostimine on üks lihtsamaid viise kuidas setet stabiliseerida, suurendada kuivainet sisaldust ning muuta ohutuks. Sete sisaldab 97-98% vett, siis kompostimine vähendab settes ka vee osakaalu. Reoveesete kompostimine on sette aeroobne lagundamine mikro- ja makroorganismide poolt, kuhu lisatakse tugimaterjalina näiteks saepuru, puukoori, turvast, põhku. (Kõrgmaa, 2010; Kacprzak jt., 2017) Kompostimise kestvus sõltub segu temperatuurist. Näiteks 10 päeval kompostimise perioodil peab aunades temperatuur olema vähemalt  $\geq 55^{\circ}\text{C}$  (Reoveesete põllumajanduses, haljastuses..., 2003). Kompostimise meetodeid on kolm (Kõrgmaa, 2010):

1. aunkompostimine – toimub välitingimustes. Komposti segatakse kindla aja tagant, et õhk pääseks juurde ja et segu oleks ühtlane. Protsessi pikkus on tavaliselt 8-12 kuud. Vaja on suurt maa-ala ning Eesti kliimas ei pruugi kõik patogeensed organismid hävida;
2. kuhjaskompostimine – sarnane aunkompostimisega;



3. anumkompostimine – protsess toimub kiirendatult suletud reaktoris, kus on kindel õhu- ja niiskusesisaldus ning temperatuur. Kompostimine on kiire ning koos järelküpsemisega kestab neli kuud.

Pärast töötlemist sisaldab reoveesete keskmiselt 50-70% orgaanilist materjali ja 30-50% mineraalseid aineid ning suurel määral ka teisi toitaineid, sealhulgas mikrotoitaineid (Kacprzak jt., 2017).

## 2.1 Kasutamise seotud eelised ja puudused

Reoveesetet saab põllumajanduses edukalt kasutada väetisena, sest et ta sisaldab väärtuslikke toitaineid nagu fosfor, lämmastik, orgaaniline aine, kaalium, kaltsium ning mikroelemente. Settes olev orgaaniline aine parandab mulla füüsikalisi omadusi – mulla poorsust, vee mahutavust ning parandab mulla mitmekesisust. (Roig jt., 2012; Lemmiksoo jt., 2015b) Maa-alal, kus kasvatatakse köögivilja- ja marjakultuure ning ravim- ja maitsetaimi, on sette kasutamine keelatud (Reoveesete põllumajanduses, haljastuses..., 2003). Pikaajaline reoveesete kasutamine väetisena vähendab mulla pH-d, mis omakorda võib tõsta metallide biosaadavust mullas (Urta jt., 2019). Samuti võib pika-aegse laotamise tulemusena suurendada antibiootikumi resistentsete geenide hulka mullas (Chen, Q jt., 2016). Samuti võib reoveesete kasutamine tekitada taimedes geneetilisi mutatsioone. Põllukultuurid, mis on kasvanud põllul, kuhu on suuremas koguses reoveesetet laotatud, võivad bioakumuleeruda toksilised ühendid, mis võivad omakorda jõuda mööda toiduahelat inimese organismi. (Correâ Martins jt., 2016) Samas võib pikaajaline reoveesete laotamine põllule mõjuda ka positiivselt. Näiteks lubjarikastel muldadel pikaajaline reoveesete kasutamine väetisena muutis mulla orgaanilise materjali poolt rikkamaks ning tõusis ka mulla orgaanilise materjali aromaatsus. Samuti muutus kiiremaks mikroobide aktiivsus ja lämmastiku mineralisatsioon ning lahustuvate fenoolsete ühendite arv mullas kasvas. (Roig jt., 2012)

Reoveesetet saab kasutada ka haljastusel ja rekultiveerimisel. Näiteks vanade kaevanduste taastamisel, kus alad on toitainetevaesed, mõjub sete aeglase väetisena ning seob rohkem vett (Lemmiksoo jt., 2015b). Haljastuses on oluline reoveesete struktuur. Struktuur peaks olema teraline ning sisaldama sobivas koguses anorgaanilist materjali. Selleks, et saavutada teralist struktuuri peaks komposti lisama ka liiva. Negatiivseks aspektiks on see, et aeroobselt stabiliseeritud olme reoveesete võib sisaldada taimede näiteks tomatiseemneid (Lemmiksoo jt., 2015a)

Reoveesette kasutamise üheks puuduseks on kindlasti kehv kvaliteet, nagu näiteks tükilisus, liiga märg ja ebameeldiv lõhn (Keskkonnaministeerium, 2017). Reoveesete võib sisaldada ka võõriseid nagu plastijääke, mis on keskkonnale ohtlikud, sest ei lagune ning muudavad sette välimust. Võõriste sisaldust settest saab vähendada, kui mehaaniline puhastus toimub nõuetekohaselt (Lemmiksoo jt., 2015a). Lisaks võib reoveesete sisaldada kahjulikke aineid, organisme ja ühendeid nagu ravimijääke, raskmetalle ja patogeenseid organisme. Ohtlikke aineid ja ühendeid sisaldava reoveesette kasutamisega võib saastuda veekeskond ning pinnas üleliigsete toitainete ja raskmetallidega (Kõrgmaa, 2010). Saasteainete kogus sõltub reoveesette päritolust, kas on ainult tööstuslik, ainult kodumajapidamistes või mõlemast (Carbonell jt., 2009).

Reoveesete sisaldab selliseid patogeenseid mikroorganisme nagu bakterid (*Salmonella* spp, streptokokid, *E. coli*), viirused (rotaviirus, hepatiit A, C, E, ehoviirus, noraviirus), seened (näiteks *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp) ja parasiitsed ussid, mis on potentsiaalselt ohuks inimese ja loomade tervisele ning taimedele (Dumontet jt., 2001; Sidhu ja Toze, 2009; Kacprzak, 2017). Inimesed võivad patogeensete organismidega kokkupuutuda kahel viisil (Shidu ja Toze, 2009):

1. otsene kokkupuude – nakatumine läbi määrdunud käte ja riiete;
2. kaudne kokkupuude – süüakse kultuurtaimi, mis on kasvatatud põllul, kuhu on lisatud saastatud reoveesetet väetisena.

Reoveesette täielik stabiliseerimine on võimatu ning ka väheoluline, sest et ellujäänud patogeenidel on vähenenud potentsiaal põhjustada terviserikkeid (Shidu ja Toze, 2009). Patogeenide arvu saab vähendada õige reoveesette töötlemise meetodiga. Näiteks sette kompostimine ja lubja lisamine võivad vähendada ohtlike patogeensete organismide arvukust reoveesettes ning seeläbi vähendada ohuriski inimesele (Lemmiksoo jt., 2015b; Kacprzak jt., 2017). Patogeenide inaktiveerimine töödeldud reoveesettes sõltub temperatuurist, niiskuse sisaldusest, mikrofloorast, pH, päevavalgusest, hapnikust, mullatüübist ja selle tekstuurist (Shidu ja Toze, 2009). Chen, Q jt., (2016) leidsid, et reoveesette pikaajaline laotamine pinnasele võib suurendada antibiootikumiresistentsete geenidega bakterite arvukust ja mitmekesisust mullas. Patogeenid inimestele võivad põhjustada toidumürgistust, seedehäireid, erinevaid haigusi ja põletikke (näiteks hepatiit, kuseteede ja jämesoole põletikud) ja allergiaid. Lisaks võivad inimesed nakatuda parasiitussidega (Dumontet jt., 2001; Kõrgmaa, 2010). Eestis on Keskkonnaministeeriumi määrusega määratud piirnormid fekaalsetele *col*/laadsetele bakteritele (100 ml kohta 1000 pesa ühikut) ning helmintide munadele (1 l üks muna) (Reoveesette põllumajanduses haljastuses..., 2003).

Reoveesetet ei tohi põllumajanduses kasutada, kui see sisaldab suurtes kogustes raskmetalle. Kõige levinumad raskmetallid, mida reoveesettes võib leida on tsink (Zn), vask (Cu), nikkel (Ni), kaadmium (Cd), plii (Pb), elavhõbe (Hg) ja kroom (Cr) (Fytli ja Zabaniotou, 2008). Peamised raskmetallide allikad on tööstusettevõtete reovesi ja pinna äravool (Fijalkowski jt., 2017). Enamik raskmetallide kogusest reoveesettes eemaldatakse mehaanilises ja bioloogilises etapis. Mehaanilise puhastamise etapis eemaldatakse umbes 50% Zn, Pb ja Cu kogusest reoveest (European Commission, 2001a). On leitud, et ka pikk kompostimise periood (180 päeva) võib vähendada raskmetallide kontsentratsiooni piirmääraneni, nii et komposti võiks kasutada põllumajanduses (Amir jt., 2005). Kuid pikaajalisel reoveesette komposti laotamise tulemusel võivad kompostis olevad raskmetallid ajajooksul koguneda pinnasesse, imbuda põhjavette ja imenduda taimedesse ning lõpuks jõuda mööda toitumishelat inimese toidulauale. Raskmetallid pärsivad taimede kasvu ning on toksilised mulla mikroobidele (Mantovi jt., 2005; Smith, 2009). Raskmetallid võivad inimestele põhjustada ägedat mürgisust, kroonilisi haigusi (näiteks kahjustusi kopsudele ja maole) ning võivad olla kartsioogeensed (Environmental Commission, 2001b). Keskkonnaministeeriumi määrusega on etteantud põllumajanduses, haljastuses ja rekultiveerimisel kasutatava settes leiduvate raskmetallide piirväärtused (Reoveesette põllumajanduses, haljastuses..., 2003). Lisaks on sätestatud ka raskmetallide piirväärtused pinnases ja põhjavees (Ohtlike ainete põhjavee kvaliteedi piirväärtused, 2010; Ohtlike ainete sisalduse piirväärtused pinnases, 2010).

Lisaks raskmetallidele ja patogeensetele organismidele takistab reoveesette laialdast kasutamist ka settes olevad orgaanilised saasteained. Orgaaniliste saasteainete alla kuuluvad ravimijäägid, isikuhooldusvahendid, pestitsiidid, polüaromaatsed süsivesinikud (PAH), polüklooritud bifenuülid (PCB), perfluoritud ühendid (PFC), adsorbeeruvad orgaanilised halogeniidid (AOX) (European Commission, 2001b; Fijalkowski jt., 2017). ELi jälgimisnimekirja kuulub kaheksa ainet või ainete rühma, mis võivad liidu tasandil põhjustada veekeskkonnale või selle kaudu keskkonnale märkimisväärset kahju. Antud ainete kohta kogutakse seireandmeid terves ELis. Varem kuulus nimekirja ka töös käsitletud DCF, kuid kuna antud toimaine kohta on kogutud piisavalt kvaliteetseid andmeid, otsustati DCF nimekirjast välja jätta. 05.06.2018 seisuga kuuluvad antud nimekirja järgmised ained. (Euroopa Liidu Teataja L141/9, 2018): 17- $\alpha$ -etinüülöstradiool (EE2); 17- $\beta$  östradiool (E2), östroon (E1); makroliidantibootikumid (erütromütsiin, klaritromütsiin, asitromütsiin); metiokarb; neonikotinoidid (imidaklopriid, tiaklopriid, tiametoksaam, klotianidiin, atseetamipriid); metaflumisoon; amoksitsilliin; tsiprofloksatsiin.

PAHd tekivad orgaaniliste ainete nagu näiteks puidu ja süsiniku mittetäielikul põlemisel, sõidukite mootoris või pürolüüsist (European Commission, 2001b; Ozaki jt., 2017). PCBd võivad tekkida

fossiilsete kütuste põlemisel (European Commission, 2001b). Orgaaniliste saasteainete sisaldust reoveesettes saab vähendada kui setet osoneerida, töödelda seda ultraviolettkiirguse (UV) oksüdatsiooniga või bioagumentatsiooniga (Semblante jt., 2015). Reoveepuhastamiseprotsessis ning reoveesette töötlemisel võivad orgaanilised ained moodustada vahesaaduseid, mis võivad loomadele ja taimedele olla veel toksilisemad kui algained (Fijalkowski jt., 2017).

Orgaanilised saasteained võivad tuule ja vihma tõttu sattuda atmosfääri ning pinnavette. Ühendid võivad akumulieruda taimedesse ning jõuda inimese toidulauale (Laturnus jt., 2007). Mõned adsorbeeruvad orgaanilised halogeniidid võivad moodustada veel toksilisemaid ja kantserogeensemaid ühendeid nagu vinüülkloriid ja trihalometaanid. Trihalometaane tekitab näiteks reoveesette töötlemisel osooniga. PAHd, PCBd on samuti kantserogeensed ühendid ning võivad põhjustada elusorganismides mutatasioone ning vähki (European Commission, 2001b).

Nagu peatükkides 1.2 ja 1.3 on kirjutatud, siis ravimid ja isikuhooldusvahendid reovees ja reoveesettes täielikult ei lagune ning looduskeskkonda jõudes võivad nad põhjustada ökotoksilisust ning akumulieruda taimedesse ning mööda toitumisahelat jõuda inimeseni. Martín jt., (2015) uurisid ravimite sisaldust pärast erinevaid töötlemise meetodeid kasutades. Leiti, et ravimijääkide sisaldus kompostis oli jäänud, kas samale taseme või läinud oluliselt kõrgemaks, kui aneroobselt lagundatud settes. Seda võib seletada sellega, et kompostimisel sette kaal orgaanilise aine lagunemise tulemusel vähenes. Haiba (2017) uuris ühe kuu jooksul ravimite lagunemist laboritingimustes kahes kompostimis segus. Ühes kompostimisanumas oli reoveesette ja saepuru vahekord 1:2 ning teises 1:3 mahu järgi. DFC lagunes 6% võrra rohkem kompostimis segus, kus vahekord oli 1:3. 1:2 vahekorraga segus oli protsent 92% ja 1:3 oli 98%. CBZi puhul oli 1:2 vahekorra puhul lagunemisprotsent -11% ja 1:3 puhul 13%. Sarnaselt DFCle oli ka METi lagunemisprotsent reoveesette ja saepuru 1:3 vahekorra puhul suurem (93 %), 1:2 puhul oli see 91%. TCS lagunemis protsendid olid vastavalt 55% (1:2) ja 81% (1:3).

Eestis ega ka ELis pole etteantud reoveesettes või selles kompostis sisalduvate inimravimite piirväärtusi. Kuid ELis on veterinaarravimitele määratud piirväärtused. Veterinaarravimite kogus ei tohiks ületada 100 µg/kg sõnnikus ja 10 µg/kg pinnases, millele on laotatud sõnnikut. Samas on teadlased arvamusel, et selleks, et sete oleks ohutu kõikidele mullaorganismidele peaks ravimite piirväärtus mullas olema väiksem (1 µg/kg). Kuid antibiootikumiresistentsed geenide tekke vältimiseks peaksid ravimite piirväärtused olema veel väiksemad (0,01-0,1 µ/kg). (Lillenberg, 2011)

### 3. VIHMAUSSID JA NENDE ROLL KESKKONNAS

Vihmaussid on ühed tähtsamad organismid mullaökosüsteemis, sest et nad parandavad mullaviljakust. Vihmaussid toovad mulla sügavamates kihtidest toitaineid mulla ülemistesse kihtidesse sõnnikuna, mis takistab toitainete leetumist. Mullakihtide segamisel on orgaaniline materjal mullas paremini hajutatud ning toitained on taimedele paremini kättesaadavad (Chauhan, 2014). Vihmaussid kiirendavad toitainete mineralisatsiooni, tekitades pinnases väikeseid laiike, mis on rikkad mineraalsete toitainete poolest. Näiteks just kultuurtaimed vajavadki suurtes kogustes mineraalseid aineid ning kasv on tulemuslikum tänu vihmausside tegevusele (Bertrand jt., 2015). Nad õhustavad mulda ning lagundavad orgaanilist materjali, mille tulemusena paranevad nii mulla keemilised, füüsikalised kui ka bioloogilised omadused (Chauhan, 2014).

Mullas liikudes ja toitudes tugevdavad vihmaussid mulla struktuuri, mis omakorda mõjutab niiskustaset, gaasi difusiooni ja toitainete liikumist mullas. Nende tegevuste tõttu muudavad vihmaussid ka mullas mikrobioomi struktuuri ja talitlemist (Gong jt., 2018). Mikroobide struktuuri ning orgaanilise materjali muutmine kiirendab mikroobide aktiivsust ning seeläbi kiireneb ka orgaanilise aine lagunemine. Orgaanilist materjali muudetakse füüsiliste tegevustega nagu näiteks õhustamine, segamine ja peenestamine (Bertrand jt., 2015; Ali jt., 2015). Lisaks mikroobide tegevuse mõjutamisele ja orgaanilise aine muutmisele muudavad vihmaussid ka orgaanilise materjali füüsikalist ja keemilist seisu vähendades järk-järgult süsiniku/lämmastiku suhet ning seeläbi suurendades mikroorganismidele kättesaadava materjali pinda. Koostöös mikroorganismidega muudavad vihmaussid keerulise ehitusega orgaanilised materjalid kõrge väärtusega huumuseks (Lazcano jt., 2008). Stimuleerides mikroobide aktiivsust tekib taimedes rohkem ka taimekasvuregulaatoreid. Vihmaussid transpordivad mikroorganisme mullas oma kehal või kehas vertikaalselt ja horisontaalselt. (Bertrand jt., 2015)

Lisaks orgaanilise aine lagundamisele ja mulla omaduste parandamisele mõjutavad vihmaussid mullas kaevates ka mulla mehaanilisi ja hüdraalseid omadusi, mis loovad mulla makropoore. Makropoorid mõjutavad vee infiltratsiooni ning aitavad vähendada pinnalt veeärajoosu ja erosiooni. Vihmausside liikumine mullas suurendab ka vee kättesaadavust taimedele (Bertrand jt., 2015). Nende tegevuse tagajärjel on põllukultuurid vastupidavamad haigustele ja kahjuritele (Bertrand jt., 2015).

Vihmaussid aitavad lagundada ka pinnases leiduvaid orgaanilisi saasteaineid nagu PAHid, PCBid, raskmetalle ja pestitsiide (Rodriguez-Campos jt., 2014). Mulla õhustamisega ning selle struktuuri

parandamisega kiirendavad nad mikroobide aktiivsust ning suurendavad mikroobidele kättesaadava aine pindala, mis omakorda aitab kaasa orgaaniliste saasteainete lagunemisele (Dendooven jt., 2011; Rodriguez-Campos jt., 2014).

Eespool kirjeldati vihmausside rolli keskkonnas, kuid lisaks mainitule on nad ka väga head indikaatorid hindamaks keskkonna saastunud olekut. Näiteks võidakse neid kasutada vältimistestis. Vältimistest on ökoloogiline riskianalüüs, mida kasutatakse, selleks et juba varakult avastada ja määrata saastumise taset/kogust pinnases (Natal-da-Luz jt., 2008a, 2008b). Vihmausse kasutatakse vältimistestis just sellepärast, et nad on tundlikud erinevate saasteainete suhtes mullas. Nende keha on kaetud kemoretseptoritega (*chemoreceptors*) tänu millele nad suudavad tuvastada erinevaid saasteaineid. Neil on õhuke epidermaalne kude ja nääre, mis on keskkonnamuutuste suhtes tundlikud. Nad kaitsevad ennast keskkonnas esinevate ebasoodsate tingimuste kas põgenemise või vältimise teel. (Garzía-Santos ja Keller-Forrer, 2011; Gao jt., 2016) Pinnases olevate saasteainetega puutuvad nad kokku välise epidermiskihiga. Just võimalusele vältida ebasoodsaid tingimusi loetakse vältimistestide vihmaussidega täpsemateks kui toksilisuse või reprodutseerimise teste (Natal-da-Luz jt., 2009).

Peamised vihmausside liigid, mida vältimistestides kasutatakse on *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* (Natal-da-Luz jt., 2009). Ka Rahvusvaheline Standardimisorganisatsioon (*International Organization for Standardization-ISO*) soovib vältimistestis kasutada *Eisenia andrei* ja *Eisenia fetida* liigi vihmausse (ISO 17512-1, 2008). Mõlemad liigid elavad mulla ülemistes kihtides (Domínguez, 2004). Mulla ülemistes kihtides elavad vihmaussid on toksilisuse testimisel eelistatavamad, sest et neid on kerge laboritingimustes kasvatada, saavutavad suguküpsuse kiiresti ning neil on taluvus erinevate keskkonnategurite suhtes (ISO 17512-1, 2008; Delgadillo jt., 2017). Lisaks kasutatakse vältimistestis *Dendrobaena veneta* liigi usse. Ka *Dendrobaena veneta* elab mulla ülemistes kihtides. *Dendrobaena veneta* liigi täiskasvanud isendid on kaalulult suured (keskmiselt 0,92 grammi), nad ei ole väga viljakad ning kasvavad väga kiiresti. Talub paremini niiskuse kõikumisi mullas kui mõni teine vihmaussiliik ning eelistab temperatuuri 15°C-25°C. Tema vöö on punakas- sinist värvi ning pikkus on 5-7 mm x 50-80 mm. Suguküpsuse saavutavad 65 päevaga ning elutsükkel on 100-150 päeva. (Domínguez ja Edwards, 2010)

Vihmausside vältimistesti saab kasutada ka põllul olevate raskmetallide toksilisuse hindamiseks, kui muuta kunstliku kontrollsubstraadis füüsikalisi- ja keemilisi omadusi nii et need oleksid põllult võetud proovidele sarnased (Delgadillo jt., 2017). Gao jt., (2016) uurisid usside käitumist metallidega saastunud keskkonnas. Leiti, et mida kõrgem on Zn ja Pb tase keskkonnas, seda rohkem vihmaussid antud keskkonda väldivad. Kui Pb kogus mullas oli 1200 mg/kg ja Zn kogus 400

mg/kg, siis kõik kümme vihmaussi olid liikunud saastunud keskkonnast kontroll keskkonda. Antud katse näitas, et Zn on *Eisenia fetidale* toksilisem kui Pb (Gao jt., 2016). Vältimistest on tehtud ka ravimitega. Žižek ja Zidar (2013) tegid vältimiskatse *Eisenia andrei* liigi vihmaussidega kasutades veterinaarravimit lasolotsiid. Vihmaussid vältisid ravimit, kui ravimi kontsentratsioon oli karbis 12,3 mg/kg<sup>-1</sup>. Kuigi on teada, et vihmaussidel on keskkonnas oluline roll ja neid saab kasutada kui keskkonna saastatuse määramise indikaatoritena, ei ole kirjanduse andmetel väga palju informatsiooni vihmausside ravimite vältimise (eriti *Dendrobaena veneta* liik) kohta pinnases. Samas ravimite ja nende jääkide sattumine keskkonda on muutunud uueks globaalseks probleemiks, millel võib olla palju negatiivseid tagajärgi (kirjeldatud peatükid 1.2 ja 1.3). Antud lõputöö puhul on piltookatsega, kus võrreldavaid andmeid *Dendrobaena veneta* ja valitud ravimitega teostatud vältimistesti kohta kirjandusest ei leitud.

## 4. MATERJAL JA METOODIKA

### 4.1 Materjal

#### 4.1.1 Ravimid

Vältimiskatsesse valiti diklofenak (DCF), karbamasepiin (CBZ), metformin (MET) ning triklosaan (TCS). Katsesse valiti just need neli ainet, sest need on ühed enim kasutatavad ravimid, mille jälgi on leitud nii reoveest, heitveest, reoveesetest, pinnaveest, põhjaveest, pinnases, taimedest ja loomadest (Oosterhuis jt., 2013; Wu jt., 2013; Chen, W jt., 2013; Sui jt., 2015; Verlicchi ja Zambello, 2015; Ebele jt., 2017; Yang jt., 2017; Bartrons ja Peñuelas, 2017; Mezzelani jt., 2018; Klampfl, 2019). Ravimid telliti Labochema Eesti OÜ.

Katsed viidi läbi kahes osas. Esimeses osas tehti vältimiskatse iga ravimi kohta eraldi. Teises osas kasutati ravimite kombinatsiooni. Ravimite kogused arvatati segu kuivaine sisalduse järgi, ühe kilogrammi kuivaine kohta lisati 5, 7, 10, 20, 30 mg ainet. Ravimid lahustati 10 ml etanoolis, seejärel lisati ravimite lahused üheks minutiks 35 kraadisesse ultrahelivanni (*Bandelin electronic*). Lisaks tehti kontrollkatse (0 mg/kg (KA)). Iga ravimi ja kontsentratsiooni kohta tehti kolm kordust (vt tabel 4.1).

Antud magistritöö puhul on tegemist pilootkatsega ning kirjanduse andmetel ei leitud informatsiooni varasemalt teostatud vältimiskatsete kohta reoveesette kompostiga. Ravimite kontsentratsioonide valiku tegemisel lähtuti teiste erinevate toksiliste katsete põhjal tehtud uuringute tulemustest (Kinney jt., 2008; Carter jt., 2014b; Pino jt., 2015; Havranek jt., 2017; Ma jt., 2017).

Tabel 4.1 Vältimiskatsesse valitud ravimite kontsentratsioonid

Ravimi nimetus	Ravimite kontsentratsioonid lahuses, mg/kg (KA)					
	0	5	7	10	20	30
Ravimeid ei lisatud	3x	-	-	-	-	-
TCS	-	3x	3x	3x	3x	3x
DCF	-	3x	3x	3x	3x	3x
CBZ	-	3x	3x	3x	3x	3x
MET	-	3x	3x	3x	3x	3x
TCS+DCF+CBZ+MET	-	3x	3x	3x	3x	3x



### 4.1.2 Vihmaussid

Vältimiskatse viidi läbi *Dendrobaena veneta* liigi vihmaussidega. Vihmaussid saadi kahest kalastustarvete poest - Vobla ja Betta Zoo. *Dendrobaena veneta* liik valiti sellepärast, et ülemistes mulla kihtides elavad ussid on tundlikud keskkonnas olevate saasteainete suhtes ning neil on võime keskkonnas olevaid ebasoodsaid tingimusi vältida põgenemise teel (Garzía-Santos ja Keller-Forrer, 2011; Gao jt., 2016). Samuti on neid laboritingimustes kerge kasvatada ning suguküpsuse saavutavad umbes kahe kuuga (Domínguez ja Edwards, 2010; Delgadillo jt., 2017). Antud liigi vihmaussid taluvad paremini niiskuse kõikumisi mullas (Domínguez ja Edwards, 2010).

### 4.1.3 Reoveesette kompostisegu

Vältimiskatse läbiviimiseks valmistati eelnevalt ette reoveesette kompostisegu, mis segati kokku mahu järgi reoveesette ja haava saepuruga (1:2). Vahekord valiti kirjanduse ja varasemalt tehtud tööde põhjal (Ojala, 2015; Haiba, 2017). Töös kasutati metaankääritatud ja tahendatud reoveesetet, mis toodi Tallinna Paljassaare reoveepuhastusjaamast (joonis 4.1) ning haava saepuru pärines Ralgetor OÜ-st (Jõgevamaa, Saare vald, Nautrasi küla). Kokku valmistati viis kompostisegu, mida piisava hapnikutaseme tagamiseks segati perioodiliselt. Kompostiaunade niiskusesisaldus hoiti 60-70% kogu katse jooksul, seda mõõdeti 3-4 korda nädalas ning vajadusel lisati vett.

Komposteerimise protsess kestis perioodil 09.03.2019-26.04.2019 ning viidi läbi Tallinna Tehnikaülikooli Tartu Kolledži mullabioloogialaboris. Selle perioodi jooksul mõõdeti erinevaid parameetreid nagu komposti temperatuur, kuivainesisaldus ja pH. Kompostide temperatuuri mõõdeti igapäev ning selleks kasutati elavhõbeda kraadiklaase.



Joonis 4.1 Vaade töös kasutatud reoveesettele (autori foto)

Segu kuivainesisalduse määramiseks kasutati massikao meetodit (valemid 4.1 ja 4.2). Selleks kaaluti kõigepealt tühjad tiigid, siis võeti igast kompostianumast nii pealt, külgedelt kui ka põhjast proovid (kaaluga 60-70 grammi). Pärast proovide võtmist kaaluti täidetud tiigid ära ning asetati 24 tunniks temperatuuril 105° C juurde kuivatuskappi. 24 tunni möödudes kaaluti proovidega täidetud tiigid ära. Kuivaine arvutamiseks kasutati kahte valemit (Ojala, 2016). Valemite järgi saadi teada mitu protsenti kuivainet on igas kompostis. Kuivaine protsent pidi jääma vahemikku 35-40%. Vajaliku niiskusesisalduse tagamiseks lisati vajadusel kompostiaunadele vett.

$$N = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100, \quad (4.1)$$

$$KA = 100 - N, \quad (4.2)$$

kus,  $N$ - proovi niiskussisaldus %

$m_0$ - analüüsitava proovikoguse mass grammides enne kuivatamist

$m_1$ - analüüsitava proovikoguse mass grammides pärast kuivatamist

$KA$ -kuivainesisaldus proovis %.

Kompostide pH määramiseks kaaluti igast kompostianumast 10 grammi proovi kolvidesse ning lisati 100 ml destilleeritud vett. Kolb suleti korgiga ning jäeti 24 tunniks toatemperatuurile seisma. Pärast 24 tunni möödumist mõõdeti selginenud vedelikust pH, kasutades selleks pH-meetrit *WTW Multi 340i*, elektroodiga SenTix 41.

## 4.2 Metoodika

Vältimiskatse viidi läbi Tallinna Tehnikaülikooli Tartu Kolledži mullabioloogia laboris vahemikus 26.04.2019-02.05.2019. Vältimiskatse viidi läbi ISO 17512-1 (2008) standardi järgi. Vältimiskatses kasutatud karbid mõõtmetega 15x13x9,5cm jagati plastikust vaheseinaga kaheks võrdseks osaks, nii et ühele poole saaks puhas segu ning teisele poole ravimitega saastunud segu (joonis 4.2). Õhuvahetuse tagamiseks tehti eelnevalt karpidele nii külgedele kui ka põhja peale õhugaugud. Ühele poolele karbi segust (150 g) lisati pipetiga vastav kogus ravimi ja etanooli lahust ning segati hoolikalt. Kontroll poolele (150g) ravimite lahust ei lisatud, kuid keskkonna tingimuste ühtlustamiseks lisati null poolele sama kogus puhast etanooli. Enne vihmausside lisamist, karbid seisisid 24 h, et tagada etanooli lahustumine segus. Lisaks hoiti katses kasutatud vihmausse enne vältimiskatse alustamist 24 h reoveesette kompostisegus (kuhu ei olnud eelnevalt lisatud ei ravimeid ega etanooli), et nad aklimatiseeruksid katse keskkonnaga. Järgmiseks eemaldati vahesein ning kahe segu vahele lisati eelnevalt destilleeritud veega puhastatud 10 täiskasvanud

*Dendrobaena veneta* vihmaussi. 16/8- tunnise valguse/pimeduse režiimi tagamiseks kaeti karbid fooliumpaberiga. Katse kestis 48 h, ruumitemperatuur oli  $20 \pm 2$  °C.



Joonis 4.2 Vältimistestis kasutatud vaheseinaga karp, kus ühel pool puhas segu ja teises ravimitega segu (autori foto)

Katse lõppedes lisati vahesein kahe segu vahele tagasi ning loeti kokku, mitu ussi on ühel ja teisel pool karpi. Vihmaussid, kes olid jagaja tagasipaneku tõttu pooleks läinud, loendati 0,5 võrra, olenemata ülejäänud keha pikkusest (ISO 17512-1, 2008; Xie jt., 2013). Kaduma läinud ussid loeti surnud usside hulka. Iga ravimi kontsentratsiooni teostati kolm kordust. Selleks, et teada saada, mitu protsenti ussidest vältis saastunud keskkonda kasutati järgmist valemit (valem 4.3) (ISO 17512-1, 2008). Negatiivne tulemus tähendas, et vältimist ei toimunud.

$$X = \left( \frac{nc - nt}{N} \right) * 100 \quad (4.3)$$

kus,  $X$ - vältimine %

$nc$ - usside arv puhtal poolel

$nt$ - usside arv ravimitega poolel

$N$ - karbis olevate usside arv

## 5. TULEMUSED JA ARUTELU

Vältimistest on ökoloogiline riskianalüüs mida kasutatakse, selleks et juba varakult avastada ja määrata saastumise taset/kogust pinnases. Teste on tehtud nii pestitsiididega, metallidega kui ka orgaaniliste kemikaalidega (Natal-da-Luz jt., 2008a). Test on soodne ning seda on kerge läbiviia (Garzía-Santos ja Keller-Forrer, 2011). Testi eeliseks võrreldes standardiseeritud toksilisuse katsetega on testi lühem kestvusaeg mullas olevate selgrootutega (Kobetižova jt., 2010). Vältimiskatse kestis 48 tundi (ISO 17512-1, 2008).

Antud magistritöö vältimistesti läbiviimiseks segati mahu järgi kokku reoveesete ja saepuru. Valmistatud segud komposteerusid 40 päeva, et kindlustada reovesettes võimalike sisalduda võivate saasteainete lagunemine. Haiba (2017) doktoritöö tulemustest selgus, et katsesse valitud ravimijäägid võivad pärast ühe kuu komposteerumise möödumist laguneda kuni 98% ulatuses.

### Diklofenak

Tabelis 5.1 on esitatud ravimi DCF vältimistesti tulemused kõikide kontsentratsioonidel korral. Pärast 48 h möödumist ja usside loendamist selgus, et kõikides karpides oli vihmausside suremus üle 10%. ISO 17512-1 (2008) standardi kohaselt loetakse vältimiskatse ebaõnnestunuks, kui usside kadumise või suremuse protsent on suurem kui 10. Samas on tulemustest näha, et 7 ja 10 mg /kg (KA) juures osaliselt ussid siiski vältisid DCF saastunud keskkonda. 5, 20 ja 30 mg/kg (KA) juures oli suremuse 47-93%, millest võib järeldada, et keskkond olid muutunud vihmaussidele toksiliseks. Kõige madalama kontsentratsiooni juures oli suremuse osakaal võrreldes 7 mg/kg(KA) 3,7 korda suurem. See võis olla tingitud asjaolust, et DCF 5 mg/kg (KA) korral ( $0,4 \pm 0,03$  g) oli vihmausside keskmine kaal väiksem kui DCF 7 mg/kg (KA) ( $0,9 \pm 0,08$  g) puhul.

Tabel 5.1 Ravimi DCF vältimistesti tulemused (A- vihmausside arv null poolel; B- vihmausside arv ravimi poolel; S-keskmine suremuse protsent kolme korduse peale; NR-keskmine vältimise protsent kolme korduse peale)

DIKLOFENAK										
Kordus	Kontsentratsioon mg/ kg (KA)									
	5		7		10		20		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1. DCF	2	0	3	5	2	2	2	2	0	0
2. DCF	3	2	2	6	7	3	2	0	0	0
3. DCF	4	5	8	2	6,5	1,5	6	2	1	1
<b>S keskmine %</b>	<b>46,7</b>		<b>13,3</b>		<b>26,7</b>		<b>50</b>		<b>93,3</b>	
<b>NR keskmine %</b>	<b>6,6</b>		<b>0</b>		<b>30</b>		<b>20</b>		<b>0</b>	

Näiteks Pino jt., (2015) on leidnud, et DCF mõjub vihmaussidele (*Eisenia fetida*) toksiliselt, surmav kontsentratsioon oli 90,49 mg/kg. Antud katse tulemused näitasid, et 30 mg/kg (KA) kohta reoveesette kompostisegus oli *Dendrobaena veneta* suremus üle 90%.

### Metformiin

Katse tulemustest selgus, et vihmaussid ei vältinud MET kontsentratsioonil 5 mg/kg (KA) (NR -23,3%). Keskmine vihmausside kaal oli  $1 \pm 0,06$  g. Samas suremuse osakaal oli 7, 10, 20 ja 30 mg/kg(KA) korral 37-70%. Võrreldes surnud ja elusate usside osakaalu (alates 7 mg/kg) võib väita, et vältimiskatse ebaõnnestus (tabel 5.2). Saadud tulemustest võib eeldada, et vihmaussid võivad vältima hakata MET-ga saastunud keskkonda kontsentratsioonide vahemikus 5-7 mg/g (KA). Kontsentratsioonil 30 mg/kg (KA) oli surnud vihmausside keskmine protsent madalam (36,7%) kui näiteks 10 mg/kg (KA) puhul. See võis olla tingitud usside keskmisest kaalu erinevusest. Näiteks 10 mg/kg (KA) korral oli keskmine isendite kaal  $0,4 \pm 0,03$  g, samas 30 mg/kg (KA) korral oli  $0,5 \pm 0,04$  g. (tabel 5.2).

Tabel 5.2 Ravimi MET vältimistesti tulemused (A- vihmausside arv null poolel; B- vihmausside arv ravimi poolel; S-keskmine suremuse protsent kolme korduse peale; NR-keskmine vältimise protsent kolme korduse peale)

Kordus	METFORMIIN									
	Kontsentratsioon mg/ kg (KA)									
	5		7		10		20		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1. MET	4	6	2	5	0	2	0	0	2	3
2. MET	3	7	5	1	0	2	2	3	3	2
3. MET	1,5	2,5	0	0	1	3	2	4	5	4
<b>S keskmine %</b>	<b>20</b>		<b>56,7</b>		<b>70</b>		<b>63,3</b>		<b>36,7</b>	
<b>NR keskmine %</b>	<b>-23,3</b>		<b>3,3</b>		<b>- 16,7</b>		<b>-10</b>		<b>3,3</b>	

### Karbamasepiin

Kui vaadata ravimi CBZ vältimistesti tulemusi (tabel 5.3, järgmisel leheküljel), siis on näha, et juba kontsentratsioonil 5 mg/kg (KA) hakkavad vihmaussid ravimit vältima (keskmine NR 16,7%), keskmine kaal  $0,6 \pm 0,02$  g. Samas võrreldes 7 mg/kg (KA) ( $0,7 \pm 0,04$  g) oli keskmine usside kaal suurem ja vältimist ei toimunud. Kuna suremuse osakaal oli 7 mg/kg (KA) juures ligi 7% tõusnud, võib eeldada, et väiksema kaalu juures oleksid ussid CBZ-d vältima hakanud. Samas ellujäänutest olid enamus ravimi poolel, ehk vältimist ei toimunud.

Tabel 5.3 Ravimi CBZ vältmistesti tulemused (A- vihmausside arv null poolel; B- vihmausside arv ravimi poolel; S-keskmine suremuse protsent kolme korduse peale; NR-keskmine vältimise protsent kolme korduse peale)

KARBAMASEPIIN										
Kordus	Kontsentratsioon mg/ kg (KA)									
	5		7		10		20		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1. CBZ	7	3	1	8	2	3	1,5	1,5	2	0
2. CBZ	1	4	2	5	1	0	0	0	0	0
3. CBZ	7	3	4	6	2	0	1,5	0,5	1	0
<b>S keskmine %</b>	<b>16,7</b>		<b>23,3</b>		<b>73,3</b>		<b>83,3</b>		<b>90</b>	
<b>NR keskmine %</b>	<b>16,7</b>		<b>-40</b>		<b>6,7</b>		<b>1,7</b>		<b>10</b>	

Tablist 5.3 on näha, et CBZ kontsentratsiooni tõustes suureneb ka vihmausside suremus. Seega võib järeldada, et mida kangem kontsentratsioon seda toksilisemalt mõjub CBZ vihmaussidele. Näiteks Carter jt., (2014a) on leidnud, et CBZil on pinnases pooride vees kõrge aktiivsus ning seetõttu akumulereerub CBZ kohe esimeste tundide jooksul vihmaussidesse (*Eisenia fetida*) üsnagi kiiresti. Juba kontsentratsioonil 2,25 µg akumulereerus ravim vihmaussidesse.

Võrreldes DCF (tabel 5.1), MET (tabel 5.2) on näha CBZ (tabel 5.3) mõjub toksilisemalt *Dendrobaena veneta* vihmaussidele kui DCF ja MET. CBZ korral on keskmine suremus suurem (57%) kui DCF (46%) ja MET korral (49%). Kui võrrelda antud töö tulemusi kirjandusega, siis on näha erinevusi ravimite mõjul erinevate vihmaussi liikide vahel. Näiteks *Eisenia fetida* liigi vihmaussides akumulereerus DCF kiiremini kui CBZ (Carter jt., 2014a), kuid *Lumbricus terrestris* akumulereerus jällegi CBZ kiiremini, kui DCF (Carter jt., 2016b).

### **Trikloosaan**

Tabelist 5.4 (järgmisel leheküljel) on näha, et juba kontsentratsioonil 5 mg/kg (KA) mõjub TCS *Dendrobaena veneta* vihmaussidele surmavalt. Mida kõrgemaks kontsentratsioon läks, seda suurem suremus (63-97%). Kui võrrelda TCS tulemusi teiste ravimite tulemustega, siis on näha, et TCS on neljast ühendist kõige toksilisem.

Tabel 5.4 Ravimi TCS vältimistesti tulemused (A- vihmausside arv null poolel; B- vihmausside arv ravimi poolel; S-keskmine suremuse protsent kolme korduse peale; NR-keskmine vältimise protsent kolme korduse peale

TRIKLOSAAN										
Kordus	Kontsentratsioon mg/ kg (KA)									
	5		7		10		20		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1. TCS	3	5	1	0	1	1	0,5	0,5	0	0
2. TCS	0	2	1	2	0	0	0	0	0	1
3. TCS	0	1	3	3	0	1	0	0	1	0
<b>S keskmine %</b>	<b>63,3</b>		<b>66,7</b>		<b>90</b>		<b>96,7</b>		<b>93,3</b>	
<b>NR keskmine %</b>	<b>-16,7</b>		<b>0</b>		<b>-3,3</b>		<b>0</b>		<b>0</b>	

Havranek jt., (2017) on leidnud, et 0,8 µg/g TCSi reoveesettes akumulereb ühe nädala jooksul *Dendrobaena veneta* vihmaussidesse, kuid ei mõju neile surmavalt. Samas kirjanduse andmed näitavad, et TCSil on võime akumulereuda *Eisenia fetida* vihmaussidesse ning aine kahjustab nende DNAd ning mõjub neile toksiliselt (Reiss jt., 2009; Lin jt., 2010; Macherius jt., 2014; Ma jt., 2017). Saadus katse tulemuste põhjal võib väita, et *Dendrobaena veneta* jaoks on TCS toksiline, ning standardi kohaselt katse ebaõnnestus, kuna vältimist ei suudetud tuvastada (ISO 17512-1, 2008). Arvestades pilootkatse ja Havranek jt., (2017) andmeid, siis vihmausside TCS vältimise leidmiseks reoveesetest valmistatud kompostis peaks teostama täiendavad katsed vahemikus 0,8 kuni < 5 mg/kg (KA) kohta.

#### Ravimite (DCF, MET, CBZ, TCS) kombinatsioon

*Dendrobaena veneta* liigi vihmaussid vältisid ravimitega saastunud reoveesette kompostisegu juba 5 mg/kg (KA) korral (tabel 5.5, järgmisel leheküljel). Paraku on ebaselge miks kontsentratsioonil 7 mg/kg (KA) oli vihmausside keskmine suremuse protsent suurem, kui näiteks 5 mg/kg (KA) korral, kuigi kaalud olid võrdsed. 5 mg/kg (KA) korral oli keskmine kaal 0,7±0,02 g ja 7 mg/ kg (KA) korral 0,7±0,03 g, sealjuures kontsentratsioonidel 10-30 mg/kg (KA) keskmine suremuse protsent vähenes veelgi. Kontsentratsioonidel 7-30 mg/ kg (KA) oli keskmine usside kaal sama (0,7±0,03 g). Vastavalt standardile saab kombinatsioonide 10-30 mg/kg (KA) kohta lugeda vältimiskatse õnnestunuks, kuna oli täidetud tingimus – kadunud või hukkunud vihmausside arv võib olla maksimaalselt kuni 10%. Samuti on näha, et kõrgematel kontsentratsioonidel oli märgata vihmausside vältimist (tabel 5.5, järgmisel leheküljel).

Tabel 5.5 Vältimistesti tulemused ravimite kombinatsiooni korral (A- vihmausside arv null poolel; B- vihmausside arv ravimi poolel; S-keskmine suremuse protsent kolme korduse peale; NR-keskmine vältimise protsent kolme korduse peale)

RAVIMITE KOMBINATSIOON (DCF+MET+CBZ+TCS)										
Kordus	Kontsentratsioon mg/ kg (KA)									
	5		7		10		20		30	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1.	6	3	0	1	5	2	8	0	5	4
2.	5	0	2	6	5	5	6	4	7	3
3.	5	3	0	6	4	6	7	3	7	3
<b>S keskmine %</b>	<b>26,7</b>		<b>50</b>		<b>10</b>		<b>6,7</b>		<b>3,3</b>	
<b>NR keskmine %</b>	<b>33,3</b>		<b>-36,7</b>		<b>3,3</b>		<b>46,7</b>		<b>30</b>	

Võrreldes üksikute ravimite tulemustega, siis kombinatsiooni korral oli vihmausside keskmine suremuse protsent on väiksem (19%). Üksikute ravimite keskmine suremus oli DCF 46%, MET 49%, CBZ 57% ja TCS 82%. Kombinatsiooni korral võib põhjenduseks olla see, et kui kõik ained on ühes lahuses koos, siis iga aine kogus kontsentratsioonil 5 mg/kg (KA) on väiksem, kui näiteks puhta ravimi lahuse korral. Kuigi magistritöö eesmärgiks oli uurida, milliste kontsentratsioonide juures vihmaussid hakkavad ravimeid vältima, siis saadud tulemused näitavad, et keskmist suremuse osakaalu arvestades on ravimite toksilise mõju vihmaussidele järgmine DCF->MET->CBZ->TCS.

#### Kontroll- ilma lisatud ravimiteta

Ravimite vältimistesti kõrvale tehti ka kontroll test, kuhu täiendavalt ravimeid ei lisatud (tabel 5.6, järgmisel leheküljel). Mõlemal poolel on enam-vähem võrdselt vihmausse. Kuigi karpides oli ravimi kontsentratsioon 0 mg/kg (KA), ületas ka siin korral suremus standardis lubatud 10% määra. Seega võib eeldada, et osaliselt olid vihmausside suremused madalamatel kontsentratsioonidel tingitud ka teistest faktoritest, nagu näiteks ebapiisav õhuaukude olemasolu; rooveesette komposti iseärasustest. Lisaks võisid vihmaussid ka lihtsalt põgeneda.



Tabel 5.6 Kontrollkarpide (0 mg/kg (KA)) vältimistesti tulemused A- vihmausside arv null poolel; C- vihmausside arv teisel puhtal poolel; S-keskmise suremuse protsent kolme korduse peale; NR-keskmise vältimise protsent kolme korduse peale)

Kordus	Kontrollkarp	
	0 mg/kg (KA)	
	A	C
1. Kontrollkarp	2	6
2. Kontrollkarp	6	3
3. Kontrollkarp	2	5
<b>S keskmine %</b>	<b>20</b>	
<b>NR keskmine %</b>	<b>-13,3</b>	

Vihmausside suremuse põhjuseks võis lisaks ravimi kõrgele kontsentratsioonile olla ka reoveesete. Näiteks Rorat jt., (2013) leidsid, et mida kõrgem oli reoveesete kogus pinnal, seda negatiivsemalt reoveesete *Dendrobaena veneta* vihmaussidele mõjub. Näiteks 50% reoveesetet pinnase kohta pärssis nende viljakust, mõjutas immuunsüsteemi. Pikaajane kokkupuude võib viia vihmausside hukkumiseni. Samuti on leitud, et 9 g reoveesetet 1 kg pinnase kohta mõjub vihmaussidele (*Eisenia fetida*) toksiliselt (Clasen ja de Moura Lisbôa, 2018). Seega võib eeldada, et vihmausside suremust võis mõjutada ka *Dendrobaena veneta* korral reoveesete koostis ja osakaal segus. Arvestades saadud tulemusi, siis kindlasti oleks vaja teha täiendavaid uuringuid, leidmaks millisest kontsentratsioonist hakkavad vihmaussid ravimeid vältima. Lisaks võiks vältimistesti viia läbi ISO standardis sätestatud *Eisenia fetida* vihmaussi liigiga, samuti näitavad ka kirjanduse andmed, et nimetatud liik on keskkonna saastajate suhtes tundlikum kui *Dendrobaena veneta* (ISO 17512-1, 2008; Ma jt., 2017; Havranek jt., 2017).

## KOKKUVÕTE

Magistritöö eesmärgiks oli uurida vihmausside *Dendrobaena veneta* tundlikkust kolme ravimi (metformiin, diklofenak ja karbamasepiin) ning ühe antibakteriaalne aine (triklosaan) abil, mille tulemusnäitajaks oli vihmausside vältimiskäitumine. Eesmärgi täitmiseks püstitati neli uurimisülesannet:

1. Anda kirjanduse põhjal ülevaade reoveesette kompostimisest ning ravimite ökotoksilisusest keskkonnale.
2. Viia läbi laboritingimustes vältimiskatse.
3. Võrrelda üksikute ravimite ja nende kombinatsiooni mõju vihmausside käitumisele.
4. Teha läbiviidud katse põhjal järeldused, kas ja kuidas mõjutavad katsesse valitud kolm ravimit ning üks antibakteriaalne aine vihmausside käitumist.

Antud teema on oluline, sest et looduskeskkonda jõuab erinevaid teid pidi järjest suurem hulk ravimijääkide koguseid. Keskkonnas võivad ravimijäägid mõjuda toksiliselt nii keskkonnale endale kui ka organismidele. Mööda toitumisahelat võivad ravimijäägid jõuda inimeseni.

*Dendrobaena veneta* tundlikkuse uurimiseks viidi läbi vältimiskatse, mille aluseks võeti ISO 17512-1 (2008) standard. Katse kestvuseks oli 48 tundi ja see viidi läbi kahes osas. Esimeses osas uuriti valitud ravimite mõju eraldi ning teises osas nende kombinatsiooni mõju kolmes korduses kontsentratsioonidel 5, 7, 10, 15, 20 ja 30 mg/kg kuivaine kohta. Katse lõppedes loendati vihmausside arv karbi mõlemal poolel ning arvutati välja nende keskmine vältimiskäitumise protsent. Vältimiskatses kasutati reoveesette ja haava saepuru segu.

Vastavalt standardile ISO 17512-1 (2008) selgus, et teostatud pilootkatse käigus vältimiskatse ebaõnnestus, kuna suremuse osakaal oli suurem kui lubatud 10%. Tulemustest selgus, et valitud ravimid ja nende kontsentratsioonid olid liialt toksilised *Dendrobaena veneta* liigile ning suurem hulk ussides hukkus. Vastavalt tulemustest selgus, et toksilisuse tase kasvas järjekorras DCF->MET->CBZ->TCS. DCF korral oli keskmine suremuse protsent oli 46%, MET 49%, CBZ 57% ja TCS 82%. Samas ravimite kombinatsiooni korral oli suremuse protsent 2,4-4,3 korda väiksem (19%). See võis olla tingitud asjaolust, et ravimite kombinatsiooni lahuses kontsentratsioonil 5 mg/kg (KA) oli ühe ravimi sisaldus (1,25 mg/kg (KA)) väiksem, kui näiteks puhta ravimi lahuse korral. Samuti võis *Dendrobaena veneta* suure suremuse põhjuseks olla ka teised tegurid: reoveesette osakaal segus; isendite väike kehakaal; ebapiisav õhuaukude olemasolu.

Kokkuvõtteks võib öelda, et antud teemat tuleks edasi uurida. Saadud tulemuste põhjal tuleks valida suurema kehakaaluga *Dendrobaena veneta* vihmaussid. Katses kasutatava usside kehakaal võiks olla alates 0,50 grammist. Selleks, et paika panna kindel piir, mil vihmaussid hakkavad ravimiga saastunud ala vältima, tuleks vältimistesti teha ka teiste kontsentratsioonidega nagu näiteks 1, 2, 3 mg/kg (KA). Selleks, et selgitada välja kuidas reoveesette ja haava saepuru segu vihmaussidele mõjub, tuleks katsetada ka reoveesette ja haava saepuru erinevaid vahekordi nagu näiteks 1:1 ja 1:3. Lisaks võiks vältimistesti läbi viia ka ISO standardis sätestatud *Eisenia fetida* vihmaussi liigiga, et võrrelda kahe vihmaussi liigi tundlikkust antud neljale ainele.

## SUMMARY

The aim of this master thesis was to study the sensibility of *Dendrobaena veneta* to three pharmaceuticals (diclofenac, metformin, carbamazepine) and one anti-bacterial agent (triclosan) with earthworm avoidance test. To achieve the aim the avoidance test was carried out.

The topic is important because an increased number of pharmaceutical residues end up in the environment by different routes. In the environment pharmaceutical residues may be toxic to the environment and to the organisms in the environment. Pharmaceutical residues may end up in the human via food chain.

To test the sensibility of *Dendrobaena veneta* an avoidance test was carried out according to the ISO 17512-1 (2008) standard. The avoidance test lasted 48 hours and was carried out in two parts. In the first part the test was performed with each chemical separately at the concentrations 5, 7, 10, 20 and 30 mg/kg (dw). In the second part the solutions with combination of the same pharmaceuticals and concentrations were made. At the end of the test number of earthworms on the both side of the container was counted and the average percentage of avoidance was calculated. In the avoidance test the sewage sludge and aspen sawdust compost were used.

According to ISO 17512-1 (2008) standard the avoidance test was unsuccessful because more than 10% of the earthworms died. The results of the avoidance test showed that the selected pharmaceuticals with these concentrations were too toxic to *Dendrobaena veneta*. The level of toxicity in the increased order was: DCF->MET->CBZ->TCS. For the DCF the average mortality was 46%, for MET 49%, for CBZ 57% and for TCS 82%. But with the pharmaceutical solution the average mortality was a lot 2,4-4,3 % smaller (19%). The reason for that maybe the fact that the amount of one pharmaceutical (1,25 mg/kg (dw)) in the solution at concentration 5 mg/kg (dw) was smaller than only one pharmaceutical at the concentration 5 mg/kg (dw).

The cause of the high mortality level maybe: too toxic environment for *Dendrobaena veneta*, sewage sludge; small body weight; insufficient amount of air holes; earthworms escaped.

In conclusion the subject of this master thesis should be further explored. The solid range of body weight should be determined. With the same four chemicals more concentrations should be researched to determine the exact concentrations when the *Dendrobaena veneta* earthworms start to avoid the contaminated area. Also different proportions of sewage sludge and aspen sawdust should be used in the avoidance test to see how the earthworms behave. In comparison avoidance test with *Eisenia fetida* should also be carried out.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Al-Farsi, R.S., Ahemd, M., Al-Busaidi, A., Choudri, B.S. (2017). Translocation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) into plant tissues: A review. *Emerging Contaminants*, 3 (4), 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2018.02.001>

Ali, U., Saijd, N., Khalid, A., Riaz, L., Muaz Rabbani, M., Hussain Syed, J., Malik, R. N. (2015). A Review on Vermicomposting of Organic Waste. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34 (4), 1050-1062. <https://doi.org/10.1002/ep.12100>

Al-Rajab, A.J., Sabourin, L., Lapen, D.R., Topp, E. (2010). The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac is readily biodegradable in agricultural soils. *Science of The Total Environment*, 409(1), 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.020>

Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Revel, J-G. (2005). Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge. *Chemosphere*, 59(6), 801-810. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.016>

Aucuna, V., Ginebreda, A., Mor, J.R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., Barcelo, D. (2015). Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: Diclofenac as an example. *Environmental International*, 85, 327-333. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.023>

Bartrons, M., Peñuelas, J. (2017). Pharmaceuticals and Personal-Care Products in Plants. *Trends in Plant Science*, 22(3), 194-203. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.010>

Bertrand, M., Barot, S., Blouin, M., Whalen, J., de Oliveira, T., Roger-Estrade, J. (2015). Earthworm services for cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 553-567. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-014-0269-7>

Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M.H., Zheng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research*, 169, 483-493. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>

Bourdat-Deschamps, M., Ferhi, S., Bernet, N., Feder, F., Crouzet, O., Patureau, D., Montenach, D., Moussard, G.D., Mercier, V., Benoit, P., Houot, S. (2017). Fate and impacts of pharmaceuticals and personal care products after repeated applications of organic waste products in a long-term field experiments. *Science of the Total Environment*, 607-608, 271-780. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.240>

Briones, R.M., Sarmah, A.K., Padhye, L.P. (2016). A global perspective on the use, occurrence, fate and effects of anti-diabetic drug metformin in natural and engineered ecosystems. *Environmental Pollution*, 219, 1007-1020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.040>

Briones, R.M., Zhuang, W-Q., Sarmah, A.K. (2018). Biodegradation of metformin and guanidylurea by aerobic cultures enriched from sludge. *Environmental Pollution*, 243(Part A), 255-262. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.075>

Butler, E., Whelan, M.J., Sakrabani, R., van Egmond, R. (2012). Fate of triclosan in field soils receiving sewage sludge. *Environmental Pollution*, 167, 101-109. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.036>

Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M.M., Fernández, C., Alonso, E., Tarazona, J.V. (2009). Sewage sludge applied to agricultural soil: Ecotoxicology effects on representative soil organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4), 1309-1319. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.01.007>

Carter, L.J., Garmant, C.D., Ryan, J., Dowle, A., Bergström, E., Thomas-Oathes, J., Boxall, A.B.A. (2014a). Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil-Earthworm System. *Environmental Science & Technology*, 48(10), 5955-5963. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es500567w>

Carter, L.J., Harris, E., Williams, M., Ryan, J.J., Kookana, R.S., Boxall, A.B.A. (2014b). Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil-Plant Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(4), 816-825. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf404282y>

Carter, L. J., Ryan, J. J., Boxall, A.B.A. (2016a). Effects of soil properties on the uptake of pharmaceuticals into earthworms. *Environmental Pollution*, 213, 922-931. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.044>

Carter, L.J., Ryan, J.J., Boxall, A.B.A. (2016b). Does Uptake of Pharmaceuticals Vary Across Earthworm Species ? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97(3), 316-322. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1875-7>

Chauhan, P.R., (2014). Role of Earthworms in Soil Fertility and Factors Affecting Their Population Dynamics: A Review. *International Journal of Research*, 1(6), 642-649. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.679.5154&rep=rep1&type=pdf>

Chen, G., den Braver, M.W., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Roelofs, D. (2015). Ecotoxicogenomic assessment of diclofenac toxicity in soil. *Environmental Pollution*, 199, 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.032>

Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y., Zhu, Y-G. (2016). Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environmental International*, 92-93(7-8), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>

Chen, W., Xu, J., Lu, S., Jiao, W., Wu, L., Chang, A.C. (2013). Fates and transport of PPCPs in soil reclaimed water irrigation. *Chemosphere*, 93(10), 2621-2630. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.088>

Clasen, B., de Moura Lisbôa, R. (2018). Ecotoxicology Tests as a Tool to Assess the Quality of the Soil. D. Vázquez-Luna, & M. D. C. Cuevas-Díaz (toim). *Soil Contamination and Alternatives for Sustainable Development*. London: Intech Open. Loetud aadressil: <https://www.intechopen.com/books/soil-contamination-and-alternatives-for-sustainable-development/ecotoxicological-tests-as-a-tool-to-assess-the-quality-of-the-soil>

Correâ Martins, M.N., de Souza, V.V., da Silva Souza, T. (2016). Genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on higher plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.031>

Daughton, C.G., Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and Personal Care Products in Environment: Agents of Subtle Changes. *Environmental Health Perspectives*, 107 (6), 907-938. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s6907>

Delgadillo, V., Verdejo, J., Mondaca, P., Verdugo, G., Gaete, H., Hodson, M.E., Neaman, A. (2017). Proposed modification to avoidance test with *Eisenia andrei* to assess metal toxicity in agricultural soils affected by mining activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140(6), 230-234. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.038>

Dendooven, L., Alarez-Bernal, D., Contreras-Ramos, S.M. (2011). Earthworms, a means to accelerate removal of hydrocarbons (PAHs) from soil ? A mini - review. G.G. Brown, E. Cooper, J. Dominguez, C. Fragoso, E. Huerta, S. James, A.J. Morgan, M. Pulleman, O. Schmidt, I. Barois (toim), *Pedobiology*, Volume 54, Supplement (S187-S192). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.08.006>

Dodgen, L.K., Li, J., Parker, D., Gan, J.J. Uptake and accumulation of four PPCP/EDCs in two leafy vegetables. *Environmental Pollution*, 182, 150-156. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.038>

Domínguez, J. (2004). State of the Art and New Perspectives on Vermicomposting Research. C. A. Edwards (toim). *Earthworm Ecology* (lk 401-417) (2nd ed.). Florida, USA: CRC Press. Loetud aadressil <http://jdguez.webs.uvigo.es/wp-content/uploads/2011/10/ewecologychapter.pdf>

Domínguez, J., Edwards, A.C. (2010). Biology and Ecology of Earthworm Species Used for Vermicomposting. C.A. Edwards, N.Q. Arancon, R.L. Sherman (toim). *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management* (lk 27-40). Florida, USA: CRC Press. Loetud aadressil <http://jdguez.webs.uvigo.es/wp-content/uploads/2012/01/Biology-and-Ecology-of-Earthworm-species-used-for-Vermicomposting.pdf>

Dumontet, S., Scopa, A., Kerje, S., Krovacek, K. (2001). The Importance of Pathogenic Organisms in Sewage and Sewage Sludge. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 51(6), 848-860. <https://doi.org/10.1080/10473289.2001.10464313>

Ebele, A.J., Abdallah, M.A.-E., Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>

Ekpeghere, K.I., Sim, W-J., Lee, H-J., Oh, J-E. (2018). Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 640-641, 1015-1023 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.218>

Entsik-Grünberg, T. (2014, 25.november). Kas, millal ja kuidas kasutada antibiootikume ? *Eesti Ekspress*. Loetud aadressil <https://ekspress.delfi.ee/kuum/kas-millal-ja-kuidas-kasutada-antibiootikume?id=70222507>

European Commission. (2001a). *Pollutants in urban waste water and sewage sludge*. Loetud aadressilt [http://ec.europa.eu/environment/archives/waste/sludge/pdf/sludge\\_pollutants.pdf](http://ec.europa.eu/environment/archives/waste/sludge/pdf/sludge_pollutants.pdf).

European Commission. (2001b). *Organic Contaminants in Sewage Sludge for Agricultural Use*. Loetud aadressilt [http://ec.europa.eu/environment/archives/waste/sludge/pdf/organics\\_in\\_sludge.pdf](http://ec.europa.eu/environment/archives/waste/sludge/pdf/organics_in_sludge.pdf).



Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122-159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>

Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garrica, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: a study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), 359-370. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00082-9)

Fijalkowski, K., Rorat, A., Grobelak, A., Kacprzak, M.J. (2017). The presence of contaminations in sewage sludge-The current situation. *Journal of Environmental Management*, 203(Part 3), 1126-1136. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.068>

Fytli, D., Zabaniotou, A. (2008). Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 12(1), 116-140. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.05.014>

Gao, M., Lv, M., Han, M., Song, W., Wang, D. (2016). Avoidance behavior of *Eisenia fetida* in oxytetracycline- and- heavy metal contaminated soils. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 47, 119-123. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.011>

Garzía-Santos, G., Keller-Forrer, K. (2011). Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere*, 84(5), 651-656. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.036>

Gaume, B., Bourgougnon, N., Auzoux-Bordenave, S., Roig, B., Le Bot, B., Bedoux, G. (2012). In vitro effects of triclosan and methyl-triclosan on the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(2), 87-94. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.04.006>

Gong, X., Jiang, Y., Zheng, Y., Chen, X., Li, H., Hu, F., Liu, M., Scheu, S. (2018). Earthworms differentially modify the microbiome of arable soils varying in residues management. *Soil Biology and Biochemistry*, 121, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.03.011>

Guo, J., Iwata, H. (2017). Risk assessment of triclosan in the global environment using a probabilistic approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 143, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.020>

Haiba, E., Nei, L., Kutti, S., Lillenberg, M., Herodes, K., Ivask, M., Kipper, K., Aro, R., Laaniste, A. (2017). Degradation of diclofenac and triclosan residues in sewage sludge compost. *Argonomy Research*, 15(2), 395-405. [http://agronomy.emu.ee/wp-content/uploads/2017/05/Vol15nr2\\_Haiba.pdf](http://agronomy.emu.ee/wp-content/uploads/2017/05/Vol15nr2_Haiba.pdf)

Haiba, E., Nei, L. (2017). Sewage Sludge Composting and Pharmaceuticals. *European Scientific Journal*, 114-121. <https://eujournal.org/index.php/esj/article/viewFile/9193/8734>

Haiba, E. (2017). *Reoveesette kompostimistehnoloogiate optimeerimine ravimijääkide kahjutustamise eesmärgil* (doktoritöö). Loetud aadressil <https://digi.lib.ttu.ee/i/?9120>

Haiba, E., Nei, L., Herodes, K., Ivask, M., Lillenberg, M. (2018). On the degradation of metformin and carbamazepine residues in sewage sludge compost. *Argonomy Research*, 16(3), 696-707. [dx.doi.org/10.15159/AR.18.123](https://doi.org/10.15159/AR.18.123)

Havranek, I., Coutris, C., Norli, H.R., Rivier, P-A., Joner, E.J. (2017). Uptake and elimination kinetics of the biocide triclosan and the synthetic musks galaxolide and tonalide in the earthworm *Dendrobaena veneta* when exposed to sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(8), 2068-2073. <https://doi.org/10.1002/etc.3737>

Higgins, C.P., Paesani, Z.J., Abbott Chalew, T.E., Halden, R.U., Hundal, L.S. (2010). Persistence of triclocarban and triclosan in soils after land application of biosolids and bioaccumulation in *Eisenia foetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 556-563.

Huang, X., Wu, C., Hu, H., Yu, Y., Liu, J. (2015). Sorption and degradation of triclosan in sediments and its effect on microbes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 116, 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.002>

Hussain, I., Zargam Khan, M., Khan, A., Javed, I., Kashif Saleemi, M. (2008). Toxicological effects of diclofenac in four avian species. *Avian Pathology*, 37(8), 315-321. <https://doi.org/10.1080/03079450802056439>

ISO 17512-1. (2008). Soil quality-avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Tests with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).

Jjemba, P.K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(1), 113-130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.11.011>

Kacprzak, M., Neczaj, E., Fijalkowski, K., Grobelak, A., Worwag, M., Rorat, A., Brattebo, H., Almås, Å., B.R, Singh. (2017). Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. *Environmental Research*, 156, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.010>

Keskkonnaministeerium. (2017). *Reoveesette käitlemine- peamised probleemid ja võimalikud lahendused*. Loetud Keskkonnaministeeriumi leheküljelt <https://www.envir.ee/et/eesmargid-tegevused/vesi/reoveesette-taaskasutus>

Kinney, C. A., Furlong, E. T., Kolpin, D.W., Burkhard, M.R., Zaugg, S.D, Werner, S.L, Bossio, J.P., Benotti, M.J. (2008). Bioaccumulation of Pharmaceuticals and Other Anthropogenic Waste Indicators in Earthworms from Agricultural Soil Amended with Biosolid or Swine manure. *American Chemical Society*, 42(6), 1863-1870. <https://doi.org/10.1021/es702304c>

Klampfl, C.W. (2019). Metabolization of pharmaceuticals by plants after uptake from water and soil: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.042>

Kobetičová, K., Hofman J., Holoubek, I. (2010). Ecotoxicity of wastes in avoidance test with *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Waste Management*, 30(4), 558-564. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X09005261>

Komisjoni Rakendusotsus (EL) 2018/ 840. (07.06.2018). *Euroopa Liidu Teataja L141/9*. Loetud aadressil <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0840&from=EN>

Kõrgmaa, V. (2010). Reoveesette töötlemise strateegia väljatöötamine, sh ohutu taaskasutamise tagamine järelvalve tõhustamise, keemiliste- ja bioloogiliste indikaatornäitajate rakendamise ning kvaliteedi süsteemide juurutamise abi. II etapp. (OÜ Eesti Keskkonnauuringute Keskuse aruanne). Loetud aadressil [http://www.klab.ee/wp-content/uploads/2010/05/Reoveesette\\_tootlemise\\_strateegia.pdf](http://www.klab.ee/wp-content/uploads/2010/05/Reoveesette_tootlemise_strateegia.pdf)

Kümmerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*, 90, 2354-2366. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.023>

Laternus, F., von Arnold, K., Grøn, C. (2007). Organic Contaminants from Sewage Sludge Applied to Agricultural Soils. False Alarm Regarding Possible Problems for Food Safety. *Environmental*

*Science and Pollution Research*, 14(1), 53-60.  
<https://link.springer.com/article/10.1065/espr2006.12.365>

Lazcano, C., Gómez-Brandón, M., Domínguez, J. (2008). Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere*, 72(7), 1013-1019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.016>

Lemmiksoo, V., Tenno, T., Mölder, E., Tamm, A. (2015a). Regionaalsete reoveesetete käitlemise lahenduste väljatöötamine ja jäätmete lakkamise kriteeriumite väljatöötamine reoveesette kohta. III osa aruanne. Tartu: OÜ aqua consult baltic. Loetud aadressil [https://www.envir.ee/sites/default/files/iii\\_osa.pdf](https://www.envir.ee/sites/default/files/iii_osa.pdf)

Lemmiksoo, V., Tenno, T., Mölder, E., Tamm, A. (2015b). Regionaalsete reoveesetete käitlemise lahenduste väljatöötamine ja jäätmete lakkamise kriteeriumite väljatöötamine reoveesette kohta. II osa aruanne. Tartu: OÜ aqua consult baltic. Loetud aadressil [https://www.envir.ee/sites/default/files/reoveesette\\_too\\_ii\\_aruanne.pdf](https://www.envir.ee/sites/default/files/reoveesette_too_ii_aruanne.pdf)

Li, M., Ding, T., Wang, H., Wang, W., Li, J., Ye, Q. (2018). Uptake and translocation of <sup>14</sup>C-Carbamazepine in soil-plant systems. *Environmental Pollution*, 243(part b), 1352-1359. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.079>

Lillenber, M., Haiba, E., Nei, L. (2012, juuni). Ravimijäägid looduskeskkonnas. *Eesti loodus* 6/7. Loetud aadressil [http://eestiloodus.horizont.ee/artikkel4679\\_4623.html](http://eestiloodus.horizont.ee/artikkel4679_4623.html)

Lillenber, M. (2011). Mõnede ravimijääkide sisaldus Eesti reoveesettes, nende stabiilsus keskkonnas ja akumulatsioon kompostiväetisest rohttaimesse (doktoritöö). Loetud aadressil <https://dspace.emu.ee/xmlui/handle/10492/146>

Lin, D., Zhou, Q., Xie, X., Liu, Y. (2010). Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as a emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 81(10), 1328-1333. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.027>

Lockwood, S., Saidi, N., Morgan, V.A. (2016). *Options for strategic approach to pharmaceuticals in the environment. Task 1 report-Revised version*. Loetud European Commission kodulehelt [https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/study\\_report\\_public\\_consultation\\_pharmaceuticals\\_environment.pdf](https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/study_report_public_consultation_pharmaceuticals_environment.pdf)

Lonappan, L., Brar, S.K., Das, R.K., Verma, M., Surampalli, R.Y. (2016). Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity- A review. *Environmental International*, 96, 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.014>

Loos, R., Carvalho, R., António, D.C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R.H., Schwesig, D., Gawlik, B.M. (2013). EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment effluents. *Water Research*, 47(17), 6475-6487. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.024>

Lozano, N., Rice, C.P., Ramirez, M., Torrents, A. (2010). Fate of triclosan in agricultural soils after biosolids application. *Chemosphere*, 78(6), 760-766. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.043>

Lozano, N., Rice, C.P., Ramirez, M., Torrents, A. (2012). Fate of Triclosan and Methyltriclosan in soil from biosolids application. *Chemosphere*, 160, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.020>

Ma, L., Xie, Y., Han, Z., Giesy, J.P., Zhang, X. (2017). Response of earthworms and their microbial communities in their guts to triclosan. *Chemosphere*, 168, 1194-1202. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.079>

Macherius, A., Lapne, D.R., Reemtsma, T., Römbke, J., Topp, E., Coors, A. (2014). Triclocarban, triclosan and its transformation product methyl triclosan in native earthworm species four years after a commercial-scale biosolids application. *Science of The Total Environment*, 472, 235-238. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.113>

Maculak, T., Černanský, S., Fehér, M., Birošová, L., Gál, M. (2019). Pharmaceuticals, drugs and resistant microorganisms - environmental impact on population health. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 9, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.04.002>

Mantovi, P., Baldoni, G., Toderi, G. (2005). Reuse of liquid, dewatered, and composted sewage sludge on agriculture land: effects of long-term application on soil and crop. *Water Research* 39(2-3), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.10.003>

Markiewicz, M., Jungnickel, C., Stolte, S., Bialk-Bielinska, A., Kumirska, J., Mroziak, W. (2017). Primary degradation of antidiabetic drugs. *Journal of Hazardous Materials*, 324(Part B), 428-435. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.008>

Marques, I., Magalhães-Mota, G., Pires, F., Sérgio, S., Ribeiro, P.A., Raposo, M. (2017). Detection of traces of triclosan in water. *Applied Surface Science*, 421(part A), 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.12.170>

Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E. (2015). Pharmaceutically active compounds in sludge stabilization treatments: Anaerobic and aerobic digestion, wastewater stabilization ponds and composting. *Science of The Total Environment*, 503-504(1),97-104. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.089>

Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F. (2018). Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine Environmental Research*, 140, 41-60. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>

Mrozik, W., Stefańska, J. (2014). Adsorption and biodegradation of antidiabetic pharmaceuticals in soils. *Chemosphere*, 95, 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.012>

Natal-da-Luz, T., Römbke, J., Sousa, J.P. (2008a). Avoidance test in site-specific risk assessment-influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(5), 1112-117. <https://doi.org/10.1897/07-386.1>

Natal-da-Luz, T., Amorim, M. J.B., Römbke, J., Sousa, J.P. (2008b). Avoidance test with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe significant response. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 545-551. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.09.005>

Natal-da-Luz, T., Domene, X., Scheffczyk, A., Sousa, J.P. (2009). Earthworm Avoidance Tests. H. Moser, & J. Römbke (toim). *Ecotoxicological Characterization of Waste* (lk 191-196). Berlin, Germany:Springer. [https://www.researchgate.net/publication/235322219\\_Earthworm\\_Avoidance\\_Tests](https://www.researchgate.net/publication/235322219_Earthworm_Avoidance_Tests)

Niemuth, N.J., Klapper, R.D. (2015). Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere*, 135, 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.060>

Niemuth, N.J., Klapper, R.D. (2018). Low-dose metformin exposure causes changes in expressions of endocrine disruption-associated genes. *Aquatic Toxicology*, 195, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.003>

OECD/EL. (2018). Health at the Glance: Europe 2018: State of Health in the EU cycle. Paris, France: OECD Publishing. Loetud aadressil [https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-europe-2018\\_health\\_glance\\_eur-2018-en](https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-europe-2018_health_glance_eur-2018-en)

Ohtlike ainete põhjavee kvaliteedi piirväärtused. (2010). RT I 2010, 57, 374. Loetud aadressil <https://www.riigiteataja.ee/akt/13349010>

Ohtlike ainete sisalduse piirväärtused pinnases. (2010). RT I 2010, 57, 373. Loetud aadressil <https://www.riigiteataja.ee/akt/13348997>

Ojala, P. (2016). Saasteaineid sisaldava reoveesette kompostimine kontrollitud tingimustes, kasutades kahes proportsioonis saepuru (magistritöö). Loetud aadressil <https://digi.lib.ttu.ee/i/?6957>

Oldenkamp, R. (2019). The boomerang effect-environmental exposure to pharmaceuticals. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 1112, 100-128. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.01.005>

Oosterhuis, M., Sacher, F., ter Laak, T.L. (2013). Predictions of concentration levels of metformin and other high consumption pharmaceuticals in wastewater and regional surface water based on sales data. *Science of The Total Environment*, 442, 380-388. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.046>

Ozaki, N., Nakazato, A., Nakashima, K., Kindaichi, T., Ohashi, A. (2017). Loading and removal of PAHs, fragrance compounds, triclosan and toxicity by composting processes from sewage sludge. *Science of the Total Environment*, 606-606, 860-866. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.165>

Palli, L., Spina F., Varese, G.C., Vincenzi, M., Aragno, M., Arcangeli, G., Mucci, N., Santianni, D., Caffaz, S., Gori, R. (2019). Occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater treatment plants of Tuscany: An effect-based approach to evaluate the potential environmental impact. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.05.006>

Patrolecco, L., Ademollo, N., Grenni, P., Tolomei, A., Barra Caracciolo, A., Capri, S. (2013). Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. *Microchemical Journal*, 107, 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.035>

Patrolecco, L., Capri, S., Ademollo, N. (2015). Occurrence of selected pharmaceuticals in the principal sewage treatment plants in Rome (Italy) and in receiving surface waters. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(8), 5864-5876. 10.1007/s11356-014-3765-z

Piiskoppel, K. (2016). Ravimijäädid ja nende mõju keskkonnale (bakalaureuse töö). Loetud aadressil <http://eprints.ttkk.ee/2172/>

Pino, M.R., Val, J., Mainar, A.M., Zuriaga, E., Español, C., Langa, E. (2015). Acute toxicology effects on the earthworm *Eisenia fetida* of 18 common pharmaceuticals in artificial soil. *Science of the Total Environment*, 518-519, 225-237. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.080>

Pintado-Herrera, M.G., González-Mazo, E., Lara-Martín, P.A. (2014). Determining the distribution and of triclosan and methyl triclosan in estuarine settings. *Chemosphere*, 95, 478-485. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.101>

Prosser, R.S., Sibely, P.K. (2015). Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids or manure amendments, and wastewater irrigation. *Environmental International*, 75, 223-233. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412014003559>

Ravimiamet. (20.12.2016). *Kuidas ravim saab müügiloa*. Loetud aadressil <https://www.ravimiamet.ee/kuidas-ravim-saab-myygiloa>

Ravimiamet (13.04.2018). *Ravimite sealhulgas toimainete tootmine*. Loetud aadressil <http://www.ravimiamet.ee/ravimite-sh-toimeainete-tootmine>

Reiss, R., Lewis, G., Griffin, J. (2009). An ecological risk assessment for triclosan in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(7), 1546-1556. 10.1897/08-250.1

Reoveesette põllumajanduses, haljastuses ja rekultiveerimisel kasutatud nõuded. (2003). RTL 2003, 5, 48. Loetud aadressil <https://www.riigiteataja.ee/akt/761407>



Ribas, J.L.C., da Silva, C.A., de Andrade, L., Galvan, G. L., Cestari, M.M., Trindade, E.S., Zamprônio, A.R., Silva de Assis, H.C. (2014). Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of freshwater fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 296-303. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.009>

Rodriguez-Campos, J., Dendooven, L., Alvarez-Bernal, D., Contreras-Ramos, S.M. (2014). Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil: a review. *Applied Soil Ecology*, 79, 10-25. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.02.010>

Roig, N., Sierra, J., Marti, E., Marti, N., Schuhmacher, M., Domingo, J.L. (2012). Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: Effects on soil functioning. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 158(9), 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.05.016>

Sammul, M., Linask, E., Uusküla, M., Laius, O. (toim). (2018). *Ravimiameti statistika aastaraamat 2018*. Tartu: Ravimiamet. Loetud aadressil [https://ravimiamet.ee/sites/default/files/ravimiamet\\_aastaraamat\\_2018.pdf](https://ravimiamet.ee/sites/default/files/ravimiamet_aastaraamat_2018.pdf)

Semblante, G.U., Hai, F.I., Huang, X., Ball, A.S., Price, W.E., Nghiem, L.D. (2015). Trace organic contaminants in biosolids: Impact of conventional wastewater and sludge processing technologies and emerging alternatives. *Journal of Hazardous Materials*, 30(12), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.037>

Shraim, A., Diab, A., Alushaimi, A., Niazy, E., Metwally, M., Amad, M., Sioud, S., Dawoud, A. (2017). Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1), S719-S729. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.11.014>

Sidhu, J.P.S., Toze, S.G. (2009). Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environmental International*, 35(1), 187-201. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.006>

Smith, S.R. (2009). A critical review of bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste compost compared to sewage sludge. *Environmental International*, 35(1), 142-156. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.06.009>

Straub, J.O. (2015). Aquatic environmental risk assessment for human use of the old antibiotic sulfamethoxazole in Europe. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 767-779. <https://doi.org/10.1002/etc.2945>

Straub, J.O., Caldwell, D.J., Davidson, T., D'Aco, V., Kappler, K., Robinson, P.F., Simon-Hettich, B., Tell, J. (2019). Environmental risk assessment of metformin and its transformation product guanyurea. I. Environmental fate. *Chemosphere*, 216, 844-854. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.036>

Sui, Q., Cao, X., Lu, S., Zhao, W., Qiu, Z., Yu, G. (2015). Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerging Contaminants*, 1(1), 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2015.07.001>

Zandaryaa, Z. (toim). (2017). Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea- A status report. *Emerging pollutants in Water Series 1*. Paris, France: UNESCO and HELCOM. Loetud aadressil <http://www.helcom.fi/Lists/Publications/BSEP149.pdf>

Žižek, S., Zidar, P. (2013). Toxicity of the ionophore antibiotic lasalocid to soil-dwelling invertebrates: Avoidance tests in comparison to classic sublethal tests. *Chemosphere*, 92(5), 570-575. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.007>

Thelusmond, J-R., Kawka, E., Strathmann, T.J., Cupples, A.M. (2018). Diclofenac, carbamazepine and triclocarban biodegradation in agricultural soils and the microorganisms and metabolic pathways. *Science of The Total Environment*, 640-641, 1393-1410. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.403>

Thomaidi, V.S., Stasinakis, A.S., Borova, V.L., Thomaidis, V.S. (2016). Assessing the risk associated with the presence of emerging organic contaminants in sludge-amended soil: A country-level analysis. *Science of The Total Environment*, 548-549, 280-288. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.043>

Tisler, S., Zwiener, C. (2018). Formation and occurrence of transformation products of metformin in wastewater and surface water. *Science of The Total Environment*, 628-629, 1121-1129. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.105>

Trautwein, C., Berset, J-D., Wolschke, H., Kümmerer, K. (2014). Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanyurea in several compartments of the aquatic cycle. *Environmental International*, 70, 203-212. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.008>

Urrea, J., Alkorta, I., Mijangos, I., Epelde, L., Garbisu, C. (2019). Application of sewage sludge to agricultural soil increases the abundance of antibiotic resistance genes without altering the composition of prokaryotic communities. *Science of The Total Environment*, 647, 1410-1420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.092>

Valdés, M.E., Huerta, B., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.A., Barceló, D., Rodríguez-Mozaz, S. (2016). Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidence of carbamazepine metabolization by fish. *Science of The Total Environment*, 557-558, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.045>

Verlicchi, P., Zambello, E. (2015). Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil- A critical review. *Science of the Total Environment*, 538, 750-767. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.108>

Weber, F-A., aus der Beek, T., Bergmann, A., Carius, A., Grüttner, G., Hickmann, S., Eber, I., Hein, A., Küster, A., Rose, J., Koch-Jugl, J., Stolzenberg, H-J. (2014). *Pharmaceuticals in the environment- the global perspective. Occurrence, effects and, and potential cooperative action under SAICM.* German Environmental Agency. [Loetud aadressil https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/pharmaceuticals\\_in\\_the\\_environment\\_0.pdf.](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/pharmaceuticals_in_the_environment_0.pdf)

Wu, X., Ernst, F., Conkel, J.L., Gan, J. (2013). Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables. *Environmental International*, 60, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.015>

Xie, X., Qian, Y., Wu, Y., Yin, J., Zhai, J. (2013). Effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on the avoidance response, survival, growth, and reproduction of earthworms (*Eisenia fetida*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90, 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.009>

Yang, Y., Ok, Y.S., Kim, K.-H., Kwon, E.E., Tsang, Y. F. (2017). Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total environment*, 596-597, 303-320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>

Ying, G-G., Yu, X-Y., Kookana, R.S. (2007). Biological degradation of triclocarban and triclosan in soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modelling. *Environmental Pollution*, 150(3), 300-305.