



TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Pestitsiididega saastunud pinnase tervendamine biostimulatsiooni teel

Magistritöö tööstusökoloogia erialal

Liina Nemvalts

Juhendaja: MSc Sander Kutti

Tartu, 2017

Autorideklaratsioon

Deklareerin, et käesolev magistritöö, mis on minu iseseisva töö tulemus, on esitatud Tallinna Tehnikaülikooli magistrikraadi taotlemiseks ja et selle alusel ei ole varem taotletud akadeemilist kraadi.

Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on viidatud.

.....

Kuupäev

.....

Allkiri

Sisukord

Jooniste loetelu	5
Tabelite loetelu	6
Kasutatud mõisted	7
Sissejuhatus	9
1 Bioremediatsioon.....	11
1.1 Bioremediatsiooni tehnoloogiad.....	12
1.1.1 <i>In situ</i> meetodid	14
1.1.2 <i>Ex situ</i> meetodid	16
1.2 Bioremediatsioonis esinevad mikroorganismid.....	18
1.3 Bioremediatsiooni mõjutavad tegurid	18
1.3.1 Pinnase pH.....	18
1.3.2 Pinnase niiskusesisaldus	19
1.3.3 Pinnase temperatuur	19
1.3.4 Toiteained	19
1.3.5 Pinnase tekstuur.....	20
1.3.6 Orgaaniline aine.....	20
1.3.7 Hapnik	20
1.3.8 Soolsus.....	21
1.3.9 Saasteaine biokättesaadavus	21
1.3.10 Elektron aktseptorid.....	21
1.3.11 Mikroobipopulatsioon	22
1.3.12 Reoaine struktuur, toksilisus ja kontsentratsioon	22
1.3.13 Kliimaatilised tingimused.....	23
1.4 Pestitsiidide lagunemise mikrobioloogia.....	23
1.4.1 Toksilised vaheühendid	24
2 Põllumajandus ja pestitsiidid	26
2.1 Kasutusala ja mahud	28
2.1.1 Pendimetaalin - Stomp 330 EC	28
2.1.2 Glüfosaat - Ranger XL	29
2.2 Pestitsiidide keskkonnaohtlikkus.....	29
2.2.1 Resistentus	31

2.3 Pestitsiididega saastunud alade taastamine bioremedatsiooni abil.....	31
3 Materjal ja meetodika.....	32
3.1 Katse ülesehitus	32
3.2 Keemiliste parameetrite määramine	33
3.3 Kasutatud söötmeplaadid.....	33
3.4 Seente ja bakterite identifitseerimine	34
4 Tulemused	36
4.1 KMÜ-de loendus	36
4.2 Keemiliste parameetrite määramine	39
4.3 Seente ja bakterite identifitseerimine	40
5 Arutelu.....	42
Kokkuvõte	44
Summary.....	46
Tänuavaldused.....	48
Kasutatud allikad	49
Lisa 1	53
Lisa 2	55
Lisa 3	57

Jooniste loetelu

Joonis 1. Seente KMÜ-de muutumine	38
Joonis 2. Bakterite KMÜ-de muutumine	38
Joonis 3. Saasteaine koguse muutumine pinnases katseperioodi jooksul.....	40

Tabelite loetelu

Tabel 1. Eestisse tarnitud taimekaitsevahendite kogused aastatel 2011-2015.....	28
Tabel 2. Katse info.....	32
Tabel 3. Bakterite söötmeplaadi koostisosad.....	33
Tabel 4. Seente söötmeplaatide koostisosad.....	34
Tabel 5. Bengaalpunase 5% värvilahus	35
Tabel 6. Bakterite kolooniate arv.....	36
Tabel 7. Seente kolooniate arv.....	37
Tabel 8. Pestitsiidi toimeaine muutus pinnases	39
Tabel 9. Katseperioodi alguses pinnases esinevad mikroorganismide perekonnad	40
Tabel 10. Katseperioodi lõpus pinnases esievate mikroorganismide perekonnad.....	41

Kasutatud mõisted

Adsorptsioon – lahuste või gaasisegude üksikute koostisosade koondumine tahke aine või vedeliku pinnale

Aeroobne protsess – õhu juuresolekul toimuv protsess. Aeroobne protsess on näiteks aeroobne lagunemine, aeroobne hingamine

Agro-ökosüsteem – ökosüsteem, milles toimub majandustegevus taimse või loomse toodangu saamise huvides

Aktinomütseedid – bakterite hulka kuuluvad organismid, kes mängivad suurt rolli ksenobiootikute lagundamisel

Akumuleeruma – koguma, kuhjama, salvestama

Anaeroobne protsess – protsess, mis ei vaja toimimiseks vaba hapniku. Anaeroobne protsess on näiteks anaeroobne lagunemine, anaeroobne hingamine

Bioaktiivsus – ehk bioloogiline aktiivsus on aine või materjali mõju organismide rakkudes toimuvatele protsessidele (näiteks metabolismile)

Biokättesaadavus – füsiokeemiliste ja mikrobioloogiliste faktorite mõju biolagunemise kiirusele ja ulatusele. Biokättesaadavus näitab kemikaalide osa pinnases, mida elusorganismid suudavad kasutada või transformeerida

Biotehnoloogia – bioloogia valdkond, mis kasutab elusorganisme elukeskkonna ja inimese tervise parandamiseks

Biotransformatsioon - keemilise ühendi koostise muutumine organismide (või neist saadud ensüümide) abil

Degradeeruma – ehk lagunema

Disperisoon – ehk levimine. Saasteaine kontsentratsioon väheneb aja jooksul, kuna saasteained segunevad pinnase ja põhjaveega. Dispersiooni käigus saasteaine ei hävine

Ensüüm – organismides moodustuv ainevahetusreaktsioone põhjustav ja reguleeriv valk. Ensüümid on katalüsaatorid, mis kiirendavad keemiliste reaktsioonide toimumist

Heterotroof – organism, kes saab oma elutegevuseks vajaliku süsiniku toidus sisalduvast orgaanilisest ainest

Hüdrofoobne – vett hülgav

Infiltratsioon – sademe- või pinnavee imbumine pinnasesse või aluspõhjakivimite pooridesse ja pragudesse

Kemotaktiline afiinsus – vastuvõtlikus teatud keemilistele ühenditele

Ksenobiootik – antropogeenne kemikaal, mida iseloomustab “mittelooduslik” struktuur. Ksenobiootikud on näiteks järgmised ühendite rühmad: põllumajanduskemikaalid; orgaanilised lahustid, BTEX (benseen, toluen, etüleen, ksüleen) ja MTBE (metüül-tert-butüüleeter) – mootorikütuse komponendid; lõhkeained (TNT- trinitrotolueen); detergendid. Enamik ksenobiootikuid on elusorganismidele mürgised

Metaboliit – metabolismi tagajärjel tekkinud aine

Metabolism – ehk ainevahetus

Omnivoorne – kõigesööja

Osmootne rõhk – rõhk, mida tuleb rakendada lahusele, et takistada lahusti liikumist läbi poolläbilaskva membraani

Sorptsioon – gaasi, vedeliku või mõne nende komponendi neeldumine vedelikus või tahkes aines või kogunemine tahke aine pinnale

Viskoossus – vedelike omadus takistada osakeste liikumist üksteise suhtes

Sissejuhatus

Põllumajanduse kasv on endaga kaasa toonud põllumajanduskemikaalide sagedama kasutamise. Kasutatavatel kemikaalidel on aga negatiivne mõju keskkonnale, inimesele ning bioloogilisele mitmekesisusele, sealhulgas mulla mikroorganismidele, kellel on oluline roll biolagunemise protsessides. Pestitsiidide kasutamine hakkas kasvama pärast II maailmasõda ning praegusel ajastul suureneb selle kasutamine iga aastaga [1]. Pestitsiidide kasutamine põhjustab veekogude-, pinnase- ja õhureostust ning bioloogilise mitmekesisuse vähenemist. Nad erinevad mürgisuse poolest inimese tervisele ja keskkonnale ning püsivuse poolest organismides ja keskkonnas. [2] Pestitsiididest tingitud saastet leidub kõikjal maailmas ning seetõttu võib seda pidada globaalseks probleemiks.

Kuna pestitsiididega saastunud alad on suured ning reostus ei ole ühes kindlas kohas, on pinnase tervendamine füüsikaliste ja keemiliste meetoditega kulukas. Üheks võimaluseks taimekaitsevahenditega saastunud alade tervendamiseks on bioremedatsioon, mille puhul kasutatakse mikroorganismide metaboolset potentsiaali [3]. Kasutades bioremedatsiooni ühte meetodit – biostimulatsioon – on võimalik saaste eemaldada koha peal ning selleks ei ole vaja suuri rahalisi ressursse. Mullas elutsev mikroobikooslus teeb selle töö ise oma elutegevuse käigus ära, muutes toksilised ühendid vähemtoksilisteks või täiesti ohututeks ühenditeks. Bioremedatsiooni tehnoloogiatel on jällegi omad negatiivsed küljed, millest üks on ajamahukus.

Pestitsiidide kasutamine on tõusutrendis ning kuna kõik pestitsiidid ei lagune looduses ühtmoodi kiiresti, on nad ohtlikud keskkonnale ja inimesele. Praegusel ajal suuri põllumajandusmaid eraldi pestitsiidijääkidest ei tervendata, mistõttu on oluline uurida, kuidas saavad sellega hakkama mulla mikroorganismid.

Magistritöös antakse ülevaade bioremedatsiooni tehnoloogiatest ning neid mõjutavatest faktoritest. Samuti pestitsiididest, nende keskkonnamõjust ning lagunemisest bioremedatsiooni teel. Magistritöö eesmärk oli uurida, mis määral väheneb pestitsiidide kontsentratsioon mullas kasutades biostimulatsiooni meetodit ja välja selgitada, kas saastunud pinnases on muutusi mikroobikoosluses võrreldes saastumata pinnasega ning lisaks identifitseerida peamised biostimulatsiooni läbi viivad mikroorganismid.

Püstitatud on järgmised hüpoteesid:

- Biostimulatsioon võiks olla sobiv meetod põllumuldade tervendamiseks.
- Pestitsiididega saastunud muldades on väiksem mikroorganismide liigirikkus.
- Pestitsiididega saastumise korral väheneb muldades mikroorganismide arvukus (stressist tingituna).

1 Bioremediatsioon

Praegusel ajastul on tootmine ja tööstus üha suuremaks trendiks. Inimene on tootnud üle saja tuhande aineühendi ja kemikaali, mida looduskeskkond ei ole kunagi tundnud. Selliste ühendite kõrval võivad inimesele ja ökosüsteemile ohtlikuks osutada aga täiesti looduslikud aineühendid. Kahjuks ei teata paljude kemikaalide kohta, kuidas nad keskkonnas toimivad – kuidas akumulereuvad, hajuvad või teisenevad, kuidas mõjuvad inimtervisele ja elusorganismidele. Väga paljud tootmises kasutatavad ained on klassifitseeritud keskkonnaohtlikuks. Tööstusarengu suurenemine on endaga kaasa toonud ka pinnase, põhja- ja pinnavee ning õhu saastumise mürgiste kemikaalidega. [4] [5]

Saastunud pinnast ning vett on võimalik puhastada füüsikaliselt, keemiliselt ning bioloogiliselt. Füüsikalised meetodid on näiteks termiline desorptsioon, pesemine ja tahkestamine. Keemiliste meetodi puhul seotakse reoaine keemiliselt, muutes seda vähemaktiivseks. Keemilised ja füüsikalised tehnoloogiad on küll kiire toimega, kuid on keerukad, vajavad palju ressursse ning on kulukad. Bioloogilised tehnoloogiad on jällegi soodsamad ning vajavad vähem ressursse, kuid on ajamahukad. [6]

Viimasel paarikümnel aastal on kiiresti arenenud biotehnoloogial põhinevad keskkonnatervendusmeetodid. Välja on töötatud arvukaid rakendusi pinnase ja põhjavee puhastamiseks erinevatest saasteainetest nagu näiteks naftasaadused, pestitsiidid ja raskemetallid. [6] Viimased aastakümned on näidanud, et paljud saasteained mullas ja veekeskkonnas on transformeerunud mikroorganismide abiga mittetoksilisteks aineteks – veeks, süsinidikoksiidiks, biomassiks või mõneks muuks ohutuks aineks. [7]

Mõiste bioremediatsioon tuleneb kahest sõnaosast: „bio“, mis tähendab elu ja viitab elusorganismidele ning „remediatsioon“, mis tähendab probleemi lahendamist ehk tervendamist. Bioremediatsioon tähendab, et probleemi lahendamiseks (nt saastunud pinnas või põhjavesi) on kasutatud bioloogilisi organisme. [4] Bioremediatsioon ehk biotervendusmeetod on üks võimalikke lahendusi puhastamiseks keskkonda jääkainetest, kasutades selleks mikroorganismide metaboolset potentsiaali. [3] Bioremediatsiooni puhul kasutatakse ohtlike ainete jääkide kontsentratsiooni vähendamiseks mikroorganisme, näiteks baktereid ja seeni. [8]

Bioremediatsiooni eelisteks on madal hind, madaltehnoloogilised tehnikad, ohutus ning keskkonnasõbralikkus. Kuid bioremediatsiooni tehnoloogia ei pruugi alati sobida, kuna saasteainete ulatus, mille puhul on meetod efektiivne, on piiratud. [3] Vaid vähesed seened ja bakterid suudavad lagundada laia saasteainete spektrit. Teadaolevalt ei ole siiani ühtegi organismi, kes oleks piisavalt omnivoorne, et hävitada suures koguses looduses esinevaid kemikaale. Selle puuduse lahenduseks oleks uute mikroobiliikide avastamine või mikroorganismide sünkroniseeritud kasutamine, millega täiendatakse teineteise bioaktiivsust. Teiseks bioremediatsiooni puuduseks on tehnoloogia ajamahukus. Ka selle puuduse üheks lahenduseks oleks mikroorganismide sünkroniseeritud kasutamine, mis tõstaks nende bioaktiivsust. Samuti aitaks protsessi kiirendada geneetiline manipulatsioon, tänu millele on võimalik saada täiustatud või uusi liike bioremediatsiooni aktiivsuse suurendamiseks. Kolmas võimalus oleks selliste preparaatide lisamine, mis võimendaksid kindlaid bioremediatsiooni radasid. Kuid kõige lihtsaimaks viisiks kiirendamiseks bioremediatsiooni protsessi on suurendada bioremediatsiooni läbi viivate organismide populatsiooni. [4]

Bioremediatsioon on võimalik vaid neile ühenditele, mis on biolagunevad. Kõiki ühendeid ei ole võimalik kiiresti ja täielikult lagundada. Samuti on võimalik, et biolagunemise jäägid on püsivamad või mürgisemad kui algsed ühendid. Saasteained, mis teadaolevalt degradeeruvad mikroorganismide abiga, on jagatud viide gruppi:

- 1) Halogeenitud aromaatsed süsivesinikud
- 2) Lõhkeainejäägid
- 3) Orgaanilised lahustid
- 4) Pestitsiidid
- 5) Polüaromaatsed süsivesinikud (PAH) [4]

Üha enam on hakatud erinevaid biotervendusmeetodeid kombineerima, et saada veelgi paremaid tulemusi. [9]

1.1 Bioremediatsiooni tehnoloogiad

Bioremediatsiooni tehnoloogiaid saab jagada kaheks: *in situ* ja *ex situ*. *Ex situ* tehnoloogiad on sellised, kus saastunud aine eemaldatakse füüsiliselt, et seda hiljem

mujal töödelda. *In situ* meetodi puhul töödeldakse saastunud materjali otse selle leiukohas. [8]

In situ meetodit rakendatakse saaste eemaldamiseks saastunud alal kohapeal reostusallikat avamata. Meetodit peetakse parimaks saaste eemaldamise meetodiks, kuna see võimaldab säästa transpordikuludelt ja kasutada saaste eemaldamiseks kahjutuid mikroorganisme. Mikroorganismidel on kemotaktiline afiinsus lagundatava saasteaine suhtes ehk neid tõmbab suurema saasteaine kontsentratsiooni suunas. Meetodi eeliseks on saastunud alade vähene häirimine ning ohutus ümbruskonnale. Teiseks eeliseks bioremediatsiooni *in situ* meetodi puhul on see, et seda saab teostada sünkroonselt saastunud pinnase ja põhjavee puhastamisel. Samas on *in situ* meetodil ka negatiivseid külgi. Meetod on aeganõudvam võrreldes teiste tervendusmeetoditega ning on mõjutatav kontrollimatute keskkonnategurite poolt (näiteks ilmastikolud), mis mõjutavad mikroorganismide tegevust. Lisandid, mis soodustavad bioremediatsiooni, võivad keskkonnas kaasa tuua muid probleeme. Bioremediatsiooni efektiivsuse määrab saasteaine liik – kas see suudab mikroorganismidele pakkuda piisavalt toiteaineid ja energiat protsessi läbi viimiseks. Soodsate tingimuste puudumisel on võimalik mikroorganismide bioaktiivsust lisanditega stimuleerida. Teine, vähem eelistatud variant, on kasutada geneetiliselt muundatud mikroorganisme. [4]

Ex situ meetodi puhul transporditakse saastunud pinnas eelnevalt ette valmistatud platsile või reaktorisse. *Ex situ* meetodite puhul segatakse pinnast pidevalt, et suurendada aereeritust ning lisada toitaineid. [8]

Kui vähegi võimalik, tuleks kahest tehnoloogiast eelistada kohapeal puhastamist (*in situ*), kus saasteaine pestakse pinnasest välja või biolaguneva reoaine puhul soodustada bioremediatsiooni. Reostuspaiga avamine ning pinnase eemaldamine võib olla ohtlik, kuna kergesti aurustuvad ühendid ohustavad inimesi ning sademevesi võib saasteained välja kaevatud pinnasest välja pesta. Samuti võivad reoained välja kanduda ka kaevandamisel tekkiva tolmuga. Samas võib orgaaniliste reoainete puhul olla väljakaevamisel ning teisaldamisel positiivne mõju, kuna pinnase õhustamine ja segamine soodustab looduslikke lagundamisprotsesse. [6]

1.1.1 *In situ* meetodid

1.1.1.1 Bioventileerimine

Bioventileerimise puhul õhutatakse pinnast, et suurendada mikroorganismide bioaktiivsust bioremediatsiooni edendamiseks ning minimeerida lenduvate saasteainete eraldumist atmosfääri. Reostuskoldesse pumbatakse gaasilisi stimulante nagu näiteks õhk, hapnik või metaan. [6] Bioventileerimise ja biodegratsiooniga saab eemaldada igat aeroobselt lagunevat saasteainet, kuid kõige paremini toimib meetod naftaproduktide lagundamisel. [10]

1.1.1.2 Bioaugmentatsioon

Bioaugmentatsiooni meetodi puhul juhitakse saastunud keskkonda spetsiifiliste metaboolsete omadustega mikroorganisme, kes on võimelised lagundama reostust tekitavaid aineid. [11] Bioaugmentatsioon on kergesti teostatav strateegia reostuse eemaldamiseks pinnast välja kaevamata. Meetodi kesksel kohal on bakteri populatsioonis biomassi kõrge taseme hoidmine. [12] Mikroobid kasvatatakse ette selektiivses söötmes, kus on reoainele sarnased või samasugused ained. Samuti on võimalik rakendada geneetilisi manipulatsioone, mille puhul muudetakse mikroorganismide geneetilist struktuuri. [6] Bioaugmentatsiooni kasutatakse, et soodustada tõrksate saasteainete lagunemist, mille mineraliseerimisega ei saa põlismikroorganismide kogum hakkama. Lisatud mikroobid täiendavad põlismikroorganismide lagundamisvõimekust, mille tulemusena väheneb mikroorganismide kohanemisaeg reoainega ja biolagunemine toimub kiiremini ning soovimatuid kõrvalsaadusi on vähem. [13] Meetodi negatiivseks küljeks on, et laboris kasvatatud mikroobitüved ei pruugi alati looduses reoainet lagundada, kui pinnases või vees võib reoaine sisaldus olla liiga suur. Samuti võivad aretatud mikroorganismide kasvu pidurdada ka looduslikud mikroobid. [6]

1.1.1.3 Looduslik hajumine ehk passiivne remedatsioon

Reostunud pinnase loodusliku hajumise puhul vähenevad keskkonnas reoaine toksilisus, hulk ning liikuvus ilma inimese sekkumiseta. Reoained transformeeruvad nii füüsiliste, keemiliste kui bioloogiliste protsesside toimetel, millest tähtsaim on biodegratsioon. [14]

Meetodi eelised on [6]:

- soodne hind;
- töökatkestuste puudumine, mida võiks põhjustada tehnika töökindlus;
- meetodit on võimalik rakendada peaaegu igal pool;
- kergesti kombineeritav muude puhastusmeetoditega;
- kõige mürgisemate ja liikuvamate reoainete eelisjärjekorras lagunemine;
- ei teki edasist töötlemist vajavaid jääkaineid, kuna pinnast ei liigutata paigast.

Meetodi puudused on [6] :

- protsess aeglane;
- vajab pikaajalist jälgimist;
- biolagunemisel võib tekkida ühendeid, mis on algsest reoainest toksilisemad;
- pikaajalise seire tõttu võib osutuda kallimaks muudest puhastusmeetoditest.

Meetodit peetakse tihti „mitte millegi tegemiseks“, kuid tegelikkuses hõlmab see endas pidevat jälgimist ning hindamist. [10]

Loodusliku hajumise meetodiga võib vähendada saasteaine massi biolagunemise käigus, saasteaine kontsentratsioonihajumise- või dispersiooniprotsessi käigus ning siduda saasteaineid mullaosakestega adsorptsiooni käigus, et vältida saasteaine liikuvust. [10]

1.1.1.4 Taimtervendamine ehk fütoremediatsioon

Taimtervendamise puhul puhastatakse saastunud pinnas taimede abiga. Taimede otsene mõju põhineb taimeliigi võimel omastada orgaanilisi või anorgaanilisi reoaineid, neid rakkudesse koguda ning neid rakkudes osaliselt lagundada. Kaudselt võivad taimed reoaineid pinnasest kõrvaldada soodustades mikroobide kasvu reostunud pinnases oma juurestiku kaudu. [6] Fütoremediatsiooni kasutatakse väga erinevate saastainete eelmaldamiseks nagu näiteks naftaproduktid, pestitsiidid, lõhkeained, radioaktiivsed ained, raskemetallid jne. Meetodi peamiseks eeliseks on madal hind ning esteetiline lõpptulemus. Fütoremediatsiooni on edukalt võimalik rakendada suurtel aladel ning asustuse lähedal. [15] Pärast protsessi tuleb pinnast puhastanud taimede biomass kokku koguda ning põletada ning tuhk ladestada ohtlike jäätmete prügilas. [6]

1.1.1.5 Biostimulatsioon

Süsivesinike biodegratsiooni pinnases piiravad paljud faktorid, sealhulgas toitained, pH, temperatuur, niiskus, hapnik, pinnase omadused ning saasteainete sisaldus. Biostimulatsioon hõlmab keskkonnatingimuste muutmist, et stimuleerida olemasolevaid mikroorganisme. Biostimulatsiooni meetodit kasutatakse juhul, kui looduslik hajumine ei toimu või selle protsess on liiga aeglane. Stimuleerimisega mõjutatakse keskkonda, et lagunemine toimuks kiiremini. Biostimulatsioon põhineb keskkonnatingimuste optimeerimises, kus stimuleeritakse looduslike mikroorganismide lagundamisaktiivsust varustades pinnast toiteainetega nagu näiteks lämmastik (N) või fosfor (P) koos elektron akseptoritega (näiteks hapnikuga). Kui tegemist on väga raskesti laguneva ühendiga, võib biolagunemise kiirendamiseks lisada kergesti lagunevaid substraate (näiteks metaani, fenooli, tolueeni või reoainele sarnast mittetoksilist ühendit). [16] Sellisel moel indutseeritakse nende ensüümide sünteesi, mis on võimelised lagundama nii ase- kui ka reoainet. [6]

Lisanditena kasutatakse tavaliselt vees lahustuvaid toitaineid nagu näiteks mineraaloolad, veetustatud ammoniaak, urea ning anorgaanilised väetised. Vees lahustuvad toitained on kergemini kättesaadavamad ning manipuleeritavamad. [13]

Biostimulatsiooni peamine eelis on, et bioremedatsiooni viivad läbi mikroorganismid, kes on eelnevalt keskkonnaga kohastunud ning pinnases ruumiliselt hästi hajutatud. Peamine probleem biostimulatsiooni meetodil on lisandite kohaletoimetamise viisis, et need oleksid pinnases elavatele mikroorganismidele kättesaadavad. Kohalik maapinna geoloogia võib raskendada lisandite levimist kahjustatud alal. Maapinna lõhed moodustavad radu, mida mööda toitained liiguvad ning see vähendab toiteainete ühtlast jaotumist pinnases. Lisaks võib toiteainete lisamine soodustada heterotroofsete mikroobide kasvu, kes ei ole suutelised lagundama naftasüsivesinikke. Selliste mikroobise kasv põhjustab lagundajate mikrofloorale konkurentsi. [17]

1.1.2 Ex situ meetodid

1.1.2.1 Tervendamine künnikihis (*landfarming*)

Künnikihis tervendamise puhul laotatakse reostunud pinnas õhukeste kihtidena saastumata pinnasele ning stimuleeritakse mikroorganismide aktiivsust õhutamise ning

toiteainete lisamisega. [18] Meetod põhineb sellel, et saastumata muld sisaldab arvukat ja mitmekesist mikroobikooslust, kes hakkavad lagundama saastunud pinnases olevaid orgaanilisi ühendeid. [19] Kuigi tehnoloogia on soodne, on sellel palju puudusi. Pinnase töötlemiseks on vaja suurt maa-ala; lagunemine on ilmast sõltuv ning seetõttu aeglane; lagunemine ei ole tõhus suure reoainesisalduse korral; raskemetallid võivad aeglustada mikroobide kasvu; lenduvad ühendid võivad biolagunemise asemel aurustuda ja nende emissioon atmosfääri tekitada keskkonnaprobleeme; võib tekkida reostunud nõrgvett ning suuremat puhastustõhusust kui 95% on raske saavutada. [6]

1.1.2.2 Kompostimine

Aunkompostimise tehnoloogia puhul kaevatakse reostunud pinnas välja, segatakse koreda tugiaine (näiteks saepuru, puukoor või hakkepuut), toitesoola ja mikroobiallikaga ning kuhjatakse aunadesse. Tugiained suurendavad kompostitava materjali poorsust. Aunasid on vaja segada, et keskkond oleks aeroobsem ning mikroorganismide hulk ning nende aktiivsus suurem. Segamine võimaldab hoida aunade temperatuuri optimaalsena, milleks on 50-60°C. [6]

Bioaun kompostimise puhul aun kaetakse kinni ning orgaanilised reoained lagunevad kontrollitavates tingimustest neist toituvate bakterite ja seente toimel. Kompostimine bioaunades on tõhusam kui tavaline aukompostimine. Sarnaselt aukompostimisele tuleb bioaunades kompostimisel protsessi tõhustamiseks auna õhutada ning lisada toiteaineid. [6]

1.1.2.3 Pinnase-vee segu reaktor (*Bioslurry reactor*)

Pinnase-vee segu reaktoris tervendamise puhul kaevatakse saastunud pinnas välja ning pannakse bioreaktorisse, kuhu lisatakse veel vett, toitesooli ning õhku. [6] Reaktoris luuakse tingimused kolme faasi (tahke, vedel, gaas) segunemiseks, mis kiirendab saasteaine biodegratsiooni. [19] Reaktortervendamise seadmed on kallid ning tehnoloogia on keerukas ja energiamahukas, kuid protsess on kiire, hästi juhitud ning kuna mahutid on kinnised, ei saa midagi õhku lenduda ning seetõttu on protsess keskkonnaohutu. [6]

1.2 Bioremediatsioonis esinevad mikroorganismid

Bioremediatsioon põhineb ideel, et mikroorganismid eemaldavad keskkonnast saasteained kasutades selleks enda metaboolset potentsiaali. Mikroorganismid nagu bakterid, seened ning arhed on looduslikud lagundajad, kes suudavad lagundada reoaineid nende enda kasvu ja ainevahetuse kaudu. [18] On teada üle 70 mikroobide perekonna, kes suudab lagundada süsivesinikke. Bioremediatsioon mullas sõltub peamiselt algsetest mikroorganismidest. Bioremediatsiooni korral stimuleeritakse neid mikroorganisme, kes suudavad lagundada ksenobiootilisi ühendeid. Erinevate uuringute kohaselt on enim levinud süsivesinike lagundajaid bakteriperekond *Pseudomonas*. See bakteriperekond suudab lagundada edukalt ka külmemas kliimas. Samuti on uuringud näidanud, et väga olulised lagundajad on bakteriperekonnad *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Janibacter*, *Kokuria* ja *Pseudonocardia*. Seente perekondadest on mullakeskkonnas enamlevinud *Trichoderma* ja *Mortierella* [7] [20] [21] [22].

1.3 Bioremediatsiooni mõjutavad tegurid

Bioremediatsiooni efektiivsus sõltub paljudest parameetritest. Need parameetrid on jagatud kolme gruppi – pinnase omadused, saasteaine omadused ja kliimatilised tingimused. [18] Tähtsaimad biolagunemist mõjutavad teguri on hapnik, temperatuur, niiskus, toiteainete olemasolu ning pH. [6]

1.3.1 Pinnase pH

Neutraalsem pH väärtus keskkonnas jääb 5 ja 9 vahele, seetõttu on ka mikroorganismid harjunud just sellise pH väärtusega. Mikroorganismid tolereerivad küll pH-d väärtuses 5-9, kuid eelisavad siiski vahemikku 6,5-7,5. Kui pinnase pH ei jää sellesse vahemikku, avaldab see negatiivset mõju mikroobide lagundamise aktiivsusele. [4] Bioremediatsiooni ajal on võimaik pinnase pH-d muuta. Kui pinnas on liiga leeliseline (pH > 8.0) ning pH-d on vaja alandada, võib lisada väävlit. Liiga happelise (pH < 6.0) pinnase puhul tuleb pinnasele lisada lupja. [18]

1.3.2 Pinnase niiskusesisaldus

Niiskusel on bioremediatsioonis oluline roll. Niiskus on oluline kõikideks bioloogilisteks protsessideks. See aitab transportida toit- ja jääkaineid mikroorganismidesse ja neist välja. Ookeanides, järvedes ja teistes pinnaveekogudes ei ole niiskusesisaldus probleemiks, kuid mullakeskkonnas peab niiskust lagunemise protsessiks olema. Optimaalne pinnase niiskusesisaldus sõltub kliimast ja pinnase tüübist. [21] Mikroobide aktiivsus on suurim pinnases, kus niiskusesisaldus on 50-80% . Kui niiskusesisaldus on madalam, siis vee kättesaadavus mikroorganismidele on piiratud osmootse- ja kapillaarrõhu tõttu. Kui niiskusesisaldus on aga sellest kõrgem, võib tekkida mikroorganismidel hapnikudefitsiit. Juhul, kui mulla veesiduvusvõime on väike, on kasulik pinnasele lisada orgaanilisi aineid nagu näiteks õled, hakkepuuit ja riisikestad, et suurendada mullas vee mahutavust. [4] Liigne niiskusesisaldus takistab õhku liikumist pinnases. See omakorda piirab hapniku kättesaadavust, mis on vajalik mikroorganismide ainevahetusprotsessideks. [18]

1.3.3 Pinnase temperatuur

Saasteainete degratsiooni mõjutab pinnase temperatuur. Temperatuur mõjutab otseselt mikroorganismide metabolismi ja järelkult ka nende bioaktiivsust. Temperatuuri tõustes biodegratsiooni tase tõuseb ning aeglustub temperatuuri langedes. [17] Biolagunemise määr kahekordistub peale iga 10°C temperatuuri tõusu. Madalatel temperatuuridel lükkub biolagunemise algus edasi. Kuigi süsivesikute biodegratsiooni on täheldatud isegi -1,1°C pinnases, langeb biolagunemise kiirus tugevalt, kui temperatuur langeb alla 15°C. [4] Mikroorganismide kasvuks on optimaalseim temperatuur 10-45°C, süsivesinike biolagunemiseks 20-30°C. [21]

1.3.4 Toiteained

Toiteainete olemasolu on tugevalt seotud mikroorganismide kohanemisvõime ja süsivesinike kasutamisega nende kasvuks. Lämmastik ja fosfor on ühed olulisemad toiteained, kuna neid on vaja süsiniku liitmiseks biomassi. [4] Mikroorganismid vajavad toiteaineid rakkude kasvuks ning biodegratsiooni protsessiks. Kirjanduses on optimaalset C:N:P suhet kajastatud erinevalt, kuid üks levinum optimaalne C:N:P suhe on 100:10:1. Haritavates muldades on toitaineid üldiselt piisavalt, kuid looduslikes

muldades on vaja lisada toiteaineid, et säilitada bakterite populatsiooni. Liialt suurt teatud toiteainete (nt fosfor, sulfaat) kogus võib aga mikroobide metabolismi pärssida. [18]

1.3.5 Pinnase tekstuur

Pinnase tekstuuril on samuti bioremedatsiooni protsessis oluline tähtsus. Pinnase tekstuur mõjutab läbilaskvust, veemahutavust ning mulla tihedust. Pinnase tekstuur mängib olulist rolli hapniku ja toiteainete liikumisel ning mulla niiskusesisaldusel. Pinnases, kus on madal läbilaskvus (nt savipinnas), on raskendatud vee, toitainete ja hapniku transport ning jaotumine. [18] Selliseid pinnaseid tuleks segada täitematerjalidega (nt õled, saepuru), et soodustada bioremedatsiooni protsessi. [21] Kõige sobivaimad pinnased bioremedatsiooniks on liiv ja kruus nende hea läbilaskvuse ja aeratsiooni tõttu. Seevastu savi, turvas või muu pinnas, millel on kõrge orgaanilise aine sisaldus, ei ole bioremedatsiooniks kõige paremad pinnased. [23]

1.3.6 Orgaaniline aine

Looduslikult esineva orgaanilise materjali olemasolu mõjutab pinnast mitmeti. Näiteks mõjutab orgaanilise materjali esinemine pinnase veepidavust, temperatuuri ja mikroorganismide võimet lagundada saasteaineid. Samuti mõjutab orgaanilise aine olemasolu sorptsiooni protsessides toiteainete kättesaadavust mikroorganismidele. Orgaaniline aine võib küll konkurentsi tõttu aeglustada biolagunemise loomulikku määra, kuid pikemas perspektiivis võib see suurendada infiltratsiooni, läbilaskvust ja poorsust. [21]

1.3.7 Hapnik

Bakterid ja seened vajavad molekulaarset hapniku hingamiseks ning saasteainete substraadi oksüdatsiooniraja utiliseerimisel. Bioremedatsioon orgaaniliste saasteainete lagundamiseks saab toimuda nii aeroobses kui anaeroobses keskkonnas. Samas on täheldatud, et praktilises bioremediatsioonis on anaeroobne degradeerumine aeglane. Hapniku kättesaadavus mullas sõltub mikroorganismide hapnikutarbimisest, mulla tüübist, niiskusest ning lagundavate substraatide olemasolust. [24] Süsivesinike biodegratsioon väheneb oluliselt, kui hapniku gaasiline kontsentratsioon mullas langeb

alla 2-5%. Mikroorganismide metaboolse tegevuse säilitamiseks peab mikroobirakkude hapnikuvarustuse määr olema tasakaalus üleüldise hapniku tarbimisega. [4]

Biodegratsiooni efektiivsemaks muutmiseks on võimalik hapniku sisaldust mullas suurendada. Võimalikud viisid hapnikusisalduse suurendamiseks on pinnase segamine kündmise teel, õhu pumpamine pinnasesse ning täitematerjalide lisamine. Optimaalne hapniku sisaldus (õhuga täidetud pooride ruum) pinnases on mikroorganismide kasvuks 10% ning süsivesinike lagundamiseks 10-40%. [21]

1.3.8 Soolsus

Soolade (KCl, NaCl) sisaldus pinnases mõjutab mikroorganismide lagundamisaktiivsust. Kui pinnase soolsus suureneb optimaalsest tasemest kõrgemale, siis biolagunemise määr langeb. Ülemäärast soola on võimalik pinnasest eemaldada vee läbipesu või kaltsiumiga. [4] Pinnase soolsuse suurenemise kõige tavalisem põhjus on väetiste lisamine (väetised koosnevad tavaliselt lahustuvast nitraadist või ammoniumsoolast). Väetised muudavad pinnase poorivee ionikontsentratsiooni, mille tagajärjel langeb biolagunemise kiirus ja ulatus. Soolsuse optimaalsena hoidmiseks mikroorganismide jaoks tuleb hinnata soolsuse ja toitainete taset algetapis ning perioodiliselt vastavalt vajadusele toiteaineid lisada. [25]

1.3.9 Saasteaine biokättesaadavus

Biokättesaadavust võib defineerida kui füsiokeemiliste ja mikrobioloogiliste faktorite mõju biolagunemise kiirusele ja ulatusele ning see on üks olulisemaid faktoreid bioremedatsioonis. Biokättesaadavus näitab kemikaalide osa pinnases, mida elusorganismid suudavad kasutada või transformeerida. [21] Biodegradeerumist mõjutab oluliselt saasteaine biokättesaadavus. Biokättesaadavus sõltub viskoossusest, lahustuvusest, temperatuurist ja pinnase omadustest. Mida madalam on temperatuur, seda väiksem on viskoosus ja lahustuvus ning seetõttu ka saasteaine biokättesaadavus ja biodegratsioon. [25]

1.3.10 Elektron aktseptorid

Molekulaarse hapniku puudumisel hakkavad anaeroobsed mikroorganismid kasutama teisel kujul kombineeritud hapnikku. [13] Süsinikoksiid, sulfaat, nitraat ja hapnik on

levinud elektron akseptorid. Eri substraatide oksüdeerimisel tekib erinev kogus energiat. Kõige enam energiat tekib hapniku redutseerumisel, järgnevad nitraatide, sulfaatide ja süsihappegaasi redutseerumine. Mikroorganismid eelistavad biolagundamisel elektron akseptorina kõrgema oksüdatsiooniastmega ühendeid. [6]

1.3.11 Mikroobipopulatsioon

Pinnases on tavaliselt väga suur mikroobikooslus (bakterid, seened, arhed), kes on võimelised lagundama süsivesinikke. Mikroobikoosluse võime lagundada saasteaineid sõltub nende arvust ning kataboolsest aktiivsusest. Edukaks biolagunemiseks ei tohiks mullas mikroorganisme olla vähem kui 10^3 kolooniaid moodustunud ühikut (KMÜ) ühe grammi mulla kohta. Mikroobikoosluste arvu pinnases mõjutavad paljud tegurid nagu näiteks pinnase pH, temperatuur ning toiteainete ja hapniku hulk. [21]

1.3.12 Reoaine struktuur, toksilisus ja kontsentratsioon

Kõik reoained ei lagune ühte moodi – reoaine lagunevus sõltub selle molekulide struktuurist ja koostisosadest. Kõige paremini suudavad mikroorganismid lagundada keskmise pikkusega süsivesinikke ($C_{10}-C_{25}$). Lühemad ahela ühendid on üldiselt rohkem toksilised ning pikemad hüdrofoobsed, mistõttu on nad halva lahustuvuse ja biokättesaadavusega ja seepärast ka raskesti biolagundatavad. [26] Osade orgaaniliste ühendite struktuursed omadused ei ole loodused tavapärased – neid nimetatakse ksenobiootikuteks (nt H asendused Cl, NO_2 , CN ja SO_3 rühmadega). Mikroorganismidel on selliseid molekule raske metaboliseerida, seetõttu on selliseid asendusi sisaldavaid molekule mikroorganismidel keeruline biolagundada. [13]

Loomulikult mõjutab bioremedatsiooni protsessi saasteaine kontsentratsioon. Kui kontsentratsioon on suur, võib saasteainel olla toksiline mõju mikroorganismidele. Samas kui saasteaine kontsentratsioon on väga madal, ei pruugi mikroorganismid oma lagundusvõimelisi ensüüme üldse aktiveerida. [17] Kui pinnases on saasteaine kontsentratsioon liiga suur, tuleb lisada puhast pinnast, et keskmine kontsentratsioon oleks allpool toksilist taset. [18]

1.3.13 Kliimaatilised tingimused

Kliimaatilistest tingimustest mõjutavad bioremediatsiooni protsessi eelkõige ümbritsev temperatuur ning sademete hulk. Ümbritsev temperatuur on oluline, kuna see mõjutab pinnase temperatuuri, mis omakorda mõjutab mikroorganismide aktiivsust, kontsentratsiooni ja biodegratsiooni. Sademete hulk mõjutab jällegi pinnase niiskusesisaldust. [18]

1.4 Pestitsiidide lagunemise mikrobioloogia

Bioremedatsiooni lõpptulemusena peaksid saasteained lagunema veeks ja süsihappegaasiks ilma, et tekiks uusi kahjulikke vaheühendeid. Bioremedatsioon sõltub mikroorganismide bioloogilistest protsessidest, millest üks on ainevahetus ehk metabolism. Metabolism on organismis toimuv sünteesi- ja lõhustusprotsesside kogusus, mis tagab organismi aine- ja energiavahetuse ümbritseva keskkonnaga. Metabolism koosneb kahest reaktsioonist – anabolism ja katabolism, mida aitavad läbi viia ensüümid. Katabolismi reaktsiooniga muudavad mikroorganismid toitained endale sobivaks, lagundades keerukamad ühendid (näiteks kemikaalid) lihtsamateks. Ühendite lagunemisel vabaneb energia, mida on vaja anabolismi reaktsioonis rakkude sünteesimiseks. [27]

Mikroorganismid kasutavad efektiivseks saasteaine, nagu näiteks pestitsiidid, lagundamiseks ensüüme. Ensüümid on katalüsaatorid, mis kiirendavad keemiliste reaktsioonide toimumist. Ensüümid võivad kiirendada reaktsiooni kiirust rohkem kui 10^9 korda. [28]

Metabolismi moodustavad metaboolsed rajad ehk reaktsioonide jada, milles ensüümide abil muunduvad ja tekivad metaboliidid ehk biomolekulid. [27] Olenevalt kemikaali keemilisest struktuurist võib metabolism toimuda kolme erinevat rada. Nendeks on hüdroolüüs, oksüdatsioon/reduktsioon ja liitmine. [28]

Hüdroolüüs on pestitsiidide lagunemises kõige tavalisem reaktsioon. [29] Uuringute kohaselt on endosulfaan üks kasutatavamaid pestitsiide, mis võib biotransformeeruda endosulfaan sulfaadiks ning endosulfaan diooliks. Endosulfaan on väga toksiline mikroobidele ja mikroobsetele ensüümide aktiivsusele mulla- ja vesikeskkonnas.

Mikroorganismid on võimelised endosulfaani ja selle isomeere lagundama. Endosulfaani biolagunemine võib toimuda selle oksüdeerimisel endosulfaan sulfaadiks, mis on toksilisem kui vanemkemikaal ning hüdrolüüsi teel endosulfaan diooliks, mis on vanemkemikaalist vähemtoksilisem. Endosulfaan diool võib tulevikus omakorda transformeeruda vähemtoksiliseks kemikaaliks. Seetõttu võib väita, et endosulfaani lagunemiseks on hüdrolüütiline rada sobivaim. [30] Samuti on uuritud pestitsiidide aldrüüni ja dieldrüüni lagunemist, kus samuti lagunemine toimus hüdrolüüsi teel. [31]

Paljud bakterid on suutelised lagundama süsivesinikke. Lagundavad bakterid on olemas nii mulla- kui ka vesikeskkonnas. Süsivesinike lagunemine võib toimuda erinevaid radu pidi. Lagunemine saab toimuda aeroobselt ning anaeroobselt. Aeroobse lagunemise puhul kasutavad bakterid funktsioneerimiseks hapnikku. Bakterid kasutavad hapnikku elektron akseptorina süsivesinike lagundamiseks. Anaeroobse lagunemise puhul lagundatakse süsivesinikud ilma hapnikuta ning elektron akseptoritena kasutatakse nitraati, sulfaati või rauda. Anaeroobset lagundamist teostavad bakterid jagatakse kahte rühma - ranged ja fakultatiivsed anaeroobid. Ranged anaeroobid (enamasti sulfaati vähendavad bakterid) suudavad lagundada vaid anaeroobses keskkonnas, fakultatiivsed anaeroobid (üldiselt nitraati või rauda kasutavad bakterid) suudavad lagundada nii aeroobses kui anaeroobses keskkonnas. [32]

Lisaks bakteritele lagundavad edukalt süsivesinikke ka seened. Kuid seened ei suuda süsivesinikke täielikult CO₂-ks lagundada. Seened kasutavad süsivesinike lagundamises teisi mehhanisme kui bakterid ning seetõttu on nad võimelised lagundama ka neid süsivesinikke, mis jäävad tavaliselt kiiremini lagundavatest bakteritest alles. Biodegratsioon on suurem, kui ühes kultuuris esinevad nii seened kui ka bakterid. [32]

1.4.1 Toksilised vaheühendid

Biolagunemise soovitud lõpp-produktiks on CO₂, kuid alati ei pruugi see nii olla. Võib juhtuda, et tekivad vaheühendid, mis on võrreldes vanemkemikaaliga sama kahjulikud või halvemal juhul veelgi toksilisemad. Näiteks putukatõrjevahend diklorodifenüültri-kloroetaan (DDT), mis on väga keskkonnaohtlik, transformeerub DDD-ks või DDE-ks, mida peetakse vähemalt sama toksiliseks kui on DDT. [28]

Samamoodi on vanemkemikaalist vähem lagunev herbitsiidi dichlobenili metaboliit BAM (2,6-diklorobensamiid) [33] ning ka eelmises alapeatükis mainitud endosulfaani metaboliit endosulfaan sulfaat. [30]

2 Põllumajandus ja pestitsiidid

Põllumajandustootmise pidev intensiivistumine on kogu maailmas kaasa toonud keemiliste ainete sagedama kasutamise. [5] Eestis on põllumajandus olnud üheks olulisemaiks majandussektoriks. [34] Eestis kasutatakse põllumajanduslikult ligikaudu 850 000 ha maad. Põllumajandustootmine kasutab loodusvarasid nagu muld, õhk ja vesi ning sõltub otseselt kliimast. [35]

Viimase 50 aasta jooksul on põllumajanduse intensiivistumine endaga kaasa toonud mitme taime- ja loomaliigi väljasuremise ning tugevalt muutnud agro-ökosüsteemide toimimist. [36]

Põllumajandusega kaasnevad keskkonnaprobleemid on [35]:

- reostuskoormus veekogudele ja põhjaveele, mida põhjustab väetamine, sõnnikust ja reoveest tulenevad haigusetekitajad ning pestitsiidid;
- veekogude füüsilise seisundi rikkumine veekogude tõkestamise ja süvendamisega;
- õhureostus ja kasvuhoonegaaside emissioon (sõnnikuhais, pestitsiidide kasutamisaegne heide, karjakasvatus, sõnnikukäitlus);
- bioloogilise mitmekesisuse vähenemine, mida põhjustab intensiivne maaharimine ning pestitsiidide kasutamine;
- mullaviljakuse langus ja mullasaaste, mis on tingitud ebapiisavast ja tasakaalustamata väetamisest, pestitsiidide kasutamisest ning liigsest tallamisest ja erosioonist.

Reostusallikad liigitatakse tavaliselt punkt- ja hajureostusallikateks. Punktireostusallikate kindlakstegemine on üldiselt kergem kui hajureostusallika puhul, mis hõlmab ulatuslikke maa-alasid. [37] Punktireostusallikas on kindlal territooriumil paiknev objekt, mille kasutamise käigus tekib reostuskoormus. Põhilisted põllumajanduslikud reostusallikad on loomakasvatusfarmid, sõnniku- ja silohoidlad, mineraalväetiste-, mürkkemikaalide- ja vedelkütuste hoidlad ning kanalisatsioonirajatised. [35] Hajureostust põhjustavad näiteks hajaasustus,

põllumajanduses kasutatavad väetised, taimekaitsevahendid, loomakasvatus, saastunud sademed jm. [37]

Pestitsiid ehk taimekaitsevahend on ühte või mitut toimeainet sisaldav toode, mis on mõeldud taimede ja taimsete saaduste kaitsmiseks taimekahjustajate eest ning mittesoovitavate taimede, taimeosade või taimekahjustajate hävitamiseks. Taimekaitsevahendid jagatakse vastavalt kasutusele kolme rühma: herbitsiidid (kasutatakse umbrohu tõrjeks), insektitsiidid (kasutatakse kahjurite tõrjeks) ning fungitsiidid (kasutatakse seente tõrjeks). [5] Pestitsiidis kasutatav toimeaine on märgitud taimekaitsevahendi märgisele. See on aine, mikroorganism või viirus, mis on mõeldud mõju avaldamiseks taimekahjustajale, taimele või taime osale või saadusele. Lisaks toimeainele võib pestitsiid sisaldada jääkaineid, mis võivad muuta toote ohtlikuks. Näiteks on jääkaine dioksiin, mida ei ole lisatud tahtlikult, vaid mis on tekkinud tootmisprotsesside tagajärjel. Samuti on pestitsiidides teisi koostisosi ehk lisaaineid, mis võivad olla sama mürgised kui toimeained. Osad pestitsiidid võivad sisaldada rohkem kui 95% lisaaineid. [38] Kõik pestitsiidid on oma olemuselt vähem või rohkem toksilised ning seetõttu mõeldud kasutamiseks kogustes, mis välistavad nende kuhjumist looduses ja elusorganismides. Taimekaitsevahendite oskamatu ning hoolimatu kasutamine võib kaasa tuua saastekoormuse suurenemise keskkonnale, mille tagajärjel võib saastuda pinna- ja põhjavesi, pinnas ja õhk. [35] Taimekaitsevahendite kahjulikke kõrvalmõjusid on võimalik vältida või vähendada, kui järgida täpset kasutusjuhendis etteantud koguseid. [38]

Keemilise koostise järgi jagatakse pestitsiidid nelja peamisesse rühma: kloororgaanilised, fosfororgaanilised, karbamaadid, ja püretroidid. Kloororgaanilised pestitsiidid on orgaanilised ühendid, millel on viis või enam klooriaatomit. Enamlevinud kloororgaanilised pestitsiidid on näiteks DDT, endosulfaan, lindaan, aldrin ja dieldrin. Fosfororgaanilised pestitsiidid sisaldavad fosforühmasid. Rohkem kasutatavad fosfororgaanilised pestitsiidid on näiteks glüfosaat, diasinon, malatioon ja paratioon. Karbamaadid koosnevad karbamiidhapest, alkoholirühmast, metüülrühmast ning vesinikust. [29]

2.1 Kasutusala ja mahud

Põhjamaades on pestitsiidide seast herbitsiidid kõige suurema osatähtsusega. Taimekaitsevahendeid kasutatakse taime ja taimse saaduse kaitseks taimekahjustajate eest või nende mõju vältimiseks; taimede elutsükli mõjutamiseks muul viisil kui toitainena; taimsete saaduste säilitamiseks; ebasoovitavate taimede või taimeosade hävitamiseks ning taimede ebasoovitava kasvu kontrollimiseks või ärahoidmiseks. [35]

Erinevaid pestitsiide kasutatakse erineval eesmärgil. Herbitsiide kasutatakse umbrohu tõrjeks. [5] Eestis on levinud üle 300 umbrohuliigi. Need varjavad kultuurtaimi, võtavad neilt kasvuruumi, kasutavad rohkesti vett ning tarvitavad toitaineid. Umbrohu tõrjeks on vaja teada umbrohu nime ning tunda tema bioloogiat, kuna herbitsiidid on samuti erinevad ning mõeldud eri liiki umbrohule. [35]

Pestitsiidide kasutamine hakkas kiiremini kasvama pärast II maailmasõda. Statistikaameti andmebaasi kohaselt on Eestis aastatel 2011-2015 taimekaitsevahendite kasutamine iga-aastaselt suurenenud (Tabel 1). [1]

Tabel 1. Eestisse tarnitud taimekaitsevahendite kogused aastatel 2011-2015

Aasta	2011	2012	2013	2014	2015
Kogus, kg (taimekaitsevahendeid kokku)	461018	554209	571286	599751	691327

2.1.1 Pendimetaalin - Stomp 330 EC

Stomp 330 EC toimeaineks on pendimetaalin 455 g/l. Herbisiid on väga mürgine veeorganismidele ning võib põhjustada pikaajalist veekeskkonda kahjustavat toimet. Toode ei ole bioloogiliselt kergesti lagunev OECD kriteeriumide kohaselt. Samas ei ole siiani toote biolagunevust uuritud ning selline seisukoht põhineb koostisainete omadustel (pendimetaalin (ISO); N-(1-etiülpropüül)-2,6-dinitro-3,4-ksüüldiin). [39]

Stomp 330 EC on taimekaitsevahend, mis on mõeldud lühiajaliste umbrohtude tõrjeks hernel, ristikul, oal, lutsernil, kapsal, porgandil, küüslaugul, juurpetersellil, porrul ja sibulal. Erinevate kultuurtaimede kaitseks on ette nähtud erinevad kulunormid [39]

2.1.2 Glüfosaat - Ranger XL

Glüfosaat on mitteselektiivne herbitsiid, mis pidurdab ensüümi tootmist, mida taim vajab valkude tootmiseks. [40] Glüfosaat on fosfororgaaniline herbitsiid, mis avaldab mõju bioloogilisele mitmekesisusele. [29]

Ranger XL on taimekaitsevahend, mille toimeaineks on glüfosaat 360g/l. Ranger XL kasutatakse enamike ühe- ja mitmeaastaste seemne- ja juurumbrohtude tõrjeks. Erinevate kultuurtaimede kaitseks on ettenähtud erinevad kulunormid. Kasutusalad: koristuseelne umbrohutõrje teraviljadel; koristuseelne umbrohutõrje rapsil ja linal; kõrrepõld; rohumaade uuendamine; kesad; viljapuu- ja marjaaedade reavahed; mittepõllumajanduslikud alad; metsandus. Herbitsiid on väga mürgine veeorganismidele. Ranger XL-i biolagunevust ei ole uuritud [41]

2.2 Pestitsiidide keskkonnaohtlikkus

Pestitsiidid erinevad mürgisuse poolest inimese tervisele ja keskkonnale ning püsivuse poolest organismides ja keskkonnas. Mõned pestitsiidid võivad keskkonnas ja elusorganismides püsida aastaid, teised lagunevad kiiresti pärast eraldumist. [2] Pestitsiidijääke on leitud igalt poolt keskkonnast – õhust, pinnasest, pinna- ja põhjaveest. [42]

Pestitsiidid saastavad pinnast, vett, taimestikku ja maastikku üleüldiselt. Hävitades soovimatuid putukaid või umbrohtu, võivad nad olla toksilised ka paljudele teistele organismidele nagu näiteks linnud, kalad, kasulikud putukad ning sihtrühma mittekuuluvad taimed. Kõige toksilisemaks peetakse üldjuhul insektitsiide ehk putukamürke, kuid ka herbitsiidid võivad põhjustada riske nendele organismidele, kes ei kuulu sihtrühma. Pestitsiidide püsivus ja liikuvus sõltub paljudest parameetritest nagu näiteks lahustuvus vees, jaotuskoefitsient oktanool/vesi (K_{ow}), poolestusaeg pinnases (DT_{50}) ja adsorptsioon pinnases (K_{oc}). [42]

Kahjurite mürgitamise käigus satuvad pestitsiidid atmosfääri, kust kanduvad tuulega laiali, põhjustades alumise atmosfäärikihi globaalset saastumist. Aja möödudes sadestuvad nad vihma või lumega maapinnale, sattudes pinnasesse ning pinna- ja põhjavette. [43] Pestitsiidijäägid pinnases on oluline keskkonnaprobleem, mis põhjustab

omakorda pinna- ja põhjavee reostumist. [44] Pinna- ja põhjavette võivad pestitsiidid jõuda äravoolu kaudu taimedest ja pinnasest. Suur pinnase reostus pestitsiididega põhjustab mullas olevate mikroobide populatsiooni ja aktiivsuse langust. Kuna mikroorganismid on tugevas kontaktis saasteainega pinnases, on nad pestitsiidide mõjule kõige ohustatumad. [42] Mikroorganismidel on võtmeroll mulla toimimises. Mikroorganismid viivad läbi biolagunemise protsessi, mistõttu on nende arvukus ja aktiivsus väga olulised faktorid saasteainete lagundamises. [45]

Pestitsiidid omavad suurt rolli bioloogilise mitmekesisuse vähenemises. Pestitsiidid kahjustavad taimi ja loomi nagu näiteks mikroorganisme, putukaid, linde, kalu ja veeselgrootuid ning ka inimesi. Pestitsiidide kasutamine mõjutab väga tolmendajate arvukust. Mesilased on üks uuritum liik, kellele pestitsiidid avaldavad suurt negatiivset mõju. [46] Pestitsiidides kasutatavad toimeained on mesilastele mürgised ning mõjutavad juba väikestes koguses mesilindude korjet. Võrreldes 2006 aastaga, oli 2015 aastal mesilaste populatsioon langenud 29-36%. Läbi toiduahela jõuavad pestitsiidid lindude ja loomadeni. Alates põllumajandusperioodi algusest on lindude populatsioon langenud 20-25%. [47] Pestitsiidide kasutamine mõjutab negatiivselt mullaelustiku mitmekesisust ja neile omast talitlust. Mullaelustiku olulisemad funktsioonid, mis kannatavad mullaelustiku mitmekesisuse vähenemise tõttu, on näiteks mulla struktuuri säilitamine, orgaanilise aine lagundamine, aineringete toimumine ja regulatsioon, mulla detoksikatsiooni ja saasteainete lagundamine ning kahjurite, parasiitide ja haiguste allasurumine. [48]

Ka inimesed ei jää pestitsiidide kahjulikust mõjust puutumata. Pestitsiidid sisenevad inimese kehasse mürke alla neelates, sisse hingates ning läbi naha. Kõige peamine põhjus pestitsiidide sattumisel inimorganismi on saastunud toit. [47] Pestitsiidide mõju tervisele on erinev – osa neist võivad olla kantserogeensed, teised võivad põhjustada sünnidefekte ja kahjustada kesknärvisüsteemi. Osa pestitsiide võivad mõjutada hormoon- ja endokriinsüsteemi ning mõned võivad ärritada nahka ja silmi. [2] Uuringute kohaselt on igal aastal umbes 750 000 inimest saanud pestitsiidide tõttu mürgistuse ning selle tagajärjel hukub ligi 14 000 inimest. [49]

2.2.1 Resistentsus

Paljudel kahjuritel tekib taimekaitsevahendite suhtes üsna kiiresti resistentsus, mis viib selleni, et hakatakse kasutama uusi ja mürgisemaid preparaate. [43] Olulised resistentsuse tekkepõhjused on näiteks herbitsiidi toimemehhanism, selle püsivus keskkonnas ja kasutussagedus. Samuti on oluline põhjus madalate kulunormide kasutamine, mille tagajärjel jäävad osad umbrohud ellu, kes muutuvad teatud tüüpi toimeainete vastu iga põlvkonnaga tugevamaks. Ka vales kasvustaadiumis herbitsiidi kasutamine aitab kaasa resistentsuse tekkele, kuna suurtele taimedele ei ole herbitsiidi mõju enam surmav, vaid kasvu pärssiv. [50]

2.3 Pestitsiididega saastunud alade taastamine bioremedatsiooni abil

Viimase kahe aastakümnega on esile kerkinud keskkonnasõbralik meetod keskkonna puhastamiseks saasteainetest erinevate mikroobiliikide abil. Võrreldes tavapäraste füüsikaliste meetoditega on see lähenemisviis vähem invasiivne ning rohkem mullafunktsioone taastav. [22]

Bioremedatsiooni peamisteks teostajateks on bakterid ja seened, kes kasutavad saasteaineid toidu- ja energiaallikana. [44] Aktinomütseedid (Actinobacteria) on bakterite hõimkond, kes mängib suurt rolli ksenobiootikute (sh pestitsiidide) lagundamisel. Kirjanduse andmetel on kõige olulisemad pestitsiidide lagundajad bakteriperekonnad *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Janibacter*, *Kokuria*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, ja *Pseudonocardia*. [22]

Pestitsiididega saastunud pinnase puhastamiseks on bioremedatsiooni tehnoloogiatest kõige sobilikumad bioaugmentatsiooni- ja biostimulatsiooni meetod. [22] Pinnases, kus mikroobipopulatsioon ei ole piisavalt suur või mitmekesine, et saasteaineid efektiivselt lagundada, on sobilik kasutada bioaugmentatsiooni tehnoloogiat, mille puhul lisatakse pinnasesse spetsiifiliste metaboolsete omadustega mikroorganisme, kes on suutelised saasteaineid lagundama. [44] Biostimulatsiooni puhul stimuleeritakse mikroorganisme lisades keskkonda sobivaid lisatoitaineid, et soodustada mikroobide ainevahetust. [16]

3 Materjal ja metoodika

Käesoleva töö raames tehti laborikatsed, et hinnata pestitsiidi jääkide sisalduse muutumist pinnases, mikroorganismide liigirikkuse ja arvukuse muutumist. Katse viidi läbi Tallinna Tehnikaülikooli Tartu Kolledži mullabioloogia laboris. Katse kestis kokku kaks kuud (08.03.2017-08.05.2017). Töö autor osales katsekehade ja söötmeplaatide valmistamisel, KMÜ-de määramisel ning identifitseerimise jaoks tehtavatel eeltöödel.

3.1 Katse ülesehitus

Kokku valmistati kolm katsekeha. Üks katsekeha saastati herbitsiidiga Stomp 330 EC, teine herbitsiidiga Ranger XL ning kolmas oli kontroll - ilma herbitsiidita. Katsekehade suuruseks oli 21,5x45,5 cm (u 1000 cm²) ning massiks 8kg. Katsekehasid hoiti kogu katseperioodi jooksul 20°C juures kliimakambris. Valitud sai 20°C põhjusel, et see on ligilähedane Eesti suvisele keskmisele õhutemperatuurile.

Tabel 2. Katse info

Parameetrid	Stomp 330 EC	Ranger XL
Katsekeha suurus	21,5x45,5 cm (u. 1000 cm ²)	21,5x45,5 cm (u. 1000 cm ²)
Katsekeha mass	8 kg	8 kg
Lahjendus	1/200	1/200
Lisatud herbitsiidi kogus	2 ml	2 ml
Toimeaine	Pendimetalliin	Glüfosaat
Toimeaine kogus katsekehas grammides	0,66 g	0,72 g

Katsekehade algne saastatus tehti vastavalt herbitsiidi ohutuskaardil olevate soovituslike koguste järgi. Antud katsetes on kasutatud ristikupõllu kontsentratsiooni, milleks on mõlema herbitsiidi puhul 1/200. Mõlemale pestitsiidiga saastatud katsekehale lisati KNO₃ väetiselahus, mis koosnes 2g väetisest ja 1 liitrist veest. Kontrollkehale lisati lihtsalt üks liiter vett. Katsekehade valmistamiseks vajalik muld võeti TTÜ Tartu Kolledži territooriumilt ning kasutatav vesi oli Tartu linna kraanivesi.

3.2 Keemiliste parameetrite määramine

Katse lõpus võeti pestitsiidiga saastatud katsekehadedest proovid ning määrati saasteaine jäägid. Pestitsiidijääkide määramine tehti Tallinna Tehnikaülikoolis LC-MS ehk vedelikkromatograafia-mass-spektromeetria meetodil.

3.3 Kasutatud söötmeplaadid

Mikrobioloogia jaoks tehti söötmeplaadid, kuhu pandi kasvama kas bakterid või seened. Samu söötmeplaate kasutati ka KMÜ-de määramiseks. Bakterite söötmeplaatide tegemiseks kasutati pärmiekstrakti, peptooni, soola, agarat ning destilleeritud vett. Nimetatud ained segati omavahel kokku ning pandi ~60 minutiks ahju 110°C juurde autoklaavima. Kui söötmed olid saavutanud ahjus läbipaistva selge välimuse ehk kui agar oli lahustunud, võeti söötmed välja ning jahutati toatemperatuurini. Kui söötmed olid jahtunud, lisati eelnevalt kokku segatud tsükloheksimiidi ja alkoholi lahus, mis taksitab seente elutegevust. Jahtunud sööde valati 12 Petri tassi ning oodati selle täielikku tahkestumist. Söötme koostisosade täpsed kogused on välja toodud Tabel 3.

Tabel 3. Bakterite söötmeplaadi koostisosad

Kogus	Koostisosa
0,5 g	Pärmiekstrakt
1,25 g	Peptoon
1,25 g	Sool
3,75 g	Agar
250 ml	Destilleeritud vesi
0,1 g	Tsükloheksimiid
10 ml	Alkohol

Seente söötmeplaatide tegemiseks kasutati agarat, linnaseekstrakti, kloramfenikooli ning destilleeritud vett. Nimetatud ained segati omavahel ning pandi ~60 minutiks ahju 110°C juurde autoklaavima. Kui agar oli lahustunud võeti söötmed välja ning jahutati toatemperatuurini. Jahtunud sööde valati 12 Petri tassi ning oodati selle täielikku tahkestumist. Söötme koostisosade täpsed kogused on välja toodud Tabelis 4.

Tabel 4. Seente söötmeplaatide koostisosad

Kogus	Koostisosa
3,75 g	Agar
5 g	Linnaseekstrakt
0,05 g	Klooramfenikool
250 ml	Destilleeritud vesi

KMÜ-d määrati katseperioodi jooksul kolm korda – katseperioodi alguses, keskel ja lõpus. Kolooniaid moodustunud ühikud loeti 24 tundi pärast mikroorganismide külvamist söötmeplaatidele.

3.4 Seente ja bakterite identifitseerimine

Seente ja bakterite identifitseerimiseks kasutati eelnevalt valmistatud söötmeplaatide, kuhu oli pandud kasvama vastavalt seene- ja bakteriliigid. Bakterite söötmeplaatidelt võeti külviaasaga baktereid ning pandi need 12-le eelnevalt alkoholiga puhastatud klaasplaadile. Samuti võeti seente söötmeplaatidelt külviaasaga seeneliigid ning pandi 12-le klaasplaadile. Kõigile 24-le klaasplaadile tilgutati pipetiga 10 µl destilleeritud vett, misjärel asetati klaasplaadid tõmbekapi alla kuivama kuniks vesi on täielikult aurustunud. Seejärel toimus klaasplaatide kuumfikseerimine, mille käigus liigutati klaasplaatid paar korda leegi kohal. Kuumfikseerimise käigus denatureeruvad seene ja bakterite valgud klaaspinnale kinni ning neid on hilisema identifitseerimise jaoks kergem värvida.

Identifitseerimise jaoks värviti seened ja bakterid bengaalpunase lahusega, et nad oleksid mikroskoobi all nähtavad. Lahuse saamiseks valmistati 5%-ne värvilahus, mille koostiseks olid bengaalpunase pulber, alkohol (90% piiritus) ja destilleeritud vesi. Täpsemad koostisosade kogused on välja toodud Tabelis 5.

Tabel 5. Bengaalpunase 5% värvilahus

Kogus	Koostisosa
0,01 g	Bengaalpunane (pulber)
0,1 ml	Alkohol (90% piiritus)
1,9 ml	Destilleeritud vesi

Seene ja bakterite värvimiseks tilgutati bengaalpunase lahust pipetiga klaasplaadile seene/bakteriliikide peale ning oodati paar minutit, et see kuivaks. Seejärel pesti üleliigne värv destilleeritud veega maha. Värvimisprotsessi korrati viis korda. Peale värvimist pildistati mikroorganismid mikroskoobiga üles ning identifitseeriti.

4 Tulemused

4.1 KMÜ-de loendus

KMÜ-d loeti 24 tundi pärast mikroorganismide külvamist söötmeplaatidele. Lugemine toimus kolmel korral – katse alguses, keskel ja lõpus. Nii seente kui bakterite KMÜ-d loeti söötmeplaatidelt. Bakterite kolooniate arvud on kujutatud Tabelis 6 ning seente kolooniate arvud Tabelis 7.

Tabel 6. Bakterite kolooniate arv

	Katseperioodi alguses (KMÜ-d)	Katseperioodi keskel (KMÜ- d)	Katseperioodi lõpus (KMÜ-d)	Arvukuse muutumine, % (algus- lõpp)
Stomp 330 EC	432±110	7276±527	6194±1087	+1330%
Ranger XL	643±77	4876±767	3742±910	+480%
Kontroll	119±28	11264±3922	6719±1419	+5540%

Herbitsiidiga Stomp 330 EC saastunud pinnasest loendatud KMÜ-de keskmine tulemus katse alguses oli 432±110 KMÜ-d. Katseperioodi keskel loetud KMÜ-de keskmine oli 7276±527 ning katse lõpus saadi keskmiseks tulemuseks 6194±1087 KMÜ-d.

Herbitsiidiga Ranger XL saastunud pinnasest saadud bakterite KMÜ-de keskmine tulemus katseperioodi alguses oli 643±77, katse keskel 4876±767 ning lõpus 3742±910 KMÜ-d.

Kontrollversiooni katsekehast võetud bakterite KMÜ-de keskmine tulemus katseperioodi alguses oli 119±28, katse keskel 11264±3922 ning lõpus 6719±1419 KMÜ-d.

Tabel 7. Seente kolooniate arv

	Katseperioodi alguses (KMÜ-d)	Katseperioodi keskel (KMÜ-d)	Katseperioodi lõpus (KMÜ-d)	Arvukuse muutumine % (algus-lõpp)
Stomp 330 EC	72±10	195±81	64±12	-10%
Ranger XL	11±2	193±46	123±8	+1010%
Kontroll	31±14	121±20	104±27	+235%

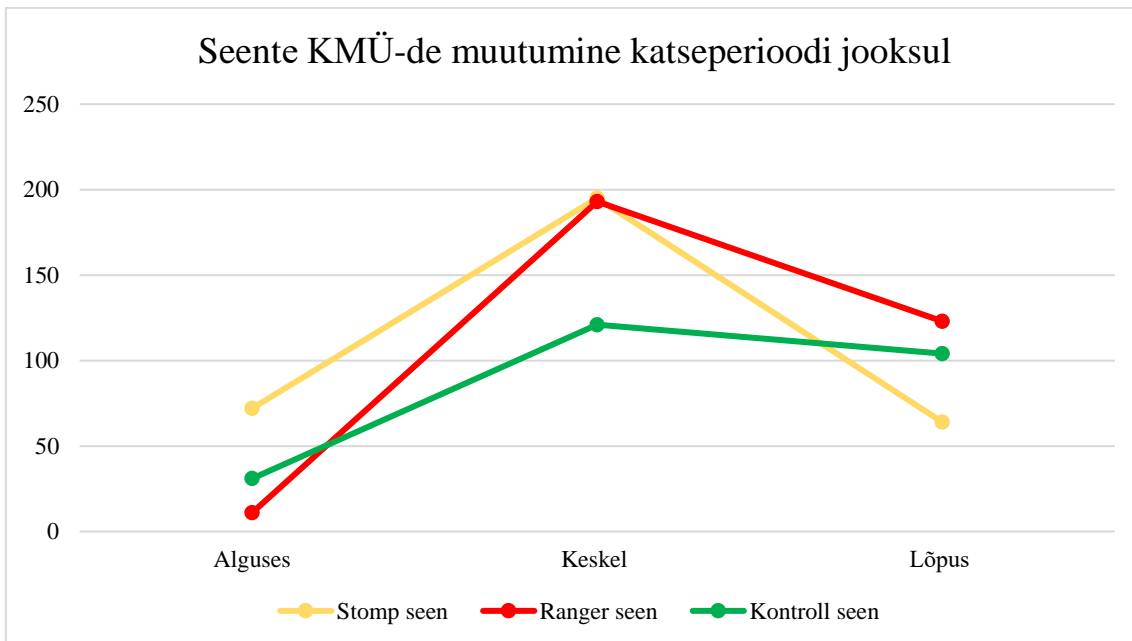
Herbitsiidiga Stomp 330 EC saastunud pinnasest saadud seente KMÜ-de tulemused oli järgmised: katse alguses 72±10 KMÜ-d, katse keskel 195±81 ning katse lõpus 64±12 KMÜ-d.

Herbitsiidiga Ranger XL saastunud pinnasest saadud seente KMÜ-de keskmine tulemus katseperioodi alguses oli 11±2 KMÜ-d, katse keskel 193±46 ning lõpus 123±8 KMÜ-d.

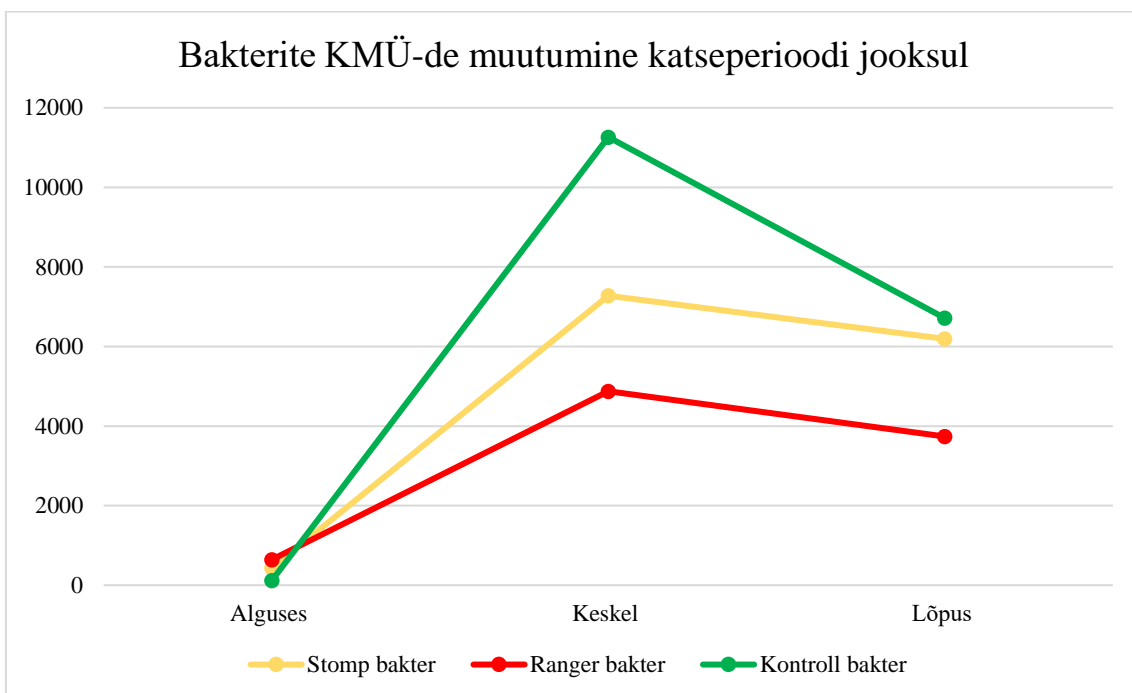
Kontrollversiooni pinnasest saadud seente KMÜ-de tulemused katseperioodi alguses olid 31±14, katse keskel 121±20 ning lõpus 104±27 KMÜ-d.

Mikroorganismide arvukuse protsentuaalset muutumist on näha Tabelites 6 ja 7. Herbitsiidiga Stomp saastunud pinnases tõusis bakterite arvukus ~1330% ning seente arvukus langes ~11%. Herbitsiidiga Ranger saastunud pinnases toimus vastupidine muutus ning seente arvukus tõusis rohkem kui bakterite oma. Seente arvukus tõusis kokku ~1010% ning bakterite oma ~480%. Kontrollkatsekehas toimus samuti pigem bakterite tõus ning seente arvukus tõusis vähe. Bakterite arvukus tõusis ~5540% ning seente arvukus ~235%. Need tulemused näitavad, et võrdselt korraga ei kasvanud mõlema mikroorganismi arvukus. Kui rohkem suurenes bakterite arvukus, siis seente oma tõusis pigem vähem või langes ning vastupidi – kui rohkem suurenes seente arvukus, jäi bakterite arvukus võrdlemisi muutumatuks.

KMÜ-de muutumist ajas kajastavad Joonised 1 ja 2. Joonistelt on näha, et KMÜ-de kasv ei olnud eksponentsaalne, vaid pärast mõningast tõusu toimus jälle mikroobide arvukuse langemine.



Joonis 1. Seente KMÜ-de muutumine



Joonis 2. Bakterite KMÜ-de muutumine

4.2 Keemiliste parameetrite määramine

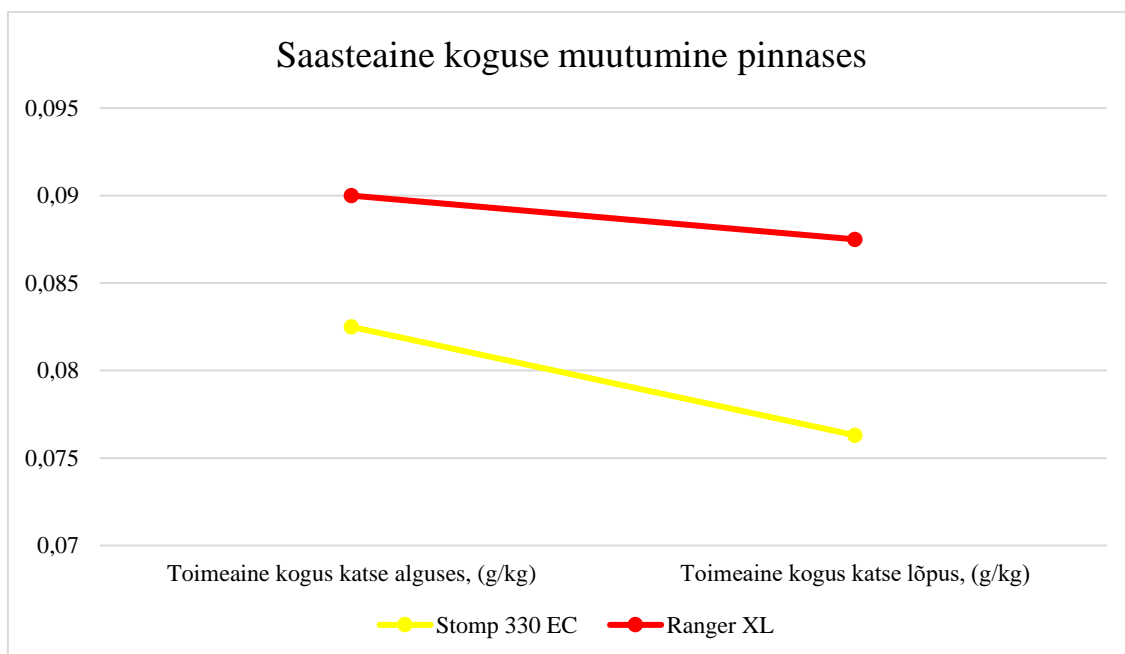
Kahe kuulise katseperioodi lõpus võeti pinnasest proovid, et hinnata pestitsiidi toimeaine sisalduse muutumist aja jooksul. Tabelis 8 on näha, millised olid toimeainete sisaldused katseperioodi alguses ning katseperioodi lõpus. Algne saasteaine kontsentratsioon on võetud herbitsiidi ohutuskaardilt ning kasutati ristikupõllule sobivaid kontsentratsioone. Herbitsiidi Stomp puhul oli selleks katse alguses 8 kg-se katsekeha kohta 0,66 g ehk 0,0825 g/kg pinnase kohta. Rangeri puhul oli 8 kg-se katsekeha kohta saasteainet 0,72 g ehk 0,090 g/kg pinnase kohta.

Tabel 8. Pestitsiidi toimeaine muutus pinnases

	Stomp 330 EC	Ranger XL
Toimeaine kogus katsekehas katse alguses, g	0,66	0,72
Toimeaine kogus katsekehas katse lõpus, g	0,61	0,70

Katseperioodi lõpus määrati saasteaine sisaldus Tallinna Tehnikaülikoolis Toidu- ja Fermentatsioonitehnoloogia Arenduskeskuses (TFTAK). Katseperioodi lõpus oli herbitsiidiga Stomp saastatud katsekehas saasteainet 0,61 g (0,0763 g/kg pinnase kohta) ning herbitsiidiga Ranger saastatud katsekehas oli saasteainet 0,70 g (0,0875 g/kg pinnase kohta). Joonisel 3 on näha saasteaine koguse muutumist kahe kuulise katseperioodi jooksul.

Kahe kuulise perioodi jooksul langes herbitsiidiga Stomp saastatud pinnases saasteaine sisaldus 0,66 g-lt 0,61 g-le ehk 7,6% ning herbitsiidiga Ranger saastatud pinnases saasteaine sisaldus 0,72 g-lt 0,70 g-le ehk 2,8%.



Joonis 3. Saasteaine koguse muutumine pinnases katseperioodi jooksul

4.3 Seente ja bakterite identifitseerimine

Katse alguses ja lõpus määrati pinnases esinevad mikroorganismid. Katse alguses identifitseeritud mikroorganismide perekonnad on näha Tabelis 9 ning katse lõpus identifitseeritud perekonnad Tabelis 10. Mikroskoobiga üles pildistatud seeni on näha Lisas 1 ning baktereid Lisas 2.

Tabel 9. Katseperioodi alguses pinnases esinevad mikroorganismide perekonnad

	Kontroll	Stomp 330 EC	Ranger XL
Bakterite perekonnad	<i>Streptomyces,</i> <i>Actinomyces,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Bacillus,</i> <i>Rhodococcus,</i> <i>Azotobacter,</i> <i>Alcaligenes</i>	<i>Streptomyces,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Bacillus,</i> <i>Rhodococcus,</i> <i>Azotobacter,</i> <i>Alcaligenes</i>	<i>Streptomyces,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Bacillus,</i> <i>Rhodococcus,</i> <i>Azotobacter,</i> <i>Alcaligenes</i>

Seente perekonnad	<i>Cladosporium,</i> <i>Aspergillus,</i> <i>Penicillium,</i> <i>Trichoderma,</i> <i>Alternaria,</i> <i>Cliocladium</i>	<i>Cladosporium,</i> <i>Aspergillus,</i> <i>Penicillium,</i> <i>Trichoderma,</i> <i>Mucor</i>	<i>Cladosporium,</i> <i>Aspergillus,</i> <i>Penicillium,</i> <i>Trichoderma,</i> <i>Mucor</i>
-------------------	---	---	---

Tabel 10. Katseperioodi lõpus pinnases esivate mikroorganismide perekonnad

	Kontroll	Stomp 330EC	Ranger XL
Bakterite perekonnad	<i>Streptomyces,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Bacillus,</i> <i>Rhodococcus,</i> <i>Azotobacter</i>	<i>Streptomyces,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Bacillus,</i> <i>Rhodococcus,</i> <i>Azotobacter</i>	<i>Streptomyces,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Bacillus,</i> <i>Azotobacter</i>
Seente perekonnad	<i>Cladosporium,</i> <i>Aspergillus,</i> <i>Penicillium,</i> <i>Trichoderma,</i> <i>Cliocladium</i>	<i>Aspergillus,</i> <i>Penicillium, Mucor</i>	<i>Aspergillus,</i> <i>Penicillium,</i> <i>Cladosporium</i>

Esimene identifitseerimine tehti katse alguses, kui pestitsiidide mõju ei olnud jõudnud veel mõjuda, teine identifitseerimine kate lõpus, kui pestitsiidid olid jõudnud mõjutada mikroorganismide elutegevust. Katse alguses identifitseeriti rohkem erinevaid perekondi kui katse lõpus. Katse lõpuks ei olnud üheski katsekehas enam bakteri perekonda *Alcaligenes*. Herbitsiidiga Ranger saastatud pinnases ei leidunud katse lõpuks ka enam *Rhodococcus*-e perekonda ning kontrollveriooni katsekehas ei olnud *Actinomyces*-e perekonda. Seente perekondadest oli mõlemast saastunud pinnasest hävinud *Trichoderma* perekond, lisaks oli Ranger-iga saastunud pinnasest hävinud *Mucor* perekond ning Stomp-iga saastunud pinnasest *Cladosporium* perekond. Ka kontrollverioonis oli hävinud üks perekond – *Alternaria*.

5 Arutelu

Katse tulemused näitasid, et tervendusmeetod toimus. Samas on valitud kaks kuud liiga lühike periood biostimulatsiooni teel pestitsiidijääkide täielikuks lagundamiseks. Kahe kuu jooksul lagundasid mikroorganismid saasteainest ära herbitsiidi Stomp puhul 7,6% ning herbitsiidi Ranger puhul vaid 2,8%.

Katseperioodi jooksul vähenes mikroorganismide liigirikkus. Vähenemist põhjustas pestitsiididega saastumisest tingitud ebasoodsad elutingimused. Vähem vastupidavamad mikroobid ei suutnud uute tingimustega kohaneda ja surid välja. [51] Bakteriperekondadest ei kohanenud uute tingimustega *Alcaligenes*-e perekond, Rangeriga saastunud pinnases ei suutnud ellu jääda ka hea saasteainete lagundaja *Rhodococcus*-e perekond. Seente perekondadest ei suutnud saastunud pinnases hakkama saada *Trichoderma* perekond. Lisaks oli Ranger-iga saastunud pinnasest hävinud *Mucor* perekond ning Stomp-iga saastunud pinnasest *Cladosporium* perekond. Alles jäänud mikroorganismid on keskkonnatingimustele vastupidavamad ning suudavad ellu jääda ja paljuneda. Neid perekondi soosis kindlasti see, et nad on tugevad saasteaine lagundajad. [52] Ka kontroll-katsekehas vähenes mikroorganismide liigikus. Katseperioodi lõpuks oli hävinud bakteriperekondadest *Alcaligenes*-e ja *Actinomyces*-e perekonnad ning seente perekondadest *Alternaria* perekond. Seda võis põhjustada nii seente- kui bakteriperekondade hulgas esinenud antibiootikume tootvad perekonnad. Kuna antibiootikumidel on bakteritele negatiivne mõju – surmav või kasvu pärssiv, võis see olla üheks põhjuseks, miks ka kontrollversioonides liigikus vähenes. [53] Katse tulemusena selgus, et saastumata pinnases oli mikroobikooslus liigirikkam kui saastatud pinnases.

Mikroorganismide arvukus tõusis võrreldes katse alguses oleva arvukusega. Katse alguses oli mikroorganismide arvukus võrdlemisi madal. Seda põhjustas stress, mis oli tingitud uutest keskkonnatingimustest. Seetõttu on igati loogiline, et aja möödudes, kui mikroobid kohanesid uute tingimustega, hakkas arvukus tõusma. Arvukuse kasv ei olnud aga pidev ning pärast mõningast tõusu toimus arvukuse langus. Kui pestitsiidide kahjulik toime hakkas mõjuma, tekitas see mikroorganismides taas stressi ning liigid, kes ei suutnud uute tingimustega kohaneda, hukkusid. Seetõttu vähenes ka

mikroorganismide arvukus pärast esialgset tõusu. Samuti võib hilisemaks arvukuse languse põhjuseks olla toiteainete kättesaadavuse vähenemine. Mikroorganismid kasutavad toitaineteks ka saasteaineid. Esialgu oli toiteaineid palju ning nende kättesaadavus oli hea. Mistõttu oli mikroorganismidel piisavalt toitaineid ning nende arvukus kasvas. Pärast kergemini kättesaadavate saasteainete lagundamist jäi mikroorganismidele alles raskemini biokättesaadavad saasteained, mistõttu ei olnud mikroorganismidel ka enam piisavalt palju toitaineid ning arvukus langes. Samuti võis keerukamate saasteainete lagundamisel tekkida toksilised vaheühendid, mis avaldasid negatiivselt mõju mikroorganismide arvukusele. [51]

Bakterite ja seente arvukuse kasv ei toimunud mõlema mikroorganismi puhul võrdselt. Katsekehad, kus hakkasid domineerima bakterid, jäi seente arvukus madalamaks. Katseperioodi jooksul tõusis küll ka seente arvukus, kuid arvukuse kasv jäi siiski madalaks. Teisel juhul, kui domineeris seente arvukuse kasv, jäi väiksemaks bakterite kasv. Herbitsiidiga Stomp saastatud katsekehas ja kontroll-katsekehas domineeris bakterite kasv, Rangeriga saastatud katsekehas domineeris seente arvukuse kasv. Seda selgitab see, et pestitsiidide toimeained on erinevad ning ühel juhul on see pärisiv pigem seentele, teisel juhul pigem bakteritele.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida, millisel määral väheneb pestitsiidide kontsentratsioon mullas biostimulatsiooni meetodit kasutades. Samuti selgitada välja, kas saastunud pinnases on muutusi mikroobikoosluses võrreldes saastumata pinnasega ning identifitseerida peamised biostimulatsiooni läbi viivad mikroorganismid.

Püstitati järgmised hüpoteesid:

- Biostimulatsioon võiks olla sobiv meetod põllumuldade tervendamiseks.
- Pestitsiididega saastunud muldades on väiksem mikroorganismide liigikus.
- Pestitsiididega saastumise korral väheneb muldades mikroorganismide arvukus (stressist tingituna).

Uuringu jaoks tehti katsed, mis viidi läbi Tallinna Tehnikaülikooli Tartu Kolledži mullabioloogia laboris. Analüüsimiseks vajalik muld võeti Kolledži territooriumilt ning saastati kahe erineva herbitsiidiga – Stomp 330 EC ning Ranger XL. Stomp-i puhul on herbitsiidi toimeaineks pendimetaliin ning Rangeri puhul glüfosaat. Esialgne saastamine tehti vastavalt herbitsiidi ohutuskaardil olevatele kogustele kasutades ristikupõllu soovituslike koguseid. Mikroorganismide stimuleerimiseks lisati katsekehadele KNO_3 väetiselahus. Katse kestis kokku kaks kuud ning kogu selle aja vältel hoiti katsekehasid kliimakambis 20°C juures.

Mikroorganismide KMÜ-d loeti katseperioodi jooksul kolm korda – katse alguses, keskel ja lõpus. Lagunemisprotsessis osalevad mikroorganismid identifitseeriti kaks korda – katse alguses ja lõpus. Katse lõpus võeti saastunud pinnastest proov, et hinnata saasteaine kontsentratsiooni vähenemist.

Katsete tulemustest selgus, et mikroorganismide arvukus tõusis võrreldes katse algusega, kuid arvukuse tõus ei olnud püsiv ning hakkas pärast mõningast tõusu taas langema. Katse alguses oli mikroorganismide arvukus madal. Mikroorganismidel oli stress keskkonnatingimuste järsu muutuse tõttu. Uute tingimustega harjudes tõusis nende arvukus, kuid kui mõjuma hakkas pestitsiidi kahjulik mõju, läksid mikroorganismid taas stressi ning nende arvukus hakkas uuesti langema. Mikroorganismide identifitseerimine katse alguses ning katse lõpus näitas, et ka nende

liigikus vähenes. Tuvastatud mikroorganismid sarnanesid kirjanduses välja toodud bioremedatiooni läbi viivate mikroobidega [7] [20] [21] [22]. Herbitsiididega saastatud pinnasest tuvastati katse alguses bakteriperekonnad *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Azotobacter* ja *Alcaligenes*, katseperioodi lõpuks olid neist alles *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Azotobacter*. Seeneperekondade osas oli väikene erinevus. Herbitsiidiga Stomp saastatud pinnasest tuvastati esialgu seeneperekonnad *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* ja *Mucor*, kellest katseperioodi lõpuks olid alles *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*. Herbitsiidiga Ranger saastatud pinnasest tuvastati seeneperekonnad *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, katse lõpuks olid alles *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Samuti toimus liigikuse vähenemine kontroll-katsekehas, mida võis põhjustada antibiootikume tootvate aktinomütsetide esinemine.

Saasteaine kontsentratsiooni lagunemine toimus, kuid aeglaselt. Kahekuulise perioodi jooksul vähenes Stomp-ga saastatud pinnases saasteaine kontsentratsioon 7,6% ning Ranger-iga saastatud pinnases 2,8%. Saadud tulemused näitavad, et biostimulatsioon on sobilik meetod pestitsiidijääkide lagundamiseks, kuid protsess on pikaajaline.

Uurimuse tulemusena selgus, et püstitatud hüpoteesidest vastab tõeale esimene, et bioremedatsioon sobib pestitsiidijääkide lagundamiseks, kuigi meetod on aeglane. Samuti on tõene teine hüpotees, et pestitsiididega saastunud pinnases on mikroorganismide liigikus madalam kui saastamata pinnases. Püstitatud kolmas hüpotees, et pestitsiididega saastumise korral väheneb stressist tingituna muldades mikroorganismide arvukus ei pidanud 100%-liselt paika. Mikroorganismide arvukus tõusis võrreldes katse algusega. Samas oli näha, et tõus ei olnud pidev ning pärast mõningast tõusu toimus taas arvukuse langus ning võib oletada, et langus jätkub veel mõnda aega.

Summary

The aim of the current Master thesis is to assess the degradation rate of two pesticides in soil when using the biostimulation method. Furthermore, the goal was to find out whether in contaminated soil the microbial community changes compared to uncontaminated soil. Also to identify the main microorganisms in the biostimulation processes.

The following hypotheses were proposed:

- Biostimulation could be a useful method for bioremediation of field soil.
- Soils contaminated with pesticides contain fewer classes of microorganisms.
- Pesticide contamination decreases the number of microorganisms in soil.

Tests were carried out in the Tallinn University of Technology Tartu College's laboratory of soil biology. The soil was obtained from the territory of the College and it was contaminated using two different herbicides – Stomp 330 EC and Ranger XL. In Stomp the active ingredient of the herbicide is pendimethalin, in Ranger glyphosate. Initial contaminations were in accordance with the amounts listed on the safety card of the herbicide. The recommended amounts for clover fields were used. In order to stimulate microorganisms KNO₃ fertilizer solution was added to the test soils. The test lasted for 2 months total and the soils were kept in the climate chamber at 20°C.

The microorganism CFU-s were counted three times during the test – at the beginning, in the middle and at the end of the test. The microorganisms participating in the decomposing process were identified twice – at the beginning and at the end of the test. At the end of the test a sample was collected from the contaminated soil in order to assess the degradation of the contaminating agent.

It became evident from the test results that the number of microorganisms increased when compared to the number at the beginning of the test, however, the increase was not steady and after some increase it began decreasing again. At the beginning of the test the microorganism count was low. Microorganisms suffered stress caused by sudden changes of environmental conditions. When adjusting to new conditions the

number increased, however, when the harmful effects of pesticides started to influence them, they suffered stress again and their number started to decrease yet again. Identifying microorganisms at the beginning and at the end of the test proved that their variety also diminished. Identified microorganisms resembled those depicted in literature - microbes conducting bioremediation [7] [20] [21] [22]. From the soil contaminated by herbicides at the beginning of the test the following bacterial classes were identified: *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Azotobacter* and *Alcaligenes*, by the end of the test *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Azotobacter* classes remained. There were slight differences in fungal classes. In the soil contaminated with herbicide initially the fungal classes *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Mucor* were identified out of which by the end of the test period *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* classes remained. In the soil contaminated by herbicide Ranger *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor* classes were identified, by the end of the test period *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* families remained. The number of species diminished also in the control test body, which could have been caused by the presence of actinomycetes producing antibiotics.

The contaminating agent was decomposing, however, it was happening slowly. In the two-month-period the concentration of contaminating agent in the Stomp contaminated soil diminished by 7,6% and in the soil contaminated by Ranger by 2,8%. The results prove that biostimulation is a suitable method to decompose pesticide residue, the process is longlasting, however.

As a result of the research it became evident that out of the hypotheses posed the one claiming that bioremediation is suitable for decomposing pesticide residue was true, yet the method is time consuming. It is also true that there are fewer microorganisms in the soil contaminated with pesticides when compared to uncontaminated soil. The posed hypothesis that in case of pesticide contamination the stress related diminishing of the number of micro organisms occurs did not turn out to be completely true. The number of microorganisms increased when compared to the beginning of the test. At the same time it was evident that the increase was not steady and after some increase the numbers decreased again and it can be assumed that the decrease continues.

Tänuavaldused

Töö autor tänab oma juhendajat, Sander Kutti-t, abivalmiduse ja hea juhendamise eest.
Samuti tänab autor Maia Boltovsky-t, kes abistas inglise keelse kokkuvõtte tõlkimisega.

Kasutatud allikad

- [1] Statistikaamet, „Turustatud taimekaitsevahendid toimeaine järgi,“ [Võrgumaterjal]. Available: <http://pub.stat.ee/px-web.2001/dialog/Saveshow.asp>. [Kasutatud 1 mai 2017].
- [2] Sotsiaalministeerium, „Kemikaalimaailm,“ Terviseamet, [Võrgumaterjal]. Available: <http://kemikaalimaailm.sm.ee/kemikaalid/pestitsiidid.html>. [Kasutatud 30 aprill 2017].
- [3] M. Vidali, „Bioremediation. An overview*,“ *Pure and Applied Chemistry*, kd. 73, nr 7, pp. 1163-1172, 2001.
- [4] E. M. Goltapeh, Y. R. Danesh ja A. Varma, *Fungi as Bioremediators*, Springer, 2013.
- [5] A. Roose, E. Otsa ja O. Roots, *Ohtlikud ained Eesti keskkonnas*, Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus, 2003.
- [6] M. Kriipsalu, A. Maastik ja J. Truu, *Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamine*, Tallinn: Tallinna Tehnikaülikooli Kirjastus, 2016.
- [7] R. Stegmann, G. Brunner, W. Calmano ja G. Matz, *Treatment of Contaminated Soil*, Berliin: Springer, 2001.
- [8] R. Boopathy, „Factors limiting bioremediation technologies,“ *Bioresource Technology*, pp. 63-67, 2000.
- [9] F. M. Bento, F. A. O. Camargo, B. C. Okeke ja W. T. Frankenberger, „Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil,“ *Bioresource Technology*, p. 1049–1055, 2005.
- [10] F. I. Khan, T. Husain ja R. Hejazi, „An overview and analysis of site remediation technologies,“ *Journal of Environmental Management*, kd. 71, p. 95–122, 2004.
- [11] J. A. Veen, L. S. Overbeek ja J. D. Elsas, „Fate and Activity of Microorganisms Introduced into Soil,“ *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, kd. 61, nr 2, pp. 121-135, 1997.
- [12] Y. Xu ja M. Lu, „Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different,“ *Journal of Hazardous Materials*, kd. 183, pp. 395-401, 2010.
- [13] T. Luhse, *Diiselmootusega saastunud pinnase bioremediatsioonil osalevad peamised mikroorganismid*, Tartu, 2016.
- [14] B. E. Rittmann, „Definition, objectives, and evaluation of natural attenuation,“ *Biodegradation*, kd. 15, pp. 349-357, 2004.
- [15] B. R. Glick, „Phytoremediation: synergistic use of plants and,“ *Biotechnology Advances*, kd. 21, p. 383 – 393, 2003.
- [16] T. Iwamoto ja M. Nasu, „Current Bioremediation Practice and Perspective,“ *Journal of Bioscience and Bioengineering*, kd. 92, nr 1, pp. 1-8, 2001.
- [17] G. O. Adams, P. T. Fufeyin, S. E. Okore ja I. Ehinomen, „Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review,“ *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, kd. 3, nr 1, pp. 28-39, 2015.
- [18] U. E. Omosiwoho, „Comparative analysis of composting and landfarming as

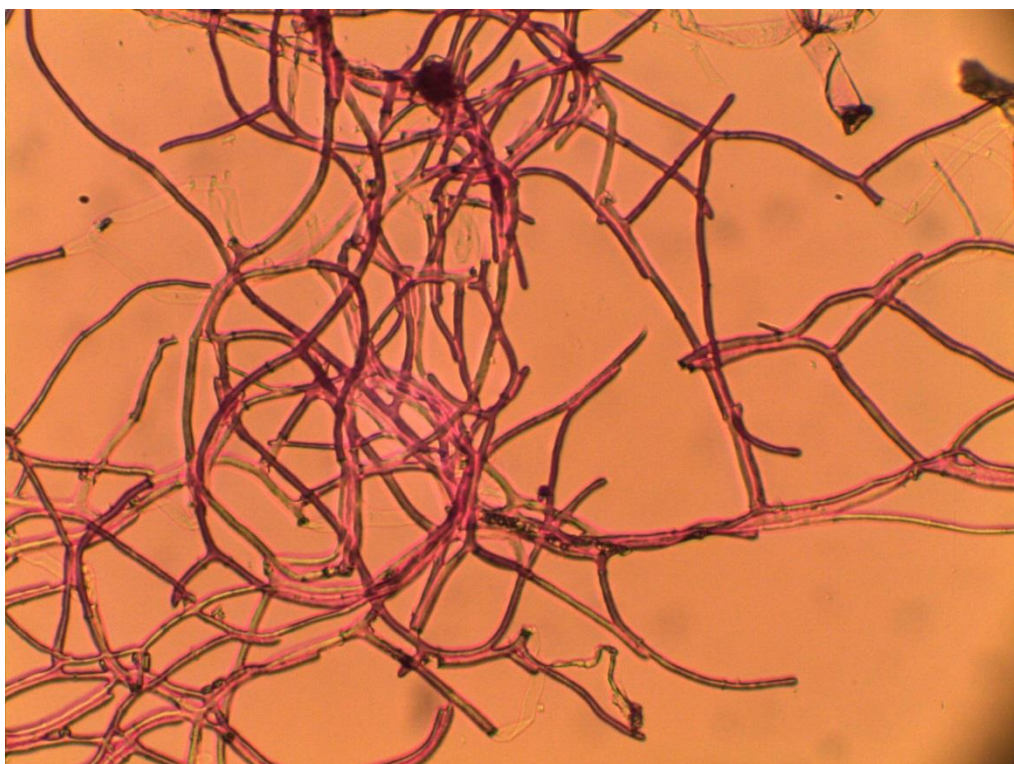
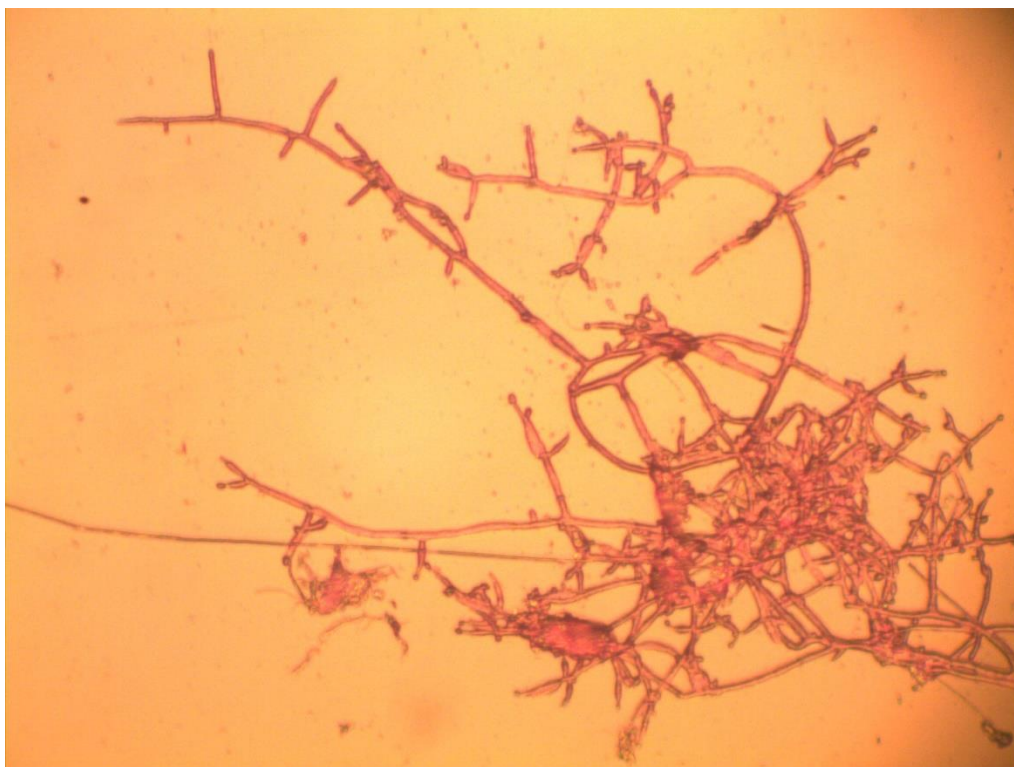
- bioremediation techniques in hydrocarbon degradation," *International Journal of Science, Environment and Technology*, kd. 3, nr 6, pp. 1977-1995, 2014.
- [19] „Keskkonna biotehnoloogia loengud 10-11,“ %1 *Vee- ja mullamikrobioloogia loengud*, 2005.
- [20] S. Kauppo, *Bioremediation of diesel oil contaminated soil and water*, Lahti: University press Helsinki, 2011.
- [21] S. Sihag, H. Pathak ja D. Jaroli, „Factors Affecting the Rate of Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons,“ *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, kd. 2, nr 3, pp. 185-202, 2014.
- [22] A. Alvarez, J. M. Saez, J. S. D. Costa, V. L. Colin, M. S. Fuentes, S. A. Cuozzo, C. S. Benimeli, M. A. Polti ja M. J. Amoroso, „Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals,“ *Chemosphere*, kd. 166, pp. 41-62, 2017.
- [23] G. M. Evans ja J. C. Furlong, *Environmental Biotechnology. Theory and Application*, England: John Wiley & Sons Ltd, 2003.
- [24] J. G. Leahy ja R. R. Colwell, „Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment,“ *Microbiological Reviews*, kd. 54, nr 3, pp. 305-315, 1990.
- [25] M. Naseri, A. Barabadi ja J. Barabady, „Bioremediation treatment of hydrocarbon-contaminated Arctic,“ *Environmental Science and Pollution Research*, kd. 21, nr 19, pp. 11250-11265, 2014.
- [26] S. Maletić, B. Dalmacija ja S. Rončević, „Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – Implications for Bioremediation,“ %1 *Hydrocarbon*, InTech, 2013.
- [27] M. Fulekar, *Bioremediation technology*, Springer, 2010.
- [28] S. Ray, „Bioremediation of Pesticides: A Case Study,“ %1 *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, London, Elsevier, 2014, pp. 511-518.
- [29] J. T. Zacharia, „Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides,“ %1 *Pesticides in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis*, InTech, 2011, pp. 1-18.
- [30] L. Kong, S. Zhu, L. Zhu, H. Xie, K. Su, T. Yan, J. Wang, J. Wang, F. Wang ja F. Sun, „Biodegradation of organochlorine pesticide endosulfan by bacterial strain *Alcaligenes faecalis* JBW4,“ *Journal of Environmental Sciences*, kd. 25, nr 11, pp. 2257-2264, 2013.
- [31] P. Xiao, T. Mori, I. Kamei, H. Kiyota, K. Takagi ja R. Kondo, „Novel metabolic pathways of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus *Phlebia*,“ *Chemosphere*, kd. 85, pp. 218-224, 2011.
- [32] R. Heul, *Environmental Degradation of petroleum hydrocarbons*, Utrecht University, 2009.
- [33] M. S. Holtze, S. R. Sørensen, J. Sørensen ja J. Aamand, „Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments - Insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms,“ *Environmental Pollution*, kd. 154, pp. 155-168, 2008.
- [34] K. Sepp, *The methodology and applications of agricultural landscape monitoring*

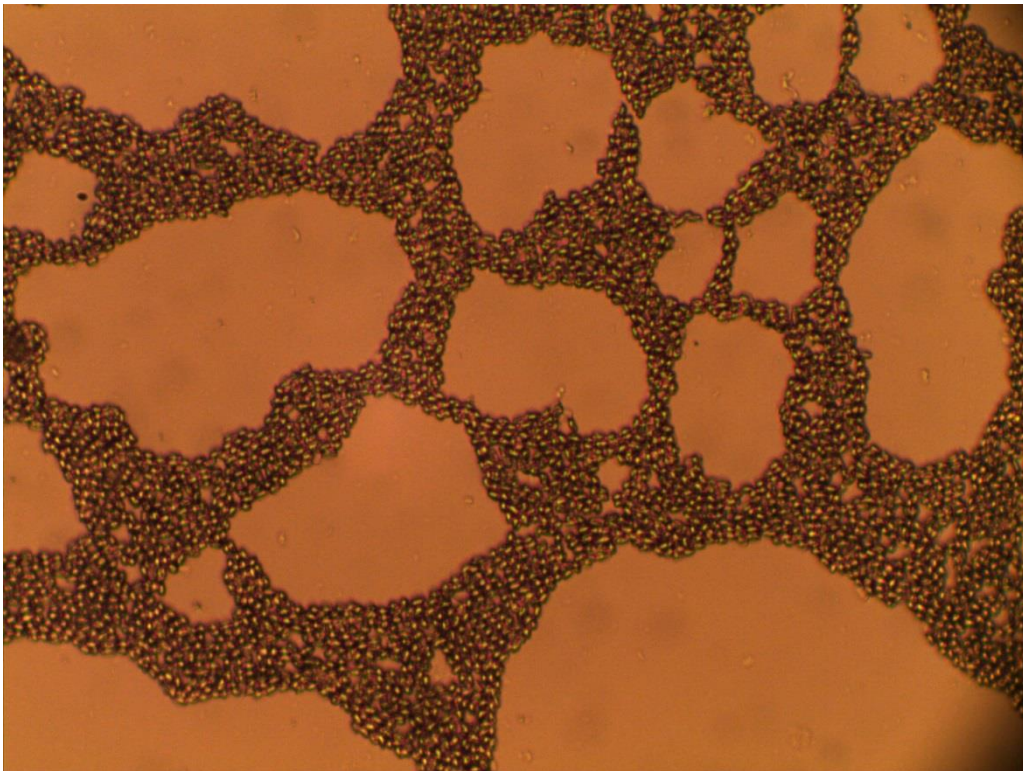
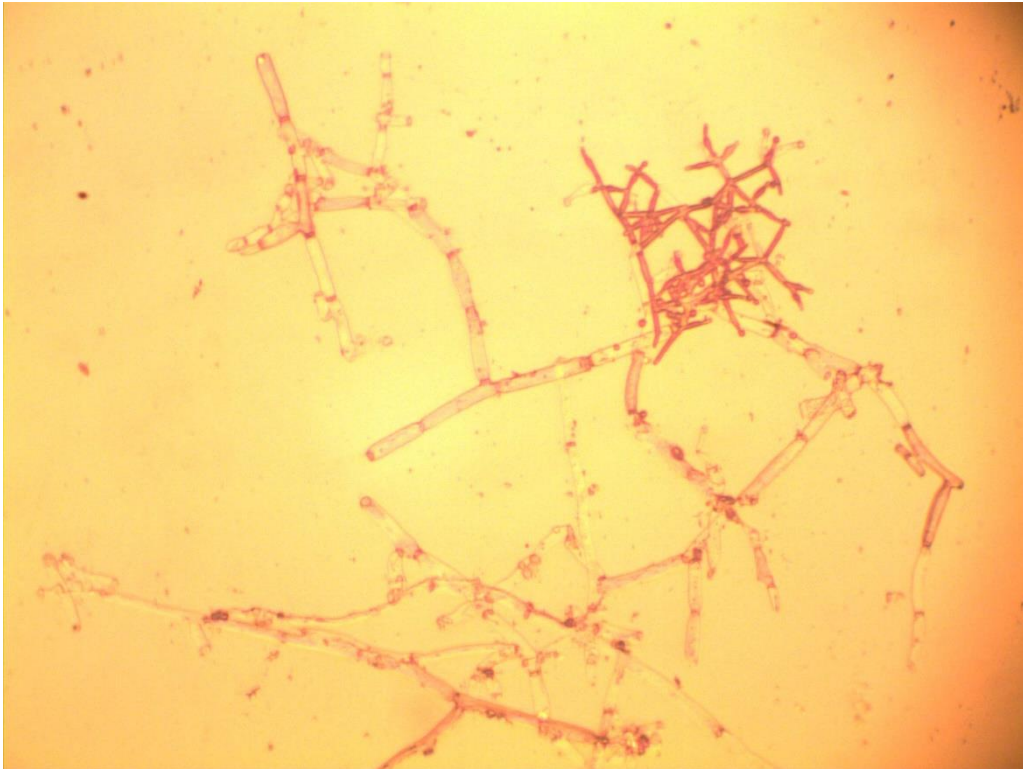
- in Estonia, Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus, 1999.
- [35] L. Rooma, P. Penu, M. Metsur ja T. Valdmaa, Hea Põllumajandustava, Tallinn: Põllumajandusministeerium, 2007.
- [36] F. Geiger, J. Benstsson, F. Berendse, W. W. Weisser, M. Emmerson, M. B. Morales, P. Cerynger, J. T. T. Liira, C. Winqvist, S. Eggers, R. Bommarco, T. Pärt, V. Bretagnolle ja ..., „Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological,“ *Basic and Applied Ecology*, kd. 11, pp. 97-105, 2010.
- [37] H. A. Velner, Keskkond ja tehnika, Võru: Eesti Loodusfoto, 1998.
- [38] Kislenko, Kitty, Lühike juhendmaterjal põllumeestele - Ohtlikud ained taimekaitsevahenites, Tallinn: MTÜ Balti keskkonnafoorum, 2007.
- [39] BASF A/S, „Stomp □ CS,“ [Võrgumaterjal]. Available: <https://scandagra.ee/tooted/stomp-cs/>. [Kasutatud 30 aprill 2017].
- [40] National Pesticide Information Center, „Glyphosate,“ [Võrgumaterjal]. Available: <http://npic.orst.edu/ingred/glyphosate.html>. [Kasutatud 12 mai 2017].
- [41] Monsanto Europe S.A, „RANGER XL,“ [Võrgumaterjal]. Available: <https://scandagra.ee/tooted/ranger-xl/>. [Kasutatud 30 aprill 2017].
- [42] W. Aktar, D. Sengupta ja A. Chowdhury, „Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards,“ *Interdisciplinary Toxicology*, kd. 2, pp. 1-12, 2009.
- [43] L. Maasik, „Taimekaitsevahendite puudused,“ Lääne-Viru Rakenduskõrgkool, [Võrgumaterjal]. Available: http://www.lvrkk.ee/kristiina/Liina_Maasik/taimekaitse/taimekaitsevahendite_puudused.html. [Kasutatud 6 mai 2017].
- [44] E. Morillo ja J. Villaverde, „Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils,“ *Science of the Total Environmen*, kd. 586, pp. 576-597, 2017.
- [45] X. Zhou, X. Shi, L. Zhang ja Y. Zhou, „Effects of Pesticide-Contamination on Population and Activity of Bacteria in Purple Paddy Soil,“ *Energy Procedia*, kd. 16, pp. 284-289, 2012.
- [46] C. Brittain, M. Vighi, R. Bommarco, J. Settele ja S. Potts, „Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales,“ *Basic and Applied Ecology*, kd. 11, pp. 106-115, 2010.
- [47] I. Mahamood, S. R. Imandi, K. Shazadi, A. Gul ja K. R. Hakeem, „Effects of Pesticides on Environment,“ %1 *Plant, Soil and Microbes*, Springer International Publishing, 2016, pp. 253-269.
- [48] M. Ivask, *Mullaelustiku tähtsus ja seda mõjutavad tegurid nii tava- kui mahetootmises*, Tartu, 2016.
- [49] V. Ahluwalia ja S. Malhotra, Environmental Science, CRC Press, 2008.
- [50] M. Vaher, *Herbitsiidide ja nende dooside mõju umbrohtumusele ja odra saagile*, Tartu, 2014.
- [51] „Molekulaarne mikrobioloogia - loengumaterjal,“ [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.tymri.ut.ee/sites/default/files/tymri/molmikro-loengumaterjalid.doc>. [Kasutatud 22 Mai 2017].
- [52] M. J. Leboffe ja B. E. Pierce, A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory, Douglas N. Morton, 2011.

- [53] L. Allikmets, „Antibiootikumid“.
- [54] L. S. Sterling, The Art of Agent-Oriented Modeling, London: The MIT Press, 2009.

Lisa 1

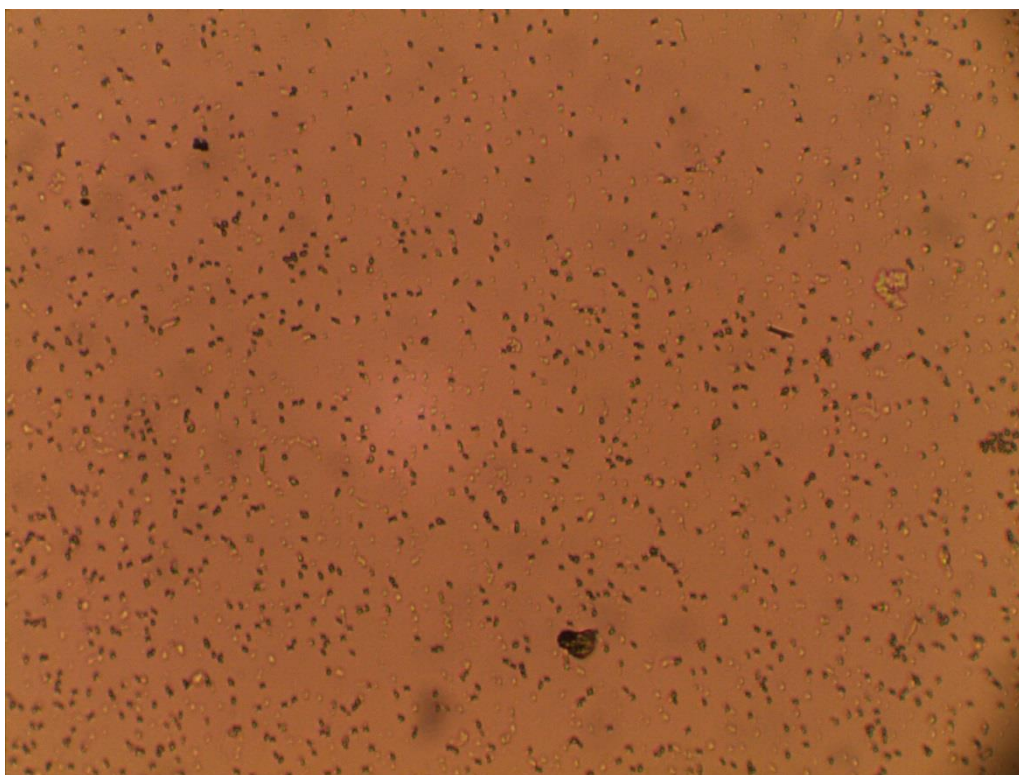
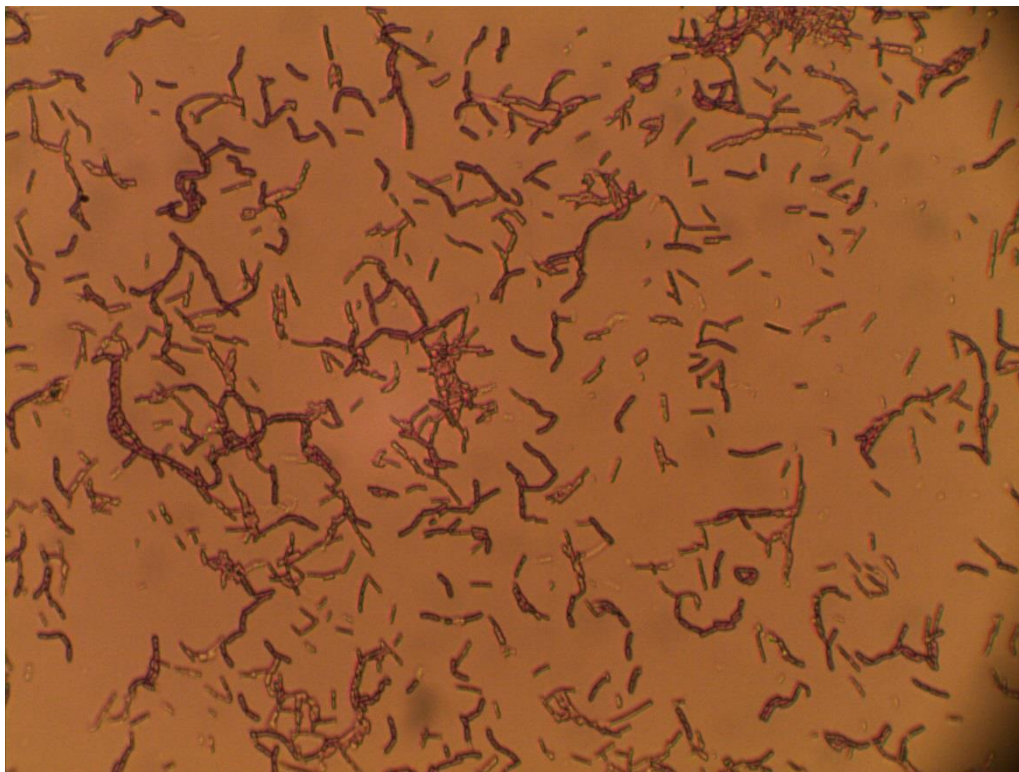
Mikroskoobiga üles pildistatud seened

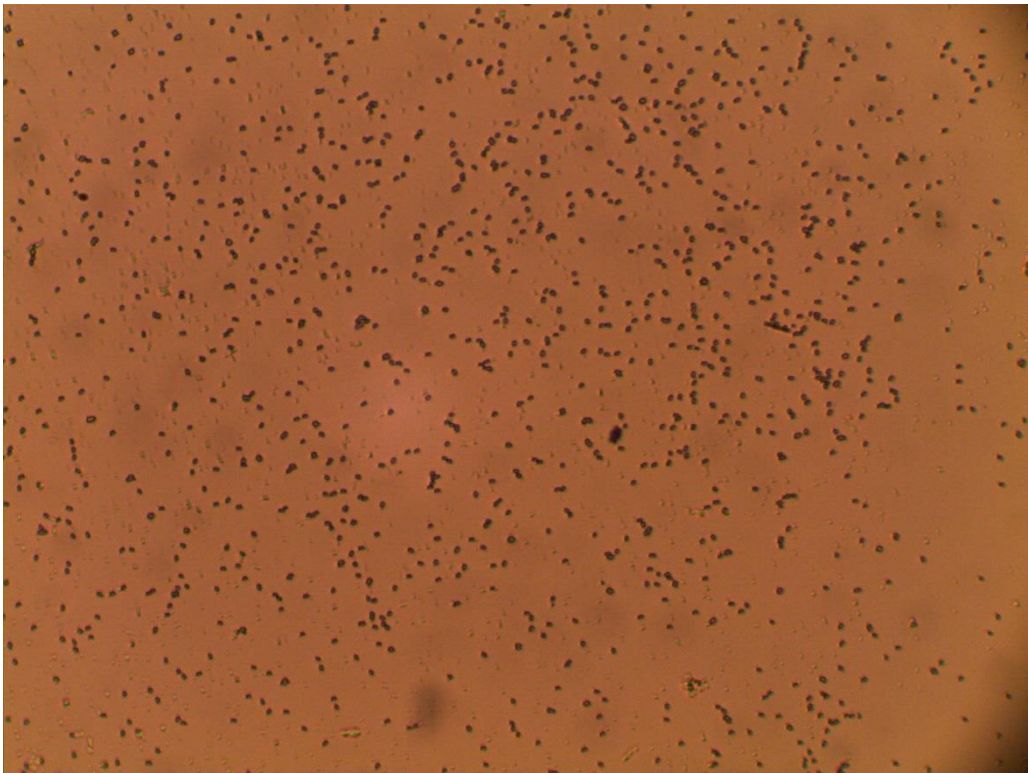
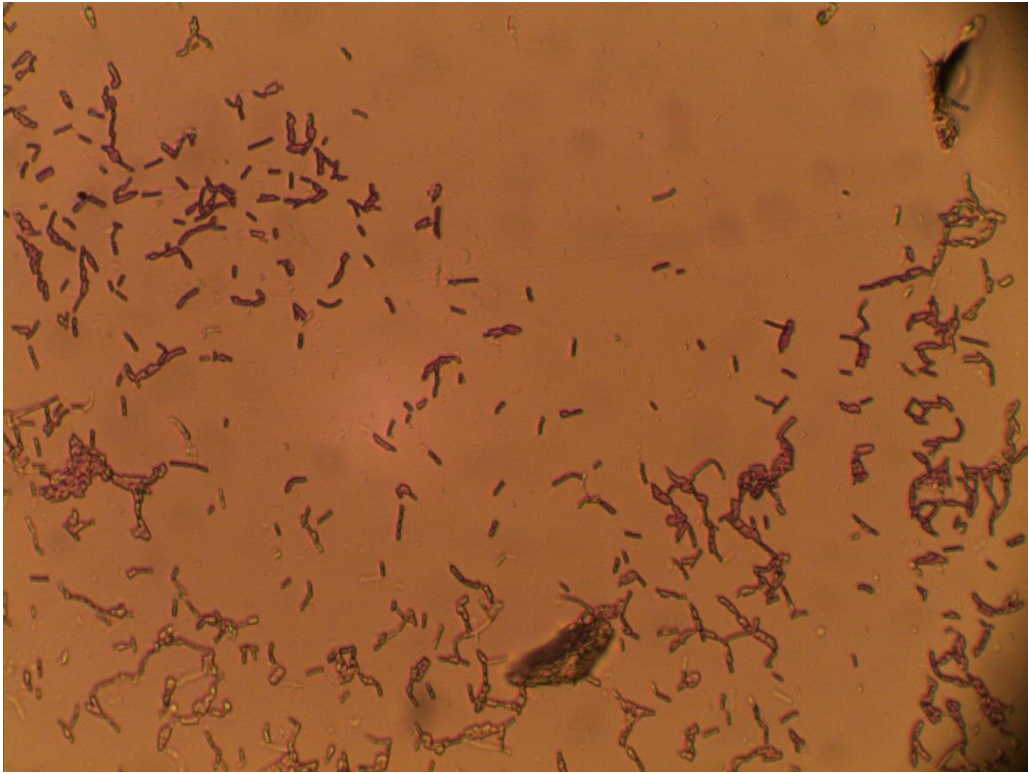




Lisa 2

Mikroskoobiga üles pildistatud bakterid





Lisa 3

KMÜ-de määramine

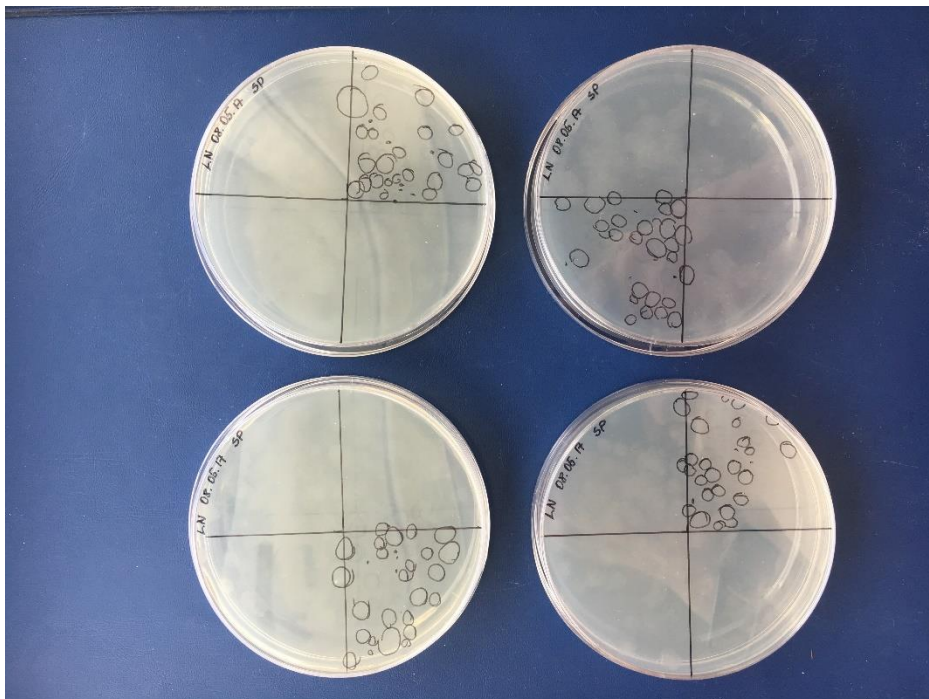


Foto 1. Seene KMÜ-de loendus 24 tundi pärast külvamist

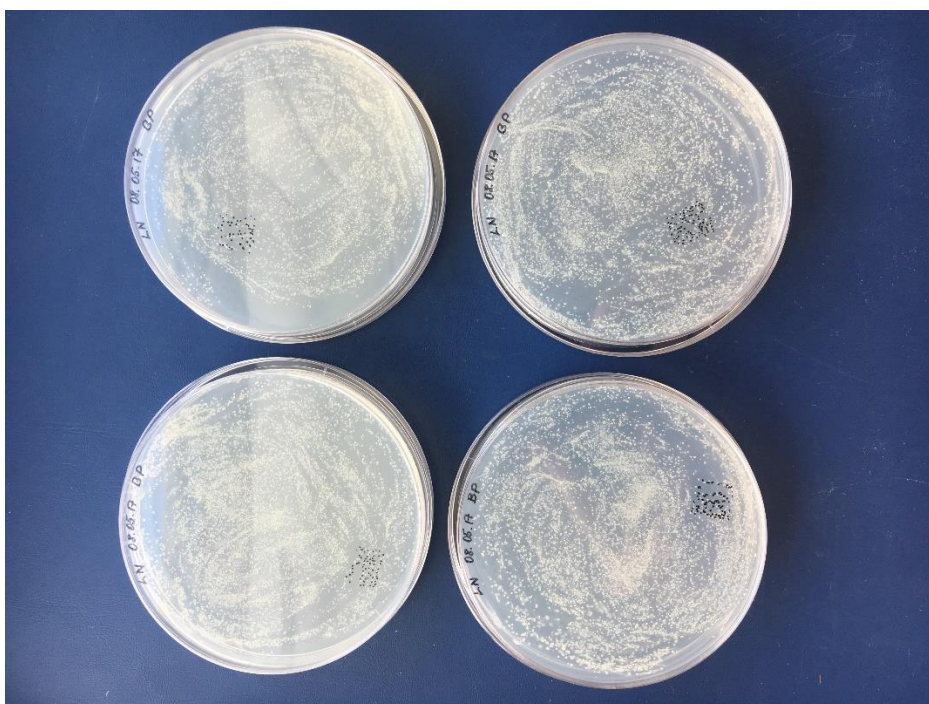


Foto 2. Bakterite KMÜ-de loendus 24 tundi pärast külvamist

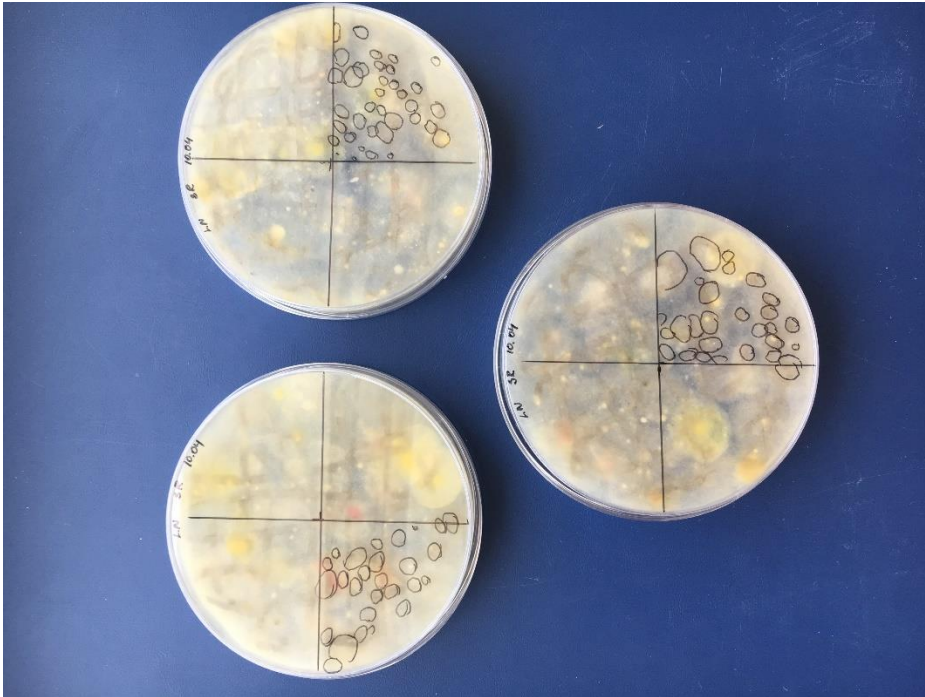


Foto 3. Seente KMÜ-d pärast 1 kuud seismist (külmikus).

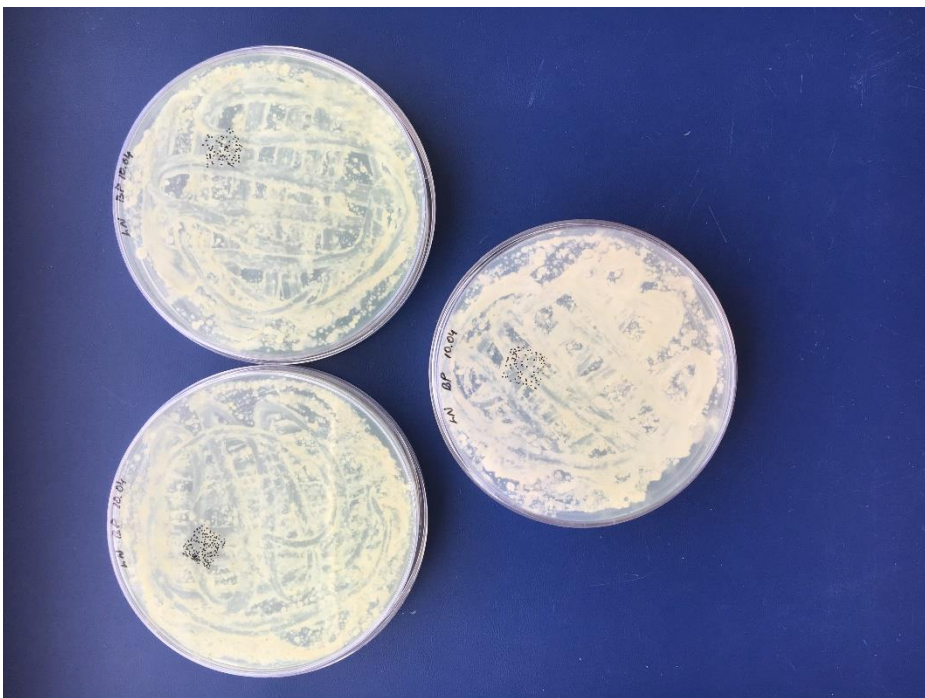


Foto 4. Bakterite KMÜ-d pärast 1 kuud seismist (külmikus)