



TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL

INSENERITEADUSKOND

Tartu Kolledž

**NAFTASAADUSTEGA SAASTUNUD PINNASE
PUHASTAMINE FÜTOREMEDIATSIONIGA
AS EPLER & LORENZ NÄITEL**

**PHYTOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED SOIL AS
BASED ON THE EXAMPLE OF AS EPLER & LORENZ**

MAGISTRITÖÖ

Üliõpilane: Katrina Kaasik

Üliõpilaskood: 192269NAEM

Juhendajad: Annely Kuu, dotsent

Jane Raamets, lektor

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.

"24" mai 2021

Autor: Katrina Kaasik

allkirjastatud digitaalselt

Töö vastab magistritööle esitatud nõuetele

"24" mai 2021

Juhendaja: Annely Kuu

Jane Raamets

allkirjastatud digitaalselt

allkirjastatud digitaalselt

Kaitsmisele lubatud

".....".....2021.

Kaitsmiskomisjoni esimees Annely Kuu

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina, Katrina Kaasik (sünnikuupäev: 30.01.1997)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Naftasaadustega saastunud pinnase puhastamine fütoremediatsiooniga AS Epler & Lorenz näitel,

mille juhendajad on Annely Kuu ja Jane Raamets,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

¹*Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil.*

_____ (allkiri)

_____ (kuupäev)

Tartu Kolledž

LÕPUTÖÖ ÜLESANNE

Üliõpilane: Katrina Kaasik, 192269NAEM
Õppekava, peeriala: NAEM06/18 - Tööstusökoloogia
Juhendaja(d): programmijuht, dotsent Annely Kuu, 6 204 809;
lektor Jane Raamets, +372 55 61 33 44

Lõputöö teema:

Naftasaadustega saastunud pinnase puhastamine fütoremediatsiooniga AS Epler & Lorenz näitel

Phytoremediation of oil contaminated soil based on the example of AS Epler & Lorenz

Lõputöö põhieesmärk:

Välja selgitada, kui efektiivselt toimib fütoremediatsiooni meetod naftasaaduste puhastamisel pinnasest.

Lõputöö etapid ja ajakava:

Nr	Ülesande kirjeldus	Tähtaeg
1.	Katse sooritamine ja kirjanduse ülevaate kogumine.	31.01.2021
2.	Tulemuste analüüs ja arutelu.	30.04.2021
3.	Magistritöö esitamine.	24.05.2021

Töö keel: eesti keel

Lõputöö esitamise tähtaeg: "24" mai 2021.a

Üliõpilane: Katrina Kaasik *allkirjastatud digitaalselt "24" mai 2021.a*

Juhendaja: Annely Kuu *allkirjastatud digitaalselt "24" mai 2021.a*

Juhendaja: Jane Raamets *allkirjastatud digitaalselt "24" mai 2021.a*

Programmijuht: Annely Kuu *allkirjastatud digitaalselt "24" mai 2021.a*

SISUKORD

SISSEJUHATUS	7
1. NAFTASAADUSTE MÕJU MULLASTIKULE.....	9
1.1 Seadusandlus.....	9
1.2 Naftasaadused	10
1.3 Naftasaaduste mõju keskkonnale.....	12
2. BIOREMEDIATSIOON.....	17
2.1 Bioremediatsiooni meetodid	20
2.2 Fütoremediatsioon	25
2.2.1 Fütoremediatsioonil kasutatavad taimeliigid.....	30
3. METOODIKA.....	32
3.1 Seemnete idanemiskatsed	32
3.2 Välikatse	33
3.2.1 Mulla keemiline ja mikrobioloogiline analüüs	33
3.2.2 Fütoremediatsioon.....	33
4. TULEMUSED	36
4.1 Seemnete idanemiskatsed	36
4.2 Välikatse	36
4.2.1 Mulla keemiline ja mikrobioloogiline analüüs.....	37
4.2.2 Fütoremediatsioon.....	41
5. ARUTELU	43
5.1 Seemnete idanemine.....	43
5.2 Välikatse	44
5.2.1 Mulla keemiline ja mikrobioloogiline analüüs.....	44
5.2.2 Fütoremediatsioon.....	46
5.3 Soovitused edukaks fütoremediatsiooniks	47
KOKKUVÕTE	50
SUMMARY.....	52
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	54
LISAD	62

EESSÕNA

Käesoleva magistritööteema sõnastati lõputöö autori ja lõputöö juhendajate koostöona. Lõputöö katsed viidi läbi AS Epler & Lorenz (Tartu, Eesti) territooriumil. Tööks vajalikud analüüsid tehti AS Epler & Lorenz laboris, Tallinna Tehnikaülikooli Tartu kolledži tööstusökoloogia laboris ning Eesti Maaülikooli Taimebiokeemia laboris. Lõputöö koostamisel olid abiks juhendajad Annely Kuu ja Jane Raamets.

Üha enam ettevõtteid, kes tegelevad jäätmekäitlusega, soovivad leida viise keskkonnareostuste lihtsamateks kahjutustamisteks. Selles valdkonnas on hea võimalus kasutada fütoremediatsiooni, mille abil on võimalik saastunud mullast eemaldada naftasaaduseid ja mis on majanduslikult otstarbekas meetod. Autor soovis lõputöö kirjutada just sellel teemal, sest jäätmekäitlus on põnev ja pidevalt arenev valdkond, keskkonnareostuste likvideerimine on jäätmekäitluse üks paljudest harudest.

Käesoleva magistri kraadi lõputöö autor soovib tänada oma juhendajaid, Annely Kuu'd ja Jane Raametsa, kes olid suureks abiks lõputöö koostamisel. Lõputöö autor soovib tänada ka Janis Lorentit, Rein Pärismaad, Helen Sõmerikku ja kõige rohkem Sander Roosalt heade nõuannete ja abi eest.

Märksõnad: fütoremediatsioon, saastunud pinnas, magistritöö.

SISSEJUHATUS

Puhas muld on üks tähtsamaid komponente tagamaks inimestele ja teistele elusolenditele täisväärtuslik elu (Kovaleva jt, 2020). Muld pakub mitmeid ökosüsteemiteenuseid, sealhulgas toitu inimestele ja loomadele, kuid ka vajalikku kasvukohta erinevatele taimedele (*Ibid*). Lisaks on muld ka elupaigaks paljudele mikroorganismidele (*Ibid*). On öeldud, et inimeste heaolu sõltub paljuski mullast (*Ibid*). Mulla ja mullaelustiku kohta on öeldud „maa bioloogiline mootor“, mis tähendab seda, et sellel on inimeste ja eluslooduse jaoks tähtis roll (Breure, 2004).

Nafta on kaasaegses ühiskonnas üks peamisi energiaallikaid (Yanxun jt, 2011). Sotsiaalmajandusliku arengu tõttu on vajadus nafta järele kasvanud hüppeliselt (*Ibid*). Naftareostused on muutunud ülemaailmseks keskkonnaprobleemiks (*Ibid*). Nafta pumpamisel, transportimisel ning tarbimisel võib esineda mitmesuguseid lekkeid kui ka õnnetusi, kus naftat või naftasaadusi lekib vette või pinnasesse (*Ibid*).

Naftat peetakse üheks levinumaks saasteaineks (Salimnezhad jt, 2021). Naftaga reostunud pinnase struktuur võib muutuda ning see omakorda võib endaga kaasa tuua palju probleeme; mitmetes uuringutes on leitud, et naftareostus võib negatiivselt mõjutada mulla geotehnilisi omadusi (*Ibid*). Paljud teadlased on soovitanud pinnase puhastamiseks naftasaadustest bioremediatsiooni meetodeid (Saeed jt, 2021).

Bioremediatsiooni üks meetoditest – fütoremediatsioon – on pinnase puhastamise tehnoloogia, milles kasutatakse rohelist taimi ja nende füüsikalisi, biokeemilisi, bioloogilisi, keemilisi ja mikrobioloogilisi omadusi (Chibueze Azubuiké jt, 2016). Pinnast naftasaadustest puhastades muundavad taimed toksilised süsivesinikud mittetoksilisteks vormideks (Mohsenzadeh jt, 2010).

Viiteid naftareostustele Eestis on mitmeid (Salu jt, 2015). Keskkonnaministeerium on 2014. a tellinud Eesti Keskkonnauuringute Keskus OÜ-lt analüüsi jääkreostusobjektide inventariseerimiseks (*Ibid*). Selle tulemusel oli Eestis uuringu tegemise hetkel 206 jääkreostusobjekti, millest osa on tänaseks juba likvideeritud (*Ibid*).

Näiteks on Eestis olnud suured reostused nii Maadevahe asfaltbetoonitehases kui ka Priimetsa asfaltbetoonitehases (Keskkonnaministeerium, 2019). Keskkonnaministeeriumi kodulehel leiduvas artiklis on öeldud, et asfaltbetoonitehase eksisteerimise esimestel aastatel paiskus kogu tehasest tulenev heide õhku ja langes seejärel maapinnale kahjustades taimkatet (*Ibid*). Lisaks sellele reostusid õlilekete käigus ka pinnas, põhjavesi ja jõgi (*Ibid*).

Töö teema valis autor suure huvi tõttu jäätmekäitlusvaldkonna, täpsemalt saastunud pinnase puhastamise vastu. Ka saastunud pinnas liigitub jäätmeteks. AS Epler & Lorenz oli nõus andma töö autorile vastavad materjalid töö läbiviimiseks – saastunud pinnase ja koha, kus katse läbi viia. Käesolevas magistritöös viidi läbi kaks erinevat katset: seemnete idanemiskatsed ja välikatse. Samuti analüüsiti saastunud pinnast AS-i Epler & Lorenz laboris, Tallinna Tehnikaülikool Tartu kolledži tööstusökoloogia laboris ja Eesti Maaülikooli Taimebiokeemia laboris.

Magistritöö eesmärkideks on:

- uurida, milline on kolme taime (valge ristik (*Trifolium repens*), harilik lutsern (*Medicago sativa*) ja harilik päevalill (*Helianthus annuus*) idanevus naftasaadustega saastunud pinnases ja puhtas pinnases;
- analüüsida, kuidas mõjutavad naftasaadustega saastunud pinnas ja puhas pinnas mikroobikoosluse näitajaid;
- selgitada välja fütoremediatsiooni mõjutavad faktorid.

Eesmärkidest lähtuvalt püstitati ka kaks uurimisküsimust:

1. Millised faktorid võivad mõjutada fütoremediatsiooni?
2. Kuidas muutuvad mikroobikoosluse aktiivsuse näitajad fütoremediatsioonil?

1. NAFTASAADUSTE MÕJU MULLASTIKULE

1.1 Seadusandlus

Tööstusheite seaduse § 5 lõike 1 järgi on saastamine inimtegevuse tagajärg, mille käigus on vette, õhku või pinnasesse otse või kaudselt väljutatud aineid, mis avaldavad mõju keskkonnale ja inimesele (Tööstusheite seadus, 2013). Saastatus on Tööstusheite seaduse § 5 lõike 2 järgi ebasoodne muutus välisõhus, vees või pinnases, mis on põhjustatud saastamisest (*Ibid*).

Euroopa Liidu keskkonnapoliitika kohaselt peab keskkonnasaaste kõrvaldama selle tekkekohas (Kurrer, 2020). Pinnasekahjustuse peab kõrvaldama sellisel viisil, et see ei kujutaks märgatavat ohtu inimese tervisele (direktiiv 2004/35/EÜ). Ohu suurust inimese tervisele tuleb hinnata selliste riskihindamise meetoditega, mis võtavad arvesse saastunud pinnase eripärasid (direktiiv 2004/35/EÜ).

Jäätmeseaduse § 2 lõige 5 sätestab jäätmete liigitamise korra ning jäätmenimistu valdkonna eest vastutava ministri määrusega (Jäätmeseadus, 2004). Keskkonnaministri 14.12.2015 määruses nr 70 „Jäätmete liigitamise kord ja nimistu“ (edaspidi määrus nr 70) sätestatakse jäätmete ohutuks ja ohtlikuks liigitamise tingimused ning jäätmete liigitus (*Ibid*). Määruse nr 70 § 6 lõike 4 kohaselt ei liigitata pinnast ja süvenduspinnast ohtlikeks, kui antud pinnases ei ületa ohtliku aine kontsentratsioon lubatud piirmäära, mis on kirjas Veeseaduse § 265 lõikes 10 (*Ibid*).

Eestis reguleerib naftasaaduste sisalduse lubatud piirmäära Veeseadus (Riigiteataja, 2019). Keskkonnaministri 28.06.2019 määruses nr 26 „Ohtlike ainete sisalduse piirväärtused pinnases“ on öeldud, et Eestis on naftasaaduste piirmääraks elamumaal kehtestatud 500 mg naftasaaduseid 1 kg mulla kohta (*Ibid*). Tööstusmaal on lubatud naftasaaduste sisalduse piiriks 5000 mg/kg (*Ibid*).

Jäätmeseaduse § 73 lõike 5 alusel saab valdkonna eest vastutav minister kehtestada teatud kogusele tavajäätmetest taaskasutamise või kõrvaldamise nõuded, kus vastava käitluse korral ei ole jäätmeloa omamine käitlejale kohustuslik (Jäätmeseadus, 2004). Keskkonnaministri 21.04.2004 määruse nr 21 „Teatud liiki ja teatud koguses tavajäätmete, mille vastava käitlemise korral pole jäätmeloa omamine kohustuslik, taaskasutamise või tekkekohas kõrvaldamise nõuded“ § 4¹ punkti 1 kohaselt on lubatud ohtut pinnast (jäätmekoodid nagu 17 05 04, 17 04 06, 20 02 02, jne) käidelda, kuid tuleb arvestada nõuet, et ohtlike ainete kontsentratsioon pinnases ei ületa Veeseaduse § 83 kehtestatud piirmäärasid (*Ibid*).

Jäätmeseaduse § 15 lõike 8 kohaselt kehtestatakse jäätmete taaskasutamistoimingute nimistu Vabariigi Valitsuse määrusega (Jäätmeseadus, 2004). Vabariigi valitsuse 08.12.2011 määruse nr 148 „Jäätmete taaskasutamise- ja kõrvaldamistoimingute nimistud¹“ § 2 sätestab taaskasutustoimingud, millega on võimalik saastunud pinnast taaskasutada (*Ibid*). Määruse nr 148 § 2 punktis 5 toodud R5o taaskasutustoiming lubab pinnase puhastamist, täpsemalt kirjeldab R5o taaskasutus toiming järgmist: „pinnase puhastamine, mille tulemuseks on pinnase taaskasutamine, sh töötlemine bioloogiliste, termiliste, füüsikalise-keemiliste jm meetoditega“ (*Ibid*).

Jäätmeseaduse § 1 lõike 4¹ kohaselt peab selleks, et jäätmetena arvel olevat pinnast käidelda, füüsilisel või juriidilisel isikul olema keskkonnaluba (Jäätmeseadus, 2004). Vastavalt tegevuse mastaapidele tuleb keskkonna- või kompleksluba taotleja Jäätmeseaduses või Tööstusheite seaduses toodud nõuetele (*Ibid*). Keskkonnaloa väljastab Keskkonnaamet, kes kannab taotluses toodud jäätmeliigid ning taaskasutustoimingukoodid loale (*Ibid*). Ühtlasi vaatab Keskkonnaamet loa menetluse raames läbi taotleja poolt esitatud käitlusprotsessi kirjeldused (*Ibid*).

Seega on seadusandlikul tasemel selgelt reguleeritud saastunud ja saastumata pinnase jäätmetena arvele võtmine, liigitamine, puhastamine ning kasutamine.

1.2 Naftasaadused

Toornaftat ja teisi naftasaaduseid peetakse üheks peamiseks energiaallikaks kogu maailmas (Abbasian jt, 2016). Mida suurem on inimkond ja mida rohkem ning kiiremalt see kasvab, seda enam on vaja toornaftat kaevandada ja kasutada (*Ibid*). Pidevalt kasvav energia tarbimine sunnib naftatootjaid suurendama oma kaevandamise mahtusid (Ojewumi jt, 2018). Sellest tingituna süveneb maailmas nafta reostumise probleem, mis võib tekkida nafta kaevandamisel või transportimisel (*Ibid*). Õnnetuse tagajärjel võivad reostuda nii pinnas kui ka veekogud (*Ibid*).

Juba mitukümmend aastat on inimeste tegevuste tõttu sattunud nii pinnasesse, vette kui ka õhku mitmeid kemikaale, mis on põhjustanud erinevaid keskkonnaprobleeme: reostuda võivad pinnas, õhk ja vesi (Kumar jt, 2018). Naftasaadustega reostunud pinnas on üks suuremaid keskkonnaprobleeme kõikjal maailmas (Min-Zoo jt, 2010).

Naftasaadused koosnevad alkaanidest, tsükloalkanidest, aromaatsetest süsivesinikest, polütsükliilistest aromaatsetest ühenditest (PAH-idest) ja muudest ühenditest (Van der Heul, 2009). Polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud (PAH-id) on keskkonnas kaua püsivad orgaanilised saasteained, mis tekivad orgaaniliste saasteainete mittetäielikul põlemisel (Košnář jt, 2020). Naftasaadusteks on petrooleum, diisel, bensiin, erinevad kütteõlid, kuid naftast on võimalik toota ka plastikut, värve, putukamürke ja sünteetilisi riideid (Robinson, 2012). Toornafta ja naftasaadused võivad olla mürgised erinevatele eukarüootsetele ja prokarüootsetele mullamikroobide rakkudele (Abbasian jt, 2016).

Naftasaadused on reeglina rikkad süsinik- ja vesinikelementide poolest, ent teisi toitaineid naftasaadustes napib või need puuduvad täielikult (Abbasian jt, 2016). Nafta sattumine keskkonda mõjutab negatiivselt põhjavee kvaliteeti, põllumajanduse tootlikkust, ümbritsevat elustikku, mulla viljakust ja kvaliteeti (Ojewumi jt, 2018; Kovaleva jt, 2020). Naftasaadustega reostunud pinnas muudab mulla füüsikalisi ja keemilisi omadusi ning on selle tõttu ohtlik erinevatele ökosüsteemidele, mis on otseselt või kaudselt mullaga seotud (Liang jt, 2016).

Kõik naftasaadustes sisalduvad komponendid ei lagune sama kiirusega (Maletić jt, 2013). Süsivesinike lagundamise kiirus mikroorganismide poolt sõltub süsivesinike struktuurist ja kontsentratsioonist (*Ibid*). Naftasüsivesinikud saab liigitada küllastunud rasvhapeteks, aromaatsed ühenditeks, vaikudeks ja asfalteenideks (*Ibid*). Naftasüsivesinikud lagunevad erinevalt (*Ibid*). Kõige paremini lagunevad keskmise pikkusega n-alkanid (C10-C25), nendest lühemad või pikemad n-alkanid on mürgisemad ja raskemini mikroobide poolt lagundatavad (*Ibid*).

Nafta võib pinnasesse sattuda näiteks selle kaevandamisel, prügilatest, kütusepaakide lekkimisel, teedel sõitvatest masinatest või sõjaväeliste tegevuste kaudu (Chaudhary ja Kim, 2019; Maletić jt, 2013). Kütusepaakides olev diislikütus on erinevate süsivesinike segu, mis tihtipeale võib keskkonda sattuda tanklates lekkivate maa-aluste mahutite kaudu (Zytner jt, 2011). Naftasaadused võivad pinnasesse sattuda ka õnnetuste tõttu (Maletić jt, 2013).

Wang ja teised (2017) on toonud välja, miks naftasaaduste sattumine muldkeskkonda on ohtlik:

- nafta tihedus on väike, viskoossus on suur ja emulgeerimisvõime on madal, mis tähendab seda, et see mõjutab mullas vee läbilaskvust ja poorsust;
- nafta suure süsinikusisalduse ja väheste lämmastikuühendite tõttu võib muutuda mulla orgaanilise aine koostis ja struktuur;

- mõjutatud on mulla C/N (süsiniku-lämmastiku) ja C/P (süsiniku-fosfori) suhe, soolsus, happesusparameeter ja elektrijuhtivus;
- mulda mõjutavad negatiivselt raskmetallid, mis on pärit erinevatest naftasaadustest, näiteks õlidest.

Õlisetted on viskoosse keerulise koostisega; need sisaldavad erinevaid materjale, nagu vesi, mineraalid, vananenud õli, vaha, vaigud ja asfalteenid ning tahked osakesed, mille suurus sõltub sellest, mis tekketüübiga need setted on (Zhong jt, 2018). Need liigitatakse jäätmeteks, mis on pärit naftatööstustest (Zhong jt, 2018; Rossiana jt, 2020). Õlisetted sisaldavad mitmeid ohtlikke, sealhulgas mürgiseid orgaanilisi ja anorgaanilisi aineid ning on kahjulikud elusloodusele ja inimestele (*Ibid*).

1.3 Naftasaaduste mõju keskkonnale

Mulla elustiku kohta võib öelda „maa bioloogiline mootor“ ning see tuleneb sellest, et muld täidab tähtsat rolli enamikes ökosüsteemiteenustes, juhtides paljusid olulisi toitainete ringluse protsesse, mulla struktuurilist dünaamikat, saasteainete lagunemist ning taimekooslusi (Breure, 2004). Näiteks mõjutab saastunud pinnas negatiivselt mullaelustikku, mulla struktuuri ja viljakust ning mullas elavaid taimi (Kumar jt, 2018).

Mulla ökoloogilised funktsioonid ja bioloogiline mitmekesisus on olulised nende rolli tõttu – muld moodustab struktuuri ning tagab funktsioonide stabiilsuse ja viljakuse; on puhvriks; muld toimib kui süsiniku neelajana (Breure, 2004). Mullaorganismid on mulla kõige tähtsamad osad (*Ibid*). Enamasti on mullaorganismide mass võrreldes mineraalse massiga või huumusega väike, ent mullaorganismide elutegevus on üks tähtsamaid tegureid tagamaks mulla õige funktsioneerimine (*Ibid*).

Üha enam kasvab vajadus hinnata mulla praegust olukorda ning ennustada, mis seisukorras ja mis tähtsusega on mullad tulevikus ning kuidas on need inimese poolt mõjutatud (Breure, 2004). Mulla õige toimimine praegu ja tulevikus on elutegevuse jaoks võtmetähtsusega (*Ibid*). Olulised märksõnad muldade hindamisel on „jätkusuutlik areng“ ja „bioloogilise mitmekesisuse jätkusuutlik kasutamine“ (*Ibid*). Need terminid on leitavad ka Euroopa Liidu õigusaktides (*Ibid*). Euroopa Liidu poliitikas on muld kirjas kui taastumatu loodusvara ning selle tõttu tuleb mulda kasutada jätkusuutlikult (*Ibid*).

Euroopa mulla temaatiline strateegia toob välja kaheksa peamist ohtu, millega Euroopa Liit peab oma territooriumil arvestama: erosioon, mulla orgaanilise aine kadu, saastatus, sooldumine, mulla tihenemine, mulla bioloogilise mitmekesisuse kadu, maapinna katmine vett mitte läbi laskvate materjalidega ning maalihked ja üleujutused (Payá Pérez ja Rodríguez Eugenio, 2018). Mulla saastumine kemikaalide või naftasaadustega on Euroopa Liidus tähtsuset kolmandal kohal võimalikest mulda ähvardavatest ohtudest (*Ibid*).

Pinnasereostusi ehk mullareostusi on kahte tüüpi – punkt- ja hajureostused (Payá Pérez ja Rodríguez Eugenio, 2018). Punktareostuseid leidub reeglina intensiivselt kasutatavatel tööstusmaastikel, puudulikes või halvasti korraldatud jäätmete kõrvaldamise kohtades, kaevandustes, militaartegevust puudutavates kohtades või õnnetuste kohtades (*Ibid*). Punktareostus võib olla seotud raskmetallide, naftasaaduste, erinevate kemikaalide või tuumajäätmetega; samuti võib saastus sisaldada pestitsiide või väetiseid (*Ibid*). Hajureostuste puhul ei ole võimalik kindlaks teha, kust on reostus alguse saanud (*Ibid*). Ohtlike ainete pinnasesse sattumine kujutab endast ka tõsist ohtu pinna- ja põhjaveele (*Ibid*).

Enamik ühendeid naftasaadustes on mürgised nii inimestele kui ka loodusele laiemalt. Naftasaadustes leidub nii aromaatsed süsivesinikke kui ka raskmetalle (Maletić jt, 2013; Devatha jt, 2019). Eriti ohtlikuks teeb naftasaadused nende sattumine toiduahelatesse (*Ibid*). Naftareostused põhjustavad keskkonda sattudes pikaajalisi kahjustusi vee- ja mullaökosüsteemidele, kuid ka inimese tervisele ning naftareostus pärsib ka loodusvarade kasutamist (*Ibid*).

Viimaste aastakümnete jooksul on suureneva inimtegevuse, nagu põllumajanduse, tööstuse ja linnastumise tõttu vette, pinnasesse ja õhku viidud suur hulk inimtekkelisi kemikaale, mis on põhjustanud ulatuslikke keskkonnaprobleeme (Kumar jt, 2018). Need ohtlikud kemikaalid sisaldavad mitmesuguseid orgaanilisi ühendeid nagu polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud, naftasüsivesinikud, ksenobiootilised ühendid, halogeenitud süsivesinikud, fenoolühendid, lenduvad orgaanilised ühendid (LOÜ), nitroaromaatsed ühendid, polüklooritud bifenüülid (PCB) ja pestitsiidid ning anorgaanilised ühendid nagu nitraat, fosfaadid, sool ja raskmetallid, st arseen (As), vask (Cu), tsink (Zn), elavhõbe (Hg), plii (Pb), kaadmium (Cd), kroom (Cr), nikkel (Ni), seleen (Se) ja hõbe (Ag) (*Ibid*). Saastunud ökosüsteemid mõjutavad kahjulikult mulla mikroobide kasvu ja ainevahetustegevust, mulla struktuuri ja viljakust, taimi, veeorganisme ning elementide biogeokeemilist tsüklit, mis lõppkokkuvõttes mõjutavad ökosüsteemi ja inimeste tervist (*Ibid*).

Naftasaadustega reostunud pinnas mõjutab märkimisväärselt mikroobikoosluste struktuure ja nende mitmekesisust, sealhulgas mõjutab see seeni ja baktereid (Liang jt, 2016). Mikroobikoosluste populatsioonid tavaliselt vähenevad saastunud kohtades ning see omakorda toob kaasa muutused teiste mullaorganismide elutalitluses (*Ibid*). Efektiveks mulla puhastamiseks naftasaadusest on vaja erinevaid mikroobikoosluste populatsioone (*Ibid*).

Reeglina leidub puhtas mullas rohkelt mikroorganisme (Wang jt, 2017). Tavaolukorras ei ole sellised mikroorganismid suutelised saama hakkama naftareostusega, kuid samas võivad nad saastunud pinnases kohaneda ja moodustada järk-järgult sümbiootilise või sünergilise toimega populatsiooni (*Ibid*). Naftasaadustega reostunud pinnas takistab taimede normaalset kasvu vähendades taimede idanemist ja viljakust ning langetades mulla vastupidavust kahjuritele ja haigustele (*Ibid*).

Toornafta kaevandamisel, transportimisel ja töötlemisel toimuda võivad naftareostused kujutavad tõsist ohtu elusolenditele (Abbasian jt, 2016). Pinnases olev naftareostus võib muuta mullamikroobide populatsiooni ja neid ümbritsevat keskkonda sedavõrd, et edasine mikroobide elutegevus on peatatud (*Ibid*).

Bensiin on keerukas segu sadadest erinevatest naftasüsivesinikest, mida looduslikus keskkonnas ei leidu (Zand ja Hoveidi, 2016). Bensiini leke pinnasesse on tõsine oht inimese tervisele (*Ibid*). Bensiin ei jää pidama ainult reostunud kohta, vaid valgub mullavee ja sademete tõttu mulla alumiste kihtide poole ning võib välja jõuda ka põhjavee erinevate kihtideni (*Ibid*).

Uute naftaallikate uurimine, tootmine ja transport külma kliimaga piirkondades (Venemaa, Kanada, Alaska, Tiibet) on hakanud kasvama, mis on omakorda muutnud need piirkonnad haavatavaks erinevatele reostustele (Chaudhary ja Kim, 2019). Jahedama kliimaga piirkondades püsivad naftat sisaldavad saasteained pinnases oluliselt kauem kui parasvöötme piirkondades (*Ibid*). Jahedama kliimaga aladel on bioremediatsioon eriti keeruline infrastruktuuri puudumise ja madalama biolagunemiskiiruse tõttu (Lopez-Echartea jt, 2020).

Jahedama kliimaga paikades lenduvad kergemad kütused, nagu lennukikütus, kiiremini kui õlitooted, mis aegamisi imenduvad pinnasesse (Chaudhary ja Kim, 2019; Mocali jt, 2017). Üks lahendustest jahedama kliimaga piirkondades naftareostusega võitlemiseks on kasutada külma taluvaid ja sellega kohanevaid mikroorganisme (näiteks *Pseudoalteromonas haloplanktis*) (*Ibid*). Külma kliimaga aladel võib naftareostus püsida pinnases kuni 50 aastat (*Ibid*).

Maailmas on üle 5 000 000 km² soised alasid, kattes 6% kogu Maa pindalast (Kovaleva jt, 2020). Soostunud alad on Skandinaavias, Suurbritannia Ühendkuningriigis, Põhja-Saksamaal, Ameerika Ühendriikides, Kanadas ja Venemaal (*Ibid*). Turbaalade ökosüsteemid pakuvad oma tohutu suuruse tõttu äärmiselt olulisi biosfääri funktsioone nagu näiteks metaani reguleerimine ja planeedi vee tasakaalus hoidmine (*Ibid*). Nende ainulaadsete omaduste tõttu on suur huvi avastada pinnase õlireostuse mõju turbamaade ökoloogilistele funktsioonidele (*Ibid*). Hinnates mulla kvaliteeti ja funktsionaalsuse parameetreid, on võimalik kindlaks määrata süsivesinike piir, mis võib jääda pinnasesse, mõjutamata oluliselt keskkonda (*Ibid*).

Lääne-Siber on üks peamisi ja suurimaid nafta kaevandamise piirkondi maailmas ning seda ala katavad turbamaad (Kovaleva jt, 2020). Nafta kaevandamise puudulik organiseerimine ja juhtimine põhjustavad ümbritseva pinnase ja vete tõsist saastumist, ning antropogeense tegevuse intensiivne areng, sealhulgas toornafta suurenev tootmine, samuti naftavarustuse kahjustamine ja õnnetused, põhjustavad keskkonna suurenenud saastumist (*Ibid*). Mõistes mulla toimimist erinevate naftasaadustega saastumisel, suudetakse tagada suurte turbamaade jätkusuutlik areng, kaitstes samal ajal ökosüsteemi (*Ibid*).

Euroopa Liidus on industrialiseerimine ja intensiivne tööstus kestnud üle 200 aasta ning see on jätnud muldadele oma jälje (Payá Pérez ja Rodríguez Eugenio, 2018). Suur osa probleemidest on põhjustatud ohtlike kemikaalide, naftasaaduste ja muude ohtlike ainete kasutamisest erinevates tööstusprotsessides, kui puudusid sellekohased seadused ja raamistikud, mis oleksid kontrollinud keskkonnasaastamist (*Ibid*). Pinnase saastumist on eriti märgata Ida-Euroopas, mille alad olid osa Nõukogude Liidust ning kus käis aktiivne militaartööstus, keskkonnasaastamine polnud seadustega reguleeritud ja sellega kaasnesid ka erinevad reostused (*Ibid*).

Lisaks uue nafta kaevandamisele tuleb arvestada ka kunagiste jääkreostusallikatega (Keskkonnaministeerium, 2019). Keskkonnaministeeriumi teabe kohaselt on jääkreostus minevikus inimese tegevuse tõttu tekkinud pinnase- või põhjavee reostunud ala või kasutamata jäetud ohtlike ainete kogum keskkonnas, mis on ohtlik ümbruskonna elanikele ja elusloodusele (*Ibid*). Jääkreostust märgatakse reeglina siis, kui see on jõudnud inimeste kaevudesse, kanalisatsiooni või avastatakse reostus kaevetööde ajal (*Ibid*).

Saaremaal asuv Maadevahe asfaltbetoonitehase bituumenibaas alustas tegevust 1959. aastal ning lõpetas tegevuse 1993. aastal (AS Maves, 2018). Tehase territooriumil leidsid sagedasti aset erinevad avariid ja lekked, mille tõttu reostusid asfaltbetoonitehase ümbrus, sh pinnas, põhjavesi ja Maadevahe jõgi (*Ibid*). Kuus aastat

pärast tehase sulgemist tehti asfaltbetoonitehase ümbrusele uuring ja leiti, et territooriumi pinnasekihtides leidub erinevaid naftasaadusi ja põlevkiviõli; põhjavee pinnalt leiti paks õlikiht (*Ibid*).

Saastunud pinnase puhastamine on vajalik inimese tervise ja keskkonna seisukohalt ning selle käigus vähendatakse või eemaldatakse kahjulikud ained pinnasest (Payá Pérez ja Rodríguez Eugenio, 2018). Saastunud pinnase taastamine selle algsesse puhtasse olekusse ei ole alati majanduslikult ega tehniliselt teostatav, kuid puhastamiseks on erinevaid tehnoloogiaid, mille hulgas on ka majanduslikult mõistlikke lahendusi (*Ibid*).

Pinnast saab puhastada kas *ex-situ* või *in-situ* meetoditega (Payá Pérez ja Rodríguez Eugenio, 2018). *Ex-situ* meetodite puhul tuleks saastunud pinnas välja kaevata ja puhastada mujal; *in-situ* meetodite puhul pole pinnase välja kaevamine vajalik (*Ibid*). *Ex-situ* meetodite kasutamisega võib kaasneda keskkonnahäiringuid, eelkõige saastunud pinnase väljakaevamisel (*Ibid*). Saastunud pinnase välja kaevamine võib negatiivselt mõjutada lähedal asuvaid elukooslusi, taimi või mullas elavaid loomi ning selle transportimisel ei ole välistatud lekete toimumine (*Ibid*).

2. BIOREMEDIATSIOON

Ülemaailmne sotsiaalne ja majanduslik areng on saanud tõsiseks katsumuseks looduskeskkonna kaitsmisel ja säilitamisel (Rostami ja Azhdarpoor, 2019). Üha enam riike pooldavad sellist tootmist, mille käigus tekib vähem mürgiseid saasteaineid (*Ibid*). Alates tööstusrevolutsioonist on inimkond pidevalt saastanud pinnast erinevate kemikaalidega ning see on kasvanud globaalseks probleemiks (*Ibid*). Üsna sagedasti leiab eest nii raskmetallide kui ka naftasaadustega reostunud pinnase (*Ibid*).

Muld on Maa õrn ja õhuke ülemine kiht, kus leidub suur osa Maal elavatest elusolenditest (Narendrula-Kotha jt, 2018). Muld on inimese jaoks üks väärtuslikematest ressursidest ja oluline ka teiste biosfääri elusolendite jaoks (*Ibid*). Mullas leidub palju erinevaid eluks vajalikke organisme mitmetele ökosüsteemidele (*Ibid*). Muld koosneb mineraalsest ja orgaanilisest osast (*Ibid*). Mineraalne osa koosneb omakorda liivast, aluskivimist ja savist, olenevalt nende vahekorrast saab määrata erinevad mullalõimised (*Ibid*). Orgaaniline osa koosneb huumusest, mullaorganismidest (bakterid, seened, vetikad, putukad), gaasidest ja vedelikest (*Ibid*).

Pinnase saastumine orgaaniliste ja anorgaaniliste ainetega võib põhjustada kahju inimese tervisele ja keskkonnale (Liduino jt, 2018). Naftareostuse vastu saab võidelda nii füüsikaliste, keemiliste kui ka bioloogiliste vahenditega, kuid enamik neist on väga kulukad (Abbaspour jt, 2020). Biopuhastus ehk bioremediatsioon on pinnase, põhja- ja pinnasevee ning muda puhastamine, kusjuures puhastusprotsessis kasutatakse erinevaid seeni ja baktereid (Boopathy, 2000).

Reostunud alade puhastamine ja nende alade arendamine loob mitmeid eeliseid: kogukondadele luuakse uusi tööalaseid võimalusi, kasutusse saab võtta olemasolevaid infrastruktuure, säilitatakse rohe- ja haljasalaid, kaitstakse inimeste tervist ja taaselustatakse surnud reostunud alad (Zand ja Hoveidi, 2016). Läbi eelmainitud protsesside paraneb inimeste ja looduse elukvaliteet, seda eriti linnastunud piirkondades (*Ibid*).

Tänapäeval on pinnase, pinna- ja põhjavee saastumine toksiliste kemikaalidega industrialiseerimise tõttu inimeste jätkusuutliku arengu mõttes globaalne murekoht, seega on mürgiste orgaaniliste ja anorgaaniliste saasteainete likvideerimine saastunud keskkonnast väga tähtis vähese keskkonnamõjuga säästva arengu edendamiseks. (Kumar jt, 2018)

Saastunud pinnase, sette ja vee töötlemine tavapäraste meetodite abil on selle kõrge hinna tõttu ebamõistlik ja tekitab sekundaarseid saasteaineid, seetõttu on bioremediatsioon kujunenud loodusliku, majandusliku ja jätkusuutliku lähenemisviisina, mis suudab taastada saastunud pinnase, pinna- ja põhjavee bioloogiliste mõjurite, näiteks bakterite, seente ja muude organismide või nende ensüümide abil (Kumar jt, 2018). See on arenev roheline tehnoloogia, kus anorgaaniliste ja orgaaniliste saasteainete lagunemiseks ja / või eemaldamiseks kasvatatakse mikroobe (*Ibid*).

Bioremediatsiooni peetakse kulutõhusaks, logistiliselt kergesti teostatavaks ja mitte keskkonda lõhkuvaks puhastustehnoloogiaks (Maletić jt, 2013). Bioremediatsioon on keeruline ja aeganõudev protsess, kus biodegradatsioon ehk bioloogiline lagunemine toimub erinevate mikroorganismide rakkudes (*Ibid*). Bioremediatsiooni käigus luuakse loomuliku biodegradatsiooni toimimiseks vajalikud tingimused, reeglina vähendades biodegradeerumise olulisi piiranguid (*Ibid*). Sobiva bioremediatsiooni tehnoloogia valikul peaks lähtuma eelkõige naftasaaduste lagunemise efektiivsust mõjutavatest teguritest (*Ibid*).

Mikrobioloogilised kooslused keskkonnas on mitmekesised (Torsvik jt, 1990). Need kooslused erinevad üksteisest isegi väga väikeste vahemaade tagant ning erinevad keskkonnategurid mõjutavad erinevaid mikrobioloogilisi kooslusi erinevalt (*Ibid*). Mulla ühes grammis võib leida kuni 5×10^9 bakterirakku (*Ibid*). Bioremeditatsioonis võib lisaks mikroobikooslustele pinnase tervendamises kasutada ka taimi (Abbaspour jt, 2020). Mõned taimeliigid, nagu ristik, parandavad tõhusalt mulla omadusi ja aitavad seeläbi naftareostust vähendada (*Ibid*).

Bioremediatsiooni käigus hävitatakse täielikult või vähendatakse keskkonnakahjulike ainete kontsentratsiooni keskkonnas (Boopathy, 2000). Bioremediatsiooniga saab keskkonda puhastada naftasaadustest ja ka toksilistest metallidest (Narendrula-Kotha jt, 2018). Erinevad raskmetallid mõjutavad negatiivselt inimeste tervist (*Ibid*). Bioremediatsioon on keskkonnasõbralik meetod puhastamiseks pinnast naftasaadustest (Kumar jt, 2018).

Muldades esinevate saasteainete püsivus ja lenduvus on olulised, sest kergesti lenduvad ained võivad aurustuda ja lenduda mulla õhustamise või segamise käigus ja mikroorganismidel ei õnnestu neid lagundada (Omosiowho, 2014). Liigne saasteainete kontsentratsioon (10 000-50 000 TPH-nafta süsivesinike üldsumma) ja nende toksilisus pärsivad mikroobide ja erinevate taimede kasvu, seega tuleks saastunud muld segada puhta mullaga, et mikroobide elutegevus oleks vähem häiritud (*Ibid*). Ümbritsev õhutemperatuur mõjutab otseselt mulla temperatuuri, seega on ka see oluline parameeter bioremediatsiooniks. Lisaks on oluliseks teguriks ka sademete hulk, kuna

sademed võivad põhjustada liigset mullaniiskust, mis omakorda takistab mikroobide elutegevust ja võib tekitada erosiooni (*Ibid*). Erosiooni võib tekitada ka tuul (*Ibid*).

Bioremediatsiooni efektiivsus sõltub mitmest tegurist, mis on jaotunud järgmiselt: mulla omadused, mulla koostisosad ja kliima (Omosiowho, 2014). Bioremediatsiooni jaoks on olulised järgmised mulla omadused: mikroobikoosluse tihedus, mulla pH, mullaniiskus, mulla temperatuur, toitainete rohkus, tekstuur (Evans ja Furlong, 2003). Mulla tekstuur mõjutab mulla veeläbilaskvust, vee sisaldust ja tihedust (Maletić jt, 2013).

Mikroobikoosluse tihedus on bioremediatsioonil oluline selle tõttu, et mikroobide abil muundatakse kahjulikud ained mullas kahjutuks (Omosiowho, 2014). Mida suurem on mikroobide tihedus, seda efektiivsemalt pinnas puhastub (*Ibid*). Mulla pH on oluline toetamaks bakterite kasvu mullas, mis omakorda aitab kaasa saasteainete vähendamisele (*Ibid*). Mulla pH võiks jääda vahemikku 6-8 (*Ibid*). Mulla mikroorganismid vajavad kasvamiseks ja elutalitlusteks niiskust (*Ibid*). Seejuures liigne mullaniiskus vähendab õhu liikumist mullas ning võib mõjuda vastupidise efektina (*Ibid*). Mikroobide kasvu kiirus sõltub mulla temperatuurist (*Ibid*). Reeglina jääb bioremediatsiooniks kasulik temperatuur vahemikku 10° C kuni 45° C. Mikroobide jaoks on mullas toitained olulised; tavaline süsiniku, lämmastiku ja fosfori suhe (C:N:P) bioremediatsiooni edukaks toimimiseks varieerub 100:10:1 kuni 100:1:0,5 (*Ibid*).

Bioremediatsiooni toimumiseks on oluline roll ka mulla tekstuuril, mis mõjutab mulla läbilaskvust, niiskusesisaldust ja massi tihedust (Omosiowho, 2014). Kui muld on liiga tihe, on mulla õhutamine raske (*Ibid*). Mulla koostisosade juures on tähtis, kui ebapüsivad on erinevad ained, milline on nende keemiline koostis ja struktuur ning mulla toksilisus (*Ibid*). Kliima parameetritest on bioremediatsiooni jaoks olulised ümbritsev õhutemperatuur, sademed ning tuul (*Ibid*).

Liivane ja kruusane muld on bioremediatsiooniks parimad valikud, sest nende muldade vee läbilaske võime ja õhu liikuvus on kõige paremad (Evans ja Furlong, 2003). Kõrge orgaanilise aine sisaldusega mullad, näiteks turvas või savi, ei ole bioremediatsiooniks kõige paremad (*Ibid*). Savises mullas bioremediatsiooni võimaldamiseks tuleks seda mulda segada mulla tekstuuri parandavate ainetega, nagu põhk või saepuru, sest bioremediatsioonil osalevad mikroorganismid vajavad elutegevuseks piisava õhutusega mulda (Maletić jt, 2013).

Bioremediatsiooni on võimalik kasutada kahel viisil, need on *in-situ* ja *ex-situ* meetodid (Chibueze Azubuike jt, 2016). *Ex-situ* meetodi puhul teisaldatakse saastunud materjal saastumise kohast, et seda puhastada (*Ibid*). Selleks kasutatakse erinevaid meetodeid - bioaun kompostimine, vaalkompostimine, bioreaktor, künnikihis tervendamine (*Ibid*).

In-situ meetodi puhul ei ole saastunud materjali liigutamine vajalik, kuna puhastamise protsess saab toimuda saastumise kohas (Boopathy, 2000). *In-situ* meetodid on järgmised: looduslik hajumine, biostimulatsioon, bioventileerimine, bioaugmentatsioon, fütoremediatsioon (Chibueze Azubuike jt, 2016).

Kasutades *in-situ* meetodit, ei toimu keskkonnanahäiringuid, näiteks pinnase koorimist ja teisaldamist, mis võib negatiivset mõju avaldada sealsele elustikule (Kumar jt, 2018). *In-situ* meetodi edukaks toimimiseks oleks vaja täita järgmised eeldused: biolagundavate mikroobide piisav arv, piisav toitainete hulk, head keskkonnatingimused (sealhulgas keskkonna pH, temperatuur ja hapniku kogus mullas/vees), piisav aeg (*Ibid*).

Pinnase puhastamine diiselmootorist toimub kõige sagedamini hapniku kättesaadavuse parendamise ja toitainete lisamisega mulda, et mikroobide populatsioonid saaksid paremini kasvada ja areneda (Zytner jt, 2011). Mitmetest uuringutest on selgunud, et diiselmootor on põldudel ja väljadel palju vastupidavam kui laboratoorses katsetel (*Ibid*). Kui laboratoorses katsed näitavad diiselmootori vähenemist juba paari nädala möödudes, siis looduslikus keskkonnas võib sama diiselmootori kontsentratsioon püsida ka veel mitme aasta pärast (*Ibid*). See tuleneb sellest, et ei osata arvestada reostuse mastaabist tulenevaid muutujaid (*Ibid*).

2.1 Bioremediatsiooni meetodid

Alljärgnevalt antakse ülevaade erinevatest bioremediatsiooni *ex-situ* ja *in-situ* meetoditest.

- Bioaun

Bioaunades komposteerimine kujutab endast saastunud pinnase väljakaevamist, ladustamist selleks ette nähtud väljakule, millele järgneb toitainete lisamine ning aeg-ajalt pinnase aereerimine, et tõhustada puhastumist ja suurendada mikroobide aktiivsust (Chibueze Azubuike jt, 2016). Olulised osad selle tehnika juures on aeratsioon, niisutamine, toitainete ja nõrgvee kogumissüsteemid ja ala, kus katset läbi viiakse. Seda *ex-situ* meetodit kasutatakse üha enam selle tõttu, et sellega on võimalik teostada tõhusat naftasaaduste biolagundamist tingimustel, et toitaineid, temperatuuri

ja aereerimist kontrollitakse piisavalt (*Ibid*). Bioaunade kompostimise kasutamist saastunud kohtades võib aidata piirata väikese molekulmassiga saasteainete lendumist ning seda meetodit saab tõhusalt kasutada ka külma kliimaga piirkondades (*Ibid*).

Bioloogiliselt kättesaadav süsinik on mikroobide ainevahetuse energiaallikas (Zhang jt, 2021). See on bioaunade üks kõige väärtuslikematest parameetritest, sest seda peetakse mulla orgaanilise süsiniku kõige biolagunevamaks osaks (*Ibid*). Bioaunades kompostimine on üsna kulutõhus meetod puhastamaks saastunud pinnast (*Ibid*).



Joonis 2.1.1. Bioaun komposteesteerimine (Foto: AS Epler & Lorenz erakogu)

- Vaalkompostimine

Vaalkompostimise meetod kujutab endast perioodilist saastunud pinnase ümberkeeramist soodustamaks bioremediatsiooni, ümber keeramine suurendab bakterite lagundamisaktiivsust (De Silva ja Yatawara, 2017). Perioodiline pinnase ümberkeeramine koos kastmisega suurendab aereeritust, saasteainete ühtlast jaotumist, suurendab toitainete sisaldust ja mikroobikoosluse aktiivsust, mis omakorda kiirendab bioremediatsiooni protsessi (Chibueze Azubuike jt, 2016). Vaalkompostimise meetod koos bioaun-kompostimise meetodiga töötab tõhusamalt saasteainete eemaldamisel keskkonnast, kui kasutada ainult ühte kahest meetodist (*Ibid*).

- Künnikihis tervendamine

Künnikihis tervendamine on üks lihtsamaid, vähem kulutusi nõudvaid ja vähem tehnoloogilisi vahendeid nõudvaid bioremediatsiooni viise (Chibueze Azubuike jt, 2016). Enamasti liigitub künnikihis tervendamine *ex-situ* meetodite alla, kuid mõningal juhul käsitletakse seda kui *in-situ* meetodit, see oleneb reostuse sügavusest pinnases (*Ibid*). Kui reostus on sügavamal kui 1,7 meetrit, on vajalik see välja kaevata ning sellisel juhul on tegemist *ex-situ* meetodiga (*Ibid*).

Välja kaevatud pinnas laotatakse ühtlase kihina aluspinnale, misjärel mulda lisatud mikroorganismid saavad asuma saasteaineid lagundama (Silva-Castro jt, 2015). Aegajalt tuleb mulda aereerida (*Ibid*).

- Bioventileerimine

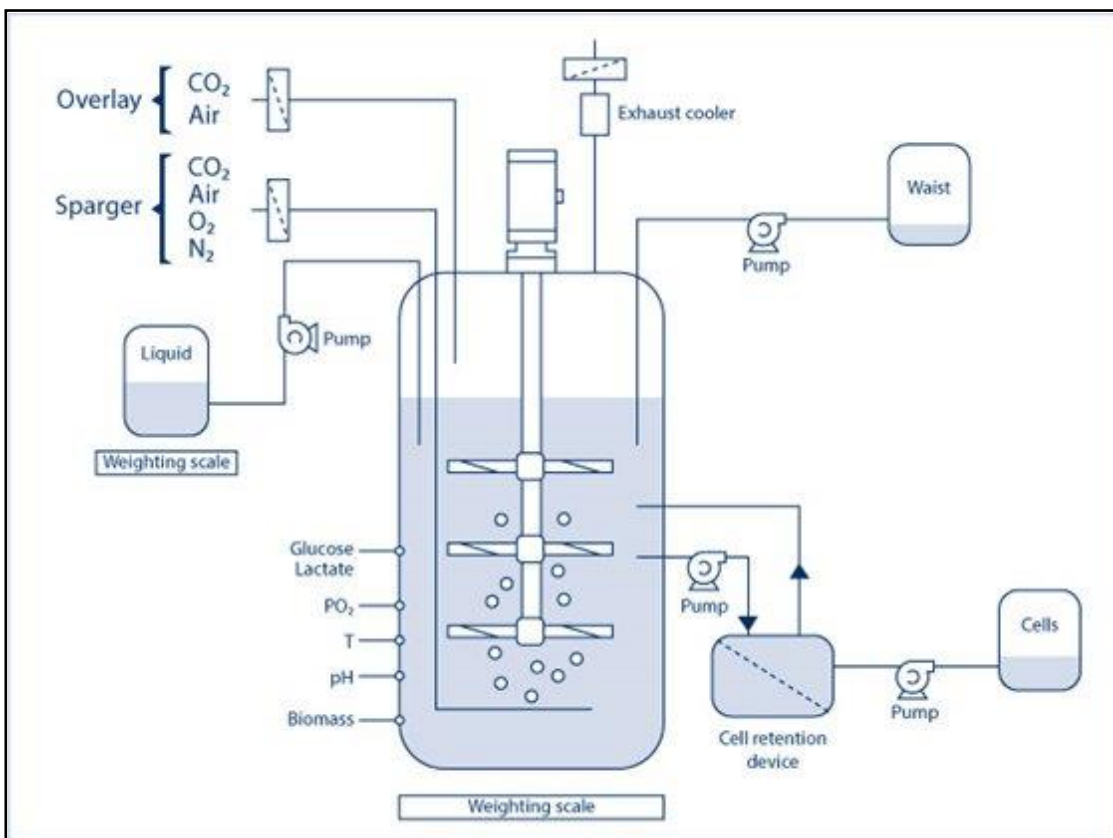
Bioventileerimine on *in-situ* meetod, mis sisaldab kontrollitud õhu lisamist protsessi, mis kiirendab mikroobide elutegevust (Chibueze Azubuike jt, 2016). Bioventileerimises puhastatakse pinnast mikroobide elutegevusele kaasa aitamisega – lisatakse toitaineid ja vajadusel niiskust, lõppeesmärgiks on saasteainete muundumine kahjulikust kahjutuks (*Ibid*). See bioremediatsiooni meetod on saanud populaarseks kergemate reostuste puhul (*Ibid*).

On kaht tüüpi bioventileerimist – aeroobne ja anaeroobne (Kalsi jt, 2020). Aeroobse bioventileerimise puhul lisatakse saastunud pinnasesse hapnikku, anaeroobse ventileerimise puhul lisatakse saastunud pinnasesse elektrondonoreid (*Ibid*). Elektrondonorite hulka kuulub näiteks lämmastik (*Ibid*).

- Bioreaktor

Bioreaktor on anum, kus toormaterjalid töödeldakse bioloogiliste protsesside abil soovitud produktideks (Chibueze Azubuike jt, 2016). Bioreaktoreid on mitut tüüpi (*Ibid*). Bioreaktoris esinevad tingimused toetavad mikroorganismide optimaalset kasvu ning säilitavad neile omast looduslikku keskkonda (*Ibid*). Saastunud materjali saab bioreaktorisse panna kas kuivana või märjana; see on ka bioreaktori üks eelistest (*Ibid*).

Üks tõhusamaid viise bioreaktori kasutamiseks on kasutada märga materjali; bioreaktoris segatakse saastunud pinnas toitainete- ja vesilahuses koos bakteritega ning õhutatakse põhjalikult (Balseiro-Remero jt, 2019). Samuti räägib bioreaktori kasuks seal toimuvate bioloogiliste protsesside kontrollimise lihtsus (Chibueze Azubuike jt, 2016). Võimalus neid protsesse kontrollida ja vajadusel bioreaktoris olevate tingimuste muutmine aitavad kaasa bioremediatsiooni ajakulu vähendamisele (*Ibid*).



Joonis 2.1.2. Bioreaktor (BRONKHORST HIGH-TECH B.V., 2020), kus *overlay* on aplikatsioon, *sparger* on prits, *exhaust cooler* on heitgaaside jahuti, *pump* on pump, *waist* on keskkoh, *liquid* on vedelik, *weighting scale* on kaalumisskaala, *glucose* on glükoos, *lactate* on laktaat, *biomass* on biomass, *cell retention device* on rakkude säilitamise seade, *cells* on rakud, *air* on õhk

- Biostimulatsioon

Biostimulatsioonis on kombineeritud omavahel vaakumpumpamine, mullaaurude ekstraheerimine ja bioventilatsioon, saavutamaks mulla ja põhjavee remediatsioon (Kim jt, 2014; Chibueze Azubuike jt, 2016). See tehnika on mõeldud kergemate reostuste likvideerimiseks, samuti saab seda kasutada lenduvate ja pool-lenduvate orgaaniliste ühendite remediatsiooniks mullast (*Ibid*).

Biostimulatsioon töötab efektiivselt koos bioaugmentatsiooniga, kombineerides mõlemad tehnikat ja lisades mulda biosütti (*biochar*), saab parandada mulla omadusi ja

kaasa aidata mullamikroobide elutegevusele (Saeed jt, 2021). Olulised tegurid tagamaks mulla mikroobide tõhus elutegevus on mulla pH, toitained, mulla temperatuur ja niiskus, hapniku kättesaadavus, mulla struktuur ja saasteainete kontsentratsioon (Adams jt, 2015).

- Bioaugmentatsioon (biotäiendamine)

Bioaugmentatsioonis lisatakse saastunud pinnasesse mikroorganisme, kes on võimelised lagundama õli (naftasaaduseid) ja toetavad põlismikroorganismide naftasaaduste lagundamisel (Adams jt, 2015). Osa mikroorganismidele sobivad lagundamiseks lineaarsed alkaanid, teistele hargnenud alkaanid või tsüklilised alkaanid; on ka mikroorganisme, kes suudavad lagundada mitmeid erinevaid ühendeid (*Ibid*). Antud meetod vähendab bioremediatsiooniks kuluvat aega (*Ibid*).

See meetod on sarnane biostimulatsioonile, sest mõlemal juhul juhitakse õhku saastunud pinnasesse, et parandada mikroobide elutegevust (Chibueze Azubuike jt, 2016). Erinevalt bioventileerimisest, suunatakse õhku juba küllastunud kihti (Kao jt, 2008), mille toimel lenduvad orgaanilised ühendid liiguvad kihtides ülespoole küllastumata kihtidesse. Bioaugmentatsiooni efektiivsus sõltub kahest aspektist: mulla läbilaskvusest, mis määrab, kui edukalt saavad mikroorganismid saasteained kätte, et neid lagundada; saasteainete biolagunevusest (Chibueze Azubuike jt, 2016).

- Looduslik hajumine

Looduslik hajumine on bioremediatsiooni meetod, mis toimub looduslikult ja kus inimene ei sekku (Chibueze Azubuike jt, 2016). Loodusliku hajumise ajal toimuvad nii aeroobsed kui anaeroobsed protsessid (*Ibid*). See meetod nõuab vähem rahalisi vahendeid kui eelnevad (*Ibid*). Sellest hoolimata tuleks seda protsessi jälgida, et olla kindel, et see on pidev ja jätkusuutlik (*Ibid*).

See meetod on tihtipeale valesti mõistetud, sest arvatakse, et looduslik hajumine tähendab mitte millegi tegemist (Khan jt, 2004). Tegelikult toimub loodusliku hajumise käigus saasteainete massi vähenemine ja saasteainete kontsentratsiooni vähenemine, kuid see võtab rohkem aega kui teised tehnoloogiad (*Ibid*). Üks võimalusi sealjuures on dispersioon (lahjendamine), kus saasteained aja jooksul hajuvad laiali nii pinnases kui ka põhjavees, kuid ei kao keskkonnast ära (*Ibid*).

- Fütoremediatsioon

Fütoremediatsioon on üks pinnase puhastamise viise, milles taimede füüsikaliste, biokeemiliste, bioloogiliste, keemiliste ja mikrobioloogiliste omaduste abil leevendatakse saasteainete kahjulikkust (Chibueze Azubuike jt, 2016). Naftaga saastatud tingimustes

võivad taimed muundada süsivesinikud mittetoksilisteks vormideks ning taimede juured ja nendega seotud mikroobikooslus aitavad naftasaaduste lagunemisele kaasa (Mohsenzadeh jt, 2010).

Sõltuvalt reostuse tüübist (elemendipõhine või orgaaniline) on fütoremediatsioonil võimalik akumulatsioon või ekstraheerimine, lagundamine, filtreerimine, stabiliseerimine või lendumine (Chibueze Azubuiké jt, 2016). Elemendipõhised saasteained, näiteks raskmetallid ja radionukleiidid, eemaldatakse peamiselt ekstraheerimise, muundamise ja kinni püüdmise kaudu (*Ibid*). Teisalt eemaldatakse orgaanilised saasteained, nagu süsivesinikud ja klooritud ühendid, peamiselt lagundamise, risoremediatsiooni, stabiliseerimise ja lendumise teel (*Ibid*).

2.2 Fütoremediatsioon

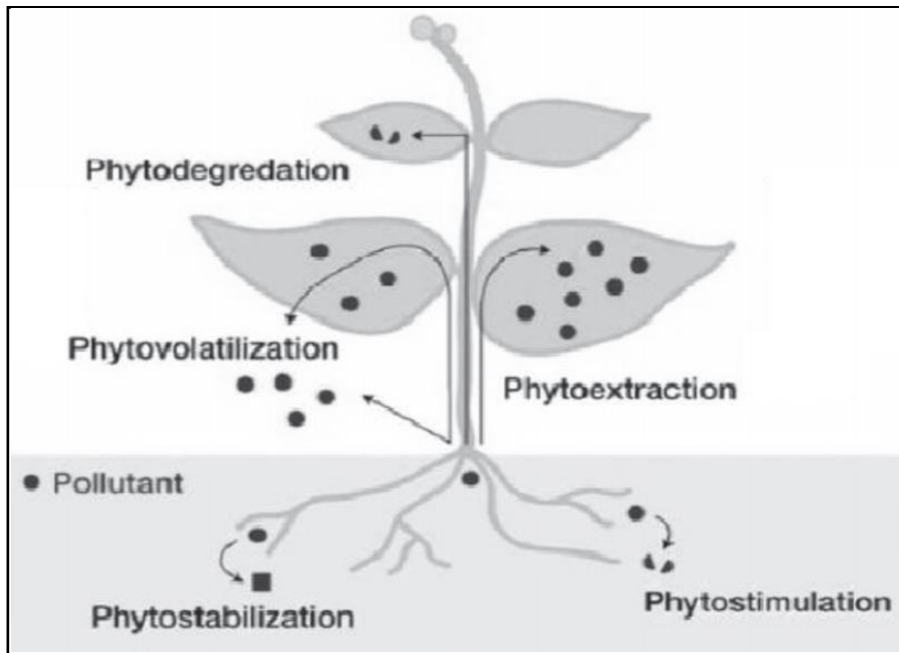
Taimtervendamine ehk fütoremediatsioon on kuluefektiivne ja keskkonnasõbralik meetod pinnase puhastamiseks naftasaadustest (Wang jt, 2019). Fütoremediatsioonil kasutatakse pinnase puhastamisel rohelisi taimi, mis suudavad muuta ohtlikud saasteained ohutuks materjaliks (*Ibid*).

Erinevate kasutusvaldkondade järgi saab fütoremediatsiooni klassifitseerida järgmiselt (Prabakaran jt, 2019; Kumar jt, 2018); lisaks on loetelu lõpus ka selgitav joonis (Joonis 2.2.1 (Demcak ja Balintova, 2015)):

- Fütоекстраktsioon – toimub taimede juurte abil, et koguda saastunud pinnasest saasteaineid (*Ibid*). Peale saasteainete pinnasest eemaldamist paigutuvad need taimed ümber, täpsemalt taime õhust osadesse (lehtedesse) (*Ibid*). Sellele järgneb biomassi koristamine, et eemaldada ohutult taime kogunenud saasteained (*Ibid*).
- Fütovolatilisatsioon (fütolendumine) – eemaldamistehnika, mille käigus kasutatakse taimi ja nende risosfääri mikroobe toksiliste saasteainete muundamiseks lenduvateks (mittetoksilisteks) vormideks, mis seejärel atmosfääri lastakse (*Ibid*). Fütovolatiliseerimisel haaravad taime juured mullast saastatust tekitavad raskmetallid ja need vabastatakse transpiratsiooni käigus keskkonda (*Ibid*). See protsess töötab tavaliselt siis, kui raskmetallide olemus

on volatiilne (Hg ja Se). Fütovolatiliseerimise peamine eelis on see, et sellega on võimalik saasteained eemaldada ilma taime koristamata ja kõrvaldamata (*Ibid*). Fütovolatiliseerimine on üks enim vaieldud fütoremediatsiooni meetodeid, kuna Hg ja Se on mürgised ning debateeritakse, kas nende mürgiste metallide atmosfääri heitmine on ohutu (*Ibid*).

- Fütofiltratsioon – taimede biomassi abil filtreeritakse saastatus keskkonnast välja. Seda kasutatakse peamiselt veepuhastuses (*Ibid*).
- Fütostabilisatsioon (fütoimmobilisatsioon) – taimed stabiliseerivad saasteained takistades ja vähendades saasteainete liikumist keskkonnas (*Ibid*). Sellisel viisil ei liigu saasteained keskkonnas ringi ning väheneb tõenäosus, et saastatus jõuab toiduahelaisse (*Ibid*).
- Fütodegradatsioon – protsess, kus taimed omastavad orgaanilisi ksenobiootikume ning seejärel lagundatakse need ensüümide abiga (*Ibid*). Taimi kutsutakse selle meetodi tõttu biosfääri „rohelisteks maksaks“, kuna taimed on võimelised keskkonnast eemaldama mitmeid saasteaineid (*Ibid*).
- Risodegradatsioon – protsess, mille käigus taim annab substraate, et stimuleerida risosfääri mikroobikoosluste kasvu (*Ibid*). Taimne risosfäär pakub ainulaadset keskkonda mikroorganismidele, mis on võimelised ainevahetuse kaudu lagundama ohtlikud saasteained mittetoksiliseks ja kahjututeks aineteks (*Ibid*). Mikroobide täiustatud risoremediatsiooniprotsess on võrreldes *ex-situ* meetoditega oluliselt aeglasem, kuna sellistes kohtades esinevad keskkonda piiravad tegurid nagu näiteks umbrohu konkurents, piiratud taimekasv saastatud keskkonnas, taimepatogeenide avaldumine ja muud abiootilised ja biotilised stressorid (*Ibid*). Risoremediatsioon toimib ainult juurtetsoonis ja on sobimatu sügavamate maa-aluste kihtide töötlemiseks (*Ibid*).



Joonis 2.2.1. Fütoremediatsiooni klassifikatsioon (Demcak ja Balintova, 2015), kus *phytodegradation* on fütodegradatsioon, *phytovolatilization* on fütovolatilisatsioon, *phytoextraction* on fütоекstraktsioon, *phytostabilization* on fütostabilisatsioon ja *phytostimulation* on risodegradatsioon

Fütoremediatsioonil on mitmeid eeliseid, kuid leidub ka puuduseid (Narendrula-Kotha jt, 2018). Eelised on järgmised: tehnoloogia on odav võrreldes keemiliste või füüsikaliste meetoditega; nõuab vähe energiat; on keskkonnasõbralik meetod; häirib muldkeskkonda palju vähem kui teised keemilised-füüsikalised meetodid; selle meetodiga on võimalik vältida pinnase väljakaevamist; see on sotsiaalselt aktsepteeritud; taimi on lihtne hooldada (*Ibid*).

Selle tehnoloogia puudusteks on: meetod on aeganõudev, sest taimede idanemine ja kasvamine võtab aega; kliimatingimused on väga suured mõjutegurid, see tähendab, et taimedele peab olema kasvamiseks sobiv kliima; taimi peab pärast fütoremediatsioonil kasutamist õigesti käitlema; saasteained võivad uuesti pinnasesse lekkida uute võsude tekkimise kaudu; taimejuured võivad põhjustada saasteainete lahustuvust ja selle tagajärjel võib saastatus uuesti pinnasesse jõuda (Narendrula-Kotha jt, 2018).

Elemendipõhiseid saasteaineid, nagu mürgiseid raskmetalle ja radionukleide, saab enamasti eemaldada fütоекstraktsiooni abil (Chibueze Azubuike jt, 2016). Orgaanilisi saasteaineid, nagu naftasaaduseid ja klooritud elemente, saab eemaldada fütodegradatsiooni, risodegradatsiooni, fütostabilisatsiooni ja fütovolatilisatsiooni abil (*Ibid*). Paju ja lutsern on taimed, millega on võimalik isegi mineraliseerumine (*Ibid*).

Polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud (PAH-id) on Ameerika Ühendriikides ühed peamised saasteained, mis koosnevad püsivatest orgaanilistest saasteainetest ja mis kujutavad eriti suurt ohtu pinnasele (Košnář jt, 2020). On leitud, et PAH-e saab fütoremediatsiooni abil pinnasest eemaldada (*Ibid*). Neid on nende struktuuri tõttu keeruline keemiliselt ja bioloogiliselt lagundada (*Ibid*). Selleks, et neid oleks bioloogiliselt võimalik lagundada, tuleb neid enne töödelda (*Ibid*). Looduslikest ainetest aitavad PAH-e paremini biolagunevaks muuta sidrun- ja oblikhapped (*Ibid*).

Fütoremediatsiooniks sobivad kõrge biomassiga ja kõrge saasteainete neeldumisvõimega taimed (Taheri jt, 2018). Kiirekasvulised puuliigid on samuti fütoremediatsiooniks sobivad, sest neil on suur biomass ning juurestik on ulatuslik (*Ibid*).

Taime valikul fütoremediatsiooniks peaks arvestama järgmisi tegureid: juurestik – sõltuvalt saasteaine sügavusest on sobilik juurestik hargnev või peajuurne; biomass maapinnal – seda ei tohi kasutada loomadele toiduks; saasteaine toksilisus taime suhtes; taime ellujäämine ja selle kohanemisvõime keskkonnatingimustega; taimede kasvukiirus; ja kõige olulisem – aeg, mis kulub soovitud puhtustaseme saavutamiseks (Chibueze Azubuoke jt, 2016). Lisaks eelnimetatule peaks taim olema vastupidav haigustele ja kahjuritele (*Ibid*). Usutakse, et enamus taimi, mis kasvavad saastunud kohtades, on sobilikud fütoremediatsiooniks (*Ibid*).

Invasiivsed taimeliigid ehk taimede võõrliigid on tavaliselt hüperakumulaatorid, mis tähendab seda, et nad on võimelised koguma saasteaineid rohkem kui neil elutegevuseks vajalik on (Prabakaran jt, 2019). Osa taimi kasutavad saasteaineid elutegevuseks (*Ibid*). Erinevates allikates on viiteid, et invasiivsetel taimeliikidel on suurem tolerantsus saasteainete suhtes, resistentsus taimtoiduliste ja patogeenide suhtes, nad on põuakindlamad ja allelopaatilised (*Ibid*). Samas ei ole invasiivsete liikide kasutamine looduses soovitud tegevus, ent fütoremediatsiooni seisukohast on need edukamad kui põlisliigid (*Ibid*).

Hiljutised uuringud on näidanud fütoremediatsiooni efektiivsust (Liduino jt, 2018). Lisaks taimedele mängivad selles meetodis olulist rolli ka mulla mikroorganismid, kes aitavad puhastamisele kaasa (*Ibid*). Kuna mitmed saasted on kombinatsioon orgaanilistest (naftasüsivesinikud) ja anorgaanilistest (raskmetallid) saasteainetest, tuleks sellega pinnase puhastamisel arvestada (*Ibid*). Edukaid katsetusi on tehtud erinevate päevalille tüüpidega (*Ibid*).

Võrreldes tavalist toornaftat raske toornaftaga (*heavy crude oil*), sisaldab raske toornafta rohkem suure molekulmassiga süsivesinikke, raskmetalle ja teisi ühendeid

(Cai jt, 2016). Kasutades fütoremediatsiooni raskmetallide eemaldamiseks pinnasest, peaks taime valiku puhul jälgima kahte asja: a) väikese biomassiga taim, mis on väga kõrge metallide kogumismahutavusega, b) suure biomassiga taim, millel on suurendatud raskmetallide neeldumise potentsiaal (Sharma ja Pandey, 2014). Kõige tähtsam taime sugukond, mida fütoremediatsioonis kasutatakse, on ristõielised (*Ibid*). Ristõieliste seas on palju liike, kes on võimelised raskmetalle koguma (*Ibid*).

Uuringutes on leitud, et troopilistes kliimatingimustes on õlisetete ja naftasaaduste eemaldamisel pinnasest tõhusaks meetodiks fütoremediatsioon (Rossiana jt, 2020). Fütoremediatsioon on troopilises kliimas paljutöötav puhastusmeetod, sest troopilised kliimatingimused soodustavad taime kasvu ja mikroobide aktiivsust (*Ibid*). Piiratud rahaliste ressurssidega piirkondades, kus kliimaatilised tingimused soodustavad taime kasvu, on fütoremediatsioon ideaalne valik, kuna see on kulutõhus meetod (*Ibid*).

Fütoremediatsiooni üheks ohuks on saasteainete jõudmine toiduahelasse (Chibueze Azubuike jt, 2016). Taimed oma olemuselt on autotroofsed (ei ole suutelised kasutama orgaanilisi ühendeid süsiniku ja energiaallikadena) ja seetõttu puuduvad taimedel kataboolsed ensüümid, mis on vajalikud orgaaniliste saasteainete täielikuks lagundamiseks, mille lõpp-produktideks on vesi ja süsinikdioksiid (*Ibid*). Kuna taimed ei pruugi täielikult saasteaineid lagundada, võivad toksilised ühendid jõuda toiduahelatesse (*Ibid*).

Tihti peale kasutatakse ka kombineeritud saneerimistehnoloogiaid, mis tähendab seda, et kasutatakse kahte või enam saneerimismeetodit, et parandada saneerimise tõhusust (Zhang jt, 2020). Kõige tihedamalt leiavad kooskasutust mikroobid ja taimed (*Ibid*). Ühtpidi aitavad mikroorganismid taime biopuhastusvõimele kaasa, muutes taimed residentseks saastajate suhtes (*Ibid*). Teisalt pakub taime juurestik mikroorganismidele head kasvukohta (*Ibid*).

Õige jäätmekäitlusviis taimele pärast fütoremediatsiooni on väga oluline; vastasel juhul võivad saastatuse eemaldanud taimed ise olla järgmised saastajad (Song ja Park, 2017). Taime biomass pärast fütoremediatsiooni liigitatakse jäätmeteks ja jäätmetele tuleb leida kõige sobivam jäätmekäitlusviis (*Ibid*). Taime biomassi saab lisada näiteks biokütusesse, kuid uuringud on näidanud, et ka biomassi põletus on jäätmekäitlustoiminguna mõeldav (*Ibid*). Lisaks on katsetatud ka puhastamisel kasutatud taime kompostimist (*Ibid*).

Pärast fütoremediatsiooni tuleks taimed niita ja koristada (*harvesting*), seejärel on võimalik valida kahe võimaluse vahel: taime biomassi otsene hävitamine ehk põletus või teha eeltöötlust enne otsest hävitust (Sas-Nowosielska jt, 2004). Eeltöötluste alla käivad

tihendamise, kompostimise ja pürolüüsi, mis vähendavad taimset biomassi ja seega on põletamist vajav materjali hulk väiksem (*Ibid*). Väiksem põletamist vajav materjali hulk tagab väiksemad käitluskulud (*Ibid*).

2.2.1 Fütoremediatsioonil kasutatavad taimeliigid

Shi jt (2018) poolt korraldatud katseeksperimentis kasvatati potis lutserni (*Medicago sativa*) ja ohtetu lustet (*Bromus inermis*). Katse tehti eraldi taimedega, mõlemate taimedega koos ja lisaks katsetati mulda tärgluse panekut ja seente lisamist (*Ibid*). Kõikidest võimalikest kombinatsioonidest kõige tõhusam oli ohtetu lustet tärgluse ja fusariumiga (*Ibid*).

Söödakõrrelised on mitmetes uuringutes näidanud tulemuslikkust pinnase puhastamisel, lisaks on nad vastupidavad naftasaaduste toksilisusele (Shi jt, 2018). Samuti on uuringutes kasutatud ka erilehelist linnurohtu (*Polygonum aviculare*), erinevaid liblikõielisi (*Fabaceae*), tähk-rebasheina (*Amaranthus retroflexus*), kassitappu (*Convolvulus arvensis*) ja palju teisi taimeliike (Mohsenzadeh jt, 2010). Cai jt (2016) uuringus kasutati fütoremediatsiooniks roog-aruheina (*Festuca arundinacea*).

Uuringud on näidanud, et naftasaaduste ja süsivesinike puhastamisel pinnasest ja põhjaveest on edukalt kasutatud harilikku lutserni (*Medicago sativa* L.) (Cherian ja Oliveira, 2006; Panchenko jt, 2016). Hariliku lutserniga tehtud katses olid risosfääris saaste kontsentratsioonid 30% madalamad kui ümbritsevas mullas (Panchenko jt, 2016).

Valge ristik (*Trifolium repens*) suudab kasvada ja kohaneda ka kuumas, külmas ja happelises keskkonnas, samuti leidub valget ristikut liivas (Lin jt, 2021). Uurimuse (Sheng-You jt, 2009) tulemuseks saadi, et valge ristiku kasv ei olnud mõjutatud saastunud pinnasest – antud katses kasvatati valge ristiku taimed ette. Valge ristik (*Trifolium repens*) on näidanud edukaid tulemusi pinnase puhastamisel diiselkütusest (Xi jt, 2018).

Cherian'i ja Oliveira uuring (2006) näitas, et harilik päevalill (*Helianthus annuus*) on tõhus puhastamaks põhjavett radionukleiididest. Samuti on päevalill tõhus puhastamaks pinnast süsivesinikest (Liduino jt, 2018). Zand'i ja Hoveidi' (2016) uuringus leiti, et harilik päevalill (*Helianthus annuus*) suudab taluda naftasaaduste kontsentratsiooni kuni 5000 mg/kg. Hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) seemnete idanevus sõltub kasvukeskkonnast; mõningal juhul võib idanemise protsent olla kõigest 40%, mõningal juhul võib see olla 85-100% (Idu ja Omonhinmin, 1998).

Pajuliste sugukonda kuuluvaid pappeid (*Populus*) on edukalt kasutatud fütoremediatsiooniks (Lopez-Echartea jt, 2020). Pappeid on erinevates uuringutes kasutatud selletõttu, et nende kasv on kiire, nad on laialt levinud, suudavad toime tulla saastunud keskkonnaga ja suudavad ka keskkonda puhastada (*Ibid*). Pappeid on kasutatud puhastamiseks pinnast nii naftasaadustest kui ka raskmetallidest (*Ibid*).

Eukalüpti (*Eucalyptus camaldulensis*) võrseid fütoremediatsiooniks kasutasid oma uurimuses Taheri jt (2018), kust selgus, et eukalüpt on sobiv taim puhastamiseks pinnast naftasaadustest. Eukalüpt suudab toime tulla ka soolases pinnases (*Ibid*). Diiselkütusega saastunud pinnast on erinevates uuringutes puhastatud kalmumänniga (*Pinus densiflora*) ja elupuudega (*Thuja orientalis*) (Devatha jt, 2019).

Wang jt (2019) on oma uurimuses välja toonud, et naftasaadustega reostunud pinnast aitavad puhastada Mehhiko puuvill (*Gossypium hirsutum*), balsamiin-lemmalts (*Impatiens balsamina*) ja aed-puhmikmalts (*Bassia scoparia*). Neist balsamiin-lemmalts (*Impatiens balsamina*) on suuteline kasvama saastunud pinnases, mille naftasaaduste sisaldus on kuni 20 000 mg/kg (*Ibid*).

3. METOODIKA

3.1 Seemnete idanemiskatsed

Seemnete idanemiskatset alustati 1. juunil 2020. Katse lõppes 8. juunil 2020. Katse viidi läbi järgmiselt: igast taimeliigist (valge ristik (*Trifolium repens*), harilik lutsern (*Medicago sativa*) ja harilik päevalill (*Helianthus annuus*)) võeti 10 seemet, mis asetati niiskeks tehtud pabersalvrätide vahele, katse toimus laboritingimustes. Pabersalvrätte niisutati iga päev, et vältida nende kuivamist. Kui seemned idanema läksid, lõpetati katse.

Lisaks viidi läbi ka seemnete idanemiskatse saastunud mullas (Joonis 3.1.1.), toa temperatuuril. Katset alustati 13. märtsil 2021, katse lõppes 25. märtsil 2021. Katse viidi läbi järgmiselt: igast taimeliigist (valge ristik (*Trifolium repens*), harilik lutsern (*Medicago sativa*) ja harilik päevalill (*Helianthus annuus*)) võeti 10 seemet, külvati seemned mulda – iga liik eraldi karpi. Karbid olid täidetud 0,85 liitri ulatuses saastunud mullaga. Karpe kasteti vajadusel veega. Katse lõpetati siis, kui taimed olid hakanud idanema.



Joonis 3.1.1. Seemnete idanemiskatse saastunud mullas

3.2 Välikatse

3.2.1 Mulla keemiline ja mikrobioloogiline analüüs

Mikroobikoosluse hingamisaktiivsust (BA) saab määrata mitmel viisil, käesolevas magistritöös määrati mikroobikoosluse hingamisaktiivsust OxiTop® manomeetrilise mõõtesüsteemiga, mis on kooskõlas vastavate rahvusvaheliste standardmeetoditega (Reuschenbach jt, 2003). Analüüs toimub 100 grammist mullast (*Ibid*). Hindamaks mikroobset biomassi, kasutatakse substraadi poolt indutseeritud hingamise meetodit (SIR) (Schinner jt, 1996). Analüüs toimub 50 grammist mullast, kuhu lisatakse glükoosi (*Ibid*). Meetod põhineb eeldusel, et mikroorganismide maksimaalne hapnikutarve on proportsionaalne mikroorganismide biomassiga (*Ibid*).

Saastunud mulla koondproovidest määrati 29.05.2020 ja 28.07.2020 mikroobikoosluse hingamisaktiivsus (BA) ja biomass substraadi poolt indutseeritud hingamise meetodil (SIR) (Reuschenbach jt, 2003; Schinner jt, 1996) ning mulla kuivaine sisaldus, määramine toimus Tallinna Tehnikaülikooli Tartu kolledži tööstusökoloogia laboris. Eesti Maaülikooli Taimebiokeemia Laboris määrati mullas keemilised näitajad: üldlämmastiku sisaldus, üldfosfori sisaldus, kaaliumisisaldus, magneesiumisisaldus, kaltsiumisisaldus, mullahappesus (pH_{KCl}), mulla orgaanilise aine sisaldus.

3.2.2 Fütoremediatsioon

Välikatse viidi läbi AS Epler & Lorenz väliterritooriumil, Tartus, Ravila 75a (Joonis 3.2.2.1.). Saastunud mullaga täideti 9 kasti, puhta mullaga (Biolan aiamaa must muld) 3 kasti, kokku 12 kasti, ühe kasti maht 80 liitrit. Kastid täideti mullaga $\frac{3}{4}$ ulatuses ning kastide alumisse osasse tehti mõned väikesed augud, et liigne vesi saaks ära voolata. Mullaga täidetud kastidesse külvati valge ristiku (*Trifolium repens*), hariliku lutserni (*Medicago sativa*) ja hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) seemned. Katse kestis kokku viis kuud (29.05.2020 kuni 29.10.2020).

Mulla lõimis määrati sõrmeprooviga (Astover jt, 2017). Valge ristiku (*Trifolium repens*) ja hariliku lutserni (*Medicago sativa*) külvamisel lähtuti heinaseemnete külvi (Selge, 2014) soovitusel, hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) külvamisel lähtuti internetilehekülje Aednik24 (Aednik24, 2020) soovitustest.

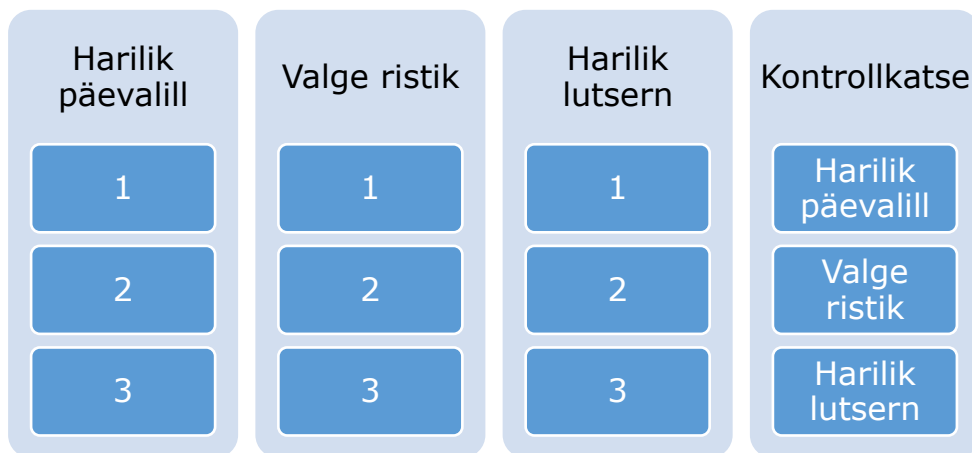
Lisaks viidi läbi veel üks korduskatse saastunud mullaga, kus külvati kõik kolm taimekultuuri (valge ristik, harilik lutsern ja harilik päevalill) ühte kasti. Korduskatse

seemned külvati 23.07.2020. Korduskatse kast jäeti sarnaselt eelnevale katsele ilmastiku kätte.



Joonis 3.2.2.1. Välikatse 14.07.2020

Saastunud mullaga kastides tehti kolm korduskatset: kolme kasti külvati valge ristiku seemned, kolme kasti külvati hariliku lutserni seemned ja kolme kasti külvati hariliku päevalille seemned (Joonis 3.2.2.2.). Puhta mullaga kastides tehti kontrollkatse: ühte kasti külvati valge ristiku seemned, ühte kasti külvati hariliku lutserni seemned ja ühte kasti hariliku päevalille seemned. Mullaga täidetud kastid jäeti ilmastiku kätte. Ilmastikunäitajad – sademed ja keskmine õhutemperatuur – saadi Riigi Ilmateenistuse lehelt, Eesti meteoroloogia aastaraamatust 2020 (Keskkonnaagentuur, 2021).



Joonis 3.2.2.2. Välikatse skeem

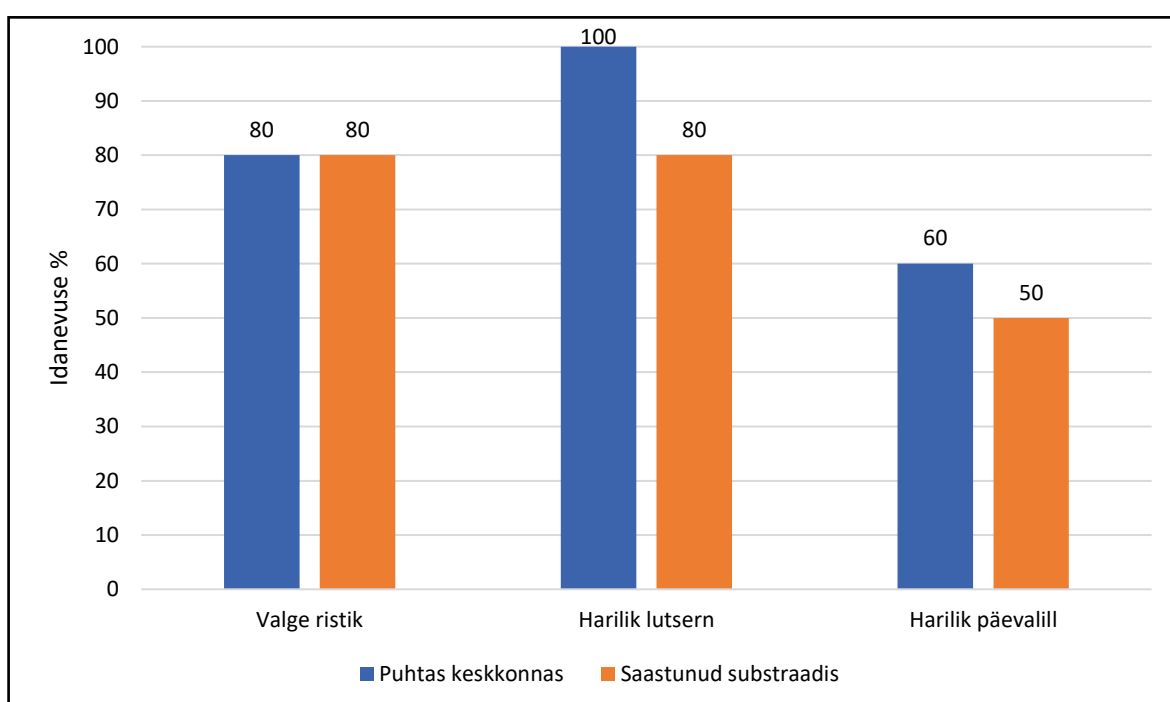
Katse käigus võeti mullaproovid. Esimene proov võeti kastidest 29.05.2020 enne taimeseemnete külvamist, teine proov võeti katse keskel (28.07.2020). AS-i Epler & Lorenz laboris määrati laborijuhi poolt saastunud pinnase naftasaaduste sisaldus süsivesinikest C10-C40 EVS-EN-16703:2011 (Eesti Standardimis- ja Akrediteerimiskeskus, 2011) meetodil 100 grammist saastunud pinnasest (Lisa 1 ja 2).

Andmete analüüsimisel ja töötlemisel kasutati Microsoft Office Excel 2016 programmi. Leiti keskmised väärtused koos keskmiste aritmeetiliste vigadega. Lisaks töödeldi andmeid CANOCO 4.52 ja STATISTICA 10.0 programmiga, kasutati mitteparameetrilist meetodit – Spearmani korrelatsioonianalüüsi.

4. TULEMUSED

4.1 Seemnete idanemiskatsed

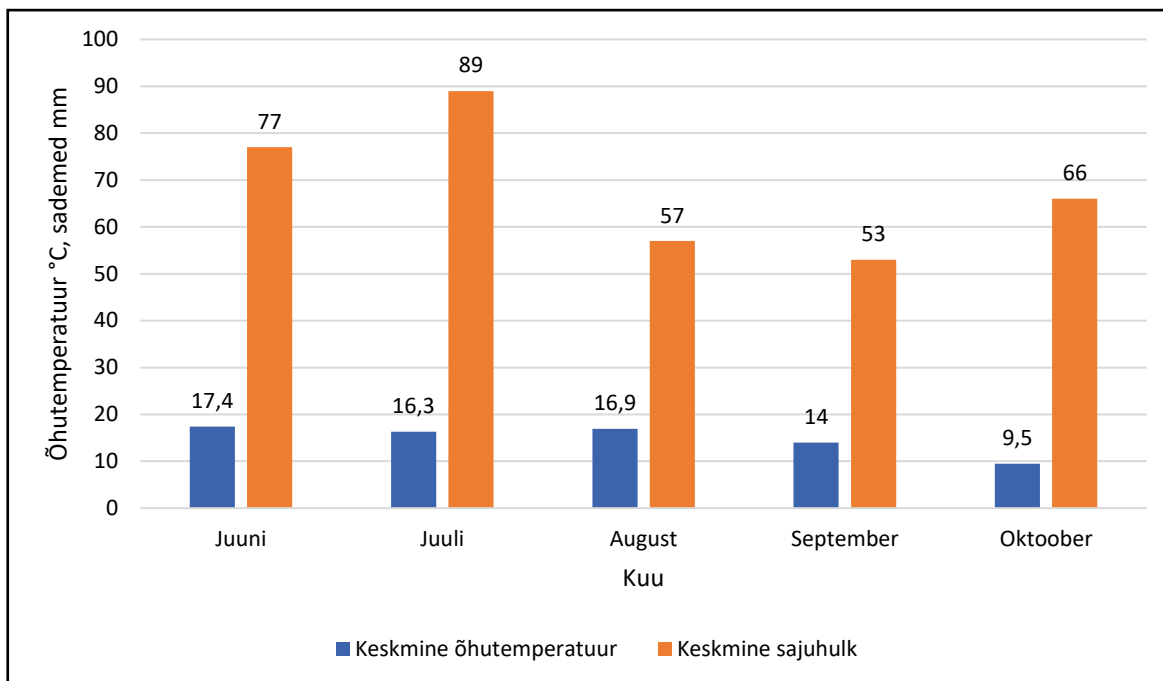
Seemnete idanemiskatsete tulemused on välja toodud joonisel 4.1.1. Puhtas keskkonnas oli hariliku lutserni (*Medicago sativa*) korral seemnete idanevus 100%. Madalaim idanevus oli harilikul päevalillel (*Helianthus annuus*), kus idanes 60% katses kasutatud seemnetest. Saastunud substraadis andsid kõrgeimad tulemused – 80% – nii valge ristik (*Trifolium repens*) kui ka harilik lutsern (*Medicago sativa*). Madalaima tulemuse andis harilik päevalill (*Helianthus annuus*) – 50% (Joonis 4.1.1.).



Joonis 4.1.1. Valge ristiku, hariliku lutserni ja hariliku päevalille seemnete idanevus

4.2 Välikatse

Joonisel 4.2.1 on esitatud katses vaadeldava perioodi (29.05.-29.10.2020) ilmastikunäitajad. Keskmine õhutemperatuur ületas normi juunis (norm 14,4 °C), augustis (norm 16,3 °C), septembris (norm 11,5 °C) ja oktoobris (norm 6,7 °C). Keskmine sajuhulk ületas normi juunis (norm 69 mm) ja juulis (norm 72 mm). (Keskkonnaagentuur, 2021)



Joonis 4.2.1.1. Ilmastikunäitajad katse perioodil (andmed: Keskkonnaagentuur, 2021)

4.2.1 Mulla keemiline ja mikrobioloogiline analüüs

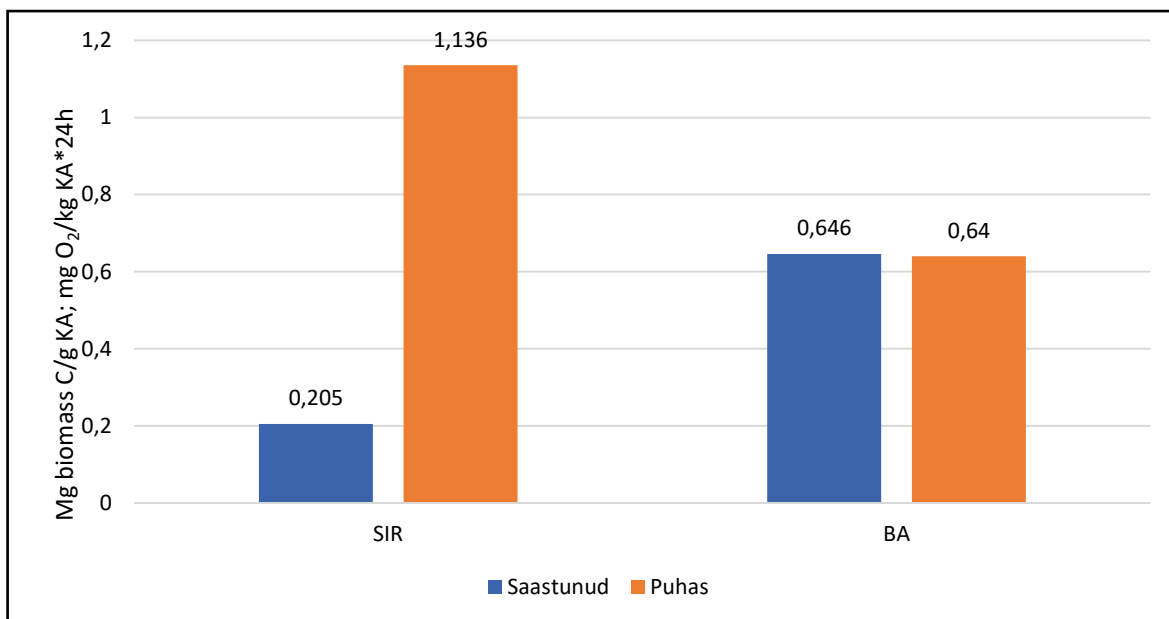
Puhtast ja saastunud pinnasest võetud koondproovide põhjal määrati muldade keemilised näitajad (Tabel 4.2.1.1). Võrreldes puhtast ja saastunud pinnast, oli mulla happesus madalaim puhtas pinnases (5,12), kuid ülejäänud muldade keemilised näitajad olid kõrgemad puhtas pinnases (Tabel 4.2.1.1). Saastunud mulla lõimiseks määrati sõrmeprooviga keskmine liivsavimuld.

Tabel 4.2.1.1. Puhta ja saastunud pinnase keemilised näitajad

Proov	pH _{KCl}	N %	P mg/kg (AL)	K mg/kg (AL)	Mg mg/kg	Ca mg/kg	Org.aine %
Puhas	5,12	2,335	83,35	607,5	1140,1	5578,7	77,38
Saastunud	7,27	0,077	39,94	57,1	57,5	1452,2	3,63

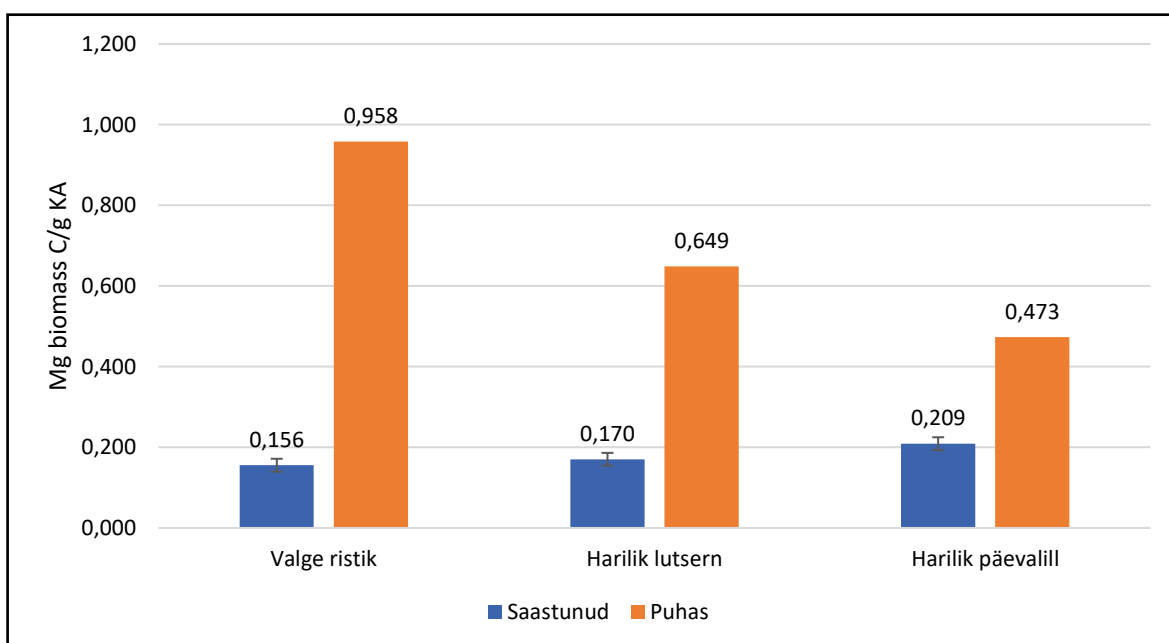
Katse alguses (29.05.2020) puhtast ja saastunud pinnasest võetud koondproovide mikroobse biomassi substraadi poolt indutseeritud hingamise (SIR) ja mulla organismide hingamisaktiivsuse (BA) näitajad on esitatud joonisel 4.2.1.1. Suurim erinevus puhta ja saastunud pinnase näitajates oli mikroobse biomassi substraadi poolt

indutseeritud hingamise (SIR) korral, vastavalt 1,136 (mg biomass C/g KA) ja 0,205 (mg biomass C/g KA) (Joonis 4.2.1.1).



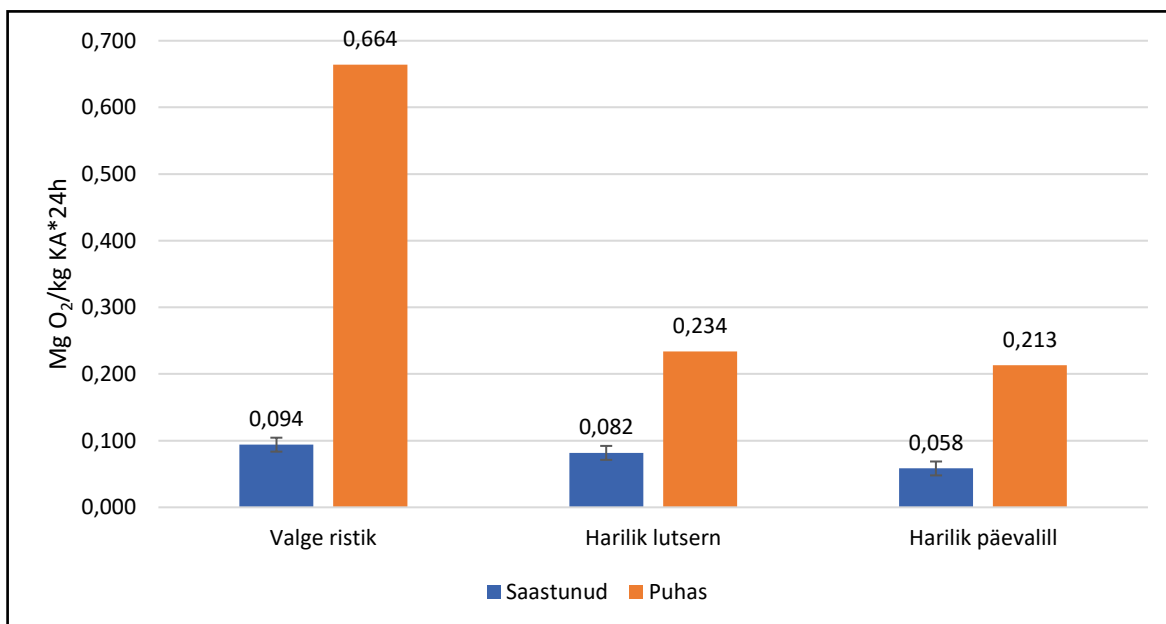
Joonis 4.2.1.1. Puhtast ja saastunud pinnasest võetud SIR ja BA koondproovide näitajad

Fütoremediatsiooni 28.07.2020 võetud muldade mulla mikroobne biomass, mida määrati indutseeritud hingamise (SIR) meetodil, on esitatud joonisel 4.2.1.2. Kontrollkatsena (puhta pinnasena) on esitatud SIR näitajad ühe kasti mulla koondproovist võetud näitaja. Saastunud pinnase puhul on võetud kolme kasti keskmine näitaja koos aritmeetilise veaga. Kõige madalam tulemus oli saastunud pinnase valge ristiku (*Trifolium repens*) proovikastides - 0,156 ± 0,013 (mg biomass C/g KA). Kõige kõrgem tulemus oli puhta pinnasega valge ristiku (*Trifolium repens*) proovikastis - 0,958 (mg biomass C/g KA).



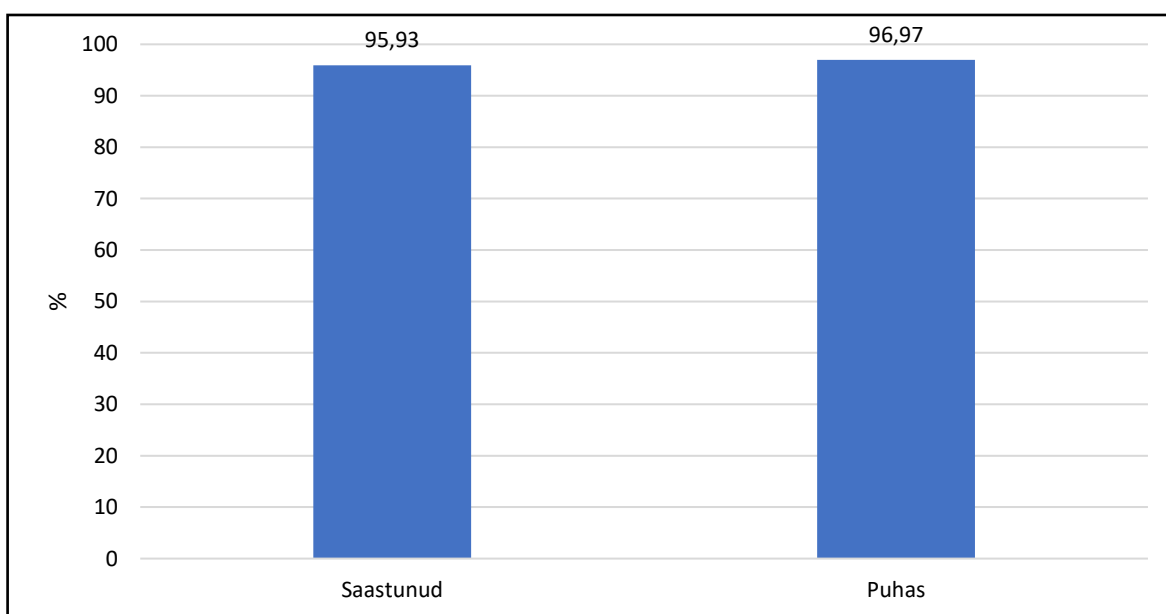
Joonis 4.2.1.2. Mulla mikroobne biomass saastunud ja puhtas pinnases

Joonisel 4.2.1.3 on mulla organismide hingamisaktiivsuse tulemused. Kontrollkatsena (puhta pinnasena) on esitatud mulla organismide hingamisaktiivsuse (BA) näitajad ühe kasti mulla koondproovist võetud näitaja. Saastunud pinnase puhul on võetud kolme kasti keskmine näitaja koos aritmeetilise veaga. Madalaim mulla hingamisaktiivsus oli saastunud pinnasega hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) proovikastides – $0,058 \pm 0,007$ (mg O₂/kg KA*24h). Kõrgeim mulla organismide hingamisaktiivsus oli puhta pinnasega valge ristiku (*Trifolium repens*) proovikastis – 0,664 (mg O₂/kg KA*24h).



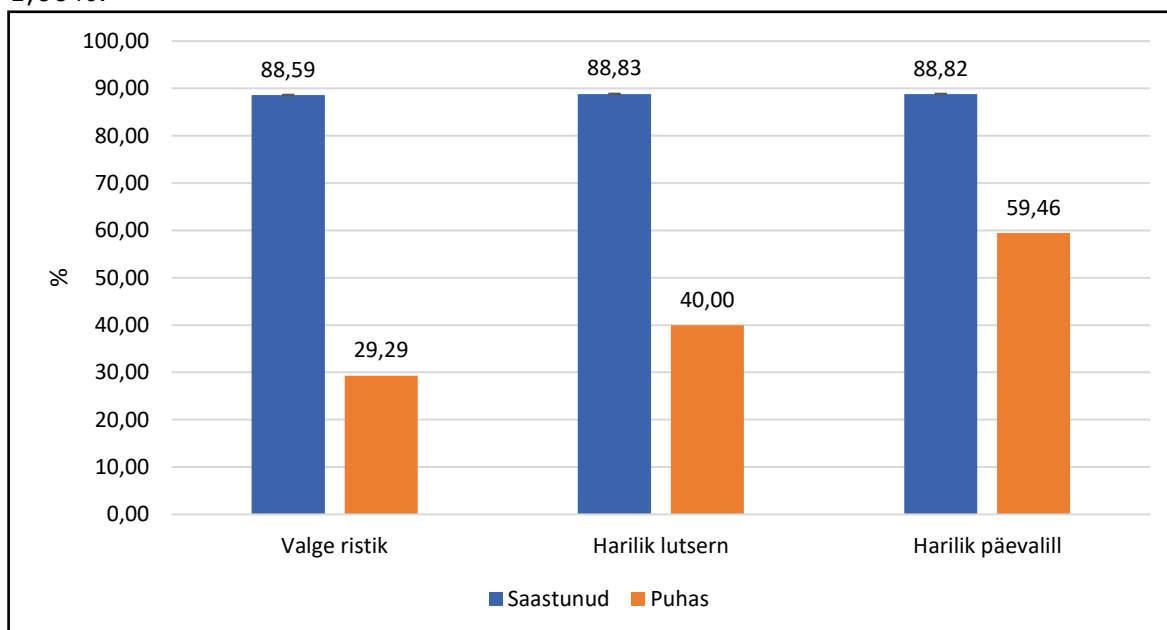
Joonis 4.2.1.3. Mikroobne hingamisaktiivsus saastunud ja puhtas pinnases

Katse alguses (29.05.2020) puhtast ja saastunud pinnasest võetud koondproovide mulla kuivaine sisaldused on esitatud joonisel 4.2.1.4. Mulla kuivaine sisaldus puhtas pinnases oli 96,97%, mulla kuivaine sisaldus saastunud pinnases oli 95,93%.



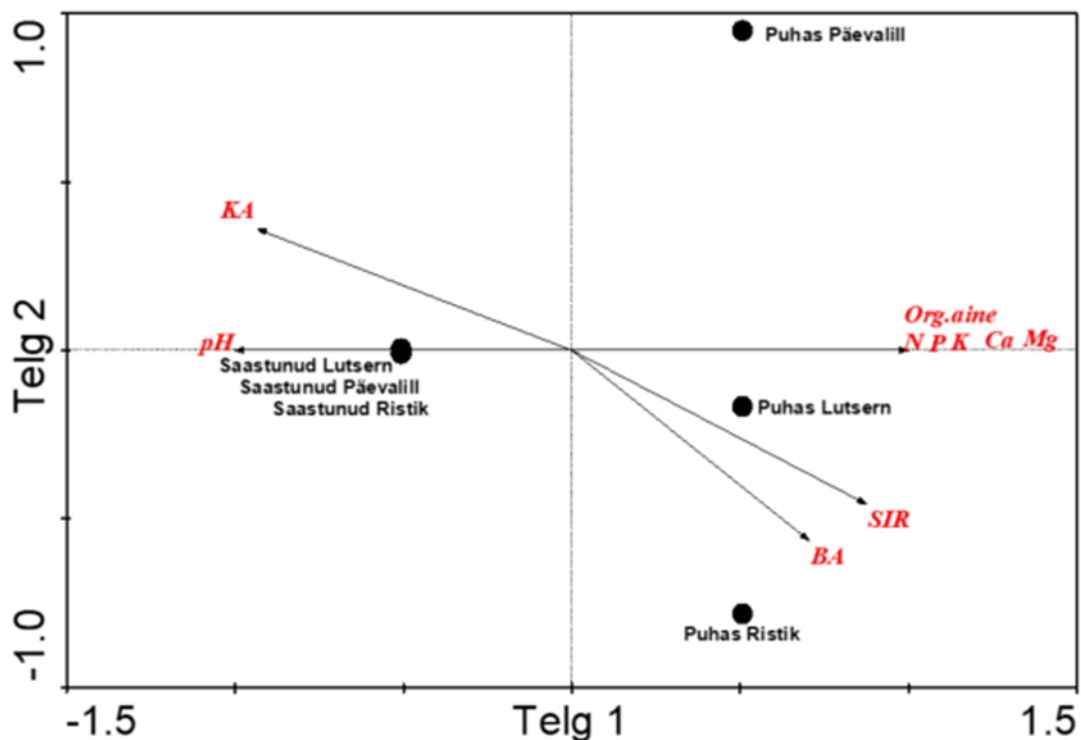
Joonis 4.2.1.4. Mulla kuivaine sisalduse koondproovide tulemused saastunud ja puhtast pinnasest

Joonisel 4.2.1.5 on välja toodud mulla kuivaine sisaldus 28.07.2020 võetud proovidest. Kontrollkatsena (puhta pinnasena) on esitatud mulla kuivaine sisaldus ühe kasti mulla koondproovist võetud näitaja. Saastunud pinnase puhul on võetud kolme kasti keskmine näitaja koos aritmeetilise veaga. Madalaim kuivaine sisaldus oli puhta pinnasega valge ristiku (*Trifolium repens*) proovikastis – 29,29%. Kõrgeim kuivaine sisaldus oli saastunud pinnasega hariliku lutserni (*Medicago sativa*) proovikastides – 88,83% ± 1,00%.



Joonis 4.2.1.5. Mulla kuivaine sisaldus saastunud ja puhtas pinnases

Joonisel 4.2.1.6. on esitatud saastunud ja puhta pinnase keemiline ja mikrobioloogiline peakomponentide analüüs (PCA). Mikroobse biomassi substraadi poolt indutseeritud hingamine (SIR) ja mikroobne hingamisaktiivsus (BA) korreleerusid statistiliselt usaldusväärset (p<0,05) negatiivselt pinnase happesusega (pH) (R=-0,8783) ja positiivselt keemiliste näitajatega (N, P, K, Mg, Ca, Org. aine) (R=0,8783). Mikroobse biomassi substraadi poolt indutseeritud hingamine (SIR) ja mikroobne hingamisaktiivsus (BA) korreleerusid negatiivselt saastunud ja puhta pinnase kuivaine sisaldusega, vastavalt R=-0,8286 ja R=-0,9429.



Joonis 4.2.1.6. Parameetrite kanooniline peakomponentide analüüs (*Principal component analysis, PCA*). Tähisted: jooned on keskkonnatingimused; must täpp- proovi nimetus.

4.2.2 Fütoremediatsioon

Naftasaaduste sisaldus saastunud pinnases oli enne seemnete külvamist 2310 mg/kg (Lisa 1), hilisem proov näitas naftasaaduste sisalduseks pinnases 2250 mg/kg (Lisa 2).

Välikatse esimeses pooles läksid taimed kasvama nii puhta mullaga kastides kui ka saastunud mullaga kastides (Joonis 4.2.2.1.). Kõik kastid olid välitingimustes. Kastide esimese veerandi peale (maapinnast alates) oli tehtud mitmeid auke, et liigne vesi saaks ära voolata. Katse keskel saastunud mullaga kastides taimede kasv peatus, puhta mullaga kastides taimede kasvamine jätkus. Välikatse korduskatse kastis, kuhu oli külvatud kolme taime seemned (valge ristik, harilik lutsern, harilik päevalill), ükski taim kasvama ei läinud.



Joonis 4.2.2.1. Hariliku lutserni (*Medicago sativa*) I proovikast, 14.07.2020

5. ARUTELU

Koos elanikkonna suurenemisega kasvab vajadus energia järele (Abbasian jt, 2016). Tänapäeval on üks peamisi energiaallikaid nafta (*Ibid*). Pidev vajadus naftasaaduste järele sunnib tootjaid üha enam toornaftat kaevandama (*Ibid*). Nafta kaevandamisel, transportimisel ja töötlemisel võib juhtuda õnnetusi, kus nafta lekib ja satub vette või pinnasesse (Ojewumi jt, 2018). Naftasaadustega vee ja pinnase reostumine on üks suuremaid keskkonnaprobleeme maailmas (Min-Zoo jt, 2010).

Mulla roll erinevates ökosüsteemiteenustes on väga oluline (Breure, 2004). Näiteks juhib muld saasteainete lagunemise protsesse (*Ibid*). Euroopa Liidu õigusaktidesse on muld kirja pandud kui taastumatu loodusvara, seega tuleb mulda hoida ja kaitsta (*Ibid*). Mitukümmend aastat on inimtegevuse tõttu sattunud vette ja pinnasesse erinevaid kemikaale (Kumar jt, 2018). Naftasaadustega reostunud pinnas mõjutab negatiivselt nii mullas olevaid taimi kui ka mullas elavaid mikroobe, samuti on mõjutatud ka mullastruktuur (*Ibid*).

Naftareostuse vastu on võimalik võidelda mitmel viisil – seda saab teha füüsikaliste, keemiliste ja bioloogiliste vahenditega (Abbaspour jt, 2020). Üks viis puhastamiseks naftasaadustega reostunud pinnast on kasutada fütoremediatsiooni ehk taimtervendamist (Chibueze Azubuike jt, 2016). Taimed suudavad süsivesinikud muundada kahjututeks, mittetoksilisteks vormideks (Mohsenzadeh jt, 2010).

Käesolevas lõputöös valiti naftasaadustega reostunud pinnase puhastamise katsetamiseks kolm taime: valge ristik (*Trifolium repens*), harilik lutsern (*Medicago sativa*) ja harilik päevalill (*Helianthus annuus*). Valik toimus selle põhjal, et nende taimedega on edukalt varasemalt katsetusi läbi viidud (Shi jt, 2018; Sheng-You jt, 2009; Liduino jt, 2018).

5.1 Seemnete idanemine

Seemnete idanemiskatse esimeses pooles, salvräti vahele pannes, läks 100%-liselt kasvama harilik lutsern (*Medicago sativa*). Hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) puhul

läks kasvama ainult 60% seemnetest, mis on ilmselt tingitud asjaolust, et hariliku päevalille seemnete puhul varieerub idanemine sõltuvalt kasvukeskkonnast 40-85%, mõningal juhul isegi 100%, kui on lisatud kasvukeskkonda toitaineid (Idu ja Omonhinmin, 1998).

Seemnete idanemiskatses saastunud mullas läksid 80%-liselt kasvama nii valge ristik (*Trifolium repens*) kui ka harilik lutsern (*Medicago sativa*). Võrreldes eelmise idanemiskatsega, mis viidi läbi seemneid salvräti vahel niisutades, oli hariliku lutserni (*Medicago sativa*) idanevus väiksem. See võib olla tingitud sellest, et katse viidi läbi naftasaadustega saastunud mullas ning selline muld ei pruukinud täielikult sellele taimetele sobida. Valge ristiku (*Trifolium repens*) kasv ei olnud mõjutatud naftasaadustega saastunud pinnasest, sama tulemuseni jõuti ka Sheng-You jt (2009) uuringus.

Hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) seemnetest saastunud mullas läks kasvama 50% ebasobiva kasvukeskkonna tõttu ning selle tõttu, et hariliku päevalille seemnete idanevuse protsent on madalam kui teistel taimedel käesolevas töös.

5.2 Välikatse

5.2.1 Mulla keemiline ja mikrobioloogiline analüüs

Naftasaadusega reostunud pinnas on ülemaailmne keskkonnaprobleem (Min-Zoo jt, 2010). Kui naftasaadused on sattunud keskkonda, on negatiivselt mõjutatud põhjavesi, põllumajandus, üldine elustik ja muld (Ojewumi jt, 2018; Kovaleva jt, 2020). Naftasaadused võivad mulda sattudes muuta selle füüsikalisi ja keemilisi omadusi, mis on ohtlik erinevatele ökosüsteemidele (Liang jt, 2016).

Eesti Maaülikooli Taimbiokeemia laboris määratud mulla keemilistest näitajatest selgub, et puhtas pinnases olid kõik näitajad (N %, P mg/kg, K mg/kg, Mg mg/kg, Ca mg/kg, org.aine %) peale mulla happesuse (pH_{KCl}) oluliselt kõrgemad kui saastunud pinnases. Saastunud pinnase madalad keemilised näitajad võisid olla tingitud sellest, et tegemist oli naftasaaduseid sisaldava pinnasega, mis omakorda võis muuta mulla keemilisi näitajaid. Naftasaadused muudavad mulla füüsikalisi ja keemilisi omadusi, mille tõttu on see ohtlik erinevatele ökosüsteemidele (Liang jt, 2016). Naftasaadustega

reostumine võib mullamikroobide populatsioone ja neid ümbritsevat pinnast sedavõrd muuta, et edasine elutegevus mullas on peatatud (Abbasian jt, 2016).

Üldiselt leidub puhtas mullas palju erinevaid mikroorganisme, kuid pinnase reostumisel naftasaadustega on negatiivselt mõjutatud erinevate mikroobikoosluste struktuurid ja nende mitmekesisus (Wang jt, 2017; Liang jt, 2016). Lisaks võib naftasaadustega reostunud pinnas pärssida taimede kasvu ning muuta neid vastuvõtlikumateks erinevatele kahjuritele ja haigustele (*Ibid*).

Alljärgnevad tulemused on esitatud järgmiselt: kontrollkatsena on esitatud ühest puhta mullaga kastist koondproovist võetud näitaja; saastunud pinnase puhul on võetud kolme kasti keskmine näitaja koos aritmeetilise veaga.

Tallinna Tehnikaülikooli Tartu kolledži mullabioloogia laboris määrati nii saastunud pinnase kui ka puhta pinnase mikroobse biomassi substraadi poolt indutseeritud hingamine (SIR) ja mulla organismide hingamisaktiivsus (BA). Koondproovide tulemused näitasid, et puhta mullaga kastides oli SIR näitaja kõrgem kui saastunud mulla kastides (vastavalt 1,136 ja 0,205 mg biomass C/g KA). See on tõenäoliselt tingitud sellest, et puhtaks mullaks oli valitud Biolani must muld, mida kasutatakse spetsiaalselt taimede kasvatamiseks, ent saastunud mullas leidis naftasaadusi, mis võisid SIR näitajaid alla tuua. Liiga kõrge saasteainete kontsentratsioon pärsib Omosiowho (2014) järgi mulla mikroobide elutegevust. Mulla organismide hingamisaktiivsus oli nii saastunud kui ka puhtas pinnases ligikaudu sama.

Võrreldes saastunud pinnase proove puhta pinnase proovidega, oli saastunud pinnasega täidetud proovikastides SIR näitajad oluliselt madalamad. Kõige madalam tulemus oli saastunud pinnase valge ristiku (*Trifolium repens*) kastides, kõige kõrgem tulemus aga puhta pinnasega valge ristiku (*Trifolium repens*) kastis (vastavalt $0,156 \pm 0,013$ ja $0,958$ mg biomass C/g KA). Kusjuures teistes puhta pinnasega kastides, hariliku lutserni (*Medicago sativa*) ja hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) kastis, olid näitajad tunduvalt madalamad kui valge ristiku (*Trifolium repens*) kastis. Erinevus võib tuleneda sellest, et mikroorganismidele sobis antud kolmest taimest enim just valge ristik (*Trifolium repens*).

Mikroobikoosluse hingamisaktiivsus (BA) oli sarnaselt mikroobse biomassiga kõrgem puhta pinnasega kastides. Madalaim näit saastunud pinnasega kastides oli hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) kastides ($0,058 \pm 0,007$ mg O₂/kg KA*24h), kõrgeim aga valge ristiku (*Trifolium repens*) puhta pinnasega kastis. Sarnaselt mikroobse biomassiga oli ka mikroobikoosluse hingamisaktiivsus kõrgeim puhta pinnasega valge

ristiku (*Trifolium repens*) kasti, mis võib viidata sellele, et tagamaks aktiivne mikroobide elutegevus pinnases, võiks pinnase puhastamisel kasutada valget ristikut.

Mulla kuivaine sisaldus erines saastunud ja puhtast pinnasest võetud koondproovidest ainult ligikaudu 1% võrra. Proovikastide kaupa oli saastunud pinnase kuivaine sisaldus suurem kui puhta pinnasega kastides, mis, võrreldes SIR ja BA näitajatega, võib oluliselt mõjutada mullamikroobide elutegevust.

Joonisel 4.2.1.6 on esitatud tulemuste usaldusväärsed seosed keskkonnaparameetritega, kust selgub, et mikroobne biomass ja mikroobide hingamisaktiivsus on oluliselt kõrgemate näitajatega puhta pinnasega proovides. Mulla happesus (pH) ja mulla kuivaine (KA) sisaldus korreleerusid statistiliselt usaldusväärselt negatiivselt saastunud ja puhta pinnasega (vastavalt $R=-0,8783$ ja $R=-0,8286$ ja $R=-0,9429$). Tõenäoliselt on puhta mulla keemilised näitajad (N, P, K, Ca, Mg, org. aine) märkimisväärselt sobivamad mulla mikroobidele kui saastunud mulla keemilised näitajad.

5.2.2 Fütoremediatsioon

Fütoremediatsioon on üks bioremediatsiooni liike, mille abil on võimalik puhastada naftasaadusega reostunud pinnast (Chibueze Azubuike jt, 2016). Taimede erinevate omaduste – füüsikaliste, biokeemiliste, bioloogiliste, keemiliste ja mikrobioloogiliste – abil saab leevendada naftasaaduste saasteainete kahjulikkust (*Ibid*). Taimed suudavad kahjulikud süsivesinikud muundada mittetoksilisteks vormideks (Mohsenzadeh jt, 2010).

Naftasaaduste sisaldus saastunud pinnases oli enne seemnete külvamist 2310 mg/kg (Lisa 1), hilisem proov näitas naftasaaduste sisalduseks pinnases 2250 mg/kg (Lisa 2), mis Riigiteataja (2019) järgi jääb lubatud piirmäära sisse ning seda pinnast võib tööstusmaale ladestada või kasutada tööstusmaal täitepinnasena. Tööstusmaal on lubatud naftasaaduste piirväärtus kuni 5000 mg/kg, elumaal on lubatud naftasaaduste piirväärtus kuni 500 mg/kg (Keskkonnaministri 28.06.2019 määrus nr 26) (Riigiteataja, 2019).

Bioremediatsioon saab toimuda kõige paremini kruusasel või liivasel mullal (Evans ja Furlong, 2003) ning see võis olla üks põhjustest, miks käesoleva magistritöö katses saastunud mullaga kastides taimed kasvama ei läinud – tegu oli keskmise liivsavimullaga. Omosiowho (2014) on öelnud, et liiga tihe muld mõjutab mulla niiskuseisisaldust ja õhustatust.

Käesolevas töös läbi viidud välikatses saastunud mullaga kastides läksid taimed alguses küll kasvama, ent suurte sajuhoogude tõttu katse esimeses pooles jäi taimede kasv kesiseks ning liigniiskuse tõttu edasine kasv peatus. Puhta mullaga kastides kasvasid taimed tavapäraselt ning liigniiskust ei täheldatud. Liigne mullaniiskus pärsib mikroobide elutegevust ja taimede kasvu (Omosiowho, 2014).

Idanemiskatsed olid suure tõenäosusega sellepärast edukamad kui välikatsed, et need toimusid kontrollitud temperatuuril ja niiskustasemel, mis arvatavasti mängis olulist rolli välikatsel.

5.3 Soovitused edukaks fütoremediatsiooniks

Mitmetes uuringutes (Evans ja Furlong, 2003; Omosiowho, 2014) on leitud, et edukaks bioremediatsiooniks peaks muld olema hea tekstuuriga, see tähendab, et mulla vee ja õhu läbilaskvus on hea (sobivad kruusased ja liivased mullad); olulist rolli mängivad ka kliimanäitajad – sademed, ümbritsev õhutemperatuur ja tuul. Kui sademeid on liiga palju, võib tekkida mullas liigniiskus, mis pärsib mulla mikroobide ja taimede kasvu (*Ibid*). Samuti peaks olema õhutemperatuur taimede kasvuks optimaalne (*Ibid*). Mõningates kohtades võib tugeva tuule tõttu tekkida pinnase erosioon, mis samuti pärsib mulla mikroobide ja taimede bioremediatsiooni võimet (*Ibid*).

Fütoremediatsioonil on mõned puudused, millega tuleks selle tehnoloogia kasutamisel arvestada (Narendrula-Kotha jt, 2018). Esiteks, fütoremediatsioon on aeganõudev protsess, sest taimede idanemine ja kasvamine võtab aega (*Ibid*). Teiseks, tuleb arvestada kliimateguritega, mis tähendab seda, et taimedel on kasvuks vaja optimaalset õhutemperatuuri ja parajas koguses sademeid (*Ibid*). Kolmandaks, tuleb hoolega jälgida taimede edasist käitlust, kui nad on fütoremediatsiooni protsessi lõpetanud, sest mõningal juhul võib pinnast puhastanud taim olla ise järgmine saastaja (*Ibid*).

Reostuseid on kahte tüüpi – elemendipõhine reostus ja orgaaniline reostus (Chibueze Azubuike jt, 2016). Orgaanilisi saasteaineid, sealhulgas naftasaaduseid, saab puhastada fütodegradatsiooni, risodegradatsiooni, fütostabilisatsiooni ja fütovolatilisatsiooni abil (*Ibid*). Luues head elutingimused mulla mikroobide elutegevuseks ja taimede kasvamiseks, on võimalik saastunud pinnast edukalt puhastada naftasaadustest

(Omosiowho, 2014). Kui naftasaaduste kontsentratsioon on liiga kõrge, on soovitatud saastatud mulda segada puhta mullaga, et mulla mikroobide elutegevust vähem häirida (*Ibid*).

Naftasaadustega saastunud pinnases looduslikult kasvavad taimed on suure tõenäosusega sobilikud ka fütoremediatsiooniks (TaHERi jt, 2018; Chibueze AzubuikE jt, 2016). Valides taime fütoremediatsiooniks, tuleks arvestada järgmist (*Ibid*):

- Taime biomass – kõrge biomassiga taimed on head pinnase puhastamiseks naftasaadustest, selleks sobivad ka kiirekasvulised puud (*Ibid*).
- Taime saasteainete neeldumisvõime – taimed peavad taluma antud saasteainet ja sellega kohanema (*Ibid*). Kui on teada, et mõni kindel liik kindlat sorti saasteainet ei talu, tuleks kaaluda teise taime kasutamist (*Ibid*).
- Taime juurestik – hargnev juurestik on sobilik juhul, kui reostus on maapinna lähedal; peajuurne taim on sobilik juhul, kui reostus on sügaval maapinnas (*Ibid*).
- Taimede kasvukiirus – mida kiiremini kasvab taim, seda kiiremini saab alata fütoremediatsiooni protsess (*Ibid*). Kindlasti tuleb arvestada ajakuluga, sest erinevad taimed kasvavad eri kiirusega (*Ibid*).

Üks enim kasutatavaid taimede sugukondi, mida fütoremediatsioonil kasutatakse, on ristõielised (Sharma ja Pandey, 2014). Kuna naftasaaduste reostusega kaasneb tihtipeale ka raskmetallide reostus, peaks edukaks fütoremediatsiooniks valima taime, millel on kas a) väike biomass, ent kõrge potentsiaal raskmetallide kogumiseks või b) suur biomass, mis suudab samuti raskmetalle koguda (*Ibid*).

Uuringud on näidanud, et invasiivsed taimeliigid on palju vastupidavamad saasteainete suhtes kui põlisliigid (Prabakaran jt, 2019). Kuigi erinevate võõrliikide sissetoomine teise looduslikku keskkonda pole soovitatav, tuleks fütoremediatsioonil arvestada seda, et võõrliigid on edukamad puhastamiseks saastunud pinnast naftasaadustest (*Ibid*). Lisaks sellele on neil suurem resistentsus taimtoiduliste loomade suhtes, nad on vastupidavamad patogeenidele, on allelopaatilised ja taluvad paremini põuda (*Ibid*).

Eriti tõhusaks saastunud pinnase puhastamiseks on soovitatud kasutada erinevaid saneerimistehnoloogiaid (Zhang jt, 2020). Omavahel kombineeritud puhastustehnoloogiaid aitavad parandada pinnase puhastamise efektiivsust ja kiirendavad puhastumise protsessi (*Ibid*). Kõige sagedamini on koos kasutatud taimi ja mikroorganisme (*Ibid*). Ühelt poolt aitavad mikroobid ja nende elutegevus kaasa taime

kasvule ning vastupidavusele saasteainete suhtes; teisalt pakuvad taimed oma juurtel mikroorganismidele vajalikku kasvukeskkonda (*Ibid*).

Käesoleva magistritöö järelused on: saastunud pinnases idanesid kõige paremini valge ristik (*Trifolium repens*) ja harilik lutsern (*Medicago sativa*), puhtas pinnases oli kõrgeim idanevus harilikul lutsernil (*Medicago sativa*). Mikroobse biomassi näitajad naftasaadustega saastunud pinnases olid kõige kõrgemad hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) kastides, puhtas pinnases olid kõrgeimad näitajad valge ristiku (*Trifolium repens*) kastis. Mullamikroobide hingamisaktiivsuse näitajad naftasaadustega saastunud pinnases olid kõige kõrgemad valge ristiku (*Trifolium repens*) kastides, puhtas pinnases olid kõrgeimad näitajad valge ristiku (*Trifolium repens*) kastis. Fütoremediatsiooni mõjutab ümbritsev õhutemperatuur, mulla lõimise, sademete hulk ja mikroobikoosluse aktiivsus.

KOKKUVÕTE

Üha enam tuntakse muret pinnase, pinna- ja põhjavee toksiliste kemikaalidega saastumise pärast (Kumar jt, 2018). Industrialiseerimisega kaasnev pidev nafta kaevandamine ja naftasaaduste kasutamine on tekitanud olukorra, kus pinnas, pinnavesi ja põhjavesi on naftasaadustega saastunud ja see on muutunud globaalseks keskkonnaprobleemiks (*Ibid*). Saastunud alade puhastamine ja nende kasutuselevõtt loob mitmeid eeliseid, kuid peamiselt paraneb inimeste ja looduse elukvaliteet (Zand ja Hoveidi, 2016). Fütoremediatsiooni ehk taimtervendamist peetakse kuluefektiivseks bioremediatsiooni meetodiks, mille abil saab pinnast puhastada naftasaadustest (Wang jt, 2019). Fütoremediatsioonil kasutatakse rohelisi taimi, mis suudavad ohtlikud kemikaalid ja naftasaadused muundada ohutuks materjaliks (*Ibid*).

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli välja selgitada fütoremediatsiooni mõjutavad faktorid, taimede idanevus saastunud ja puhtas pinnases ning analüüsida mikroobikoosluse näitajaid saastunud ja puhtas keskkonnas. Töö kahes esimeses peatükis anti ülevaade teemaga seotud seadusandlusest, naftasaaduste mõjust keskkonnale ja erinevatest bioremediatsiooni meetoditest ja fütoremediatsioonist. Järgnevas peatükis anti ülevaade, millist meetodikat töö katsete käigus kasutati. Seejärel esitati katsete tulemused ja tulemuste põhjal tehti analüüs.

Töös viidi läbi idanemiskatsed ja välikatse, kus uuriti kolme taime, valge ristiku (*Trifolium repens*), hariliku lutserni (*Medicago sativa*) ja hariliku päevalille (*Helianthus annuus*), idanemist saastunud pinnases ja puhtas pinnases. Idanemiskatsed toimusid laboritingimustes, välikatse toimus looduslikes tingimustes. Käesolevas magistritöös määrati mulla mikrobioloogilised näitajad järgmiste meetoditega: mikroobikoosluse hingamisaktiivsus (BA) ja mikroobikoosluse biomass substraadi poolt indutseeritud hingamise (SIR) meetod (Reuschenbach jt, 2003; Schinner jt, 1996). Andmete analüüsimisel ja töötlemisel kasutati Microsoft Office Excel 2016 programmi. Leiti keskmised väärtused koos keskmiste aritmeetiliste vigadega. Lisaks töödeldi andmeid CANOCO 4.52 ja STATISTICA 10.0 programmiga, kasutati mitteparameetrilist meetodit – Spearmani korrelatsioonianalüüsi.

Kokkuvõtvate tulemuste näol oli seemnete idanemiskatsetes märgata teatud langust, kui seemned pandi idanema saastunud substraati; ainult valge ristiku (*Trifolium repens*) idanevus ei olnud mõjutatud saastunud keskkonnast. Pinnase keemilised näitajad olid puhtas pinnases märgatavalt kõrgemad kui saastunud pinnases, ainsaks erandiks oli mulla happesus, mis oli kõrgem saastunud pinnases. Sarnaselt keemiliste näitajatega

olid ka mulla mikrobioloogilised näitajad – mikroobne biomass ja mikroobne hingamisaktiivsus – kõrgemad puhtas pinnases. Kuivaine sisaldus oli saastunud pinnases kõrgem kui puhtas pinnases.

Käesolevas magistritöös katsetati kolme taimega – valge ristiku (*Trifolium repens*), hariliku lutserni (*Medicago sativa*) ja hariliku päevalille (*Helianthus annuus*) – pinnase puhastamist, kuid välikatses jäi taime kasv kesiseks. Tõenäoliselt on see tingitud mitmest asjaolust, näiteks katse algusperioodil ebasobivatest kliimatingimustest, madalate keemiliste näitajatega saastunud pinnasest ja taimele ebasobivast mullastruktuurist.

Töö eesmärgid said täidetud. Magistritöö autori hinnangul on selle teema edasi uurimine vajalik, sest üha enam on tarvis kasutada keskkonnasõbralikke ja kulutõhusaid viise puhastamiseks pinnast naftasaadustest.

SUMMARY

Clean soil is one of the most important components which ensures humans and other living beings a full life (Kovaleva et al., 2020). Soil provides a number of several ecosystem services, including food for people and animals, but also a habitat for plants (*Ibid*). In addition, soil is a habitat of many microorganisms (*Ibid*). It has been said that the well-being of humans depends largely on soil (*Ibid*). Soil and its biota have been called "the biological engine of the earth", which means that soil plays an important role for humans and living nature (Breure, 2004).

The contamination of soil, surface water and groundwater with toxic chemicals is of growing concern (Kumar et al., 2018). Constant crude oil mining and use of petroleum products in industrialized countries has led to petroleum contaminated soil, surface water and groundwater and this has become a global environmental issue (*Ibid*). Clean-up of contaminated sites and putting these to use result in a number of advantages, but first and foremost, people's and nature's well-being will improve (Zand & Hoveidi, 2016). Phytoremediation is considered to be a cost-effective method of bioremediation which enables the clean-up of petroleum contaminated soil (Wang et al., 2019). Phytoremediation uses green plants which have the ability to transform contaminants into non-hazardous components (*Ibid*).

The aims of this master's thesis were to determine the factors impacting phytoremediation, seed germination rate in contaminated and clean soil, and to analyze properties of microbial community in contaminated and clean environment. Germination tests and a field experiment were conducted. The germination and ability to clean up oil contaminated soil of the following three plants were studied: white clover (*Trifolium repens*), alfalfa (*Medicago sativa*) and common sunflower (*Helianthus annuus*). Germination tests were performed under laboratory conditions, the field experiment in a natural setting.

This master's thesis employed the following methods to determine soil microbiological properties: respirometric biodegradation method and superiority and inferiority ranking method (Reuschenbach et al., 2003; Schinner et al., 1996). Microsoft Office Excel 2016 was used to analyze and process data. Mean values with standard deviations were found. In addition, the data were analyzed using the programmes CANOCO 4.52 and STATISTICA 10.0. A nonparametric method, Spearman rank correlation, was used.

The results of the seed germination tests indicated a decline when seeds germinated in contaminated substrate; only the germination rate of white clover (*Trifolium repens*) was not affected by contaminated soil. Soil chemical properties were significantly higher in clean soil than in contaminated soil, with the exception of the higher soil acidity in contaminated soil. Similarly to the chemical properties, soil microbiological properties, microbial biomass and microbial respiratory activity, were higher in the less contaminated soil. Plant growth remained poor in the phytoremediation field experiment. It became evident that phytoremediation requires soil that is suitable for plants. This master's thesis used three plants – white clover (*Trifolium repens*), alfalfa (*Medicago sativa*) and common sunflower (*Helianthus annuus*) – for decontaminating soil, whereas plant growth remained poor in the field experiment. It is likely to have been due to a variety of reasons, for example, unfavourable climate conditions at the beginning of the experiment, the contaminated soil low in chemical soil properties and poor soil structure.

The author of this master's thesis considers the topic in need of further research due to the fact that we need more and more to use environmentally friendly and cost-efficient ways to clean up oil contaminated soil.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M., Naidu, R. (2016). The Biodiversity Changes in the Microbial Population of Soils Contaminated with Crude Oil. – *Current Microbiology*, 72, 663–670.

Abbaspour, A., Zohrabi, F., Dorostkar, V., Faz, A., Acosta, J. A. (2020). Remediation of an oil-contaminated soil by two native plants treated with biochar and mycorrhizae. – *Journal of Environmental Management*, 254, 109755.

Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. – *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3 (1), 28-39.

Aednik24. Päevalill. <https://aednik24.ee/toode/paevalill-soodavad-seemned/> (26.05.2020).

AS Maves. (2018). Jääkreostusobjektide seirevõrgu inventuur ja veekvaliteedi hindamine. Aruanne. https://infoleht.keskkonnainfo.ee/GetFile.aspx?id=-1881716264&fbclid=IwAR2Uoxj3YoXsJlqJ1m4UDpq9UdER4LXQk_fDBdvPHfaqLI-8G24bfheC2Dw (26.04.2021).

Astover, A., Leedu, E., Reintam, E. (2017). Mulla ABC: Mulla mehaaniline koostis. Mullastikukaardid. I osa. Välja antud Eesti Maaülikoolis.

Balseiro-Romero, M., Monterroso, C., Kidd, P. S., Lu-Chau, T. A., Ckorezis, P., Vangronsveld, J., Casares, J. J. (2019). Modelling the *ex situ* bioremediation of diesel-contaminated soil in a slurry bioreactor using a hydrocarbon-degrading inoculant. – *Journal of Environmental Management*, 246, 840-848.

Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. – *Bioresource Technology*, 74, 63-67.

Breure, A.M. (2004). Soil Biodiversity: Measurements, Indicators, Threats and Soil Functions. – *RIVM, National Institute for Public Health and the Environment*, 83-96.

BRONKHORST HIGH-TECH B.V. (2020). <https://www.bronkhorst.com/int/blog-1/biotechnology-and-bioreactors-a-very-diverse-technology/> (20.05.2021).

Cai, B., Ma, J., Yan, G., Dai, X., Li, M., Guo, S. (2016). Comparison of phytoremediation, bioaugmentation and natural attenuation for remediating saline soil contaminated by heavy crude oil. – *Biochemical Engineering Journal*, 112, 170-177.

Chaudhary, D. K., Kim, J. (2019). New insights into bioremediation strategies for oil-contaminated soil in cold environments. – *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142, 58-72.

Cherian, S., Oliveira, M. (2006). Transgenic Plants in Phytoremediation: Recent Advances and New Possibilities. – *Environmental Science and Technology*. DOI: 10.1021/es051134l (31.08.2020).

Chibueze Azubuiké, C., Blaise Chikere, C., Chijioke Okpokwasili, G. (2016). Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. – *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32 (11), 180.

De Silva, S., Yatawara, M. (2017). Assessment of aeration procedures on windrow composting process efficiency: A case on municipal solid waste in Sri Lanka. – *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 8, 169-174.

Demcak, S., Balintova, M. (2015). Overview of chosen techniques and methods for soils remediation. – Conference: VEDECKÝ SEMINÁR ÚEI, Herlany, Slovakia, (1). https://www.researchgate.net/publication/289193260_Overview_of_chosen_techniques_and_methods_for_soils_remediation (20.05.2021).

Devatha, C. P., Vishnu Vishal, A., Purna Chandra Rao, J. (2019). Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. – *Applied Water Science*, 9, 89.

Eesti Standardimis- ja Akrediteerimiskeskus. (2011). EVS-EN ISO 16703:2011 - Soil quality - Determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography (ISO 16703:2004). <https://www.evs.ee/et/evs-en-iso-16703-2011> (05.04.2021).

Euroopa Parlamendi ja Nõukogu direktiiv 2004/35/EÜ, keskkonnavastutusest keskkonnakahjustuste ärahoidmise ja parandamise kohta. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004L0035&from=EN> (22.04.2021).

Evans, G. M., Furlong, J. C. (2003). *Environmental Biotechnology: Theory and Application*. <https://studfile.net/preview/395638/> (02.09.2020).

- Idu, M., Omonhinmin, C. A. (1998). Germination control of *Helianthus annuus* L. using two growth regulators -thiourea and coumarin. https://www.researchgate.net/publication/280098451_Germination_control_of_Helianthus_annuus_L_using_two_growth_regulators_-thiourea_and_coumarin (27.04.2021).
- Jäätmeseadus. (2004). *Riigi Teataja I*, 5, 2.
- Jäätmeseadus. (2004). *Riigi Teataja I*, 15, 8.
- Jäätmeseadus. (2004). *Riigi Teataja I*, 73, 5.
- Kalsi, A., Celin, S. M., Bhanot, P., Sahai, S., Sharma, J. G. (2020). Microbial remediation approaches for explosive contaminated soil: Critical assessment of available technologies, Recent innovations and Future prospects. – *Environmental Technology & Innovation*, 18, 100721.
- Kao, C. M., Chen, C. Y., Chen, S. C., Chien, H. Y., Chen, Y. L. (2008). Application of in situ bioremediation to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation. – *Chemosphere*, 70, 1492-1499.
- Keskkonnaagentuur. (2021). Eesti meteoroloogia aastaraamat 2020. <https://kaur.maps.arcgis.com/apps/MapSeries/index.html?appid=6f0dd73e60e8456f9861a62a33417c5a> (12.04.2021).
- Keskkonnaministeerium. (2019). Jääkreostus. <https://www.envir.ee/et/jaakreostus> (10.03.2020).
- Keskkonnaministeerium. (2019). Maadevahe ja Priimetsa asfaltbetoonitehased. <https://www.envir.ee/et/eesmargid-tegevused/vesi/jaakreostus/maadevahe-ja-priimetsa-asfaltbetoonitehased> (19.01.2020).
- Khan, I. F., Husain, T., Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. – *Journal of Environmental Management*, 71, 95-122.
- Kim, S., Krajmalnik-Brown, R., Kim, J-O., Chung, J. (2014). Remediation of petroleum hydrocarbon-contaminated sites by DNA diagnosis-based bioslurping technology. – *Science of The Total Environment*, 497-498, 250-259.
- Kovaleva, E. I., Trofimov, S. Y., Zhongqi, C. (2020). Impact of oil contamination on ecological functions of peat soils from West Siberia of Russia. – *Journal of Environmental Quality*, 50, 49-62.

Košnář, Z., Mercl, F., Tlustoš, P. (2020). Long-term willows phytoremediation treatment of soil contaminated by fly ash polycyclic aromatic hydrocarbons from straw combustion. – *Environmental Pollution*, 264, 114787.

Kumar, V., Shahi, S. K., Singh, S. (2018). Bioremediation: An Eco-sustainable Approach for Restoration of Contaminated Sites. DOI: 10.1007/978-981-13-0053-0_6.

Kurrer, C. (2020). Teabelehed Euroopa Liidu kohta. Keskkonnapoliitika. https://www.europarl.europa.eu/ftu/pdf/et/FTU_2.5.1.pdf (21.04.2021).

Liang, Y., Zhao, H., Deng, Y., Zhou, J., Li, G., Sun, B. (2016). Long-Term Oil Contamination Alters the Molecular Ecological Networks of Soil Microbial Functional Genes. – *Frontiers in Microbiology*. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00060>.

Liduino, V. S., Servulo, E. F. C., Oliveira, F. J. S. (2018). Biosurfactant-assisted phytoremediation of multi-contaminated industrial soil using sunflower (*Helianthus annuus* L.). – *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 53 (7), 609-616.

Lin, H., Liu, C., Li, B., Dong, Y. (2021). *Trifolium repens* L. regulated phytoremediation of heavy metal contaminated soil by promoting soil enzyme activities and beneficial rhizosphere associated microorganisms. – *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123829.

Lopez-Echartea, E., Strejcek, M., Mukherjee, S., Uhlik, O., Yrjälä, K. (2020). Bacterial succession in oil-contaminated soil under phytoremediation with poplars. – *Chemosphere*, 243, 125242.

Maletić, S., Dalmacija, B., Rončević, S. (2013). Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – *Implications for Bioremediation*. DOI: 10.5772/50108.

Min-Zoo, C., Joo-Young, K., Jung-Hoon, K., Sang-Il, C. (2010). A Study on Effects of Oil Contaminated Soil on the Growth of Plant. – *Journal of Soil and Groundwater Environment*, 15 (1). https://www.researchgate.net/publication/263628419_A_Study_on_Effects_of_Oil_Co ntaminated_Soil_on_the_Growth_of_Plant (25.08.2020)

Mocali, S., Chiellini, C., Fabiani, A., Decuzzi, S., de Pascale, D., Parrilli, E., Tutino, M. L., Perrin, E., Bosi, E., Fondi, M., Lo Giudice, A., Fani, R. (2017). Ecology of cold environments: new insights of bacterial metabolic adaptation through an integrated genomic-phenomic approach. – *Scientific Reports*, 7, 839.

Mohsenzadeh, F., Nasser, S., Mesdaghina, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., Khodakaramian, G., Chehregani, A. (2010). Phytoremediation of petroleum-polluted

soils: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. – *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 613-619.

Narendrula-Kotha, R., Mehes-Smith, M., Nkongolo, K. K. (2018). Critical Analysis of Remediation Methods of Metal Contaminated Lands. – *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 6 (1), 1-7.

Ojewumi, M. E., Okeniyi, J. O., Ikotun, J. O., Okeniyi, E. T., Ejemen, V. A., Popoola, A. P. I. (2018). Bioremediation: Data on *Pseudomonas aeruginosa* effects on the bioremediation of crude oil polluted soil. – *Data in Brief*, 19, 101-113.

Omosiowho, U. E. (2014). Comparative analysis of composting and landfarming as 50 bioremediation techniques in hydrocarbon degradation. – *International Journal of Science, Environment and Technology*, 3 (6), 1977-1995.

Panchenko, L., Muratova, A., Turkovskaya, O. (2016). Comparison of the phytoremediation potentials of *Medicago falcata* L. And *Medicago sativa* L. in aged oil-sludge-contaminated soil. – *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 3117-3130.

Payá Pérez, A., Rodríguez Eugenio, N. (2018). Status of local soil contamination in Europe. – *JRC Technical Reports*. DOI:10.2760/093804.

Prabakaran, K., Li, J., Anandkumar, A., Leng, Z., Zou, C. B., Du, D. (2019). Managing environmental contamination through phytoremediation by invasive plants: A review. – *Ecological Engineering*, 138, 28-37.

Reuschenbach, P., Pagga, U., Strotmann, U. (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. – *Water Research*, 37 (7), 1571-1582.

Riigiteataja. (2019). <https://www.riigiteataja.ee/aktilisa/1040/7201/9006/Lisa.pdf> (06.02.2021).

Robinson, P. (2012). Petroleum and Its Products. DOI:10.1007/978-1-4614-4259-2_18.

Rostami, S., Azhdarpoor, A. (2019). The application of plant growth regulators to improve phytoremediation of contaminated soils: A review. – *Chemosphere*, 220, 818-827.

Rossiana, N., Alipin, K., Malini, D., Indrawati, I., Rahayuningish, S. R., Media, N., Dhahiyat, Y. (2020). Urgency longterm oil sludge biophytoremediation: Acute, subchronic toxicity on liver and kidney rats. – *Environmental Technology & Innovation*, 19, 100766.

Saeed, M., Ilyas, N., Jayachandran, K., Gaffar, S., Arshad, M., Ahmad, M. S., Bibi, F., Jeddi, K., Hessini, K. (2021). Biostimulation potential of biochar for remediating the crude oil contaminated soil and plant growth. – *Saudi Journal of Biological Sciences*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.044>.

Salimnezhad, A., Soltani-Jigheh, H., Soorki, A. A. (2021). Effects of oil contamination and bioremediation on geotechnical properties of highly plastic clayey soil. – *Journal of Rock Mechanics and Geotechnical Engineering*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jrmge.2020.11.011>.

Salu, M., Kupits, K., Vreimann, T. (2015). Jääkreostusobjektide inventariseerimine 2014-2015. Hinnangute koostamine ja andmete analüüs. Eesti Keskkonnauuringute Keskus OÜ (https://www.envir.ee/sites/default/files/jaakreostusobjektide_inventariseerimine_sel_etuskiri.pdf) (25.04.2021).

Sas-Nowosielska, A., Kucharski, R., Małkowski, E., Pogrzeba, M., Kuperberg, J. M., Kryński, K. (2004). Phytoextraction crop disposal—an unsolved problem. – *Environmental Pollution*, 128 (3), 373-379.

Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. Margesin, R. (1996). Methods in soil biology. DOI 10.1007/978-3-642-60966-4.

Selge, A. (2014). Heinaseemnete külv. <https://www.pikk.ee/valdkonnad/taimekasvatus/rohumaaviljelus/rohumaade-rajamine-ja-agrotehnika/heinaseemnte-kulv/> (23.05.2020).

Sharma, P., Pandey, S. (2014). Status of Phytoremediation in World Scenario. – *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2 (4), 178-191.

Sheng-You, X., Ying-Xu, C., Kuang-Fei, L., Xin-Cai, C., Qi, L., Feng, L., Zhao-Wei, W. (2009). Removal of Pyrene from Contaminated Soils by White Clover. – *Pedosphere*, 19 (2), 265-272.

Shi, W., Guo, Y., Ning, G., Li, C., Li, Y., Ren, Y., Zhao, O., Yang, Z. (2018). Remediation of soil polluted with HMW-PAHs by alfalfa or brome in combination with fungi and starch. – *Journal of Hazardous Materials*, 360, 115-121.

Silva-Castro, G. A., Uad, I., Rodriguez-Calvo, A., Gonzalez-Lopez, J., Calvo, C. (2015). Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. – *Environmental Research*, 137, 49-58.

Song, U., Park, H. (2017). Importance of biomass management acts and policies after phytoremediation. – *Journal of Ecology and Environment*. DOI 10.1186/s41610-017-0033-4.

Zand, A. D., Hoveidi, H. (2016). Feasibility of Sunflower (*Helianthus annuus L.*) Plantation in Low to Moderately Contaminated Brownfields to Achieve Remediation Objectives. – *Journal of Applied Biotechnology Reports*. http://www.biotechrep.ir/article_69233_8d4a0856f5ef5fb23ff33ee457b0d7ae.pdf (23.04.2021).

Zhang, H., Yuan, X., Xiong, T., Wang, H., Jiang, L. (2020). Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. – *Chemical Engineering Journal*, 398, 125657.

Zhang, K., Wang, S., Guo, P., Guo, S. (2021). Characteristics of organic carbon metabolism and bioremediation of petroleum-contaminated soil by a mesophilic aerobic biopile system. – *Chemosphere*, 264, 128521.

Zhong, H., Qiu, Z., Chai, J., Guo, B., Sun, D., Liu, J. (2018). A preliminary study of the preparation of shale stabilizer with oil sludge - From waste to resource. – *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 161, 50-60.

Zytner, R.G., Salb, A., Brook, T. R., Leunissen, M., Stiver, W.H. (2011). Bioremediation of diesel fuel contaminated soil. – *Canadian Journal of Civil Engineering*, 28, 131-140.

Taheri, M., Motesarezadeh, B., Zolfaghari, A. A., Javadzarrin, I. (2018). Phytoremediation modeling in soil contaminated by oil-hydrocarbon under salinity stress by eucalyptus (A comparative study). – *Computers and Electronics in Agriculture*, 150, 162-169.

Torsvik, V.L., Goksoyer, J., Daae, F.L. (1989). High diversity in DNA of soil bacteria. – *Applied and Environmental Microbiology*, 1990 (56), 782-787.

Tööstusheite seadus. (2013). *Riigi Teataja I*, 5, 1 ja 2.

Van der Heul, R. M. (2009). Environmental Degradation of petroleum hydrocarbons. Utrecht University/IRAS, 3061655.

Wang, B., Xie, H-L., Ren, H-Y., Li, X., Chen, L., Wu, B-C. (2019). Application of AHP, TOPSIS, and TFNs to plant selection for phytoremediation of petroleum-contaminated soils in shale gas and oil fields. – *Journal of Cleaner Production*, 233, 13-22.

Wang, S., Xu, Y., Lin, Z., Zhang, J., Norbu, N., Liu, W. (2017). The Harm of Petroleum-Polluted Soil and its Remediation Research. – *AIP Conference Proceedings*, 1864 (1). <https://doi.org/10.1063/1.4993039> (26.08.2020).

Xi, Y., Song, Y., Johnson, D. M., Li, M., Liu, H., Huang, Y. (2018). Se enhanced phytoremediation of diesel in soil by *Trifolium repens*. – *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154, 137-144.

Yanxun, S., Yani, W., Hui, Q., Yuan, F. (2011). – Analysis of the Groundwater and Soil Pollution by Oil Leakage. – *Procedia Environmental Sciences*, 11, 939-944.

LISAD

Lisa 1.



Analüüsi protokoll nr.20/ 017

Tellija:	Katrina Kaasik	Proovi nimetus/nr.	Pinnas
Aadress:		Proovivõtmise koht:	Toodud kliendi poolt
Telef.:	56261396	Proovivõtmise aeg/akti nr.	29.05.2020/ 17
Kontaktisik			

Analüüsimeetodid ja tulemused

Naftasaaduste sisaldus

EVS-EN ISO 16703

Proovi nr.	Proovi nimetus	Tulemus	Mõõtühik
17/1	Pinnas	2310	mg/kg

Analüüsis: laborijuht R. Pärismaa

Kuup. 6.06.2020

AS Epler Lorenz
Ravila 75a, Tartu 50411
Reg. nr. 10136864

Lk 1 (1)

Tel. 7 421 398
fax. 7 422 780



Analüüsi protokoll nr.20/ 004

Tellija:	Katrina Kaasik	Proovi nimetus/nr.	Pinnas
Address:		Proovivõtmise koht:	Toodud kliendi poolt
Telef.:	56261396	Proovivõtmise aeg/akti nr.	12.02.2021/ 4
Kontaktisik			

Analüüsimeetodid ja tulemused

Naftasaaduste sisaldus

EVS-EN ISO 16703

Proovi nr.	Proovi nimetus	Tulemus	Mõõtühik
4/1	Pinnas	2250	mg/kg

Analüüsis: laborijuht R. Pärismaa

Kuup. 15.02.2021

AS Epler Lorenz
Ravila 75a, Tartu 50411
Reg. nr. 10136864

Lk 1 (1)

Tel. 7 421 398
fax. 7 422 780