



TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Diiselmootoriga saastunud pinnase bioremediatsioonil osalevad peamised mikroorganismid

Magistritöö tööstusökoloogia erialal

Toomas Luhse

Juhendaja: MSc Sander Kutti

Autorideklaratsioon

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

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

.....
Kuupäev

.....
Allkiri

Sisukord

Kasutatud mõisted ja lühendid	4
Sissejuhatus	6
1 Kirjanduslik ülevaade	7
1.1 Bioremediatsioon.....	7
1.1.1 Bioaugmentatsioon	14
1.1.2 Biostimulatsioon.....	17
1.1.3 Looduslik hajumine	18
1.1.4 Kompostimine	20
1.2 Bioremediatsiooni mõjutavad faktorid	22
1.2.1 Temperatuur.....	22
1.2.2 Niiskus	23
1.2.3 Hapnik	23
1.2.4 pH	24
1.2.5 Toitained.....	24
1.2.6 Soolsus.....	25
1.2.7 Biokättesaadavus ja pindaktiivsed ained	26
1.2.8 Mulla tüüp	27
1.2.9 Alternatiivsed elektroni aktseptorid.....	27
1.2.10 Süsivesinike tüüp.....	28
1.2.11 Redokspotentsiaal	28
1.2.12 Orgaaniline aine.....	29
1.2.13 Valgus.....	29
1.3 Diiselkütuse biolagunemise protsess	30
1.3.1 Bakterid biodegradatsioonis	35
1.3.2 Seened biodegradatsioonis	37
2 Materjal ja meetodika	39
2.1 Katse ülesehitus	39
2.2 Keemiliste parameetrite määramine	39
2.3 Kasutatud söötmeplaadid.....	39
2.4 Seente ja bakterite identifitseerimine	40
2.5 Vältimistest.....	42
3 Tulemused	43
3.1 Keemiliste parameetrite määramine	43

3.2 Seente ja bakterite identifitseerimine	46
3.3 Vältimistest.....	47
4. Arutelu	49
Kokkuvõte	52
Summary.....	54
Tänuõnad.....	56
Lisa 1	62
Lisa 2	63
Lisa 3	67

Kasutatud mõisted ja lühendid

Aeroobne hingamine – on bioloogiline protsess, mille käigus redutseeritakse orgaanilised ühendid ja seejärel oksüdeeritakse need reguleeritud viisil, toimub üksnes hapniku juuresolekul.

Anaeroobne hingamine – hapnikuvaba gaasivahetus on vaba hapnikuta (anaeroobses) keskkonnas selleks kohastunud organismide energiasaamisviis.

Alifaatsed süsivesinikud – on orgaaniline ühend, mis ei sisalda benseenitsükli ehk benseenituumat. Nende hulka kuuluvad atsüklilised ehk avatud ahelaga ühendid ja alitsüklilised ühendid ehk ühendid, mille struktuuris on mõni suletud ahel, kuid mitte benseenitsükkel.

Aktinomütseedid – bakterite hulka kuuluvad organismid. Sarnaselt mikrosetega moodustub keha hüüfidest.

Biotransformatsioon ehk biokonversioon – on keemilise ühendi koostise muutmine organismide või nendest saadud ensüümide abil.

Difusioon – aine või energia ülekandumine kõrge kontsentratsiooniga piirkonnast madala kontsentratsiooniga piirkonda.

Dispersioon – ühe aine ja pihustatus teises, näiteks jaotus .

Eksogeensed mikroorganismid – Mikroorganismid, mis eksisteerivad mingi organismi või bioloogilise süsteemi pinnal.

Eukarüootid ehk päristuumsed organismid – organismid, kelle rakus esineb membraaniga ümbritsetud tuum.

Fütoremediatsioon – on kombinatsioon kahest sõnast füto, mis tähendab taime ja remediatsioon, mis tähendab tervendamist.

Heterotroofsed organismid – saavad oma elutegevuseks vajaliku süsiniku orgaanilisest ainest.

Inokulaat – Varem bioloogilisele süsteemile võõraste mikroorganismide kogu.

Kemotaktiline afiinsus – vastuvõtlikus teatud keemilistele ühenditele.

Käärimine – bioloogias suhkrute ja mõningate lämmastikuühendite lagunemine osavõtuta.

Ligniin – looduslik fenoolne polümeer, leidub peamiselt puitunud taimeosades.

NAPL ehk *non-aqueous phase liquids* – mittevesifaasis vedelik on vedel saasteaine lahus, mis ei lahustu või segune veega nagu õli, bensiin ja petrooleum produktid.

Patogeen – on mikroorganism, harvem ka mingi keemiline aine, mis kutsub taim- või loomorganismis esile haigusi.

Petrooleum süsivesinik – Petrooleum süsivesinikud on esmaseks komponentideks õlis, bensiinis, diislikütuses ja erinevates lahustes.

Pindaktiivne aine (PAA) – on keemiline aine, millel on võime vähendada vee ja teiste vedelike või tahkiste pindpinevust, suurendades ühtlasi nende mürgumist.

Põlismikroorganismide konsortsium – keskkonnas varem kohastunud mikroorganismide kogum.

Retentsioon – kinni hoidma mingeid ühendeid.

Sissejuhatus

Kõikjal maailmas on nafta ja naftaproduktide kasutamine kütusena väga populaarne, see on lahutamatu osa tänapäeva maailma funktsioneerimiseks. Kuid selle laia levikuga kaasneb ka märkimisväärne reostus. Naftasüivesinike saastest on saanud globaalne probleem, seda leidub kõigis maailma otstes.

Eestis on reostuse põhjusteks ka ajalooline pärand. Eesti on olnud mitmete sõdade lahinguväli, mis on toonud endaga kaasa suurel määral reostust, levinum neist on naftasaadused. Pinnas kui ka põhjavesi on mitmes Eesti paigas reostunud mahajäetud sõjaväeobjektide ja mahutite tõttu. Eesti Nõukogude Sotsialistlikus Vabariigis oli peaaegu 800 punktis 1565 armeesõjakoja üldpindalaga 87146 ha, millest 1997 aasta seisuga oli pinnast 4335 ha (761 427 tonni) reostunud naftaproduktidega[1]. Saastunud alade tervendamine on väga kulukas ja töömahukas ning selle pärandi tervendamine kestab tänapäevani.

Naftaproduktidega saastunud pinnast kui ka põhjavett on võimalik tervendada bioremediatsiooni abil. Bioremediatsiooni käigus eemaldatakse saasteaine tänu mikroorganismide ja taimede ainevahetuslikele protsessidele. Bioremediatsioon on odav ja lihtne alternatiiv praegustele töömahukatele tehnoloogiatele, kuid sellega kaasnevad ka omad piirangud.

Magistritöös antakse ülevaade bioremediatsioonist tehnoloogiatest, neid mõjutatavatest faktoritest kui ka naftaproduktide lagunemisest. Uurimuse eesmärk oli võrrelda nelja remediatsiooni tehnikat- bioaugmentatsiooni, biostimulatsiooni, loodusliku hajumist ja kompostimist, et hinnata diiselkütuse lagunemise efektiivsust ning identifitseerida neis osalevad peamised mikroorganismid. Samuti oli uurimuse eesmärgiks võrrelda nelja erineva bioremediatsioonitehnika puhul kohastunud mikroorganismide perekondade sarnasusi ja erinevusi ning proovida leida võimalikke seene- ja bakteriperekondasid, millega parendada bioremediatsiooni protsessi.

1 Kirjanduslik ülevaade

1.1 Bioremediatsioon

Möödunud sajandil on ülemaailmne reostus tohutult kasvanud. Tööstuse areng, rahvastiku kasv, linnastumine ja hoolimatus kemikaalide keskkonda heitmisel, kõik see on põhjustanud kaasaegse reostustaseme. Paljud tööstusharud on olnud reostuse leviku otsesteks põhjustajateks, sealhulgas eeskätt nafta- ja gaasitööstus[2]. Üks tõsine mulla saastamise põhjuseid on seotud petrooleumsüsivesinike leviku ja populaarsusega. Petrooleumsüsivesinike satub keskkonda sihipärasel nafta töötlemisel või tootmisel, transpordil ja kemikaalide kasutamisel ning õnnetusjuhtumite käigus[3].

Saasteainetega kokku puutunud pinnast ja põhjavett on võimalik puhastada kolmel erineval viisil: füüsikaliselt, keemilist või bioloogilist. Pesemine, tahkestamine, termiline desorptsioon ning lenduvate ühendite ekstraheerimine kuuluvad füüsikaliste protsesside hulka. Keemiliste protsesside korral seotakse saasteine pinnases keemiliselt, muutes saasteaine vähemliikuvamaks. Põletamine on füüsikalise ja keemilise protsessi kombinatsioon. Intensiivsed füüsikalised ja keemilised tehnoloogiad on peamiselt kiire toimega, kuid neid on keeruline rakendada ning vajavad rohkelt ressursse ja on kallid. Laiaulatuslike seal hulgas bioloogilisi tehnoloogiaid karakteriseerib vähesem otsene sekkumine ning aeganõudvam toime[4].

Orgaanilise ja anorgaanilise saasteainete eemaldamine reostunud aladelt võib olla väga kulukas. Arvestades reostuse olemust ja ulatust ning selle koristamise kulukust, otsitakse kogu maailmas alternatiivseid, kuid siiski efektiivseid meetodeid reostunud alade puhastamiseks. Üks tehnoloogiline lahendus on bioremediatsioon[5].

Bioremediatsioon on kombinatsioon kahest sõnast- bio, lühend bioloogilisest ja remediatsioon, mis tähendab tervendamist. Bioremediatsioon tähendab, et kasutatakse bioloogilisi organisme lahendamaks keskkonna probleeme nagu saastunud pinnas või pinnavee/ põhjavee saastatus[6].

Vaatamata sellele, et mikroorganisme on kasutatud reostunud alade puhastamiseks vähemalt sajand, peetakse bioremediatsiooni uueks keskkonnasõbralikuks tehnoloogiaks. Bioremediatsiooni ja biodegradatsiooni ehk bioloogilist lagunemist ei tohiks teineteisega segamini ajada. Biodegradatsioon võib olla üks osa bioremediatsiooni protsessist. Ainult mõned saasteained on biodegradeeruvad ja osad mikroorganismid on võimelised lagundama ainult murdosa saasteainetest. Seetõttu on vajalik uurida erinevate mikroorganismide biolagundamispotentsiaali. Paljud ühendid, mis on kahjulikud ja ohtlikud, on võimalik bioremediatsiooni käigus biotransformeerida kahjututeks ühenditeks. See välistab saastunud materjali puhastamise ja transportimise vajaduse tulevikus. Selle asemel, et saasteaineid teisaldada/ üle viia ühest keskkonnast (näitkes:pinnasest vette või õhku) teise, on võimalik saasteainete täielik kõrvaldamine[7].

Saasteainete eemaldamine toimib tänu mikroorganismide ja taimede mitmekesistele metaboolsetele võimetele. Bioremediatsioon on populaarsust koguv ja arenev meetod keskkonnast saasteainete lagundamiseks ja eemaldamiseks, eriti naftatööstuse toodete seas. Mikroorganismidel on võtmeroll mullas olevate keerukate saasteainete biotransformatsiooni protsessis[8].

Keskkonnas olevad mikrobioloogilised kooslused on väga mitmekesised, erinedes suuresti isegi väga lühikestel vahemaadel. Paljud keskkonnategurid mõjutavad mikroorganismide kasvu ja ellujäämist, sealhulgas vee, hapniku, anorgaaniliste ja orgaaniliste toitainete olemasolu. Mikrobioloogilise kogukonna koosseisu mõjutavad ka kiskjad, viirused ja kliima varieerumine. Keskmiselt on mulla ühes grammis 5×10^9 bakterirakku ning mitmekesisuse selles rühmas on tohtu[49]. Tuginedes DNA uuringutele on geneetiliselt erinevate mikroorganismide arv viljakas pinnases hinnanguliselt vähemalt 10 000 mikroorganismi ühe grammi pinnase kohta. Arvestades seda tohutut mitmekesisust võiks eeldada, et mis tahes keskkonnas peaks eksisteerima vähemalt lagundamise potentsiaal enamikele inimtegevusest tekkinud ühenditele. Hoolimata sellest mitmekesisusest on siiski mõningaid ühendeid, mis on jätkuvalt tõrksad lagunema konkreetsel alal. Mikroorganismide poolt teadaolevalt lagundatavate ühendite mittelagunemine võib viidata, et konkreetsel alal lagundava võimega

mikroorganisme (või geene) ei esine või tingimused alal ei soodusta nende mikroorganismide kasvu. Nendes olukordades on võimalik soodustada tõrksate ühendite lagundamist stimuleerides pinnases olevaid esialgseid mikroorganisme või kasutusele võtta uus mikroobne inokulaat. Vajalike meetodite rakendamiseks on vaja põhjalikku arusaamist mikroobide ökoloogiast saastunud keskkonnas[9]. Biomass ja selle aktiivsus kipuvad sügavuse suurenemisel vähenema[10].

Arvestades, et enamik sünteetilisi ühendeid on väga sarnased looduslikult esinevate vastetega, saab neist enamikke ka mikroorganismide abil biolagundada. Mõned ksenobiootilised (inimtekkelised) ühendid aga omavad molekulaarstruktuure, mis ei ole kergesti ära tuntavad olemasolevate lagundavate ensüümide poolt. Sellised ühendid ei biodegradeeruvad ja metaboliseeruvad puudulikult, mistõttu ksenobiootilised ühendid keskkonnas akumulatsioonid. Kuid tõdemus, et mõned loomulikult esinevad halogeenitud ühendid on olemas ja on ka mikrobioloogiliselt valmistatud tähendab, et mikroobidel on võime selliseid ksenobiootikume transformeerida[2]. Biodegradatsiooni jäägid on tavaliselt ohutud, näiteks süsinikdioksiid, vesi ja rakkude biomass[7].

Bioremediatsiooni on sageli võimalik läbi viia saastunud alal, tehnoloogia rakendamine ei põhjusta suuri häireid tavapärasele tegevusele saastunud alal ning sageli välistab potentsiaalse ohu, mis saastunud materjali transpordiga võib inimese tervisele ja keskkonnale tekkida. Saastunud materjali koristamisel võib bioremediatsioon osutada odavamaks tehnoloogiaks võrreldes teiste võimalike lahendustega. Bioremediatsiooni tehnoloogial on kaks peamist puudust. Üks on see, et vaid vähesed bakterid ja seened on võimelised lagundama laia saasteühendite spektrit. Siiani ei ole teada organismi, mis oleks piisavalt omnivoorne, et hävitada suures osas looduslikult esinevaid kemikaale. Seda probleemi on võimalik vältida uute mikroobiliikide avastamise kui ka mikroorganismide sünkroniseeritud kasutamisel, millega täiendatakse üksteise/teineteise bioaktiivsust. Teiseks bioremediatsiooni puuduseks on see, et selle toimimine ja mõju avaldumine võtab palju aega. Sellise puuduse mõju vähendamiseks on erinevaid lahendusi[7].

Võimalikud lahendused võivad olla[7]:

- Geneetiline manipulatsioon, mille abil on võimalik saada täiustatud või uusi tüvesid bioremediatsiooni aktiivsuse suurendamiseks
- Preparaatide lisamine, mis võimendaksid kindlaid bioremediatsiooni radasid
- Sünkroonselt on võimalik kasutada ühte või mitut mikroorganismi, mis otseselt või kaudselt suurendaks bioremediatsiooni bioaktiivsust.
- Kõige lihtsam on suurendada bioremediatsiooni läbi viivate organismide populatsiooni.

Bioremediatsioon on limiteeritud ainult nendele ühenditele, mis on biolagunevad. Kõiki ühendeid ei ole võimalik kiiresti ja täielikult lagundada ning on võimalik, et biolagunemise jäägid võivad olla püsivamad või mürgisemad kui algsed ühendid. Bioloogilised protsessid on sageli väga spetsiifilised. Edukaks saasteainete bioremediatsiooniks on vajalik metaboolselt võimekate mikroobide populatsiooni, sobivaid kasvutingimusi keskkonnas, sobivat toitainete taset ja sobiva ehitusega saasteaineid[7].

Bioremediatsiooni kasutusele võtmiseks, tuleb kõigepealt selgitada, kas pinnases olev saasteaine on biodegradeeruv, ega töö tekita meediumile kahjulikke kõrvalmõjusid ning kas bioremediatsioon on alternatiivsetest lahendustest majanduslikult kasulik. Reostuskolle üritatakse kaardistada ja võetakse pinnaseproove. Tervendamist on mõttekas alustada alles siis, kui saasteainete sissevool on takistatud. Mida saasteallikaga peale hakata, sõltub sihist, kapitalist ning sotsiaalsetest ja keskkonnapiirangutest. Tehnoloogia selektsiooni mõjutab ka see, millise saasteainega on tegemist, kui puhtaks on pinnast vajalik teha ning kui kiiresti see peab toimuma[4].

Vaid vähestel juhtudel, kui saastatud alal on piisavalt vajalike materjale saab bioremediatsioon toimuda inimese sekkumiseta. Seda protsessi nimetatakse iseeneslikuks bioremediatsiooniks. Sagedamini nõuab bioremediatsioon kunstlike süsteemide konstrueerimist, mis stimuleeriks mikroobe vajalike materjalidega- protsessi nimetatakse konstrueeritud bioremediatsiooniks. Konstrueeritud bioremediatsioon

tugineb soovil kiirendada biolagunemise reaktsiooni, soodustades organismide kasvu ja optimeerides keskkonda, kus organismid peavad teostama tervendamisprotsesse[29].

Pinnase bioremediatsiooni võib laias laastus jagada *in situ* ja *ex situ* strateegiateks. *In situ* bioremediatsioon viitab saastunud pinnase bioloogilisele töötlemisele ilma pinnast välja kaevamata. *Ex situ* meetodid viiakse läbi eelnevalt ettevalmistatud platsil või reaktoris. *Ex situ* meetodite rakendamisel pööratakse või segatakse pinnast pidevalt, et suurendada aereeritust ja lisada sinna toitaineid[11].

In situ bioremediatsiooni rakendatakse saaste eemaldamiseks saastunud alal ja põhjavees kohapeal. *In situ* meetodi puhul säästetakse transpordikuludelt ja kasutatakse keemiliste saasteainete eemaldamiseks kahjutuid mikroorganisme. Efektiivselt töötavatel mikroorganismidel peaks olema üldjuhul kemotaktiline afiinsus lagundatava saasteaine suhtes, mis tähendab, et mikroorganismid aktiivselt üritaksid kasvada suurema saasteaine kontsentratsiooni suunas. Selline omadus suurendab eelkõige kõrge kontsentratsiooniga varasemalt häiringuteta punktreostuste puhastamise tõenäosust. Samuti on meetod eelistatud, kuna see põhjustab vähem häireid saastunud alal. See omaks palju tähtsust kohtades kus väikseim investering ja saaste on soositud (näiteks tehased) või kohtades mis on saastunud ohtlike saasteainetega (näiteks keemiliste või radioaktiivsete materjalidega) ehk teisisõnu punktreostusallikate puhul. Teine eelis *in situ* meetodi puhul on, et bioremediatsioon on teostatav sünkroonselt pinnases ja põhjavees. Kuid *in situ* bioremediatsioonil on mõningaid puudusi, meetod on aeganõudvam võrreldes teiste tervendavate meetoditega ning on mõjutatav erinevate kontrollimatute keskkonnategurite poolt, mis avaldavad mõju mikroobide tegevusele, samuti bioremediatsiooni edendavad lisandid võivad tekitada täiendavaid probleeme[7].

Lisandite kasutamisel tuleb arvesse võtta mitmete võimalike probleemide tekkimist[39]:

- Mikroobne ummistus viitab mitte ettenähtud mikroorganismide ülemäärasele biomassi kasvule, põhjustades torustikes ummistusi ja vähendades lisandite jaotumist efektiivselt.
- Seiskumine viitab bioremediatsioonile suunatud ühendite mitte täieliku degradatsioonile tütar ühendite degradatsiooni akumulierumise tõttu.

Bioremediatsioon võib seiskuda vesiniku kontsentratsiooni ebakorrektsel reguleerimisel, mikroobi populatsiooni limitatsioonide tõttu

- Veelademete ülevoolavus- Kõrge rõhk lisandite puuraugus võib põhjustada põhjaveekihi purunemist ning see võib soodustada lisandite voolamist ebäühtlasel viisil
- Viskoosete ja vees mittelahustuvate ainete lisamine, bioloogilise aktiivsuse tagajärjel tekkinud gaasiummistus ja ekstensiivse biomassi kasv madala vooluhulgaga põhjaveekihtides võib vähendada veejuhtivust. Veejuhtivuse vähenemine võib põhjustada saastunud põhjavee voolamist ümber remediatsiooni tsooni, see mõjutab saasteaine võimet luua kontakti orgaanilise substraadiga ja samuti mõjutab ka võimet efektiivselt jaotada lahustuvat orgaanilist ainet.
- Lisandite suuremahuline lisamine võib põhjustada saasteainete olulist nihkumist ja lahjenemist.
- Orgaaniliste hapete tekkimine ja pH langemine põhjavees liigse orgaanilise süsiniku kasutamise tõttu.

Bioremediatsiooni edukuse määrab saasteaine sort, nimelt kas saasteaine pakub mikroorganismidele vajalike toitaineid ja energiat, et tervendamist läbi viia. Kuid soodsate saasteainete puudumisel võib põlismikroorganismide bioaktiivsust kompenseerida stimuleerimise kaudu. Teine vähem eelistatud võimalus on kasutada geneetiliselt muundatud mikroorganisme[7].

Võimaluse korral tuleks eelistada kohapealset tervendamist (in situ), saasteaine pinnasest välja pesta või, kui saasteaine on degradeeruv, soodustada bioremediatsiooni. Juhul kui saastunud ala on mingiks otstarbeks kasutusel või tahetakse kasutusele võtta, siis peab saastunud pinnase välja kaevama ja käitlemas kas samal territooriumil (on site) või mujal (ex situ). Pinnase ümberpaigutamine on väga töömahukas ning alati tekib probleem, kuhu saastunud pinnas viia. Ladestamist prügilasse (dig-and-dump) peetakse keskkonnahoiu seisukoha poolest kehvaks lahenduseks, sest saastunud pinnas transportitakse vaid ühest kohast teise ning saasteained jäävad eemaldamata. Eestis on võimalik saastunud pinnast viia Vaivara ohtlike jäätmete prügilasse. Saastunud ala

avamine ja pinnase väljakaevamine võib olla ohtlik- kergesti aurustuvad ühendid, näiteks bensiin ohustavad inimesi ning sademevesi võib saasteained väljakaevatud pinnasest välja pesta. Samuti võivad saasteained laiali kanduda ka kaevamisel tekkiva tolmuga. Orgaaniliste saasteainete puhul võib väljakaevamisel ja transportimisel olla ka positiivne mõju, sest pinnase aereerimine ja segamine soodustab biodegradatsiooni[4].

In situ pinnase biotervendamise tehnoloogiad:

- Looduslik tervendamine toimub ilma inimese sekkumiseta, läbi looduslike protsesside vähenevad keskkonnas saasteaine toksilisus, hulk ning liikuvus. Saasteained transformeeruvad füüsikaliste (lahustamine, sadestumine, adsorptsioon), keemiliste ja bioloogiliste protsesside toimetel, millest tähtsaim on enamasti biodegradatsioon[4].
- Fütoremediatsiooni puhul kasutatakse taimede loomuliku võimet absorbeerida, koguda või metaboliseerida mürgiseid kemikaale ja saasteaineid mullast või veest, paigas kus taimed kasvavad. Kui taimed on saasteained imendanud ja kogunud võib nad ära koristada ja hävitada[6].
- Bioaugmentatsiooni puhul lisatakse saastunud keskkonda spetsialiseeritud mikoobikultuurid täitma konkreetseid tervendamise ülesandeid. Bioaugmentatsiooni kasutatakse sageli, et suurendada tõrksate saasteainete lagunemist, mida kohalik mikroorganismide konsortsium isegi parimatel tingimustel ei suuda lagunda[18]. Spetsialiseerunud populatsioon valitakse selektiivsöötmetel kultiveerimise teel (*enrichment culturing*) või geneetilise manipulatsiooni abil[22].
- Biostimulatsiooni kasutatakse kui loodusliku degradatsiooni ei esine või kui lagunemine on liiga aeglane. Keskkonda on võimalik stimuleerida nõnda, et reaktsiooni määrad suurenevad. Biostimulatsiooni puhul lisatakse keskkonda toitained nagu lämmastik ja fosfor koos elektron akseptoritega nagu hapnik ning substraate nagu metaan, fenool ja touleen[19].
- Bioventileerimise protsessi puhul õhutatakse pinnast *in situ*, et stimuleerida mikroorganismide bioloogilist aktiivsust ja edendada bioremediatsiooni[21]. Hapniku lisatakse tavaliselt õhu sissepritsekaevudest, mis suruvad õhku

maapõue[20]. On leitud, et paljud saasteained biolagunevad hapniku juuresolekul, eriti naftasüivesinikud, mis esinevad kütustes[21].

Ex situ pinnase bioremediatsiooni tehnoloogiad:

- Künnikihis tervendamise (*landfarming*) puhul laotatakse välja kaevatud saastunud pinnas puhtale pinnasele ning perioodiliselt segatakse ja aereeritakse seda materjali. Saasteained transformeeritakse ja immobiliseeritakse biotiliste ning abiotiliste reaktsioonide abil[15].
- Pinnase-vee segu tervendamise (*bioslurry*) puhul kaevatakse saastunud pinnas ning pannakse see reaktorisse koos vee ja teiste lisanditega. Reaktoris segatakse pidevalt pinnast, et lisatud mikroorganismid puutuksid saasteainega kokku. Reaktoris läbiviidav tervendamine on hästi kontrollitav ning saasteaine degradatsioon toimub kiiresti[17].
- Aunkompostmisel kaevatakse saastunud pinnas välja, segatakse jämedakoelise tugiainega (saepuru, hakkpuit, puukoor vms), toitesoola- ja mikroobiallikaga (laudasõnniku või valmis kompostiga) ning kuhjatakse aunadesse. Tugiaine loob kompostitavasse massi õhuvahesid ning tekitab hapnikurikka keskkonna. Aunas tõuseb temperatuur 50-60 kraadini, märksa kõrgemaks kui künnikihis tervendamisel, ning see soodustab bioloogilisi protsesse. Aunasid tuleb vahetevahel läbi segada. Aeroobses keskkonnas suureneb bakterite arv kiiresti ning nende toimet degradeeruvad saasteaine koostises oleva süsinikumolekulid süsihappegaasiks ja veeks[4].
- Bioaun tervendamise puhul aun kaetakse ning saasteainete lagunemine toimub kontrollitavates tingimustes bakterite ja seente toimet. Meetodid tõhustatakse õhutamise ja toitesoolade lisamisega[4].

Bioremediatsiooni tulemuslikkuse hindamine on raske, sest puhtuse definitsioon ei ole selge ning bioremediatsioonil ei ole üldtunnustatud lõpp punkti[7].

1.1.1 Bioaugmentatsioon

Alates 1970. aastatest on õliga saastunud keskkondade alternatiivse remediatsiooni meetodina kasutatud bioaugmentatsiooni ehk õli lagundavate mikroorganismide lisamist

saastunud alasse, et täiendada põliseid mikroorganisme[36]. Bioaugmentatsioon on spetsialiseerunud mikroorganismide kultuuri lisamine, mis on tavaliselt kasvanud omaette täpselt määratletud tingimustes, täitmaks konkreetseid tervendamise ülesandeid antud keskkonnas. Bioaugmentatsioonil kasutatakse sageli, et suurendada tõrksate saasteainete lagunemist, mille mineraliseerimisega ei saa põlismikroorganismide konsortsium isegi parimates tingimustes hakkama. Lisatud mikroorganismid täiendavad põlismikroorganismide lagundamisvõimekust, mille tulemusel väheneb mikroorganismide kohanemisaeg saasteainega ning biolagunemine toimub kiiremini, samuti on vähem ebasoovitavaid kõrvalsaadusi[18]. Bioaugmentatsiooni on kasulik rakendada ka siis kui süsivesinikke lagundavate mikroorganismide populatsioon on lihtsalt madal. Meetod vähendab remediatsiooni seisufaasi ning suurendab tervenemise kiirust. Selle meetodi tulemuslikkuseks välitingimustes peavad külvatud mikroorganismid suutma lagundada peamisi nafta komponente, säilitama geneetilise stabiilsuse ja elujõu aja jooksul, jääma ellu võõras ja vaenulikus keskkonnas, tõhusalt konkureerima kohalike mikroorganismidega ning efektiivselt liikuma läbi sette pooride saasteaineni[36].

Erinevatel mikroobiliikidel on erinevad ensümaatilised võimed ja eelistused õlide lagundamiseks. Mõned mikroorganismid lagundavad lineaarseid, hargnenud või tsüklilisi alkaane. Teised eelistavad mono- või polütuumseid aromaatsed ühendeid ja osad lagundavad ühiselt nii alkaani ja aromaatsed ühendeid[36].

Edukas mikroobide sisseviimiseks on vaja mitmesuguseid tegureid[29]:

- populatsioon peab uues keskkonnas vastu pidama ja kasvama
- mikroorganismid peavad säilitama oma degradatsioonivõime uutes tingimustes
- mikroorganismid peavad saasteainetega kokku puutuma
- mikroobide vajalikuks kasvuks ja saasteaine degradatsiooniks peavad populatsioonile kättesaadavad olema elektronide doonorid/aktseptorid ja vajalikud toitained.

Pärast mikroorganismide lisamist saastunud alasse on eduka degradatsiooni läbiviimiseks vaja sisseviidud mikroorganismid mingi mehhanismi abil stimuleeritud

alas laiali levitada, enne kui nad kinnituvad tahke maatriksi külge. Raku transport poorses keskkonnas sõltub tahkest keskkonnast ja mikroobide rakkudest, eriti nende suuruselt. Katsed on näidanud, et kõige paremini soodustavad mikroobide transporti poorses keskkonnas hästi läbilaskev materjal, väikse ioontugevusega põhjavesi ning väikse läbimõõduga mikroobirakud ise. Kahjuks mikroorganismid, mis on tõhusad laboratooriumi tingimustes ei pruugi hakkama saada reaalses maailmas. Looduslikes tingimustes on laboratoorsed tüved silmitsi ebasoodsate toite- ja füüsikalise-keemiliste tingimusega. Nad peavad võistlema juba looduses olevate põliskogukondadega ja peavad taluma erinevate kiskjate ja viiruste rünnakuid. Lisaks on sageli ebakõla võõrliigi tavapärasest ökoloogilistest tingimustes ja elupaigas kuhu nad asustatakse. Samuti kui biostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni kasutatakse samaaegselt, siis tihtipeale selgub, et lisatud toitained kasutatakse enamasti põliskogukonna poolt ja nad kasvavad sissetoodud liikidest üle[29].

Edukas pinnase augmentatsioon eeldab mitte üksnes teadmisi saasteaine tüübist ja tasemest, vaid ka sobivatest mikroorganismitüvedest või nende konsortsiumist. Õige kultuuri valimisel peaks arvestama järgmisi mikroorganismide funktsioone: kiire kasv, lihtne kultiveerimine, kõrge saasteainete kontsentratsiooni taluvus ja võime jääda ellu mitmesugustest keskkonna tingimustes. Eriti tõhusateks on osutunud tihtipeale nõ. pärandtüved, mida on eelnevalt juba mõne muu puhastusprotsessi läbi viimiseks modifitseeritud ning siis laboris ka peale projekti lõppu säilitatud. Väga tõhusaks on osutunud ka need mikroorganismid, mis on võimelised tootma pindaktiivseid aineid, et muuta ärastatavad reoained hõlpsamini kättesaadavaks teistele bakteritele ja seentele[37].

Tänini on olnud vähe veenvaid tõendeid edukast mikroorganismide juurutamisest *in situ* põhjaveekihtidesse. Eksogeense mikroorganismi kultuuride ebatõhus levimine maapõues ja laboris kasvatatud kultuuride vähene ellujäämine välitingimustes heidutab bioaugmentatsiooni kasutamist. Bioaugmentatsioon võib saavutada tähtsama rolli bioremediatsioonis kui geneetiliselt muundatud organismide kasutamine on lubatud[29].

1.1.2 Biostimulatsioon

Süsivesinike biolagunemisprotsesse pinnases piiravad paljud tegurid, sealhulgas toitained, pH, temperatuur, niiskus, hapnik, pinnase omadused ja saasteainete olemasolu[36]. Kui looduslikku degradatsioonivõimet ei esine või kui lagunemine on liiga aeglane, siis on keskkonda võimalik manipuleerida, et biolagundumist stimuleeritakse ja reaktsiooni määrad suurenevad. Üheks selliseks meetmeks on biostimulatsioon. Biostimulatsiooni puhul varustatakse keskkonda, kus puhastusprotsess läbi viiakse, toitainetega nagu lämmastik ja fosfor, koos elektron aktseptoritega nagu hapnik ning substraatidega nagu metaan, fenool ja toluen. Keemiliste lisanditena kasutatud substraadid fenool ja toluen on tuntud mürgkemikaalid. Seega nende kemikaalide kontsentratsioone tuleb biostimulatsioon ajal hoolikalt jälgida[19].

Tavaliselt kasutatakse vees lahustuvaid toitaineid, mille hulka kuuluvad mineraalsoolad (nt KNO_3 , NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, MgNH_4PO_4), veetustatud ammoniaak (NH_3), urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) ja paljud kommertsiaalsed anorgaanilised väetised. Bioremediatsioonis kasutatavate anorgaaniliste lämmastiksoolade efektiivsuses on mõningaid erimeelsusi. Üldiselt ei olda veel ühtsel seisukohal, milline lämmastikuallikas on eelistatavam – kas ammonium või nitraat. Vees lahustuvad toitained lisatakse tavaliselt keskkonda toitainete segu pihustamisega või kuiv graanulite puistamisega. Selline lähenemine on olnud tõhus paljudel välikatsetustel suurendades õli biolagunemisprotsesse. Võrreldes teist liiki toitainetega on vees lahustuvad toitained kergemini kättesaadavamad ja manipuleeritavamad. Seda tüüpi toitainete teine eelis orgaanilise väetise ees on see, et anorgaaniliste toitainete kasutamine kõrvaldab võimalikku konkurentsi süsinikuallikatele[14]. Kuid vees lahustuvatel toital on ka mitmeid puudusi. Esiteks on tõenäoline, et toitaliste lisamisel merevette uhutakse toitained loodete ja lainete tegevuse tõttu ära ning anorgaaniliste toitaliste lisamisel, eelkõige ammoniaagi lisamisel tuleb olla ettevaatlik, et vältida toksilisi tasemeid[29].

Biostimulatsiooni peamine eelis on, et bioremediatsiooni viivad läbi juba eelnevalt keskkonnas eksisteerivad mikroorganismid, mis sobivad hästi antud maapõue keskkonda ja on pinnases ruumiliselt hästi hajutatud. Kõige suuremaks probleemiks,

arvestades kohaliku maapõue geoloogiat, on lisandite kohale toimetamine viisil, mis võimaldaks lisandid muuta maapõues olevatele mikroorganismidele kergesti kättesaadavaks. Veekindel maapõue litoloogia (tihe savi või muud peeneteraline materjal) raskendab lisandite levimist kahjustatud alal. Toitainete ühtlast jaotumist vähendavad lõhed maapõues, moodustades eelistatavaid radu, mida mööda toitained voolavad. Toitainete lisamine võib soodustada ka heterotroofsete mikroorganismide kasvu, mis ei ole naftasüsvesisinike lagundajad, tekitades nii olemasolevale mikrofloorale konkurentsi[36]. Biostimulatsiooni meetodit on edukalt rakendatud mere naftareostuse ja polütsükliiliste aromaatsete süsvesisikutega reostunud pinnase tervendamiseks[29].

1.1.3 Looduslik hajumine

Alates 1990. aastatest on kasvanud huvi saastunud alade haldamise vastu loodusliku tervenemise mehhanismidega, seda küll eelkõige Ameerika Ühendriikides. Järgnevatel aastatel hakkasid ka teised riigid seda kontseptsiooni uurima. Tänapäeval on looduslik lagunemine tunnustatud kui võimalik saastunud ala tervendamise mehhanism nii Ameerikas kui ka Euroopa riikides[34].

Üldiselt viivad loodusliku tervenemise protsessi läbi erinevad füüsikalised, keemilised või bioloogilised mehhanismid nagu lagunemine, dispersioon, lahjenemine, sorptsioon, lendumine ja (bio)keemiline stabiliseerumine, mis toimivad inimese sekkumiseta. Nende protsesside tulemusel väheneb saasteaine mass, toksilisus, liikuvus pinnases ja põhjavees. Protsesside nimekirjast peetakse sageli biolagunemist peamiseks mehhanismiks saasteainete vähenemisel[34].

Kuigi looduslikku hajumist võib kasutada mitmetes kohtades, kasutatakse seda harva ainsa raviprotsessina, kuna mittekonstrueeritud biolagundamisprotsessid on väga aeglased. Pikaajaline järelevalve on hädavajalik, sest ohtu ei tohi sattuda ei keskkond ega inimesed[35].

Loodusliku hajumise protsessi liigitatakse tihti kahte gruppi: destruktiivseks või mittedstruktiivseks. Destruktiivse protsessi käigus saasteaine hävitatakse, samas mittedstruktiivse protsessi puhul vähendatakse saasteaine kontsentratsiooni. Seda

tervendamise tehnoloogiat mõistetakse sageli valesti ning arvatakse, et see on mitte millegi tegemine[17].

Looduslik tervenemine ei ole mitte millegi tegemine, sest see hõlmab endas[38]:

- reoaine muutumise ja transpordi iseloomustamise selleks, et hinnata loodusliku tervenemise protsessi iseloomu ja ulatust,
- veendumist selles, et protsessi kulgedes väheneb reoaine kogus, mürgisus ja liikuvus nii, et see ei kujutaks ohtu inimese tervisele ja vastaks keskkonnanormidele
- tegurite hindamist, mis avaldavad mõju loodusliku tervenemise protsessi pikaajalisele arengule
- loodusliku tervenemise protsessi pikaajalist jälgimist, et olla kindel protsessi kestvas efektiivsuses

Looduslik hajumise protsessiga võib vähendada saasteaine massi (biolagunemise käigus), vähendada saasteaine kontsentratsiooni (lahjenemis- või dispersioonprotsessi käigus) või siduda saasteaineid mullaosakestega, et vältida saasteaine liikuvust (adsorptsioon)[17].

- Lahjendamine/dispersioon: Saasteainete kontsentratsioon väheneb aja jooksul, saasteained segunevad pinnase ja põhjaveega. See protsess ei hävita saasteaineid[17].
- Adsorptsioon: Saasteainete liikuvust väheneb siis kui saasteaine kinnitub mulla osakestele. See takistab saasteainete liikumist alale, kus nad võivad kujutada endast ohtu inimese tervisele ja keskkonnale[17].
- Biolagunemine: on protsess, kus looduslikult esinevad mikroorganismid (pärmid, seened või bakterid) lagundavad saasteaineid või vähendavad ohtlike ainete toksilisust. On kolm protsessi, mille abil mikroorganismid lagundavad süsivesinikke: käärimine, aeroobne hingamine ja anaeroobne hingamine[17].

Looduslik hajumine on suhteliselt lihtne tehnoloogia võrreldes teiste remediatsiooni tehnoloogiatega, kuid selle tulemuslikust on raske ennustada. Looduslik hajumine vajab rohkem aega kui tavapärased remediatsiooni meetodid, seda saab läbi viia ilma või

vähese ümbruskonna häiringuta. Protsessi pikaajaline hindamine ja jälgimine mõjutab eelkõige loodusliku hajumise kulukust[17].

See remediatsioonitehnoloogia on sobiv ainult mõndadele saasteainetele (näiteks benseen, toluen, etüülbenseen ja ksüleen- BTEX, hapnikurikkad süsivesinikud, madala molekulmassiga alkoholid, ketoonid, estrid ja metüleenkloriidid). Samuti võib transformatsiooni käigus saasteaine toksilisus ja liikuvus vastupidiselt eeldatule hoopis suurenedada[29].

1.1.4 Kompostimine

Kompostimise käigus lisatakse mahuaineid ja orgaanilisi aineid, nagu koor, hake, nisukliid, saepuru ja olme ning rohejäätmete segu. Need suurendavad õhutust ja mikroobide aktiivsust, seega saasteainete biolagunemise määra. Toitainete ja mikroorganismide augmenteerimine võib samuti kiirendada saasteainete biolagunemise protsessi. Orgaanilisi saasteaineid, kaasa arvatud petrooleumsüsivesinikke on kompostitud edukalt nii laboris kui ka välitingimustes[11].

Orgaaniliste ainete olemasolu toetab kõrge mikroobi populatsiooni arengut ja kõrgemat temperatuuri kompostimisel. Kompostimine on protsess, mille puhul mikroorganismid lagundavad orgaanilist saastet kõrgendatud temperatuuridel. Tüüpilised saasteainete efektiivseks lagunemiseks vajalikud komposti temperatuurid on vahemikus 55-65 C. Suurenenud temperatuurid tulenevad mikroorganismide poolt toodetud soojusest orgaanilise saasteaine degradatsioonil[7].

Saastunud pinnase osakaal ei ületa harilikult 30% kogu kompostisegus. Saasteainete kompostimisel on tarvilik järgida rangemaid ohutusnõudeid- leovesi tuleb varuda ning see tervendada, ja juhul, kui protsessi käigus võib eralduda lenduvaid ühendeid, siis need transformeerida kahjutuks. Teatud puhkudel on kompostimine vajalik läbi viia kinnistes ruumides[38].

Aeroobne kompostimine on orgaaniliste ainete degradatsiooni protsess, mis toimub kindlatel tingimustel ning hapniku ja mikroorganismide kohalolekul. Protsessi jooksul kasutavad mikroorganismid hapnikku ja orgaanilist ainet. Toimivast

kompostimisprotsessist eraldub tähelepanuväärselt soojust, süsihappegaasi ja veeauru. Süsihappegaas ja veekaod moodustavad ligikaudu poole algse materjali kaalust, mille tõttu on komposti ruumala ja mass väiksemad algsest materjalist. Orgaanilise aine defitsiidi puhul on võimalik kompostisegule lisada olmejäätmeid ja reovee puhastusseadmete muda käärimisprotsessi algatamiseks ja soojuse tootmiseks. Käärimisel eralduvad gaasid kobestavad materjali ja garanteerivad parema ligipääsu sellele. Kompostimine läbib optimaalsetel tingimustel neli faasi[40]:

- Mesofiilne faas, kestab paar päeva;
- Termofiilne faas, võib kesta paarist päevast paari kuuni;
- Jahutusfaas;
- Küpsemisfaas, kestab mitu kuud.

Erinevate faaside käigus domineerivad erisugused mikroorganismid. Kiiresti lahustuvad ja kergesti degradeeruvad ühendid lagundatakse esimeses faasis mesofiilsete bakterite poolt. Kompostimaterjali temperatuur tõuseb bakterite toodetud soojuse tõttu kiiresti. Termofiilsed mikroorganismid hakkavad domineerima alates 40°C. Paljud inim- ja taimepatogeenid hakkavad hävinema alates 55°C. Palju mikroorganismid hukuvad ja kompostikiirus väheneb temperatuuridel üle 65°C. Termofiilses faasis kiireneb valkude, süsivesinike ja rasvade degradatsioon. Kui loetletud ühendid ehk energiaallikad saavad otsa, hakkab komposti temperatuur langema, siis hakkavad taas domineerima termofiilsed bakterid ja algab viimane faas ehk allesjäänud orgaanika degradatsioon ning stabiilsemaks muutumine[40].

Peamiselt kasutakse kolme kompostimise viisi[6]:

- Aunkompostimine- Kompostist moodustatakse kuhjad ning aereeritakse puhuritega või vaakum pumpadega.
- Trummelkompostimine- Kompost asetatakse reaktorisse, kus seda segatakse ja aereeritakse.
- Vaalkompostimine- Kompost paigutatakse pikkadesse, madalatesse ja kitsastesse kuhjadesse ning segatakse perioodiliselt liikuvate seadmetega.

Kompostimist on edukalt rakendatud petrooleumsüsivesinike (nt kütuse ja õli), lahustite, klorofenooli, pestitsiidide, herbitsiidide, polüaromaatsete süsivesinike ja lõhkeainetega saastunud pinnase bioremediatsiooniks[6].

Kompostimine on Eestis kõige populaarsem saastunud pinnase tervendamise tehnoloogia. Kompostimise protsess on odav ning võrreldes keemilise või termilise käitlusega on tehnoloogia lihtsam. Võrreldes orgaaniliste jäätmete kompostimisega saastunud pinnase kompostimisel võtab lagunemine kauem aega, temperatuur ei tõuse nii kõrgele ja vajalik on toitesoolade lisamine. Tervendamine kestab 1-2 aastat[4].

1.2 Bioremediatsiooni mõjutavad faktorid

Bioremediatsiooni kõige olulisem põhimõte on see, et mikroorganisme (peamiselt baktereid ja seeni) saab kasutada ohtlike saasteainete hävitamiseks või muuta saasteained vähem kahjulikeks vormideks. Seega on saasteainete bioremediatsioon mikroobse ainevahetusaktiivsuse rakendamine. Seetõttu saab bioremediatsiooni rakendada ainult keskkonnas, mis on võimeline säilitama elu. Mikroorganismid lagundavad saasteaineid üksnes siis kui neile on saadavad erinevad ühendid, mis on neile energiaallikaks ja toitaineiks, et ehitada rohkem rakke. Mikroorganismide metaboolseid omadused koos saasteainete füüsikalise-keemiliste omadustega määravad kas saasteainete interaktsioon on võimalik. Nende omavahelist seost mõjutab saastunud ala keskkonnatingimused. Edukaks bioremediatsiooniks peab arvestama nende piirangutega. Need piirangud hõlmavad mikroobide, keemiliste ja keskkonna omadusi plaanitud alal[29]. Järgnevad peatükid hõlmavad ülevaadet bioremediatsiooni mõjutavates faktoritest.

1.2.1 Temperatuur

Nafta biodegradatsioon on temperatuurist otseselt mõjutatud, see mõjutab nafta füüsilist olemust ja keemilist koostis, samuti mikroorganismide süsivesinike metabolismi ning mikroobide koosseisu koosluses. Nafta optimaalne biodegradatsiooni temperatuur on 30-40 C. Biodegradatsiooni algus lükkub madalatel temperatuuridel edasi. Lisaks, madalatel temperatuuridel suureneb õli viskoossus, toksiliste lühiahelaliste alkaanide

lendumine väheneb ja lahustuvus vee suureneb. Süsivesikute biodegradatsiooni on täheldatud isegi -1,1 C pinnases, kuid biodegradatsiooni määr väheneb märgatavalt alla 15° C keskkonnas[7].

Biolagunemise määr väheneb ligi poole võrra peale iga 10° C temperatuuri langust. Biolagunemisprotsesside tase on 0° C juures üldiselt äärmiselt madal. Seevastu kõrgem mulla temperatuur toob kaasa mikroobide ainevahetuse suurema aktiivsuse ja kiirema biodegradatsiooni kuni umbes 65° C. Selle tulemusena biolagunemise kiirus võib sesoonselt erineda, samuti võib mikroobide ainevahetuse tegevus ise suurendada mulla temperatuuri[23].

1.2.2 Niiskus

Niiskus on nõutav kõikide bioloogiliste protsessides läbiviimiseks, see aitab transportida toitaineid, toitu ja jääkaineid mikroorganismide sisse ja välja. Ookeanites, järvedes ja teistes pinnaveekogudes ei kujuta see endast probleemi. Mullakeskkondades peab mõningane niiskus olema olemas, et degradatsioon üldse võimalik oleks. Liigne vesi mullas võib protsessid muuta anaeroobseks. Optimaalne niiskuse tase on klooriast ja mulla tüübist[28].

Naftasüsivesinike biolagundamiseks on optimaalne niiskusesisaldus mullas 50-80%. Kuna mullatüüpide veesiduvus erineb oluliselt, on tähtis, et uurimise all olev pinnase veesiduvus määratakse eksperimentaalselt. Kui mulla veesiduvusvõime on madal, on kasulik lisada orgaanilist ainet nagu õled, hakkepuu ja riisikestad, et suurendada mullas vee retentsiooni[7].

1.2.3 Hapnik

Aeroobne ja anaeroobne on kaks peamist metabolismi režiimi süsivesinike molekulide biolagundus protsesside puhul[26].

Bakterid ja seened vajavad nafta saasteainete substraadi oksüdatsiooni raja utiliseerimisel katabolismiks molekulaarset hapniku. Hapniku kättesaadavus pinnases sõltub mikroobide hapniku tarbimise kiirusest, pinnase tüübist, pinnase niiskusest ja lagundatavate substraatide olemasolust[7]. On täheldatud, et süsivesiniku

biolagunemine väheneb oluliselt kui hapniku gaasiline kontsentratsioon mullas langeb alla 2-5%[13]. Et säilitada mikroobide metaboolne tegevus, peab rakkude hapnikuvarustuse määr olema tasakaalus üldise tarbimisega. Nafta saasteainete anaeroobset degradeerumist on täheldatud, kuid selle lagunemiskiirus oli liiga aeglane praktiliseks bioremediatsiooni süsteemiks[7].

Loomulikult viiakse hapnikku pinnase alumisse kihti difusiooni teel. Kui saastunud pinnase füüsikalised ja keemilised omaduste blokeerivad või piiravad hapniku difusiooni, siis hapnik tarbitakse kiiremini kui seda on võimalik asendada. Selle tulemusel protsess muutub aeroobsest anaeroobseks metabolismiks ning biolagunemise kiirus langeb. Mulla segamine või mahuainete lisamine mulda suurendab hapniku kogust mullas ning selle tulemusel paraneb ka biodegradatsioon[26].

1.2.4 pH

pH-d mõjutavad organismide omavahelised keerukad seosed, saasteainete keemia ning keskkonna füüsikalised ja keemilised omadused[29]. Erinevalt enamikest veeökosüsteemidest võib mulla pH olla väga varieeruv, ulatudes 2,5-st kaevandusjäätmetes kuni 11,0-ni leeliselistes kõrbetes. Enamus heterotroofseid baktereid ja seeni eelistavad peaaegu neutraalset pH-d. Seened on happelistele tingimustele tolerantsemad. Pinnase pH äärmused avaldavad negatiivset mõju mikroobide populatsiooni võimele lagundada süsivesinikke. Üldiselt eeldatakse, et optimaalne pinnase pH nafta biolagunemisel on 6-8. Kui muld on liiga happeline (alla 6) võib pinnasele lisada lupja või kaltsiumkarbonaati, et suurendada pH-d soovitud vahemikku. Samas, kui pinnas on liiga leeliline (üle 8), võib pH alandamiseks lisada väävlit, ammooniumsulfaati või alumiiniumsulfaati[7].

1.2.5 Toitained

Toitainete olemasolu on suuresti seotud mikroorganismide võimega kohaneda ja kasvuks kasutada süsivesinikke. Lämmastikku ja fosforit peetakse kõige olulisemateks toitaineteks, sest neid vajatakse süsiniku liitmiseks biomassi. Kirjanduses on raporteeritud laias ulatuses optimaalset C:N ja C:P suhet. Parimat C:N ja C:P suhet

reguleerib pinnase keerukas koostis koos erinevate muutujatega ja muud tegurid nagu lämmastiku varud ja mügarbakterite (lämmastik-parandavate bakterite) olemasolu[7].

Süsiniku ja lämmastiku vahekord muutub pinnases järsult, kui seda reostatakse süsivesiniksaastega. Soovitatud optimaalne vahekord süsivesinike 0,1% kuni 10% kontsentratsiooni puhul on 9:1. Bakterite kasvamine ja süsivesinike utiliseerimine toimub aeglasemalt kui vahekord on suurem. Bakterite poolt läbiviidud diiselkütuse biodegradatsiooni kiirust vees võib suurendada 10 korda läbi toiteelementide koguse optimeerimise (424 mg/l lämmastikku ja 178 mg/l fosforit). Samuti võib naftaproduktidega reostunud pinnastes olla rikutud ka teiste elementide õige suhe- neis väheneb fosfori ja kaaliumi sisaldus. Vabalt liikuvate lämmastikusidujate viimine segusse aitab reguleerida pinnaste lämmastikurežiimi. Üks mulla ökosüsteemi normaalset toimimisttagav võtmerühm on lämmastikku siduvad mikroorganismid. Fosfaatide sisaldumine mullas mõjutab lämmastiku sidumise intensiivsust. Pinnase reostumine nafta ja naftaproduktidega vähendab fosfori liikuvate vormide sisaldust pinnases ning see omakorda avaldab negatiivset toimet lämmastikku sidumisele pinnases. Optimaalne süsiniku ja fosfori vahekord on 10:1. Fosfori allikana soovitatakse tarvitada ammoonium-ja kaaliumfosfaati. Mineraalväetiste toimetamine pinnasesse tõstab mulla kõikide mikroorganismide populatsiooni ja täiustab nende kasvutingimusi[27].

1.2.6 Soolsus

Biolagundamise määr langeb, kui mulla soolsus suureneb optimaalsest tasemest kõrgemale. Näiteks katse rikastada vett mikroorganismidega, mille soolsus on üle 20%, on osutunud ebaedukaks. Mulla kõrgele soolasisaldusele on erinevaid põhjuseid, näiteks soolane reovesi või soolaste õlide lekkimine. Mõningatel juhtudel saastatud pinnas on juba iseenesest kõrge soolsusega. Kuid kõige tavalisem põhjus mulla soolsuse suurenemisel on suurte koguste väetise lisamise, mis koosneb peamiselt hästi lahustuvast nitraadist või ammooniumsoolast (nagu ammooniumkloriid ja ammooniumnitraat). Need väetised muudavad pinnase poorivee ioonikontsentratsiooni pärast lahustumist, mille tulemusel väheneb biolagunemise kiirus ja ulatus. Mikroobide tegevuseks mulla soolsuse taseme optimaalses vahemikus hoidmiseks on vajalik mulla

soolsuse ja toitainete taseme hindamine algetapis, perioodiline toitainete lisamine, ajastatud mõõtmine ja jälgimine[26].

1.2.7 Biokättesaadavus ja pindaktiivsed ained

Nafta on iseenesest keeruline segu mittelahustunud ja hüdrofoobsetest elementidest nagu n-alkaanid, aromaatsed süsivesinikud, vaigud ja bituumen. Selliste ühendite biolagunemise piiravaks teguriks võib olla biokättesaadavus[12]. Termin "biokättesaadavus" viitab kemikaalide murdosale mullas, mida saavad elusorganismid kasutada või transformeerida[25]. Biokättesaadavust ja järk-järgulist nafta saasteainete lagundamist saab parandada, lisades kemikaale ja pindaktiivseid aineid[7].

Pindaaktiivsed ained muudavad saasteained mikroorganismidele kergemini degradeeruvaks, suurendades vees mitte- või vähelahustuvate saasteainete lahustuvust või vähendades pindpinevust. Pindaktiivsed ained aitavad kaasa solubilisatsiooni ja mobilisatsiooni protsessidele. Solubilisatsiooni puhul kasvab NAPL kontsentratsioon vees tänu mitsellide jaotamisele, samuti väheneb pooride arv. Mobilisatsiooni protsessi puhul vähendatakse NAPL/ vesi pindpinevust märkimisväärselt, alandades kapillaarjõudusid ning seejärel saab õlid ekstraheerida eraldi faasina[24].

Pindaktiivsete ainete kasutamine on soositud, sest nende püsivus looduses on madal. Tavaliselt peetakse ideaalseks pindaktiivsete ainete 1-2% lisamist pinnasesse. Kasutades kriitilisest piirist suuremat mitselli kontsentratsiooni, ei puutu saasteaine lagundavate mikroorganismidega kokku. Sellistel juhtudel on vaja pinnast lahjendada, et soodustada lagundavate mikroorganismide ja saasteainete kontakti[7].

Paljud bakteritüved, mis on võimelised lagundama või transformeerima naftasaaduseid toodavad pindaktiivseid aineid. Need on mitte toksilised, mitte ohtlikud, biolagunevad ja keskkonnasõbralikud ühendid[12].

Eraldi võib ära märkida aineid, mida produtseeritakse seente ja bakterite poolt, kasutades suhkruid, alkaane ja teisi bioloogiliselt degradeeruvaid jäätmehääd. Paljud mikroorganismid on võimelised sünteesima bioloogilisi pindaktiivseid aineid (bio-PAA). Glükolopiide sünteesivad näiteks *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas*

fluorescens, *Torulopsis bombicola*, *Arthrobacter*, *Torulopsis petrophilum* ning neutraalseid lipiide sünteesivad *Nocardia erythropolis* ja *Corynebacterium salvonicum* SFC. Polüsahhariid-protein kompleksi sünteesib *Corynebacterium hydrocarboclastus*. Bioloogilistel pindaktiivsetel ainetel on mitmeid eelised võrreldes keemiliselt toodetud pindaktiivsete ainete ees, biolagunevus, üldiselt madal toksilisus, looduslikust toorainest produtseerimine, aktsepteeritav tootmisökonoomika, efektiivsus. Aeroobsetes tingimustes pindaktiivsed ained lagunevad kergesti, kuid anaeroobsetes tingimustes on nende biolagunemine aeglasem. Seetõttu võib pindaktiivsete ainete rakendamine esile kutsuda sekundaarset saastet[24].

1.2.8 Mulla tüüp

Mulla omadused on eriti olulised edukaks süsivesinike lagundamiseks. Peamised piiravad tegurid on pinnase tekstuur, läbilaskvus, pH, vee mahtuvus, temperatuur, toitained ja hapnikusisaldus. Mulla tekstuur mõjutab läbilaskvust, vee sisaldust ja mulla tihedust. Mulla madal läbilaskvus (nt savipinnas) takistab vee, toitainete ja hapniku transporti ning jaotumist. Sellises pinnases bioremediatsiooni edendamiseks tuleb pinnas segada täitematerjalidega (nt põhk, saepuru jne), sest bioremediatsiooni protsess tugineb mikroobsele aktiivsusele ning mikroorganismid vajavad anorgaanilisi toitained, vett, optimaalset temperatuuri ja pH-d, et toetada rakkude kasvu ja säilitada biolagunemise protsess[25]. Üldiselt on liiv ja kruus kõige sobivam pinnase tüüp pinnase bioremediatsiooniks, savi ja kõrge orgaanilise sisuga pinnas, nagu turbane pinnas, ei ole nii hästi bioremedeeruv[16].

1.2.9 Alternatiivsed elektroni aktseptorid

Molekulaarse hapniku puudumisel kasutavad anaeroobsed mikroorganismid teisel kujul esinevat kombineeritud hapniku. Bakterid kasutavad erinevaid ühendeid elektroni aktseptoritena, näiteks denitriifitseerivad bakterid kasutavad nitraati (NO₃), nitritit (NO₂) või diämmastikoksiidi (N₂O), metalli vähendavad dissimilatoorsed bakterid kasutavad mangaani või raudoksiide (nt MnO₂, Fe (OH)₃, või FeOO-) ja metanogeensed bakterid kasutavad süsinikoksiidi (CO₂). Situatsioonides kus hapnik

järk-järgult väheneb kasutatakse elektron aktseptorid käesoleva oksüdatsiooni reaktsiooni redoks potentsiaali sobivuse järgi[29].

1.2.10 Süsivesinike tüüp

Bioremediatsiooni projekti edukus sõltub peamiselt saastunud alal olevatest orgaaniliste molekulide keemilisest struktuurist. Mõnede orgaaniliste ühendite struktuursed omadused ei ole looduses tavapärased, neid nimetatakse ksenobiootikuteks (nt H asendused Cl, NO₂, CN, ja SO₃ rühmadega) Selliseid molekule on mikroorganismidel raske metaboliseerida. Seega saasteained, mis sisaldavad selliseid asendusi oma molekulides, kipuvad olema tõrksad mikroobsele degradatsioonile[29]. Erinevat liiki süsivesiniku molekulid läbivad biodegradatsiooni läbi erinevate oksüdatsiooni protsesside. Seetõttu nende biolagunemise määrad ja protsessid varieeruvad sõltuvalt molekulaarstruktuurist ja koostisosadest. Lisaks on tõestatud, et identsetel süsivesiniku ühenditel võib olla erinev biolagunemise määr, sõltuvalt teiste süsivesinike ühendite esinemisest segus[33]. Kergemad molekulid (näiteks ühe ja kahe tsüklilised aromaatsed ühendid) aurustuvad ja lagunevad üldiselt kiiresti, kui raskemad molekulid (nagu polüaromaatsed süsivesinikud ja asfalteenid) on väga vastupidavad biodegradatsioonile ja jäävad sageli pinnase segusse. See toob kaasa pikaajalise kahjuliku mõju keskkonnale. Erinevate metaboolsete radadega alifaatsete ja madala molekulmassiga süsivesinike lagundavate mikroorganismide samaaegne esinemine ei ole tavapärane. Juhul kui saastunud ala on juba eelnevalt mitmeid kordi saastunud süsivesiniku tüüpi saastega, siis on selliste mikroorganismide leidumine tõenäolisem[26].

1.2.11 Redokspotentsiaal

Pinnase redokspotentsiaal on otseselt seotud gaasilise ja vedelal kujul esineva hapniku kontsentratsiooniga. Hapniku kontsentratsioon on sõltuvus atmosfääri gaasivahetusest ja mikroorganismide ning taimejuurte hingamisest. Hingamine võib hapniku ammutada, alandades redokspotentsiaali ja luues anaeroobsed tingimused nagu denitrifikatsioon, sulfaatide vähenemine ja käärimine. Paljud mitmevalentsete metallkatioonide redutseeritud vormid lahustuvad paremini kui nende oksüdeeritud vormid. Hästi aereeritud muldade redokspotentsiaal on 0,8 kuni 0,4 V, mõõdukal pinnasel 0,4 kuni 0,1

V, vähe aereeritud pinnasel 0,1 kuni -0,1 ja väga vähese aereeritusega pinnases -0,1 kuni 0,3 V. Redokspotentsiaali on pinnases ja põhjavees raske mõõta ning välitingimustes seda laialdaselt ei kasutata[29].

1.2.12 Orgaaniline aine

Loodusliku orgaanilise aine esinemine võib mõjutada pinnase veepidavust, pinnase temperatuuri ja mikroorganismide võimet lagundada saasteaineid. Orgaaniline aine võib sorptsiooni protsessides mõjutada mikroorganismide toitainete kättesaadavust. Biodegradatsioonile suunatud saasteained võivad olla mulla osakese sorptsiooni tõttu resistentsed alternatiivsetele ensümaatilistele rünnakutele. Seotud materjal muutub rünnakutele kättesaamatuks. Lisaks orgaanilise aine võib aeglustada biolagunemise loomulikku määra konkurentsi suurenemise tõttu, kuid pikemas perspektiivis võib see suurendada infiltratsiooni, läbilaskvust ja poorsust. Materjal lisamine võib olla kasulik madala niiskuse siduvusega muldkeskkondades[28].

1.2.13 Valgus

Valgusel on suur mõju nafta degradatsiooni protsessis. Kuni viimaste aastateni hinnati valguse mõju väikseks. Hiljutised uuringud näitavad, et see võib olla sama oluline kui bioloogiline lagunemine, eriti troopilistes piirkondades. Valguse olemasolu mõjutab positiivselt vetikate süsivesinike degradatsiooni, kuid valgusel on võime lagundada nafta komponente otseselt fotokeemilisel viisil. Valguse fotokeemilised reaktsioonid mõjutavad peamiselt õlifraktsioonide füüsilisi omadusi. Näiteks on võimalik muuta emulsioon formatsiooni ja petrooleum fraktsioonide lahustuvust. Seda tehakse õlikomponentide ja teiste molekulide vahelise reaktsiooni esilekutsumisega, mis muudab molekulid polaarsemaks ja vees paremini lahustuvaks, nõnda luues uued ühendid teiste füüsikaliste ja toksiliste omadustega. Toksilisust mõjutab ka esialgse süsivesinike kontsentratsiooni muutus[41].

1.3 Diiselkütuse biolagunemise protsess

Petrooleumsüsivesinikke bioremediatsiooni peetakse rakendatavaks ravimeetodiks, see on tõhus, ökonoomne ja keskkonnasõbralik tehnoloogia[30]. Diislikütus on petrooleumsüsivesinik saasteaine, mis on keeruline segu alkaanidest ja aromaatsetest ühenditest, mida sageli lekitab mahutitest ja torustikest või avarii juhtumitel[31]. Diislikütus koosneb ligikaudu 30% alkaanidest, 45% tsükliilistest alkaanidest ja 24% aromaatsetest ühenditest[42]. Diiselkütuse süsinike arv on 11 ja 25 vahemikus ning destillimine on 180-380° C vahemikus. Diiselkütus sisaldab tavaliselt väikeses koguses alkeene. Diisel kütus koosneb peamiselt neljast süsivesiniku struktuurklassist[43]:

- N-alkaanid või n-parafiinid (lineaarsed küllastunud süsivesinikud);
- Isoalkaanid või isoparafiinid (hargnenud küllastunud süsivesinikud);
- Tsükloalkaanid või naftenid (küllastunud tsükliilised alkaanid);
- Aromaatsed ühendid.

Diiselkütus sisaldab 2000-4000 süsivesinikku, millest kõiki ei saa gaasikromatograafiliselt täielikult eraldada. Ainult n-alkaane ja mõnda hargnenud süsivesiniku saab identsifitseerida kui eraldi ühendina[43].

Petrooleumsüsivesinike biodegradatsioon on keeruline protsess, mis sõltub antud süsivesinike iseloomust ja kogusest. Süsivesinike lagunemist mõjutavad paljud erinevad faktorid, kuid peamiseks piiranguks on saasteainete kättesaadavus mikroorganismidele. Petrooleum süsivesiniku ühendid seovad end mulla osakestega ja neid on raske eemaldada või lagundada. Süsivesinikud eristuvad nende mikroobide rünnaku vastuvõtlikkuse poolest. Süsivesinikud saab jaotada degradatsioonile vastuvõtlikkuse järgi: lineaarsed alkaanid, hargnenud alkaanid, väikesed aromaatsed ühend, tsükliilised alkaanid. Mõned ühendid ei tarvitse üldsegi laguneda nagu näiteks suure molekulmassiga polütsükliilised aromaatsedsüsivesinikud (PAH)[44].

Biolagunemine on protsess, kus mikroorganismid muudavad või mineraliseerivad orgaanilised saasteained vähem kahjulikeks, mitte ohtlikeks aineteks läbi metaboolsete

või ensümaatiliste protsesside, mis seejärel integreeritakse loomuliku biogeokeemilisse tsüklisse[25].

Mikroorganismide poolt lagundatakse süsivesinike läbi kolme protsessi: käärimise, aeroobse ja anaeroobse lagunemise. Käärimise käigus lagundatakse süsinik ensüümide poolt vahendatud reaktsioonide abil, mis ei sisalda elektron transpordi ahelat. Käärimise puhul võivad orgaanilised ühendid toimida nii elektron doonorite kui aktseptoritena. Aeroobse lagunemise puhul kasutavad mikroorganismid funktsioneerimiseks hapniku. Aeroobse lagunemise puhul lagundatakse süsinik ensüümide poolt vahendatud reaktsioonide abil, kus hapnik osaleb välise elektron aktseptorina. Anaeroobsetes tingimustes lagundavad mikroorganismid keemilisi ühendeid ilma hapnikuta. Anaeroobse lagundamise puhul lagundatakse süsiniks ensüümide poolt vahendatud reaktsioonide abil, kus nitaadid, sulfaadid, süsinikdioksiidid ja teised oksüdeeritud ühendid (välja arvatud hapnik) toimivad elektron aktseptoritena[17].

Bioremediatsioon sõltub mikroorganismide looduslikest bioloogilistest protsessidest, millest üks on ainevahetus ehk metabolism. Metabolism viitab kõikidele keemilistele reaktsioonidele, mis toimuvad raku või organismis. Kõik elavad protsessid põhinevad keeruliste keemiliste reaktsioonide jadas. Metaboolsed protsessid jagunevad kaheks tüübiks, anaboolseks, mis ehitab keerukad molekulaarstruktuure lihtsamatest molekulidest ja kataboolseks, mis lõhub keerukad molekulid lihtsamateks. Kemikaale, mis esinevad saastunud alal saab tervendada läbi mõlema protsessi[6].

Anabolismi puhul kasutavad mikroorganismid kemikaale, et ehitada erinevaid raku osasid. Mikroobirakud on moodustatud valkudes, suhkrutes ja nukleiinhapetest, mille põhikemikaalidesks on süsinik ja lämmastik. Mikroorganismid saavad süsiniku ja lämmastiku mullast, veest ja nende ümber. Selleks, et toitainetest moodustada raku osad vajavad mikroorganismid energiat. Katabolism võimaldab mikroorganismidel saada ümbritseva keskkonna kemikaalidest energiat. Kuigi enamik mikroorganismid omavad kokkupuudet valgusega ja keemiliste energia allikatega, siis enamik kasutavad energia allikana kemikaale. Kui kemikaalid lõhutakse, siis energia vabaneb ning mikroorganismid kasutavad seda energiat raku funktsioonide täitmiseks anabolismis[6].

Kemikaalid saastunud alal saavad anabolismi ja katobolismi protsessi osaks. Näiteks saavad mikroorganismid kasutada petrooleum süsivesinike raku ehituseks. Mikroorganismidele on tähtsad ka teised keemilised ühendid ja naatrium rühm. Saastunud alal leidub ka teisi mikroorganismidele vajalikke ühendeid nagu kroom, kolbat ja raud[6].

Saasteainete lagunemise kiirus sageli sõltub saasteaine kontsentratsioonist ja katalüsaatorite kogusest. Katalüsaatorite kogus esindab organismide arvu, mis on võimelised saasteainet metaboliseerima ja rakude poolt toodetud ensüümide kogust. Iga tegur, mis mõjutab saasteaine kontsentratsiooni, mikroorganismide arvukust või ensüümide tegevust rakus võib suurendada või vähendada saasteaine degradatsiooni. Degradatsiooni kiirus ei ole üldiselt konstantne ja oleneb saasteaine kontsentratsioonist[6].

Ensüümid vahendavad kõiki metaboolseid reaktsioone. Paljud oksügenaasi ensüümid, mis lagundavad aromaatsid süsivesinike omavad märkimisväärselt laia degradatsiooni võimet, tänu konkreetse anfiinsuse puudumise tõttu. Näiteks toluen dioksügenaas on võimeline lagundama üle 100 erineva ühendi, sealhulgas TCE, nitrobenseeni ja klorobenseeni[29].

Ensüümid on keerulised kerajas valgud, mis esinevad elus rakkudes ja kus nad tegutsevad katalüsaatoritena ning hõlbustavad ainetes keemilisi muutusi[32]. Nad kiirendavad biokeemilisi reaktsioone ilma, et neid reaktsioonis tarbitaks. Neid leidub kõikjal looduses: vees, keskkonnas ja kõigis elusorganismides. Ilma ensüümideta poleks elu võimalik. Ensüümid kiirendavad keemilisi ja biokeemilisi reaktsioone ning seda protsessi nimetakse katalüüsiks. Iga ensüüm sobib ja tegutseb ainult kindla ainega. Ensüümid on nagu väikese molekulaarsed masinad, mis kindlustavad, et molekulid omavahel kokkupuutuksid ja reageeriks. Ensüüme leidub looduslikult esinevates mikroorganismides nagu bakterites, seentes ja pärmides, mis võivad olla ka geneetiliselt muundatud[6].

Mikroorganismid saavad toitaineid ja energiat raku protsessideks ning kasvuks läbi oksüdatsiooni reduktsiooni reaktsiooni, mis katalüüsitakse spetsiifilise ensüümi poolt.

Redoks (oksüdeerumine/ reduktsioon) reaktsioon sisaldab elektronide transporti ühelt reagentilt teisele[6].

Nafta ja naftaproduktide loomuliku fraktsioneerumise etapp algab kohe pärast nende pinnasesse sattumist ja transformeerub pikapeale. Nafta transformeerumisel pinnases on vahet tehtud kolmel kõige tavapärasemal etapil ja kolmel neile kohasel mikroobide koosluse järgnevuse etapil[27]:

- 1) Alifaatsete süsivesinike füüsikalise-keemiline ja osalt ka mikrobioloogiline degradatsioon, mikroobikoosluse muutumine, mikroorganismide aktiveerumine ja populatsiooni kasv.
- 2) Madalamolekulaarsete ühendite mikrobioloogiline degradeerumine ja vaikainete formeerumine.
- 3) Kõrgmolekulaarsete ainete (asfalteenide, vaikude, tsükliliste süsivesinike) transformeerumine ja mikroobikoosluse järgjärguline taastumine algsele või sellele sarnasele positsiooni.

Mikroorganismid suudavad süsivesinike lagundada ainult vees. Kõik süsivesinikud on teataval määral vees lahustuvad ning sellepärast on võimalik nende degradatsioon mikroobide poolt. Paljud bakterid (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacteria*, aktinomütseedid), seened (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cladosporium*) ja pärmid on suutelised lagundama süsivesinikke. Alkaanide biolagunemine võtab aset nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes konditsioonides. Kõikidel mikroorganismidel on selge spekter süsivesinikke, mida nad on suutelised degradeerima. Kõige paremini lagundatakse n-alkaanidest molekule vahemikus C10-C24, madalama ja kõrgema arvu süsiniku molekulidega n-alkaane mikroobide ei degradeeri või seda siis väga aeglaselt. Kuni 20% mulla mikroobidest on suutelised lagundama süsivesinikke. Oksügenaaside (monoksügenaasid ja dioksügenaasid) kaudu toimub alfaatsete süsivesinike lagundamise esimene etapp. Alkaan hüdrokulaasi kodeerivaid geene kasutatakse markergeenina. Küllastunud süsivesinikud on kergemini lagundatavad kui küllastumata süsivesinikud[27].

Degradatsioonil kulgedes muutetakse alkaanid metüülrühmasid ründavate oksügeneesi ensüümide poolt alkoholiks. Alkohol oksüdeeritakse edasi aldehüüdiks ja seejärel rasvhapeteks. Edasine rasvhapete utiliseerimine toimub alifaatse jada β -oksüdatsioonil[45].

Tsükloalkanid või alitsükliilised süsivesinikud on vähem lagunevad kui alkaanid. Biolagunevus väheneb ringstuuride arvu suurenemisel. Alküülrühma asendanud tsüklaalkaanid on võrreldes asendamat süsivesinikega lihtsam lagundada. Oksüdatsiooni toimetel lagundatakse tsükloalkanid tsükliiliseks alkoholiks, mis edaspidi dehüdrogeenitakse ketooniks. Tsükloalkanide metabolismi toodeteks on tsüklokatoonid ja tsükloalkaan karboksüülhapped[45].

Aromaatsed süsivesiniku molekulid omavad benseeni põhjalist struktuuri. Võrreldes teiste tsükliiliste ühenditega on aromaatsed ühendid stabiilsemad, sest nad jagavad läbi pi sidemete delokaliseeritud elektrone. BTEX (bensee, touleen, etüülbenseen, ksüleen) ühendid on võrdlemisi mobiilsed ja vees hästi segunevad. Aromaatse ühendi biodegradatsioonil on kaks peamist sammu- tuuma aktiveerimine ja selle lõhustamine. Aktiveerimine saavutatakse molekulaar hapniku ühinemisel aromaatse tuumaga viies aromaatse tuuma dihidroksüülimiseni läbi oksügenaasi ensüümi. Seente ja teiste eukarüootidele iseloomulik monooksügenaasid katalüüsivad hapniku üksikuid aatomeid, et luua epoksüvaigud, mis seejärel läbivad hüdratsiooni saades transdihüdrodioolid. Dioksügenaasid katalüüsivad samaaegselt kahte hapniku aatomid, et luua dihidrodiool. Need dioksügenaasi reaktsioonid toimuvad benseenis, halgeneenitud benseenis, toluenis, para-klorotolueenis, ksüleenis, bifenüülis, naptheleenis, antratseenis jne. Need dihidrodioolid oksüdeeritakse edasi katehoolideks, mis on tuuma lõhustamise lähteained. Katehoole saab oksüdeerida, kas läbi orto lõhustamise rada, mis sisaldab kahe hüdroksüül rühma süsiniku aatomite sidemete lõhustamist, et saada mükoonhape või meta lõhustamise rada, mis sisaldab hüdroksüül rühma süsiniku ja sellega külgneva süsinik aatomite sidemete lõhustamist, et saada 2-hüdroksüülmükoon pool aldehüüd. Need ühendid lagundatakse veel orgaanilisteks hapeteks, mis seejärel utiliseeritakse mikroorganismide poolt nende raku sünteesiks ja energia tootmiseks[45].

Polütsükliiliseid aromaatseid süsivesinike (PAH) või polütuumseid süsivesinike (PNA) toodetakse kõrgetel temperatuuridel tööstusliku tegevuse tagajärjel nagu nafta rafineerimine, kosi tootmine ja puidu kaitsevahendite tootmisel. See ühendite rühm, mis koosnevad kahest või enamast benseeniringist, sisaldab 16 prioriteetset saasteainet. Arvatakse, et mõned neist ühenditest on kantserogeenid. PAH molekulaar raskuse ja ring struktuuride suurenemisel väheneb nende lahustuvus ja volatiilsus, kuid samal ajal suurendades adsorptsiooni mahtuvust. PAH-de lagunemise mehhanism on sarnane monoaromaatsete ühenditega. PAH-de lagundamine seente poolt on keskkonnale oluline, sest mõned tooted on toksilised kõrgematele eluvormidele[45].

Asfalteenid ja vaigud on suure molekulmassiga ühendid, mis sisaldavad enda struktuuris lämmastiku, väävlit ja hapniku. Need ühendid on tõrksad biodegradatsioonile, kuna need on väga raskesti lahustuvad ja koosnevad funktsionaalsetest rühmadest, mis on kaitstud mikroobsete rünnakute eest ulatuslike aromaatsete ring struktuuridega[45].

1.3.1 Bakterid biodegradatsioonis

Bakterid on võimelised lagundama enamik nafta ühendeid. Lagundavad bakterid on olemas nii vee kui ka mulla keskkonnas. Süsivesinike lagundamise kiirus sõltub ühendist, olemas olevatest bakteritest ja keskkonna tingimustest. Erinevaid degradatsiooni etappe võivad teostada erinevad bakterid. Lisaks bakteritele on teada ka petrooleum degradatsiooni teostavaid seeni. Nad suudavad aidata bakterite lagundada mõndasid süsivesinike. Degradatsiooni mehhanism toimib üldiselt polaarsete reaktsiooni gruppide tutvustamisel molekulile. Seda paremini reageeruvat gruppi kasutatakse edasises süsinikuaahela degradatsioonis. Reaktsiooniraja lõpuks lagundatakse nafta täielikult süsinikdioksiidiks[41].

Evolutsiooni käigus valitakse välja bakterid, mis on võimelised lagundama süsivesinikke. Taimed toodavad väiksemas kontsentratsioonis süsivesinike kuna need omavad taimedele kindlaid funktsioone. Kaitse herbivooride eest on üks näide. Evolutsiooni käigus on bakteritel arenenud erinevad mehhanismid, et lagundada neid

molekule. Teada on palju bakterite lagundamise radu, millest paremini tuntud ja arusaadavam on hapniku osalusega reaktsiooni rada. Orgaaniliste molekulide lagundamiseks vajavad bakterid elektron aktseptoreid. Enamus reaktsiooni radades on selleks hapnik, kuid selleks võib olla ka mingi teine molekul[41].

Kui degradatsiooni kulgemisel kasutatakse hapniku, nimetatakse seda aeroobseks, vastasel juhul anaeroobseks. Anaeroobse lagunemise kulgemisel kasutatakse nitraadi, sulfaadi või raua molekule. Anaeroobselt lagundavad bakterid saab jagada kahte klassi – ranged ja fakultatiivsed anaeroobid. Enamik neist on sulfaati vähendavad bakterid. Fakultatiivsetel anaeroobsetel bakteritel on võimalik valida lagundamise rada, kas hapnikuga või ilma. Need on üldisel nitraati või raua kasutavad bakterid. Anaeroobsed protsessid leiavad aset anaeroobses keskkonnas, näiteks sette kihtidas, sügavamates mulla või vee kihtides[41].

Aeroobsele lagunemisele on iseloomulik hapniku reaktsiooni jada kaasamine. Enamik alifaatsete ja aromaatssete süsivesinike reaktsioone teostavad monoüksügenaasid, mis lisavad ühe hapniku süsivesinikule. Dioksügenaasid on võimelised lisama üks või kaks hapniku aatomit aromaatssele molekulile[41].

Hargnemata alkaanid lagunevad kergesti veekeskkonnas. See lagunemise töötab väikeste ja suuremate süsinikahelate puhul, kuid lühemad ahelda lagunevad kiiremini. Bakterid muudavad alkaanid esmajärjekorras alkoholiks. Need alkoholid saab katalüüsida aldehüüdideks või karboksüülhapeteks. Mõnedel harvadel juhtudel on alkohol sekundaarne produkt ja järgmises etapis toodetakse karboksüülhape asemel ketooni. Karboksüülhapet saab β -oksüdatsiooni kaudu edasi lagundada, mis produtseerib süsiniku ahela, milles on kaks süsiniku aatomit vähem kui alguses molekulis ja atsetüülkoenuümi. Teine võimalus on omega oksüdiatsioon[41].

Rohkem hargnenud alkaanid on bakteriaal degradatsioonile resistentsemad. Seda seetõttu, et süsiniku ahela külgrupp teeb degradatsiooni bakteritele võimatuks. Selletõttu hargnenud alkaane degradeeritakse teiste mehhanismide abil. Näiteks omega degradatsiooni, mille käigus lisatakse kaks karboksüül hapet. Tehtud on palju uurimusi metüül gruppide lisamise mõjust molekuli. Degradatsioon keerukamad mehhanismid,

näiteks α -lagunemise asemel β -lagunemine takistab peamise süsinikahela degradatsiooni, mille tulemuseks on aeglasem biolagunemine[41].

Tsükloalkaanid on degradatsioonile resistentsemad kui alkaanid. Asendamata tsükloalaanide esimene lagunemise samm on alkoholi või ketoon rühma lisamine. Seda rühma võib kasutada teises etapis tuuma lõhustamiseks. Kui tsükloalkaan on asendatud, siis on degradatsioon kiirem ja tõenäoline on happeliste rühma lisamine külgrühma lähedale[41].

Aromaatsete ühendite lagunemise kiirus sõltub molekuli tuumade arvust. Aromaatsete ühendite esinemine suuremal hulgal põhjustab suuremat resistentsust degradatsioonile. Enamus aromaatsete ühendite degradatsiooni esimeses etapis sisestatakse diool rühm. Teises etapis diool lõhustatakse ja moodustatakse karbosüülhapete rühm. Oksügenaasi ja dehüdroksügenaasi ensüümid on kõige olulisemad bakteriaal ensüümid, mida kasutatakse polüaromaatsete lagundamiseks. Seened kasutavad reaktsioonide läbiviimiseks lignoliitilisi ensüüme, mida seletatakse järgnevas peatükis. Need aromaatsed molekuli reaktsioonid toimivad katalüüsi abil, mille tulemuseks on radiaalne reaktsioon. Väikesed aromaatse süsivesinikud lagundatakse nende osalise lahustuvuse tõttu vees. Suuremad polüaromaatsed ühendid lagundatakse tahkes olekus, mistõttu on nende degradatsiooni kiirus madalam[41].

1.3.2 Seened biodegradatsioonis

Seentel on suur potentsiaal orgaaniliste ühendite lagundamiseks, nende kasvu režiimi leviku ja taimede sümbiootse koosluse tõttu. Kuid baktereid peetakse seentest tähtsamateks kolonisaatoriteks õliga saastunud pinnasel. Seentel ja bakteritel võivad olla mutualistlikud suhted. Seente hüüvide ja mükoriisa struktuurid toetavad bakterite kasvu ja mõned bakterid täiustavad mütselli kasvu, nõnda parandades seente kasvutingimusi[46].

Lisaks tuntud süsivesinike lagundavatele bakteritele on teisi organisme nagu seened, vetikad ja taimed, mis on võimelised lagundama süsivesinike. Nad kasutavad süsivesinike lagundamiseks ensüüme, näiteks tsütokroom P450 peroksiidi ja

dioksügenaasi. Tänu oma püsivale iseloomule on sageli PAH-d nende laguprotsesside osaks[41].

Seene kasutavad võrreldes bakteritega teisi mehhanisme süsivesinike lagundamiseks, seetõttu nad võivad lagundada süsivesinike, mis jäävad tavaliselt kiiremini lagundavatest bakteritest alles. See võib olla kasulik viie tuumalise PAH lagundamisel, mis on bakterite poolt halvasti degradeeruv[41].

Seened eritavad ligniini lagundamiseks rakuvälist oksüdeerivat ensüümi. Need ensüümid on võimelised tegema hapnikust reageeruva peroksiidi. Eriti hästi lagundavad ligniini valge mäda seened ehk *white rot* seened. Ligniin on keeruline ebakorrapärane molekul, mis sisaldab palju aromaatsaid rühmi. Seente ligniini lagundamise võime teeb neist ka võimaliku PAH lagundamise kandidaadiks. Ligniini peroksüdaas ja mangaan peroksüdaasi ensüümid on näidanud võimet lagundada mõndasi ligniini mudel ühendeid. Peroksüdaas osaleb PAH lagundamisel kioonideks[41].

Erinevalt bakteritele, seened ei lagunda süsivesinikud täielikult süsinikdioksiidiks, parima tulemuse puhul konverteeriti ainult 19% süsivesinike. Selle asemel tekivad degradatsiooni produktid, mis lahjenevad vees või seovad mulla orgaanilise osaga[41].

Seente ja bakterite esinemine ühes kultuuris suurendab degradatsiooni kiirust võrreldes nende eraldi kasutamisel. Näiteks bakterid, mis ei olnud võimelised kasvama benzo(a)pireenil on seente olemasolu suutelised kasvama. Bakterite ja seente degradatsiooni mehhanismid on märkimisväärselt erinevad, seente cis-trans hüdroksülatsioon ja bakterite cis-cis hüdroksülatsioon[41].

2 Materjal ja metoodika

2.1 Katse ülesehitus

Katse viidi läbi TTÜ Tartu Kolledži mullabioloogia laboratooriumis. Katses kasutati nelja remediatsiooni tehnikat- bioaugmentatsiooni, biostimulatsiooni, loodusliku hajumist ja kompostimist, et hinnata diiselkütuse degradatsiooni efektiivsust ning määrata neis osalevad peamised mikroorganismid. Katsekehadeks vajalik muld oli võetud Kolledži territooriumilt. Katsekehade mass oli 10 kg. Katse kestis täpselt 90 päeva. Kõik katsekehad olid kogu selle aja 20 kraadi Celsiuse juures kliimakambris. Algne saastatus sai tehtud arvestades 10 g diislit 1 kg mulla kuivaine kohta. Kaasa arvatud kompostiga segatud muld- see oli vahekorras saastunud muld (konts. ikka 10 g diislit 1 kg mulla kohta) 1:0,5 komposti. Mis tähendab, et mulda oli 10 kg-ses katsekehas 6,6 kg ja komposti 3,4 kg. Bioaugmentatsioonis kasutati Tartu Ülikoolist saadud tüve *Pseudomonas fluorescense*. Biostimulatsioonis kasutati N ja P väetise segu kontsentratsioonis 0,5% katsekeha massi kohta ning see lisati katsekehale katse alguses. Oli plaan ka lisada katse keskel aga kirjanduse andmetel ei ole mõtet 3 kuu jooksul mitu korda stimuleerida, liiga lühike periood.

2.2 Keemiliste parameetrite määramine

Iga kolmekümne päeva järel võeti saastatud mullast proov, et saada teada saasteaine keemiline kontsentratsioon. Proovi mass oli 10 grammi ja naftaproduktide analüüs toimus TÜ Chemicumis.

2.3 Kasutatud söötmeplaadid

Mikrobioloogia jaoks tehti söötmeplaadid, millele pandi kasvama vastavalt kas bakterid või seened. Samasid plaate kasutati ka KMÜ-de määramiseks. Bakterite jaoks koostati söötmeplaadid, mille koostisosad on toodud tabelis 1. Bakterite söötmeplaatide tegemiseks kasutati pärmiekstrakti, peptooni, soola, agarat ja destilleeritud vett. Kõik ained segati omavahel kokku ning pandi ahju 110°C juurde autoklaavima 30-60

minutiks. Peale autoklaavimist jahutati söödet ning lisati eelnevalt kokku segatud tsükloheksimiidi ja alkoholi lahus, mis takistab seente elutegevust. Lahus lisati jahtunud söötmele, et see ei kaotaks oma mõju. Jahtunud sööde valati Petri tassidesse ning oodati selle täielikku tahkestumist.

Tabel 1. Bakterite söötmeplaadi koostisosad

0,5 g	pärmiekstrakt
1,25 g	peptoon
1,25 g	sool
3,75 g	agar
250 ml	destilleeritud vett
KOKKU 250 ml	

Seente jaoks koostati söötmeplaadid, mille koostisosad on toodud tabelis 2. Seente söötmeplaatide tegemiseks segati kokku agar, linnaseekstrakt, kloramfenikool ja destilleeritud vesi. Söötme koostisosas olev kloramfenikool on aine, mis takistab mikroobirakus valgusünteesi ja pärsib seega bakterite elutegevust. Seejärel pandi sööde ahju 110°C juurde autoklaavima 30-60 minutiks või seniks kuni agar on lahustunud. Peale autoklaavimist lasti söötmele jahtuda ning valati Petri tassidesse ja oodati selle täielikku tahkestumist.

Tabel 2. Seente söötmeplaadi koostisosad

3,75 g	agar
5 g	linnaseekstrakt
0,05 g	kloramfenikool
250 ml	destilleeritud vett
KOKKU 250ml	

2.4 Seente ja bakterite identifitseerimine

Identifitseerimiseks kasutati nelikümmend söötmeplaati, kuhu oli külvatud kaksikümmend bakteri- ja seeneliik. Silmajärgi otsustades olid mõnel plaadil ka muid liike, ning valituks osutusid need kaksikümmend seene ja bakteriliiki. Kõigile neljakümnele klaasplaadile tilgutati 10 µl destilleeritud vett, kuhu pandi hästi natukene uuritavat materjal. Klaasplaadid asetati tõmbekapi alla kuivama, seniks kuni veetilk on

täiesti aurustunud. Seejärel toimus klaasplaatide kuumfikseerimine, mille käigus klaasplaat liigutati paar korda läbi leegi. Sellekäigus denatureeruvad seene või bakteri valgud klaaspinnale kinni ning nii on neid kindlam ja lihtsam värvida, et neid hiljem identifitseerida.

Seente identifitseerimiseks värviti seened bengaalpunasega, et neid hiljem oleks mikroskoobi all näha. Bengaalpunase saamiseks valmistati 5%-line värvilahus, mille koostisosad on toodud tabelis 3. Seente värvimist korrati kolm korda, et värv kinnituks korralikult. Peale igat värvimist eemaldati üleliigne värv destilleeritud veega.

Tabel 3. Bengaalipunase 5% värvilahus

0,01 g	bengaalipunane (pulber)
0,1 ml	alkohol (90% piiritus)
1,9 ml	destilleeritud vesi
KOKKU 2 ml	

Bakterite identifitseerimiseks kasutati Grami värvimist, mille võttis kasutusele teadlane H.C.J Gram 1884-ndal aastal. Grami värvimismeetod põhineb bakteriraku seina ehitusel, mille järgi bakterid jagunevad kaheks– grampositiivsed ja gramnegatiivseks[47]. Gram'i värvimise esimeseks etapiks on bakterpreparaadi värvimine kristallviolettiga. Edasi töödeldakse preparaati Lugoli lahusega, mille ülesandeks on kinnistada kristallviolett grampositiivsete bakterite peptidoglükaani kihtidesse. Selle tulemusena moodustub grampositiivsete bakterite–kristallviolett-joodi kompleks. Järgmises etapis toimub preparaadi värvustamine, pestes seda etanooliga. See etapp toob esile erinevad astmed Gram'i värvimisel. Nimelt grampositiivsed bakterid hoiavad kristallvioletti täna paljudele peptidoglükaani kihtidele kinni ja jäävad violetseteks. Samas gramnegatiivsed bakterid muutuvad värvituks, kuna nendel on peptidoglükaani kihte oluliselt vähem. Nende bakterite esile toomiseks toimub järelvärvimine safraniiniga. Iga etapi vahel loputatakse preparaati destilleeritud veega. Selle tulemusena värvuvad gramnegatiivsed bakterid punasteks (roosadeks), grampositiivsed jäävad violetseks. Kui preparaat on kuivanud toimub mikroskopeerimine[48].

2.5 Vältimistest

Neljakümnele Petri tassile lisati erinevas mahus diiselkütust, kümnele 0,25 ml diislit, kümnele 0,5 ml diislit, kümnele 0,75 ml diislit, kümnele 1,0 ml diislit (tabel 4). Seejärel lisati kahekümnele Petri tassile bakterisöödet ning kahekümnele seenesöödet. Söötmed külvati erinevate mikroorganismi liikidega.

Tabel 4. Vältimistesti ülesehitus

Selektiivsööde (nii bakterite kui seente)	Lisatud diisli hulk
1% saastatus 25ml-s söötmes	0,25 ml diislit
2% saastatus 25ml-s söötmes	0,5 ml diislit
3% saastatus 25ml-s söötmes	0,75 ml diislit
4% saastatus 25ml-s söötmes	1,0 ml diislit

3 Tulemused

Antud töö kõige esimeseks tulemuseks oli söötmeplaatidel olevate seente kolooniate arvu leidmine erinevatel katsevariantidel (tabel 5). Seente keskmiseks kolooniate arvuks saadi 407 ± 244 KMÜ-d.

Tabel 5. Seene kolooniate arv

Nr. katsevariant	KMÜ
1. Augmentatsioon	196
2. Stimulatsioon	625
3. Looduslik hajumine	644
4. Kompostiga segamine	163

3.1 Keemiliste parameetrite määramine

Uurimuse vältel võeti iga 30 päeva järel pinnase proov ning tehti keemiliste parameetrite määramine, et näha kuidas diiselkütise kontsentratsioon muutub ajas (tabel 6, joonis 1). Katse alguses oli kõigi katsekehade saaste kontsentratsioon 10 mg/g. 30 päeva möödudes võeti uued proovid, katsekehade saasteaine kontsentratsiooni tase oli keskmiselt langenud 10,6%. Bioaugmentatsiooni puhul oli saasteaine kontsentratsioon langenud 10 mg/g-lt 9,36 mg/g-le ehk 6,4%. Biostimulatsiooni katsekehas oli saasteaine kontsentratsioon langenud 8,23 mg/g-le ehk 17,7%, mis oli ka kõige suurem degradatsiooni määr peale 30 päev möödumist (tabel 7). Looduslik hajumine andis kõige madalamad degradatsiooni tulemused, peale 30 päeva möödumist oli saaste kontsentratsioon langenud 9,67 mg/g-le ehk 3,3%. Kompostimise puhul langes saasteaine kontsentratsioon 8,49 mg/g-le ehk 15,1%.

Tabel 6. Diiselkütuse kontsentratsiooni muutus pinnases katse perioodil

Kasutatud meetod	Algkontsentratsioon	30 päeva pärast	60 päeva pärast	90 päeva pärast (katse lõpp)
1. Bioaugmentatsioon	10 mg/g KA	9,36 mg/g KA	8,13 mg/g KA	7,47 mg/g KA
2. Biostimulatsioon	10 mg/g KA	8,23 mg/g KA	7,37 mg/g KA	6,71 mg/g KA
3. Looduslik hajumine	10 mg/g KA	9,67 mg/g KA	9,25 mg/g KA	8,84 mg/g KA
4. Komposti segu	10 mg/g KA	8,49 mg/g KA	7,39 mg/g KA	6,89 mg/g KA

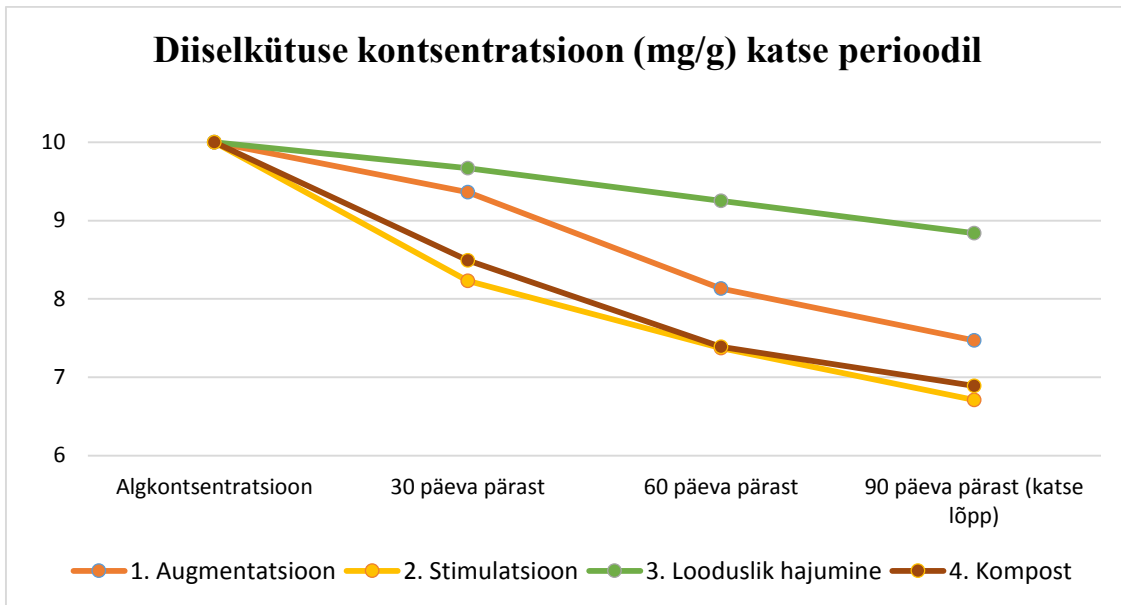
Tabel 7. Degradatsiooni intensiivsuse muutmine katse vältel (protsentides)

Kasutatud meetod	Katse alguses	30 päeva pärast	60 päeva pärast	90 päeva pärast (katse lõpp)
Bioaugmentatsioon	0,0	6,4	13,1	8,1
Biostimulatsioon	0,0	17,7	10,4	9,0
Looduslik hajumine	0,0	3,3	4,3	4,4
Komposti segu	0,0	15,1	13,0	6,8

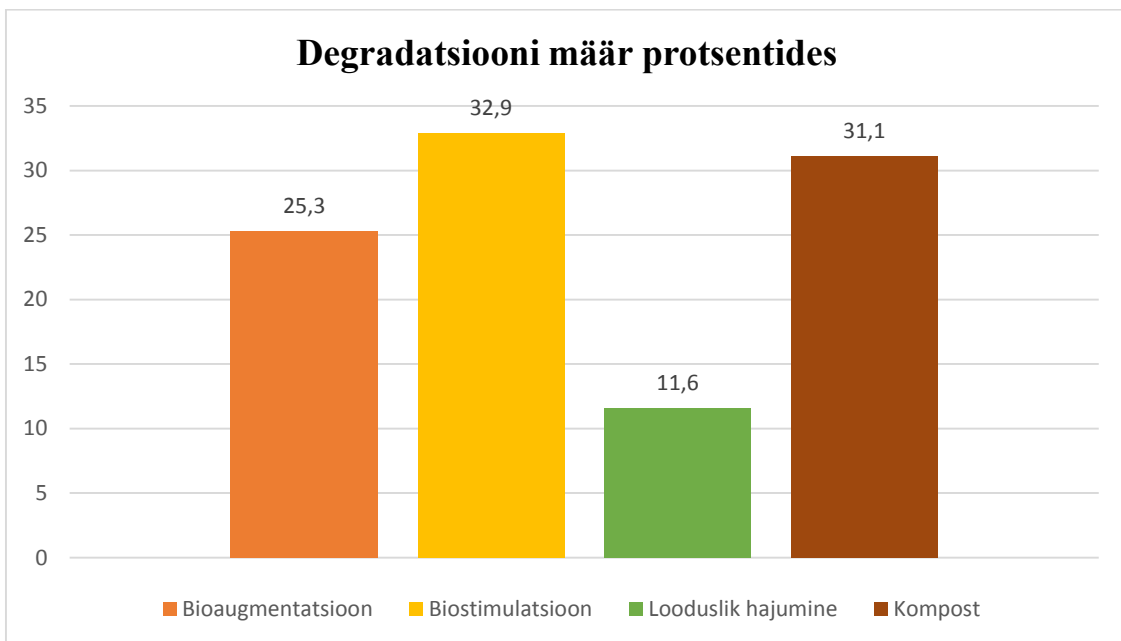
Katsealgusest 60 päeva pärast võeti katsekehadelt uued proovid, saasteaine tase oli keskmiselt langenud 19,6%. Bioaugmentatsiooni meetodi puhul oli saasteaine kontsentratsioon langenud 8,13 mg/g-le ehk alg kontsentratsiooniga võrreldes 18,7%. Biostimulatsiooni meetodi puhul lagunes saasteaine kontsentratsioon 7,37 mg/g-le ehk 26,3%. Loodusliku hajumise meetodi puhul langes saasteaine kontsentratsioon 9,25 mg/g-le ehk 7,5%. Komposti segu meetodi puhul langes saasteaine kontsentratsioon 7,39 mg/g-le ehk 26,1%.

90 päeva möödudes oli katsekehade saasteaine kontsentratsioon langenud keskmiselt 25,2%. Bioaugmentatsiooni meetodi puhul oli saasteaine kontsentratsioon langenud 7,47 mg/g-le ehk 25,3% võrreldes algkontsentratsiooniga (joonis 2). Biostimulatsiooni

meetodi puhul oli saasteaine kontsentratsioon langenud 6,71 mg/g-le ehk 32,9%, mis ühtlasi on ka antud uurimuse kõrgeim degradatsiooni tulemus. Loodusliku hajumise meetodi puhul oli saasteaine kontsentratsioon langenud 8,84 mg/g-le ehk 11,6%. Komposti segu saasteaine kontsentratsioon oli langenud 6,89 mg/g-le ehk 31,1%.



Joonis 1. Graafiline ülevaade diiselmootori kontsentratsiooni muutusest pinnases



Joonis 2. Ülevaade erinevate tehnoloogiate degradatsiooni määradest antud uurimuses

3.2 Seente ja bakterite identifitseerimine

Katsetes kasutatud söötmeplaatidel identifitseeriti bakteri- ja seeneliigid (tabel 8, lisa 1, lisa 2). Identifitseeritud mikroorganismidest kuulusid bakterid ja seened vastavatesse rühmadesse:

- Gram-positiivsed bakterid: *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Bacillus*
- Nendest omakorda aktinomütseedid on: *Streptomyces* ja *Rhodococcus*
- Gram-negatiivsed bakterid: *Arthrobacter* (ainult noored rakud), *Sphingomonas*, *Pseudomonas*
- Hallitusseened: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*
- Pärmid: *Candida* ja *Pichia*

Tabel 8. Bioremediatsiooni katsetes esinenud mikroorganismid

Kasutatud meetod	Mikroorganism	Identifitseeritud perekonnad
Bioaugmentatsioon	Seen	<i>Pichia</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i>
	Bakter	<i>Streptomyces</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>
Biostimulatsioon	Seen	<i>Aspergillus</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Candida</i> , <i>Rhizopus</i>
	Bakter	<i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i>
Looduslik hajumine	Seen	<i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i>
	Bakter	<i>Sphingomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Arthrobacter</i>
Pinnase ja komposti segu	Seen	<i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Fusarium</i>
	Bakter	<i>Rhodococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> + üks perekond mida ei suudetud identifitseerida

Esimene identifitseerimine sai tehtud kohe alguses Ecopro AS Kiviõli jäätmejaamast saadud naftaproduktidega saastunud komposti proovidest (tabel 9). Sealt määrati kahe erineva (algusfaas ja lõppfaas) proovi seened ja bakterid. Ecopro AS-i komposti muldades ja antud komposti segu mullas esinesid sarnased mikroorganismid. Kuid labori tingimustes esines rohkem perekondi, mis tuleneb konkurentsi puudumisest ning optimaalsemate tingimuste esinemisest. Väritingimustes on palju inhibiteerivaid tegureid, mis mõjutab mikroorganismide arengut. Väritingimustes puudusid *Cladosporium* ja *Fusarium* seene perekonnad ning *Rhodococcus* bakteri perekond. Kuigi antud uurimuse komposti segu katsekehas *Candida* ja *Penicillium* seene perekonda ei esinenud, on need perekonnad laialt levinud ning esinesid mitmes teises katsekehas.

Tabel 9. Kiviõli jäätmejaamast saadud proovid

Algusfaas	Seente perekonnad	<i>Aspergillus, Candida, Penicillium, Mucor, Trichoderma</i>
	Bakterite perekonnad	<i>Bacillus, Streptomyces</i>
Lõppfaas	Seente perekonnad	<i>Aspergillus, Candida, Trichoderma</i>
	Bakterite perekonnad	<i>Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces</i>

3.3 Vältimistest

Vältimistesti tulemuseks oli, et kõigil plaatidel oli 1 nädala järel, 15°C inkubatsioonitemperatuuri juures tekkinud mikroorganismide kasv. Isegi 4% saastatusega (väga kõrge saastatuse tase) ei olnud tekkinud mingitki inhibeerivat efekti.

Söötmed külvati silmnähtavalt erinevate mikroorganismi liikidega, kuid bakterite puhul selgus, et mõned olid samast perekonnast (tabel 10, lisa 3). Antud katses ei olnud võimalik kasutada DNA määramismeetodit, et mikroorganisme määrata liigi tasemini.

Tabel 10. Identifitseeritud mikroorganismid, mida vältimistestis kasutati

Bakterid		Seened	
B1.1	<i>Streptomyces</i>	S4.3	<i>Mucor</i>
B1.2	<i>Rhodococcus</i>	S1.3	<i>Candida</i>
B4.5	<i>Streptomyces</i>	S1.4	<i>Penicillium</i>
B2.3	<i>Pseudomonas</i>	S3.2	<i>Aspergillus</i>
B2.1	<i>Pseudomonas</i>	S4.5	<i>Fusarium</i>

4. Arutelu

Kõikides katsekehades hakkasid tervendamismeetodid tööle, kuid seda erineval määral. Katse periood oli liiga lühike, et naftasüsivesinike täielikult lagundada. Biostimulatsiooni meetodi puhul lagundati üllatuslikult kõige rohkem saasteainet, 32,9% algtkonsentratsioonist, samuti algas tervendamine selle meetodi puhul kõige intensiivsemalt. Seetõttu võib väita, et antud uurimuses töötas mikroorganismide stimuleerimine toitainetega väga hästi. Esimese 30 päeva jooksul lagundati 17,7% saasteaine kontsentratsioonist, järgmisel perioodil lagundati 10,4% eelnevast perioodist alles jäänud saasteainetest ja katselõpuks 9,0% võrreldes eelneva perioodiga. Võib eeldada, et biostimulatsiooni intensiivne saasteaine lagundamine algas toitainete küllusest ja nende hõlpsast kättesaadavusest. Samuti võib arvata, et lagundamise intensiivsuse langus tuleneb toitainete kontsentratsiooni langusest ning biokättesaadavuse vähenemisest. Kuid tähtsamaks põhjuseks võib pidada, et katse alguses lagundati kergemini lagundatavaid saasteaineid ja sellest tulenes ka kõrge saasteaine kontsentratsiooni muutus katse alguses. Katse kulgedes vähenes kergesti lagunevate süsivesinike osakaal ning suurenes resistentsemate komponentide osatähtsus, millest tulenes ka degradatsiooni intensiivsuse määra langus. Samuti on võimalik, et keerukamate süsivesinike lagundamisel võisid tekkida toksilised vaheained, mis pärssisid mikroorganismide tegevust. Lisaks oli tähtis tuntud naftasüsivesinike lagundavate bakterite ja seente olemasolu. Protsessis esinesid meie laiuskraadidele tavapärased mikroorganismid ning ühtegi ainulaadset organismi võrreldes teiste katsekehadega ei esinenud. Põlismikroorganismid on hästi kohanenud enda keskkonnaga. Bakteriperekondadest leidis valmistatud katsekehades *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*. Seeneperekondadest laialt levinud mullas ja õhus elutsevad seened, nagu *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Candida*, *Rhizopus*.

Komposti segu meetod oli antud uurimuses samuti väga edukas, algtkonsentratsioonist lagundati 31,1% saasteainet. Esimese 30 päeva jooksul lagundati 15,1% saasteainet ning intensiivne algus võib tuleneda kompostis esinevate toitainete ja mikroorganismide tõttu. Järgneval perioodil degradatsiooni määr langes, lagundati 13,0% saasteainet eelneva perioodi kontsentratsioonist. Katse viimasel perioodil langes degradatsiooni

intensiivsus veelgi, lagundati 6,8% saasteainet. Intensiivse degradatsiooni alguse ning selle languse katse vältel põhjustasid ilmselt samad faktorid, mis biostimulatsiooni puhul. Komposti segu üheks edu põhjuseks võib olla ka *Mucor* ja *Fusarium* seente esinemine, mida teistes meetodites ei esinenud. Nende leidmine ei olnud ka iseenesest üllatav, kuna tegemist on tüüpiliste kompostis elutsevate seeneperekondadega. Samas, võis just nende perekondade esinemine anda eelise just kompostimise meetodile võrreldes mõne teise biotervendusmeetodi ees. Bakterite ja seente mutualistlik suhe toetab saasteainete degradeerimist. Samuti esines antud meetodis bakter, mida ei suudetud identifitseerida, võimalik et ka selle bakteri roll oli märkimisväärne.

Bioaugmenteeritud katsekeha edukus oli oodatust madalam, 90 päeva jooksul langes saasteaine kontsentratsioon 25,3%. Esimese 30 päeva jooksul kahanes saasteaine kontsentratsioon ainult 6,4%, mis on siiski peaaegu kaksorda parem tulemus kui loodusliku hajumise puhul. Madal esialgne degradatsioon võib tuleneda toitainete puudumisest ning mikroobikoosluse harjumatuses muutunud keskkonnaga, kuid suurem spetsialiseerunud bakteri tüvi annab eelise loodusliku hajumise ees. Järgneval perioodil lagundati 13,1% saasteainest, selleks hetkeks oli lisatud *Pseudomonas fluorescence* bakteri tüvi harjunud keskkonnaga ning eeldatavasti lagundati enamus kergesti lagundatavatest süsivesinikkudest. Katse viimasel perioodil langes degradatsiooni intensiivsus 8,1%-le, mis võib tuleneda kergesti kättesaadavate süsivesinike vähenemisest ning loomuliku esinevate toitainete vähenemise tõttu. Katsekehadele ainulaadselt esines bioaugmentatsioonis pärm *Pichia* perekonnast. Arvestades pärmide kiiret elutsükli, võis just *Pichia* esinemine pärssida naftaproduktide lagundamiseks spetsiaalselt aretatud *Pseudomonas fluorescence*-i elutegevust konkureerides vabalt kättesaadavatele toitainetele. Sellest ka lagunemisprotsesside hüppelisus.

Loodusliku hajumise meetodi puhul lagundati oodatult kõige vähem saasteainet. 90 päeva jooksul langes saasteaine kontsentratsioon 11,6%. Esimese 30 päeva jooksul lagundati 3,3%, järgneval perioodil 4,3% eelneva perioodi saasteaine kontsentratsioonist ja viimaseks perioodiks 4,4%. Loodusliku hajumise degradatsiooni intensiivsus suurenes kogu katse vältel, kuid selle kiirus ja üldine lagundamise määr oli

võrreldes teiste meetoditega mitu korda kehvem. Antud meetodi puhul ei stimuleeritud seda kuidagi, kui teistel meetoditel oli eeliseks kas spetsiaalsed mikroorganismid või lisatud toitained. Meetodit on lihtne rakendada, kuid see vajab rohkem aega.

Bakterite ja seente peal viidi läbi 1-4% saasteaine kontsentratsioonidega vältimistest. Vältimistesti tulemused näitasid, et kõigil saasteainega plaatidel oli tekkinud mikroorganismide kasv. Valitud mikroorganismid olid võimelised koloniseerima kõikide kontsentratsioonidega plaate, ei olnud tekkinud mingitki inhibeerivat efekti, isegi saasteaine suurtes kontsentratsioonides (4% söötme kogusest).

Petroolium süsivesinike täielikuks lagundamiseks on 90 päeva liiga lühike aeg, seda isegi laboritingimustes. Looduslikes tingimustes võtab nafta täielik lagundamine palju rohkem aega ja on mõjutatud paljudest erinevatest keskkonnafaktoritest. Paljusid saasteaineid, mis on võimelised laboris lagunema nädalate jooksul, on leitud looduses veel pärast mitut aastat [42]

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida diiselkütusega saastunud mulla bioremediatsioonis esinevat mikroobikooslust. Uurimuses käsitleti diiselkütuse degradatsiooniks nelja tehnoloogiat. Uuriti mikroorganisme ja degradatsiooni määrasid bioaugmentatsioonis, biostimulatsioonis, naturaalses hajumises ja kompostimises.

Katsed viidi läbi TTÜ Tartu Kolledži mullabioloogia laboris. Analüüsideks vajalik muld koguti Kolledži territooriumilt ja seejärel saastati laboris diiselkütusega. Katsekehad kaalusid 10 kg ja olid saastatud 100 g diiselkütusega. Komposti segu koosnes 6,6 kg mullast ja 3,4 kg kompostist. Bioaugmentatsioonis kasutati Tartu Ülikoolist saadud tüve *Pseudomonas fluorescens*. Biostimulatsioonis kasutati N ja P väetise segu kontsentratsioonis 0,5% katsekeha massi kohta ning see lisati katsekehale katse alguses. Katse kestis 90 päeva ja kõiki katsekehasid hoiti kliimakambris 20 kraadi Celsiuse juures.

Täiustatud remediatsiooni meetodid olid edukamad diiselkütuse degradatsioonil kui naturaalne hajumine. Biostimulatsiooni meetodi puhul lagundati katse lõpuks 32,9% algsest saastest, kompostisegus 31,1%, bioaugmentatsiooni puhul 25,3% ja naturaalse hajumise meetodid korral 11,6% algsest saaste kontsentratsioonist.

Biostimulatsioon ja kompostimine olid efektiivsemad ilmselt lisatoitainete tõttu ja seetõttu ka degradatsioon algas intensiivsemalt. Bioaugmentatsioonil oli eelis naturaalse hajumise ees lisatud tüve tõttu, mis oli võimelised süsivesikuid kiiresti lagundama, kuid toitainete puudus ja konkurents kiiresti paljuneva *Pichia* perekonna pärmiga võis takistada kunstlikult sisseviidud organismil saavutamaks oma täielikku lagundamispotentsiaali.

Biostimulatsioonis identifitseeriti *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Candida*, *Rhizopus* seene perekonnad ja *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* bakteri perekonnad. Kompostimisel identifitseeriti *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Fusarium* seene perekonnad ja *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* bakteri perekonnad, ühte bakteri perekonda ei suudetud tuvastada.

Bioaugmentatsioonis identifitseeriti *Pichia*, *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Cladosporium* seene perekonnad ja *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* bakteri perekonnad. Naturaalse hajumise meetodi puhul identifitseeriti *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichoderma* seene perekonnad ja *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* bakteri perekonnad. Need mikroorganismid on tavapärased sellele laiuskraadile ja enamus muldades esineb neid üsnagi rohkelt.

Seente ja bakterite mikroobikoosluse identifitseermisel leiti, et mullas esinenud perekonnad on sarnased kirjanduses väljatoodule. Tulemused näitasid kahe bakteri perekonna ülekaalu- *Streptomyces* ja *Pseudomonas*, koos kahe seene perekonnaga- *Aspergillus* and *Penicillium*. Kuid *Penicillium* perekonda kompostimis meetodi puhul ei tuvastatud. Kompostimissegus identifitseeriti kaks sellele katsele unikaalset seene perekonda *Mucor* ja *Fusarium*, samuti leiti bioaugmentatsioonis unikaalne seeneperekond- *Pichia*.

Bakterite ja seente peal viidi läbi 1-4% saasteaine kontsentratsioonidega vältimistest. Vältimistesti tulemused näitasid, et kõigil saasteainega plaatidel oli tekkinud mikroorganismide kasv. Valitud mikroorganismid olid võimelised koloniseerima kõikide kontsentratsioonidega plaate, ei olnud tekkinud mingitki inhibeerivat efekti, isegi saasteaine suurtes kontsentratsioonides (4% söötme kogusest).

Petroolium süsivesinike täielikuks lagundamiseks on 90 päeva liiga lühike aeg, seda isegi laboritingimustes. Looduslikes tingimustes võtab nafta täielik lagundamine palju rohkem aega ja on mõjutatud paljudest erinevatest keskkonnafaktoritest.

Eestis on kompostimine levinum remediatsiooni tehnika, seda ka põhjusega. Kompostimine on odav, suhteliselt lihtne ja efektiivne tehnoloogia. Stimulatsioonis esinenud seene *Rhizopus* ja bakteri *Sphingomonas* lisamine komposti segule võib edendada kompostimise degradatsiooni. Samas, vajab nende perekondade petrooleumsüsivesinike lagundamispotentsiaal kindlasti täiendavaid uuringuid. Siiani ei ole Eestis eelnevalt selliseid uurimusi läbi viidud, sarnaselt on uuritud tehismärgaladel esinevat mikroobikooslust ainult.

Summary

„Microorganisms involved in bioremediation of soils contaminated with diesel fuel and their degradation potential“

The aim of this Master's thesis was to examine the microorganisms involved in bioremediation processes of soils contaminated with diesel. In this study we evaluated four technologies for the degradation of diesel fuel. Microorganisms and their degradation rates of diesel were examined in bioaugmentation, biostimulation, natural attenuation and composting.

The tests were carried out at TTU Tartu College's soil biology laboratory. Soils for the analyses were collected from College territory and then contaminated with diesel fuel. Each test pile weighed 10 kg and was contaminated with 100 g of diesel fuel. The compost mix consisted of 6,6 kg soil and 3,4 kg compost. For bioaugmentation *Pseudomonas fluorescens* was used and for biostimulation N and P nutrient mix of 0,5% w/w concentration was added. The test lasted precisely 90 days and all of the piles were kept in a climate chamber at 20 degrees Celsius.

As expected stimulated/enhanced methods were more successful at degrading diesel fuel contaminations than natural attenuation. In this study the biostimulation method degraded 32,9%, composting mix 31,1%, bioaugmentation 25,3% and natural attenuation 11,6% of initial contamination concentration.

Biostimulation and composting were more effective because of extra nutrients and therefore the degradation was more intense at the beginning. Bioaugmentation had an advantage over natural attenuation because of the addition of specially cultivated bacteria which were able to degrade hydrocarbons more rapidly but whose growth might have been hindered due to lack of nutrients.

The fungal genera found in the biostimulation processes were *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Candida*, *Rhizopus* and *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* bacterial genera were identified in biostimulation. In compost *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Fusarium* genera of fungi and

Rhodococcus, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* and one unidentified genera of bacteria were identified. In bioaugmentation *Pichia*, *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Cladosporium* genera of fungi and *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* genera of bacteria was identified. In natural attenuation *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichoderma* genera of fungi and *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* genera of bacteria were found. These microorganisms are commonly found at this latitude and are quite abundant in most soils.

Identification of fungi and bacteria showed that microbial genera found in the subjected soils were similar to those described in literature. Results showed two predominant bacterial genera – *Streptomyces* and *Pseudomonas*, together with two abundant genera of fungi – *Aspergillus* and *Penicillium*. However *Penicillium* was not found in the composting mix. In the composting mix *Mucor* and *Fusarium* genera fungi were unique for all the studied methods, also one unique genera was found in bioaugmentation- *Pichia*.

An avoidance test was conducted for bacteria and fungi at diesel fuel concentration of 1% to 4% w/w. Avoidance test results showed that diesel fuel had no effect on the selected group of microbes, regardless of concentration of diesel contamination. The selected microorganisms managed to form colonies on all of the mentioned concentrations.

90 days is too short of a time to completely degrade petroleum hydrocarbons, even in laboratory conditions. Needless to say, it would take much longer for the petroleum to be fully degraded in natural conditions.

Tänuõnad

Magistritöö autor soovib tänada oma juhendajat Sander Kuttit abivalmiduse ja hea juhendamise eest.

Kasutatud kirjandus

- [1] **Anto Raukas.** 1999. Endise Nõukogude Liidu sõjaväe jääkreostus ja selle likvideerimine.
- [2] **Ronald M. Atlas, Jim Philp.** 2005. Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup.
- [3] **Wioletta Przystas, Krzysztof Ulfig, Korneliusz. Miksch.** 2007. The Potential of Keratinolytic and Keratinophilic Fungi for degradation of Petroleum Hydrocarbons in Soil. (Raamatust: Hermann J. Heipieper. 2007 Bioremediation of Soils Contaminated with Aromatic Compounds.)
- [4] **Mait Kriipsalu, Aleksander Maastik, Jaak Truu.** 2016. Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamise.
- [5] **Rashmi Sanghi, Vandana Singh.** 2012. Green Chemistry for Environmental Remediation.
- [6] **M.H. Fulekar.** 2010. Environmental Biotechnology.
- [7] **Ebrahim Mohammadi Goltapeh, Tounes Rezaee Danesh, Ajit Varma.** 2013 Fungi as Bioremediators.
- [8] **Yong-chao Gao, Shu-hai Guo, Jia-ning Wang, Dan Li, Hui Wang, De-hui Zeng.** 2014. Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. *Chemosphere. Vol 117, p 486-493.*
- [9] **J.R.Wild, S.D.Varfolomeyev, A.Scozzafava.** 1996. Perspectives in Bioremediation. Technologies for Environmental Improvemnet. NATO ASI Series. 3. High Technology- Vol. 19.
- [10] **D.C. Adriano, J.M Bollag, W.T. Frankenberger, Jr., R.C.Sims.** 1999. Bioremediation of Contaminated Soils.

- [11] **Yaohui Xu, Mang Lu.** 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials. Vol 183 p 395-401.*
- [12] **K.S.M. Rahman, T.J. Rahman, I.M. Banat, R. Lord and G. Street.** 2007. Bioremediation of Petroleum Sludge using Bacterial Consortium with Biosurfactant (Raamatust: Shree N. Singh, Rudra D. Tripathi. Environmental Bioremediation Technologies. 2007)
- [13] **Leeson A, Hincbee RE.** 1997. Soil bioventing: principles and practice. Lewis. Boca Raton, FL.
- [14] **Albert D. Venosa, Xueqing Zhu.** 2005. Guidance for the Bioremediation of Oil-Contaminated Wetlands, Marshes, and Marine Shorelines (Raamatust: Milton Fingerman, Rachakonda Nagabhushanam. 2005. Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystems)
- [15] **Arezoo Dadrasnia, N. Shahsavari and C. U. Emenike.** 2013. Remediation of Contaminated Sites.
- [16] **Gareth M. Evans, Judith C. Furlong.** 2011. Environmental Biotechnology Theory and Application.
- [17] **Faisal I. Khan, Tahir Husain, Ramzi Hejazi.** 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management. Vol 71, p 95–122.*
- [18] **Pedro J.J Alvarez, Walter A. Illman.** 2006. Bioremediation and Natural Attenuation Process Fundamentals and Mathematical Models.
- [19] **Tomotada Iwamoto and Masao Nasu.** 2001. Current Bioremediation Practice and Perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 92, No. 1, p 1-8.*

- [20] **United States Environmental Protection Agency.** 2006. In Situ Treatment Technologies for Contaminated Soil.
- [21] **United States Environmental Protection Agency.** 1995. Bioventing Principles and Practices. Volume I: Bioventing Principles.
- [22] **Liesbet van Cauwenberghe, Diane S Roote, P.G.** 1998. In Situ Bioremediation.
- [23] **The Mississippi Department of Environmental Quality.** 1998. Fundamental Principles of Bioremediation (An Aid to the Development of Bioremediation Proposals).
- [24] **Jana Budašova.** 2005. Anioonsete pindaktiivsete ainete käitumine õliga reostunud pinnase bioremediatsioonis. Magistritöö. Juhendajad: Prof Toomas Tenno, Doktorant Aare Selberg. Tartu.
- [25] **Snežana Maletić, Božo Dalmacija, Srđan Rončević.** 2013. Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil– Implications for Bioremediation.
- [26] **Masoud Naseria, Abbas Barabadia, Javad Barabadya.** 2014. Bioremediation Treatment of Hydrocarbon-Contaminated Arctic Soils: Influencing Parameters. *Environmental Science and Pollution Research. Vol 21(19), p 11250-11265.*
- [27] **Vallo Kõrgmaa, Hugo Tang, Katri Vooor, Mati Salu, Oliver Järviik, Sergei Lavrentjev, Mart Kont.** 2013. Endiste militaar- ja industriaalalade jääkreostuskollete ohutuks muutmise meetodika väljatöötamine ulatuslikku keskkonnakahju põhjustavate hädaolukordade tarbeks, I etapp. Aruanne. Eesti Keskkonnauuringute Keskus OÜ.
- [28] **Shallu Sihag, Hardik Pathak, D.P.Jaroli.** 2014. Factors Affecting the Rate of Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons. *International Journal of Pure & Applied Bioscience. Vol 2 (3): p 185-202.*

- [29] **Artin Hatzikioseyan.** 2010. Principles of bioremediation processes. *Trends in Bioremediation and Phytoremediation. 2010: p 23-54.*
- [30] **Ta-Chen Lin, Po-Tsen Pan, Sheng-Shung Cheng.** 2010. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials. Vol 176, p 27-34*
- [31] **Fatima M. Bento, Flavio A.O. Camargo, Benedict C. Okeke, William T. Frankenberger.** 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology. Vol 96, p 1049-1055.*
- [32] **John E. Smith.** 2009. Biotechnology Fifth Edition
- [33] **Ronald M. Atlast.** 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews. vol 45 (1), p 180-209.*
- [34] . 2012. Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: State of the art in Europe—A critical evaluation. *Science of The Total Environment. Vol 426, p 393–405.*
- [35] **Catherine N. Mulligana, Raymond N. Yong.** 2004. Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International. Vol. 30, Issue 4, p 587– 601.*
- [36] **Godleads Omokhagbor Adams, Prekeyi Tawari Fufeyin, Samson Eruke Okoro, Igelenyah Ehinomen.** 2015. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review.
- [37] . 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research. Vol 165, Issue 5, p 363–375.*
- [38] **Vee- ja mullamikrobioloogia loengud.** 2005. Keskkonna biotehnoloogia loengud 10-11.

- [39] **Yongtian Thomas He, Chunmin Su.** 2015. Use of Additives in Bioremediation of Contaminated Groundwater and Soil. (Raamatust: Naofumi Shiomi. 2015. *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil.*)
- [40] **Keskkonnaministeerium.** 2005. Biolagunvate jäätmete käitlemine II etapp.
- [41] **R.M. van der Heul.** 2009. Environmental Degradation of petroleum hydrocarbons.
- [42] **R.G. Zytner, A. Salb, T.R. Brook, M. Leunissen, and W.H. Stiver.** 2011. Bioremediation of diesel fuel contaminated soil. *Canadian Journal of Civil Engineering. Vol 28, p 131-140.*
- [43] **R. Marchal, S. Penet, F. Solano-Serena and J.P. Vandecasteele.** 2003. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology. Rev. IFP, Vol. 58, No. 4, p 441-448.*
- [44] **Nilanjana Das and Preethy Chandran.** 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International. Vol 2011.*
- [45] **Vijay Kothari, Meera Panchal, Namrata Srivastava.** 2013. Microbial Degradation of Hydrocarbons.
- [46] **Sari Kauppi.** 2011. Bioremediation of diesel oil contaminated soil and water. Academic dissertation in Environmental Ecology.
- [47] **Elias, A.** 2014. Bakteriraku ehitus ja endosporide moodustumine: Gram-positiivsed ja -negatiivsed bakterid.
- [48] **Elias, A.** 2014. Bakteriraku ehitus ja endosporide moodustumine: Gram'i värvimine.
- [49] **Torsvik, V.L., Goksoyer, J Daae, F.L.** (1990) High diversity in DNA of soil bacteria, *Appl. Environ. Microbiol. Vol 56, p 782-787.*

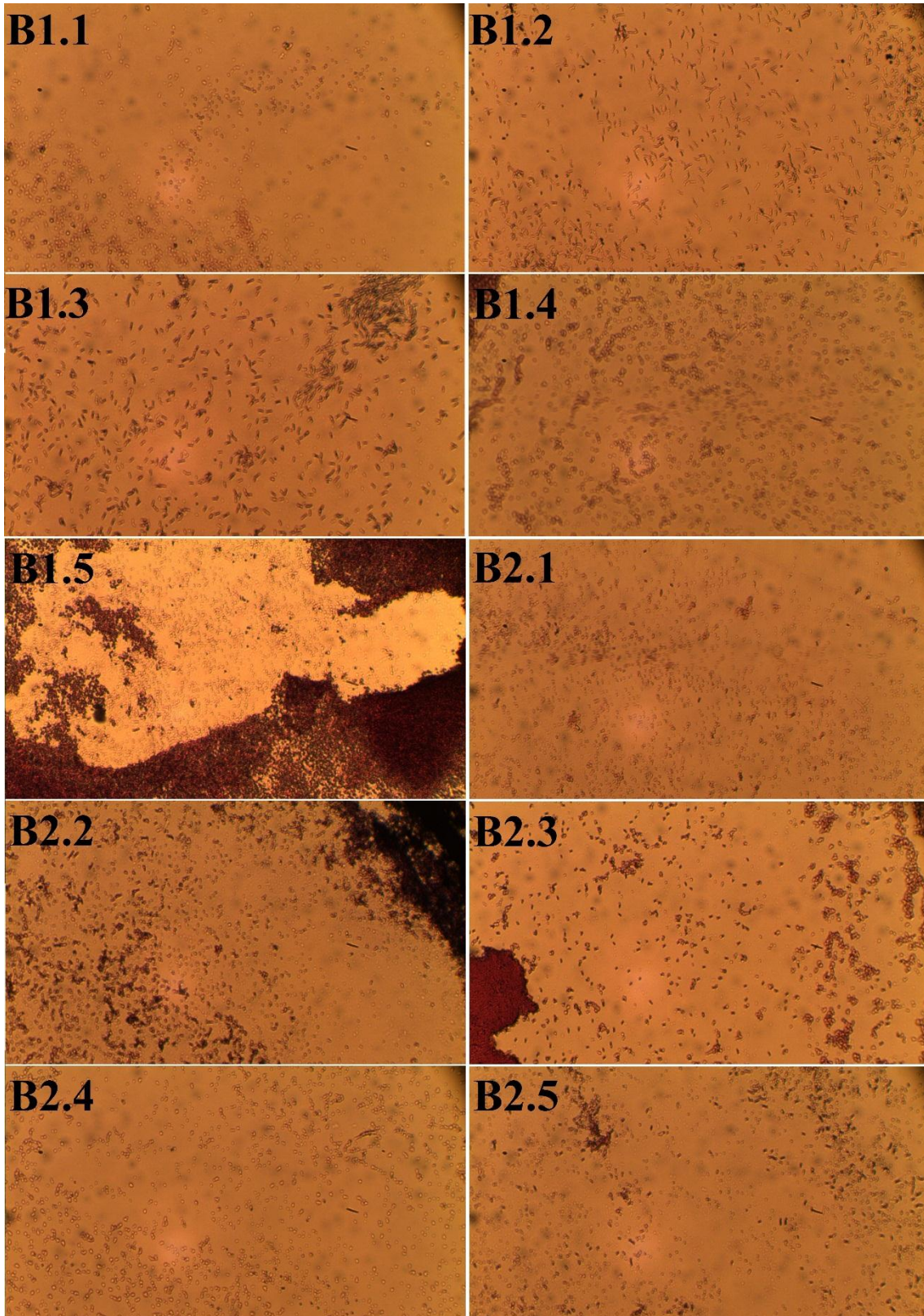
Lisa 1

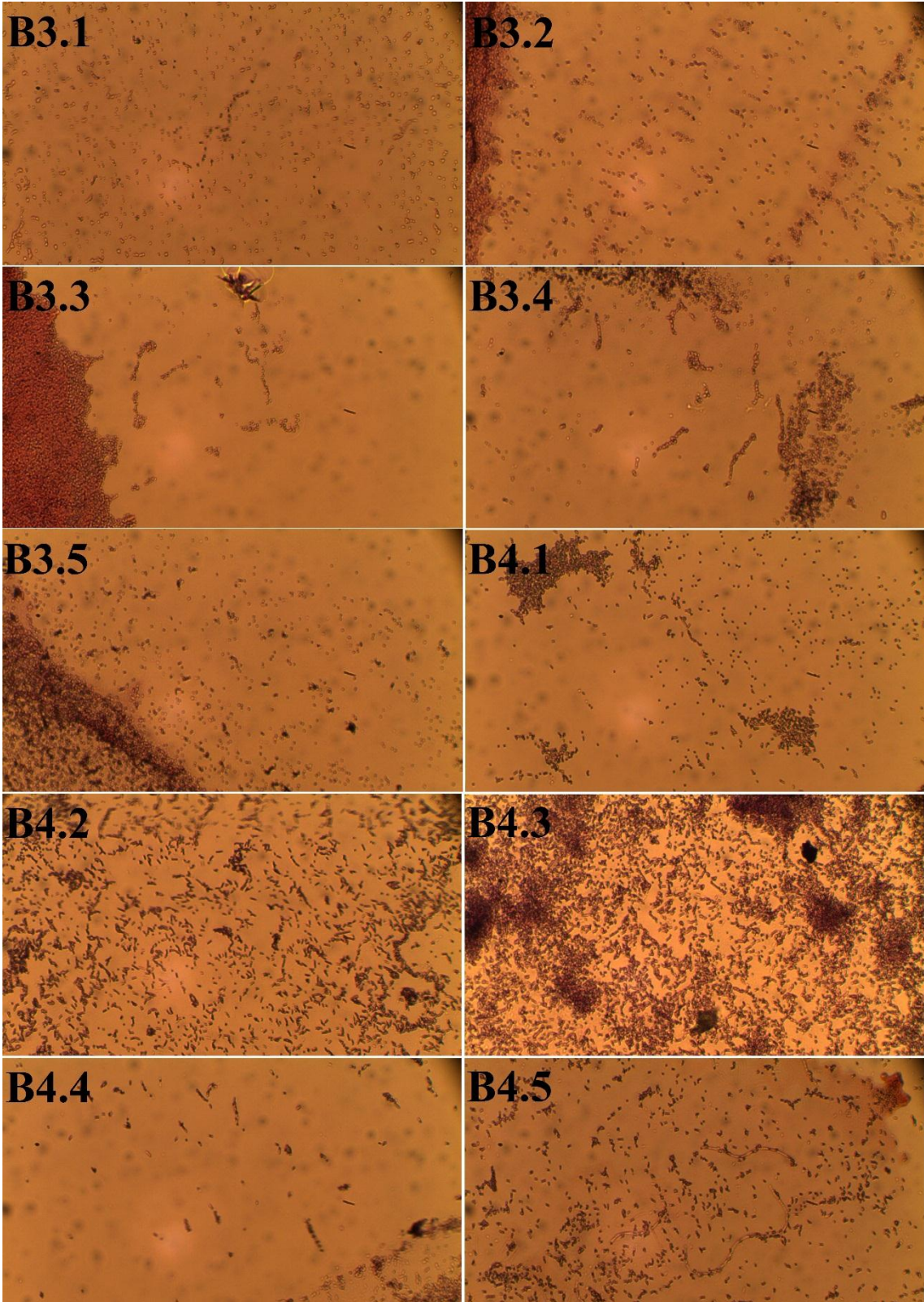
Seene- ja bakteriperekondade identifitseerimine slaidide kaupa.

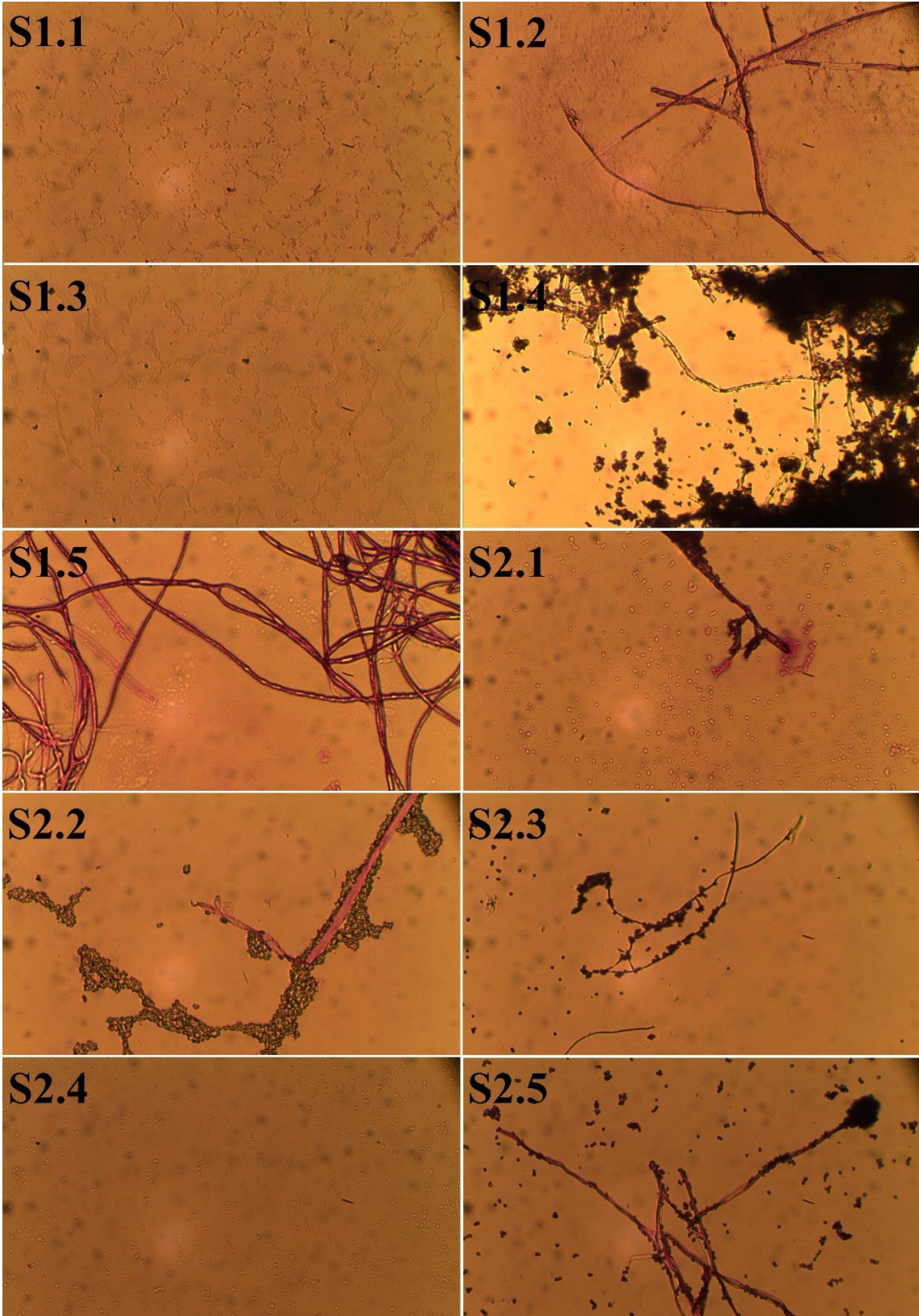
Slaidid asuvad lisa 2.

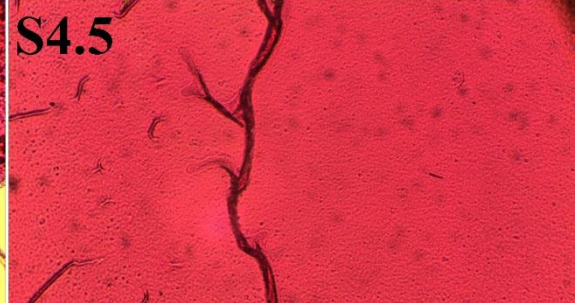
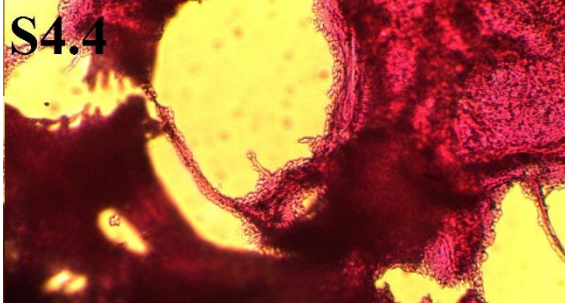
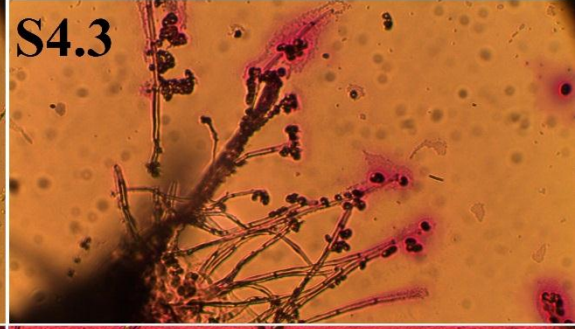
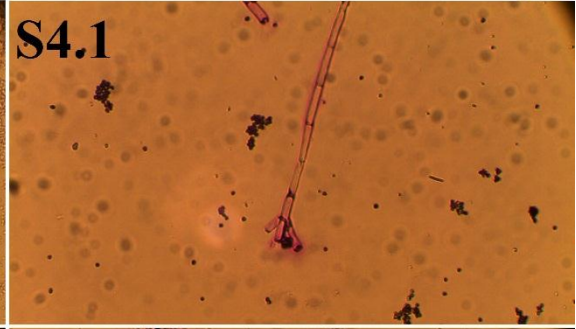
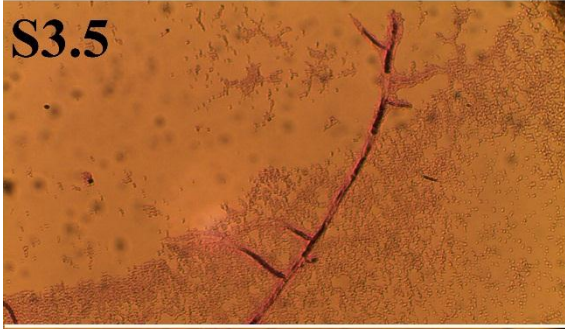
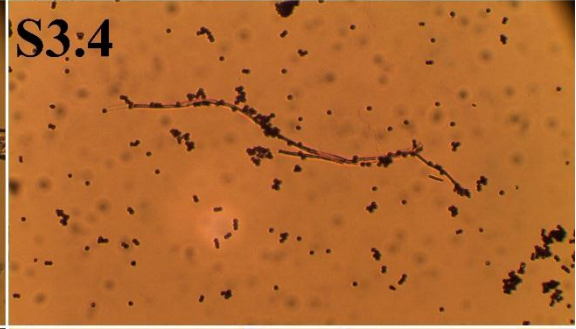
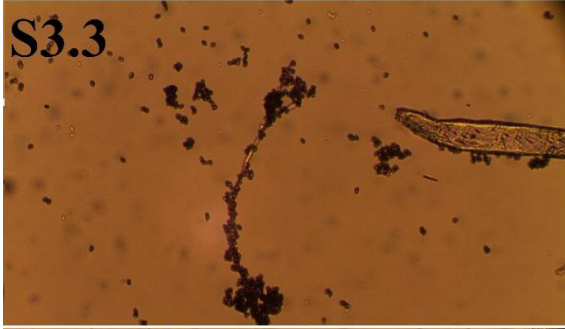
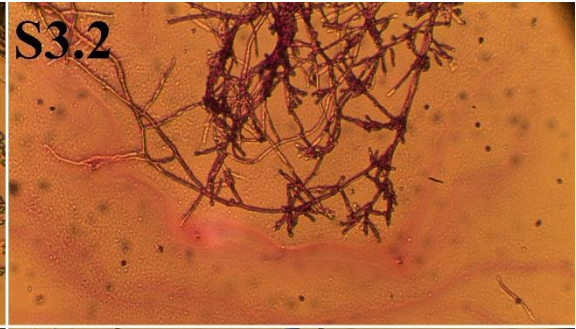
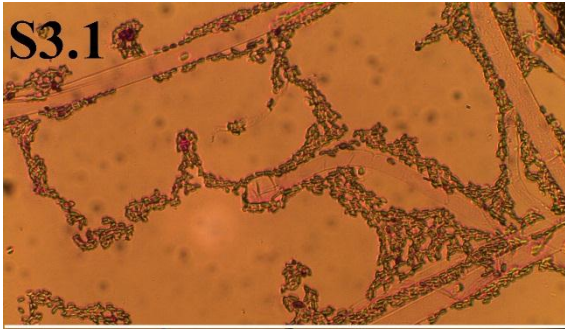
Bakterid		Seened	
B1.1	<i>Streptomyces</i>	S1.1	<i>Pichia</i>
B1.2	<i>Rhodococcus</i>	S1.2	<i>Aspergillus</i>
B1.3	<i>Arthrobacter</i>	S1.3	<i>Candida</i>
B1.4	<i>Pseudomonas</i>	S1.4	<i>Penicillium</i>
B1.5	<i>Pseudomonas</i>	S1.5	<i>Cladosporium</i>
B2.1	<i>Pseudomonas</i>	S2.1	<i>Aspergillus</i>
B2.2	<i>Sphingomonas</i>	S2.2	<i>Trichoderma</i>
B2.3	<i>Pseudomonas</i>	S2.3	<i>Penicillium</i>
B2.4	<i>Streptomyces</i>	S2.4	<i>Candida</i>
B2.5	<i>Bacillus</i>	S2.5	<i>Rhizopus</i>
B3.1	<i>Sphingomonas</i>	S3.1	<i>Cladosporium</i>
B3.2	<i>Bacillus</i>	S3.2	<i>Aspergillus</i>
B3.3	<i>Pseudomonas</i>	S3.3	<i>Rhizopus</i>
B3.4	<i>Streptomyces</i>	S3.4	<i>Penicillium</i>
B3.5	<i>Arthrobacter</i>	S3.5	<i>Trichoderma</i>
B4.1	Identifitseerimatu	S4.1	<i>Cladosporium</i>
B4.2	<i>Rhodococcus</i>	S4.2	<i>Aspergillus</i>
B4.3	<i>Bacillus</i>	S4.3	<i>Mucor</i>
B4.4	<i>Pseudomonas</i>	S4.4	<i>Trichoderma</i>
B4.5	<i>Streptomyces</i>	S4.5	<i>Fusarium</i>

Lisa 2









Lisa 3

