

KESKKONNA BIOTEHNOLOOGIA

SISSEJUHATUS

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

Suurte saastunud kohtade ametlik arv on USA-s 12000 (US EPA Superfund) ja Lääne-Euroopas ca 400 000, lisaks neile veel muidugi teadmata kohad. 1998 aastal hinnati saastunud kohtade remediatsiooni (puhastamise) käibeks 15-18 miljardit USD.

Möödunud aegadest on Eesti saanud päranduseks hulga reostunud alasid. Pinnast reostavaid aineid on mitmesuguseid, neist levinuim on erinevad naftassaadused. Lisaks sõjaväereostusele on õliga hooletult ümber käidud ka õlihoidlates ja vanades katlamajades. Õlijääke on valatud prügilaisse ja ilma spetsiaalse põhjarajatisteta tiikidesse. Saastatud alasid on Eestis loetletud 842, kogupindalaga 87 128 ha. Neist 200-s on peetud vajalikuks tervendustöid. Reostustsoon hõlmab 2212 ha. Vaid 110 juhul on reostus likvideeritud või likvideerimisel.

Keskkonna biotehnoloogiat defineeritakse kui bioloogiliste süsteemide kasutamist, arendamist ja reguleerimist eesmärgiga puhastada saastunud keskkonda (vesi, pinnas, õhk) ning käidelda tahkeid ja vedelaid jäätmeid.

Saastunud pinnase ning põhja- ja pinnavee puhastamiseks on võimalik kasutada füüsikalisi, keemilisi ja bioloogilisi meetodeid.

Viimase kümnendi jooksul on biotehnoloogial põhinevad keskkonna saneerimismeetodid arenenud väga kiiresti. Välja on töötatud arvukalt keskkonna biotehnoloogial põhinevaid rakendusi puhastamiseks pinnast ja põhjavett naftasaadustest, polütsüklistest aromaatsetest ühenditest, polükloreeritud difenüülidest, nitroaromaatsetest ühenditest, orgaanilistest lahustitest, pestitsiididest ja metallidest (Dua et al., 2002). Biotehnoloogial põhinevate keskkonna saneerimismeetodite iseloomulikud tunnused on madal hind, paindlikkus ja minimaalne mõju keskkonnale (Grommen ja Verstraete, 2002). Keskkonna biotehnoloogial põhinevad rakendused on leidnud eriti kasutust juhtudel, kui reostus on ulatuslik, kuid saasteainete kontsentratsioonid ei ole suured.

Bioremediatsioon (biotervendamine) on tehnoloogia, mille puhul rakendatakse mikroorganismide metaboolset potentsiaali saastunud keskkonna puhastamiseks. Välja on töötatud suur hulk erinevaid pinnase ja vee bioremediatsiooni meetodeid: in-situ (kohapealsed) protsessid pinnase ja põhjavee puhastamiseks; ex-situ protsessid nagu land-farming, kompostimine ja vee-pinnase segu reaktorid.

BIOREMEDIATSIOONI TEOORIA

Fenoolsete ühendite degradatsioon

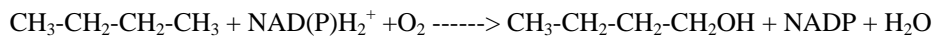
Lisaks tööstusest keskkonda sattuvale fenoolile vabaneb fenooli ka looduslikest allikatest. Igasugusest taimsest materjalist (lehed, seemned, varred, juured, õied) võib keskkonda leostuda fenooli. Fenool ja *p*-kresool ongi peamised aromaatsed saasteained, mis tihti esinevad tööstuslikes heitvetes. Kuna fenool on keskkonnas laialt levinud, suudavad mikroorganismid, nii aeroobid kui ka anaeroobid, seda süsiniku ja energiaallikana kasutada. Aeroobse lagundamise esimeses etapis katalüüsib fenooli hüdroksülaas teise hüdroksüülrühma lisandumist fenooli *ortho* asendisse, tekitades katehhooli. Katehhooli edasine biodegradatsiooni võib sõltuvalt mikroorganismist toimuda kas *ortho* või *meta* rada mööda. *p*-kresooli lagundamise esimene etapp võib toimuda kahte rada mööda, millest esimeses oksüdeeritakse *p*-kresooli metüülrühm karboksüülrühmaks. Teises rajas jäetakse *p*-kresooli metüülrühm alles ja moodustatakse 4-metüülkatehhool, mis edasi lagundatakse katehhooli *meta* rada mööda. Fenooli lagundada suutvate bakteritena on kirjanduses välja toodud ja hästi iseloomustatud näiteks perekondade *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Burkholderia*, *Variovorax* esindajad.

Naftaproduktide lagundamise mikrobioloogia

Süsivesinikke suudavad mikroorganismid lagundada üksnes vees. Kõik süsivesinikud on mingil määral vees lahustuvad ja seetõttu on võimalik nende lagundamine mikroobide poolt. Süsivesinikke suudavad lagundada paljud bakterid (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacteria*, aktinomütseedid), seened (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cladosporium*) ja pärmid. Alkaanide biodegradatsioon toimub nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes. Igal mikroorganismil on kindel spekter süsivesinikke, mida nad on võimelised lagundama. n-alkaanidest lagundatakse kõige paremini molekule vahemikus C10-C24, väiksema ja suurema arvu süsiniku molekulidega n-alkaane mikroobid ei lagunda või lagundavad väga aeglaselt. Mulla mikroobidest on kuni 20% võimelised lagundama süsivesinikke. Alifaatsete süsivesinike lagundamise esimene etapp toimub oksügenaaside vahendusel (monooksügenaasid ja dioksügenaasid). Markergeenina kasutatakse alkaani hüdrokülaasi kodeerivaid geene (*alk* geenid). Küllastumata süsivesinikud on raskemini lagundatavad kui küllastunud süsivesinikud. Naftaproduktide lagundamisintensiivsus merevees 1-30 mg m⁻³ päevas, mullas 0.3% päevas (10 °C juures) Lagundamist limiteerivateks teguriteks meres on madal temperatuur, madal mineraaltoitainete kontsentratsioon, hapniku defitsiit.

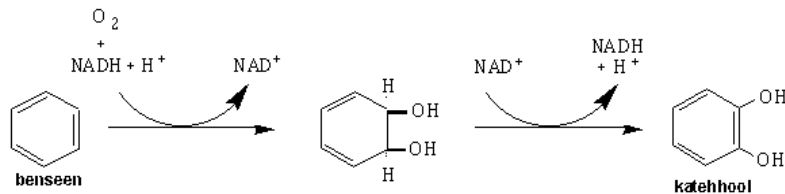
Toorõli (nafta) on looduslik produkt ning seega peaks ta olema degradeeritav looduses esinevate mikroorganismide poolt. Looduslike mikroorganismide õliproduktide degradeerimise võimet võib limiteerida toitainete tasakaalu nihkumine mullas, mille optimaalne suhe oleks süsinik/lämmastik/fosfor vastavalt 10:1:0.3. Toorõli sisaldab sadu erinevaid ühendeid, mis üldiselt jaotatakse nelja fraktsiooni:

küllastatud süsivesinikud, aromaatsed süsivesinikud, vaigud ja asfalteenid. On näidatud, et need fraktsioonid alluvad biodegradatsioonile erinevalt, kusjuures mikroorganismid lagundavad eelistatult kõigepealt n- ja isoalkaane, seejärel tsükloalkaane ning 1-3 aromaatses tuumaga ühendeid ja lõpuks polüaromaatseid ühendeid, asfalteene ja vaike.



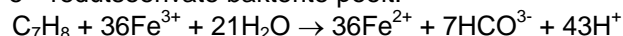
n-alkaanide oksüdeerimine alkaani monooksügenaasi (hüdroksülaasi) vahendusel

Aromaatsed süsivesinikud (BTEX = benseen, toluen, ksüleen, etüülbenseen) on sõltuvalt struktuurist kas kergesti või raskesti lagundatavad. See sõltub benseenituumade arvust, asenduste arvust ja tüübist molekulis. Lagundamine võib toimuda nii aeroobselt kui anaeroobselt (elektroni aktseptorid nitraat, mangaan, raud, sulfaat).

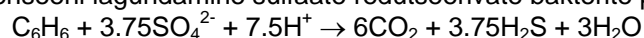


Benseeni oksüdeerimine benseeni dioksügenaasi vahendusel.

Aromaatsete süsivesinike lagundamine võib toimuda ka anaeroobsetes tingimustes. Järgnev on näide tolueni lagundamisest Fe³⁺ redutseerivate bakterite poolt:



ja benseeni lagundamine sulfaate redutseerivate bakterite poolt:



Polütsükliised aromaatsed süsivesinikud (PAH) – naftaleen, antratseen, püreen, bensopüreen. Üldiselt sõltub nende ühendite lagundamise kiirus rõngaste arvust molekulis, 2-3 ringi puhul toimub bioloogiline lagundamine hapniku aeroobsetes tingimustes. Lagundamine sõltub veel järgmistest teguritest: PAH-I lahustuvus vees, rõngaste arv molekulis, asenduste tüüp, asenduste arv, asenduse

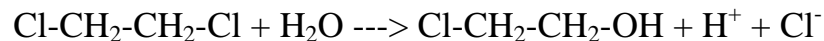
paiknemine. Suurema rõngaste arvuga PAH-ide biodegradatsioon toimub peamiselt kometabolismi vahendusel. PAH-e lagundavad paljud seente liigid (ekstratsellulaarne ensüüm peroksidaas). Bakterite PAH-e degradatsiooniks vajalikud geenid paiknevad sageli plasmiididel. Väikese molekulmassiga PAH-e (naftaleen, fenantreen) degradatsioon on levinud ja lagundamist suutvate bakterite mitmekesisus suur samas, kui suure molekulmassiga PAH-e lagundamine on raskendatud (Kuiper jt., 2004). Bakterid initsieerivad PAH-e degradatsiooni rakusiseste dioksügenaaside vahendusel. PAH-d oksüdeeritakse mitmete reaktsioonidega katehooliks ning edasine degradatsioon võib sarnaselt fenoolile minna kas meta või ortho rada mööda. PAH-e biodegradatsioon võib täita erinevaid funktsioone:

*Assimilatiivne biodegradatsioon, mis on organismile süsiniku ja energiaallikaks lagundatava ühendi osalise või täieliku mineralisatsiooni käigus (levinud bakteritel).

*Rakusisene detoksifikatsioon, eesmärgiks muuta PAH vees lahustuvaks, millele järgneb ühendi eritamine rakust välja (levinud seentel).

*PAH-e kometaboolne degradatsioon, mis pole raku metabolismile ei energia ega ka süsinikuallikaks.

Kloreeritud alifaatsed ja aromaatsed süsivesinikud: nende ühendite lagundamine võib toimuda nii aeroobselt kui anaeroobselt (oksüdeerimine, kometabolism, reduktiivne dehalogeenimine). Kõige rohkem on uuritud tetrakloroetüleeni (PCE) ja trikloroetüleeni (TCE) anaeroobset lagundamist. 1 ja 2 kloori aatomiga aromaatsete süsivesinike lagundamine võib alata dioksügenaaside vahendusel ning seejärel eemaldatakse kloori aatomid. Suurema asenduste arvuga aromaatsete süsivesinike korral esmalt eemaldatakse kloori aatomid (aeroobne- Cl asendatakse -OH rühmaga, -OH rühma O tuleb molekulaarsest hapnikust; reduktiivne - Cl asendatakse H aatomiga; hüdrofüütiline- Cl asendatakse - OH rühmaga, -OH rühma O tuleb veest).



Cl aatomi hüdrofüütiline eemaldamine 1,2-dikloroetaani molekulist ensüümi haloalkaani dehüdrogenaas vahendusel

1,2-dikloroetaani võib bakter *Xanthobacter autotrophicus* kasutada ainsa süsiniku ja energia allikana. Nitroaromaatsete ühendite biodegradatsiooni mehhanismid on sarnased kloreeritud ühendite lagundamisradadele.

Biodegradeeritavuse ja ökoloogiliste kõrvalmõjude testimine

Uute kemikaalide puhul on vaja kontrollida, kas need lagunevad keskkonnas. OECD on välja töötanud testid: 1) ühendi bioloogilist lagundatavust hinnatakse CO₂ eraldumise, O₂ tarbimisintensiivsuse või lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni vähenemise alusel heitvees või mullas; katse viiakse läbi kontrollitud standardiseeritud (niiskus, temperatuur, min. toitained, inokulumi suurus) tingimustes; kui tulemus näitab 50-60% ühendit lagunemist kindlaksmääratud aja jooksul, siis eeldatakse et antud ühend on biodegradeeritav. Sellele testile võivad järgneda katsed, mille käigus uuritakse ühendi lagunemise kineetikat spetsiifilistes tingimustes, mis sarnanevad tegelikule keskkonnale. Katsete usaldusväärsust saab tõsta, kui kasutada radioaktiivse isotoobiga märgistatud ühendeid. Oluline on kindlaks teha, millised vahe- ja lõppproduktid tekivad ühendi lagunemisel.

Visualiseerimine ja modelleerimine

Looduslike isepuhastumisprotsesside kirjeldamiseks on vaja vahendeid, mis lihtsustaksid analüüsi ja võimaldaks esile tuua protsesside suundumusi. Selleks võib kasutada jooniseid, millel on saasteainete või elektroni aktseptorite kontsentratsioonide muutus esitatuna piki aja telge või ruumilist telge (n. BHT muutus piki jõge alates saasteallikast). Mitmekomponendiliste süsteemide (palju saasteaineid, vaheprodukte, elektroni aktseptoreid) kirjeldamiseks on välja töötatud mitmeid erinevaid arvutiprogramme protsesside modelleerimiseks ja/või visualiseerimiseks.

Bioremediatsiooni modelleerimine laboris: selleks kasutatakse bioreaktoreid või mikrokosme. Saadud andmete põhjal üritatakse kirjeldada biodegradatsiooni dünaamikat ja selle seost keskkonnateguritega.

Biodegradatsiooni kineetika ja kiirus: orgaanilist ühendite lagundamine kineetika on tavaliselt määratud laboris optimaalsetes tingimustes. Neid tulemusi kasutatakse mudelites, kuid *in situ* tingimustes on protsessidel hoopis teine kiirus. Biodegradatsiooni kineetikat kirjeldavad mudelid põhinevad substraadi kontsentratsioonil ja biomassil. Sellest tulenevalt on defineeritud kolme tüüpi kineetilisi mudeleid. Kui substraat on täielikult kättesaadav, siis sõltub degradatsioon ainult

mikroobide aktiivsusest (0-järku kineetika). Kui biodegradatsiooni kiirus on proportsionaalne substraadi kontsentratsiooniga, siis on tegemist esimest järku kineetilise mudeliga ($v=k[S]$). Teist järku mudelis, kus esimest järku kineetika on seotud populatsiooni arvukusega, on kõige realistikum. Arvestada tuleb ka seda, et mikroobidele on kättesaadav ainult vees lahustunud osa orgaanilisest ühendist, seega tuleb mudelites kasutada seda kontsentratsiooni, mitte ühendi kogu kontsentratsiooni keskkonnas. Kuna erinevatel degradatsiooni etappidel on erinev kiirus, siis tegelik orgaanilise ühendi lagundamise kiiruse kõver omab tsüklilist iseloomu.

Scale-up: laborikatsetes saadud tulemusi kasutatakse suuremõõtmeliste süsteemide konstrueerimiseks. Peamine erinevus laborikatsete ja tegelike looduslike süsteemide vahel seisneb aine(te) transpordiefekti olulisuses: suuremõõtmelises süsteemis on ainete transport väga oluline, eriti ainete desorptsioon pinnaseosakestelt.

Bioremediatsioon ehk *biotervendusmeetod* –

bioloogiliste vahendite kasutamine toksiliste jäätmete eemaldamiseks keskkonnast. (A. Kurg, Biotehnoloogia loengu konspekt <http://www.biotech.ebc.ee/literature/loeng16.pdf>).

Mikroobide või/ja taimede kasutamine saasteainete koguse vähendamiseks või nende täielikuks lagundamiseks keskkonnas.

Kui saastunud materjali puhastamine toimub otse looduses, siis on tegemist *in-situ* puhastusmeetodiga. Teine võimalus on teisaldada saastunud pinnas ja viia puhastusprotsess läbi selleks rajatud platsidel või pumbata põhjavesi töötlemiseks pinnale (*ex-situ* bioremediatsioon).

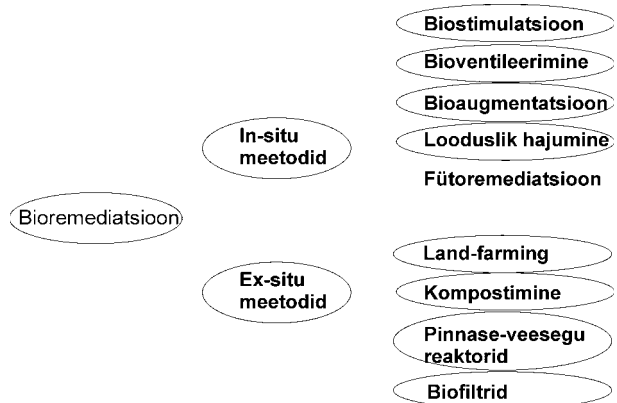
IN-SITU MEETODID

In-situ bioremediatsioon põhineb pinnases ja vees olevate saasteainete lagundavate looduslike mikroorganismide kasutamisel. Enamikel juhtudel saavutatakse *in-situ* bioloogiline puhastamine looduslike mikroorganismide saasteaine lagundamisaktiivsuse stimuleerimisega (**biostimulatsioon**). Selleks pumbatakse põhjavette/pinnasesse hapnikku (või H_2O_2) ja mineraalseid toitaineid (N, P). Hapniku asemel on proovitud kasutada ka nitraate, soodustades nii orgaaniliste ühendite anaeroobset lagundamist. Kui tegemist on väga raskesti lagundatava ühendiga, siis võib biodegradatsiooni kiirendamiseks lisada kergesti lagundatavat substraati või mittetoksilist saasteainele sarnast ühendit (aseaine) selleks, et indutseerida ensüümide sünteesi, mis on võimelised lagundama nii aseainet kui ka saasteainet.

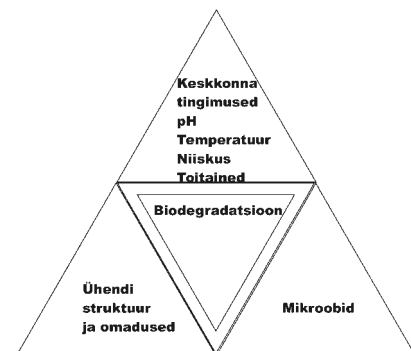
Lisaks loodusliku mikroobi-populatsiooni lagundamisaktiivsuse stimuleerimisele on võimalik lisada saastunud pinnasesse või vette spetsiifiliste metaboolsete omadustega mikroorganisme. Sellist meetodit tähistatakse terminiga **bioaugmentatsioon**. Selleks kasvatakse mikroobe enne selektiivsetes söötmetes (so. kasvukeskkond, mis sisaldab sama või lähedast ainet saasteainele) või kasutatakse geneetilisi manipulatsioone (muudetakse mikroorganismide geneetilist struktuuri). Alati ei pruugi laboris aretatud mikroobitüved loodusesse viiduna lagundada saasteainet, sest a) saasteaine kontsentratsioon võib pinnases või vees on liiga kõrge või b) looduslikud mikroobid inhibeerivad aretatud mikroobitüve kasvu.

Bioventileerimise puhul lisatakse keskkonda gaasilisi stimulante nagu hapnik ja metaan. Bioventileerimine on *in-situ* bioremediatsiooni lihtsaim variant.

In-situ bioremediatsiooni eelised: 1) eemaldab pinnasest saasteaine, mis on adsorbeerunud materjalile või asub poorides 2) on kiire võrreldes teiste meetoditega (materjali väljakaevamine või pumpamine 3) on odav



Joonis 1. Bioremediatsiooni meetodid



Joonis 2. Biodegradatsiooni mõjutavad tegurid keskkonnas.

In-situ bioremediatsiooni puudused: 1) saasteaine võib pinnases või vees olla kontsentratsioon, mis pidurdab mikroobide kasvu või on toksilised mikroobidele 2) puurkaevud, mille kaudu pinnasesse toitaineid lisatakse, võivad ummistuda mikroorganismide intensiivse kasvu tagajärjel. Selleks, et võtta kasutusele bioremediatsioon on vaja esmalt näidata, et 1) keemiline ühend või ühendite segu on biodegradeeritav 2) bioremediatsioonil ei ole keskkonnale kahjulikke kõrvalmõjusid 3) on odavam võrreldes teiste meetoditega

In situ bioremediatsiooni efektiivsust limiteerivad tegurid:

1. Madal temperatuur: sõltuvalt geograafilisest piirkonnast võib muld/pinnas olla enamiku aastast liiga madala temperatuuriga saasteaine efektiivselt lagundamiseks.
2. Anaeroobsed tingimused: biodegradatsioon on anaeroobsetes tingimustes aeglane, osad ühendid ei lagundata üldse, osade lagundamisel võivad tekkida toksilised produktid.
3. Toitainete ja ko-substraatide väike kontsentratsioon. Enamasti on saastunud koha toitainete kontsentratsioon optimaalsest madalam
4. Bioloogiline kättesaadavus (bioavailability). Saasteaine ruumiline jaotumine ainet lagundava mikroobi suhtes.
5. Degradatsioonivõime puudumine: sünteetilise aine lagundamiseks vajalik ainevahetuse rada puudub või vajalikke genee ei indutseerita.

Biodegradatsiooni soodustavad ja aeglustavad tegurid

Soodustavad tegurid	Mittesoodsad tegurid
Erinevate saasteainete väike arv	Palju erinevaid saasteaineid
Mitmekesine mikroobikooslus	Väike ja hajus mikroobipopulatsioon ning mikroobide aktiivsus
pH6...8	ekstreemsed pH väärtused
Elektroniaktseptorite olemasolu	
	Anorgaaniliste ja orgaaniliste saasteainete segu
	Saasteaine toksiline kontsentratsioon
Poorne pinnas	Kivine pinnas
Ühtlane mineraalne koostis	Keeruline mineraalne koostis
Homogeenne keskkond	Heterogeenne keskkond

Degradatsioonivõime areng saastunud pinnases. Piisava aja ja soodsate tingimuste korral on suure tõenäosusega võimalik enamuse sünteetiliste orgaaniliste ühendite lagundamisvõime teke või migreerumine saastunud pinnases(se).

Degradatsioonivõime areng võib tekkida järgnevalt:

1. Looduslik mikroobikooslus on piisavalt kaua olnud kontaktis ksenobiootikuga, et geneetilise arengu teel tekiks degradatsioonivõime. Protsess on aeglane ja tulemuseks võib olla vähearvukas ja/või madala aktiivsusega sobiva ainevahetusrajaga mikroobipopulatsioon.
2. Looduslik mikroobikooslus on kontaktis ksenobiootikuga. Bakterid saavad antud ühendi lagundamiseks vajalikud geenid väljastpoolt migreerunud bakterirakkudelt. Geneetilise materjali ülekande toimub kas konjugatsiooni, transduktsiooni või transformatsiooni vahendusel. Protsess on suhteliselt aeglane.
3. Nagu punkt 2, kuid looduslikule mikroobikooslusele lisatakse vastava degradatsioonivõimega mikroobe. Laboratoorseid tüvesid kasutatakse doonoritena geeniülekanal.
4. Valitakse või konstrueeritakse degradatsioonivõimega bakter, mis arvatakse ellu jäävat saastunud keskkonnas.

Bioremediatsiooni efektiivsuse testimine. Selleks viiakse läbi laborikatsed, kasutades saastunud pinnast/vett, milles üritatakse modelleerida võimalikult lähedaselt keskkonnatingimusi. Nendes katsetes mõõdetakse järgmisi parameetreid: mikroobirühmade arvukus, mikroobse hingamise intensiivsus, degradatsioonikiirus.

Bioremediatsiooni kõrvalmõjude testimine. Kasutatakse standardseid toksikoloogilisi teste (Daphnia, kalad, luminesseeruvad bakterid). Biodegradatsiooni lõppproduktide toksilisuse testimiseks võidakse kasutada erinevaid testsüsteeme (Microtox test- *Vibrio fischer*; Ames'i test - *Salmonella typhimurium*, seemnete idanemise test, noodulite moodustumise test, vihmaussid, nitrifikatsiooni inhibitsioon). Praegu ollakse seisukohal, et bioremediatsiooni korral on tähtis kasutada teste, mis näitaksid saasteaine mõju olulistele protsessidele (C, N-ringe, mikroobide biomass) mullas.

Looduslik hajumine (*natural attenuation*) ehk passiivne remediatsioon

Paljudel juhtudel on väga kulukas ja keeruline puhastada sügavamal asuvat pinnast ja põhjavett. Sellistel juhtudel on üheks võimalikuks lahenduseks jälgitava loodusliku hajumise (*monitored natural attenuation* – MNA) kasutamine, seda meetodit nimetakse ka passiivseks remediatsiooniks. Passiivse remediatsiooni üldine definitsioon on järgmine: meetod, mille käigus väheneb saasteaine toksilisus, kogus ja/või liikuvus keskkonnas ilma inimese vahelesekumiseteta.

Looduslik hajumine tähendab looduslike protsesse pinnases ja põhjavees, mille käigus väheneb saasteaine kogus, toksilisus, liikuvus, ruumala või kontsentratsioon keskkonnas. Need *in-situ* protsessid on biodegradatsioon, dispersioon, lahustumine, adsorptsioon, lendumine ja keemiline või bioloogiline saasteaine stabiliseerimine või lõhustumine. Looduslik hajumine ei ole "mitte midagi tegemine", sest see sisaldab endas:

- 1) saasteaine muutumise ja transpordi iseloomustamist selleks, et hinnata loodusliku hajumise protsessi iseloomu ja ulatust, 2) veendumist selles, et protsessi käigus väheneb saasteaine kogus, toksilisus ja/või liikuvus nii, et see ei kujutaks ohtu inimese tervisele ja vastaks keskkonnanormidele
- 3) tegurite hindamist, mis mõjutavad loodusliku hajumise protsessi pikaajalist kulgu
- 4) loodusliku hajumise protsessi pikaajalist jälgimist, et olla kindel protsessi jätkuvas efektiivsuses

Loodusliku hajumise eelised ja puudused

Eelised	Puudused
In-situ lagundamine - eiteki jääkaineid ja puudub materjali transport ühest kohast teise	Protsessi kestus võib olla sama pikk kui põhjavee väljapumpamisel ja töötlemisel
Toimub enamikes saastunud kohtades	Pikaajaline protsessi jälgimine
Kõige mürgisemad ja liikuvad saasteained lagundatakse tavaliselt kõige kiiremini	Biodegradatsiooni (vahe)produktid võivad olla toksilisemad kui algne saasteaine
Odav	Üksikjuhtudel võib osutuda kallimaks kui teised puhastamis-meetodid (pikaajalise monitooringu tõttu)
Kergesti kombineeritav teiste puhastamismeetoditega	
Puuduvad tööpausid, sest ei kasutata tehnikat	

Viimase kümnendi jooksul on passiivne remediatsioon lülitatud Ameerika Ühendriikides riiklikult aktsepteeritavate pinnase ja põhjavee saneerimismeetodite hulka. Seda meetodit on Lääne-Euroopa riikides hakatud viimastel aastatel intensiivselt uurima ja hiljutised tulemused osutavad selle meetodi kasutamise võimalikkusele külmema kliimaga piirkondades (Salminen et al., 2004). Põhjamaades on passiivset remediatsiooni seni väga vähe kasutatud

Fütoremediatsioon

Fütoremediatsiooni korral kasutatakse taimi saastunud pinnase puhastamiseks. Otsene toime: osa taimi on võimelised omastama keskkonnast saasteaineid ja neid lagundama. Kaudne toime: 1) taimed soodustavad juurte kaudu mikroobide kasvu pinnases (fütostimulatsioon) 2) taimed omastavad mullast anorgaanilisi saasteaineid, mis kogunevad taime kudedesse (fütoekstraktsioon).

Loodusest on leitud mitmeid taimi, mis suudavad akumuloida suuri koguseid metalle. Neid taimi kutsutakse hüperakumulaatoriteks ning neid on tihti leitud kasvamas suurenenud metallide kontsentratsiooniga pinnases. Kahjuks on aga nii, et väga suurte metalli kontsentratsioonide juures jäävad ka need taimed väga väikesekasvuliseks st, et suur metallide kogus on kasvuinhibiitoriks.

Fütoremediatsiooni üheks variandiks on risosfääri bioremediatsioon ehk fütostimulatsioon, kus saasteainete lagundamine toimub taime juurte vahetus läheduses mikroobide poolt. Modifitseeritud mulla omadused taime juurte ümbruses - risosfääris (kõrgem mikroobide aktiivsus; kõrgem oksüdatsioonipotentsiaal; muutunud mikroobikooslus) tekitavad positiivse risosfääri efekti, mis ongi orgaaniliste saasteainete fütoremediatsiooni aluseks. Lisaks saasteainete lagundamise stimuleerimisele on fütoremediatsioonil veel teisi positiivseid keskkonnamõjusid. Taimestik suurendab vee aurustumist pinnasest (evapotranspiratsiooni), vähendades pinnasest leostuva vee kogust. Taimeluurtega seotud mikroobid parandavad mulla struktuuri, tootes orgaanilisi ühendeid, mis stabiliseerivad pinnase osakesi (glomaliin).

Fütostimulatsioon e. risosfääri bioremediatsioon

Taimejuured soodustavad bioremediatsiooni pinnases järgnevalt:

1. juurte läheduses on (biodegradatiivsete) bakterite arvukus suur
2. tänu suuremale energiakogusele juure eritiste näol on degradatiivsed ensüümid ekspreseedid ja toimivad paremini
3. tõenäoline on assotsiatsioon degradatiivsete bakterite ja juure sümbiontsete mükoriisa seente vahel
4. teatud juhtudel võivad juured toota ühendeid, mis toimivad looduslike ko-substraatidena, indutseerides degradatiivseid geene ka juhul, kui saasteaine kontsentratsioon on madal
5. mitmeaastased taimed tagavad nendega assotsieerunud bakterite pikaajalise ellujäämise keskkonnas
6. kasvades juured läbivad erinevaid mullahorisonte ja transpordivad niimoodi mikroobe ilma pinnast mehhaaniliselt segamata

Fütoremediatsiooni saab kasutada neil juhtudel, kui töödeldav maa ei oma olulist majanduslikku väärtust ja on piisavalt aega oodata, kuni puhastusprotsess saavutab oma eesmärgi.

Fütoremediatsioon võib olla problemaatiline lahendus juhtudel, kui taim suudab saasteaineid transportida oma kudesse ning saasteaine või selle metabolismi vaheproduktid lenduvad taimedest lehtede kaudu. Selliste vees lahustuvate lenduvate ühendite puhul võivad taime juurtesse sisenenud saasteaine lagundada peamiselt taime juurtes (ksüleem ja floem) elutsevad endofüütsed bakterid. Endofüütseid baktereid on leitud paljudest bakteriperekondadest, kuid enamasti ei oma nad biodegradatiivseid omadusi. Üks võimalus on nakatada taimed enne istutamist saastunud pinnasesse sobiliku endofüütse bakteritüvega. Sellisel moel on võimalik vähendada saastunud pinnase toksilisust taimetele ning vähendada saasteaine lendumist taimest.

Fütoremediatsiooni kui keskkonna saneerimismeetodi üha ulatuslikum kasutamine on seotud selle meetodi majandusliku efektiivsusega. Võrreldes alternatiivsete remediatsiooni meetoditega on fütoremediatsioon 50-80% odavam. Fütoremediatsiooni hinna kujunemine sõltub paljudest asjaoludest, neist olulisemad on saastunud koha eripäraga seotud. Sellest tulenevalt saab meetodi maksumuse arvutada üksnes lähtuvalt iga konkreetse saastunud koha tingimustest.

EX-SITU MEETODID

Landfarming

Landfarming – *ex-situ* bioremediatsiooni meetod, kus saastunud pinnas laotatakse saastumata pinnasele selleks spetsiaalselt kohandatud (veekindlateks vooderdatud) väljakutel. Pinnast aeg-ajalt segatakse mehaaniliselt (küntakse), sellega tagatakse ühtlane segunemine, aereeritus ja niiskus. Meetod põhineb asjaolul, et saastumata muld, millele viiakse saastunud pinnas, sisaldab arvukat ja mitmekesist mikroobikooslust (bakterid ja seened). Selles mikroobikoosluses olevad mikroobid hakkavadki lagundama saastunud pinnasesolevaid orgaanilisi ühendeid. Meetodit võib kombineerida biostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooniga. Biostimulatsiooni puhul lisatakse pinnasesse mineraalväetisi, et kiirendada suurema lämmastiku ja fosfori kogusega mikroobide kasvu. Võidakse kasutada ka sõnnikut, mis lisaks toitainetele lisab pinnasesse ka mikroobide biomassi.

Inglise keeles kasutatakse selle meetodi puhul veel termineid *land treatment* või *land application*.

Landfarming'ü eelised ja puudused

Eelised	Puudused
Suhteliselt lihtne läbi viia	Suuremat puhastusefektiivust kui 95% (või alla 0.1 ppm) on raske saavutada
Protsessi lühike kestus (6 kuud kuni 2 aastat)	Ei ole efektiivne saasteaine suurte (>50000 ppm, õliproduktid) kontsentratsioonide korral
Madal hind (30-60\$ tonni saastunud pinnase kohta)	Raskemetallide esinemisel võib mikroobide kasv aeglustuda
Efektiivne aeglase lagundamiskiirusega orgaaniliste saasteainete korral	Lenduvad ühendid võivad aurustuda biodegradatsiooni asemel
	Vajalik suur maaala
	Tolmu ja auru tekkimine protsessi käigus võib olla probleemiks
	Võib vajada aluspinnase vettpeidavaks muutmist kui on võimalik saastunud leovee teke

Biofiltrid lenduvate orgaaniliste ühendite lagundamiseks

Õhu biofiltratsioon on tehnoloogia, mille korral lenduvad orgaanilised ained lagundatakse bioloogiliselt aeroobsetes tingimustes. Sellistes biofiltrites kasutatakse turvast, komposti või sünteetilist materjali koos toitainete puhverlahusega. Läbi filtri juhitakse õhk, mis sisaldab lenduvat orgaanilist ainet. Filtrit läbides lenduvad orgaanilised ühendid lahustuvad vees. Filtri täidismaterjalis olevad mikroorganismid

lagundavad selle orgaanilise aine. Puhastusefekt on sõltuvalt saasteaine tüübist kuni 99%. Kasutusvaldkonnad: loomakasvatus, eriti sigalad; tööstus (värvimistöökodad), reoveepuhastid (H₂S eemaldamine õhust). Biofiltrite eeliseks võrreldes keemilisel või füüsikalisel teel õhku puhastavate süsteemidega on madal energia kulu.

Pinnase-vee segu reaktor (BioSlurry Reactor)

Pinnase-vee segu reaktoris luuakse tingimused 3 faasi (tahke, vedel, gaas) segunemiseks, mis kiirendab pinnasega seotud või vees lahustuva saasteaine biodegradatsiooni saastunud pinnase ja mikroobide biomassi vesisuspensioonis. Sellises reaktoris toimub pidev segamine, mis hoiab ära pinnase settimise. Protsessi eelised:

- otsene kontakt mikroobide ja saasteaine vahel, millele lisandub võimalus kontrollida keskkonnaparameetreid (temperatuur, pH, toitained)
- süsteem on väga paindlik
- kuna mahutid on kinnised ja lenduvad ühendid ei saa lekkida atmosfääri, siis on protsess keskkonnale ohutu
- reaktorid on sobivad kasutada juhul, kui maad (pinda) on vähe

Pinnase-vee segu reaktorites on puhastatud pinnast ja setteid, mis sisaldas naftaprodukte, pestitsiide ja halogeenitud aromaateid süsivesinikke. Pinnase-vee segu reaktorites võidakse läbi viia nii aeroobseid kui anaeroobseid mikrobioloogilisi protsesse.

Kompostimise kasutamine saasteainete lagundamiseks

Kompostimisel põhinevaid tehnoloogiaid (ingl. *biopile*) kasutatakse saastunud pinnase ja setete käitlemiseks. Eriti edukas on olnud kompostimise kasutamine õliproduktidega ja lõhkeainetega saastunud pinnase ja setete bioremediatsioonil. Meetodi erinevus võrreldes tavalise kompostimisega seisneb selles, et sõltuvalt lähtematerjalist ja saasteainest tuleb lisada mineraalseid toitaineid, tugimaterjali ja orgaanilisi ühendeid. Tavaliselt ei ületa saastunud pinnase osakaal segus 30%. Võrreldes tavalise kompostimisega tuleb jälgida rangemaid ohutusnõudeid - koguda tuleb leovesi ning see puhastada, ja juhul, kui protsessi käigus võib eralduda lenduvaid ühendeid, siis need muuta kahjutuks. Teatud juhtudel tuleb kompostimine läbi viia kinnistes ruumides.

Protsessi lõpptulemuseks on tavaliselt õliproduktide puhul kontsentratsiooni vahemik 500-1000 mg/kg.

Õlise pinnase puhastamine biotervendusmeetodil

Naftasaadustega saastunud pinnase puhastamiseks lisatakse sellele füüsikalisi ja keemilisi omadusi muutvaid ja õlisaastet lagundavatele bakteritele võimalikult soodsaid kasvutingimusi loovaid materjale. Aeroobsetes tingimustes suureneb bakterite arv kiiresti ja nende toimel lagunevad saasteallika koostises olevad süsivesiniku molekulid süsihappegaasiks ja veeks. Soovitud puhastusastme saavutamiseks peab pinnases toimuv lagundamisprotsess toimuma pikema aja jooksul.

Tavaliselt kasutatakse õlise pinnase puhastamiseks kompostimist perioodiliselt segatavates aunades. Reostunud pinnas segatakse struktuuriomaduste parandamiseks täitematerjaliga - puukoore, saepuru, turbaga. Seejärel lisatakse bakterid, toitained ja aktivaatorid. Valmistatud segus tuleb nagu toorkompostis kontrollida niiskusesisaldust, pH väärtust, põhitointainete vahekorda. Töödeldav materjal kuhjatakse kompostimisväljadel aunadesse, mida segatakse iga 2-4 nädala tagant. Bioloogiliste protsesside käivitumisest annab aunas märku temperatuuri tõus kuni 50 °C-ni. Töötlemise kestus on 1-2 aastat.

Keskkonnatehnika 2/98

Saastunud pinnase kompostimise eelised ja puudused

Eelised	Puudused
Saasteaine lagundatakse	Ei ole efektiivne saasteaine suurte (>50000 ppm, õliproduktid) kontsentratsioonide korral
Süsteemi on lihtne disainida	Raskemetallide esinemisel võib mikroobide kasv aeglustuda
Protsessi kestus on 3-6 kuud	
Odav	

Kriteeriumid *in-situ* bioremeditsiooni läbiviimiseks (mida tuleks enne selle protsessi rakendamist uurida):

1. Saasteaine biodegradeeritavus
2. Spetsiifilised tingimused mikroobidele - elektroniaktseptorid, biodegradatiivsete mikroobide arv keskkonnas
3. Toitainete olemasolu – tavaliselt N ja P kontsentratsioon
4. Koha hüdrogeoloogilised omadused
5. Saasteaine ruumiline jaotumine ja ulatus
6. Biogeokeemilised näitajad – hapniku kontsentratsioon, redokspotentsiaal, CO₂, NH₄⁺, NO₃⁻, SO₄²⁻, S²⁻, Fe²⁺

Elektroniaktseptorid	E ₀ (V)
O ₂ + 4H ⁺ + 4e ⁻ → 2H ₂ O	+1.229 [*]
MnO ₂ (s) + 4H ⁺ + 2e ⁻ → Mn ²⁺ + 2H ₂ O	+1.208 [*]
NO ₃ ⁻ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → NO ₂ ⁻ + H ₂ O	+0.94 [†]
Fe ³⁺ + e ⁻ → Fe ²⁺	+0.77 [*]
SO ₄ ²⁻ + 4H ⁺ + 2e ⁻ → H ₂ SO ₃ + H ₂ O	+0.20 [*]
2H ⁺ + 2e ⁻ → H ₂	0.0 [†]

^{*}Oxtoby et al., 1994; [†]Tinoco et al., 1985.

TAHKETE JÄÄTMETE AEROOBNE KÄITLEMINE E. KOMPOSTIMINE

Ligi 95 % majapidamises tekkivatest jäätmetest on mingil viisil uuesti kasutatavad. 15-20 % prügilatesse toodavast materjalist USA-s moodustavad puulehed ja muruniitmise jäätmed.

Kompostimine on orgaanilise aine kontrollitud bioloogiline ja keemiline lagundamine ja selle protsessi lõpptulemuseks on toitaineterikas ja hea struktuuriga huumus.

Kompostimise tulemusena väheneb orgaanilise aine sisaldus materjalis kuni 80 %. Kompostida võib lihtsalt- kuhjata lagundatav materjal hunnikusse või keeruliselt- kasutada spetsiaalseid mahuteid.

Esimene keerulisem kompostimise skeem töötati välja ca 75 aastat tagasi Indias (Indore protsess). Selle kohaselt ladustati erinevad materjalid (sõnnik, fekaalid, puulehed, õled, majapidamisjäätmed) kihiti umbes 1,5 m kõrgustesse kuhjadesse, mida segati 2 korda 6 kuu jooksul. Indori protsessi on modifitseeritud ja kasutatud paljudes maades.

Hiljem on uuritud erinevate tingimuste (temperatuur, niiskus, aeratsioon, lagundatava materjali C:N suhe, materjali peenestamine) mõju kompostimisprotsessile. Euroopas on uurimise peaarõhk olnud kompostimisprotsessi mehhaniseerimisel ja kiirendamisel, samuti protsessi ökonoomsemaks muutmisel.

Kompostimist võib vaadelda kui mikroorganismide kontrollitud kasvatamist (*micro-organism farming*).

Igasugune orgaaniline aine laguneb looduses, kuid sõltuvalt materjalist on lagundamise kiirus erinev. Orgaanilise aine lagundamise esmasel staadiumis osalevad bakterid, seened ja algloomad. Bakterite arvukus kompostis on suurem kui seente arvukus. Esmalt lagundatakse kergestilagundatav org. ainevalgud, suhkrud, tärklis mesofiilse mikroobikoosluse poolt, sellega kaasneb komposti temperatuuri tõus. Järgnevale, termofiilsele etapile, on iseloomulik vähese liikide arvuga mikroobikooslus. Kui temperatuur tõuseb üle 50-60 °C, siis bioloogiliste protsesside aktiivsus väheneb. Hilisemates protsessides osalevad mulla selgrootud, neist olulisem osa on vihmaussidel. Et kompostimine kulgeks kiirelt on vaja luua mikroorganismidele soodsad tingimused. Kompostis olevad mikroobid ei saa metaboliseerida lahustumatuid orgaaniliste ühendite tükikesi. Esmalt tuleb suured biopolümeerid

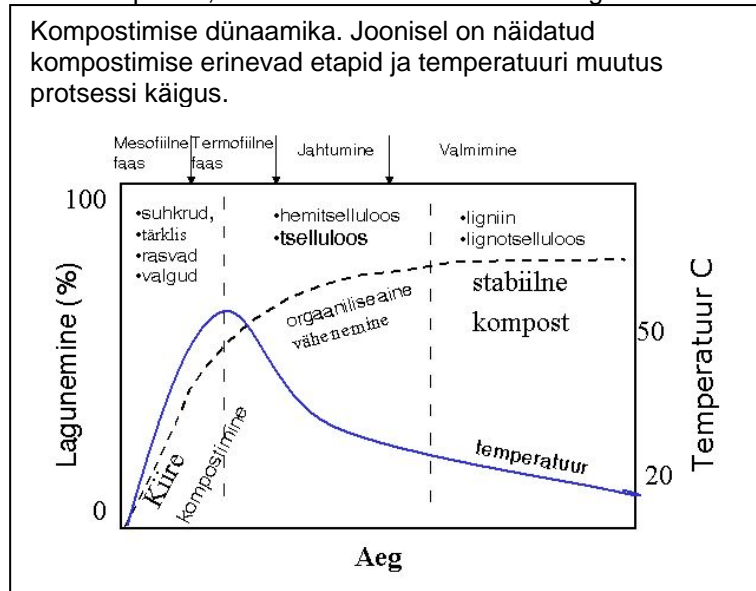
Kompostimise etapid:

- Latentne faas, mikroobipopulatsioon kohaneb komposteeritava materjaliga
- Komposti materjal koloniseeritakse mesofiilsete mikroobidega, temperatuur on vahemikus 10-40 °C, domineerivad bakterid (10⁸-10⁹ raku g⁻¹).
- Kui temperatuur ületab 40 °C, siis hakkavad domineerima termofiilsed mikroobid, temperatuur on vahemikus 40-70 °C, org. aine laguneb kiiresti bakterite (*Bacillus*), aktinomütsetide (*Streptomyces spp.*, *Clostridium*, *Thermus*, *Thermoactinomyces spp.*) ja seente (*Aspergillus*, *Mucor*) vahendusel. Üks arvukamaid bakteriliike kuumas kompostis on *Bacillus stearothermophilus*.
- Jahtumise faas, temperatuur langeb mesofiilsetele mikroobidele sobilikku vahemikku. Selles faasis suureneb seente (0.01-1 x 10⁶ KMÜ g⁻¹) ja aktinomütsetide (0.1-10 x 10⁶ raku g⁻¹) arv.
- Küpsemise faas, temp. langeb väliskeskonna tasemele, suureneb teiste troofiiliste tasemete organismide - algloomad, nematoodid, lestad - arvukus. Selles faasis suureneb huumusaine kogus.

depolümeeriseerida rakuväliste ensüümide abil. Lipaaside, proteaaside ja amülaaside aktiivsus on kõrge komposteerimise alg- ja lõppetapil, komposti kuumenemise faasis on nende ensüümide aktiivsus madal. Seentel on oluline osa raskemini lagundatavate taimsete materjalide (ligniini, tselluloosi) lagundamisel, samuti tagavad seened komposti hea struktuuri (so väikesed agregaadid).

Mikroobid, kes viivad läbi kompostimisprotsessi, sattuvad sinna koos lähtematerjaliga, veega, õhu kaudu, kuid võidakse lisada ka spetsiaalseid tööstuslikke mikroobide segusid. Neid segusid (inokulume) võidakse lisada kas komposteerimise algul või juba lõppfaasis. Inokulumi tootjate väitel parandavad lisatud mikroobid komposti häid omadusi.

Vahel võib kompost üle kuumeneda, sellega kaasneb enamike mikroobide surm. Järele jäävad üksnes bakterite spoorid, mis muutuvad aktiivseks kui tingimused muutuvad jälle soodsaks.



Efektiivseks kompostimiseks vajalikud tingimused. **Hapniku** tase kompostitavas materjalis peaks olema 5 % või rohkem; kui hapnikku on vähem hakkab domineerima anaeroobne lagundamine ja tekib halva lõhna probleem. Mida suurem on hapniku kontsentratsioon, seda kiirem on lagundamine. **Niiskus** - materjal ei tohi olla kuiv (opt. 50-60%). **Materjali struktuur** - materjali peenestamine enne kompostimist kiirendab protsessi, sest paraneb aereeritus ja ensüümide ligipääs substraadile. **Temperatuur** - hästi aereeritud kompost soojeneb temperatuurini 40-70 °C aktiivse lagundamise perioodil.

Üks olulisemaid tegureid kompostimisel on lähtematerjali **C:N suhe**. C:N suhte vahemik 25-30:1 on optimaalne. Kui lämmastiku kogus materjalis on väga väike, siis tekib lämmastiku defitsiit ja lagundamisprotsess aeglustub. Kui lämmastikku on rohkem, siis osa sellest lendub lagundamisprotsessi käigus ammoniaagina. Erinevatel materjalidel on erinev C:N suhe, seetõttu tuleb kompostimisel materjale segada. Näiteks niidetud muru C:N suhe on 20:1, puulehtedel 40-60:1, saepurul 500:1.

Komposti kvaliteedi hindamine. Komposti kvaliteeti hinnatakse tema füüsikaliste, keemiliste ja mikrobioloogiliste näitajate alusel. Erinevate riikide standardid on erinevad. Euroopa Ühenusel on olemas oma standard kompostile (Europe Eco-Label Standards Applicable to Compost). Mikrobioloogilistest parameetritest sisaldab see standard *Salmonella* (25 g materjalis 0) ja *E. coli* (< 1000 MPN/g) detekteerimist.

Komposti kasutamine. Komposteerimisprotsessi tulemus on kõrge huumuse sisaldusega ja neutraalse pH-ga materjal. Valmis komposti mikrobikooslus on väga mitmekesine. Tavaliselt hinnatakse kompostist üldisemaid mikrobioloogilisi parameetreid: aktinomütsete, aeroobsete ja anaeroobsete bakterite ning seente arvukus. Kompost parandab mulla struktuuri ja rikastab mulda (aeglaselt) toitainetega. Kompost soodustab vihmausside kasvu mullas, mis omakorda parandab mulla struktuuri ja aeratsiooni. Kompost peab olema valmis, st. ei tohi sisaldada lagundamata orgaanilist ainet, eriti orgaanilisi, mis võivad mõjuda halvasti taimedele. happeid. Mittevalmis komposti kasutamine kahjustab taimede kasvu. Komposti kasutamisel see kas segatakse mullaga või mulla pind kaetakse 1-2 cm paksuse komposti kihiga.

Komposti uuemad kasutusvaldkonnad on biofiltrid lenduvate orgaaniliste ühendite lagundamiseks ja sadevete puhastamine.

Kompostimise meetodid: staatiline (kuhjad, aunad) ja pidev (reaktorid). Staatilise meetodi puhul tuleb kuhjasid perioodiliselt segada, et tagada piisav aereeritus.

