

KESKLAVOR

Eesti Keskkonnauuringute Keskus

CENTRAL LAB

Estonian Environmental Research Centre

**Endiste militaar- ja
industriaalade
jääkreostuskollete ohutuks
muutmise meetodika
väljatöötamine ulatuslikku
keskkonnakahju põhjustavate
hädaolukordade tarbeks, I etapp**

Aruanne

Tallinn 2013



Töö nimetus: Endiste militaar- ja industriaalalade jääkreostuskollete ohutuks muutmise metoodika väljatöötamine ulatuslikku keskkonnakahju põhjustavate hädaolukordade tarbeks, I etapp

Töö autorid: Vallo Kõrgmaa, Hugo Tang, Katri Vooor, Mati Salu, Oliver Järvik, Sergei Lavrentjev, Mart Kont

Töö teostaja:

Eesti Keskkonnauuringute Keskus OÜ

Marja 4D

Tallinn, 10617

Tel. 6112 900

Fax. 6112 901

info@klab.ee

www.klab.ee

Lepingu nr: 3-2_1/22-5/2012

Töö valmimisaeg: 30.04.2013

Töö on teostatud Keskkonnainvesteeringute Keskus toetusel



**KESKKONNAINVESTEERINGUTE
KESKUS**

Sisukord

1. Eessõna.....	4
2. Sissejuhatus.....	5
3. Ülevaade jääkreostuskolletest Eestis	7
3.1. Objektid, kus on võimalik pinnase bioloogiline puhastamine	9
3.2. Põlevkiviõlide, kasutatud masinaõlide ja poolkoksi keemiline koostis	10
4. Kirjanduse ülevaade	13
4.1. Saastatud pinnaste biotervendamine	13
4.2. Saastunud pinnaste bioremedatsioon	15
4.3. Aromaatsete süsivesikute, benseenide, fenoolide ja nende polüasendatud derivaatide biokonversioon	18
4.4. Venemaal kasutatavad bakteripreparaadid naftareostuste kõrvaldamiseks.....	21
5. Metoodika	25
5.1. Pinnaseproovid.....	25
5.2. Mikro-organismide konsortsiumid Ufa-Estoil-1 ja Ufa-Estoil-2	26
5.3. Töö käik	27
5.4. Tulemused	29
5.5. Peamised järeldused	33
6. Saastunud pinnaste biokultiveerimine reaalsetes oludes.....	34
6.1. Põlevkiviõliga, poolkoksiga ja kasutatud masinaõliga saastatud pinnaste biorekultiveerimise põhietapid	35
6.2. Seire üldpõhimõtted.....	37
7. Lõppkokkuvõte	39
8. Kasutatud kirjandus.....	41
Lisa 1. Vana poolkoski analüüsitulemused	48
Lisa 2. Eesti Keskkonnauuringute Keskus OÜ-s kasutusel olnud meetodikad vana poolkoski analüüsimiseks.	49
Lisa 3. Välikatsete plaan	52

1. Eessõna

Seoses Eestis EL finantseerimisel elluviidava jääkreostuse likvideerimisega („Jääkreostuse likvideerimine endistel sõjaväe- ja tööstusaladel“, RTL 2009, 19, 235) on objektidelt äraveetava reostunud pinnase kogus suur ja käitluskohtade täituvus sedavõrd kõrge, et käitluskohtade puudus võib pidurdada jääkreostusobjektide likvideerimist.

Üldjuhul toimub pinnase tervendamise tehnoloogia valik selle järgi, et kuidas oleks eesmärgist (aeg, lõppkontsentratsioon) lähtuvalt otstarbekas naftasaadusi kõrvaldada rakendades kas bioloogilisi, füüsikalisi või keemilisi võtteid (või nende meetodite kombinatsiooni). Siis valitakse puhastustehnoloogia(d) ja koostatakse projekti eelarve. Selleks, et biotervendamist ette võtta, on vaja kõige pealt selgeks teha, kas keemiline ühend või ühendite segu on biolagunev, ega töö põhjusta keskkonnale kahjulikke kõrvalmõjusid ning kas see on muude meetoditega võrreldes majanduslikult otstarbekam.

Üheks käesoleva projekti eesmärgiks on kiirendada reostunud pinnase käitlemist keskkonnanõuetele vastavaks ja dokumenteerida läbiviidava meetodika edukaks kulgemiseks vajalikud tingimused Eesti oludes Vaivara Ohtlike Jäätmete Kogumiskeskuse vastavalt ettevalmistatud katsepolügoonil. Täiendavalt on käesoleva projektiga on kavas leida, täpsustada kohapealsed tingimused ja ette valmistada võimalused *In Situ* katsetööde läbiviimiseks selleks sobivas jääkreostuskoldes. See võimaldab läbiviidava protsessi teostamist ilma reostunud pinnase väljakaevamiseta, mis on osades paikades ainuvõimalik jääkreostuskoldes olemasoleva infrastruktuuri piirangute tõttu

2. Sissejuhatus

Tööstusliku tootmise arenguga tänapäeva maailmas kaasneb süsivesiniktoorme ammutamise ja kasutamise kasv. Naftamaardlate ekspuaterimise ning nafta ja naftasaaduste transportimise olemasolevad tehnoloogiad ei välista selliste avariolukordade tekkimist, mille puhul võib keskkonda sattuda märkimisväärsel hulgal mitmesuguseid süsivesinikke.

Veel üht arenenud tööstusriikides teravalt päevakorda kerkinud probleemi kujutab endast vajadus utiliseerida suuri koguseid nafta töötlemise käigus tekkivaid saastunud jäätmeid.

Naftareostuse kõrvaldamise uute viiside loomine ja olemasolevate viiside täiustamine on ka tänapäeval jäänud aktuaalseks ülesandeks. Vajadus leida tõhusaid keskkonna puhastamise meetodeid ei tulene mitte üksnes inimese elukvaliteedile esitatavatest kasvavatest nõuetest, vaid on seotud ka looduslikele ökosüsteemidele avaldatava antropogeense mõju vähendamisega.

Nafta ja naftasaadused toimivad keskkonda sattudes negatiivselt ökosüsteemide kõikide komponentide suhtes. Nafta otsene või kaudne toksiline toime annab endast tunda toitumishela kõikidel tasanditel taimedest kuni mikroorganismideni. Kuid just nimelt mikroorganismide metaboolne potentsiaal võimaldab nende kasutamist pinnase ja vee puhastamiseks süsivesinikest. Praegusel ajal on olemas kaks põhilähenumist naftareostusega objektide biotervendamisele – need on biostimuleerimine ja biotäiendamine ehk bioaugmentatsioon. Biostimuleerimine põhineb kohapealsete looduslike süsivesinikke oksüdeerivate mikroorganismide aktiveerimisel mitmesuguste meetoditega, biotäiendamine aga eeldab, et saastatud substraati viiakse erilisi mikroorganisme, mis on võimelised antud konkreetset saasteainet ära kasutama.

Märkimisväärset ohtu keskkonnale kujutavad endast toksilist toimet omavad sünteetilised orgaanilised ühendid ehk ksenobiootikumid. Tähtsal kohal selles paljudest ainetest koosnevas rühmas on fenool ja tema halogeenitud derivaadid, mille hulka kuulub näiteks diklorodifenüültrikloroetaan (DDT). On selgunud, et oluline osa sünteetilisest ühenditest, mida kasutati algselt teatavate kindlate organismirühmade vastu võitlemiseks, võib mõjuda kahjustavalt üsna mitmesugustele elusmateriale vormidele.

Ökosüsteeme võivad mõjustada nii ksenobiootikumid ise kui ka nende prognoosimatute omadustega lagusaadused. Paljudel juhtudel ei ole need võimelised lülituma ainete ringkäigu tsüklitesse. On täheldatud, et niisuguste ainete mõjule allutatud piirkondade bioloogilistes süsteemides toimuvad muutused järk-järguliselt ja on pöördumatu iseloomuga. Ühtaegu kuuluvad kõnealused ühendid ka selliste toodete kategooriasse, mida toodetakse põllumajanduse, keemia-, puidutöötlemis- ja värvitööstuse, paberi- ja tselluloositöötlemise, naftatöötlemise ja koksikeemiatööstuse vajaduste rahuldamiseks suurtes kogustes. Nad satuvad koos reovee ja jäätmetega pidevalt keskkonda.

Sünteetilisi ühendeid utiliseerivate mikroorganismide otsimisele ja uurimisele pööratakse tänapäeval üha suuremat tähelepanu. Huvi asjaomase valdkonna vastu tuleneb peamiselt asjaolust, et

biolagundajaid on võimalik kasutada mõjuritena uutes keskkonnaohututes tehnoloogiates, mille abil saab tervendada biogeotsünooside kahjustatud komponente. Tööstuslikku päritolu saasteainete biotöötlemise üksikülesannete lahendamine omandab erilise tähtsuse, sest selle eesmärgiks on inimese elukeskkonna säilitamine ja ühiskonna pidevat arengut tagavate tingimuste toetamine.

Edasimineku nafta ja keerukate sünteetiliste ksenobiootikutega saastatud pinnaste biorekultiveerimise vallas peab tuginema mikroorganismide uute ja väga tõhusate tüvede otsimisele ning nende kasutamise viiside ja tehnoloogiate täiustamisele.

Kindlate omadustega ja teatavas mõttes väärtusliku bioloogilise ressursina käsitletavate organismide mitmekesise, kuid vähetuntud valimiku potentsiaali tunnetamine ja rakendamine kujutab endast tähtsat osa bioressursside ja biosfääri kui terviku tundmaõppimisest.

3. Ülevaade jääkreostuskolletest Eestis

Esimesed reostuskollete ülevaate tööd jäävad aastaisse 1995, mil Keskkonnaministeeriumi tellimusel tehti tööd [1, 2]

2002. a. töödes [3, 4] määratleti jääkreostuse mõiste ja koondati kogu saada olnud maakondlik jääkreostuse andmestik (üle 300 objekti) ühtsesse nimekirja ning hakati koostama jääkreostusobjekte iseloomustavaid infokaarte. Käsitlemist leidsid erinevat liiki jääkreostuskolded ja põhimõtted nende järjestamiseks ohtlikkuse alusel. 2004. a. koostati riikliku tähtsusega jääkreostusobjektide nimekiri (75 objekti) ja neid puudutav info anti koos GIS andmestiku kihtidega üle Keskkonnateabe Keskusele. Keskkonnateabe Keskuses praegusel kujul olev andmebaas koostati 2008. a.

Aastatel 2010-2012 on jääkreostusobjektide keskkonnaregistri (KKR) andmebaas täienenud 8 objektiga (peamiselt veekogudes esinevate reostusobjektidega). 2013. a jaanuari seisuga on riiklikus KKR-i andmebaasis keskkonnaohtlike objektide nimistus 83 jääkreostusobjekti, mille reostus ohustab ümbritsevat pinnast ja põhjavett ning elusloodust. Keskkonnaministeeriumi andmebaasis on koos riikliku ja maakondliku tähtsusega objektide nimekirjas 330 jääkreostusobjekti (Lisa 4).

Ohtlikud jääkreostuskolded on tekkinud valdavalt mitmesuguse keemiatööstuse (kohapeal toodetavad põlevkivikeemia tooted ja sisseveetavad kütused) toodanguga vastutustundetust ümberkäimisest, sellega transpordil, laadimisel ja hoiustamisel tekkinud avariidest, ohutusnõuete puudumisest või nende mitte järgimisest, mille tagajärjel on ohtlikud ained sattunud pinnasesse või pinnavette. Eraldi valdkonna moodustavad põlevkivi aheraine ja poolkoksi põlenud ladestud (põlemine kestab 2012. a andmeil mõnes ladestustes ka praegu). Pinnasesse sattunud ohtlikud ained liiguvad olenevalt selle veejuhtivusest ja aeratsioonivöö paksusest edasi põhjavette. Reostunud põhjavesi liigub edasi seda drenivatesse sademevee ja olmereovee kanalisatsiooni süsteemidesse ning kohalikesse veekogudesse, nagu see on toimunud Paldiskis, Tapal ja Ämaris, suurendades niiviisi reostuskolde ulatust. Jääkreostusobjektidest enamusel on reostunud nii pinnas kui ka põhjavesi.

Eelpool nimetatud 83 jääkreostusobjekti jaotuvad suures plaanis oma päritolult endisteks NL tsiviilobjektideks ja sõjaväeobjektideks. Tsiviilobjektidest võib nimetada asfaltbetoonitehaseid (33), kütuseternale (10), mitmesuguseid tööstusobjekte s.h jäätmeladestusalad (18), katlamaju (6), raudtee depoosid (4), lennuvälju (1), muid objekte (2); sõjaväeobjektidest lennuvälju (4), raketibaase (1), sadamapiirkondi (3), katlamaju (1).

Jääkreostuskollete uuringutes Eesti laborites enimmääratud ohtlikeks aineteks on mitmesuguste kütuste komponendid nagu aromaatsed ühendid (benseen, toluen, etüülbenseen, ksüleenid), polütsükliised aromaatsed süsivesinikud (PAH), fenoolid, polüklooreritud bifenüülid (PCB), aniliinid ning raskmetallid. Jääkreostuskollete ulatuslikus uuringus [5], kus uuriti riikliku tähtsusega 32 objekti, määrati Rootsis (*Lantmännen Analysen AB*) lisaks eelpool nimetatud komponentidele veel kloororgaanilisi aromaatsid ühendeid (VOC) ja halogeenitud alifaatsid ühendeid, kokku üle 100

nimetuse ohtlikke aineid. Jääkreostusobjektide reostusuuringutes on kasutatud ka Hollandi labori Eurofins Analytico B.V. ja Saksamaa Gesellschaft für Bioanalytik Hamburg mbH teenuseid.

Valdaval osal jääkreostusobjektidel on tegemist naftasaadustest või põlevkiviõlist põhjustatud reostusega (kütused, asfaldi tootmise toorained, õlid, määrdeained), raketibaasides ka raketikütusega (samiin). Jääkreostusobjektide maakondlikus nimekirjas on kontrollimata andmeil veel säilinud likvideerimata mürgi- ja väetiseladusid.

Poolkoksi ladestud on põlevkivikeemiatööstuse jäätmemäed Kohtla-Järvel ja Kiviõlis, kuhu on aegade jooksul ladestatud peale poolkoksi ka õlijäätmek (fuussid, gudroonid jm) ning mäele transporditud poolkoks on laiali uhutud õlise veega. Seetõttu sisaldavad poolkoksi ladestud fenoolid, PAH-e ja naftasaadusi. Poolkoksi uuringutöodes [6, 7] on ladestusaladelt võetud pinnaseproovides ületanud tööstusmaa piirarve fenoolide ja PAH-de sisaldus, naftasaaduste sisaldused on jäänud elumaa ja tööstusmaa piirarvude vahele. Poolkoksiladestute ja selle lähema ümbruse põhjavesi sisaldab üle piirarvu aroomaatseid ühendeid, PAH-e ja naftasaadusi.

Jääkreostusobjektid, kus õhukese pinnakatte tõttu on domineerivaks põhjaveereostus (pinnases olnud jääkreostus on osaliselt puhastustöödega likvideeritud, osaliselt aegade jooksul sademeteveega läbi pestud) paiknevad Põhja- ja Lääne-Eestis. Väljavõtte keskkonnaregistris olevatest põhjaveereostusega jääkreostusobjektidest on tabelis 1.

2001. aastast on jääkreostusobjektide likvideerimist rahastatud SA KIK keskkonnaprogrammist (jääkreostuse alamprogramm) vahenditest. 12 aasta jooksul on puhastustöid teostatud ligi 100 maakondlikul jääkreostusobjektil, neist ligi 90 on likvideeritud, kuid vajavad järelhinnangut objekti staatuse kohta (kustutada või jätta andmebaasi alles). Aastatel 2009...2012 on Euroopa Liidu Ühtekuuluvusfondi rahastamisel alustatud 14 riikliku jääkreostusobjekti pinnase likvideerimistöid (neist seitsmel on käesolevaks ajaks pinnasereostuse likvideerimistööd projekteeritud mahus lõppenud). Euroopa Liidu toel on praegu käimas ka kahe suure jääkreostusobjekti – Kohtla-Järve põlevkivitööstuse ja Kiviõli põlevkivitööstuse ohtlike jäätmete prügilate sulgemise projektid.

Tabel 1: Tabel 1.1 Ainult põhjaveereostusega jääkreostusobjektid

KKR kood	Nimetus	Pindala m ²	Lühikirjeldus
JRA0000001	Tapa sõjaväelennuvälja petrolireostus	16 927 000	Põhjavesi reostunud naftasaadustega, kohati vaba õli kiht vee pinnal
JRA0000005	Aruküla põhjaveereostus	918 000	Põhjavesi joogiks kõlbmatu
JRA0000007	Ääsmäe põhjaveereostus	273 000	Põhjavesi tolupeeniga reostunud
JRA0000009	Moonaküla põhjaveereostus	172 000	Vesi joogiks kõlbmatu, viimasel ajal reostunud põhjaveega ala muutumatu suurusega
JRA0000011	Ümarmäe katlamaja	145 700	Ordoviitsiumi kihi põhjavesi on reostunud
JRA0000013	Keila-Joa raketibaas	60 000	Naftasaadused (diiseli) ja samiini põhjavees
JRA0000061	Balti Elektriijaama tuhaväljak 1 ja 2		Põhjaveet reostavad kõrge leeliselisusega vesi, PAH-d, Cr ^{VI}
JRA0000072	Eesti SEJ tuhaväljak		Põhjavesi reostunud naftasaaduste, fenoolide, PAH-dega ja halogeenoorgaaniliste ühenditega (VOC)

Keskonnategevuskavas aastateks 2007...2013 on ettenähtud likvideerida 32 peamist jääkreostuskollet (uuritud aastatel 2005-2007), mis on selleks tähtjaks ilmselgelt ülejõu käiv eesmärk. Lähiaastatel on plaanis koostada riigihange maakondlike jääkreostusobjektide inventariseerimiseks ja nende reostuse kaardistamiseks ning jätkata riikliku tähtsusega jääkreostusobjektide puhastustöödega.

3.1. Objektid, kus on võimalik pinnase bioloogiline puhastamine

In-situ meetoditest kasutatav biotervendus on kasutatav jääkreostusobjektidel, kus reostus paikneb maapinnale lähedal ja on veetasemest kõrgemal või selle läheduses ning kontsentratsioonid ei ole ülikõrged. Puhastustööd on kergesti teostatavad hea veejuhtivusega pinnastes, seevastu savikates pinnastes ja heterogeense koostisega pinnastes (saviliiv, moreen) muutub tööde kestvus pikemaks.

Kergesti puhastatava objekti näiteks on Tallinn-Väike Veduridepoo, mis on käesoleval hetkel töös. Reostuskomponentideks on siin naftasaadused ja PAH-d. Reostus paikneb sügavusel 1,5...5,5 m maapinnast, veetase on 3,4...4,5 m sügavusel maapinnast, pinnaseks on peen- ja keskliiv. Puhastustööde läbiviimiseks on pinnase homogeensed omadused (liiv) ja pinnase hea filtratsioon (1...5 m/d) soodsad.

In-situ meetodil toimuvad puhastustööd ka Tapa Veduridepoo ja Kopli Kaubajaama jääkreostusobjektidel. Esimene on neist tugevalt reostunud pinnasega ja pinnaseks on valdavalt saviliiv ja saviliivmoreen. Tööde tähtaeg on kaks aastat aga tööde efektiivsuse kohta andmed veel praegu puuduvad.

Potentsiaalseteks *in-situ* meetodil töödeldava pinnasega objektideks on JR riiklikus andmebaasis:

Tabel 2: Jääkreostusobjektid, mis on potentsiaalselt töödeldavad in-situ meetodil

KKR kood	Nimetus	Pinnase liik	Reostuse sügavus, m	Veetase maapinnast, m	Ohtlikud ained
JRA0000008	Tiitsu ABT	Kruus, liiv	0,5-5	0,5-4	Fenoolid, naftasaadused
JRA0000018	Riisipere ABT	Saviliivmoreen	0-5,5	3,5-5	Aromaatsed ühendid, PAH ja naftasaadused
JRA0000021	Pahnimäe ABT	Kruus, liiv	0-7	>4,5	Aromaatsed ühendid, fenoolid, PAH-d ja naftasaadused
JRA0000023	Jaska ABT	Turvas, liiv, kruus, saviliivmoreen	0-6,3	0,1-4	Aromaatsed ühendid, fenoolid, PAH-d ja naftasaadused
JRA0000026	Põlva ABT	Kruus, liiv, saviliiv, saviliivmoreen	0,5-4,9	1,5-3	Aromaatsed ühendid, fenoolid, PAH-d ja naftasaadused
JRA0000031	Lasila ABT	Kruus, liiv, saviliivmoreen	3,2-5,5	0,6-5	Fenoolid, PAH-d ja naftasaadused

Tabelis 2 olevatest jääkreostusobjektidest pole vaid Tiitsu ABT-s reostunud pinnase levila ulatus, selle maht ega reostustase määratud, ülejäänud jääkreostusobjektid on uuritud 2005. aastal seoses 32 objekti uuringutega [5].

Kõigil tabelis 2 toodud jääkreostusobjektidel (Tiitsu ABT ei ole teada) on pinnas reostunud üle tööstusmaa piirarvude.

3.2. Põlevkiviõlide, kasutatud masinaõlide ja poolkoksi keemiline koostis

Põlevkiviõli on põlevkivi (kukersiidi) termilisel töötlemisel tekkiv nafta sarnane vedelik. Põlevkivi koosneb omavahel tihedalt seotud orgaanilisest (umbes 35%) ja anorgaanilisest osast (umbes 65%). Orgaaniline osa, millest saadakse termilise töötlemise teel põlevkiviõli, koosneb peamiselt kerogeenist (üle 95%) ning sisaldab järgmiseid peamiseid elemente (reastatult sisalduse kahanemise järgi): süsinik, hapnik, vesinik, väävel, kloor, lämmastik [8] Kukersiitse kerogeeni struktuur sisaldab märkimisväärselt pika lineaarse külghelaga fenoolseid rühmi [9], mille tõttu on kukersiidi H/C suhe madal (umbes 1,49), samas O/C suhe on kõrge (umbes 0,14).

Põlevkiviõli saadakse põlevkivi termilist töötlemisel, mida viiakse läbi retortides hapnikuvabas keskkonnas temperatuuril umbes 500°C, kus on kerogeeni pürolüüsi kiirus kõige suurem. Sellel temperatuuril kerogeen laguneb ning eralduvad gaas, kondenseeruv põlevkiviõli (sealhulgas reaktsioonivesi) ja tahke jääk (poolkok). Eestis kasutatakse põlevkivi pürolüüsiks kahte põhimõtet:

esiteks, põlevkivi soojendamine gaasiga (nn Kiviter protsess) ning teiseks, põlevkivi soojendamine tsirkuleeriva tuhaga (nn Galoter protsess). Tulenevalt kukersiitse kerogeeni struktuurist, sisaldab saadav põlevkiviõli märkimisväärselt fenoolseid ühendeid. Sõltuvalt pürolüüsi protsessi läbiviimise tingimustest, muutub põlevkiviõli saagis ja fenoolsete ühendite sisaldus õlis. Üldine trend on, et pürolüüsi protsessi temperatuuri kasvuga üle optimaalse temperatuuri, õli saagis väheneb ja aromaatsete ühendite sisaldus õlis kasvab. Kuna Galoter protsessis puutuvad õliaurud kokku aluseliste omadustega tuhaga, on saadavas õlis väiksem fenoolsete ühendite sisaldus kui Kiviter protsessist saadavas õlis. Viimasest eraldatakse veeslahustuvad fenoolsed ühendid (alküülresortsinoolid) ekstraktsioonil veega.

Üldiselt sisaldab kukersiidi pürolüüsil saadav õli märkimisväärsel hulgal heteroatomide sisaldavaid ühendeid (umbes 55%), millest omakorda umbes kolmandiku moodustavad fenoolid. Umbes 30% põlevkiviõlis sialduvatest ühenditest on aromaatsed ühendid ning umbes 10% alkaanid, tsükloalkanid ja alkeenid. Põlevkiviõli keskmine molaarmass on 290 g/mol. Kukersiitse põlevkiviõli elementkoostis on järgmine: süsinik (~81%), vesinik (~10,5%), hapnik (~7%), väävel (<1%), lämmastik (<0,5%) (M. Veiderma. Estonian Oil Shale – Resources and Usage. Oil Shale 20, 3 (2003), 295-303).

Kukersiitsel põlevkiviõlil on lai keemispääre vahemik, kusjuures üle poole õlist moodustavad ühendid, mille keemistemperatuur on üle 350°C (Tabel 3). [10]

Tabel 3: Ainegruppide sisaldus kukersiitse põlevkiviõli fraktsioonides

Ainegrupp, %	Fraktsiooni keemispääre, °C			
	<200	200 – 300	300 – 350	>350
Alkaanid ja tsükloalkanid	11	12	3	1
Alkeenid	39	23	3	1
Aromaatsed ühendid	21	29	33	33
Neutraalsed hapnikuühendid (ketoonid)	20	19	30	30
Fenoolid	9	17	31	35

Põlevkiviõli tootmisel tekib **poolkoks** sisaldab kuni 16% orgaanilisi lenduvaid ühendeid, sealhulgas fenoolseid ühendeid (kresoolid, resortsinoolid, ksüleenoolid) [11] õlitooteid ja polüaromaatseid süsivesinikke (PAH). Lisaks sisaldab poolkoks erinevaid leostuvaid mikroelemente, sealhulgas kroomi, pliid, vanaadiumi, tsinki, niklit arseeni jt [12]. Nii mikroelementide kui ka fenoolsete ühendite ja PAH-ide sisaldus on poolkoks on üldiselt madalam kui lubatud maksimaalne sisaldus pinnases [13].

Kasutatud masinaõli tekib pärast õli kasutamist sisepõlemismootorites. Eestis kasutatakse aastast kütteõlina ca 5 tuhat tonni masuuti ja ca 85 tuhat tonni kerget kütteõli. Kuna diislikütus on märgatavalt kallim, kui teised kütteõlid, siis tema kasutamise tõenäosus kütteõlina on minimaalne. Samas on diislikütus ja kerge kütteõli nii oma keemilise koostise kui ka vastavate kvaliteedinäitajate osas väga sarnased. Masuut on üks kahest nafta töötlemise lõppproduktidest (raskeimaks lõppproduktiks on bituumen) ja ta koosneb väga erinevatest kõrgmolekulaarsetes keemilistest ühenditest, mille sisaldus

sõltub omakorda nafta leiukohast. Naftas sisalduvad mineraalsed lisandid, mida on avastatud kokku üle kuuekümnelt, kanduvad otseselt sinna üle. Neile lisanduvad veel ka need komponendid, mis on seotud rafineerimisprotsessiga, ning ka korrosiooniproduktid torustikest ja mahutitest. Nafta töötlemisel põhiline osa nõu mineraalsetest elementidest, mille sisaldus väheneb reas V, Fe, Ca, Ni, Na, K, Mg, Al, Hg, Zn, Mo, Cr, Cu, Co, Mn, Ba, Ge, Ag, U, Hf, La, Pb, Au, Be, Ti, Sn, läheb üle masuuti, välja arvatud komponendid mis lenduvad. Seepärast on anorgaaniliste komponentide ja väevli kontsentratsioon masuudis suhteliselt suurem kui toornaftas [14].

4. Kirjanduse ülevaade

4.1. Saastatud pinnaste biotervendamine

Nafta ammutamise, transportimise ja töötlemise tehnoloogiate praegune arengutase ei luba kahjuks ära hoida selliste avariilukordade tekkimist, mille puhul nafta ja naftasaadused satuvad keskkonda. Kõige rohkem saastuvad sellisel juhul pinnas ja pinnaveed.

Nafta ja naftasaadused avaldavad negatiivset mõju ökosüsteemi kõikidele komponentidele. Süsivesinike toksiline toime taimedele on nii otsese [15-18] kui ka kaudse iseloomuga seoses niiskuse kättesaadavuse halvenemise [19] liikidevaheliste sidemete nõrgenemise [20] ja toksiine moodustavate seente kogunemisega saastatud muldadesse [20-22];

Kõige tõsisemat mõju avaldab saastumine naftast ja põlevkivist pärit süsivesinikega pinnase omadustele tervikuna. Halvenevad mulla agrofüüsikalised ja agrokeemilised omadused [23-25] muutub happe-aluse tasakaal [26] ja vähenevad oksüdeerivate-redutseerivate ja hüdrolüüsivate fermentide aktiivsus [30, 31, 33-34] ning pinnase varustus lämmastiku ja fosfori liikuvate vormide ja mikroelementidega [35 -38].

Olulised muudatused leiavad naftareostuse toimel aset muldade mikroobikoosluste koostises ja toimimises [39-41, 27, 29]. Mikroorganismide üksikute rühmade vahetamine naftaga saastatud pinnastes on erinev ning sõltub kliimaoludest ja mulla tüübist. Turbasoode saastumisel näiteks pärsitakse esmajoonel mikroseeni, kes etendavad sellistes pinnastes juhtivat osa orgaanilise aine lagunemisel [40]. Naftasaaduste kondenseerituse astme kasvamisest hallides metsamuldades ja mustmuldades väheneb neis tselluloosi lagunemise mikroorganismide ja nitrifitseerivate mikroobide arv [27]. Mõnede mikroorganismide arv võib saastunud pinnastes suurendada. On täheldatud mikroseeni, lämmastikku siduvate bakterite [27] ja purpursete mittevälvlibakterite [41] arvukuse kasvu.

Nafta- ja põlevkivisaaduste vahetu toksiline toime laieneb ka taimedele. Otsesest mõju taimedele avaldavad naftasaadustes sisalduvad naftaalkaunid ja muud toksilised süsivesinikud. M. J. Giljazovi [42] arvates tuleneb raskete fraktsioonide kahjulik toime sellest, et seemnete, juuresüsteemi ja keskkonna vahele tekib mehaaniline barjäär, mis halvendab õhu-, vee ja toitumisrežiimi

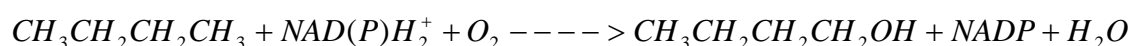
Saastumine süsivesinikega rikub tõenäoliselt üksikute liikide vahelisi sidemeid. N. A. Kirejeva uuringud [28] tõendavad, et selline saaste avaldab negatiivset mõju odradele, vähendades tema fotosünteesivõimet ja saagikust. Taimekooslusega seotud risosfääri mikroorganismid asenduvad uuritavate muldade jaoks ebatüüpiliste liikidega. Selle tulemusena väheneb agrotsünooside saagikust. Mikroobide ja taimede koosteguvuse kahjustamine kutsub naftaga saastumise korral esile toksiine moodustavate seente arenemise taimede all olevas mullas [43, 21-22].

Nafta ja naftasaaduste loomuliku fraktsioneerumise protsess algab kohe pärast nende pinnasesse sattumist ja teiseneb ajapikku. Nafta muundumisel pinnases on eristatud kolme kõige üldisemat etappi [44] ja kolme neile vastavat mikroobide kooslusjärgnevuse etappi [32, 46]:

1. alifaatsete süsivesinike füüsikalis-keemiline ja osaliselt ka mikrobioloogiline lagunemine, mikroobikoosluse muutumine, mikroorganismide aktiveerumine ja paljunemine;
2. eelkõige madalmolekulaarsete ühendite mikrobioloogiline lagunemine ja vaikainete moodustumine;
3. kõrgmolekulaarsete ühendite – vaikude, asfalteenide, tsükliliste süsivesinike – muundumine ning mikroobikoosluse järkjärguline naasmine algsesse või sellele lähedasse seisundisse.

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 molekulid 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. 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 pinnases ja merevees on madal temperatuur, madal mineraaltoainete kontsentratsioon, hapniku defitsiit [46]

n-alkaanide oksüdeerimine alkaani monooksügenaasi (hüdroksülaasi) vahendusel [46]:



Lisaks täielikule ja osalisele lagunemisele võivad süsivesinikud liituda ka huumusainetega [47]. Pinnase isepuhastumine naftasaastest tänu mikroorganismide suutlikkusele süsivesinikke ära kasutada on erinevates kliimavöötmes erinev ja sõltub nii saasteaine kontsentratsioonist kui ka pinnase saastumise tüübist. Toornaftaga saastunud pinnase isepuhastumine toimub üldjuhul äärmiselt aeglaselt. On kindlaks tehtud, et hallides metsamuldades võib nafta tungida 15-30 aastaga kuni 3,5 meetri sügavusele [48], koondudes eelkõige huumushorizonti, mille saastatuse aste oli 15 aasta pärast väga kõrge ning 30 aasta pärast nõrk ja keskmine. Mulla profiil sooldus kuni suure naatriumisaldusega sooldunud muldade tasemeni. Saastumine nõlvadel põhjustas saasteaine migratsiooni ja tekitas uusi saastatud piirkondi.

Naftasaaduste muundumise protsess kestab sõltuvalt loodusvööndist ja saasteaine kogusest mõnest kuust kuni mõnekümne aastani. Jääksaaste säilimine isegi 35 aastat pärast naftasaaduste keskkonda sattumist ning saasteaine migreerimise ja uute saastekollete tekkimise võimalus nõuavad erivõtete kasutamist pinnase süsivesinikest puhastumise kiirendamiseks [48, 49].

4.2. Saastunud pinnaste bioremedatsioon

Pinnaste kahjulikest ainetest puhastamise biotehnoloogilised meetodid on praegusel hetkel aktiivselt edasi arenemas. Bioloogilise rekultiveerimise all ei peeta silmas mitte üksnes pinnase või muu objekti puhastamist reostusest, vaid ka selle looduslike funktsioonide taastamist. Kõiki olemasolevaid bioloogilise rekultiveerimise tehnoloogiaid on võimalik liigitada ühte kahest põhitüübist, milleks on biostimuleerimine ja biotäiendamine (bioaugmentatsioon) [50].

Pinnasesse sattunud naftasaaduste lagunemisele avaldab otsustavat mõju nende mulla mikroorganismide toimeaktiivsus, kes on võimelised tagama nafta ja naftasaaduste täielikku mineraliseerumist süsihappegaasiks ja veeks. Nafta (ning ühtlasi keeruka ehitusega nafta- ja põlevkivisaaduste) lagundamises osalevad mulla mikroorganismide erinevad rühmad - bakterid, pärmseened ja mikroseed. Üldjuhul on koosluses ülekaalus bakterid, keda iseloomustab võime omastada laias valikus süsivesinikke ja sealhulgas ka aromaatsaid süsivesinikke. Kõige tüüpilisemad süsivesinikke lagundada suutvad naftaga saastatud muldade asukad kuuluvad perekondadesse *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Acromobacter*, *Aeromonas* ja *Serratia* [51-57].

Mikrooseente kompleksides on kõige aktiivsemaid naftasaaduste lagundajaid leitud perekondades *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Graphium*, *Mortierella*, *Gliocladium* ja *Trichoderma* [38, 58-61].

Süsivesinike vastupidavus mikroobide lagundavale toimele on erinev. Toornafta ja naftasaaduste mikroobide lagundavale toimele allumise astme gradatsioon on järgmine: toornafta-petrooleum-põlevõlid-masuut [62]. Olulist osa nafta vastupidavuses mikroorganismide toimele etendab selle hüdrofoobsus ja seetõttu on biolagundamise protsessi tõhususe seisukohalt otsustava tähtsusega paljude mikroorganismide juures avastatud võime sünteesida looduslikke pindaktiivseid aineid [63-66].

Mitme uurija saadud tulemused viitavad sellele, et mikroorganismide konsortsium suudavad lagundada süsivesiniksubstraate täielikumalt ja kiiremini kui üksiktüved [62, 67-68]. Mulla mikroorganismide konsortsium on võimeline tagama ksenobiootikute süntroofia toimumiseks vajalikke tingimusi. Naftast ja põlevkivist pärinevate süsivesinike biolagundamise kiirus sõltub paljudest teguritest ning selle protsessi hoogustamiseks on vaja luua mikroorganismidele parimad kasvu- ja arengutingimused. Peamiste süsivesinikke oksüdeerivate mikroorganismide aktiivsusele mõju avaldavate loodustegurite hulka kuuluvad temperatuur, niiskus- ja aeratsioonitingimused, mulla happelisus, mineraalsete toitelementide olemasolu ja päikesepaiste intensiivsus [69-70].

- **Temperatuur** - Muldades süsivesinikke oksüdeerivate mikroorganismide jaoks loetakse optimaalseks mesofiilseid tingimusi ehk temperatuuri 20-30 °C [71, 72]. Temperatuuri säilitamise viisid suurendavad saastatud pinnase puhastamise tõhusust [73, 74].
- **Niiskussisaldus** - Täiesti veevabas keskkonnas ei ole naftat oksüdeerivad mikroorganismid võimalised arenema. Parimateks tingimusteks on nende jaoks 60% suhteline niiskus. Muldade veerežiimi parandatakse põhjavee ärापumpamisega või siis niisutussüsteemide rakendamisega mulla kuivamise takistamiseks ning polüetüleenkile kasutamisega vajaliku niiskustaseme säilitamiseks [74].
- **pH** - Nafta lagunemiseks pinnases on optimaalsed neutraalse lähedale jäävad pH väärtused. Mitmed uurijad soovitavad kasutada happeliste muldade neutraliseerimiseks lubja. Lubja ja mineraalväetiste üheaegne muldaviimine aitab kaasa nafta koostisse kuuluvate raskmetallide neutraliseerimisele [75, 76].
- **Hapnikusisaldus** - Kuna süsivesinike lagunemise protsessid on enamasti oksüdeerivad, on üheks neile piiranguid seadvaks teguriks hapniku kättesaadavus. Puhastusprotsessi jõudlus sõltub suurel määral saastatud pinnaste aeratsiooni intensiivsusest. Seetõttu liigniisketes või raske mehaanilise koostisega struktureerimata muldades naftasaadused sama hästi kui ei lagune [77, 78]. Saastatud pinnase töötlemine, mis aitab kaasa hapniku pääsemisele nafta mikrooblagunemise piirkonda, kiirendab rekultiveerimise protsessi tunduvalt [79]. Sellega kaasneb süsivesinikke oksüdeerivate mikroorganismide elutegevuse aktiivsemaks muutumine, kerged fraktsioonid lenduvad ja väheneb mullaosakeste paakumine. Mikrofloora aktiivset elutegevust tagavate mulla töötlemise viiside hulka kuuluvad kündmine, kobestamine, äestamine ja randaalimine. Pinnaste aeratsiooniprotsesside intensiivistamisele aitab kaasa ja mulla tõhusama puhastamise tagab ka mitmesuguste struktuuri parandavate ainete viimine pinnasesse – nende hulka kuuluvad näiteks perliit, puukoor, saepuru, õled ja muud taimsed jäätmel [80, 81].
- **Mineraalid** - Soodsate temperatuuri- ja aeratsioonitingimuste olemasolu korral peetakse peamiseks naftasaaduste biolagunemisele looduskeskkonnas piiranguid seadvaks teguriks varustatust mineraalsete toiteelementidega [82]. Mõne elemendi nappuse all kannatavate mikroorganismide juures täheldatakse süsivesinike oksüdeerimise aktiivsuse järsku vähenemist, mis viib välja biotervenemise protsessi peatumiseni [83] Biogeensete elementide nappust on võimalik korvata mineraal- ja orgaaniliste väetiste viimisega mulda [84, 85].
- **Toitained (N ja P)** - Arhede kasvu tagavate mikroelementidega varustatuse seisukohalt on kõige tähtsam lämmastiku ja fosfori allikate olemasolu mullas [86]. Kuna süsivesiniksaastega viiakse pinnasesse suures koguses süsinikku, muutub seal järsult C ja N vahekord [87]. Süsivesinike kontsentratsiooni puhul 0,1% kuni 10% on soovitatud optimaalsena nende suhet 9:1. Kui suhe on suurem, toimub bakterite kasvamine ja süsivesinike utiliseerimine aeglasemalt. Toiteelementide koguse optimeerimine (424 mg/l lämmastikku ja 178 mg/l fosforit) lubab suurendada diislikütuse bakterite abil biolagundamise kiirust vees 10 korda [71]. Lisaks sellele võib naftasaadustega

saastatud pinnastes olla rikutud ka muude elementide õige vahekord – neis väheneb liikuva fosfori ja kaaliumi sisaldus [88]. Üheks muldade lämmastikurežiimi reguleerimise vahendiks võib saada vabalt liikuvate lämmastikusidujate viimine nende koostisse. Lämmastiksiduvad mikroorganismid on üks mulla ökosüsteemi normaalset toimimist tagavatest võtmerühmadest. Lämmastiku sidumise intensiivsus on seotud fosfaatide sisaldumisega mullas. Mulla saastumine nafta ja naftasaadustega vähendab fosfori liikuvate vormide sisaldust pinnases, see aga avaldab omakorda negatiivset mõju lämmastikku sidumisele mullas [89, 90]. Süsiniku ja fosfori optimaalne vahekord on C:P = 10:1 [91]. Fosfortoite allikana soovitatakse kasutada ammonium- ja kaaliumfosfaati [92, 93]. Mineraalväetiste viimine pinnasesse suurendab mulla kõikide mikroorganismide arvu ja parandab nende kasvutingimusi.

Üks võimalusi stimuleerida naftast ja põlevkivist pärinevate süsivesinikega saastatud pinnaste looduslikke mikroorganisme on kasutada orgaanilisi substraate, mis rikastavad reostuskohta bioloogiliselt aktiivsete ühenditega ja loovad nii tingimusi raskesti utiliseeritavate süsivesinike ko-metabolismi toimumiseks. Kõnealusel eesmärgil kasutatakse üldjuhul odavaid ja hõlpsasti kättesaadavaid pärmitööstuse jääksaadusi, peptonvett, biohuumust, haljasväetiskultuure, valgu-vitamiinkontsentraate või kalajahu [27, 37,94-96]. On kindlaks tehtud, et naftaga saastatud pinnaste bioloogiline aktiivsus suureneb, kui neisse viiakse komposti, vadakut, aktiivmuda, loomakasvatuskomplekside reovett [44, 61] või eraldi välja töötatud biolisandeid [29, 97].

Soodsat mõju avaldab nafta- ja põlevkivisaadustega saastunud muldade rekultiveerimisel reovee puhastamisel tekkinud aktiivmuda kasutamine. Enne aktiivmuda muldaviimist tuleb siiski eelnevalt hoolikalt kontrollida, kas selles ei leidu kahjulikke mürkaineid [32].

Mikroorganismide eduka toimimise saavutamiseks tuleb tagada naftaga saastatud muldades peamiste toitainete optimaalne vahekord ning säilitada neis soodne temperatuuri-, vee- ja õhurežiim.

Mikroorganismide suutlikkus kasutada süsinivesinikke jt orgaanilisi ühendeid energia allikana ning nende suur kohanemisvõimekus on lubanud välja töötada erinevaid bioaugmentatsioonitehnoloogiad.

Mikroorganismide valimisel tuleb võtta arvesse mitmeid nõudeid. Esiteks peab nende kasutamine olema inimese ja keskkonna jaoks täiesti ohutu – st mikroorganismid ei tohi olla patogeensed, aidata kaasa toksiinide või ksenobiootikute lagunemise mutageensete või väga toksiliste vahesaaduste kuhjumisele ega halvendada ökoloogilist olukorda rekultiveeritaval maa-alal. Teiseks peavad biopreparaadid olema tõhusamad kui natiivsed mikroobikooslused. Kolmandaks peavad introductseeritavad mikroorganismid olema vastupidavad ebasoodsate keskkonnatingimuste toimele. Ühtlasi oleks soovitatav omada võimalust kontrollida biopreparaadi mikroorganismide arengut ja levikut rekultiveeritavas pinnases. Sellele võivad kaasa aidata nende hästi tuvastatav morfoloogia ja biokeemiliste või geneetiliste markerite olemasolu.

Biopreparaatide väljatöötamisel on aluseks saastatud pinnastest võetud mikroorganismide tüved, mis allutatakse selektsioonile (ja geenmuundamisele), et suurendada nende toimet, ning kohandatakse uue elukohaga. Selliste mikroorganismidena, mis on potentsiaalselt kasutatavad pinnaste

süsvivesinikreostusest puhastamise biopreparaatide loomiseks, on kirjeldatud *Pseudomonas putida* ja *Pseudomonas sp.* isolaate [98, 99], perekondade *Rhodococcus* ja *Xanthomon* esindajaid, kes suudavad lagundada näiteks masuuti [100] ning *Acinetobacter* ja *Mycobacterium*it, kes lagundavad laias valikus tavalisi süsvivesinikke. Paljude autorite arvates on kõige tõhusamateks tüvedeks biolagundavaid plasmiide sisaldavad bakterid [101, 102].

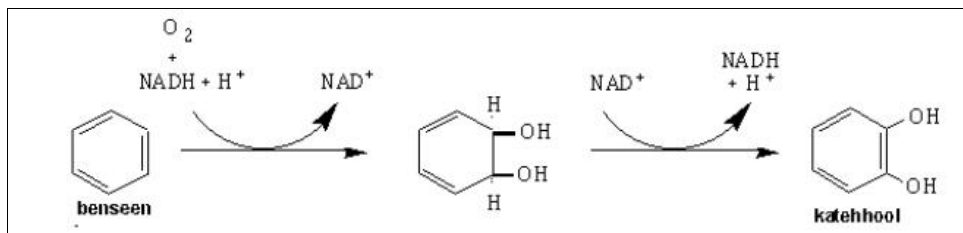
Suurt huvi äratavad perekonda *Bacillus* kuuluvad spore moodustavad mullabakterid, sest nad peavad kõige paremini vastu mitmesuguste keskkonnatingimuste ebasoodsale mõjule. *Bacilluse* tüvede hulgas on avastatud isolaate, kes suudavad utiliseerida n-alkaane C₁₁-C₁₆ ja C₂₀, bensooli, toluooli, naftaleeni ja asfalteene ning produtseerida süsvivesinike lagundamise tõhusust suurendavaid bioemulgaatoreid. Mullaproovidest on eraldatud nafta süsvivesinike lõhustama võimeliste termofiilsete denitritifitseerivate mikroorganismide kooslus. Sellest kooslusest isoleeriti puhaskultuur, mis tuvastati kui *Bacillus stearothermophilus*. Elektroni aktseptorina kasutatava nitraadi ja oksüdeeritavate süsvivesinike vahekord oli 1,25 g/g pinnast [103].

Praeguseks hetkeks on kogunenud hulganisti rakendus- ja alusuuringute materjale, mis tõendavad süsvivesinike lagundavate mikroorganismide kasutamise suurt tõhusust naftasaadustega saastatud pinnaste puhastamisel, ning tänu sellele on osutunud võimalikuks eriotstarbeliste biopreparaatide loomine.

4.3. Aromaatsete süsvivesikute, bensoolide, fenoolide ja nende polüasendatud derivaatide biokonversioon

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 biodegradatsioon 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 [46].

Aromaatsed süsvivesinikud (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) [46].



Joonis 1: Benseeni oksüdeerimine benseeni dioksügenaasi vahendusel [46]

Polütsükliised aromaatsed süsivesinikud (PAH) – naftaleen, antratseen, püreen, bensopüreen jt. Üldiselt sõltub nende ühendite lagundamise kiirus tuumade arvust molekulis, 2-3 ringi puhul toimub bioloogiline lagundamine hapniku aeroobsetes tingimustes. Lagundamine sõltub veel järgmistest teguritest: PAH-ide 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 ensüümi peroksidaasi vahendusel [46].

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) [46]

Bensooli, fenooli ja tema klooritud derivaatide biokonversiooni käsitlevaid andmeid üldistades võib nentida, et selle ühendirühma lagundajatena on nimetatud 123 bakteritüve, mis kuuluvad 37 perekonda. Kõige rohkem teateid puudutab perekonda *Pseudomonas* (38 tüve).

Mõnede bakterite puhul on välja selgitatud nende aktiivsus mitme substraadi suhtes. Nii näiteks *Acinetobacter sp.* [104] ja *Desulfomonile tiedjei* DSB [105] lõhustavad mitmesuguseid diklorofenoole ja triklorofenoole. On võimalik tuua andmeid tüvede *Streptomyces rohei* 303, *Rhodococcus chlorophenolicus* [106], *Desulfitobacterium dehalogenas* [107], *Pseudomonas sp.* KF1 [108] ja *Pseudomonas sp.* SR3 [109] kohta, kes on võimelised lagundama tervet spektrit diklooritud fenoolidest kuni polüklooritud fenoolideni, ning teateid *Pseudomonas sepacia* AC1100 kultuurist, mis ilmutas aktiivsust nii polüklooritud fenoolide (kaasa arvatud diklorofenoolid, triklorofenool ja pentaklorofenool) kui ka triklorofenoksüületaanhappe (2,4,5-) suhtes [110, 111]. Aktiivsust mitme substraadi puhul on täheldatud eukarüootsete mikroorganismide juures – *Aspergillus niger* on suuteline metaboliseerima 4-klorofenooli, 2,4-diklorofenooli, 4-klorofenoksüüädikhapet ja 2,4-diklorofenoksüüädikhapet [112], *Candida tropicalis* HP15 lagundab aga fenooli ja mitmeid selle derivaate [113].

Avaldatud tööde andmeil moodustub fenooli metabolismil võtmetähtsusega intermediaat pürokatehiin, mis lõhustub seejärel intradioolselt või ekstradioolselt. Kõnealune etapp on kõige tähtsam ning sellest sõltuvad suurel määral aromaatsete ühendite utiliseerimise kiirus ja tõhusus tervikuna. Enamasti kaasneb aromaatses ringi lõhkumisega β -ketoadipaadi moodustumine.

Halogeenasendajate olemasolu aromaatses ringis muudab substraadi mikroorganismide jaoks fenoolidega võrreldes halvemini kättesaadavaks. On kindlaks tehtud, et selliste ksenobiootikute lõhustamisel muutub süsiniku ja halogeeni side pärast hapniku aatomi lisandumist labiilseks ja moodustuvad hüdrokinoonid (klorofenoolide lõhustamisel) või halogeenasendatud katehoolid (klorofenoksüaadikhapete lõhustamisel). Intermediaatide analüüsimisega on näidatud, et ksenobiootikute dehalogeenimine võib leida aset nii metabolismi algstaadiumis enne halogeeni sisaldava intermediaadi ringi katkestamist kui ka pärast ringi katkestamist [114, 115]. On tõestatud, et kõige sagedamini viiakse hüdrokinoonid ja katehoolid ensüümide toimel fenooli metabolismi üldevinud ortorajale. Mitme autori järelduste kohaselt täheldati erinevusi intermediaatide iseloomus lõhustumise algjätkudes, hilisemate metaboliitidena on aga näidatud β -ketoadipaadi tüüpi saaduste moodustumist.

Ksenobiootikute metabolismi algetappide geneetilised determinandid lokaliseeruvad D-plasmiidideks nimetatavatel liikuvatel elementidel, hilisemaid etappe kontrollivad aga kromosoomide geenid. D-plasmiidid sisaldavad niisugust geneetilist informatsiooni, mis ei ole iseenesest rakkude jaoks eluliselt vajalik. Kuid just see informatsioon suudab anda bakteritele omadusi, mis tagavad nende ellujäämise teatavates tingimustes (ka ksenobiootikute juureolekul). Andmed D-plasmiidide tunnusoonte kohta on suurel määral ebatäielikud.

Fenooli ja tema klooritud analooge lagundada suutvate tüvede ring on küllaltki piiratud. Sünteetiliste ühendite bioloogilise konversiooni puudutavates töodes on nimetatud 91 bakterite ja 34 seente sugukonda. Arvestades tõsiasja, et praeguseks hetkeks on tuntud üle 250 bakterite sugukonna ja 3000 seente sugukonda, saab selgeks, et teadaolevate ksenobiootikuid metaboliseerida suutvate tüvede arv ei ole suur.

On tarvis rõhutada, et fenooli ja tema klooritud derivaatide mikrobioloogilise mõjutamise uurimise käesolevat etappi iseloomustab selgesti väljendunud praktiline huvi eelnimetatud ksenobiootikute suhtes looduslikke kataboolseid suutlikkusi omavate uute spetsiifiliste mikroorganismide otsimise ja nende alusel eriotstarbeliste biopreparaatide loomise vastu. Biotehnoloogia kasutamine fenooli klooritud derivaatide hävitamiseks kujutab endast perspektiivset lähenemist looduskeskkonna kaitsmise ja puhastamise probleemi lahendamisele. Mikroorganismid on ühtlasi võimelised kaasama ainete ringkäiku mitmesuguseid derivaate, mille hulka kuuluvad ka raskesti lagundatavad tööstuslikku päritolu komponendid ja nende segud. Saasteainete bioloogilist konversiooni kohandatud kultuuride abil saab viia läbi ilma kahjulike või toksiliste ainete kuhjumiseta, see aga lubab välistada keskkonna sekundaarse saastumise. Nii tekib võimalus lahendada saasteainete suurte koguste hävitamise probleemi.

Perspektiivne näib olevat uute tüvede otsimine juba tekkinud reostuspiirkondades, sest on olemas tõendeid selle kohta, et biolagaundavad tüved võivad kujuneda välja pikka aega ksenobiootikute mõjule allutatud mikroorganismikoosluste tähtsate koostisosadena. Sellised tüved muutuvad loodusliku mikrofloora osaks, kusjuures võõrühendite kasutamine süsiniku ja energia allikana ongi see asjaolu, mis määrab ära nende põhilised tunnused ja ökoloogilise niši.

4.4. Venemaal kasutatavad bakteripreparaadid naftareostuste kõrvaldamiseks

Muldade ja pinnaste naftareostusega võitlemiseks loodud esimese põlvkonna biopreparaadid kujutasid endast üldjuhul suspensiooni või biolagaundavate mikroorganismide kontsentreeritud või kuivatatud biomassi.

Bakteripreparaat Putidoil töötati välja loodusliku bakteritüve *Pseudomonas putida* 36 alusel [116]. Kõnealuse preparaadi puuduseks on puhastamisprotsessi suur sõltuvus hapniku kättesaadavusest ja niiskustingimustest.

Venemaa Teaduste Akadeemia Mikrobioloogia Instituudis on loodud preparaat Devoroil, mille koostisse kuulub mikroorganismide konsortsiumi – sugukonda *Candida* kuuluvate pärmide ning bakterite *Rhodococcus sp.*, *Rh. morus.*, *Rh. erythropolis*, *Alcaligenes sp.* ja *Pseudomonas stutzeri* – rakumass [117, 118]. Selle konsortsiumi mikroorganismid suudavad tõhusalt oksüdeerida alifaatseid süsivesinikke ahela pikkusega $C_9 - C_{30}$ ja aromaatsaid süsivesinikke avara happesusvahemikuga (5,5-9,5) ja temperatuurivahemikuga (5-40 °C) keskkondades, nad on kohanenud keskkondadega, mille soolsus ulatub kuni 150 g/l, ning nad on võimelised tungima naftakelmesse [119]. Kõnealuse biopreparaadi kasutamine võimaldab vähendada naftasaastet kontsentratsiooniga 60 m³/ha kolme kuu jooksul 78,8% võrra ning lisaks sellele on tehtud kindlaks, et mulla fototoksilisus langeb kuni foontasandini [117, 118, 120, 121].

Bakteripreparaat Batsispetsin on saadud bakterite *Bacillus sp.* 739 loodusliku tüve alusel. Tüvi kohaneb keskkonnatingimustega hästi, suudab kasvada laias temperatuurivahemikus ning on võimeline kasutama toiteallikana avaras valikus orgaanilisi ja anorgaanilisi ühendeid [122]. Preparaadi kasutamise suurt tõhusust tõestati naftaga reostatud pinnase rekultiveerimisel tootmiskoondise Surgutneftegaz territooriumil, kus hävitati kahe ja poole kuu jooksul 52,4-55,8% naftaühendeid [123]. Batsispetsini on rakendatud ka suures kontsentratsioonis (kuni 20%) naftaga saastunud pinnase biorekultiveerimiseks nafta- ja gaasitööstusvalitsuse Juganskneft maa-alal. Preparaadi viimine mulda aitas vähendada selle naftasisaldust 30-40% võrra [122]. Batsispetsini kui naftaga saastatud pinnaste biorekultiveerimiseks sobiva preparaadi tõhusus on ilmnunud erinevat tüüpi (nii orgaanilise aine poolest rikaste kui ka vaeste) muldade puhul ja mitmesugustes kliimatingimustes (Lõuna-Uural ja Lääne-Siber).

Valgevene Vabariigis on loodud biopreparaat Rodobol, mis saadi sugukonna *Rhodococcus* nafta ja naftatöötlemisjättejate utiliseerimiseks eraldi välja valitud esindajate alusel. Rodokokkide konsortsium

on võimeline nafta alifaatseid komponente 3,5 kuu jooksul täielikult ära kasutama ja lagundama aromaatsaid komponente 95% ulatuses [124].

Bakterpreparaat Rodotrin on tõestanud oma tõhusust tööstusvalitsuse Južarlanneft ja Kaug-Põhja tootmiskoondise Nadõmgazprom ammutamisalade tingimustes ning seda preparaati saab kasutada pinnase ja veekogude naftareostuse likvideerimiseks [125].

Teised teadlased on sugukonna *Rhodococcus* psührofiilsete bakterite alusel loonud preparaadi Ruden, mida kasutati Ižora jõe masuudiga reostatud kollaste ja veepinna puhastamiseks. Sealjuures selgus, et preparaadi ja struktuurimoodustajate (õled, saepuru) kooskasutamisel vähenes naftasaaduste kontsentratsioon pinnases ja vees pooleteise kuu jooksul kaks korda [126].

Ühtaegu pinnase reostusest puhastamisel rakendatavate biopreparaatide uurimise ja väljatöötamisega tehakse samalaadset tööd ka veekeskonna jaoks mõeldud preparaatidega. Nii näiteks on Peterburi Riikliku Tehnoloogiainstituudi asjatundjad eraldanud saastatud muldadest välja uusi naftat lagundavaid mikroorganisme, kusjuures kaks bakteritüve ja kaks seenetüve nende seast on võimelised oma elutegevuse käigus lõhustama vees oleva toornafta 74-86% ulatuses. Nende mikroorganismide sorbendina katsetati Bamili, mis kujutab endast kuivatatud aktiivmuda alusel loodud bioväetist. Tehti kindlaks sorbendi ja bakterite optimaalne vahekord (bakterite puhul 3% ja seente puhul 5% Bamili) bakterite kontsentratsioonil 10^{10} PMÜ/ml. Bamili ja naftat lagundavate bakterite kooskasutamisel lagundatakse viie päeva jooksul 98-99% toornafta vedelfaasist [127].

Muldade ja pinnavee puhastamiseks naftareostusest on loodud preparaat Naftoks, mis sisaldab sugukondade *Mycobacterium*, *Pseudomonas* jt väga aktiivseid aeroobseid naftat oksüdeerivaid baktereid. Preparaadile lisati ka 0,05-1,0% ammoniumoksalaati ja 1,0-1,5% normaalparafiine, mis tagas suure kontsentratsiooni ja süsivesinike oksüdeerimise aktiivsuse säilimise.

Moskva oblastis Obolenski alevis asuvas riiklikus rakendusmikrobioloogia teaduskeskuses töötati erinevatest looduslikest allikatest eraldatud bakteritüvede *Mycobacterium flavescens* EX-91, *Pseudomonas putida* 9 ja *Acetobacter* sp. 1 alusel välja vedel biopreparaat Ekoil. See preparaat on oma erinevates modifikatsioonides kasutatav nii nafta ja naftasaadustega reostatud veekogude kui ka pinnaste puhastamiseks. Uuriti ka seitsme sugukondadesse *Aspergillus* ja *Penicillium* kuuluva loodusliku mikroseenetüve suutlikkust puhastada vett ujuvnaftast. Tüved *Aspergillus* sp. 1 ja *Penicillium* sp. 2/2 on statsionaarsetes tingimustes võimelised eemaldama katsekolvis mere- ja magevee pinnalt naftalike nafta kontsentratsiooni juures 1% temperatuuril 25° ja 10° , kusjuures eemaldamise tõhusus on 14-21 ööpäeva jooksul 60% kuni 98%. Nende tüvede alusel luuakse biopreparaate veepinna puhastamiseks reostusest.

Naftaga saastatud muldade ja veekogude taastamiseks mõeldud biopreparaatide edasine täiustamine on nähtavasti seotud nende kohandamisega mitmesuguste ja sealjuures sageli ka spetsiifiliselt ebasoodsate tingimustega, millega mikroorganismid reostuskohta introductseerimisel kokku puutuvad.

Üleminek biopreparaatide teisele põlvkonnale oli seotud nende tehnoloogiliste omaduste märkimisväärse paranemisega. Mikroobirakkude immobiliseerimine kandjatel lubas suurendada kuivvormis preparaate säilimisaega ning kaitsta ja stabiliseerida pinnases sinna kunstlikult viidavaid mikroobiühendusi. Kseonobiotikute lagundamises osalevate mikroorganismide toitumisvajaduste tundmaõppimine aitas kaasa sellele, et biopreparaatide koostisse kaasati ka mineraalseid ja orgaanilisi lisandeid.

Naftast pärinevate saasteainete lagundamise tõhusus sõltub süsivesinikke oksüdeerivate mikroorganismide kandjatel immobiliseerimise astmest. Modifitseeritud bioloogiliste preparaate kasutamine lubab vähendada mikroorganismide toimekontsentratsiooni 4 korda ja lühendada naftaga saastatud alade puhastamiseks kuluvat aega 1,5-2 korda [128]. Preparaadi koostise täiendamine lisakomponentidega muudab võimalikuks süsivesinikke oksüdeerivate mikroorganismide rakendamise kriitilise piirkontsentratsiooni 25 g naftat 1 kg mulla kohta ületamise [129]. Mikroorganismide immobiliseerimiseks kasutatakse anorgaanilisi või orgaanilisi sorbente, mille hulka kuuluvad näiteks taimset päritolu põllumajandusjäätmek (tatra- ja kaerasõklad, peenendatud teraviljapõhk), turvas või puidu- ja puidukeemiatööstuse jäätmek (saepuru, ligniin). Elavate mikroorganismide baasil tõhusatoimeliste preparaate loomisel omavad otsustavat tähtsust biopreparaadi bioloogilise aluse jaoks agendi valimine ja bakterirakkudele õige adsorbendi leidmine [130].

On välja töötatud biosorbent Unipolimer-bio, mis saadi naftat oksüdeerivate mikroorganismide immobiliseerimisel suure naftaimavusega (40-80 mg naftat 1 g sorbendi kohta) vahtsorbendil ja mille koostises on kõik vajalikud biogeenid [131]. Tjumeni oblastis ja Krasnodari kraisis teostatud katsed näitasid, et Unipolimer-bio suudab viia ühe hooaja jooksul naftareostuse taseme nii madalale, et spetsiaalsete puhastamistoimingute teostamine ei ole enam vajalik. Kergkruusa (keramsiidi) kasutamine kandjana bakteritüvede *Acinetobacter calcoarcticus* K-4, *Nocardia vacceinii* K-8, *Rhodococcus erythropolis* -1 ja *Mycobacterium* sp. K-2 immobiliseerimiseks lubas intensiivistada mikroorganismide kasvu ja süsivesiniksubstraate assimileerimist veekeskkonnas [132].

Naftaga saastatud pinnaste biotervendamise tehnoloogiate edasine täiustamine viis välja mõistmiseni, et mikroobikoosluste saaste mõjul nõrgenenud või kadunud funktsioonide taastamine vajab kompleksset lähenemist. Esimesed sellisuunalised uurimused on demonstreerinud uude lähenemise suurt tulemusrikkust. Uuriti sugukonda *Azotobacter* kuuluvate nafta süsivesikuid ära kasutada suutvate bakterite (*A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*) võimet stimuleerida süsivesinikke oksüdeerivate introductseeritud mikroorganismide elutegevust [133]. Asotobakteri ja preparaadi Devoroil kooskasutamine osutus tõhusaks.

Halofiilsete bakterite sümbioosis rakendamine võitluses naftareostusega sooldunud pinnastel kaitseb sugukonda *Pseudomonas* kuuluvaid baktereid soolade nende jaoks hukutava mõju eest. Immobiliseeritud kompositsiooni koostis on järgnev – orgaanilist päritolu adsorbendist kandja, bakterid *Pseudomonas putida* ja aeroobsed kemoorganotroofsed halofiilsed arhed sugukonnast *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halococcus* või *Haloferax* (pinnase pH väärtustel 5,0 kuni 8,0). Kui väärtus ületas 8,5, kasutati alkalofiilseid baktereid sugukonnast *Natronobacterium* või *Natronococcus*.

Sümbioos on tegur, mis lubab süsivesinikke oksüdeerivatel bakteritel viia läbi elutegevust nende jaoks äärmuslikes tingimustes (nafta ja soolade liiasus) [134]. Mikroorganismide niisuguste

immobiliseeritud segude kasutamine, mille koostises on orgaaniline või anorgaaniline sorbent, süsivesinikke oksüdeerivad bakterid ja aeroobsed kemoorganotroopsed halofiilsed bakterid ning mille toime on suunatud ühtaegu nii mulla soolasisalduse vähendamisele kui ka nafta biolagundamisele, tagas süsivesinikke oksüdeerivatele bakteritele kaitse soolade hukutava mõju eest.

5. Metoodika

Kõik bioremedatsioonikatsed viidi läbi Venemaa Teaduste Akadeemia Ufaa Teaduskeskuse (VTA UTK) järgnevates allüksustes:

1. VTA UTK Orgaanilise Keemia Instituut (füüsikalise-keemiliste analüüsimeetodite laboratoorium).
 2. VTA UTK Naftakeemia ja Katalüüsi Instituut (kromatograafia laboratoorium).
 3. VTA UTK Biokeemia ja Geneetika Instituut (molekulaarbioloogia ja taimefüsioloogia osakond) ja
 4. Venemaa Põllumajanduse Akadeemia Baškiiri Põllumajanduse Instituudis (analüüsilaboratoorium).
- Vana poolkoksi proovid võeti ja analüüsid teostati Eesti Keskkonnauuringute Keskus OÜ poolt.

5.1. Pinnaseproovid

Tehnogeensete saasteainetega reostatud pinnaste biotervendamist käsitleva katse jaoks valiti saasteainetena välja.

Uuringus kasutati kolme erinevat tüüpi saastunud pinnaseid:

- Vana poolkoks. Poolkoksi proovid võeti 17.09.2012.a. Kohtla-Järve tuhamäelt. Tabelis 4 on toodud poolkoksi analüüsitulemused. Kõnealusel tuhamäel käivad käesoleval ajal sulgemistööd. Euroopa Liidu toel tegelevad mäe sulgemistöödega ehitusfirmad Merko ning Rand&Tuulberg. Poolkoksi analüüsitulemused on toodud lisa 1 ja Eesti Keskkonnauuringute Keskus OÜ-s kasutusel olevad analüüsimeetodikad lisa 2. Laboratoorse katse modelleerimiseks segati vana poolkoksi halli metsamullaga vahekorras 31:100
- Kasutatud masinaõlidega saastunud pinnas – pinnased modelleeriti Venemaa Teaduste Akadeemia Ufaa Teaduskeskuse Bioloogia Instituudi laboris. Laboratoorse katse modelleerimiseks segati kasutatud masinaõli halli metsamullaga vahekorras 22:100
- Põlevkiviõlidega saastunud pinnas - pinnased modelleeriti Venemaa Teaduste Akadeemia Ufaa Teaduskeskuse Bioloogia Instituudi laboris. Laboratoorse katse modelleerimiseks lisati põlevkiviõli "VKG extra light" (vt tabel 4 ja lisa 3) hallile metsamullale vahekorras 7:100.

Tabel 4: Põlevkiviõli koostis (kromatomassispektromeetria andmeil)¹

Jrk nr	Koostisosa	Sisaldus %
1	N-alkaanid (C ₉ - C ₂₅)	18,5
2	Isoalkaanid	15
3	Olefiinid (i-alkaanidele vastavad C ₉ - C ₁₈)	11
4	Alküülbensoolid (metüül-, dimetüül-, trimetüül-)	7
5	Fenoolid (kresool, di-, trimetüül)	5,5
6	Resortsiinid	2,5-3
7	Polütsüklilised aromaatsed süsivesinikud (metüül-, dimetüül-naftaleen, antratseen, metüülantsatseen)	2-3
8	Nafteenid	4-5
9	Aldehüüdid	2-3
10	Vesi	2-2,5
11	Kondensatsioonisaadused, oligomeerid	26,5-30,5

5.2. Mikro-organismide konsortsiumid Ufa-Estoil-1 ja Ufa-Estoil-2

Venemaa Teaduste Akadeemia Ufa Teaduskeskuse Bioloogia Instituudi bioloogiliselt aktiivsete ainete laboratooriumis ja rakendumikrobioloogia laboratooriumis on loodud biopreparaadid, mis on Venemaal laialdaselt kasutatavad naftasaastega objektide rekultiveerimiseks.

Diislikütusega saastatud hallist metsamullast eraldati bakteriisolaat (5-5), mis on võimeline kasutama ainsa süsiniku ja energia allikana diislikütust. Uuringute käigus tehti kindlaks, et isolaat kujutab endast looduslikku bakterikonsortsiumit. Morfoloogiliste tunnuste kogumi ja füsioloogiliste omaduste alusel tuvastati tüvi 5-1 kui *Bacillus brevis*, tüvi 5-3 aga kui *Arthrobacter sp.* Uus mikroorganismide konsortsium on patenteeritud Vene Föderatsioonis (VF patent nr 2 232 806) kui "Mikroorganismide *Bacillus brevis* ja *Arthrobacter sp.* konsortsium, mida kasutatakse vee ja pinnase puhastamiseks naftast ja naftasaadustest". Eraldatud mikroorganismide konsortsiumi alusel on loodud nafta ja naftasaadustega saastatud muldade ja pinnaste puhastamiseks kasutatav biopreparaat Lenoil [135-149].

Mõlemad bakteritüved omavad teatavat oksüdeerimissuutlikkust erineva keemilise koostisega süsivesinike suhtes. Mikroorganismide konsortsiumi oksüdeerimisaktiivsus on suurem kui konsortsiumi koostisse kuuluvate üksikute bakteritüvede isoleeritud puhaskultuuride analoogiline näitaja. Tüve *Bacillus brevis* oksüdeerimisaktiivsus on sealjuures suurem kui tüvel *Arthrobacter sp.* ja kujutab endast tõenäoliselt määravat väärtust konsortsiumi kui terviku jaoks. Erandiks on tsüklilise

¹ Analüüs teostatud VTA UTK laboris

struktuuriga süsivesinikud (bensool, toluool, naftaleen, tsükloheksageen), sest nendel juhtudel prevaleerib tüve *Arthrobacter sp.* oksüdeerimisaktiivsus, mis ületab väärtuselt konsortsiumi teise liikme analoogilise näitaja. Mitmesuguste süsivesinike oksüdeerumine mikroorganismide toimel on seotud oksügenaasi fermentsüsteemi olemasoluga mikroorganismidel, mis lubab neil lülitada molekulaarset hapnikku vahetult süsivesinike molekuli koostisse, mille tulemusena moodustuvad oksüdeerunud ühendid. Võib oletada, et vaadeldavasse konsortsiumisse kuuluvate mikroorganismide fermentsüsteemid sisaldavad oksügenaase. Tüve *Bacillus brevis* oksügenaasisüsteem on sealjuures spetsiifilisemalt kohanenud sirge ahelaga süsivesinike oksüdeerimisele, tüve *Arthrobacter sp.* analoogiline süsteem aga tsükliiliste süsivesinike oksüdeerimisele.

Katsete läbiviimiseks töötati Venemaa Teaduste Akadeemia Ufaa Teaduskeskuse Bioloogia Instituudi laboris välja kaks mikro-organismide konsortsiumi Ufa-Estoil-1 ja Ufa-Estoil-2.

Ufa-Estoil-1 koostisesse kuuluvad:

- 1) Süsivesinikke oksüdeerivad tüved ***Bacillus brevis*** ja ***Arthrobacter sp.***, mis on demonstreerinud oma tõhusust mitmes labori- ja tootmiskatses. See konsortsium on tööstusliku biopreparaadi Lenoil aluseks.
- 1) Lämmastikku siduv tüvi ***Azotobacter vinelandii*** -4. Selle tüve ülesanne on mullas toimuvate bioloogiliste protsesside intensiivistamine ja sealhulgas ka lämmastikvahetuse parandamine. Kõnealuse tüve alusel on loodud biostimulaator Azolen.
- 2) Tüvi ***Bacillus sp. 739*** on biopreparaadi Batsispetsini aluseks ja sisaldab spore moodustavate mulla mikro-organismide biomassi. Kõnealune preparaat põhjustab kohapealse mikrofloora märkimisväärse aktiveerumise, kaasates selle tehnogeensete ja sealhulgas ka süsivesiniksaastete biolagundamise protsessidesse.

Biopreparaatide Lenoil ja Azolen kontsentratsioon selles konsortsiumis on 2×10^8 PMÜ/g ja Batsispetsini kontsentratsioon 1×10^6 PMÜ/g.

Konsortsiumi “Ufa-Estoil-2” koostises on kuus liiki erinevaid mikroorganisme: ***Bacillus brevis***, ***Arthrobacter sp.***, ***Azobacter vinelandii*** -4, ***Bacillus sp. 739***, ***Arthrobacter globiformis*** IBRB-17S ja ***Bacillus subtilis*** IBRB 16. Konsortsiumisse kuuluvaid tüvesid ***Arthrobacter globiformis*** IBRB-17S ja ***Bacillus subtilis*** IBRB 16 rakendatakse reovete puhastamisel fenoolühenditest.

5.3. Töö käik

Ekspperimentaalse katse ettevalmistamiseks segati saasteainetega (põlevkiviõli, poolkoksi ja kasutatud masinaõliga) pinnaseproovid, mille mass oli 1 kg, hoolikalt samasuguses proportsioonis halli metsamullaga (muld võeti Ufaa linna metsapargivööndist) ja paigutati 5-liitrise mahutavusega plastanumatesse.

Proove inkubeeriti 90 päeva toatemperatuuril $20 \pm 2^{\circ}$. Suhteline niiskus anumates hoiti kogu katseaja jooksul tasemel 60%. Mikroorganismidele optimaalsete elutingimuste loomiseks viidi mulda mineraalseid lämmastik- ja fosforväetisi arvestusega 0,25 grammi väetisi 1 kg proovi kohta kuus.

Eksperiment viidi läbi järgneva skeemi alusel:

- 1) kontrollproov nr 1 (põlevkiviõli + hall metsamuld);
- 2) kontrollproov nr 2 (kasutatud masinaõli + hall metsamuld);
- 3) kontrollproov nr 3 (poolkoks + hall metsamuld);
- 4) Ufa-Estoil-1 + põlevkiviõli;
- 5) Ufa-Estoil-1 + poolkoks;
- 6) Ufa-Estoil-1 + kasutatud masinaõli;
- 7) Ufa-Estoil-2 + põlevkiviõli;
- 8) Ufa-Estoil-2 + poolkoks;
- 9) Ufa-Estoil-2 + kasutatud masinaõli.

Eksperimendi käigus võeti proove iga 30 päeva järel modelleeritud pinnastest ning poolkoksi katseseeria puhul iga 15 päeva järel.

VTA UKT-s ei olnud antud uuringu raames võimalik viia läbi kõigi reostuskomponentide (põlevkiviõli, läbitöötanud masinaõli, poolkoks) süsivesinike fraktsioonide analüüsi nende lagunemise eri staadiumitel ning selle asemel määrati summarse süsivesinike kontsentratsiooni muutust (%) eksperimendi käigus.

Pinnases summaarse süsivesinike kontsentratsiooni määramise meetodika VTA UKT laboris seisneb ettevalmistatud pinnaseproovide ekstraheerimises erinevate orgaaniliste lahustitega. Kõige levinuim neist on heksaan. Protsess viiakse läbi mitmes etapis:

- 1) Pinnaseproovide võtmine. Katseplatsilt võetakse tavaliselt 9...12 pinnaseproovi, seejärel need proovid segatakse hoolikalt kesendatud proovi saamiseks. Kui katse toimub laboritingimustes, segatakse muld katseanumas ja valmistatakse samuti [kesendatud] proov.
- 2) Saadud proovid kuivatatakse liigsest niiskusest 4..7 ööpäeva jooksul kas toatemperatuuril või kuivatusahjus 2...4 tunni jooksul temperatuuril 35..50 °C. Seejuures auruvad vähesel hulgal (mis on tühine) süsivesinike lenduvad fraktsioonid.
- 3) Kuivatatud pinnase 10 g kaalutised (3..4 tükki) paigutatakse iga eraldi eksperimendi jaoks topelt paberkotikestesse, pakitakse hoolikalt ja kaalutakse analüüstilistel kaaludel kolmanda koha täpsusega peale koma.

- 4) Heksaaniga ekstraheerimine toimub Soxleti anumal temperatuuril, mis ületab pisut heksaani keemistemperatuuri, tavaliselt 70..75 °C. Seejuures läheb suurem osa süsivesinikke, sh aroomaatseid, üle ekstrakti. Ekstraheerimine kestab tavaliselt 4..5 tundi.
- 5) Saadud ekstraktist aurutatakse rootor-kileaurutil heksaan ja seejärel saadetakse proov analüüsile süsivesinike fraktsioonkoostise määramiseks gaas- ja vedelik-kromatograafia, spektroskoopia jm. meetoditega.
- 6) Heksaanijääkidest kuivatatud pinnasega pakikesed kaalutakse uuesti elektroonilistel kaaludel ja määratakse ekstraheeritud süsivesinike hulk.

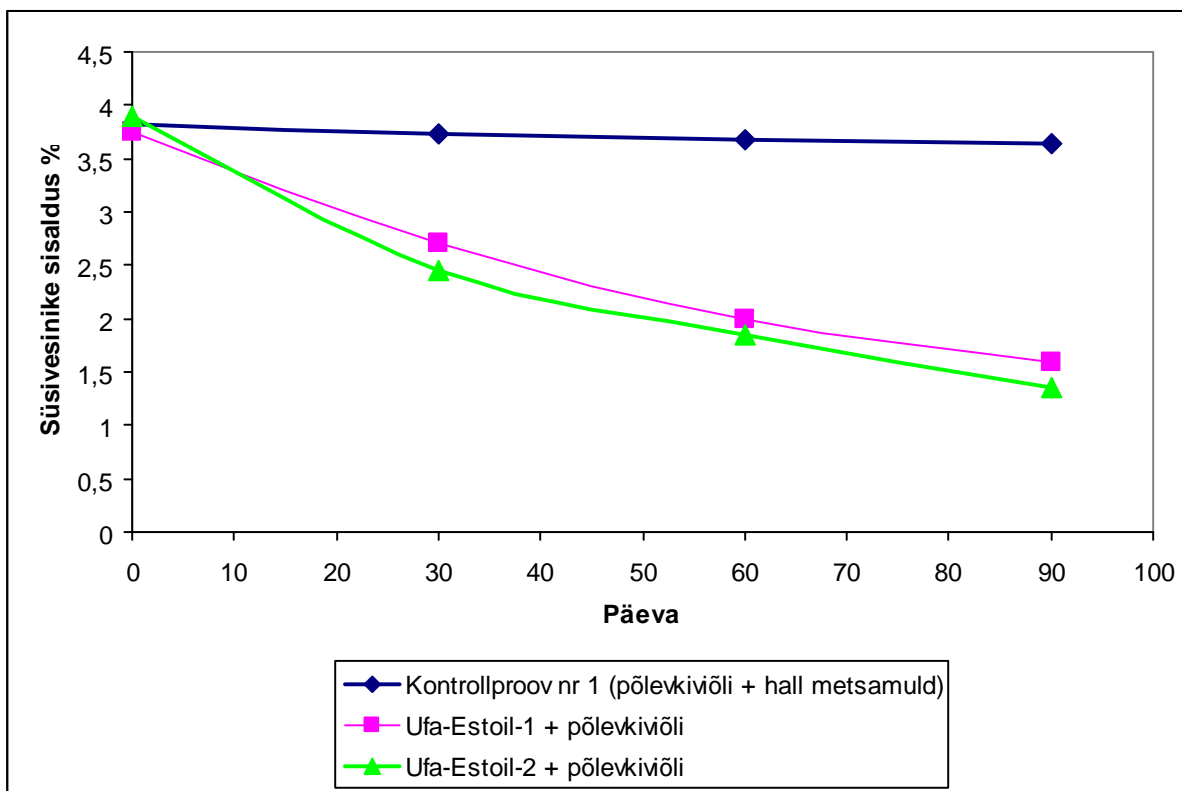
5.4. Tulemused

Süsivesinike eri fraktsioonide utiliseerimisprotsess kulgeb järgmiselt. Biorekultiveerimise algetapil jääb katseplatsi looduslik mikrofloora allasurutud seisundis ja eelise saavad introductseeritud mikroorganismid. Sel etapil toimub lineaarsete lühikese ahelaga süsivesinike (parafiinide) utiliseerimine. Konsortsiumi "Ufa-Estoil-2" koosseisu fenoolide lagundavate tüvede viimine võimaldab juba selles etapis alustada aroomaatsete süsivesinike lagundamist, vältides seejuures liikidevahelist võitlust substraadi pärast.

Kui parafiinid on süsivesinikeostusest ammendatud, toimub keerukamate süsivesinike – tsükliiliste ja aroomaatsete – mikroobne lagundamine. Kusjuures nende utiliseerimine toimub bensoolirõnga "lahtilõikamise" ja "lahtikerimise" teel lineaarseks molekuliks selle järgneva lõikamisega väikesteks fragmentideks. Sel moel toimub kõigi süsivesinikfraktsioonide järk-järguline lagunemine. On loomulik, et parafiinide utiliseerimine kulgeb kiiremas tempos, kuna sellesl protsessis osaleb tunduvalt rohkem mikroorganisme.

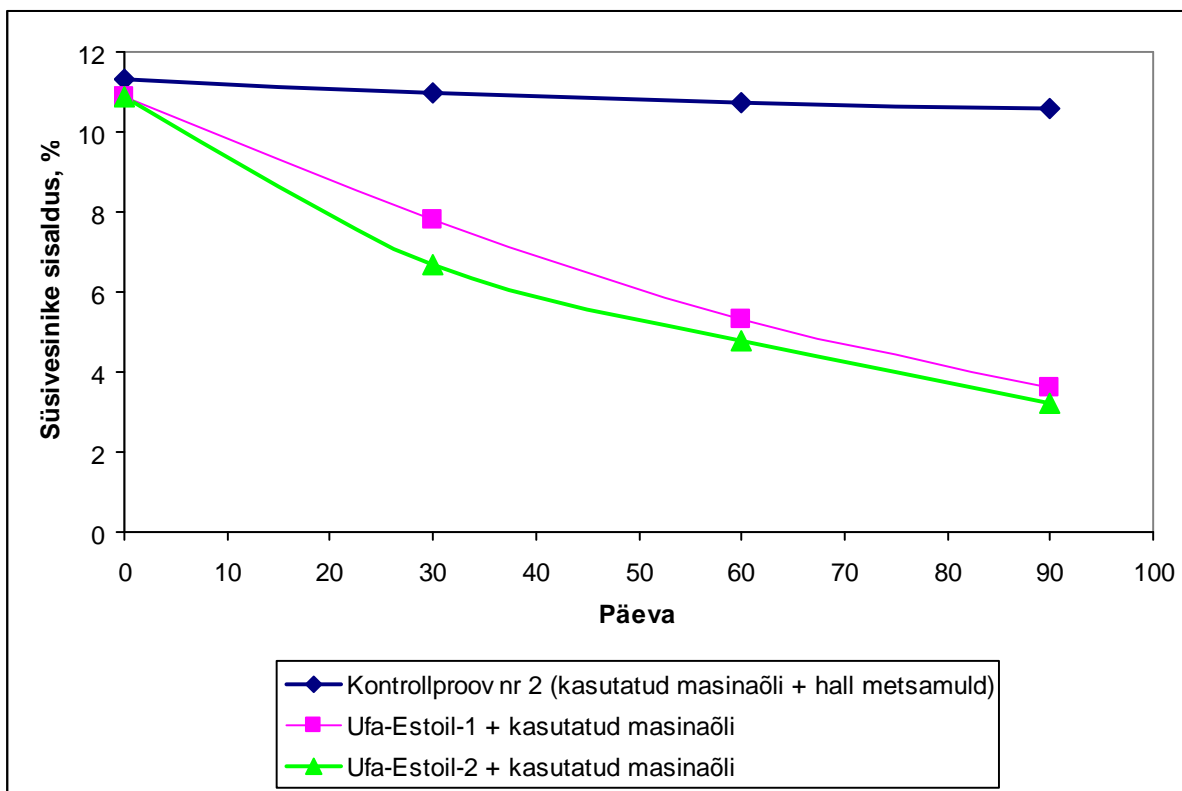
Vastavalt sellele, kuidas toimub katseplatsi pinnases süsivesinike üldine vähenemine, võtavad biorekultiveerimisest üha rohkem osa kohapealsed mikroorganismid, mis olid mullas juba algul. Aborigeenide mikrofloora kiiremaks aktiveerimiseks lisatakse konsortsiumitesse "Ufa-Estoil-1" ja "Ufa-Estoil-2" *Bacillus sp.* 739 tüvi. Edaspidi väheneb introductseeritud mikroorganismide hulk aborigeenide mikroorganismide hulga suurenemise ja substraadi (lineaarsete süsivesinike) kättesaadavuse vähenemise tõttu. Biodegradatsiooniprotsess aeglustub. Kuid spetsiaalsete bensool- ja fenoolhapendavate bakterite kasutamisel ("Ufa-Estoil-2"-s) keeruliste aroomaatsete süsivesinike biodegradatsiooniprotsesside intensiivsus ei alane.

Naftakeemiast ja põlevkivist pärit süsivesinike biodegradatsiooni protsessi lõpuks jääb katseplatsi pinnasesse mõningane hulk "raskeid" aroomaatseid süsivesinikke, mis on eri lagunemisastmel. Seetõttu on nende fraktsioonilist koostist määrata praktiliselt võimatu. Kvantitatiivselt võib see jääk moodustada 10...15 % algsest reostusest.



Joonis 2: Süsivesinike sisalduse muutus põlevkiviõliga reostunud pinnases

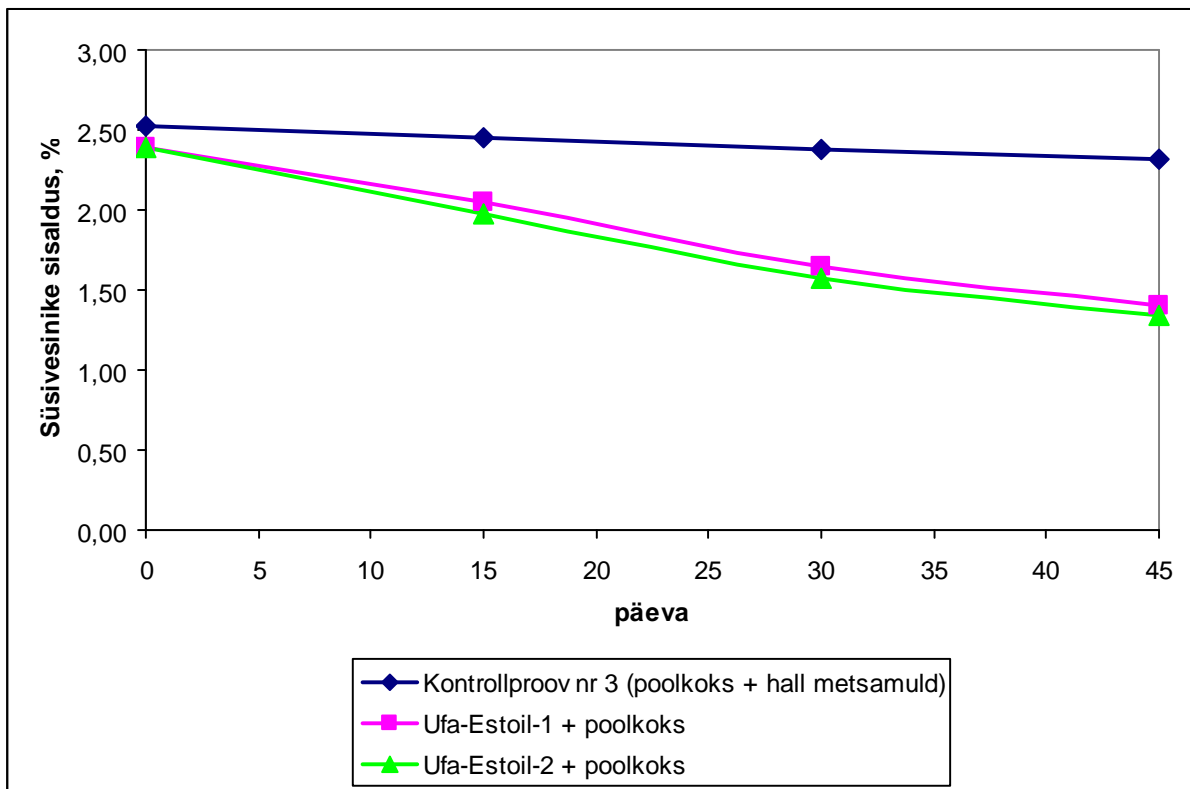
Nagu võiski oodata, osutus biotervendamisel kõige keerulisemaks objektiks põlevkiviõli (vt Joonis 2). Sellegipoolest õnnestus konsortsiumi Ufa-Estoil-1 kasutamisega vähendada süsivesinike sisaldust vastavas proovis võrreldes nende esialgse kogusega peaaegu 57% protsendi võrra. Autoremediatsiooni tase kontrollproovis ulatus sealjuures kõigest 4,7%. Veelgi paremaid tulemusi andis valikulise toimega mikroorganismide ehk bensoolide, fenoolide ja nende polüasendatud derivaatide lõhustajate kasutamine mikrobioloogilise konsortsiumi Ufa-Estoil-2 koostises – põlevkiviõli biolagunemise määr katseproovis ületas siis 65%.



Joonis 3: Süsivesinike sisalduse muutus kasutatud masinaõliga reostunud pinnases

Suurimat edu biotervendamisel õnnestus saavutada poolkoksi (vt Joonis 4) ja kasutatud masinaõli (vt Joonis 3) puhul. Poolkoks sisaldab suurel hulgal lenduvaid ühendeid ja enamus osutus nendest biotervendamisel konsortsiumi Ufa-Estoil-1 mikroobide jaoks kättesaadavaks. Poolkoksis sisalduvate süsivesinike biolagunemise määr katse 45 päeva jooksul oli 41,5%. Konsortsiumi Ufa-Estoil-2 kasutamisel ulatus poolkoksi biolagunemine samasugustel tingimustel peaaegu 44%. Autobioremediatsiooni tase kontrollvariandis jäi alla 8%.

Seega järeldub saadud katseandmete analüüsist, et biopreparaatide konsortsiume Ufa-Estoil-1 ja Ufa-Estoil-2 saab väga tulemusrikkalt kasutada naftakeemia- ja põlevkivikeemiatööstuse tehnogeensete saadustega saastatud muldade biotervendamiseks. Konsortsium Ufa-Estoil-2 on sealjuures rohkem orienteeritud selliste raskete süsivesinikfraktsioonide biolagundamisele, mille koostises on aromaatsed, naften- ja asfalteensüsivesikuid. Pinnase isepuhastumise protsessid (autobioremediatsioon) kulgevad väiksema intensiivsusega kui valikulise toimega mikrobioloogiliste biopreparaatide kasutamisel.



Joonis 4: Vana poolkoksiga reostunud pinnase biolagunemise aste

Biopreparaatide kompleksid Ufa-Estoil-1 ja Ufa-Estoil-2 suudavad tõhusalt lahendada nii looduslikku kui ka sünteetilist päritolu keeruliste süsivesiniksaastete biolagundamise ülesandeid, kusjuures lagunemisprotsessi efektiivsus ületab suurusjärgu võrra pinnaste isepuhastumise (autoremediatsiooni) vastavad näitajad, ning et ühtlasi aitavad need kompleksid kaasa erineva otstarbega pinnaste kiiremale ja täielikumale puhastumisele kogunenud saasteainetest.

Ülalnimetatud saadustega saastatud pinnaste biotervendamisel tuleb rakendada integreeritud ja etapiviisilist, mitmesuguste biopreparaatide kasutamise, mineraal- ja orgaaniliste väetiste lisamise ja fütomelioratsiooni järku hõlmavat lähenemist nende puhastamisele.

5.5. Peamised järeldused

1. Laborikatsed komplekssete biopreparaatidega Ufa-Estoil-1 ja Ufa-Estoil-2 on näidanud nende suurt tõhusust (41,5%-71%) Eesti Vabariigis leiduvate tehnogeensete saastete (põlevkiviõli, kasutatud masinaõli ja poolkoks) biolagundamisel.
2. Niisugused tulemused viitavad vajadusele viia Eesti Vabariigi tingimustes läbi välikatsed olulisel määral (tööstuslikus mastaabis) põlevkivikeemiasaadustega saastatud pinnastega.
3. Biopreparaadid Ufa-Estoil-1 ja Ufa-Estoil-2 aitavad tõhusalt kaasa pinnaste puhastumisele (biotervenemisele) tehnogeenselt saastumisest nafta, naftasaaduste ja naftakeemiatööstuse protsessides tekkinud sünteetiliste derivaatidega. Aromaatseid ühendeid hävitavate valikulise toimega tüvede mikrobioloogilise konsortsiumi viimine pinnasesse suurendab sealjuures lõhustamise tõhusust 5-8% võrra.
4. Biopreparaatide kasutamise tõhusus ületab pinnaste loodusliku puhastumise protsesside efektiivsuse (juhul kui saaste lahjendamiseks on viidud pinnasesse värsket mulda) terve suurusjärgu võrra ja kaks-kolm suurusjärku siis, kui värsket mulda ei lisata. Tänu sellele kasvab pinnaste biotervenemise ja selle varasemate omaduste taastumise kiirus mitmeid kordi.
5. Biopreparaatide kasutamine tuleb siduda agrotehnilise meetmete rakendamisega, mille hulka kuuluvad täiendava värsket mulla viimine pinnasesse, kobestamine, kastmine ning väetamine orgaaniliste ja mineraalväetistega. Sellise lähenemisega on võimalik biotervendumise ja saateainete mikrobioloogilise lõhustamise protsessi tunduvalt kiirendada.

6. Saastunud pinnaste biokultiveerimine reaalsetes oludes

Kõik konsortiumite "Ufa-Estoil-1" ja "Ufa-Estoil-2" mikroorganismid kuuluvad mesofiilsete heteroorganotroofsete bakterite hulka.

Se tähendab, et nad võivad kasutada toitumiseks erinevaid orgaanilisi aineid (naftakeemiast ja põlevkivist pärit süsivesinikke), nende optimaalne elutegevuse temperatuur on 20...35 °C ja vajalik pinnase niiskussisaldus on 60...70 %. Seega on parim aeg biorekultiveerimistööde jaoks suveperiood (kolm suvekuud). Kuid soodsate ilmastikutegurite korral võib kõrge intensiivsusega mikrobioloogilisi protsesse täheldada ka hiliskevadel (mais) ja varasügisel (septembris).

Loomulikult ei ole temperatuuri reguleerimine looduslikes tingimustes praktiliselt võimalik, seepärast on biorekultiveerimisprotsessid kõike efektiivsem läbi viia suhteliselt kõrge ööpäevakeskmise temperatuuriga suvekuudel. Pinnase niiskus ja mineraal- ning orgaaniliste elementidega varustamine erilisi raskusi ei valmista ja neid saab kergesti tagada agrotehniliste võtetega.

Külmade ilmade saabudes väheneb biokultiveerimisprotsesside efektiivsus. See on eelkõige seotud kõigi bakterite füsioloogiliste ja biokeemiliste ainevahetus[metabolism]-protsesside aeglustumisega. Praktiliselt lähevad nad üle "magavasse režiimi". Mõned bakterid surevad madala temperatuuri ja toitainete puuduse tõttu, teised säilitavad oma aktiivsuse madalal tasemel, lähevad üle intaktse (mitteaktiivsesse) vormi, jäädes seejuures eluvõimeliseks. Sel viisil võib tunduv osa bakterikooslusest saada ebasoodsatest keskkonnatingimustest jagu pika perioodi vältel (talvel), kevadel aga, soodsama ilma saabudes, aktiveerida järsult oma tegevust.

Erilise eluvõime poolest paistavad silma bakterid perekonnast *Bacillus*, kuna selle tüüpi bakterid moodustavad endospore, mis võivad säilitada oma elutegevuse pika ajavahemiku järel, isegi mitme tuhande aasta vältel. Mulla pinnakihi külmumisel suurem osa mikroorganisme, sh introdetseeritud, suudab säilitada oma elutegevuse.

Aeroobsete mikroorganismide elutegevuse jaoks piisav õhuhapnikuga küllastumine toimud sügavuseni 30...50 cm sõltuvalt pinnasetüübist, peale selle osutab õhuvahetusele mõju pinnasevee tase. Ei tasu unustada ka seda, et aborigeeni mikrofloora seas esineb sageli anaeroobseid ja fakultatiivseid anaeroobseid baktereid ja mikroseeni (-mütseete), mis suudavad lagundada eri klasside süsivesinikke ilma hapniku juurdepääsuta (näiteks sulfaati redutseerivad bakterid).

Mikroorganismide elutegevuse tagajärjel ei jää pinnasesse ja pinnasevette kahjulikke ja toksilisi ühendeid. Aja jooksul taastub pinnase mikrobioloogiline tasakaal koos mikroorganismide alanemise ja elimineerimisega bioloogilise rekultiveerimise hilisematel etappide

Kõike ülalmainitud kokku võttes võib teha järelduse, et külmal aastaajal (ja öökülmade korral) võib suurem osa mikroobkooslusest, sh konsortiumite "Ufa-Estoil-1" ja "Ufa-Estoil-2" mikroorganismid,

säilitada oma elutegevuse, kuid nende kvantitatiivne sisaldus sõltub pinnase koostisest ja aborigeense mikrofloora arvukusest.

6.1. Põlevkiviõliga, poolkoksiga ja kasutatud masinaõliga saastatud pinnaste biorekultiveerimise põhietapid

Põlevkiviõliga, poolkoksiga ja kasutatud masinaõliga saastatud pinnaste biorekultiveerimise põhietapid vastavalt VTA UKT-s välja töötatud metoodikale on järgmised:

- 1) Üldise saasteaste kindlakstegemine. Kui pinnase üldine saastatus põlevkiviõliga ületab 10%, siis on vaja seda täiendavalt segada värskes mullaga, et vähendada saasteaste kuni 10-15%. See suurendab tervendamise tõhusust ja vähendab ühtaegu ka kulutusi.
- 2) Agrotehniliste meetmete rakendamine – maa-ala ettevalmistamine, (saastatud mulla segamine värskesega), substraadi kobestamine ja kastmine.
- 3) Mineraalväetiste (lämmastik- ja fosforväetiste), orgaaniliste väetiste (aktiivmuda, biohuumus) ja kobestusaine (perliit, turvas, vermikuliit) mulda viimine ning esmajoones süsivesinike kergeid fraktsioone lagundavate mikroorganismidega biopreparaatide esimese annuse lisamine (30. päev).
- 4) Laias valikus keerulisi süsivesinikke lagundavate biopreparaatide viimine mulda ühtaegu mikroobikoosluse aktiveerimisega. Ka nüüd lisatakse pinnasele mineraalseid ja orgaanilisi elemente (60. päev).
- 5) Keeruliste süsivesinike utiliseerimisele suunatud mikroorganismide konsortsiumi uus muldaviimine (90. päev).
- 6) Fütoremediatsiooni etapp – näiteks sudaani sorgo kasutamisega –, kui biolagundatud on kuni 80-90% esialgu pinnases sisaldunud süsivesinikest.

Katsete kordamisel tööstuslikes mahtudes tuleb siiski meeles pidada, et enne välikatse kavandamist on vaja uurida pinnast ja agrokliimatilisi tingimusi. Allpool on loetletud tähtsamad väliskeskkonna tingimused, mis etendavad biotervendamise protsessis peamist rolli.

- 1) Pinnase happesus – nõrgalt happelisest kuni nõrgalt aluseliseni, pH 5,0-7,0.
- 2) Raskmetallide ionide kontsentratsioon – lubatud piirväärtuste piires.
- 3) Niiskus – suhteline niiskus tasemel ~ 60% (atmosfäärivee nappuse korral säilitatakse selline tase kunstliku niisutamise abil).

- 4) Õhutemperatuur – katse läbiviimiseks on sobivad suvekuud, mil õhk on kõige soojem, sest niisugused temperatuurid vastavad erinevatesse klassidesse kuuluvaud süsivesikuid lõhustavate mikroorganismide elutegevuseks optimaalsetele tingimustele.
- 5) Optimaalne õhurežiim tagatakse rekultiveeritava pinnase korrapärase mehaanilise kobestamisega – kobestada tuleb ligikaudu iga 2-3 nädala järel. Kõnealust võtet võib ühendada rekultiveeritava maa-ala kastmisega.
- 6) Töötlemise sügavus sõltub pinnase koostisest ja saasteaine sellesse tungimise sügavusest. Tööde alguses tehakse kindlaks põhilised saasteaine lasumise horisondid ja künatakse (kobestatakse) saadud andmete alusel pinnast vajaliku sügavuseni. Sealjuures tuleb silmas pidada, et kui on tagatud niiskuse piisav tase, surutakse osa süsivesinikke (kui hüdrofoobseid aineid) puhastatava mulla pinnale.
- 7) Soovitav biorekultiveerimise tehnoloogia on täielikult mittetoksiline ja konsortsiumi mikroorganismid ei ohusta vähimalgi määral inimest ega rekultiveeritavate paikade vahetus läheduses asuvate objektide ja alade floorat ja faunat.
- 8) Kõik kasutamiseks soovitatavate biotehnoloogiliste konsortsiumide mikroorganismid on mulla mikroobidega ühilduvad, sest kõik tüved on võetud mitmesugustest pinnaproovidest. Nad täielikult ühilduvad ka kohapealsete süsivesinikke oksüdeerivate mikroorganismidega ning lisaks sellele stimuleerib konsortsiumide Ufa-Estoil-1 ja Ufa-Estoil-2 koostisse kuuluv biopreparaat Batsispetsin kohapealsete mikroobide kasvu ja arengut.
- 9) Saaste lahjendamiseks vajalikud täiendavad värske mulla kogused toimetatakse vahetult katsepolügoonile sõltuvalt saasteaine kogusest ja selle lasumise sügavusest.

Tingimustes, kus jääkreostuskolded sisaldavad väga suurtes kontsentratsioonides saasteaineid, soovib VTA UKT võimalusel saastunud pinnaste lahjendamist. Selleks, et alandada süsivesinike reostuse taset bioloogiliseks lagundamiseks optimaalse tasemeni (näiteks 30 %-lt, mis on enamuse mikroorganismide jaoks kriitiline tase, 5...10 %-ni), kasutatakse puhta pinnase täiendavate mahtude lisamist. Pinnas on iseenesest orgaaniliste ja mineraalainete rikas substraat, mis sisaldab peale selle suurt hulka mitmesuguseid mikroorganisme, sh süsivesinikke hapendavaid.

Värske pinnase lisamine aitab saavutada järgmisi sihte:

- 1) Süsivesinike reostuse "lahjendamine" lagundavate mikroorganismide jaoks optimaalse tasemeni;
- 2) Rikkaliku toitekeskkonna loomine introditseeritud ja aborigeense mikrofloora arenguks, mis soodustab suurel määral süsivesinike lagundamisprotsessi intensiivistamist;
- 3) Biolagundavate mikroorganismide introditseerimise efekti pikendamine, kuna pinnase lisamisel alaneb biopreparaatidega töötlemise kordade arv ja järelikult ka majanduslikud kulud.

Täiendavate pinnasemahtude lisamise võimatuse korral, st vajadusel korraldada rekultiveerimine *in situ*, on vajalik mikrobioloogiliste preparaate sagedasem pinnasesse viimine, seejuures tekib samuti vajadus lisada füsioloogilisesse lahusesse bioaktivaatoreid (orgaanilisi ja mineraalaineid). Sel juhul kasvavad kulud rekultiveerimiseks 3...4 korda.

Sellega seoses on vaja uurida võimalust eemaldada süsivesinikega reostunud pinnas vahetult reostuskohast (näiteks raudteetammilt killustiku ja pinnase vahetamisel) ja luua pidevalt tegutsev tööstuslik seade reostunud pinnase rekultiveerimiseks.

6.2. Seire üldpõhimõtted

Seire puhul tuleb teha selgeks, mis eesmärgil seiret tehakse. Kas hinnatakse lühiajaliselt pinnase puhastustööde efektiivsust või on eesmärgiks reoainete võimaliku kandumise (reostustaseme muutuse) selgitamine põhjaveega pikema perioodi jooksul lähikonnas olevatesse veehaardetes või pinnavette.

Ex-situ puhastustööde efektiivsuse kontroll toimub väljakaevamistööde ajal reostunud pinnasekogumi piiridel võetavate pinnaseproovide määrangute järgi. Olenevalt määratavate ohtlike ainete tasemest otsustatakse, kas puhastustöödega on kogu reostunud pinnasekogus eemaldatud, või peab väljakaevatavat ala suurendama jõudmaks mittereostunud pinnaseni. Reostunud pinnase kõrvaldamise mõju põhjaveeseires avaldub aeglasemalt.

In-situ puhastustööde efektiivsuse kontroll toimub puhastatavalt alalt nii pinnase kui ka põhjavee proovide analüüside alusel. *In-situ* puhastustööde puuraukude võrgu kavandamisel määratakse eelnevate uuringutega reostunud kihi reostustase ja lasumissügavus. Reostustase pinnases ja põhjavees on ka taustainfoks puhastustööde efektiivsuse üle otsustamisel. Põhjavee proovide võtmine on puhastatavale alale rajatud seirepuuraukudest lihtsam, kuid analüüsitulemuste tõlgendamine ja vastavus tegelikule pinnase olukorrale on ilma kontrollpinnaseanalüüse tegemata keeruline. Ohtlike ainete sisalduse muutlikkus veeproovis sõltub paljudest asjaoludest (veetase, sademete hulk eelneval perioodil, temperatuurist, jm). Seetõttu tuleb lõpphinnangu tegemiseks võtta kontrollproovid ka pinnasest.

Jääkreostuskolde seire võimaldab saada teavet põhjaveega reostuskoldest levivate ohtlike ainete liikumise suuna, kiiruse ja sisalduse muutuse kohta ajas, nende ohtlikkuse kohta veehaardetele või pinnaveele. Selleks tuleb rajada puhastatava ala (reostunud pinnas ja põhjavesi) ümber seirevõrk, mis koosneb minimaalselt ühest seirepuuraugust reostuskoldest põhjaveevoolu suunas ülesvoolu ja minimaalselt kahest seirepuuraugust allavoolu. Seirevõrku võib kaasata vajadusel ka lähima veevarustuskaevu või vooluveekogu. Rohkem seirepunkte tagavad parema ülevaate reostuskolde mõjust.

Seire sagedus puhastustööde järgse hooldusperioodi ajal võiks olla neli kord aastas. Hilisemal perioodil üks kord viie aasta jooksul, kuid sel juhul ei piirduks see ühe juhusliku proovivõtu korraga vaid koosneks ühe aasta pikkusest neljast proovivõtuseeriast.

Praegu ongi jääkreostuse seire puhul puuduseks, et regulaarne seire puudub ja analüüside puudumise tõttu pole ülevaadet rajatud minimaalse seirevõrgu kasutamisevõimalustest reostuskolde ohtlikkuse hindamiseks. Sellest tulenevalt võib olla seirevõrk amortiseerunud (tehnilisi puudusi pole enam jooksvalt parandatud) ja uute maaomanike või arendajate poolt pikapeale üksikute seirepunktide kaupa likvideeritud; osaliselt on jääkreostusobjektid (ka sõjaväe objektid) üle võetud uute omanike poolt ja seirevõrgu järelevalve puudub (näiteks likvideeriti Moonaküla põhjaveereostuse üks seirepuurauk ja Tapa lennuväljal likvideeriti II ja IV pumpamisväljaku puurauke, s.h ka seirepuurauke).

7. Lõppkokkuvõte

Arenenud naftakeemia- ja naftatöötlemistööstusega piirkondades on üheks peamiseks keskkonnareostuste põhjuseks avariilised heitmed nafta ammutamisel ja teisaldamisel ning suurtes kogustes tahkete ja vedelate süsivesinikega saastatud jäätmete tekkimine nafta- ja naftakeemisaaduste tootmisel. Naftasaastatus põhjustab tõsiseid ja vahel koguni katastroofilisi häireid looduslike süsteemide toimimises. Nafta sattumine pinnasesse toob endaga kaasa selle omaduste kompleksse halvenemise – muutuvad nii agrofüüsikalised ja agrokeemilised kui ka bioloogilised näitajad. Naftaga saastatud pinnaste enesepuhastumine toimub äärmiselt aeglaselt ega ole üldjuhul täielik. Muldade ja pinnaste süsivesinikest puhastamise biotehnoloogilised viisid lubavad vähendada saastatud ökosüsteemide taastumiseks kuluvat aega olulisel määral. Üks kasutuses olevatest võtetest naftareostusega muldade ja pinnaste biotervendamiseks on laias valikus süsivesinikke utiliseerida suutvate mikroorganismide introductseerimine. Kõige perspektiivsemad on sellised tööstuslikud biopreparaadid, mis kujutavad endast mikroorganismide konsortsiume. Erinevat liiki mikroobide leidumine konsortsiumi koostises muudab võimalikuks kooperasiiooni võimaluste maksimaalse ära kasutamise, see aga lubab teostada rekultiveerimist lühikese ajaga ning saavutada muldade ja pinnaste kõrget puhtusastet. Nafta ja naftasaaduste sattumisel pinnasesse muutub süsiniku ja lämmastiku vahetegur (C:N) tunduvalt suurel määral süsiniku kasuks, ja see ongi üks peamisi saasteaine kõrvaldamist raskendavaid tegureid. Mitmetoimelise biotäiendamise põhimõtte rakendamine naftareostusest puhastamisel laseb sellest raskusest jagu saada. Naftat lagundavate preparaatide kasutamine biotervendamisel koos selliste preparaatidega, milles sisalduvad bakterid suudavad lämmastikku sidudes täiendada mulla lämmastikvarusid, mitte üksnes ei optimeeri spetsiaalsete süsivesinike oksüdeerivate mikroorganismide elutegevuseks vajalikke tingimusi, vaid lubab ka tänu mineraalväetiste annuse vähendamisele leevendada täiendavat koormust rikutud ökosüsteemile.

Biopreparaat Ufa-Estoil-1 kujutab endast süsivesinikke oksüdeerivate tüvede *Bacillus brevis* ja *Arthrobacter sp.*, lämmastikku siduva tüve *Azotobacter vinelandii* -4 ja tüve *Bacillus sp.* 739 loomuliku ühenduse, biopreparaati Ufa-Estoil-2 aga kuuluvad peale nimetatud tüvede ka mikroobid *Arthrobacter globiformis* IBRB-17S ja *Bacillus subtilis* IBRB 16.

Konsortsiumid omavad laiaulatuslikku oksüdeerimissuutlikkust nafta- ja aromaatsete süsivesinike ning parafiinide rea süsivesinike, nafta ja naftasaaduste suhtes. Biopreparaatide mikroorganismid on võimelised edukalt arenema ning utiliseerima naftat ja naftasaadusi substraadis nende üsna mitmesuguse kontsentratsiooni korral. Biopreparaatide rakke saab immobiliseerida tahkele kandjale, see aga suurendab nende kasutamiskõlblikkuse aega ning lihtsustab preparaadi vedamist ja kasutamist.

Kõnealuste konsortsiumide kasutamine mitte üksnes ei suurenda naftaga saastatud pinnaste puhastumise astet, vaid aitab ka kaasa mikroobikoosluse koostise ja funktsioonide taastumisele ning

vähendab olulisel määral pinnase fütotoksilisust, mis lubab edukalt läbi viia biorekultiveerimise lõppetappi ehk fütoremediatsiooni.

Mitmetoimelise biotäiendamise põhimõtte rakendamine (konsortsiumpreparaatide Ufa-Estoil-1 ja Ufa-Estoil-2 kasutamine) biotervendamise tehnoloogiate väljatöötamisel lubas laborikatses saavutada süsivesinike utiliseerimist põlevkiviõliga saastunud pinnases 57-65%, poolkoksiga segatud pinnases 41,5-44% ja kasutatud masinaõliga saastunud pinnases 67-71% ulatuses.

VTA UKT-s väljatöötatud konsortsiumite töökindluse ja efektiivsuse kindlakstegemiseks Eesti kliimaatilistes tingimustes tuleb käesoleva projekti teises etapis läbi viia välikatsed Vaivara Ohtlike Jäätmete Kogumiskeskuse väljakutel.

Vaivara Ohtlike Jäätmete Kogumiskeskuse kompostiväljakutele rajatakse reostunud pinnase puhastumisvõimaluste uurimiseks kokku 12 katseala. Teostatakse bioremedatsiooniuuringud paralleelselt kompostimise ning loodusliku oleku lähedaseks tihendatud reostunud pinnase (*in situ*) tulemuste võrreldavuseks. Tööde käigus seiratakse jätkuvalt ohtlike ainete sisalduse, toksilisuse ning bioakumulatsiooni muutust töötlemisprotsessi jooksul. Lisas 3 on esitatud kavandatavate katsete plaan ja eelarve.

8. Kasutatud kirjandus

1. Käär, A., „Eesti reostunud alade koondkataloog. Inventariseeritud endiste NL sõjaväeobjektide pinnasesaaste“. AS Maves, 1995
2. Käär, A., „Eesti reostunud alade koondkataloog ja kaart. Tsviilobjektid“. AS Maves, 1995
3. Tamm, I., „Eesti jääkreostuskollete andmebaasi täiendamine ja investeringute plaan“. AS Maves, 2002
4. Salu, M., „Ohtlike jääkreostuskollete järelvalve ja kontroll“. AS Maves, 2002
5. „Tehnilise abi projekt jääkreostusobjektide likvideerimiseks endistel militaar- ja industriaalaladel. Teostatavus uuring“, Sweco International AB, 2005-2007),
6. Metsur, M., „Põlevkivi poolkoksi kuivladestamine ja poolkoksist täiteaine valmistamine. Keskkonnamõju hindamine“. AS Maves, 2002;
7. Tang, H., jt „Poolkoksi keskkonnaohtlikkuse määramine“, EKUK 2003;
8. Arro, Ü., Prikk, A., Pihu, T., Calculation of composition of Estonian oil shale and its combustion products on the basis of heating value. Fuel 82, 18 (2003), 2179-2195
9. Lille, Ü., Current knowledge on the origin and structure of Estonian kukersite kerogen, Oil Shale 20, 3 (2003), 253-263
10. <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C08/E3-04-04-05.pdf>
11. Kahru, A., Maloverjan, A., Sillak, H., Põllumaa, L., The Toxicity and Fate of Phenolic Pollutants in the Contaminated Soils Associated With the Oil-Shale Industry. Environmental Science and Pollution Research International (Special Issue), 1 (2002), 27-33
12. Saether O.M., Banks D., Kirso U., Bityukova L., Sorlie J.E.. The chemistry and Mineralogy of Waste from Retorting and Combustion of Oil Shale. Energy, Waste and the Environment: A Geochemical Perspective, 263-284
13. Kahru A., Põllumaa L.. Environmental Hazard of the Waste Streams of Estonian Oil Shale Industry: an Ecotoxicological Review. Oil Shale 23, 1 (2006), 53-93
14. Liitmaa, M. 2012. Vanaõli ja PCB sisaldus kütteõlis. EKUK. Aruanne
15. „...“ .1980. 6. .21-25
16. „...“ () // „...“ . 2000.
12. .1509-1514.
17. „...“ // „...“ : „...“ ,2001. .82-83.
18. „...“ // „...“ . 2001.
8. „...“ . 2001 . 12.
19. „...“ // „...“ . 2001 . 12. .1515-1519.
20. „...“ // „...“ .1995. 2. .211-216.
21. „...“ : „...“ ,2003. 266
22. „...“ .2004. 24 .
23. „...“ // „...“ : . V
24. „...“ ,12-15 .1987 .: „...“ ,1989. .52-62
25. „...“ // „...“ / „...“ , : „...“ ,2002. .359-373.
25. „...“ // „...“ ; „...“ „...“ . „...“ - „...“ » (14-18 .2002 ., „...“). „...“ ,2002. .299.

51. Benka-Coker M.O., Ekandayo J.A. Applicability of evaluating the ability of microbes isolated from an oil spill site to degrade oil // *Environ. Monit. and Asses.* 1997. Vol. 45, N 3. P. 259-272.
52. . . . , 1983. 248 .
53. //
54. . 1995. . 31, 5. . 534-539.
54. // » (10-14 .
- 2003 ., .) ., 2003. . 2. . 27.
55. . . . - // .
- . « : » , 17-19 . 2004. . . 53-
- 54.
56. . . // . « - » (14-18 . 2002 ., .) ., 2002. . 475.
57. . . . // » (10-14 . 2003 ., .) ., 2003. . 2. . 34.
58. Llanos C., Kjoller A. Changes in the flora of soil fungi following oil waste application // *Oikos.* 1976. 27. P. 377-382.
59. . . . , 1980. 340 .
60. . . . // . 1996. 7. . 44-48.
61. . . . // : , 2001. . 60-61.
62. . . . // . 2001. . 37, 2. . 175-180.
63. Krigswoll S., Senk J., Storr J. Microbial emulsification of crude oil // 5th Europ. Congr. Biotechnol. Copenhagen, 8-13 July. 1990: Proc. Voll. Copenhagen. 1990. P. 221-224.
64. Weir S.C., Dupuis S.P., Providenti M.A. et al. Nutrientenhanced survival of and phenanthrene mineralization by alginate-encapsulated and free *Pseudomonas sp.* UG14Lr cells in creosote-contaminated soil slurries // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 1995. Vol. 43. 5. P. 946-951.
65. Burd G., Ward O.P. Bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons on agar plates: The role of biosurfactants // *Biotechnol. Techn.* 1996. Vol. 10, N5. P. 371-374.
66. . . . // . 1994. . 56. 1. . 90-91.
67. Sugiura K., Ishihara M., Shimauchi T., Harayama S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil // *Environ. Sci. and Technol.* 1997. Vol. 31. 1. P. 45-51.
68. Bertrand J.C., Rambeloarisoa E.H., Rontani J.F. et al. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture // *Ibid.* 1983. Vol. 5, N 8. P. 567-572.
69. , 1985. 292 .
70. Walker J.D. Chemical fate of toxic substances: Biodegradation of petroleum // *Mar. Technol. Soc. J.* 1985. Vol. 18. 13. P. 73-86.
71. . . . // . 1980. . 49, 1. . 25-30.

72. Leatherm W., Kinner R., Maurer D. Microbial degradation of petroleum at low temperature // Mar. Pollut. Bull. 1973. Vol. 4. 8. P. 125-129.
73. « » (14-18 . 2002 ., .). ., 2002. . 262.
74. Gudín C., Syrratt W.J. Biological aspects of land rehabilitation following hydrocarbon contamination // Environ. Pollut. 1975. Vol. 8. P. 107-112.
75. « » (10-14 . 2003 ., .), 2003. . 2. . 21.
76. // IV (6-7 . 2006 ., .). .: , 2006. . 93-94.
77. Atlas R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective // Microbiol. Rev. 1984. Vol. 45. P. 180-209.
78. Zeyer J., Eicher P., Dolfing J., Shwarzendach P.R. Anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons: Biotechnology and Biodegradation. Houston: Gulf Publ. 1990. P. 33-40.
79. Finkelstein Z.L., Baskunov B.P., Pukalchuk I.E., Golovleva L.A. Microbial degradation of lignosulfonates // VTT Symp. 1985. Vol. 60. P. 25-34.
80. , 1983. 16 .
81. « » // . 1998. 1. . 79-84.
82. // . 1991. . 60, 4. . 741-745.
83. Margesin R., Schinner F. Bioremediation on of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. Vol. 47. P. 462-468.
84. // . 1999. 2(5). . 14-18.
85. Mohn W.W., Radziminski C.Z., Fortin M.C., Reimer K.J. On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soil in inoculated biopiles // Appl. Microbiol. and Biotechnol. 2001. Vol. 57. P. 242-247.
86. Smith A.D. Stimulation of Oil Biodegradation by Using Slow-release Fertilizers // Biochem. Soc. Trans. 1985. Vol. 13. 2. P. 523-525.
87. Fusey P., Lampin M.F., Oudot J. Recherches sur Teliminations des hydrocarbures par voic biologique // Mater. and Org. 1989. Vol. 10. 2. P. 109-147.
88. // . - . 1980. 4. . 53-54.
89. // .: , 1977. . 204-212.
90. Watanable I., Cholitulkul W. Nitrogen fixation an acid sulfate paddy soil // Intern. Symp. Distrib: Characteristics and Util Problem Soil Proc. Symp. Trop. Agr. Res. Tsukuba, 1982. P. 114-118.
91. Van den Berg R., Verhaul J.H., Eikelboom D.H. In situ biorestration of an oil contaminated subail // Water Sci. and Technol. 1988. Vol. 20. 3. P. 255-256.
92. Atlas R.M., Bartha R. Abundance, distribution and oil degradation potential of microorganisms in Raritan Bay // Environ. Pollut. 1973. N 4. P. 291-300.
93. Mitchell W.W., Lounachan T.E., Mikendrick J.D. Effects of tillage and fertilization on persistence of crude oil contamination in an Alaskan soil // Environ. Quaet. 1979. Vol. 8. P. 525-532.
94. // .: , 2001. . 73-74.
95. Sveum P., Faksness L.-G. Enhaneed biological degradation of crude oil in a Spitsbergen tundra site // Proc. XVI Arct. and Mar. Oilspill Programm Techn. Semin., Calgary, June 7-9, 1993. Vol. 1. P. 377-391.

96. // . 2005. 1. . 42-50.
97. // . 2002. 10. . 1259-1273.
98. // . 1997. . 66, 2. . 269-272.
99. //
100. , 2007. . 2 . 220-224.
101. // . 1997. . 33, 4. . 423-427.
102. // 70- « . » , 3-4 . 1996 . , 1996. . 107-108.
103. // 2007. . 75. . 258-262.
103. Ivanov V.N., Kachur T.L., Dulgerov A.N., Saljuk A.J. Degradation of the oil hydrocarbons by thermophilic denitrifying bacteria // *Microbiol. Chem. Technol. Food Ind.* 1995. . 57. 2. . 85-94.
104. Beadle C.A., Smith A.R.W. The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of *Acinetobacter* species // *Eur. J. Biochem.* 1982. Vol. 123. P. 323-332.
105. Madsen T., Licht D. Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium // *Appl. and Environ. Microbiol.* 1992. Vol. 58. 9. P. 2874-2878.
106. Apajalahti J.H.A., Salkinoja-Salonen M.S. Degradation of chlorophenols by *Rhodococcus chlorophenolicus* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986. 25. P. 62-67.
107. van de Pas B.A., Smidt H., Hagen W.R., van der Oost J., Schraa G., Stams A.J.M., de Vos W.M. Purification and molecular characterization of ortho-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans* // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. 29. P. 20287-20292.
108. Puhakka J.A., Herwig R.P., Koro P.M., Wolfe G.V., Ferguson J.F. Biodegradation of chlorophenols by mixed and pure cultures from a fluidized-bed reactor // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. Vol. 42. 6. P. 951-957.
109. Resnick S.M., Chapman P.J. Physiological properties and substrate specificity of a pentachlorophenol-degrading *Pseudomonas* species // *Biodegradation.* 1994. Vol. 5. 1. P. 47-54.
110. Karns J.S., Duttgupta S., Chakrabarty A.M. Metabolism of Halophenols by 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-degrading *Pseudomonas cepacia* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. Vol. 46. 5. P. 1176-1181.
111. Tomasi I., Artaud I., Bertheau Y., Mansuy D. Metabolism of polychlorinated phenols by *Pseudomonas cepacia* AC 1100: determination of the first two steps and specific inhibitory effect of methimazole // *J. Bacteriol.* 1995. Vol. 177. 2. P. 307-311.
112. Shailubhai K., Sahasrabude S.R., Vora K.A., Modi V.V. Degradation of chlorinated derivatives of phenoxyacetic acid by *Aspergillus niger* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1983. Vol. 18. P. 279-282.
113. Krug M., Ziegler H., Straube G. Degradation of phenolic compounds by the yeast *Candida tropicalis* HP15 // *J. Basic Microbiol.* 1985. Vol. 25. 2. P. 103-110.
114. Ghosal D., You I.S., Chakrabarty A.M. Microbiol degradation of halogenated compounds // *Science.* 1985. Vol. 228. 4696. P. 135-228.
115. Ghosal D., You I.S., Chatterjee D.K., Chakrabarty A.M. Plasmids in the degradation of chlorinated aromatic compounds // *New York Plenum Press.* 1985. P. 667-686.
116. // . 1990. 9. . 148-151.

117. //
118. , 17-19 1994 , 1994. . 14-15.
119. « . . . » // . 1998. .
34, 3. . 281-286.
120. « . . . » // . 1998. .
I . . . « . . . » -
(14-18 . 2002). , 2002. . 474.
121. // , 1996. . 174-175.
28-31 1996 III
122. // 1997. . 33, 5. . 497-502.
123. // 1997. . 4/5. . 21-23.
124. // 1994. . 2. . 16-18.
125. « . . . » // II
« . . . » (10-14 . 2003).
2003. . 2. . 40.
126. // 1995. . 2. . 3/4. . 69-70.
127. 1988. . 24, 2. . 203-207. //
128. « . . . » 21-23 1996 . .
. , 1996. 20 .
129. // I « . . . » -
» (14-18 . 2002). , 2002. . 292.
130. // II
« . . . » (10-14 . 2003).
2003. . 2. . 74.
131. // XXI , 2001. . 455-457.
132. // I « . . . » -
(14-18 . 2002). , 2002. . 299.
133. // II « . . . » :
» (10-14 . 2003). , 2003. . 2. . 36.
- (14-18 . 2002). , 2002. . 296.

134.
 , // II
 « : » (10-14 . 2003 ., .). .,
 2003. .2. .67.
135.
 // II « -2000» (. 2000 ., .):
 , 2000. .3. .105-107.
136.
 : . - .
137.
 « », 2000. 99 .
138.
 // (29-30 2000 ., .): . . , 2000. .344-346.
139.
 // . 2002. 4. .481-486.
140.
 « » // XV (7-10 .
 2002 ., .). : . - . « », 2002. .1 .178-179.
141.
 « » // . . . 2003. 10, 4. .76-77.
142.
 // . . 2004 . 5. .7-8.
143.
 - Azotobacter
 // - . . 2004 . 5. .104-108.
144.
 // . . - . 2007. .75. .34-
 36.
145.
146. « » // . . . 2005. .12, 3. .123-126.

 , //
147. . 2006. 5. .57-62.
 //
148. - . 2007. 2. .2-3.
 « » // . . . 2008. 3. .14-15.
149.
 // , 17-19 1994 .: . . . , 1994. .53.

Lisa 1. Vana poolkoski analüüsitulemused

Näitaja	Katsemeetod	Tulemus	Ühik
Kuivaine 105 °C	EVS-EN 12880	76,2	%
Orgaaniline aine	EVS-EN 12879	23,4	%
Naftasaadused (süsivesinikud C ₁₀ - C ₄₀)	ISO 16703	610	mg/kg
1-aluselised fenoolid	STJ nr. U12	< 0,1	mg/kg
2-aluselised fenoolid	STJ nr. U12	< 0,5	mg/kg
Polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike summa (16 PAH-i)	ISO 18287	53,3	mg/kg
Elavhõbe (Hg)	STJnr.M/U84-2	0,01	mg/kg
Kaadmium (Cd)	STJnr.M/U91	1,15	mg/kg
Kaalium (K)	STJnr.M/U85	5540	mg/kg
Kroom (Cr)	STJnr.M/U91	14,2	mg/kg
Nikkel (Ni)	STJnr.M/U91	13,5	mg/kg
Plii (Pb)	STJnr.M/U91	28,5	mg/kg
Tsink (Zn)	STJnr.M/U91	12,5	mg/kg
Vask (Cu)	STJnr.M/U91	14,1	mg/kg
PCB summa (18 ühendit)	STJ nr.U63*	9,7	µg/kg
CB-28	STJ nr.U63	< 0,7	µg/kg
CB-52	STJ nr.U63	1,9	µg/kg
CB-101	STJ nr.U63	1,4	µg/kg
CB-105	STJ nr.U63*	< 0,6	µg/kg
CB-167	STJ nr.U63*	< 0,9	µg/kg
CB-169	STJ nr.U63	< 1,3	µg/kg
CB-118	STJ nr.U63	0,7	µg/kg
CB-77	STJ nr.U63*	1,32	µg/kg
CB-123	STJ nr.U63*	< 0,7	µg/kg
CB-114	STJ nr.U63*	0,5	µg/kg
CB-126	STJ nr.U63*	< 0,7	µg/kg
CB-81	STJ nr.U63*	< 0,9	µg/kg
CB-138	STJ nr.U63	< 1	µg/kg
CB-156	STJ nr.U63*	< 0,7	µg/kg
CB-157	STJ nr.U63*	< 0,7	µg/kg
CB-153	STJ nr.U63	0,9	µg/kg
CB-180	STJ nr.U63	< 0,8	µg/kg
CB-189	STJ nr.U63	3,0	µg/kg
pH	ISO 10390	8,9	
Üldlämmastik (N _{üld}) Kjeldahl	ISO 11261	< 1000	mg/kg
Üldfosfor (P _{üld})	STJnrV26B	380	mg/kg
Üldorgaaniline süsinik (TOC)	EVS-EN 13137	170000	mgC/kg

Lisa 2. Eesti Keskkonnauringute Keskus OÜ-s kasutusel olnud meetodikad vana poolkoki analüüsimiseks.

Analüüs	Tööjuhendi nimi	Rahvusvaheline standard	Erinevus standardist
1-aluseliste ja 2-aluseliste fenoolide määramine	STJnr.U12 Fenoolsete ühendite määramine: Vedelikkromatograafiline meetod	Standard puudub.	Fenoolide määramiseks ei ole olemas rahvusvahelist standardit, sest tänu põlevkivitööstusele on fenoolid pinnases Eesti-spetsiifiline probleem. Meetod on sama, mis artiklis Anal. Chem. Vol. 51. 7. June 1979. p. 1039-1045
Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	STJnr.M/U91 Vee, muda ja sette metallisisalduste määramine induktiivsistestunud plasma aatomemissioonspektromeetriga	EVS-EN ISO 11885 Water quality - Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES).	Keskmiastatud proovid mineraliseeritakse lämmastikhappega mikrolaine-mineralisaatoris temperatuuri 200 °C ja rõhul 600 psi. Saadud filtraati analüüsitakse induktiivsistestunud plasma aatomemissioonspektromeetriga (ICP/OES) Analüüsimeetod põhineb aatomite emissioonkiirguse mõõtmisel optilise spektromeetri abil. Proov pihustatakse ja saadud aerosool viiakse plasmasse, kus toimub aatomite ergastamine. Elementidele iseloomulikud aatomemissioonspektrid saadakse raadiosagedusliku induktiivsistestunud plasma abil. Kõrvalaine kiirgus eemaldatakse monokromaatori abil ja kiirguse intensiivsust mõõdetakse detektori abil. Signaale töödeldakse ja jälgitakse kompuutri abil.
Hg	STJnr.M/U84-2 Elavhõbeda sisalduse määramine AAS-külmaurumeetodiga.	Rahvusvahelist standardit pole,	EKUKis teostatakse analüüsid seadmega kaasas olnud juhendi järgi, seadme tootja poolt koostatud
Kuivaine 105 °C	STJnr.V8 Kuivaine sisalduse määramine gravimeetriselt.	SFS 3008 Determination of total residue and total fixed residue in water, sludge and sediment.	Ei
Naftasaadused (süsivesinikud C ₁₀ -C ₄₀)// pinnas	STJnr.U62A Naftaproduktide määramine pinnases, gaasikromatograafiline meetod.	ISO 16703 Soil quality – Determination of content of hydrocarbon in the range C10 to C40 by gas chromatography.	Ei -Meetod kirjeldab gaasikromatograafilist meetodit, mille abil analüüsitakse kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt pinnast saastavaid naftasaadusi. Naftasaaduste all mõistetakse üldisemalt mittepolaarseid süsivesinikke, mis kuuluvad toorõli (nafta) ja sellest saadud produktide - bensiini, petrooleumi, diiselkütuse, kerge kütteõli ja raske kütteõli ning määrdeõli koostisesse. Antud meetod võimaldab analüüsida ka kütustena kasutatavate põlevkiviõli fraktsioonide poolt põhjustatud saastet. Saasteprodukte on võimalik ekstraheerida süsivesinike või nende segude abil, mille keemisiirid on vahemikus 36-69 °C ja mis ei adsorbeeru fluorisili pinnale ja on kromatograafiliselt analüüsitavad kasutades mittepolaarset kapillaarkolonni. Retentsiooniajad kromatografeerimisel on n-dekaani (C ₁₀ H ₂₂) ja n-tetrakontaani (C ₄₀ H ₈₂) vahel. proov ekstraheeritakse n-heksaaniga. Saadud ekstrakt puhastatakse adsorptsioonikolonnis ja

Analüüs	Tööjuhendi nimi	Rahvusvaheline standard	Erinevus standardist
			analüüsitakse gaasikromatograafiliselt. Naftasaaduste sisaldus arvutatakse viiepunktilise kalibreerimisega välisstandardi alusel. Kromatogrammil identifitseeritakse n-alkaanid arvuti mällu salvestatud individuaalühendite retentsiooniaegade põhjal. n-Alkaanide keemispriiride järgi tehakse kindlaks reostuse põhjustanud naftasaaduse keemispriid. Gaasikromatograafiline analüüsimeetod ei ole spetsiifiline ainult naftasaadustele. Proovidest ekstraheerub kaasa erinevaid keemilisi ühendeid, mis võivad analüüsi segada, seega on naftasaaduste eraldamiseks vajalik proovi puhastamine adsorptsioonikolonnis, mis peab kinni polaarsed ühendid ja laseb läbi mittepolaarsed süsivesinikud.
Üldlämmastik (N _{üld}) Kjeldahl // tahke Kj	STJnr.V49 Üldlämmastiku sisalduse määramine pinnasest (Kjeldahli modif.).	ISO 11261 Soil quality – Determination of total nitrogen – Modified Kjeldahl method.	Ei
Polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike summa (16 PAH-i) //pinnases	STJnr.U65 Polütsükliiliste aromaatsete süsivesinike määramine pinnases GC MS - ga.	ISO 18287 Soil quality – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – Gas chromatographic method with mass spectrometric detection (GC-MS)	Ei - Keskmistatud proovidest määrati PAH sisaldus kromatomass-spektromeetrilise (GC/MS) meetodiga järgides rahvusvahelist standardit ISO 18287. Standardi järgi määratakse kvantitatiivselt 16 polüaromaatset ühendit, mis kuuluvad EPA (Environmental Protection Agency, Ameerika Ühendriigid) prioriteetsete ühendite nimekirja. Nimekirja kuuluvad järgmised PAH ühendid: naftaleen, atsenaftüleen, atsenafteen, fluoreen, fenantreen, antratseen, fluoranteen, püreen, krüseen, benso(a)antratseen, benso(k)fluoranteen, benso(b)fluoranteen, benso(a)püreen, indeno(1,2,3-ed)püreen, dibenso(a,h)antratseen ja benso(g,h,i)perüleen. Meetodiga saab määrata nii PAH-ide üksikkomponentide sisaldust kui ka 16 PAH-i summaarselt. Proov kuivatatakse toatemperatuuril, ekstrheeritakse atsetooni ja n-heksaaniga ultrahelivannis. Ekstrakt aurutatakse kokku rotatsioonaurustiga ja puhastatakse silikageelikolonnis, kontsentreeritakse uuesti ja analüüsitakse kromato-massispektromeetriliselt. PAH ühendid identifitseeritakse massiarvude alusel SIM meetodil.
Üldfosfor (P _{üld}) // pinnas	STJnrV26B Üldfosfori määramine pinnasest fotomeetriliselt.	EVS-EN ISO 6878 Water quality - Determination of phosphorus - Ammonium molybdate spectrometric methodsec 7 This International Standard specifies methods for the determination of total phosphorus after decomposition	Standard on vee proovidele ning ei sisalda proovide eeltötlust (mikrolainemineralisaator)

Analüüs	Tööjuhendi nimi	Rahvusvaheline standard	Erinevus standardist
Kaalium (K) // tahke Aleek	STJnr.M/U85 Naatriumi ja kaaliumi määramine veest leek-emissioon spektromeetriliselt	ISO 9964-3	Ei
Orgaaniline aine	STJnr.V8 Orgaaniline aine	SFS 3008 Determination of total residue and total fixed residue in water, sludge and sediment.	Ei
pH // pinnas	STJnr.V72 pH mõõtmine pinnasest ja setetest	ISO 10390 Soil quality – Determination of pH.	Ei
PCB summa (18 ühendit) // pinnas, setted	STJ nr.U63 Mõningate kloororgaaniliste pestitsiidide/ PCB määramine vees ja pinnases. Gaasikromatograafiline meetod	Standard puudub	Pinnaseproovilt kallutatakse ära vaba vesi, eemaldatakse võõrkehad (oksad, lehed, kivitükid jne). Proov kas kuivatatakse 60 °C juures termostaadis või lisatakse 30 g niiske pinnaseproovi kohta 30 g veevaba Na ₂ SO ₄ ja segatakse uhmis kuni proov enam ei kleepu ja on homogeenne. Pinnaseproovile lisatakse sisestandard (4000 pg CB 53, 189 ja/või 209) ja ekstraheeritakse n-heksaani ja atsetooni seguga 1:1 ultrahelivannis 1,5 h või Sotex aparaadis ligikaudu 12 tundi. Kui on tegemist suure orgaanilise aine sisaldusega proovidega või proovidega, mis sisaldavad tahmaosakesi, ekstraheeritakse proov tolupeeniga. Edasi vastavalt standardile.

Lisa 3. Välikatsete plaan

Projekti käigus läbiviidud laboratoorsete katsete tulemusena on võimalik eeldada, et Eesti jääkreostusobjektide puhastamiseks on testitud konsortsiumid sobilikud. Paraku ei piisa välitingimustes töötamiseks ainult laboratoorsetest katsetest ning seetõttu oleks väljapakutud meetodikat kindlasti vaja välitingimustes testida.

Projekti planeerimise ajal nähti laboratoorsete ja välikatsete läbiviimist kui seotud tervikut. Paraku ei õnnestunud rahastust saada kõigile plaanitud tegevustele. Käesolevas lisas on esitatud välikatsete plaan koos eeldatava eelarvega eeldusel, et projekti jätkufaasile õnnestub rahastust leida.

REKULTIVISEERIMISPROTSESSI TEHNOLOOGIA

Vastavalt Vene Föderatsiooni patendile nr. 2232806 kasutatakse tehnoloogias biopreparaati "Ufa-Estoil" (vastavuses tehniliste tingimustega 9291-020-22657427-2004), mis sisaldab aeroobseid naftat lagundavaid mikroorganisme. Reostatud pinnase väikese paksuse (kuni 30 cm) korral ja kobestamisega hapnikurežiimi tagades ning mineraalelemente lisades võib pakutav biopreparaat VTA UTK andmetel suveperioodil utiliseerida täielikult pinnases olevad nafta süsivesinikud nende kuni 10 % sisalduse korral ja 80-87 % ulatuses sisalduse korral 10 kuni 30 %. Naftaproduktide üle 30 % sisalduse korral on vaja alandada nende sisaldust reostatud pinnase segamise teel puhta pinnase, õlgede, saepuruga ja/või puulaastudega.

Kõige tõhusam biopreparaadi pinnasesse viimise moodus on mineraalsete lisanditega suspensioonina. Peale selle kasutatakse ühe töösuspensioone osisena biolisandit, mis sisaldab bioaktiivseid aineid, mis hoogustavad naftat lagundavate mikroorganismide elutegevust.

Preparaat viiakse naftaga reostunud pinnasesse 1...4 korda hooaja jooksul (sõltuvalt reostuse tasemest ja vegetatsiooniperioodi pikkusest) koos pinnasetöötusega (kündmine, kobestamine, randaalimine) vihmutamisega mistahes selleks määratud agregadi abil. Pinnasesse viimise perioodilisus on 30 päeva. Preparaati võib pinnasesse viia positiivsete ööpäeva keskmiste temperatuuride (+3° kuni + 40°) juures.

Biopreparaadi "Ufa-Estoil" iseloomustus

Biopreparaadi "Ufa-Estoil" põhineb naftat lagundavate mikroorganismide *Bacillus brevis* ja *Arthrobacter species* looduslikul kooslusel. Preparaadil on kõrge süsivesinikke oksüdeeriv aktiivsus, ta suudab kohaneda kõrge süsivesinike sisaldusega ja utiliseerida tõhusalt eri mullatüüpide substraati.

EKSPERIMENDI KIRJELDUS

Käesolevasse eksperimenti on lülitatud kolm süsivesinikreostuse liiki koos eeldatava töökonsentratsiooniga.

1. Kasutatud mootoriõli (6-8 %)

2. Poolkoks (10-12 %)
3. Põlevkiviõli (5-6 %)

Eri süsivesiniku klasside utiliseerimise protsesside intensiivistamiseks ja konsortsiumi "Ufa-Estoil" mikroorganismide bioloogiliseks aktiveerimiseks nähakse ette järgmiste agrotehniliste võtete kasutamist: pinnase kobestamine ja kastmine (vihmutamine), vajaduse korral on võimalik mineraalsete (N-P-K kompleks) ja orgaaniliste (sõnnik) väetiste kasutamine ning samuti fosfokipsi kasutamine pinnase liigsoolsuse neutraliseerimiseks.

Iga reostusliigi kohta teostatakse neli paralleelset katset.

1. Kontroll
2. Kontroll koos väetiste lisamisega
3. Biopreparaadi pinnasesse viimine ilma agrotehniliste võteteta
4. Biopreparaadi pinnasesse viimine koos agrotehniliste võtetega

Biopreparaat "Ufa-Estoil" viiakse pinnasesse koos mineraalsete lisanditega kolm korda hooaja jooksul

Ekspereimendit teostatakse kaheteistkümnes erinevas katsevariandis. Igas variandis kasutatakse ca 5 kuupmeetrit pinnasesegu. Iga katseplats kujutab endast 8,3 m² pindalaga ala, rekultiveeritava pinnase paksus on 0,6 m.

N-P-K väetiste hulk (arvestuses 200 kg/ha) on ühekordsel lisamisel 0,12 kg platsi kohta või 1,08 kg kuuele platsile. Kogu eksperimendi jaoks kulub 3 kg väetist (kolme korra jaoks). Sõnnikut soovitatakse lisada üks kord, 10 % ulatuses kogu pinnase hulgast, s.t. 500 kg.

Ekspereimendi (eeldatav) ajakava:

20.05. – eksperimendi algus – preparaate pinnasesse viimine (nullpunkt)

20.06. – esimene kontrollpunkt

20.07. – teine kontrollpunkt

20.08. – kolmas kontrollpunkt – eksperimendi lõpp

Eksperimendi skeem

Kontroll nr. 1 Mootoriõli + pinnas	Kontroll nr. 2 Poolkoks + pinnas	Kontroll nr. 3 Põlevkiviõli + pinnas
Kontroll nr. 1 Mootoriõli + pinnas + väetised	Kontroll nr. 2 Poolkoks + pinnas + väetised	Kontroll nr. 3 Põlevkiviõli + pinnas + väetised
Katse nr. 1 Mootoriõli + pinnas + "Ufa-Estoil" + väetised	Katse nr. 2 Poolkoks + pinnas + "Ufa-Estoil" + väetised	Katse nr. 3 Põlevkiviõli + pinnas + "Ufa-Estoil" + väetised
Katse nr. 1 Mootoriõli + pinnas + "Ufa-Estoil" + väetised + agrotehnika	Katse nr. 2 Poolkoks + pinnas + "Ufa-Estoil" + väetised + agrotehnika	Katse nr. 3 Põlevkiviõli + pinnas + "Ufa-Estoil" + väetised + agrotehnika

Kuivpreparaadist suspensiooni valmistamine

5,0 kg kuivpreparaati ja 0,5 kg mineraalset granulaati (näiteks N-P-K väetist TY 2186-181-00209438-01, mark 15:15:15) lahustatakse 100 l tehnoloogilises vees. Suspensioon segatakse hoolikalt läbi. Preparaadis olevate mikroorganismide normaalseks elutegevuseks vajaliku (toitainete) defitsiidita toite tagamiseks lisatakse suspensiooni 1 l diiselkütust. Preparaati lastakse seista perioodiliselt segades 24 tundi 20-25° C.

Ühe hektari ühekordseks töötlemiseks on vaja 20 kg biopreparaati "Ufa-Estoil", mis segatakse 4 000 liitri veega.

Ühe platsi (8,3 m²) ühekordseks töötlemiseks on vaja 0,0166 kg biopreparaati "Ufa-Estoil" + 0,0166 kg kompleksväetist + 0,03 l diiselkütust, mis segatakse 3,3 liitri veega.

Sel moel on kuue platsi jaoks vaja valmistada 0,1 kg preparaati + 0,1 kg väetist + 0,02 kg diislikütust 20 l vees.

Mineraalväetiste sisseviimise arvestus

Naftasaaduste bioloogilise lagundamise protsessi kiirendamiseks pinnases on vaja biopreparaadi koostisesse kuuluvate mikroorganismide mineraalne lisatoitmine. Naftareostuse keskmise taseme (kuni 15 %) juures on vajalik viia pinnasesse mineraalväetiseid arvestusega 30 kg toimeainet 1 ha töödeldava pinnase kohta. Tavaliselt kasutatakse N-P-K kompleksväetisi (15:15:15). Ühe hektari töötlemiseks on vaja 200 kg kompleksväetisi (võib kasutada ka muid väetisi, kuid sel juhul arvestatakse pinnasesse viidavate elementide (N, P, K) hulk eraldi iga elemendi minimaalse koguse järgi). Vajaduse korral on nafta konglomeraatide lõhkumiseks ja pinnase struktuuri parandamiseks soovitatav viia pinnasesse ja sinna sisse künda õle eelmise aasta ülejäägid, silo, sõnnik, turvas (mida saada on).

Agrotehnilised võtted

1. Kobestamine – 4-8 korda kuus (sõltuvalt pinnase niiskusest).
2. Vihmutamine (kastmine) – 3-10 korda kuus (sõltuvalt pinnase niiskusest).
3. Pinnase niiskus peab olema 60-70 % küllastustasemest (kontrollitakse pinnasesse surutava pinnaseniiskuse määramise aparaadiga).

PROTSESSI ANALÜÜS JA KONTROLL

1. Biolagundamise protsessi kontroll toimub pinnaseproovide analüüsiga järgmiste näitajate põhjal:
 - Keemiline analüüs. Pinnase keemilised analüüsid teostatakse EKUKi laboris. Analüüsitakse järgnevaid näitajaid: Hg, Cr, Cd, Cu, Zn, Ni, Pb, pH, N, P, K, TOC, fenoolid, PAH, KA, orgaaniline aine, naftaproduktid, PCB
 - heterotroofsete mikroorganismide üldhulk (VTA UTK)
 - süsivesinikke lagundavate mikroorganismide üldhulk (VTA UTK)
2. Proovide võtmine toimub enne järjekordset biopreparaadi suspensiooni ja mineraalainete pinnasesse viimist.
 - Proovivõtt toimub pinnaseprofiilis kihiti: 0-30 cm ja 40-60 cm
 - Proovid võetakse keskmistatult kihi kohta igalt katselapilt eraldi.
 - Kokku võetakse 84 proovi.

BIOLOOGILISE REKULTIVEERIMISE PROTSESSI TÕHUSUST MÕJUTAVAD TEGURID

Peamised tegurid, mis mõjutavad negatiivselt bioloogilise rekultiveerimise protsessi tõhusust, on:

- madalate temperatuuride (alla + 3°C) mõju;

Taoliste madalate (õhu ja pinnase) temperatuuride juures toimub naftat lagundavate mikroorganismide, aga samuti teiste "Ufa-Estoil" koostisesse kuuluvate bakteritüvede füsioloogilise

aktiivsuse järsk alanemine. Samal ajal toimub mikrokoopiliste seente aeglustatud areng, mis (eriti patogeensed liigid) võivad tõsiselt pidurdada või inhibeerida biopreparaadi "Ufa-Estoi" töö.

- niiskuse alla 70 % küllastusastmest;
- sooldumus üle 60 g/l;
- pH madal või kõrge tase ($6 < \text{pH} < 8$).

Pinnase ebapiisav niiskus, kõrge soolade sisaldus ja pH madal või kõrge tase ning muud pinnase füüsilis-biokeemilised näitajad mõjutavad üheselt mitte ainult "Ufa-Estoi" füsioloogilist ja bioloogilist aktiivsust, vaid ka kõiki mullatsünoosi bioremediatsiooni protsesse ning järelkult ka pinnases süsivesinikreostuse utiliseerimise protsessi tõhusust.

- naftareostus üle 45-55 massi%;

Taolise äärmiselt kõrge süsivesinike reostuse korral toimub substraadi poolt inhibeerimise biokeemiline protsess, s.t. süsivesinikreostuse mürgine toksiline mõju ületab konsortsiumi "Ufa-Estoi" mikroorganismide võimalused reostuse utiliseerimiseks ning see toob vaid kaasa nii pinnases olemasolevate kui ka sisse viidud mikroorganismide hukkumise.

Kululiigid	Planeeritud tegevused projekti detailsete eesmärkide täitmiseks	Ühik	Ühikuhind EUR	Kogus	KOKKU summa EUR
Komposteerimisväljakute kasutus	Metoodika kontroll katsealal Kompostiväljakute kasutus; aunade segamine teenusena (iga 2 nädala tagant kogu vegetatsiooniperioodi vältel); 120 m ³ saastunud pinnase käitlemine	Tk	23 312,00	1,00	23 312,00
Metoodika kontroll katsealal	Metoodika kontroll katsealal VTA UTK teadlaste juhendamisel, eksperimendi läbiviimine	tk	28 100,00	1,00	28 100,00
Pinnase analüüs	Metoodika kontroll katsealal Analüüsitakse 39 pinnase proovist järgnevaid näitajaid: Hg, Cr, Cd, Cu, Zn, Ni, Pb, pH, N, P, K, TOC, fenoolid, PAH, KA, orgaaniline aine, naftaproduktid, PCB	komplekt	956,00	84,00	80 304,00
Proovivõtt	Metoodika kontroll katsealal Pinnase proovide võtmine	tundi	6,84	48,00	328,37
Projektijuhtimine	Projektijuhtimine Projekti koordineerimine, metoodika väljatöötamine, puhastustööde läbiviimine, hinnang protsessile, andmetöötlus, aruandluse koostamine jm seonduvad tegevused	päeva	72,78	40,00	2 911,32
Metoodika kontroll katsealal	Metoodika kontroll katsealal Metoodikate väljatöötamine, välitööd, toksikoloogilised uuringud jm seonduvad tegevused, kasutatakse 3 spetsialisti	päeva	54,32	280,00	15 209,73

Kululiigid	Planeeritud tegevused projekti detailsete eesmärkide täitmiseks	Ühik	Ühikuhind EUR	Kogus	KOKKU summa EUR
Andmetöötlus	Metoodika kontroll katsealal Metoodikate väljatöötamine, andmetöötlus, uuringud jm seonduvad tegevused (3 spteisalist)	päeva	54,32	140,00	7 604,87
Ametiauto kasutamine	Metoodika kontroll katsealal Objektile sõit Tallinn - Ida-Virumaa	EUR/km	0,30	2 200,00	660,00
Majutuskulu	Metoodika kontroll katsealal Majutus Ida-Virumaal, 3 inimest	tk	52,00	14,00	728,00
KOKKU					159 158,29