

TARTU ÜLIKOOL
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

LIIS KÄRME

BIOTERVENDUSMEETODITE KASUTAMINE SAASTEAINETE
BIODEGRADATSIOONI VÕIMENDAMISEKS POOLKOKSIS

MAGISTRITÖÖ KESKKONNATEHNOLOOGIAS

JUHENDAJA VANEMTEADUR JAAK TRUU, PhD

TARTU 2006

SISUKORD

LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Põlevkivitööstuse tekitatud keskkonnaprobleemid.....	6
1.2. Bioremediatsioon.....	6
1.3. Fütoremediatsioon.....	7
1.3.1. Taimede kasutamine keskkonnareostuse eemaldamisel.....	7
1.3.2. Risodegradatsioon ja fütostimulatsioon.....	8
1.4. Bioaugmentatsioon.....	9
1.4.1. Valmissegude kasutamine bioaugmentatsioonil.....	10
1.4.2. Bioaugmentatsiooniks sobivate tüvede valik.....	11
1.5. Erinevate bioremediatsioonimeetodite efektiivsus.....	12
1.6. Bioremediatsiooni uurimismeetodid.....	13
2. MATERJAL JA METOODIKA.....	15
2.1. Proovivõtukohta ja proovide võtmise kirjeldus.....	15
2.1.1. Fütoremediatsiooni katselapid.....	15
2.1.2. Bioaugmentatsiooni eksperiment.....	15
2.1.3. Analüüsitud proovid.....	15
2.2. Keemilised analüüsid.....	16
2.3. Mikroobide arvukuse määramine.....	16
2.4. Mikroobikoosluste potentsiaalse metaboolse aktiivsuse kineetika määramine.....	16
2.5. DNA eraldamine.....	17
2.6. DNA puhastamine.....	17
2.7. DGGE.....	17
2.7.1. 16S rDNA geenisegmentide amplifikatsioon.....	17
2.7.2. 16S rDNA segmentide eraldamine DGGE meetodil.....	18
2.8. Andmeanalüüs GelCompar tarkvaraga.....	19
3. TULEMUSED.....	20
3.1. Poolkoksi keemilised omadused ja nende muutumine katse käigus.....	20
3.2. Kultiveeritavate bakteritüvede arvukus.....	21
3.2.1. Bakterite arvukused fütostimulatsiooni katses.....	21

3.2.2. Bioaugmentatsiooni mõju bakterite arvukusele.....	22
3.3. Mikroobikoosluste potentsiaalse metaboolse aktiivsuse kineetika.....	23
3.4. Mikroobikoosluste uurimine DGGE meetodiga.....	25
4. ARUTELU.....	26
KOKKUVÕTE.....	31
SUMMARY.....	32
KASUTATUD KIRJANDUS.....	33

LÜHENDID

CFU	- kolooniat moodustav ühik (<i>Colony-Forming Unit</i>)
DGGE	- denatureeriva gradiendi geel-elektrofoores
DNA	- desoksüribonukleinhape
dNTP	- desoksünukleosiidi trifosfaat
EDTA	- etüleendiamiintetraatsetaat
GEM	- geneetiliselt modifitseeritud mikroorganism (<i>Genetically Engineered Microorganism</i>)
PCR	- polümeraasi ahelreaktsioon (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	- ribonukleinhape
TCE	- trikloroetüleen
UPGMA	- kaalumata kesksideme meetod (<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>)

Pookoksiproovide lühendid:

K - poolkoks

KB - poolkoks, lisatud bakteritüved

S - poolkoksi külvatud muruseemned

L - poolkoksi külvatud muruseemned, kaetud liivaga

T - poolkoksi külvatud muruseemned, kaetud turbaga

TB - poolkoksi külvatud muruseemned, kaetud turbaga, lisatud bakteritüved

M - poolkoks kaetud ettekasvatatud murumatiga

MB - poolkoks kaetud ettekasvatatud murumatiga, lisatud bakteritüved

SISSEJUHATUS

Eesti ühe olulisema maavara, põlevkivi, kasutamine keemiatööstuses on kaasa toonud tõsised keskkonnaprobleemid Ida-Virumaal. Kohtla-Järve linna vahetus läheduses asuvad hiiglaslikud poolkoksimäed, mis koosnevad põlevkivi utmise jääkidest ja reostavad sealset õhku, pinnast ning põhja- ja pinnavett.

Poolkoksimägedesse ladustatud ainese mass ulatub sadadesse miljonitesse tonnidesse. Seetõttu ei ole probleemi lahendamiseks sobilikud üksnes konventsionaalsed meetodid, mis seisneksid poolkoksi teisaldamises ja/või füüsilis-keemilises töötlemises. Antud probleemile lahendust otsides tuleb arvesse võtta eelkõige kohapeal teostatavaid ehk *in situ* meetodeid.

Bioremediatsioon ehk biotervendus on viimasel kümnel aastal laialdasemat kasutust leidnud meetod, mille puhul rakendatakse taimede, bakterite ja seente suutlikkust reostuse eemaldamiseks. Vaatamata meetodi uudsusele on biotervendus üks paljulubavamaid tehnoloogiaid keskkonnareostuste likvideerimisel ning on kasutust leidnud üle kogu maailma.

Antud magistritöö eesmärgiks on hinnata kahe biotervendusmeetodi – fütoremediatsiooni ja bioaugmentatsiooni mõju poolkoksi keemilisele koostisele ja mikroobikooslustele ning testida nende meetodite sobivust Kohtla-Järve poolkoksimägedega seonduvate keskkonnaprobleemide lahendamiseks.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Põlevkivitööstuse tekitatud keskkonnaprobleemid

Põlevkivi ehk kukersiit on üks Eesti tähtsamaid maavarasid, mida kasutatakse energeetika- ja keemiatööstuse toorainena. Keemiatööstuse utmise- e. poolkoksijääkide ladustamine on põlevkivikeemia tööstusettevõtete ümber Kohtla-Järvel ja Kiviõlis aastakümnete jooksul tekitanud ülisuured poolkoksimaed, mis katavad umbes 200 ha ning sisaldavad kuni 100 miljonit tonni tahkeid jäätmeid. Aastas lisandub umbes 600 000 tonni poolkoksi (allikas: AS Viru Keemia Grupp). Ehkki Eesti põlevkivi ei sisalda ohtlikus koguses raskemetalle (Kahru jt., 1997), on põlevkivi tootmise ja termilise töötlemise produktidest ja jääkainetest keskkonda sattunud rohkesti orgaanilisi ja anorgaanilisi saasteaineid. Tahked poolkoksijäätmed sisaldavad mitmeid orgaanilisi ja anorgaanilisi ühendeid nagu fenoolsed ühendid, õliproduktid, väävli- ja lämmastikuühendid. Seoses Eesti põlevkivi kõrge hapnikusisalduse ja orgaanilise aine spetsiifilise struktuuriga sisaldavad need jääkproduktid rohkem fenoolseid ühendeid kui teiste kütuste puhul (Ebber, 2000). Ladustusaladelt pärit nõrgveed sisaldavad aga suures koguses fenooli, kreosooli, dimetüülfenooli ja resortsinoole ning ohustavad pinna- ja põhjavett.

Tulenevalt Euroopa Liidu nõuetest planeeritakse poolkoksi ladustamine praegustesse prügilatesse lõpetatada aastaks 2009 ja prügilad peavad olema suletud hiljemalt aastaks 2013. Konkreetsete saneerimismeetodite osas tehakse otsused lähiaastatel. Arvestades aga poolkoksiprügilate suurt pindala ja jäätmete iseloomu, on selge, et puht majanduslikult ei ole konventsionaalsete saneerimismeetodite (poolkoksi teisaldamine ja füüsilis-keemiline töötlemine) kasutamine terve prügila sulgemiseks võimalik. Nende meetodite kasutamisel ei saavutata ka poolkoksijäätmete saasteinete sisalduse ja toksilisuse vähenemist, vaid üksnes isoleeritakse saasteallikas. Sellest tulenevalt on vaja alternatiivseid lahendusi poolkoksi ladustusala remediatsiooniks.

1.2. Bioremediatsioon

Bioremediatsiooni e. biotervendusmeetodi puhul kasutatakse baktereid või teisi bioloogilisi süsteeme reostatud keskkonna puhastamiseks (Dua jt., 2002). Võrreldes klassikaliste, füüsikalise-keemiliste remediatsioonitehnoloogiatega, on bioremediatsiooni eelisteks odavus, väiksem töömahukus, ohutus ja keskkonnasõbralikkus (Dixon, 1996). Bioremediatsiooni saab rakendada *in situ*, vältides saastatud pinnase transportimist ja pinnasestruktuuri muutmist, samas kui mikroobid on võimelised saasteaineid täielikult

mineraliseerima. Ära jäävad saastatud pinnase kaevandamisega tekitatav võimalik õhureostus ja reoainete leke põhjavette.

Erinevad *in situ* bioremediatsiooni meetodid võib tinglikult jagada nelja kategooriasse. **Looduslik hajumine** (e. passiivne remediatsioon) seisneb saasteaine toksilisuse, liikuvuse ja hulga vähenemises inimese sekkumiseta nii füüsiliste kui ka bioloogiliste protsesside tagajärjel (Rittmann, 2004). Oluline on nende protsesside jälgimine, et teha kindlaks saastuse vähenemine. Loodusliku hajumise meetodit on võimalik kasutada, kui pole vaja kiireid tulemusi ning kui saastatud paik asub asustatud aladest kaugel ega ohusta otseselt keskkonda. Seda meetodit on laialdaselt rakendatud bensiinisastuse puhul maa-alustes hoidlates Ameerika Ühendriikides (Dojika jt., 1998). **Biostimulatsiooni** kasutatakse, kui looduslik lagundamine ei toimu või on liialt aeglane ning keskkonda on vaja mõjutada lagundamise esilekutsumiseks või kiirendamiseks. Biostimulatsioon seisneb keskkonnatingimuste optimeerimises, näiteks keskkonda aereerides, sinna toitaineid, elektroniaktseptoreid ja -doonoreid lisades või kontrollides pH-d ja temperatuuri (Margesin jt., 2000). Jaapanis on edukalt testitud biostimulatsiooni, lisades metaani TCE-ga reostatud põhjavette (Iwamoto ja Nasu, 2001). Kolmanda meetodi, **bioaugmentatsiooni** puhul suurendatakse saastatud keskkonnas biodegradatsiooni võimsust keskkonda sobivate kataboolsete omadustega baktereid lisades. **Fütoremediatsiooni** puhul kasutatakse keskkonna puhastamiseks taimi. Fütoremediatsiooni all võib eraldi välja tuua risoremediatsiooni, millega tähistatakse taimejuurte vahetus läheduses asuvate mikroobide panust saastuse vähendamisel (Anderson jt., 1993). Üha enam toimub ka erinevate biotervendusmeetodite kombineerimine, saamaks võimalikult häid tulemusi (Bento jt., 2005).

1.3. Fütoremediatsioon

1.3.1. Taimede kasutamine keskkonnareostuse eemaldamisel

Taimed mõjutavad paljusid pinnases toimuvaid protsesse. Taimed on võimelised muutma saastunud pinnase füüsilisi ja keemilisi omadusi ning suurendama pinnase orgaanilise süsiniku sisaldust juureekstraktide abil. Lisaks sellele saavad taimed suurendada pinnase hapnikusisaldust, eraldades hapnikku otse juuretsooni ja parandades pinnase ülemiste kihtide poorsust. Taimkatte abil saab vähendada saastatud pinnase erosiooni ja levikut tuule teel. Taimed võivad vähendada kemikaalide liikuvust pinnases ning saastuse migratsiooni põhjavette, soodustada kometabolismi ning läbi selle keemiliste ühendite ensümaatilist transformatsiooni (Chang ja Corapcioglu, 1998; Schwitzguebel jt., 2002).

Fütoremediatsioon on bioremediatsiooni üks valdkondi, mille puhul kasutatakse taimi ja taimejuurtega seotud risosfäärimikroobe keskkonnasaastuse eemaldamiseks (Cunningham ja Berti, 1993; Susarla jt., 2002). Tänapäeval kasutatakse fütoremediatsiooni väga erinevate reoainete eemaldamiseks (naftaproduktid, klooriühendid, pestitsiidid, lõhkeained, raskemetallid, radioaktiivsed ained jne.). Fütoremediatsiooni peamised eelised on madal maksumus ja esteetiline lõpptulemus, mistõttu on seda meetodit võimalik edukalt rakendada suurtel aladel asustuse lähedal. Erinevate orgaaniliste ja anorgaaniliste ühendite fütoremediatsioon võib toimuda järgnevalt (Glick, 2003):

- 1) fütоекstraktsioon e. fütOakumulatsioon - saasteainete akumulatsioon erinevatesse taimeosadesse;
- 2) risofiltratsioon - saasteainete eemaldamine veest taimejuurte filtreeriva efekti abil;
- 3) fütostabilisatsioon - taimed takistavad anorgaanilise saastuse levimist keskkonnas;
- 4) fütovolatilisatsioon - taimed akumulatsioon ja eraldavad atmosfääri lenduvaid mürgiseid ühendeid;
- 5) fütostimulatsioon - taimed stimuleerivad mikroobide elutegevust ja läbi selle saastuse lagundamist mikroobide poolt taimejuurte vahetus läheduses ehk risosfääris;
- 6) fütodegradatsioon/fütotransformatsioon - saasteainete akumulatsioon ja lagundamine taimes.

Et fütoremediatsiooni edukalt rakendada, tuleb arvesse võtta meetodile omaseid kitsendusi (Khan jt., 2000). Esiteks - tulemuste saavutamiseks läheb aega, kuna taimede kasv võib olla küllaltki aeglane. Teiseks on mõjutatav ala piiratud taimejuurte ulatusega. Taimed võivad olla tundlikud teatud reostuse suhtes, samuti on taimede kasv sõltuv kliimatilistest tingimustest. Neid probleeme saab ületada, kasutades taimi, mis on vastavas keskkonnas hästi kohastunud, kiire kasvuga ja sügavate juurtega. Üks võimalusi on sobivate transgeensete taimede aretamine. Ka taimede ja mikroobide kooskasutamine tekitab sünergilise efekti, mõjudes positiivselt nii taime kasvule kui ka mikroobikoosluste arengule.

1.3.2. Risodegradatsioon ja fütostimulatsioon

Risosfäär on taime juurte poolt mõjutatav mullaosa, millele on iseloomulikuks mikroobide kõrge arvukus ja aktiivsus. Risosfääri kirjeldati esmakordselt juba 1904. aastal (Hiltner, 1904). Risosfääris toimub saasteainete kõrgendatud degradatsioon suuresti tänu risosfääri mikroobikooslustele, millede osalust lagundamises nimetatakse ka risoremediatsiooniks (Anderson jt., 1993). Risosfääris toimuvad protsessid on olulised fütostimulatsioonil, mille puhul taimed stimuleerivad mikroobide elutegevust ja läbi selle

reainete lagundamist mikroobide poolt taimejuurte vahetus läheduses. Taimejuured aereerivad mulda sellest läbi tungides ja suurendavad mikroobide aktiivsust juurtest eralduvate süsinikuühendite abil. Juurtest eralduvad molekulid (n. fenoolsed ühendid) võivad indutseerida mikroobide ensümaatilist aktiivsust või aidata kaasa sobiva metaboolse raja tekkele. Samuti mõjutavad taimed mulla pH-d, osmootset ja redokspotentsiaali ning hapniku ja süsihappegaasi osarõhkusid (Joner ja Leyval, 2003).

Risosfääri muutunud tingimused ei muuda proportsionaalselt kõigi mikroobide arvukust, eelkõige muutub mikroobikoosluse koosseis (Marschner jt., 2001; Steer ja Harris, 2000). Risosfäärikoosluste täpse koosseisu kohta on samas väga vähe infot. On teada, et risosfääris domineerivad Gram-negatiivsed bakterid nagu näiteks *Pseudomonas* perekonna liigid (Kuiper jt., 2004).

Ridder-Duine ja kaastöölised (2004) uurisid, mis mõjutab risosfääri bakterikoosluse struktuuri rohkem – pinnase omadused või konkreetne taimeliik. Molekulaarsete meetoditega (DGGE) analüüsiti 10 erinevast kasvukohast pärit liivtarna (*Carex arenaria*) risosfääri bakterikooslusi. Klasteranalüüsi põhjal selgus, et iga kasvukoha risosfäärikooslus omas suuremat sarnasust sama kasvukoha mullast pärit kooslusega kui teisest kasvukohast pärit taime risosfäärikooslusega. Selle põhjal järeldati, et risosfääri bakterikoosluse koosseis on suuresti mõjutatud kasvukoha mulla bakterikooslustest. Seda järeldust toetasid ka laborikatsed, mille puhul erinevatest kasvukohtadest pärit taimede risosfäärikooslused muutusid sarnaseks, kui nad istutati ümber samasse mulda. Samas ühest kasvukohast pärit tarna istutamine erinevatesse muldadesse muutis taime risosfäärikooslused üksteisest erinevaks.

Uuringud on näidanud, et sobivaimad taimed fütostimulatsioonil kasutamiseks on erinevad kõrrelised ja liblikõielised (Kuiper jt., 2001). Selle põhjuseks on tõenäoliselt eelkõige nimetatud taimede väga hästi välja kujunenud juurestik, mida ümbritseb suur hulk mikroobe.

1.4. Bioaugmentatsioon

Bioaugmentatsiooni puhul kiirendatakse saastatud pinnase puhastamist, viies keskkonda spetsiifiliste metaboolsete omadustega mikroobe, mis on võimelised reostust tekitavaid aineid lagundama. Remediatsioon toimub sel juhul kiiremini tänu lagundavate mikroobide suuremale hulgale ja aktiivsusele või kataboolsete omaduste ülekandumisele kohalikele mikroobidele (Van Veen, 1997). Bioaugmentatsiooni puhul võib keskkonda lisada (Scow ja Hicks, 2005):

- a) sealtsamast saastunud keskkonnast eraldatud bakteritüve või tüvede segu e. konsortsiumi, mida on paljundatud laboris selektiivses söötmes (so. kasvukeskkonnas, mis sisaldab sama või lähedast ainet saasteainele);
- b) tüvesid, mida antud kohas looduslikult ei esine, aga mis omavad vajalikke lagundamisradu;
- c) geneetiliselt muundatud tüvesid.

Geneetiliselt modifitseeritud mikroobide (GEM) kasutamine on vajalik selliste ainete bioaugmentatsioonil, mille puhul pole olemas või pole teada sobivaid looduslikult väljakujunenud kataboolseid lagundamisradasid, nagu näiteks polükloreeritud bifenuülide või kloroetüleenide puhul (Brazil jt., 1995). Sellisel juhul on võimalik biotehnoloogia abil luua uusi metaboolseid radu, kombineerides neid teadaolevatest radadest, või optimeerida olemasolevaid lagundamisradasid, näiteks teatud geenide või operonide üleekspressiooni kaudu (Pieper ja Reineke, 2000). GEMide kasutamisega on samas seotud mitmed probleemid, näiteks nende võime lagundada vaid väheseid saasteaineid, lisaks ka seadustest tulenevad nõuded geneetiliselt modifitseeritud organismide viimisel keskkonda ja GEMid ei ole siiani laialdast kasutust leidnud.

1.4.1. Valmissegude kasutamine bioaugmentatsioonil

Naftaproduktid on tänapäeval ühed kõige laiemat kasutust leidvad kemikaalid. Seoses vajadusega ladustada ning transportida ühest kohast teise suuri koguseid naftaprodukte, on lekked ja õnnetused vältimatud. Seetõttu esineb nõudlus odavate vahendite järele, mille abil keskkonda õlireostusest puhastada. Bakterite mitmekesisus on väga suur ning lagundamisradasid on olemas peaaegu kõigi olulisemate saasteainete jaoks, kaasa arvatud erinevad polüaromaatseid süsivesinikke sisaldavad ained nagu mootoriõli, diiselkütus jne. Bioaugmentatsiooni kui odava ja lihtsalt rakendatava meetodi laiem levik on viinud kommertsiaalsete ehk valmissegude tootmiseni, mis on mõeldud just õlireostuse likvideerimiseks. Bioaugmentatsiooni valmissegud võivad sisaldada kas ainult baktereid või ka baktereid kombinatsioonis ensüümide ja väetistega (Wright ja Weaver, 2004).

Simon ja kaastöölised (2004) kontrollisid kahe bioaugmentatsiooni valmisprodukti võimekust bensiinireostuse eemaldamiseks mere mõju all oleval märgalal. Produktid valiti 13 sarnase seast. Väljavalitud kaks saavutasid parimad tulemused laborikatsetel, kus kontrolliti nende võimet lagundada õliprodukte merevees. Produkte BP8 ja BP10 lisati katsealale vastavalt 5 ja 2 korda katse jooksul. Vähendamaks õlireostusega tavaliselt kaasnevat heterogeensust, lisati katsealale vaid üht tüüpi õli. Vaatamata sellele, et laborikatsetel olid valmissegud mõjunud õlilagundamisele positiivselt, ei täheldatud katse

lõpuks kõrgemat biodegradatsiooni taset katselappidel, kuhu oli lisatud lisaks õlile ka bioaugmentatsiooni valmisprodukte. Mõlemal katsealal tõusid õli lagundavate mikroobide arvukused võrdselt. Võimalik, et kasutatud mikroobitüved polnud suutelised võõras keskkonnas adapteeruma, samas kui “kohalikud” mikroobid olid hästi kohanenud antud keskkonna oludele.

Wright ja Weaver (2004) testisid viie erineva kommertsiaalse bioaugmentatsiooniprodukti mõju õliga reostunud mere poolt üleujutatava soo veele. Kõik produktid pärinesid eri firmadelt ja sisaldasid vastavalt kas ensüüme, mikroobitüvesid, mikroobe ja toitaineid, mikroobe ja ensüüme või mikroobe, ensüüme ja dispergeerivat ainet. Lagundamiskatsed viidi läbi mesokosmides. Nimetatud produktide lisamine ei parandanud ei õli lagundamist ega mõjutanud aeroobsete heterotroofide või süsivesinikke lagundavate mikroorganismide arvukust. Selgus, et looduslikud mikroobikooslused olid võimelised ise õli lagundama ega vajanud bioaugmentatsiooni.

Mitmetes uurimustöödes on näidatud ka bioaugmentatsiooni valmisegude positiivset mõju õliproduktide ja süsivesinike lagundamisele (Aldrett jt., 1997; Neralla ja Weaver, 1997; Venosa jt., 1992). Need tööd olid läbi viidud laboritingimustes, kasutades vaid mõnda grammi saastunud pinnast ja lagundamist jälgiti katseklaasis, kuhu ei lisatud taimi. Laborikatsete tulemused ei pruugi aga olla tõepärased, kui ei kasutata reaalsele keskkonnale võimalikult lähedasi tingimusi.

1.4.2. Bioaugmentatsiooniks sobivate tüvede valik

Bioaugmentatsiooni edukaks rakendamiseks on olulisim bakteritüve või -konsortsiumi leidmine, mis suudaks antud keskkonnas ellu jääda ja paljuneda või siis oma kataboolseid omadusi looduslikele bakteritele edasi anda (Singer jt., 2005). Eelnevas peatükis toodud näidete põhjal pole tööstuslikult toodetud bioaugmentatsioonisegud, kus rakendatakse baktereid, mis pole pärit reostatud alalt, ennast tihti õigustanud.

Tunduvalt paremaid tulemusi on saadud, kui keskkonda on viidud sealt samast saastunud piirkonnast eraldatud baktereid ja bioaugmentatsiooni abil on suurendatud nende arvukust keskkonnas (Bento jt., 2005). Antud bakterid on juba kohandunud keskkonnasaastusele ja nende arvukuse tõstmine kiirendab remediatsiooni.

On ka teada, et bakterikonsortsiumid lagundavad saasteaineid efektiivsemalt kui üksiktüved, kuna erinevad tüved saavad paremini kasutada lagundamisradades tekkivaid vaheühendeid (Pelz jt., 1999). Konsortsiume kasutades on võimalik vältida võimalike toksiliste vaheühendite tekkimist, kasutades erineva katabolismitüübiga baktereid (Heinaru jt., 2005). Bakterite segu, millest iga liige on võimeline läbi viima teatud osa kataboolsest

lagundamisrajast, suudab sageli saasteainet efektiivsemalt lagundada kui terviklikku lagundamisrada omav üksik tüvi (Rahman jt., 2002).

1.5. Erinevate bioremediatsioonimeetodite efektiivsus

Iga reostus on erinev ning seetõttu tuleb enne biotervenduse rakendamist hoolega kaaluda, milline meetod just antud keskkonna ja saasteainete puhul parima tulemuse annaks. Seoses biotervendusmeetodite laiemal levikuga on hakatud erinevaid meetodeid ka omavahel võrdlema.

Bento ja kaastöölised (2005) võrdlesid omavahel loodusliku hajumise, biostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni mõju kahele erinevale diiselkütusega reostatud mullale, mille proovid olid võetud Californiast ja Hong Kongist. Selgus, et parimad tulemused diiselkütuse lagundamisel saadi bioaugmentatsiooniga California mullas. Bioaugmentatsioonil kasutatud bakteritüvede segu oli eraldatud sealtsamast mullast. Samas Hong Kongi mulla puhul nimetatud segu kasutamine mingit positiivset mõju ei avaldanud. Samuti ei saavutatud puhastusefekti ainuüksi toitainete (lämmastiku ja fosfori) lisamisega.

Ruberto ja kaastöölised (2003) uurisid loodusliku hajumise, biostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni mõju kütusega reostunud Antarktika pinnasele. Bioaugmentatsioon tõstis bioremediatsiooni efektiivsust, lagundati 75% süsivesinikest. Ka looduslikud mikroobikooslused kohandusid hästi reostusega ning süsivesinikke lagundavate bakterite arvukus tõusis. Samas lämmastiku ja fosfori lisamine positiivset efekti ei tekitanud, vaid tingis hoopis bakterite kasvu aeglustumise.

Sarkar ja kaastöölised (2004) võrdlesid kahte biostimulatsioonimeetodit ja looduslikku hajumist diiselkütusega reostatud pinnase puhul. Biostimulatsiooni puhul lisati kas anorgaanilist lämmastiku- ja fosforirikast väetist või biotahkist, mis sisaldas lisaks lämmastikule ja fosforile ka süsinikku. Peale 8 nädalat inkubeerimist oli mõlema biostimulatsiooni katse tulemusel lagundatud 96% süsivesinikest ja loodusliku hajumise puhul 93,8%. Kuid esimesel katsenädalal tõusis biotahkisega proovis mikroobide arvukus kahe suurusjärgu võrra, samas kui lämmastiku- ja fosforiväetisega töödeldud proovis tõusis arvukus ühe suurusjärgu võrra. Järgmistel nädalatel langes väetatud proovis mikroobide arvukus tunduvalt, mis johtus tõenäoliselt kas väetise poolt tekitatud keskkonna pH langusest ja/või NH₃ üledoosist tingitud toksilisusest. Autorid soovivad nende tulemuste põhjal eelistada biostimulatsioonil biotahkist anorgaanilisele väetisele.

1.6. Bioremediatsiooni uurimismeetodid

Looduslikke mikroobikooslusi uurides tekivad küsimused nende koosluste liigilise koosseisu, ülesehituse ja stabiilsuse kohta, samuti üksikute koosluseliikmete aktiivsuse ja funktsioonide kohta. Traditsiooniliste mikrobioloogias kasutatavate meetodite abil on nendele küsimustele võimalik vastata vaid osaliselt. Valgusmikroskoobiga mikroobe uurides pole võimalik määrata bakterite liigilist koosseisu, radioaktiivselt märgistatud leutsiini või tümidiini abil koosluseliikmete aktiivsust määrates pole võimalik selgeks teha, millised bakteripopulatsioonid on aktiivsed (Törnblom ja Sondergaard, 1999). Isoleeritud bakteritüvesid on väga edukalt iseloomustatud füsioloogiliste katsetega, ent tänapäevaks me teame, et enamikku (kuni 99%) looduses esinevatest mikroobidest ei ole võimalik isoleerida puhaskultuuri, sest meil puuduvad andmed bakterite looduslikus mikrokeskkonnas valitsevate tingimuste kohta (Amann jt., 1995).

Molekulaarsete meetodite areng on teinud võimalikuks teistsuguse lähenemise. See võimaldab meil uurida mikroorganismide mitmekesisust geneetilisel tasemel. Mikroobid grupeeritakse vastavalt nende geenide sarnasusele, mis väljendab ka nende evolutsioonilist vahekorda (Woese, 1987). Molekulaarsete meetoditega on võimalik uurida otse keskkonnast eraldatud bakterikoosluse DNA-d ja vältida kultiveerimise selektiivsusest tulenevaid probleeme. Sedasi saame uurida keskkonnas degradatsiooni läbiviivate bakterikoosluste mitmekesisust, dünaamikat ja stabiilsust. Nende teadmiste abil on omakorda võimalik bioremediatsioonisüsteemi optimeerida.

Kuid ka mikroobikoosluste kirjeldamiseks kasutatavatel molekulaarsetel meetoditel on mitmed puudujäägid. Peamiseks vigade allikaks on polümeraasi ahelreaktsioon (PCR), kuna selle käigus võib toimuda teatud segmentide eelistatud amplifikatsioon ning vähemesinevate järjestuste tase võib jääda detekteerimiseks liiga madalale (Ranjard jt., 2000; Winzingerode jt., 1997). Denatureeriva gradiendi geel-elektroforeesi ehk DGGE puhul, millega on võimalik eraldada ühepikkusi, kuid erineva primaarjärjestusega fragmente (Myers jt., 1988), on peamiseks puuduseks analüüsitavate fragmentide pikkus. Nimelt pole võimalik analüüsida pikemaid fragmente kui 500 aluspaari, enamasti jääb analüüsitavate fragmentide pikkus alla 400 aluspaari (Fromin jt., 2002).

Ehkki kultiveerimisest tulenevad probleemid on hästi teada, on puhaskultuuri eraldatud tüvede kasutamine hädavajalik, kui soovitakse uurida tüvede biokeemilisi ja füsioloogilisi omadusi (Whiteley jt., 2001). Ka enne bioaugmentatsiooni rakendamist on vajalik isoleerida, indentifitseerida ja iseloomustada saasteainet lagundavaid bakteritüvesid ja analüüsida nende aktiivsust *in situ* (Heinaru jt., 2005).

Mikroobide polüfaasilist uuringut on peamiselt kasutatud taksonoomias (Vandamme jt., 1996), kuid seda mõistet võib rakendada ka mikroobiökoloogias (Juck jt., 2000). Taksonoomias tähendab see mikroobide uurimist nii feneetiliste kui geneetiliste tunnuste põhjal, mikroobiökoloogias aga koosluste iseloomustamist nii kultiveerimisel põhinevate kui ka kultuurist sõltumatute molekulaarsete meetoditega. Polüfaasilist uuringut kasutades on kõige paremini võimalik kirjeldada ja mõista mikroobikoosluste funktsioneerimist ja rolli saasteainete bioremediatsioonis.

2. MATERJAL JA METOODIKA.

2.1. Proovivõtukohta ja proovide võtmise kirjeldus

2.1.1. Fütoremediatsiooni katselapid

AS Viru Keemia Grupi poolkoksimägedele Kohtla-Järvel rajati 4 katselappi juulis 2001. Katselapid rajati u. 10 aastat tagasi ladestatud poolkoksi peale. Iga katselapi pindala oli 50 m². Katselappidele külvati murusegu, mis sisaldas nelja liiki kõrreliste seemneid: *Lolium perenne* (karjamaa-raihein), *Poa pratensis* (aasnurmikas), *Festuca rubra* (punane aruhein) ja *Festuca ovina* (lamba-aruhein). Katselappidel rakendati lisaks taimede külvamisele järgmisi töötusi: 1. katselapp – muruseemned külvati poolkoksi, lisatöötlust ei toimunud; 2. katselapp – muruseemned külvati poolkoksi ja kaeti 1-2 cm paksuse liivakihi; 3. katselapp – seemned külvati poolkoksi ja kaeti 1-2 cm paksuse turbakihi; 4. katselapp – poolkoksi kaeti ettekasvatatud murumatiga.

2.1.2. Bioaugmentatsiooni eksperiment

Bioaugmentatsiooni eksperimentis kasutati kolme bakteritüve, mis olid isoleeritud lähedalasuvalt alalt. Nendeks olid *Pseudomonas mendocina* PC1, *Ps. fluorescens* PC18 ja *Ps. fluorescens* PC24, kes lagundavad fenooli ja *p*-kresooli vastavalt *meta-meta*, *meta-ortho* (protokatehhaadi haru) ning *ortho* (katehhooli haru)- *ortho* (protokatehhaadi haru) rada mööda (Heinaru jt., 2000). Valitud tüved on erinevate fenooli metaboolsete lagundamisradade tüüpesindajad, tüvede valiku aluseks oli nende metaboolne võimekus.

2002. a. juulis kanti turbaga ja murumatiga kaetud katselappide ja poolkoksi kontrolllapi 10 m² suurusele osale 20 liitrit bakterisuspensiooni. Suspensiooni kontsentratsioon oli 10⁸ CFU/ml, bakteritüvede PC1, PC18 ja PC24 suhe suspensioonis oli 3:1:1.

2.1.3. Analüüsitud proovid

Antud töös on analüüsitud kaheksat 2002. a. oktoobris järgmistelt katselappidelt võetud pinnaseproovi:

1. Poolkoksi kontrollkatselapp (K)
2. Poolkoksi kontrollkatselapp, millele kanti bakterisuspensiooni (KB)
3. Poolkoksile külvatud muruseemnetega katselapp (M)
4. Poolkoksile külvatud muruseemnetega katselapp, kaetud liivaga (L)
5. Poolkoksile külvatud muruseemnetega katselapp, kaetud turbaga (T)
6. Poolkoksile külvatud muruseemnetega katselapp, kaetud turbaga, lisatud bakterisuspensiooni (TB)

7. Murumatiga kaetud poolkoksi katselapp (M)
8. Murumatiga kaetud poolkoksi katselapp, lisatud bakterisuspensiooni (MB)

Igalt lapilt koguti 5-15 cm sügavuselt kümme proovi, mis segati kokku ühtseks analüüsitavaks prooviks.

2.2. Keemilised analüüsid

Proovide keemilised analüüsid teostas Tartu Keskkonnauuringute Labor. Õliproduktid ekstraheeriti pentaaniga ja mõõdeti gaaskromatograafia. Lenduvad fenoolid määrati spektrofotomeeriliselt. Summaarse orgaanilise süsiniku määramisel kasutati infrapuna-spektrofotomeetrit.

2.3. Mikroobide arvukuse määramine

5 g proovi homogeniseeriti 45 ml-s 0,9% NaCl isotoonilises lahuses. Peale 10-minutilist settimist kasutati vesifaasi uute detsimaalsete lahjenduste tegemiseks. 10 µl mahus lahjendused külvati kolmes korduses tilga meetodil R2A (Difco) söötmetele ning fenooli minimaalsöötmele. Fenooli minimaalsööde sisaldas M9 soolasid (Adams, 1959), mikroelemente (Bauchop ja Elsdén, 1960) ja 2,5 mM fenooli.

2.4. Mikroobikoosluste potentsiaalse metaboolse aktiivsuse kineetika määramine

Mikroobikoosluse potentsiaalse metaboolse aktiivsuse kineetika uurimiseks kasutati Biolog EcoPlate™ mikroplaate 31 erineva süsinikuallikaga. Iga plaat sisaldab igat substraati ja veega kontrolli kolmes korduses. Lisaks süsinikuallikale sisaldab iga mikroplaadi kaevuke tetrasooliumvärvi. Mikrotiiterplaadid inokuleeriti 150 µl uuritava materjali 10^{-2} lahjendusega. Plaatide inkubeeriti toatemperatuuril pimedas ja tekkinud formasaani absorptsioon mõõdeti iga 24 h tunni järel 5 päeva jooksul lainepikkusel 590 nm. Kõigi sama plaadi erinevate substraatide oksüdeerimisel tekkinud formasaani optilised tihedused summeeriti ajahetkede kaupa ja kasutati seejärel kineetilise mudeli konstrueerimiseks järgmise valemi järgi (Lindström jt., 1998):

$$y = \sum OT_{590} = \frac{A}{(1 + e^{-r(t-s)})}$$

kus

$\sum OT_{590}$ on summeeritud 31 substraadi oksüdeerimisel tekkinud formasaani optilised tihedused;

A on asümptoot;
r on optilise tiheduse eksponentsiaalse muutumise kiirus;
t on aeg alates inokuleerimisest tundides;
s on aeg, mis kulub kõvera eksponentsiaalse osa keskpunkti jõudmiseni.

Mudeli parameetrite võrdlemiseks kasutati ühefaktorilist dispersioonanalüüsi. Mikroobikoosluse potentsiaalse metaboolse aktiivsuse kineetilise mudeli parameetrite hindamine võimaldab võrrelda mikroobikooslusi sõltumata nende biomassist või arvukusest.

2.5. DNA eraldamine

Mikroobikoosluse DNA eraldamiseks kasutati firma MoBio (USA) toodetud valmiskomplekti (*UltraClean Mega Prep Soil DNA Kit*). DNA eraldati 10 g proovimaterjalist. DNA eraldamisel järgiti tootja instruktsioone ühe muudatusega. 8 ml lahuse S5 asemel kasutati DNA filtrilt maha pesemiseks 1 ml MilliQ vett. Filtrit pesti DNA lahusesse viimiseks esmalt 1 ml MilliQ veega ning peale fuugimist võeti tuubi põhjast lahus ja DNA saagise suurendamiseks pesti sellega filtrit teinegi kord. Pesemisel fuugiti tuube mõlemal korral 5 minutit.

2.6. DNA puhastamine

Poolkoksi proovidest saadud mikroobikoosluste DNA puhastati kasutades kommertsiaalset puhastuskomplekti *UltraClean PCR Clean-up Kit* (MoBio). Puhastamisel järgiti tootja instruktsioone, kuid kadude minimeerimiseks pesti filtrit DNA lahusesse viimiseks esmalt 50 µl MilliQ veega ning peale fuugimist võeti tuubi põhjast lahus ja pesti sellega filtrit teinegi kord.

2.7. DGGE

2.7.1. 16S rDNA geenisegmentide amplifikatsioon

Polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) abil amplifitseeriti pinnaseproovidest eraldatud kogu koosluse DNA-st ribosoomi väikest subühikut kodeeriva järjestuse e. 16S rDNA 236 aluspaari pikkune segment, mis vastab *E. coli* positsioonidele 338 – 518. 16S rDNA amplifikatsiooniks kasutati primereid P338F ja P518R, mille järjestus on toodud tabelis 1. Primer P338F sisaldab 5' otsas 40 nukleotiidi pikkust GC rikast ala ehk GC klambrit, mis parandab segmentide eraldumist DGGE geelis. Klamber takistab kaheaheelalise DNA täielikku lahtisulamist denaturantide kontsentratsiooni mõjul geelis.

PCR viidi läbi 50 µl -s proovi kohta. Proov sisaldas 1 x PCR puhvrit (75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂ SO₄, 0.01% Tween 20), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM lõppkontsentratsiooniga iga

dNTP-d, 30 pmol kumbagi praimerit, 0.5 ühikut/ μ l Taq polümeraasi (MBI Fermentas, Leedu) ja 1 μ l genoomset DNA-d.

Kasutati järgmist amplifikatsiooniprogrammi: denaturatsioon 95 °C 2 min., 30 tsükliks 95 °C 1 min., 53 °C 1 min., 72 °C 2 min. Lõppekstensioon 72 °C 10 min. (Øvreås jt., 1997).

PCR reaktsioonid viidi läbi Eppendorfi "Mastercycler"-is. Produkti olemasolu ja negatiivse kontrolli puhtust kontrolliti 1% agarosgeelil.

Tabel 1. Praimerite järjestused.

<i>Praimer</i>	<i>Positsioon E. coli järgi</i>	<i>Järjestus 5'-3'</i>	<i>Vüide</i>
P338F	338-357	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	(Øvreås jt., 1997)
P518R	518-534	ATTACCGCGGCTGCTGG	(Muyzer jt., 1993)
GC-klamber		CGCCCGCCGCGCGGGCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGG	

2.7.2. 16S rDNA segmentide eraldamine DGGE meetodil

DGGE meetodiga eraldatakse denatureerivas geelis ühepikkused DNA segmentid üksteisest vastavalt erinevustele primaarjärjestustes. Selle meetodiga on võimalik teineteisest eraldada ka ainult ühe aluspaari võrra erinevad segmentid (Muyzer jt., 1993).

Amplifitseeritud fragmentide analüüsimiseks kasutati DCode elektroforeesisüsteemi (BioRad). Valmistati 1 mm paksune 10% polüakrüülamiidgeel. Geel sisaldas 1x TAE puhvrit (50 mM Tris/atsetaat; 1 mM EDTA, pH 8.3), 10% akrüülamiidi/bisakrüülamiidi segu (37.5:1) ning denaturantide (uurea ja formamiid) lineaarset kontsentratsiooni. 100% denatureeriv lahus sisaldas 40% formamiidi ja 7 M ureat. Geeli valamisel kasutati LKB Bromma 2115 MULTIPERPEX peristaltilist pumpa kiirusel 4 ml/min. ja gradiendivalajat (Amersham Pharmacia, Biotech). 16S rDNA fragmentide eraldamiseks kasutati kontsentratsioonivahemikku 35-70%.

Geelil lasti polümeriseeruda 6 tundi. Geeli "hammaste" parema polümeriseerumise tagamiseks valati geeli ülemine, ca 2 cm kõrgune osa denaturandivabast geelist. Ülemisel osal lasti polümeriseeruda 2 tundi. Polümeriseerunud geelile kanti 35 μ l proovi ning geeli elektroforeesiti 1x TAE puhvris 14 tundi 80 V pingega temperatuuril 60 °C. Peale elektroforeesi värviti geeli etiidumbromiidiga 20 minuti jooksul 1x TAE puhvris ning pesti MilliQ veega 15 minuti jooksul. Geeli pildistati ultraviolet-valguses. Geelipilti töödeldi ja analüüsiti GelCompar arvutiprogrammiga ning visuaalselt.

2.8. Andmeanalüüs GelCompar tarkvaraga

Geelipildid digitaliseeriti ning salvestati. Seejärel nad konverteeriti, normaliseeriti ning analüüsiti, kasutades GelCompar 4.0 programmi (Kortrijk, Belgia). Programmi abil arvutati koosluste sarnasuskordajate maatriksid, kasutades Pearsoni korrelatsioonikoefitsienti, mis arvestab triibumustri densitomeetrilist kõverat. Seejärel viidi läbi klasteranalüüs, mille tulemusel saadi proovide sarnasust kujutav dendrogramm. Kasutati UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*) meetodit. UPGMA puhul moodustatakse dendrogramm, kus omavahel ühendatakse osaklastrid arvestades mitte kummagi klastri kõige sarnasemaid või erinevaid taksoneid, vaid aluseks võttes sarnasuse (erinevuse) keskmist. Lisatakse takson, mille keskmine kaugus kõigist juba moodustunud klastritest on minimaalne (Parmasto, 1996).

3. TULEMUSED

3.1. Poolkoksi keemilised omadused ja nende muutumine katse käigus

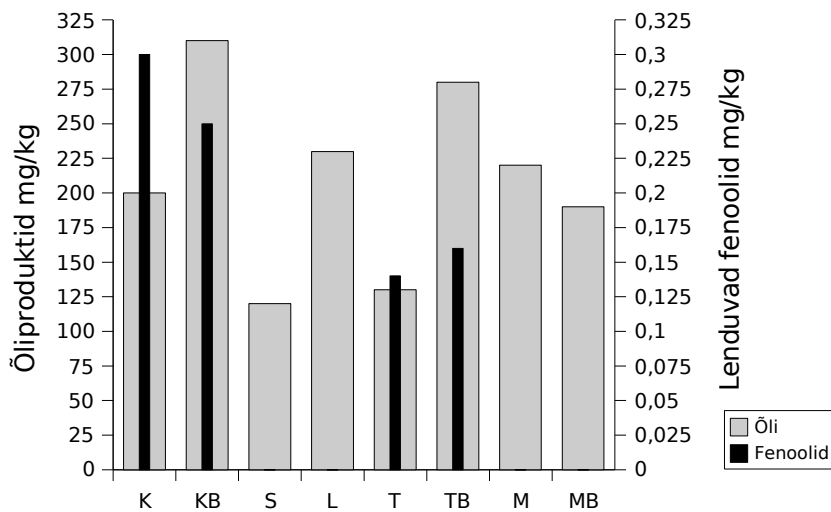
Poolkoks tekib põlevkivi termilisel töötlemisel ehk utmisel, mis toimub temperatuuril alla 500 °C. Niisugusel temperatuuril ei toimu karbonaatide ega terrigeensete mineraalide lagunemist, seega esinevad poolkoksas samad mineraalid mis põlevkivis. Utmise eesmärgiks on eelkõige õli saamine. Utmisel tekkiv tahkejääk poolkoks moodustab 55-60% kasutatavast tehnoloogilisest põlevkivist ehk õlikivist. Värske poolkoks on väga aluseline, kõrge soolsusega ja bioloogiliselt steriilne toitainetevaene struktuuritu materjal. Poolkoksi keemilised omadused kontroll-lapil katselappide rajamise ajal on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Poolkoksi keemilised omadused 2001. a. kontroll-lapil.

<i>Parameeter</i>	<i>Mõõdetud väärtus</i>
pH	8.0-11.0
Summaarne N (%)	0.08
P-PO ₄ ³⁻ (mg/kg)	12.3
K ⁺ (mg/kg)	799
Ca ⁺ (mg/kg)	18673
Mg ⁺ (mg/kg)	826
Summaarne orgaaniline süsinik (%)	15.0-18.0
Õliproduktid (mg/kg)	340
Lenduvad fenoolid	0.30-0.34

2002. aasta oktoobriks, mil oli möödunud 15 kuud katselappide rajamisest, oli lenduvate fenoolide kontsentratsioon võrreldes kontroll-lapiga langenud neljal katselapil tasemeni, mida polnud võimalik detekteerida ning kahel lapil (turvas ja turvas bakteritüvedega) vähenenud kaks korda (kontsentratsioonilt 0,3 mg/kg kontsentratsioonile 0,14 ja 0,16 mg/kg) (joonis 1). Lenduvate fenoolide kontsentratsioon bioaugmentatsiooni kontroll-lapil oli samuti langenud (0,25 mg/kg). Summaarne orgaaniline süsinik ei olnud muutunud, jäädes vahemikku 15 - 18%.

Õliproduktide osas olid tulemused vastuolulised (joonis 1). Õliproduktide kontsentratsioon oli kõrgeim bioaugmentatsiooni kontroll-lapil (310 mg/kg) ning madalaim liivaga ja turbaga kaetud katselappidel (vastavalt 120 ja 130 mg/kg).



Joonis 1. Õliproduktide ja lenduvate fenoolide kontsentratsioonid 2002. a. katselappidel.

Samas turbaga kaetud katselapil, millele lisati bakterisuspensiooni, mõõdeti väga kõrge õliproduktide kontsentratsioon (280 mg/kg) ning murumatiga fütostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni katselappidel olid õliproduktide kontsentratsioonid võrdelised kontrollprooviga (vastavalt 220, 190 ja 200 mg/kg).

3.2. Kultiveeritavate bakteritüvede arvukus

3.2.1. Bakterite arvukused fütostimulatsiooni katses

Kultiveeritavate heterotroofsete ja fenooli lagundavate bakterite arvukused fütostimulatsiooni katses on toodud tabelis 3.

Tabel 3. Kultiveeritavate aeroobsete heterotroofsete ja fenooli lagundavate bakterite arvukused fütostimulatsiooni katses.

<i>Katselapp</i>	<i>Aeroobsed heterotroofid CFU/g</i>	<i>Fenoolilagundajad CFU/g</i>	<i>Fenoolilagundajate osakaal %</i>
K	8.2×10^6	1.0×10^4	0.12
S	4.2×10^6	$1,5 \times 10^4$	0.36
L	1.5×10^6	3.7×10^3	0.25
T	5.7×10^6	6.5×10^5	11.4
M	5.6×10^6	1.2×10^4	0.21

Aeroobsete heterotroofsete bakterite arvukused olid suurusjärgus 10^6 CFU/g, kõige suurem arvukus oli kontrollproovis. Võrreldes esimese katseaastaga langesid heterotroofide arvukused suurusjärgu võrra (Truu jt., 2003).

Fenooli lagundavate bakterite arvukus oli suurim turbaga kaetud katselapil (6.5×10^5 CFU/g), samas kui teistel katselappidel jäid arvukused üks kuni kaks suurusjärku väiksemaks (10^3 - 10^4 CFU/g). Võrreldes esimese aastaga vähenesid teisel katseaastal ka fenoolilagundajate arvukused, v.a. turbaproovis, kus see oli 10 korda suurem kui 1. aastal.

Fenoolilagundajate/heterotroofsete bakterite suhe oli alla 0,4%, välja arvatud turbaproovis, kus fenoolilagundajad moodustasid 11,4% (tabel 3). Kui arvukuste puhul ei olnud olulist vahet kontrollproovil ja teistel katselappidel, siis fenooli lagundavate bakterite osakaal oli kontrollproovis väiksem kui taimedega kaetud proovides.

3.2.2. Bioaugmentatsiooni mõju bakterite arvukusele

Bioaugmentatsiooni mõju kultiveeritavatele aeroobsetele heterotroofidele ei olnud märgatav, kuna nii fütoremediatsiooni kui ka bioaugmentatsiooni katselappidel jäid nimetatud bakterite arvukused suurusjärku 10^6 CFU/g (tabel 4). Vaid bioaugmenteeritud murumati puhul ulatus arvukus 10^7 CFU/g-ni. Olulist erinevust aeroobsete heterotroofsete bakterite arvukuses kontrollproovi ja töötlusega alade vahel ei olnud.

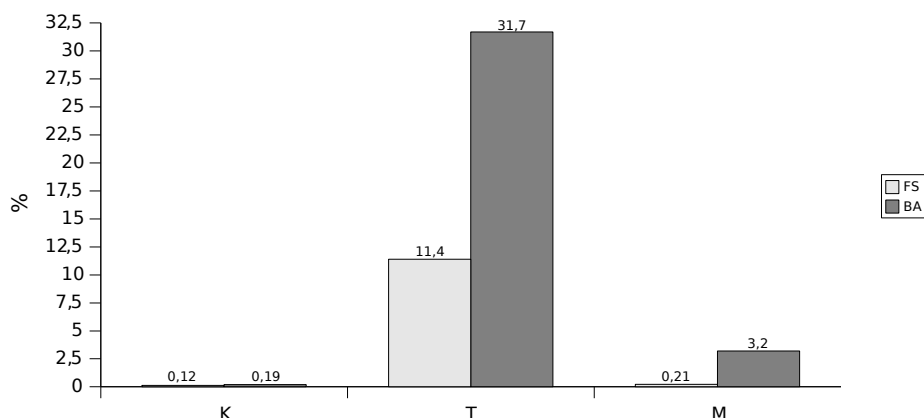
Tabel 4. Bakterite arvukused fütostimulatsiooni (FS) ja bioaugmentatsiooni (BA) katsetel.

<i>Katselapp</i>	<i>Aeroobsed heterotroofid</i>		<i>Fenoolilagundajad</i>	
	<i>FS</i> <i>CFU/g</i>	<i>BA</i> <i>CFU/g</i>	<i>FS</i> <i>CFU/g</i>	<i>BA</i> <i>CFU/g</i>
K	8.2×10^6	6.9×10^6	1.0×10^4	1.3×10^4
T	5.7×10^6	6.0×10^6	6.5×10^5	1.9×10^6
M	5.6×10^6	1.0×10^7	1.2×10^4	3.2×10^5

Fenooli lagundavate bakterite arvukused erinesid fütostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni katsetes. Kontrollproovide arvukused olid mõlema meetodi puhul suurusjärgus 10^4 CFU/g. Samas katselappidel, kuhu lisati biomassi, olid fenoolilagundajate arvukused suurusjärgu võrra suuremad kui ainult taimedega kaetud aladel. Murumatiga katselapi puhul olid bakterite arvukused vastavalt $3,2 \times 10^5$ CFU/g ja $1,2 \times 10^4$ CFU/g ning turbaga kaetud katselapil vastavalt $1,9 \times 10^6$ CFU/g ja $6,5 \times 10^5$ CFU/g. Turbaga kaetud katselapi fenoolilagundajate arvukus oli suurim ka absoluutväärtustes.

Fenoolilagundajate/heterotroofide suhe katselappidel, kus rakendati nii fütostimulatsiooni kui ka bioaugmentatsiooni, on toodud joonisel 2. Fenooli lagundavate bakterite osakaal turbaga kaetud katselapil oli fütostimulatsiooni katse puhul 11,4%, olles sellega oluliselt suurem kui teistel taimedega katselappidel. Bioaugmentatsiooniga mõjutatult tõusis fenoolilagundajate osakaal sellel katselapil koguni 31,7%-ni. Ka murumati puhul oli

fenoolilagundajate osakaal bioaugmentatsiooni mõjul suurenenud, ulatudes 0,21% asemel 3,2%-ni.



Joonis 2: Fenooli lagundavate bakterite osakaal fütostimulatsiooni (FS) ja bioaugmentatsiooni (BA) katsete puhul.

3.3. Mikroobikoosluste potentsiaalse metaboolse aktiivsuse kineetika

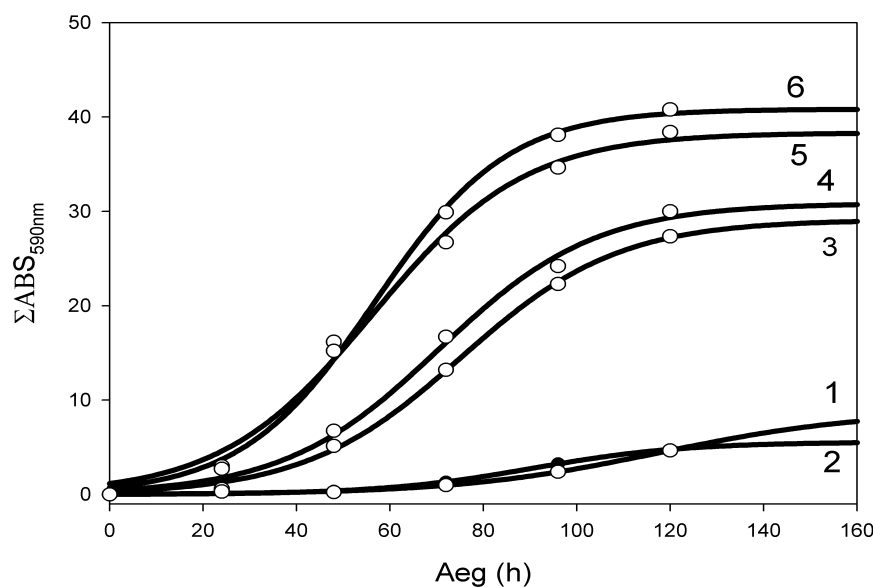
Mikroobikoosluste potentsiaalset metaboolset aktiivsust hinnati Biolog-mikroitiiterplaatide abil katselappidel, millele rakendati lisaks fütostimulatsioonile ka bioaugmentatsiooni. Mudeli parameetrid on toodud tabelis 5.

Tabel 5. Mikroobikoosluste potentsiaalse metaboolse aktiivsuse kineetikat kujutava mudeli parameetrid.

<i>Katselapp</i>	<i>A</i>	<i>r</i>	<i>s (h)</i>	<i>R² (%)</i>
K	8.8±2.7	0.045±0.007	117.8±13.5	99.8
KB	5.5±0.2	0.061±0.05	90.6±2.1	99.8
T	29.1±1.0	0.060±0.04	75.3±1.8	99.8
TB	40.8±1.0	0.070±0.006	56.8±1.5	99.7
M	30.0±1.9	0.06±0.01	70.6±3.5	99.0
MB	38.3±1.9	0.06±0.01	56.4±3.3	98.8

Mikroobikoosluste kineetikamudel, mis põhineb Biolog-mikroitiiterplaatide substraadi tarbimisel, on toodud joonisel 3. Mudeli parameetrid, mis nende kõverate põhjal arvutati, olid statistiliselt erinevad (ANOVA, $P < 0.001$). See tähendab, et muutused mikroobikoosluste struktuuris toimusid taimede ja bioaugmentatsiooni mõjul.

Kõik kineetiliste parameetrite väärtused kohandusid hästi formasaani tekke sigmoidsele kineetikale ($R^2 > 99\%$). Töötlusega katselappide A ja r väärtused olid suuremad kui kontroll-lappidel. A näitab võimalikku maksimaalset värvi redutseerumist, st. kõrgem A väärtus tähendab, et kooslus oli võimelisem rohkem süsinikuallikaid tarbima. Parameeter r on optilise tiheduse eksponentsiaalse muutumise kiirus, mis näitab kui kiiresti värvi redutseerumine toimub. Parameetri s väärtused langesid võrreldes kontrollprooviga, seega kulus kooslustel peale biotervendusmeetodite rakendamist vähem aega kõvera eksponentsiaalse osa keskpunkti jõudmiseni. Kui parameetrite A ning r väärtused inokulandi tihedusest ei sõltu, siis parameeter s on pöördvõrdelises seoses suspensiooni tihedusega,



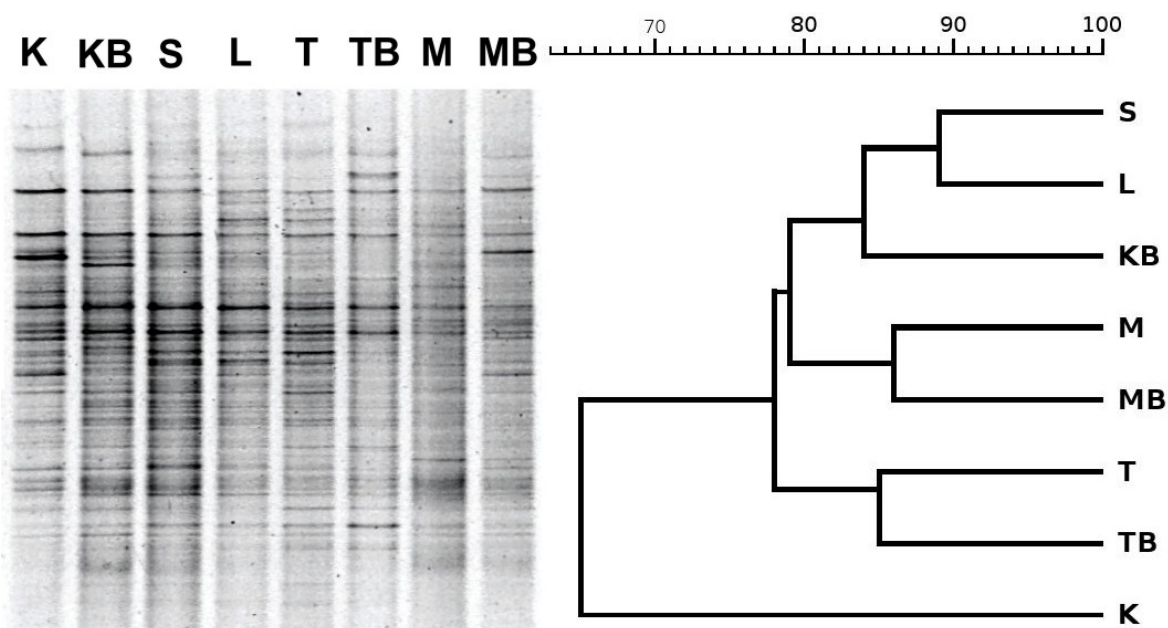
Joonis 3: Summeeritud formasaani tekke kineetika BIOLOG plaatidel. 1 – kontroll; 2 – kontroll biomassiga; 3 – turvas; 4 – turvas biomassiga; 5 – murumatt; 6 – murumatt biomassiga

Need tulemused näitavad bioremediatsiooniga mõjutatud bakterikoosluste suuremat metaboolset aktiivsust võrreldes kontroll-lapiga. Katselapid, millele oli lisatud bakterisuspensiooni, näitasid suuremat potentsiaalset kineetilist aktiivsust võrreldes vaid taimedega kaetud aladega. Suurimad väärtused saavutas murumatiga kaetud proov, millele oli lisatud bakterisuspensiooni.

3.4. Mikroobikoosluste uurimine DGGE meetodiga

DGGE meetodiga 16S rDNA 236 aluspaari pikkuse lõigu põhjal saadud bakterikoosluste triibumustrid on näha joonisel 4. Kõigi proovide korral moodustusid kompleksed, paljudest triipudest koosnevad mustrid, mis viitab mitmekesiste koosluste olemasolule kõigis proovides. Visuaalselt võib mustrites täheldada mitmeid dominantseid, st. tugevamaid triipe, mis näitavad suurema arvukusega populatsioonide olemasolu proovides.

Mõned nendest kordusid läbi mitmete proovide, teised olid iseloomulikud vaid teatud proovidele. Enim oli domineerivaid triipe kontrollproovides ja poolkoksi külvatud muruseemne proovis. Ülejäänud proovides oli dominantseid triipe vähem.



Joonis 4. DGGE meetodiga saadud koosluste triibustikud ja dendrogramm.

Proovide densitomeetrilisel tihedusel põhinev dendrogramm on toodud joonisel 4. Proovid jaotusid nelja põhilisse klastrisse. Kõigist teistest proovidest eraldus selgesti kontrollproov, mille sarnasus teiste proovidega oli vaid veidi üle 60%. Kaks omaette klastrit moodustasid vastavalt turvas ja turvas biomassiga ning murumatt ja murumatt biomassiga. Kõige sarnasemaks osutusid proovid, kuhu külvati ainult muruseemnet ja kus seeme kaeti liivaga. Nende proovidega ühte klastrisse liigendus ka kontrollproov, kuhu oli lisatud bakterisuspensiooni.

4. ARUTELU

Bioremediatsiooni uurimisel on olulised järgmised parameetrid: saasteainete koostis, pinnase struktuur ja hüdrogeoloogia ehk saasteainete liikumine pinnases ja põhjavees ning reostunud koha mikroobikoosluste aktiivsus ja koosseis (Blackburn ja Hafker, 1993). Bioremediatsiooni on siiani siiski kõige rohkem uuritud nn. "musta kasti" põhimõttel – jälgitud on vaid saasteainete vähenemist süsteemis, pööramata tähelepanu mikroobikooslusele, kes biolagundamise eest vastutab (Whiteley ja Bailey, 2000). Antud töös analüüsiti fütostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni mõju nii poolkoksi keemilisele koostisele kui ka bakterikooslustele. Uurides biotervenduse mõju bakterikooslustele, kasutati kultiveerimispõhiseid, mikroobide metaboolset aktiivsust ja mitmekesisust hindavaid ja molekulaarseid, bakterite geneetilisel materjalil põhinevaid meetodeid.

Poolkoks sisaldab rohkelt fenoolseid ühendeid seoses Eesti põlevkivi kõrge hapnikusisalduse ja orgaanilise aine spetsiifilise struktuuriga (Ebber, 2000). Biotervendusmeetodite rakendamine vähendas lenduvate fenoolide hulka kõigil katselappidel 50-100%. Fenoolide kontsentratsioonid olid vähenenud ka võrdluses eelneva aastaga. Kuigi bioaugmentatsiooni kontroll-lapil oli fenoolide kontsentratsioon veidi langenud, tingis fenoolide kontsentratsiooni vähenemise tõenäoliselt eelkõige taimede kasutamine, sest fenoolide kontsentratsioonid olid võrreldes kontrollprooviga võrdselt langenud nii taimedega kaetud kui ka biomassi lisandiga katselappidel. Samas õliproduktide osas olid tulemused vastuolulised. Kui esimese kolme kuuga katselappide rajamisest oli õliproduktide kontsentratsioon võrreldes kontrollprooviga langenud kuni 15 korda (Truu jt., 2003), siis aasta hiljem oli õliproduktide kontsentratsioon seitsmest taimedega kaetud proovist viiel kõrgem kui kontroll-lapil. Näiteks biomassi lisandiga turbaga kaetud lapil oli õliproduktide kontsentratsioon kaks korda suurem kui ainult turbaga kaetud proovialal. Kõigil töötlusega lappidel olid kontsentratsioonid kordades kõrgemad kui eelneval aastal. Sellel on kaks võimalikku seletust. Esiteks, et õlireostus on katsealadel laiguline, olles mõnes kohas tunduvalt kõrgem kui teises kohas. Kuna analüüsil kasutati katselapi mitmest kohast võetud proovide segu, peaks taolise vea teke olema välistatud. Teine, tõenäolisem võimalus on, et viga tehti õliproduktide kontsentratsioonide määramisel, kuna mõõtmismetoodika polnud sobilik. Tõenäoliselt oleks õlilääkide ekstraheerimiseks vaja kasutada tugevamat lahustit kui pentaan või heksaan, näiteks tetrakloorsüsinikku.

Kuigi on teada, et enamikku bakteritest ei ole võimalik kultiveerida (Amann jt., 1995) ning et kultiveeritavate bakterite osakaal võib erinevate süsinikuallikate tarbijate osas erineda (Corgie jt., 2003), rakendatakse nii heterotroofsete kui ka biodegradatiivsete

kultiveeritavate bakterite arvukuste määramist tänapäeval paljudes mikroobikoosluse uuringutes (Bento jt., 2005; Molina-Barahona jt., 2004; Sarkar jt., 2005). Biotervendusmeetodite rakendamine ei avaldanud mõju aeroobsete heterotroofsete bakterite arvukusele, kuna nii kontrollproovide kui ka tötlusega proovide arvukused olid samas suurusjärgus. Bioaugmentatsiooni rakendamine tõstis fenooli lagundavate bakterite arvukust ja osakaalu nii turbaga kui ka murumatiga kaetud katselapil, samas kui kontroll-lappidel arvukus ei tõusnud. Kas arvukuse tõus tekkis seoses lisatud bakterite ellujäämisega või nendes olevate biodegradatiivsete plasmiidide ülekandumisega kohalikele mikroobidele, pole siin rakendatud meetodite abil võimalik öelda.

Fenoolilagundajate arvukus ja fenoolilagundajate/heterotroofide suhe olid eriti suured turbaga kaetud katselappide puhul. Varasemates töödes on näidatud, et fenoolilagundajad erinevad heterotroofsetest bakteritest ja teistest biodegradatiivsetest tüvedest sellegipoolest, et nende arvukused ei korreleeru oluliselt keskkonnaparameetritega nagu pH, lahustunud hapnik ja lämmastik, kuid samas kohanevad nad teistest biodegradatiivsetest bakterirühmadest paremini fenoolse saastusega (Talpsep, jt., 1997). Sellest võib järeldada, et nende mikroobide arvukust mõjutab suuresti fenoolsete saasteainete olemasolu keskkonnas ning nende suur või väike arvukus peegeldab saasteainete kontsentratsiooni. Seega võib turbaga kaetud katselappide fenoolilagundajate suhteliselt suurem arvukus ja osakaal olla osaliselt tingitud sellest, et antud katselappidel esines lenduvaid fenoolseid, samas kui teistel taimestatud katselappidel fenoolseid ei detekteeritud. Kindlasti avaldasid fenoolilagundajate arvukusele positiivset mõju ka taimed. Nimelt olid taimestamata kontroll-lappidel fenoolilagundajate arvukused väiksemad kui turba ja taimedega kaetud katselappidel, vaatamata kontroll-lappide kõrgemale fenoolide kontsentratsioonile.

Võrreldes esimese aastaga langesid teisel katseaastal nii heterotroofsete kui ka fenooli lagundavate bakterite arvukused. Sellist vahet kultiveeritavate bakterite arvukuses esimesel ja teisel katseaastal võib seletada teise aasta suve erakordse kuumuse ja kuivusega, mis mõjus negatiivselt taimede kasvule ja sellest tulenevalt ka bakterikooslustele. Kuna risosfääri muutunud tingimused muudavad eelkõige mikroobikoosluse koosseisu (Marschner jt., 2001), on võimalik, et ebasoodsad keskkonnaolud tingisid bakterite kultiveeritavuse vähenemise, samal ajal kui bakterite biomass jäi samale tasemele. Selle hindamiseks oleks lisaks bakterite arvukuse määramisele vajalik olnud ka bakterite biomassi määramine, mida antud töös ei tehtud.

Mõistmaks mikroobikoosluste rolli erinevates keskkondades, on vajalikud teadmised mikroobikoosluste funktsionaalse mitmekesisuse kohta (Preston-Mafham jt., 2002). Koosluse metaboolne mitmekesisus, väljendatuna Biolog-mikroitiiterplaadi süsinikuallikate

tarbimise muudatustena, on piiratud mikroobide suutlikuse poolt metaboliseerida substraate Biolog-plaadi keskkonnas (Lindstrom jt., 1998). Seega ei saa seda vaadata kui meetodit, mis kirjeldab mikroobide täielikku funktsionaalset mitmekesisust keskkonnaproovis. Sellele vaatamata saab saadud tulemusi kasutada keskkonnaproovide omavaheliseks võrdluseks ja eristamiseks. Taimedega kaetud katselappide bakterikoosluste potentsiaalse metaboolse kineetika mudeli parameetrid erinesid oluliselt kontrollalade koosluste parameetritest. Selle mudeli parameetrite alusel oli võimalik eristada ka taimestatud ja bakterisuspensiooniga töödeldud katselappe. Võrreldes fütostimulatsiooniga tõstis bioaugmentatsiooni rakendamine koosluste metaboolset võimekust mõningal määral.

DGGE meetodiga on võimalik määrata koosluste ligikaudset mitmekesisust, kui võtta eelduseks, et iga triip esindab ühte populatsiooni (Ranjard jt., 2000). Samas tuleb arvesse võtta meetodist tulenevaid kitsendusi. Erinevate järjestustega segmendid võivad peatuda samal positsioonil (Vallaeyts jt., 1997). Vähemarvukamate populatsioonide amplifikatsioon võib jääda alla detekteerimispiiri, kuna on üldiselt aktsepteeritud, et ainult peamised populatsioonid, mis moodustavad kooslusest rohkem kui 0,1-1%, on DGGE profiilidel nähtavad (Murray jt., 1996; Muyzer jt., 1993). Seetõttu saaks triipude arvu ja koosluse liikmete arvu vahele otsese seose tõmmata vaid mitte väga mitmekesiste koosluste puhul. Sellele vaatamata on visuaalsel analüüsil üldisemaid järeldusi võimalik teha.

Triipude intensiivsust DGGE profiilis saab siduda vastava bakteripopulatsiooni arvukusega analüüsitava proovis, st. tugevam triip näitab arvukamat populatsiooni (Murray jt., 1996). Rohkem kui teistes proovides oli tugevaid triipe nii fütostimulatsiooni kui ka bioaugmentatsiooni kontrollproovides ning poolkoksi külvatud muruseemne proovis, samas kui taimedega katmine ja bakterisuspensiooniga töötlemine vähendas DGGE profiilis märgatavate tugevate triipude arvukust. Kui võrrelda dominantsete populatsioonide rohkust DGGE profiilis ja Biolog-plaatide kineetikat, siis selgub, et dominantsed triibud esinesid eelkõige katselappidel, mille potentsiaalse kineetika mudeli parameetrid A ja r olid väiksemad (kontroll ja kontroll biomassiga). Taimestatud katselappidel, mille puhul potentsiaalse kineetika vastavad parameetrid olid suuremad, oli triibustik ühtlasem ja tugevaid triipe vähem. Dominantsete populatsioonide vähenemine võib seega olla tulnud sellest, et taimede mõjul muutus keskkond sobilikumaks paljudele bakteripopulatsioonidele ja suurem konkurents ei lasknud tugevalt domineerivatel populatsioonidel tekkida. Mitmed kontrollproovides dominantsed triibud kordusid läbi kõigi proovide, viidates sellele, et taimestamata poolkoksis esinevad bakteripopulatsioonid olid ka pärast fütostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni rakendamist pinnases olemas, kuid nende osakaal koosluses oli muutunud (vähenenud).

Dominantsete populatsioonide kindlakstegemiseks on võimalik vastav triip geelist välja lõigata ja DNA sekveneerida. Seda võimalust on mikroobiökoloogias tihti kasutatud (Evans jt., 2004; Kowalchuk jt., 2003; Siciliano jt., 2003). Seda rakendati ka käesoleval juhul, kuid valitud meetod – otse geelist väljaleotatud DNA lõigu amplifikatsioon ja sekveneerimine ilma kloneerimiseta – ei õigustanud ennast. Järjestuste kvaliteet oli kehv ning kuna triibumustri loomiseks kasutati lühikest, vaid 236 aluspaari pikkust lõiku 16S rDNast, ei olnud võimalik tüvesid identifitseerida. Isegi pikemat, ligi 500 aluspaari pikkust fragmenti sekveneerimisel kasutades soovitatakse saadud järjestuse fülogeneetilise paigutuse ja sarnasuse interpreteerimisel ettevaatlik olla (Evans jt., 2004). Seetõttu pole sekveneerimise andmeid töös esitatud.

DGGE mustrite klasteranalüüsi puhul kasutati Pearsoni korrelatsioonikordajat, mistõttu põhineb moodustunud dendrogramm triibumustrite densitomeetrilisel tihedusel. Pearsoni korrelatsioonikordaja on objektiivne koefitsent, mis võimaldab arvesse võtta iga triibu suhtelist tugevust ning mida soovitatakse kasutada DGGE andmete analüüsiks koefitsentide asemel, mis arvestavad vaid triipude arvu ja paigutust (Boon jt., 2002). Klasteranalüüs näitas muutuste teket bakterikoosluste struktuuris mõlema töötluse puhul. Muutused tekkisid nii erinevate taimestatud katselappide vahel kui ka fütostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni katselappide vahel. Taimestamata kontrollproovi eristumine taimestatud katselappidest oli väga selge. Huvitav oli bioaugmentatsiooniekspriimendi kontrollproovi liigitumine taimelega kaetud proovilappidega samasse klastrisse ja selle suur erinevus fütostimulatsiooni kontrollproovist. See näitab, et kooslustes toimusid muutused ka ainuüksi bakterisuspensiooni lisamisel poolkoksi. Turbaga ja murumatiga kaetud fütostimulatsiooni- ja bioaugmentatsioonikatsete proovid liigitusid küll samasse klastrisse, kuid bioaugmentatsiooni rakendamine oli põhjutanud muutuse proovide mikroobikooslustes, kuna proovide sarnasus jäi 80 ja 90% vahele.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et fütostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni rakendamine põhjustas muutusi poolkoksi mikroobikooslustes ning suurendas saasteainete degradatsiooni ja mikroobikoosluste potentsiaalset metaboolset aktiivsust. Bakterite biomassi lisamine avaldas degradatsioonile positiivset mõju – suurenes kultiveeritavate fenoolilagundajate arvukus ja osakaal ning koosluste potentsiaalne metaboolne aktiivsus võrreldes vaid taimelega kaetud proovidega. Bioaugmentatsiooni ja fütostimulatsiooni katselappide mikroobikooslused eristusid selgelt ka liigilise koosseisu põhjal. Samas tõstab bakterisuspensiooni lisamine tunduvalt remediatsiooni maksumust, mistõttu tuleb järgnevate uuringutega näidata selle olulist positiivset mõju võrreldes poolkoksi katmisega vaid taimkattega.

KOKKUVÕTE

Antud töös viidi läbi katsed testimaks biotervendusmeetodite mõju poolkoksis sisalduvate saasteainete remediatsiooniks. Eksperimendiks rajati katselapid Kohtla-Järve linna lähedal asuvale ligikaudu 10 aasta vanusele poolkoksimäele. Analüüsi proove, mis koguti 15 kuud peale katselappide rajamist. Katselappidel oli rakendatud fütostimulatsiooni ehk pinnase katmist taimedega ja bioaugmentatsiooni ehk spetsiifiliste biodegradatsioonivõimetega bakterite lisamist pinnasesse. Analüüsi töötluste mõju reoainete lagundamisele ja poolkoksi mikroobikooslustele.

Pinnaseproovide keemilised analüüsid näitasid biotervendusmeetodite mõju lenduvatele fenoolidele, mille kontsentratsioon langes kuni 100% võrreldes kontrollalaga. Õliproduktide osas olid andmed vastuolulised ning vajalik on analüüsimeetodite muutmine.

Kultiveeritavate aeroobsete heterotroofsete bakterite arvukusele biotervendusmeetodid mõju ei avaldanud. Fenooli lagundavate bakterite arvukus ja osakaal tõusid seoses bioaugmentatsiooni rakendamisega.

Mikroobide potentsiaalset metaboolset aktiivsust hinnati Biolog mikrotiiterplaatide abil. Taimedega kaetud katselappide bakterikoosluste potentsiaalne metaboolne kineetika oli oluliselt kõrgem kui kontrollaladel. Bioaugmentatsiooni rakendamine tõstis koosluste metaboolset võimekust mõningal määral võrreldes fütostimulatsiooniga.

DGGE meetodiga loodud 16s rDNA profiilide visuaalne analüüs näitas, et poolkoksi katmine taimedega ja töötlemine bakterisuspensiooniga vähendas dominantsete triipude arvukust profiilis, mis viitab suuremale konkurentsile bakteripopulatsioonide vahel. Klasteranalüüs näitas muutuste teket bakterikoosluste struktuuris seoses fütostimulatsiooni ja bioaugmentatsiooni rakendamisega.

Antud töö põhjal võib järeldada, et põlevkivitööstuse poolt tekitatud keskkonnaprobleeme oleks osaliselt võimalik lahendada mikroobsetel protsessidel põhinevate meetodite abil. Bioaugmentatsiooni rakendamine mõjus remediatsioonile positiivset, kuid selle kasutamise vajadust tuleb näidata ka järgnevate uuringutega, kuna bakterisuspensiooni lisamine tõstaks tunduvalt remediatsiooni maksumust.

SUMMARY

“The use of bioremediation for the enhancement of biodegradation in the semi-coke”

Oil shale industry has created a serious pollution problem in North-East Estonia. There are dump sites consisting of up to 100 millions tons of solid waste called the semi-coke. Toxic compounds leaking and evaporating from these dump sites are polluting the environment nearby.

In this work field experiments were carried out in order to test the effect of phytoremediation and bioaugmentation for remediation of pollutants in semi-coke. Plant treatment based on a grass mixture and bacterial biomass consisting of three bacterial stains was applied to experimental plots. The microbial communities from test plots were analysed, using a polyphasic approach.

The chemical analysis of soil samples showed impact of plant treatment on the degradation rate of volatile phenols. The concentration of volatile phenols decreased up to 100% compared to the control plot. The results of the concentration of oil products were controversial and more suitable analysis methods must be applied.

The abundance of aerobic heterotrophic and phenol-degrading bacteria was estimated by total viable bacterial counts. The number of heterotrophic bacteria was not influenced by the treatments while the number of phenol-degrading bacteria and the rate of phenol-degraders/heterotrophs was risen after the application of bioaugmentation.

The potential metabolic activity of microbes was estimated by using kinetic model based on average well color development of Biolog EcoPlates. Model parameters indicated a rise in the metabolic activity of bacterial communities due to phytoremediation and bioaugmentation.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) allowed the comparison of microbial communities based on differences in 16s rDNA. Visual analysis revealed higher diversity in the treatment plots compared to semi-coke. Dendrogram based on Pearson coefficient showed variation between the DGGE fingerprints of different treatments.

Results of this work allow to draw the conclusion that environmental problems created by oil shale industry could be partly solved by the use of bioremediation methods. Differences between the phytoremediation and bioaugmentation treatments were detectable. Because the application of bioaugmentation would rise the cost of remediation further studies are needed to confirm the necessity of biomass application.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams M. 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers Inc. New York, 445-447.
- Aldrett S., Bonner J., Mills M., Autenrieth R., Stephens F. 1997. Microbial degradation of crude oil in marine environments tested in a flask experiment. *Water Resources*, 31: 2840-2848.
- Amann R., Ludwig W., Schleiffer K. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143-169.
- Anderson T., Guthrie E., Walton B. 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology*, 27: 2630-2636.
- Bauchop, T., Elsdén, S.R. 1960. The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *Journal of General Microbiology*, 23: 469-495.
- Bento F., Camargo F., Okeke B., Frankenberger W. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96: 1049-1055.
- Blackburn J., Hafker W. 1993. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *Tibtech*, 11: 328-333.
- Boon N., Windt W., Verstraete W., Top E. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 101-112.
- Brazil G., Kenefick L., Callanan M., Haro A., de Lorenzo V., Dowling D., O'Gara F. 1995. Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of bph gene expression in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1946-1952.
- Chang Y., Corapcioglu M. 1998. Plant-enhanced subsurface bioremediation of nonvolatile hydrocarbons. *Journal of Environmental Engineering*, 112: 162-169.
- Corgie S., Joner E., Leyval C. 2003. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant and Soil*, 257: 143-150.
- Cunningham S., Berti W. 1993. Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cell Developmental Biology*, 29P: 207-212.
- Dixon B. 1996. Bioremediation is here to stay. *ASM News*, 62: 527-528.

- Dojika M., Hugenholtz P., Haack S., Pace N. 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3869-3877.
- Dua M., Sethunathan N., Johri A. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 143-152.
- Ebber A. 2000. Separation of oil shale phenols by capillary electrophoresis. *Oil Shale*, 17: 233-240.
- Evans F., Rosado A., Sebastian G., Casella R., Machado P., Holmström C., Kjelleberg S., van Elsas J., Seldin J. 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 295-305.
- Fromin N., Hamelin J., Tarnawski S., Roesti D., Jourdain-Miserez K., Forestier N., Teyssier-Cuvelle S., Gillet F., Aragno M., Rossi P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 11: 634-643.
- Glick B. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21: 383-393.
- Heinaru E., Merimaa M., Viggor S., Lehiste M., Leito I., Truu J., Heinaru A. 2005. Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 363-373.
- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U., Heinaru, A. 2000. Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol and p-cresol degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology*, 1097: 1-11.
- Hiltner L. 1904. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderes Berücksichtigung der Grundungen und Brauche. *Arbeitshefte der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschafts Berlin*, 98: 59-78.
- Iwamoto T., Nasu M. 2001. Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92: 1-8.
- Joner E., Leyval C. 2003. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. *Agronomie*, 23: 495-502.
- Juck D., Charles T., Whyte L., Greer C. 2000. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 33: 241-249.

- Kahru A., Kurvet M., Kurvet I. 1997. Study of the toxicological impact of different components of ash-heap water (sulphur rich phenolic leachate) using luminescent bacteria as test organisms. *Oil Shale*, 14: 469-475.
- Khan A., Kuek C., Chaudhry T., Khoo C., Hayes W. 2000. Role of plants, mucorhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 41: 197-207.
- Kowalchuk G., Os G., Aartrijk J., Veen J. 2003. Microbial community responses to disease management soil treatments used in flower bulb cultivation. *Biology and Fertility of Soils*, 37: 55-63.
- Kuiper I., Bloemberg G., Lugtenberg B. 2001. Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 1197-1205.
- Kuiper I., Lagendijk E., Bloemberg G., Lugtenberg B. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17: 6-15.
- Lindstrom, J.E., Barry, R.P., Braddock, J.F. 1998. Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C-source utilization patterns. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 231-239.
- Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40: 339-346.
- Marschner P., Yang C., Lieberei R., Crowley D. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1437-1445.
- Molina-Barahona L., Rodriguez-Vazquez R., Hernandez-Velasco M., Vega-Jarquín C., Zapata-Perez O., Mendoza-Cantu A., Albores A. 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Applied Soil Ecology*, 27: 165-175.
- Murray A., Hollibaugh J., Orrego C. 1996. Phylogenetic composition of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2676-2680.
- Muyzer G., de Vaal E., Underlitten A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.

- Myers R., Sheffield, V.C., Cox, D.R. 1988. Detection of single base changes in DNA: ribonuclease cleavage and denaturing gradient gel electrophoresis. IRL Press, Oxford, 95-133.
- Neralla S., Weaver R. 1997. Inoculants and biodegradation of crude oil floating on marsh sediments. *Bioremediation Journal*, 1: 89-96.
- Øvreås L., Forney L., Daae F. E., Torsvik V. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3367-3373.
- Parmasto E. 1996. *Biosüsteematika teooriad ja meetodid*. Tartu, 111.
- Pelz O., Tesar M., Wittich R., Moore E., Timmis K., Abraham W. 1999. Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: unraveling the network of carbon sharing in a pollutant-degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry. *Environmental Microbiology*, 1: 167-174.
- Pieper D., Reineke W. 2000. Engineering bacteria for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 262-270.
- Preston-Mafham J., Boddy L., Randerson P. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles - a critique. *FEMS Microbiology Ecology*, 42: 1-14.
- Rahman K., Rahman T., Lakshmananperumalsamy P., Banat I. 2002. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *Journal of Basic Microbiology*, 42: 284-291.
- Ranjard L., Poly F., Nazareth S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151: 167-177.
- Ridder-Duine A. D., Kowalchuk G., Klein Gunnewiek P., Smant W., van Veen J., de Boer W. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural sands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 349-357.
- Rittmann B. 2004. Definition, objectives and evaluation of natural attenuation. *Biodegradation*, 15: 349-357.
- Ruberto L., Vazquez S., Mac Cormack W. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52: 115-125.

- Sarkar D., Ferguson M., Datta R., Birnbaum S. 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, 136: 187-195.
- Schwitzguebel J., Lelie D., Baker A., Glass D., Vangronsveld J. 2002. Phytoremediation: European and American trends. *Journal of Soils and Sediments*, 2: 91-99.
- Scow K., Hicks K. 2005. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 1-8.
- Siciliano S., Germida J., Banks K., Greer C. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 483-489.
- Simon M., Bonner J., Page C., Townsend R., Mueller D., Fuller C., Autenrieth R. 2004. Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland. *Ecological Engineering*, 22: 273-277.
- Singer A., van der Gast C., Thompson I. 2005. Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *TRENDS in Biotechnology*, 23: 74-77.
- Steer J., Harris J. 2000. Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 869-878.
- Susarla S., Medina, V.F., McCutcheon S. 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*, 18: 647-658.
- Talpsep, E., Heinaru, E., Truu, J., Laht, T., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A. 1997. Functional dynamics of microbial populations in waters contaminated with phenolic leachate. *Oil Shale*, 14: 435-453.
- Törnblom E., Sondergaard M. 1999. Seasonal dynamics of bacterial biomass and production on eelgrass *Zostera marina* leaves. *Marine Ecology Progress Series*, 179: 231-240.
- Truu J., Kärme L., Talpsep E., Heinaru E., Vedler E., Heinaru A. 2003. Phytoremediation of solid oil shale waste from the chemical industry. *Acta Biotechnology*, 23: 301-307.
- Vallaeyts T., Topp E., Muyzer G. 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology*, 24: 279-285.
- Van Veen J. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 121-135.

- Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60: 407-438.
- Venosa A., Haines J., Allen D. 1992. Efficacy of commercial inocula in enhancing biodegradation of weathered crude oil contaminating a Prince William Sound beach. *Journal of Industrial Microbiology*, 10: 1-11.
- Whiteley A., Bailey M. 2000. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2400-2407.
- Whiteley A., Wiles S., Lilley A., Philp J., Bailey M. 2001. Ecological and physiological analyses of pseudomonad species within a phenol remediation system. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 79-88.
- Winzingerode F., Gübel U., Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 213-229.
- Woese C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271.
- Wright A., Weaver R. 2004. Fertilization and bioaugmentation for oil biodegradation in salt marsh mesocosms. *Water, Air and Soil Pollution*, 156: 229-240.