

Tartu Ülikool
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut
Kolloid- ja keskkonnakeemia õppetool

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogias (12 EAP)

**Mükoremediatsiooni kasutamine saasteainete eemaldamiseks
reoveekäitluse liigmudast ja kompostist**

Anette Merivee

Juhendaja:
Ergo Rikmann, PhD
Kaasjuhendaja:
Ivar Zekker, PhD

Tartu 2026

Infoleht

Mükoremediatsiooni kasutamine saasteainete eemaldamiseks reoveekäitluse liigmudast ja kompostist

Käesoleva töö eesmärk oli analüüsida, kui efektiivselt saab kasutada mükoremediatsiooni raskmetallide ja püsivate orgaaniliste ühendite nagu PFASide eemaldamiseks reoveekäitluses tekkinud anaeroobsest mudast ning kompostist. Töö praktilises osas viidi erineva koostisega substraatidel läbi neljakuuline seenkäitlus, milleks kasutati austerservikuid (*Pleurotus ostreatus*). Enne ning peale seenkäitlust analüüsiti substraadis PFASide, raskmetallide, lämmastiku, fosfori ja orgaanilise aine sisaldust. Analüüsides selgus, et PFASide tase oli kõrgem komposti substraadil ning seenkäitlusega lagundati või sorbeeriti hüüfide pinnale pika süsinikuahelaga PFASe. Metallide sisaldus jäi kõigis proovides alla Euroopa Liidu kehtestatud piirnormide ning enam sidusid seened niklit ning pliid.

Märksõnad: *mükoremediatsioon, PFAS, raskmetallid*

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll, P305 Keskkonnakeemia

Abstract

Using Mycoremediation for Removing Organic Pollutants from Sewage Sludge and Compost.

The aim of this thesis was to assess the effectiveness of using mycoremediation for removing organic pollutants such as PFAS and heavy metals from sewage sludge and compost. The experiment included a four-month long processing of different sludge and compost substrates by oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). Before and after processing the concentration of PFAS, heavy metals, nitrogen, phosphorus and organic matter was analysed. It appears that the level of PFAS was higher in compost substrates and during the experiment fungi degraded or sorbated long-chain PFAS rather than short-chain PFAS. Heavy metal concentrations were within the established limits in the EU in all the samples. During the experiment the most sorbated metals by fungi were nickel and lead.

Keywords: *mycoremediation, PFAS, heavy metals*

CERCS: T270 Environmental technology, pollution control, P305 Environmental chemistry

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	4
2. Teoreetiline taust.....	5
2.1. Ülevaade raskmetallidest.....	5
2.2. Ülevaade PFASidest.....	6
2.3. Bioremediatsioon.....	7
2.3.1. In-situ meetodid.....	7
2.3.2. Ex-situ meetodid.....	9
2.3.3. Mükoremediatsioon.....	10
3. Metoodika.....	12
3.1. Katsepakkide ettevalmistus.....	12
3.2. Lämmastiku sisalduse määramine.....	12
3.3. Fosfori sisalduse määramine.....	14
3.4. Keemilise hapnikutarbe määramine.....	15
3.5. Metalli analüüs.....	16
3.6. Tehisintellekti kasutamine.....	16
4. Tulemused ja arutelu.....	17
4.1. TKN, üldfosfori ja KHT sisaldus.....	17
4.2. Metallide sisaldus.....	20
4.3. PFASide sisaldus.....	23
5. Kokkuvõte.....	25
Summary.....	27
Tänuavaldused.....	29
Kasutatud kirjandus.....	30
Lisad.....	35
Lisa 1. Katsepakkide koostised.....	35
Lisa 2. PFAS analüüside tulemused enne ja peale seenkäitlust.....	36

1. Sissejuhatus

Tööstusest, põllumajandusest ja jäätmekäitlusest satub keskkonda hulgaliselt saasteaineid (Vaksmäe jt, 2023). Olgu nendeks ravimijäägid, raskmetallid, püsivad orgaanilised ühendid või per- ja polüfluoritud alküülühendid ehk PFASid. Praegu toimub paljude saasteainete eemaldamine keskkonnast reoveekäitluse käigus, kasutades filtratsioonimeetodeid või keemilisi protsesse (Xiang jt, 2022). Kuigi efektiivsed, on eeltoodud puhastusmeetodid kulukad ning energiamahukad. Samuti pole neid alati mõistlik rakendada väikeste puhastite puhul, kus võib olla ebaregulaarne sissevool. Siiski on Euroopa Liit kehtestamas järjest rangemaid nõudeid saasteainete eemaldamiseks ka väikeste puhastite puhul (Asulareovee puhastamise direktiiv, 2024).

Bioremediatsioon on potentsiaalikas meetod mitmete reoainete eemaldamiseks keskkonnast, eeskätt pinnasest aga ka vesikeskkonnast (Kriipsalu jt, 2016). Raskmetallide eemaldamise puhul on uuringud näidanud mükoremediatsiooni efektiivsust, kuid peamiselt on pinnase tervendamise eesmärgil kasutatud hallitusseeni ning viljakehi moodustavate kandseente potentsiaal on jäänud tagaplaanile (Singh ja Singh, 2024; Vaksmäe jt, 2023).

Käesoleva töö eesmärk on analüüsida, kui efektiivselt saab kasutada mükoremediatsiooni raskmetallide ja püsivate orgaaniliste ühendite nagu PFASide eemaldamiseks reoveekäitluses tekkinud anaeroobsest mudast ning kompostist. Muuhulgas on eesmärk kasutada ära tekstiilijääkmeid ning põlevkivitööstusest tekkinud tuhka seenemassi kasvatamisel.

2. Teoreetiline taust

2.1. Ülevaade raskmetallidest

Raskmetallid (ka raskemetallid) on metallid, mille tihedus on üle viie grammi kuupsentimeetri kohta ning mille liigne kontsentratsioon keskkonnas kahjustab nii tervist kui reostab keskkonda (EKI, i.a). Levinumad raskmetallid on plii, tsink, nikkel, kaadmium, elavhõbe, kroom, vask ja arseen (Quasem jt, 2021). Osad raskmetallid (Zn, Fe, Cu, Mo ja Mn) loetakse mikroelementide hulka ning need on taimedele ja loomadele väga väikeses koguses vajalikud, kuid suures hulgas osutuvad toksiliseks (Jaishankar jt, 2014). Käesoleval ajal on Euroopa Liidus joogivees kehtestatud piirmäärad kümnele raskmetallile ning reoveemudas on reglementeeritud Hg, Cd, Pb, Ni, Cu, Zn, Cr, kuid EL õiguslikud regulatsioonid liiguvad aina enam ka orgaaniliste saasteainete rangema piiramise suunas (EL joogivee direktiiv, 2020; Reoveesette kasutamise direktiiv, 2019). Reglementeeritud metallidest on organismidele toksilisemad plii, kaadmium ja elavhõbe.

Raskmetallid satuvad keskkonda muuhulgas geoloogiliste ja looduslike protsesside käigus, kuid tänapäeval peamiselt inimtegevuse tõttu, eelkõige just tööstusest, kaevandustest, jäätme- ning põllumajandusest (Fashola jt, 2016; Girma, 2015; Gupta ja Kumar, 2017). Keskkonnas esinevad raskmetallid tavaliselt keemiliste ühenditena: oksiidide, hüdroksiidide, sulfaatide, sulfiidide ja orgaaniliste ühendite koosseisus (Goutam jt, 2021), kuid harva võib keemiliselt vähem aktiivseid raskmetalle, nagu elavhõbe, leiduda ka puhaste elementidena. Need elemendid püsivad keskkonnas pikka aega (Fashola jt, 2016) ja akumuleeruvad toiduahelas (Norman, 2022).

Bioloogiliselt pole võimalik raskmetalle lagundada, küll aga saab muuta metallide oksüdatsiooniastet, mis vähendab ühendite toksilisust, suurendab nende liikuvust või vastupidi võimaldab keskkonnast välja leostada (Vaksmäa jt, 2023), peamiselt mikroorganismide toimetel. Raskmetallid, muuhulgas näiteks kaadmium ja kuuevalentne kroom, on kantserogeensed ka väikestes kogustes, lisaks põhjustavad need inimestel mitmete organite talitushäireid ning probleeme reproduktiivorganites (Singh jt, 2011; Jaishankar jt, 2014). Samuti põhjustavad raskmetallid aeglast kasvu ja mutatsioone nii taimedes kui loomades ja inhibeerivad näiteks seente kasvu (Mohamadhasani ja Rahimi, 2022).

2.2. Ülevaade PFASidest

PFASid ehk per- ja polüfluoritud alküülühendid on sünteetilised ühendid, mida kasutatakse alates 1950. aastatest laialdaselt tööstuses ning tarbekaupades tänu PFASide hüdro- ja lipofobsetele omadustele (Zhang jt, 2022). PFASid koosnevad erineva pikkusega süsinikuahelast, kus enamik või kõik vesinikuaatomitest on asendatud fluoriaatomitega, kusjuures süsinikuga võib olla seotud veel ka hüdrofoobne funktsionaalrühm (Tang ja Kristanti, 2022). PFASid jagatakse süsiniku ahela pikkuse järgi pikkadeks (ingl *long-chain PFAS*), kui ahelas on kaheksa ka rohkem süsinikuaatomit, ja lühikesteks (ingl *short-chain PFAS*) kui ahelas on alla kaheksa süsinikuaatomi. Tänu tugevatele C-F sidemetele on PFASid termiliselt ja keemiliselt stabiilsed (Glüge jt, 2020) ning neid kasutatakse nii tekstiilide, pindade kui pakendite vetthülgavuse suurendamiseks, köögitarvikute kõrbemiskindluse (ingl *non-stick*) tõstmiseks ja tuletõrjehahtudes (Tang ja Kristanti, 2022). Laia kasutasala tõttu on PFASid levinud saasteaine keskkonnas ning suure stabiilsuse tõttu nimetatakse neid tihti “igavesteks kemikaalideks” (ingl *forever-chemicals*).

Keskkonda levivad PFASid eeskätt reoveepuhastuse ja prügilate kaudu. Keskkonnas PFASid ei lagune, vaid bioakumuleeruvad ja satuvad toidu ning joogivee kaudu inimorganismi (Tang ja Kristanti, 2022). On täheldatud PFASide kahjulikku mõju kilpnäärme talitusele ja immuunsüsteemile, samuti reproduktiivorganitele ning ühendid võivad olla kantserogeensed (Zhang jt, 2022). PFASide toksilise mõju tõttu on kehtestatud sisalduse piirmäärad nii joogivees kui toidus. On tavaline, et PFASidele kehtestatakse summaarsed piirmäärad nagu PFAS 4, millega piiratakse levinumate ja inimesele eriti toksiliste ühendite (perfluorooktaansulfoonhappe, perfluorooktaanhappe, perfluoroheksasulfoonhappe ja perfluorononaanhappe ehk PFOS, PFOA, PFHxS ja PFNA) sisaldust (Herco Pollet Water Group veebileht, i.a). Alates 2026 aasta jaanuarist on Euroopa Liidu liikmesriikidel kohustus monitoorida PFASide taset joogivees, kusjuures kõikide PFASide sisalduste summa peab jääma alla 0,5 µg/l ning 20 tervisele kahjulikuma PFASi kontsentratsioon peab jääma alla 0,1 µg/l (EL joogivee direktiiv, 2020). EL-l on eesmärk üle 150 000 inimekvivalendiga reostuskoormusega reoveepuhastitest hakata eemaldama mikrosaasteaineid, mille hulka kuuluvad ka PFASid, alates 2045. aastast (Asulareovee puhastamise direktiiv, 2024). PFASide eemaldamiseks on alternatiivse meetodina võimalik kasutada ka bioremediatsiooni.

Seentega on potentsiaali tervendada pinnast PFASidest. Tseng näitab oma töös (2012), et keskkonnas leiduvatel hallitusseentel on võime biotransformatsiooni käigus lühikese aja

jooksul eemaldada keskkonnast selliseid PFASe nagu PFOA (perfluorooktaanhappe) ja PFOS (perfluorooktaansulfoonhappe). Tseng kirjeldab, et neljateist päeva jooksul eemaldas *Geomyces* perekonda kuuluv seen 13,4% PFOAst ja 17,7% PFOSist. *Pseudeurotium* perekonna esindaja eemaldas sama ajaga 29,2% PFOSidest, kuid PFOAd ei lagundanud. Samas suutsid laboris inkubeeritud hallitusseened eemaldada madalamal kontsentratsioonil ja kuu aja jooksul kuni 72% PFOA lähteainetest FTOHidest (flourotelomeeralkoholid), kuid transformeerisid need PFOAdeks. (Tseng, 2012)

2.3. Bioremediatsioon

Bioremediatsiooniks ehk biotervendamiseks nimetatakse protsessi, mille käigus taimede ja mikroorganismide abiga lagundatakse saasteaineid või vähendatakse nende toksilisust keskkonnas. Mikroorganismid lagundavad ensümaatiliste redoksreaktsioonide abil saasteained neile vajalikeks metaboliitideks, süsihappegaasiks ja veeks (Kuppan jt, 2024). Peamiselt kasutatakse oksüdaase ja peroksüdodaase, mis kasutavad elektronaktseptorina vastavalt hapniku või peroksiidi (Vaksmäa jt, 2023). Protsessi efektiivsus sõltub nii keskkonnatingimustest kui ka saasteaine iseloomust.

Oma ülevaates (2018) toob Maitra välja, et pinnase temperatuuri mõju bioremediatsioonile on märgatav eeskätt põhjapoolkeral, kus mulla temperatuur on enamik aastast efektiivse mikroobse lagundamise jaoks liiga madal. Samuti toob ta välja, et keskkonna anaeroobsus ning vähene toitainete kättesaadavus vähendavad bioremediatsiooni efektiivsust. Selleks, et keskkond oleks bioremediatsiooni abil puhastatav, peab reostuse põhjustanud saasteaine olema biolagundatav ning kättesaadav lagundavatele organismidele. (Maitra, 2018)

Keskkonnast tulenevate mõjude vähendamiseks töötatakse pidevalt välja uusi bioremediatsiooni tehnoloogiaid (Kuppan jt, 2024). Bioremediatsiooniga on võimalik vähendada muuhulgas tööstusest tuleva heitvee, raskmetallide, pestitsiidide ja muude saasteainete toksilisust (Sharma, 2021) ning selleks kasutatakse nii *in-situ* kui ka *ex-situ* meetodeid.

2.3.1. *In-situ* meetodid

In-situ bioremediatsiooni käigus töödeldakse pinnast või põhjavett mikroorganismidega saastatud alal koha peal, ilma pinnase väljakaevamiseta ja suurte keskkonnahäiringuteta

(Kuppan jt, 2024). Lisaks loomulikule biolagunemisele võib klassikalised *in-situ* meetodid jagada üldiselt kolmeks: bioventileerimine, biostimulatsioon ja bioaugmentatsioon (Maitra, 2018).

Kõige levinuma biopuhastusmeetodi, bioventileerimise puhul rikastatakse saastunud keskkonda õhuga, et kiirendada mikroorganismide elutegevust ja aeroobsete protsesside käiku, et suurendada saasteainete lagundamist (Kensa, 2011). Nagu Goswami jt oma ülevaates (2018) välja toovad, täidavad sama eesmärgi kõik eespool mainitud meetodid. Biostimulatsiooni käigus lisatakse saastatud keskkonda elektrondooneid ja vajalikke toitaineid nagu fosfor ja lämmastik, mis tekitab mikroorganismidele soodsama keskkonna lagundamisprotsesside läbiviimiseks. Bioaugmentatsiooni puhul lisatakse keskkonda geneetiliselt muundatud bakterite või arhede konsortium, mis sobivad saasteaine remediatsiooni kiirendamiseks. Bioaugmentatsiooni kasutatakse eelkõige just naftareostuse remediatsiooniks. (Goswami jt, 2018)

Kuppan jt (2024) toovad välja, et *in-situ* meetodite suureks eeliseks on nende kulutõhusus, kuna ei tehta kulutusi otsestele kaevetöödele ega saastunud materjali transpordile. Samuti pole reostuse kõrvaldamiseks vaja ehitada eraldi infrastruktuuri ning saastunud keskkonna häiringud on minimaalsed. *In-situ* meetoditega on võimalik vähendada reostust suurel alal, kuid selleks võib kuluda aastaid. (Kuppan jt, 2024)

Vaatamata sellele, et bioremediatsiooni käigus suudetakse orgaanilised saasteained muuta süsihappegaasiks ja veeks, võivad tekkinud vaheühendid osutada algsest saasteinest toksilisemaks nii inimesele kui ka keskkonna mikroobikooslusele (Sharma, 2021), mis pidurdab edasist remediatsiooni. Näiteks toovad Vaksmaa jt oma artiklis (2023) välja, et pestitsiidide degradatsioonil võib tekkida toksiline metüül-paaksoon, mida seostatakse mitmete terviseriskidega (Vaksmaa jt, 2023). Raskmetallid ja püsivad orgaanilised saasteained võivad inhibeerida mikroobide elutegevust ja vähendada sellega bioremediatsiooni efektiivsust (Sharma, 2021). Suureks puudujäägiks *in-situ* bioremediatsiooni puhul on tundlikkus keskkonnatingimuste, muuhulgas temperatuuri, pH ja niiskuse suhtes (Goswami jt, 2018). Mõningaid *in-situ* meetodite puudujääke võivad korvata *ex-situ* meetodid.

2.3.2. *Ex-situ* meetodid

Ex-situ meetodite korral eemaldatakse reostunud pinnas keskkonnast ning seda saab teha väikese reostuskolde puhul. Kõige lihtsam ja pikemat aega kasutuses olnud (Sharma, 2021) meetodiks on künnikihis tervendamine, mille käigus kaevatakse ja laotakse reostunud pinnas õhukeste kihtidena maha ning perioodiliselt küntakse läbi. Reostunud materjal on avatud ka päikesele, mistõttu toimub lisaks reoaine biolagundamisele selle fotolüütiline lagundamine (Kriipsalu jt, 2016).

Aunkompostimise puhul segatakse reostunud materjal tugiainega, mis tõstab aunades poorsust ning võib rikastada aunasid bakterikooslusega (Kensa, 2011). Tugiaine lisamisel tekib aunades aeroobne keskkond ning temperatuur tõuseb 50-60 °C juurde, mis muudab lagunemisprotsessid efektiivsemaks. Oluline on aunasid perioodiliselt segada, et hoida aeroobseid tingimusi (Kriipsalu jt, 2016). Samas on täheldatud, et aunadesse tekivad metanogeensete bakterite tegevuse tõttu ka anaeroobsed tsoonid, mis on olulised lagundamise viimaseks etapiks, kuid tingib märgatava metaani (CH₄) emissiooni (Edjabou ja Scheutz, 2023). Aunkompostimisega sarnane, kuid tõhusam meetod on bioaunade süsteem, kus aunad on kaetud geomembraaniga ning aunadesse on suunatud niisutus- ja õhutustorustikud (Kriipsalu jt, 2016). Bioaunades on võrreldes tavaliste aunadega tingimused kontrollitud: saab jälgida pH taset, temperatuuri, toitainete hulka ning aeratsiooni efektiivsust. Samuti kogutakse töötluse käigus kokku nõrgvesi ning lenduvad orgaanilised saasteained (Sharma, 2021). Peamiselt kasutatakse bioaunu naftasüsivesinike saaste eemaldamiseks (Kensa, 2011).

Bioreaktorid on kinnised mahutid, kus saastunud materjalile lisatakse vett, toitaineid ja õhku, millega tekitatakse optimaalne keskkond biolagundamiseks. Enne mahutisse viimist tuleb pinnas segada ühtlaseks püdelaks massiks (ingl *slurry*), sest nii on mikroorganismidel parem kontakt reoainega (Kriipsalu jt, 2016). Bioreaktoris toimub lagunemine kiiremini ja suuremal määral, kuna mahuti tingimused on lihtsasti ja täpselt juhitavad (Kensa, 2011). Bioreaktoreid kasutatakse ka reovee puhastamisel, kuid eelnevalt läbib vesi füüsikalise-keemilise eeltöötluse, mille käigus eemaldatakse veest suuremad tahked osakesed ja heljuvaine ning seejärel toimub aktiivmuda toel biopuhastus (Vaksmäa jt, 2023). Tekkinud reoveemuda käitlusel, näiteks kompostimisel, toimuvad suurel määral samad protsessid nagu saastunud pinnase bioremediatsioonil (Manea jt, 2024).

Ex-situ meetodite puhul on võimalik keskkonnatingimusi jälgida ning vajadusel optimeerida, seega on meetodite eeliseks nende efektiivsus, mis ilmneb hästi bioreaktorite puhul (Sharma, 2021). Võrreldes füüsikalis-keemiliste pinnase tervendamise võtetega on nii *in-situ* kui *ex-situ* bioremediatsioon odavam ning tihti energiatõhusam. Siiski võivad *ex-situ* meetodid olla kallimad kui kohapealsed lahendused (Kriipsalu jt, 2016) ja pole võimalik lagundada kõiki püsivaid saasteaineid (Sharma, 2021).

Pinnase väljakaevamine ning transportimine on tömahukas ning sobiva töötlemisala leidmine võib osutada keerukas, kuna ruumikulu on võrdlemisi suur. Samuti peab arvestama reoaine iseloomuga, et see pinnase väljakaevamise käigus ei lenduks või ei kanduks muul viisil keskkonda. (Kriipsalu jt, 2016)

2.3.3. Mükoremediatsioon

Bioremediatsiooni meetodit, kus mikroorganismideks kasutatakse seeni, nimetatakse mükoremediatsiooniks. Seened on looduses levinud lagundajad, kuna suudavad kasutada energiaallikana paljusid erinevaid süsinikuühendeid. Vaksmaa jt kirjeldavad oma ülevaates (2023), kuidas see on tingitud seentes olevatest erinevatest mittespetsiifilistest ensüümidest. Lisaks keerukate orgaaniliste ühendite lagundamisele, on seentel võime assimileerida raskmetalle, eemaldades need nii keskkonnast ja vähendades reostuse määra. Selleks kasutavad seened nii rakusiseseid kui -väliseid mehhanisme. (Vaksmaa jt, 2023)

Ühe võimalusena toimub mükoremediatsioonil metalli seondumine seene rakupinnale ehk biosorptsioon, mille tingib ioonvahetus rakumembraani ja metalliiooni vahel (Goutam jt, 2021). Blaudez'i jt uurimus (2000) näitas, et seente võime siduda metalli raku pinnale on võrdväärne rakusisese metalli ärastusega (Blaudez jt, 2000). Meharg kirjeldab oma töös (2003), et seentel on võime eritada keskkonda kelaate moodustavaid ensüüme, mis vähendavad raskmetallide toksilist mõju ja pärsivad metallide liikumist raku sisse. Kui metalliioon on sisenenud rakku, suudab seen selle liigutada metaboolselt vähetähtsasse organelli, näiteks vesiikulitesse. Samuti toimub seentes metabolismi käigus paljude ühendite toksilisuse vähendamine. (Meharg, 2003)

Kaitsemehanismide tõttu on seentel kõrge tolerants ja ärastusvõime metallide, ka raskmetallide, osas ning antud omadus on seetõttu potentsiaallikas bioremediatsiooniks (Vaksmaa jt, 2023). Siiski on seente tolerants erinevate metallide suhtes erinev. Mohamadhasani ja Rahimi tööst (2022) ilmnes, et servikute sugukonda (*Pleurotus spp.*)

kuuluvad seened on tolerantsemad näiteks koobalti ja vase suhtes, samas kui nikli olemasolu substraadis inhibeeris niidistiku kasvu täielikult (Mohamadhasani ja Rahimi, 2022). Akrami jt tööst (2023) selgub, et kerahalliku (*Aspergillus*) ja pintselhalliku (*Penicillium*) perekondadesse kuuluvatel hallitusseente liikidel on võime mullast eemaldada üle 90% vasest ning üle 70% pliist. Antud uuringus oli metallide kontsentratsioon vastavalt 1,044 mg/l vaske ja 0,631 mg/l pliidi, lisaks leidis pinnases kroomi ja tsinki (Akram jt, 2023).

Mükoremediatsiooni on võimalik rakendada peaaegu kõigi eelpool kirjeldatud biotervendamise võtete puhul. Vaksmaa jt artiklis (2023) selgitatakse, et just *in-situ* meetodite puhul on mükoremediatsiooni eeliseks seente poolt pikkade hüüfide moodustamine, mille abil on võimalik assimileerida või siduda saasteaineid ja metalle suurel maa-alal. Samuti võimaldavad seenehüüfid teiste mikroorganismide paremat levimist pinnases (Junier, 2021). Kuna kohapealsete meetoditega puudub täpsem ülevaade tervendamise efektiivsusest ja protsessist ning seentel võib puudu jääda hapnikust, soovitatakse kasutada mükoremediatsioonil eeskätt *ex-situ* meetodeid. (Vaksmaa jt, 2023)

3. Metoodika

3.1. Katsepakkide ettevalmistus

Katsete jaoks kasutati Tartu Veevärgi reoveekäitluse protsessi anaeroobset muda ja stabiliseeritud reoveekomposti. Kokku valmistati ette 12 erineva koostisega katsesegu, millest igast valmistati kaks paralleelkatset. Esmalt lõigati täispuuvillastest riidekangast umbes 5x7 sentimeetri suurused riideribad. 200 grammi puuvillaseid riideribasid segati 400 grammi komposti või reoveepuhasti anaeroobse mudaga ja lisati 50-400 grammi vett. Osadele katsetele lisati veel vastavalt 20 või 40 grammi põlevkivi tuhka. Täpsemad katsete koostised on välja toodud lisas 1. Segudel määrati pH kasutades pH-meetrit. Pooled katsetest, millele lisati põlevkivi tuhka, neutraliseeriti kasutades 5 M vesinikkloriidhapet.

Kasvukatsed viidi läbi Eesti Maaülikooli PKI seenematerjalide laboris, kus kasutati inkubatsioonikambrit. Substraat steriliseeriti autoklaavis ning toatemperatuuril inkubeeriti austerservikuid (*Pleurotus ostreatus*) ning libliktagelit (*Trametes versicolor*) 18 päeva kuni neli kuud. Peale nelja kuud polnud libliktagel viljunud. Austerservikud viljusid kuue päevaga selleks kohandatud kasvukapis, kus keskmine temperatuur oli 17,9 °C, suhteline niiskus 94,4% ja CO₂ sisaldus 652,8 ppm. Viljakehad korjati, kui ääred hakkasid üles keerama. Iga viljunud katse puhul määrati algsegu kuivaine sisaldus ning hiljem anaeroobse muda, komposti ja seenemassi märg- ja kuivkaal.

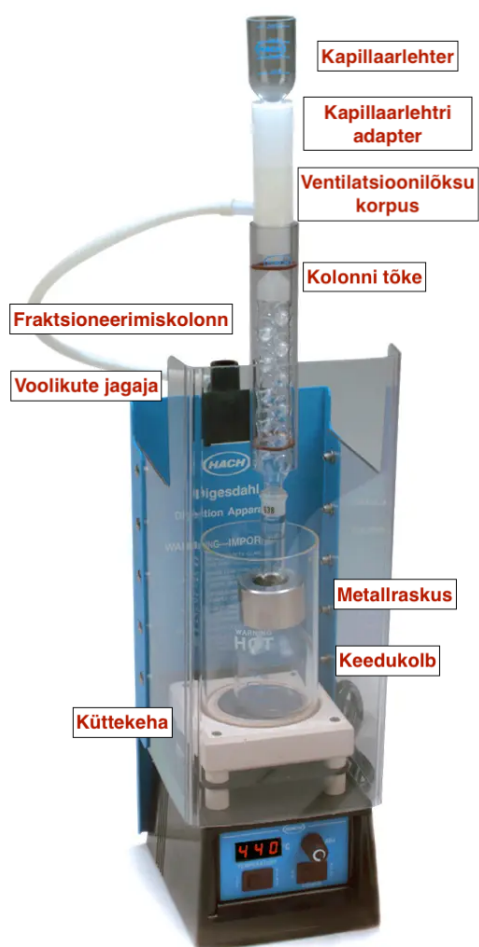
3.2. Lämmastiku sisalduse määramine

Tahkest aineist lämmastiku määramiseks kasutati Hach-Lange modifitseeritud TKN (*Total Kjeldahl Nitrogen*) meetodit 8075. Lahuse valmistamise jaoks kasutati Hachi Digesdahl 115 Vac instrumenti. Kuue viljunud katse jaoks kuivatati esmalt materjal 105 °C juures vähemalt 24 tundi ning uhmerdati peeneks. Seejärel kaaluti analüütilise kaaluga umbes 0,1 grammi kuivainet, mis uhuti deioniseeritud veega spetsiaalsetesse keedukolbidesse. Kolbidesse lisati 3,5 ml kontsentreeritud väävelhapet (H₂SO₄).

Katseseade asetati kohttõmbe alla, seadistati 440 °C peale ning ühendati veejoapumbaga, et keetmisel tekkivad aurud seadmest ventilatsiooni tõmmata. Seade komplekteeriti vastavalt joonisele 1. Keedukolb asetati küttekehale.

Kui kolvist oli kogu vesi ära aurunud, oodati kuni hape hakkas keema ja kolb täitus happeauruga. Segul lasti veel keeda ligikaudu viis minutit. Seejärel asetati seadme tippu kapillaarlehter, kuhu valati silma järgi umbes 7,5 - 10 ml vesinikperoksiidi (H_2O_2). Peale kogu vesinikperoksiidi aurumist ja kondensatsiooni muutus lahus läbipaistvaks ning seda keedeti veel umbes minut aega.

Kapillaarlehtrisse jäänud mullid või veepiisad eemaldati klaaspipetiga, et tagada sujuv peroksiidi vool proovile. Proovidel lasti jahtuda toatemperatuurini ja keedukolvid täideti mahumärgini deioniseeritud veega.



Joonis 1. Keeduste valmistamiseks kasutatud Hach-Lange Digesdahl mineraliseerimisseade (digester) (Ettevõtte Hach koduleht, 2026).

Jahtunud ja keedetud lahustest mõõdeti 25 milliliitristesse mõõtekolbidesse 1 ml proovi. Seejärel lisati kolbi üks tilk TKN indikaatorit, mis muutis proovi kollakaks. Lisati tilkhaaval 8,0 N KOH lahust, kuni proov muutus sinakaks. Mõõtekolvid täideti poolenisti deioniseeritud

veega ning igasse kolvi lisati kolm tilka mineraalstabilisaatorit ja kaks tilka polüvinüülalkoholi. Kolvid täideti mahumärgini, suleti korgiga ja loksutati. Viimaks lisati mõõtekolbi 1 ml Nessleri reagenti ja spektromeetriselt määrati tollise küvetiga valguse absorptsioon ja lämmastiku sisaldus. TKN tulemuse arvutamiseks kasutati valemit:

$$TKN (mg/g KA) = \frac{A*75}{B*C}$$

kus A – spektrofotomeetri näit,
 B – keetmiseks võetud proovi kaalutis (g),
 C – lahjenduseks võetud proovi maht (ml).

3.3. Fosfori sisalduse määramine

Proovide üldfosfori määramiseks kasutati eelmises alapeatükis kirjeldatud lahust. 25 milliliitrisesse mõõtekolbi lisati 0,5 või 1 ml lahust vastavalt lahuse fosforisisaldusele. Kolb täideti mahumärgini deioniseeritud veega ja sellele lisati 1 ml molübdaadi lahust ning 1 ml askorbiinhappe lahust. Kolvid suleti ja loksutati. Lahusel lasti seista umbes kümme minutit. Spektrofotomeetriselt määrati fosfaatide sisalduse näit ning arvutati fosfori sisaldus kasutades valemit:

$$TKN (mg/g KA) = \frac{A*2500}{B*C}$$

kus A – spektrofotomeetri näit,
 B – keetmiseks võetud proovi kaalutis (g),
 C – lahjenduseks võetud proovi maht (ml).

3.4. Keemilise hapnikutarbe määramine

Proovide keemilise hapnikutarbe (KHT) määramiseks kuivatati proovide materjal 105 °C juures vähemalt 24 tundi ning uhmerdati peeneks. Kuivainest KHT määramiseks kaaluti analüütilise kaaluga umbes 0,020 grammi kuiva peenestatud ainet, mis uhuti 25 ml deioniseeritud veega spetsiaalsetesse kuumutuskolbidesse. Kolbidesse lisati spaatliga umbes 0,4 grammi elavhõbesulfaati (HgSO_4), 5 ml 1 N kaaliumdikromaati ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ja mõõtsilindriga 30 ml hõbesulfaati (Ag_2SO_4). Lahused pandi keema ja ühendati jahutusvee torudega.

Lahuseid keedeti kuni kaks tundi, aga mitte vähem kui tund aega. Proovidel lasti jahtuda ning jahutustorud uhuti deioniseeritud veega puhtaks. Kui lahused olid täielikult jahtunud valati need 300 milliliitristesse kolbidesse ning lisati deioniseeritud vett kuni kolvid olid umbes poolenisti täidetud. Kolbidesse lisati 3-5 tilka ferroiinindikaatorit ning tiitriti 0,25 N Mohri soola ehk ammoniumraud(II)sulfaadi $((\text{NH}_4)_2(\text{Fe})(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ lahusega.

Mohri soola kontsentratsioon ajas väheneb. Täpse kontsentratsiooni arvutamiseks kasutati valemit:

$$C_{\text{Mohri sool}} = \frac{C_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} \cdot V_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}}{V_x},$$

kus V_x - tiitrimiseks kulunud Mohri soola lahuse ruumala,

$C(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)$ – kaaliumdikromaadi lahuse kontsentratsioon (=1 N),

$V(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)$ – lisatud kaaliumdikromaadi lahuse ruumala (=5 ml).

KHT arvutamiseks kasutati valemit:

$$KHT (mg/kg KA) = \frac{(A-B) \cdot N \cdot 8000}{S},$$

kus A = pimeproovi tiitrimiseks kulunud Mohri soola hulk (ml),

B = proovi tiitrimiseks kulunud Mohri soola hulk (ml),

N = Mohri soola lahuse normaalsus,

S = proovi kuivaine kaalutis (g).

3.5. Metallide analüüs

Metallide analüüs viidi läbi Tartu Ülikooli Geoloogia osakonna poolt. Induktiiv-sidestatud plasma massispektromeetria (ICP-MS) abil määrati proovidest metallide sisaldused. Analüüsiks kasutati 0,1-0,2 grammi kuivainet, mis lagundati eelnevalt kuningvee (lad *Aqua Regia*) lahuses. Mõõdeti järgnevate metallide sisaldused: Li, Be, B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Y, Mo, Ag, Cd, Sb, Cs, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Pb, Th, U.

3.6. Tehisintellekti kasutamine

Autor kasutas OpenAI ChatGPT rakenduse GPT-5.5 versiooni abi Pythoni koodi kirjutamisel graafikute loomiseks ning PFAS ühendite tõlkimisel eesti keelde. Käesolevas töös ei ole kasutatud tehiaru rakendusi tekstiloomeks ega kirjanduse või tulemuste analüüsiks.

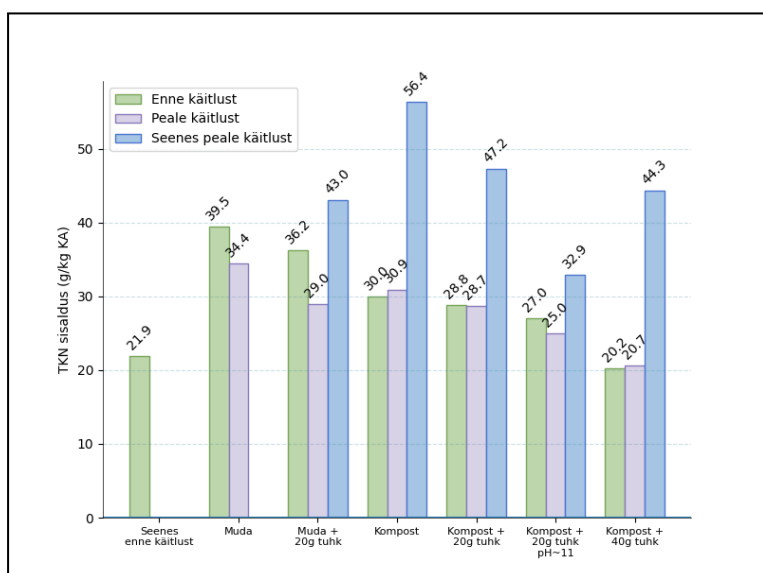
4. Tulemused ja arutelu

Peale neljakuulist seenkäitlust tehti viljunud ja viljakehad kasvatanud katsepakile metalli analüüs kasutades induktiiv-sidestatud plasma massispektromeetriat (ICP-MS), lisaks TKN, üldfosfori ja KHT analüüsid. Algmaterjalist ja kahest katsepakist tehti PFASide sisalduse analüüs, mida teostas Eurofins.

Reoveesette kasutamise direktiiv (2019) reglementeerib kroomi, tsingi, vase, nikli, kaadmiumi, plii ja elavhõbeda sisaldused settes, seega keskenduti analüüsis mainitud metallidele.

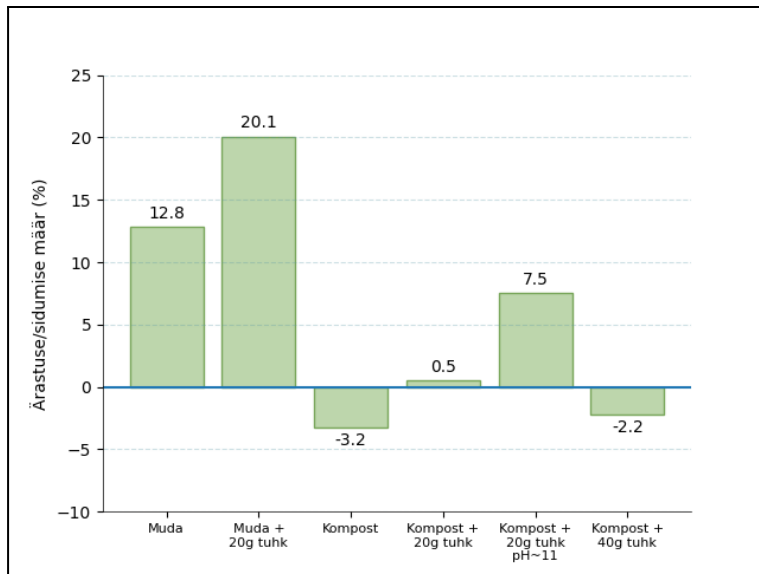
4.1. TKN, üldfosfori ja KHT sisaldus

Joonisel 2 on näidatud TKN (*Total Kjeldahl Nitrogen*) sisaldus muda ning komposti substraadis enne ja peale neljakuulist seenkäitlust. Samuti on lisatud lämmastiku sisaldus seenes enne ja pärast käitlust. Tulemustest ilmneb, et lämmastiku kontsentratsioon on kõrgem anaeroobse muda substraadis (joonis 2). Jooniselt 3 on näha, et ärastuse või sidumise määr on suurem muda substraadil kasvanud seente puhul. Anaeroobsest mudast oli ärastuse määr 12,8% ja 20,1%, samas kui komposti puhul on toimunud märgatav vähenemine vaid ühe katse puhul, kus ärastuse määr oli 7,5%. Teiste kompostil kasvanud katsetega lämmastiku sisaldus kasvas.



Joonis 2. TKN sisaldus substraadis ning seentes enne ja peale käitlust (g/kg KA).

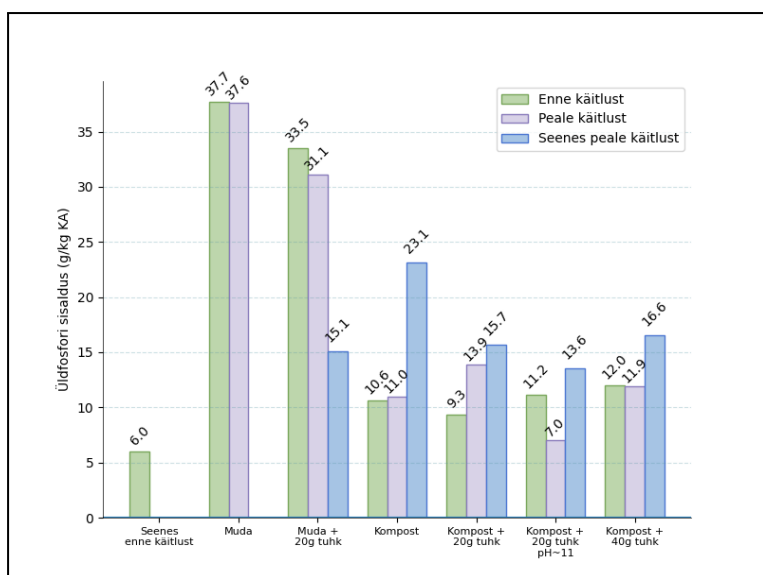
Lämmastiku sisalduse tõus võib olla seotud asjaoluga, et katsetes toimus suhteliselt rohkem orgaanilise aine lagunemist (joonis 6), millega tekkis juurde mineraalset lämmastikku. Puhta komposti substraadis suurenes lämmastiku sisaldus 3,2% võrra, kuid samal katsel keemilise hapnikutarbe ehk KHT väärtus vähenes 13%. Katses, kuhu lisati 40 grammi põlevkivi tuhka lämmastiku kontsentratsioon tõusis 2,3%, aga KHT määr vähenes 5,3% ning ka kuivaine sisaldus vähenes 16,6%, seega mineraalse lämmastiku osakaal võis proovis tõusta.



Joonis 3. Lämmastiku ärastuse määr komposti ja anaeroobse muda substraadist, mõõdetuna substraadist peale neljakuist seenkäitlust.

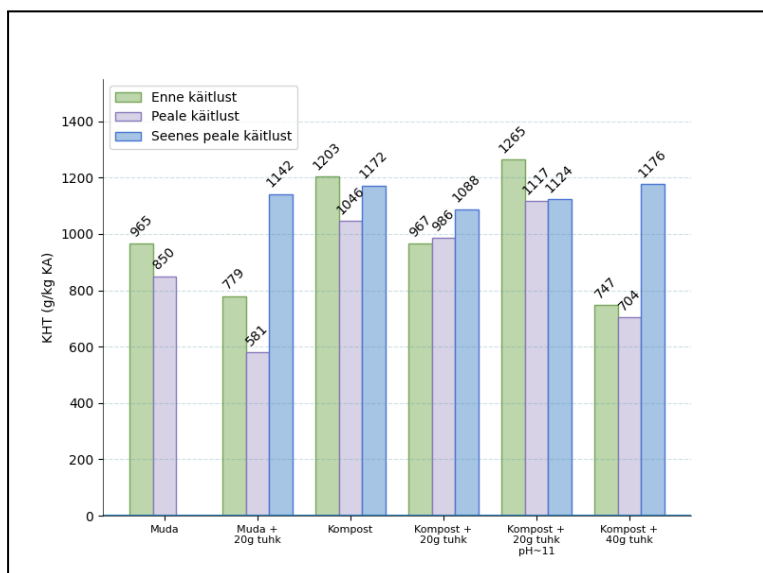
Sarnaselt lämmastikule, oli ka fosfori sisaldus kõrgem anaeroobses mudas, nagu on näha jooniselt 4. Fosfori hulga muutus peale seenkäitlust oli siiski väike. Oluline muutus toimus ainult kahe kompostil kasvanud katse puhul, kus ühest (kompost + 20g tuhk, pH~11) toimus ärastus 37,1% võrra ning teises (kompost + 20g tuhk, pH~7) sisaldus tõusis 48,5% võrra. Muda katsete puhul vähenes fosfori sisaldus 0,3% ja 7,1% võrra. Katses, kuhu oli kompostile lisatud 40 g tuhka vähenes fosfor 0,8%, kuid puhtal komposti substraadil tõusis fosfori kontsentratsioon 3,4%.

Proovis, kus fosfori kontsentratsioon suurenes peale seenkäitlust ligi poolteist korda, suurenes ka KHT väärtus 2% (joonis 6). Seega ei saa antud proovis sisalduse tõus olla seotud mineraalne osakaalu suurenemisega, vaid pigem proovi heterogeensusega.

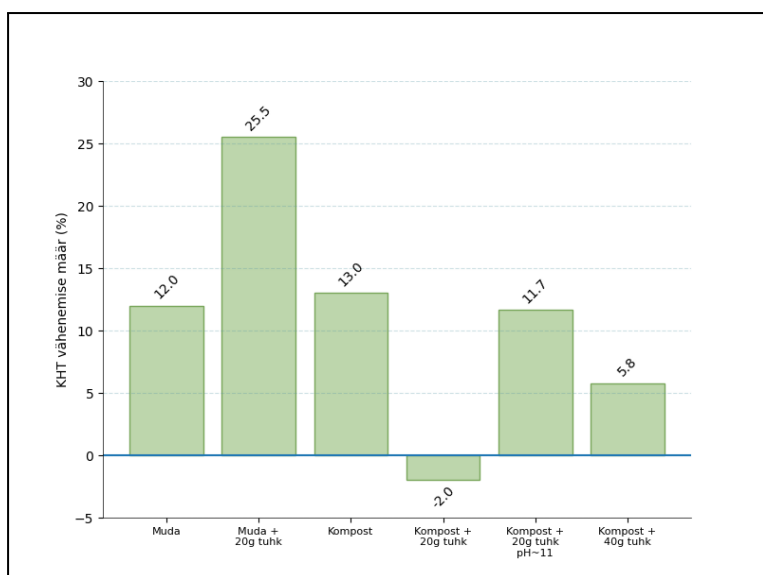


Joonis 4. Üldfosfori sisaldus substraadis ning seenes enne ja peale käitlust (g P/kg KA).

Keemiline hapnikutarve ehk KHT, mis näitab orgaanika sisaldust, oli suurem kompostil kasvanud katsetel. Nii enne kui peale käitlust. Täpsed KHT väärtused on olemas joonisel 5. Orgaanilise aine hulk peale seenkäitlust vähenes pea kõigis katsetes, kus vähenemise määr jäi vahemikku 5-25% (joonis 6). Katses, kus kompostile oli lisatud 20 grammi tuhka, ei toimunud orgaanika vähenemist ning KHT väärtus kasvas 2%. KHT vähenemine substraadis viitab orgaanika lagunemisele ja mineraliseerimisele mikroorganismide toel.



Joonis 5. Keemiline hapnikutarve substraadis ning seenes enne ja peale käitlust, g/kg KA.



Joonis 6. KHT vähenemise määr komposti ja anaeroobse muda substraadist, mõõdetuna substraadist peale neljakuist seenkäitlust.

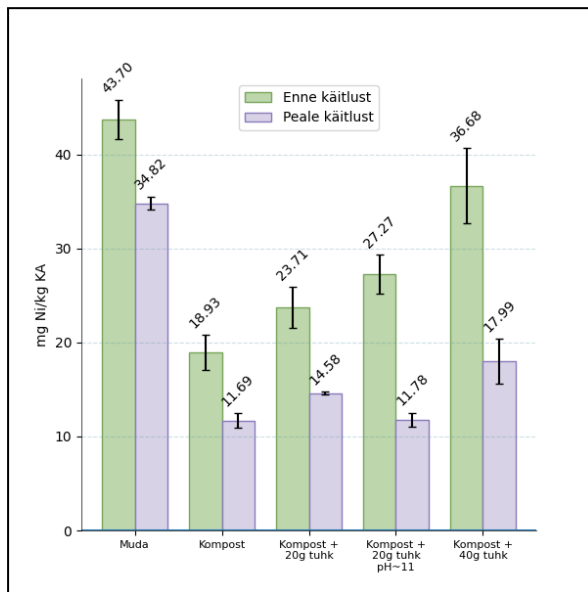
4.2. Metallide sisaldus

Analüüsides tuli välja, et subtraatides oli suurim sisaldus tsingil, kus igas proovis oli sisaldus üle 200 mg/kg KA (joonis 9). Järgnesid vask (sisaldused üle 79 mg/kg KA) (joonis 10), kroom (sisaldused üle 27 mg/kg KA) (joonis 11), nikkel (sisaldused üle 18 mg/kg KA) (joonis 7), plii (sisaldused üle 14 mg/kg KA) (joonis 8) ja kaadmium (sisaldused alla 1 mg/kg KA) (joonis 12). Kõige suuremad sisaldused olid muda proovides, kus võrreldes kompostiga oli tsinki rohkem kuni 262%, vaske kuni 218%, kroomi kuni 209%, niklit kuni 131%, pliidi kuni 182% ja kaadmiumit kuni 161%.

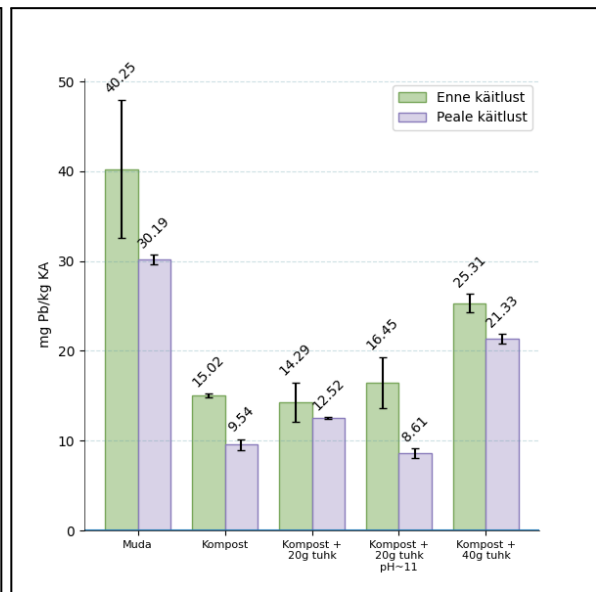
Muda suurem metallide sisaldus võib olla tingitud komposti suuremast mikrobioloogilisest aktiivsusest ja loomulikust bioremediatsioonist. Lagundamisprotsessid ning mikroobide elutegevus on mudas anaeroobse keskkonna tõttu pärsitud. Samuti võisid mikroorganismid suurendada metallide lahustuvust ning need võisid kompostimise vältel välja leostuda (Vaksmäe jt, 2023).

Peale seenkäitlust vähenesid kõikides proovides metalli sisaldused ainult nikli (joonis 7) ja plii (joonis 8) puhul, kus keskmine sidumise või ärastuse määr oli vastavalt 27,45% pliist ja 40,96% niklist. Selline tulemus on vastupidine Mohamadhasani ja Rahimi katsele (2022), kus nikkel oli suurim seenkasvu inhibeerija (Mohamadhasani ja Rahimi, 2022). Amini jt uurimusest (2024) selgus samuti, et erinevate seene liikide puhul on nikli sidumise võime

madalam teiste raskmetallide sidumise võimest, samas kui plii sidumise võime on võrreldes teiste metallidega pigem kõrge (Amin jt, 2024).

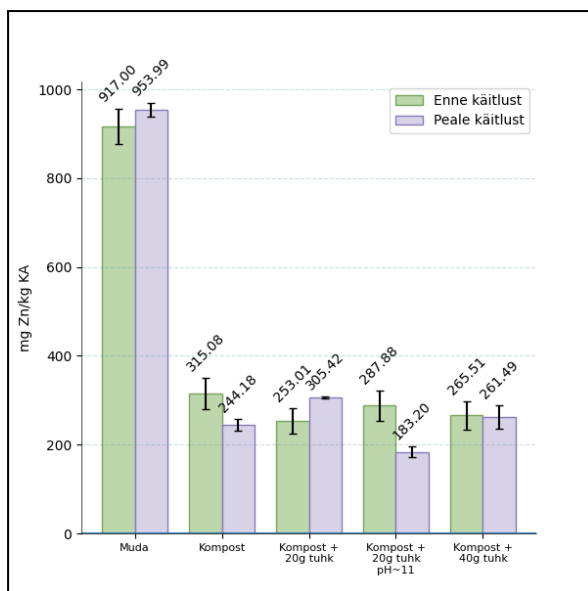


Joonis 7. Nikli sisaldus substraadis (mg/kg KA).

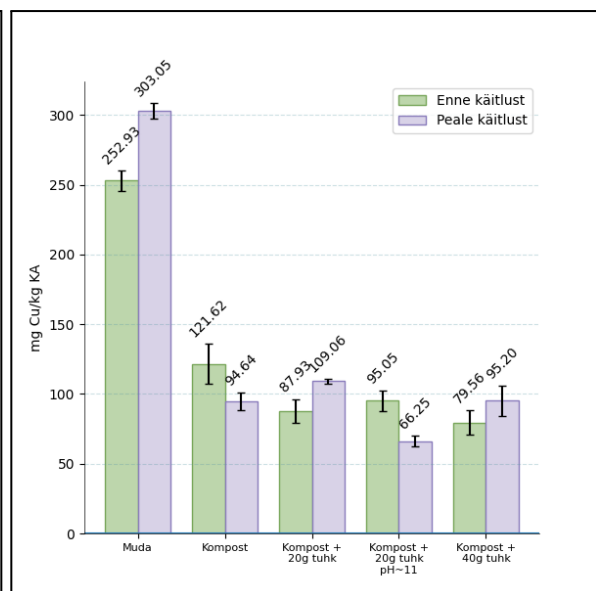


Joonis 8. Plii sisaldus substraadis (mg/kg KA).

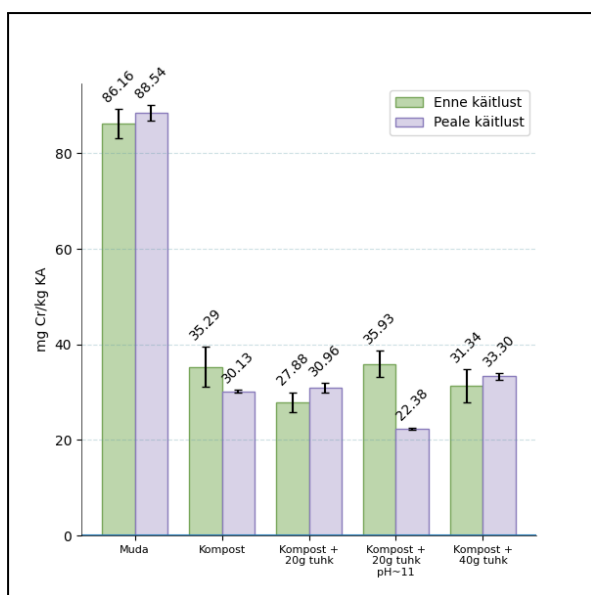
Teiste metallide puhul osades katsetes peale seenkäitlust metalli sisaldus suurenes, mis võib olla tingitud proovide heterogeensusest. Siiski katsetest, kus toimus metalli sidumine vähenes vase sisaldus keskmiselt 26,24%, kroomi sisaldus keskmiselt 26,17%, tsingi sisaldus keskmiselt 20,13% ja kaadmiumi sisaldus keskmiselt 4,45%.



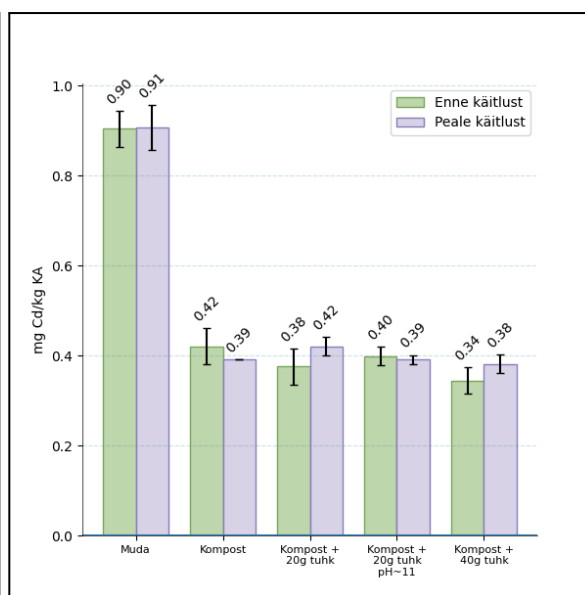
Joonis 9. Tsingi sisaldus substraadis (mg/kg KA).



Joonis 10. Vase sisaldus substraadis (mg/kg KA).



Joonis 11. Kroomi sisaldus substraadis (mg/kg KA).



Joonis 12. Kaadmiumi sisaldus substraadis (mg/kg KA).

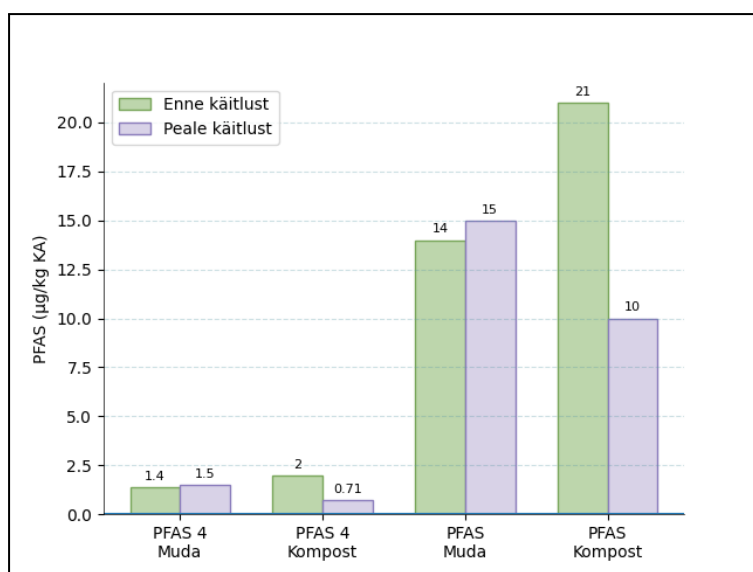
Euroopa Liidus on põllumajanduses, haljastuses ja rekultiveerimisel kasutatava sette raskmetallide sisaldustele seatud piirväärtused, mis on toodud välja tabelis 1. Analüüsides järeldub, et isegi enne käitlust olid kõikides proovides antud metallide sisaldused alla kehtestatud piirmäärade.

Tabel 1. Põllumajanduses, haljastuses ja rekultiveerimisel kasutatava sette raskmetallide sisalduse piirväärtused (Reoveesette kasutamise direktiiv, 2019).

Raskmetall	Piirväärtus (mg/kg KA)
Kaadmium (Cd)	20
Vask (Cu)	1000
Nikkel (Ni)	300
Plii (Pb)	750
Tsink (Zn)	2500
Elavhõbe (Hg)	16
Kroom (Cr)	1000

4.3. PFASide sisaldus

PFASide analüüsil mõõdeti 35 erineva PFASi sisaldus, mis on leiatavad lisa 2. Lisaks PFAS 4 (PFOS, PFOA, PFHxS ja PFNA) ning PFAS 20 summa. Joonisel 13 on näha PFAS 4 ning summaarne PFAS 20 sisaldus koos poole määramispiiri väärtustega. Substraadina komposti kasutanud katse puhul vähenes PFAS 4 sisaldus peale käitlust 1,29 µg/kg KA (ligi 65%) ning PFAS 20 sisaldus vähenes 52% ehk 11 µg/kg KA. Anaeroobsel mudal läbi viidud katsetel PFAS 4 ja kogu PFASide hulk suurenes vastavalt 0,1 ja 1,0 µg võrra.



Joonis 13. PFAS 4 ja PFAS 20 summaarne sisaldus koos poole määramispiiri väärtustega (µg/kg KA).

On näha, et kompostil kasvanud seente abil vähenes PFASide hulk märkimisväärselt (PFAS 4 vähenes 65% ja PFAS 20 52%). Analüüsi tulemusi hinnates (vt lisa 2), võib öelda, et suurima erinevuse tingib PFAS 4 puhul PFOSi sisalduse vähenemine 1,09 µg võrra. PFOSi sisalduse vähenemise mõju on märgatav ka PFAS 20 puhul, kus lisaks vähenesid oluliselt PFPeA, PFDoS, PFTrDS ja PFUnDS väärtused. PFPeA kontsentratsioon vähenes 2,17 µg (72%). PFDoS, PFTrDS ja PFUnDS puhul oli maksimaalne väärtus enne käitlust 3,6 µg ning peale käitlust 2,3 µg (vt lisa 2), seega vähenes nende sisaldus maksimaalselt 1,3 µg (36%). Tegemist on pikka süsinikuahelat sisaldavate ühenditega, mis seenkäitlusel võivad kergemini sorbeeruda hüüfide pinnale ning seonduvad paremini seenmassiga (Lenka jt, 2021).

Muda substraadil tehtud katsete puhul on märgata väikest sisalduse tõusu nii PFAS 4 kui PFAS 20 puhul, mis võib olla tingitud pikkade ahelate lagunemisest lühikese ahelaga

PFASideks. PFAS 4 puhul tõusis muda substraadil PFOA kontsentratsioon 0,28 µg võrra. PFOA on paljude pika ahelaga PFASide lagunemisel tekkiv vahe- või lõpp-produkt (Park jt, 2016). Analüüsist on näha, et peale käitlust mudas oli palju 6:2 FTS ühendit, mis võib olla tingitud proovi heterogeensusest, kuid tasub märkida, et samuti oli proovis kõrge PFHxA sisaldus (2,5 µg), mis on rohkem kui 90-protsendiline kontsentratsiooni tõus võrreldes käitlusele eelneva prooviga. PFHxA on üks tavalistest 6:2 FTSi laguproduktidest ning üks laialdasemalt levinud PFOA aseaineid (Park jt, 2016).

Läbi viidud analüüsi tulemused on kooskõlas Tsengi katsega (2012), kus mükoremediatsioonis ärastatati rohkem PFOSi kui PFOAd. Käesolevas töös ärastatati 83,3% PFOSist ning 6,5% PFOAst. Lisaks märkis Tseng ära, et oluliselt lagundati PFOA lähteainet (Tseng, 2012), mis on võrreldav PFHxA lähteaine 6:2 FTSi lagunemisega. Ka Lenka jt toovad oma ülevaates (2021) välja, et enam ärastatatakse PFOSi ning pika-ahelaga PFASid seonduvad paremini orgaanikaga (Lenka jt, 2021), mis korreleerub käesoleva töö tulemustega.

Pika-ahela lagunemine on tavaline reoveekäitluse protsessis (Lenka jt, 2021), millega saab põhjendada suuremat PFASide hulka kompostis võrreldes anaeroobse muda substraadiga. Analüüsist tuleb välja, et kaheksa lühikese ahelaga PFASide maksimaalne summaarne kontsentratsioon mudas on 2,61 µg/kg KA, samal ajal kui komposti puhul on see 7,65 µg/kg KA.

5. Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärk oli analüüsida, kui efektiivselt saab kasutada mükoremediatsiooni raskmetallide ja püsivate orgaaniliste ühendite nagu PFASide eemaldamiseks reoveekäitluses tekkinud anaeroobsest mudast ning kompostist. Viidi läbi neljakuuline seenkäitus muda ja komposti substraadidel, kuhu lisati puuvillast riidet tselluloosi allikaks ning põlevkivi tuhka.

Kuuest viljunud katsest tehti enne ning peale seenkäitlust KHT (keemiline hapnikutarve), TKN (*Total Kjeldahl Nitrogen*) ja üldfosfori analüüsid. Lisaks teostati PFASi analüüsid ning metalli analüüsid ICP meetodil. Analüüsides selgus, et nii lämmastiku kui fosfori sisaldus oli suurem muda substraadil. Ühtlasem eemaldamine toimus lämmastiku puhul, kus ärastus jäi 0,5-25,5% vahele. KHT väärtus, mis näitab orgaanika sisaldust, oli suurem just komposti proovidel ning pea kõigis katsetes toimus KHT vähenemine 5-25%. KHT vähenemine on tingitud antud juhul orgaanika mineraliseerimisest mikroorganismide poolt. Lämmastiku ja fosfori sisalduse suurenemine osade katsete puhul võib olla seotud mineraalne osakaalu suurenemisega orgaanilise aine vähenemise arvelt.

Kuna reoveesette kasutamise direktiiv (2019) kehtestab piirmäärad Cr, Zn, Ni, Cd, Cu, Pb ja Hg, siis keskenduti analüüsis mainitud metallidele. Metallide sisalduse määramiseks kasutati induktiiv-sidestatud plasma massispektromeetriat (ICP-MS). Analüüsist tuli välja, et üheski proovis ei ületatud enne ega peale käitlust direktiivi kehtestatud piirmäärasid. Sarnaselt lämmastikule ja fosforile, olid suuremad metallide sisaldused muda substraadis, mis võib olla tingitud metallide välja leostamisega kompostist mikroorganismide toel. Seenkäitluse käigus seoti kõige rohkem niklit (keskmiselt 40,96%) ning pliid (keskmiselt 27,45%). Samas ei saa tulemuste põhjal teha järeldusi, kuna tulemusi mõjutas proovide heterogeensus.

PFASide puhul mõõdeti 35 erineva PFASi sisaldust ning lisaks PFAS 4 ja PFAS 20 summaarne sisaldus. Nii PFAS 4 kui PFAS 20 sisaldus oli kõrgem komposti substraadis, mis tuleneb pika ahelaga PFASide lagunemisest reoveekäitluse protsessis. Seenkäitluse tagajärjel vähenes PFAS 20 hulk 52% võrra ning PFAS 4 65% võrra. Peamiselt toimus kontsentratsiooni alanemine pika ahelaga PFASide arvelt. Protsessi käigus toimus ilmselt pikkade PFASide sorbeerumine seene hüüfidele või nende lagundamine lühikese ahelaga PFASideks.

Mükoremediatsiooni efektiivsuse kohta saasteainete eemaldamisel reoveesetest ning -kompostist ei saa käesoleva töö põhjal anda ammendavat hinnangut. Tulemused näitasid

siiski, et mükoremediatsiooniga on võimalik siduda nii raskmetalle kui PFASe, mistõttu on põhjendatud täiendavate uuringute läbiviimine seenkäitluse potentsiaali hindamiseks keskkonna tervendamisel. Edaspidi tuleks tagada proovivõtul proovide parem homogeniseerimine ja võimalusel viia läbi seenkäitlust pikema aja vältel, tehes järjepidevaid analüüse. Samuti tasuks tulevikus uurida teiste seeneliikide kasutamist ning võimalusel kombineerida erinevaid bioremediatsiooni meetodeid, näiteks bioaugmentatsioon rakendamist samaaegselt mükoremediatsiooniga.

Using Mycoremediation for Removing Pollutants from Sewage Sludge and Compost.

Anette Merivee

Summary

The aim of this thesis was to assess the effectiveness of using mycoremediation for removing heavy metals and organic pollutants such as PFAS from sewage sludge and compost. Today most pollutants make it to the environment from wastewater systems, agriculture or landfills. Pollutants like heavy metals and PFAS even in small quantities are a potential risk for human health, which is why in the EU limit values are implemented in drinking water, food, wastewater effluent and sewage sludge.

With conventional wastewater treatment some of the pollutants can be removed but the process is costly and energy-intensive, so an alternative method should be considered. Bioremediation can be used to clean the soil of many oil-based pollutants, heavy metals and personal care products. Especially advantageous are found to be fungi because they are metallotolerant. The experiment of this paper included a four-month long processing of different sludge and compost substrates by oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*).

Before and after processing the concentration of PFAS, heavy metals, nitrogen, phosphorus and organic matter was analysed. Nitrogen and phosphorus were measured using spectrophotometry. Organic matter was assessed by chemical oxygen demand (COD). The metal analysis was conducted by the Geology department in University of Tartu and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used. PFAS analysis was conducted by Eurofinns.

From the analysis it appears that in mud substrates both nitrogen and phosphorus levels are higher compared to compost substrates, while the COD levels were higher in compost. Removal efficiency was more even for N, where the removal was between 0,5-25,5 percent, as opposed to phosphorus where in some samples the concentration of P increased. COD decreased in almost all the samples by 5-25%. The lowering of COD levels is caused by the mineralisation of organic matter by microorganisms.

Metal analysis showed that none of the samples before or after processing crossed the established limits for heavy metals in sewage sludge. Overall levels of metal concentration were higher in mud substrate, which may be caused by the fact that in compost

bioremediation took place even before the processing with mushrooms. During the remediation microorganisms could have bioleached the metals out of compost substrates. The highest removal percentage was of nickel (40,96%) and lead (27,45%). Since the samples were quite heterogeneous, no further conclusions can be made.

A total of 35 PFAS was analysed, including the sum of PFAS 4 and PFAS 20. PFAS levels were again higher in mud substrates compared to compost. This may be caused by the degradation of long-chain PFAS in wastewater treatment plants. After the processing the decrease of long-chain PFAS was noticeable. Sum of PFAS 4 in compost substrates decreased by 65% and PFAS 20 by 52%, while in mud the concentration increased. It is probable that in mud the long-chain PFAS were degraded to small-chain PFAS and in compost long-chain PFAS were sorbed to the mycelium.

To assess the effectiveness of mycoremediation for removing pollutants, a more thorough study needs to be conducted. A longer processing time should be considered, while taking constant samples to analyse and a more homogeneous sample taking needs to be guaranteed. In the future different strains of fungi could be assessed and the combining of other bioremediation methods, such as bioaugmentation.

Tänuavaldused

Töö autor tänab juhendajaid Ergo Rikmanni ja Ivar Zekkerit, katsepakkides seente kasvatamist läbi viinud Maidu Silma ning keemiliste analüüside tegemisel juhendanud Anne Paaverit.

Kasutatud kirjandus

Akram, M. B., Rehman, M. U., Sarwar, A., Ullah, N., Rahman, S. U., Aziz, T., Alharbi, M., Alshammari, A., Alasmari, A. F. (2023). Mycoremediation of Heavy Metals Contaminated Soil by Using Indigenous Metallotolerant Fungi. *Polish Journal of Chemical Technology*, 25, 1-13. <https://doi.org/10.2478/pjct-2023-0019>

Amin, I., Nazir, R., Rather, M. A. (2024). Evaluation of multi-heavy metal tolerance traits of soil-borne fungi for simultaneous removal of hazardous metals. *World J Microbiol Biotechnol*, 40. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03987-z>

Asulareovee puhastamise direktiiv (27.11.2024). *Euroopa Liidu Nõukogu veebilehekülg*, Kasutatud 15.05.2026, <https://data.consilium.europa.eu/doc/document/PE-85-2024-REV-1/et/pdf>

Blaudez, D., Botton, B., and Chalot, M. (2000). Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus paxillus involutus. *Microbiol.*, 146(5), 1109–1117. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-5-1109>

Edjabou, M. E., Scheutz, C. (2023). Quantification of – And determining factors affecting – Methane emissions from composting plants. *Waste management*, 170, 287-296 <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.09.010>

EKI = Eesti Keele Instituut. (i.a). Sõnaveeb. Vaadatud 20. märtsil 2026, <https://sonaveeb.ee/search/unif/dlall/dsall/raskmetall/1/est>

EL joogivee direktiiv (16.12.2020). *Euroopa Liidu Teataja*. Kasutatud 14.05.2026, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/ALL/?uri=CELEX%3A32020L2184>

Fashola, M. O., Ngole-Jeme, V. M., and Babalola, O. O. (2016). Heavy metal pollution from gold mines: Environmental effects and bacterial strategies for resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111047>

Girma, G. (2015). Microbial Bioremediation of some Heavy Metals in Soils: An updated review. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology*, 7(1), 29-45. <https://doi.org/10.21608/eajbsg.2015.16483>

Glüge, J., Scheringer, M., Cousins, I. T., DeWitt, J. C., Goldenman, G., Herzke, D., Lohman, R., Ng, C. A., Trier, X., Wang, Z. (2020). An overview of the uses of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 22, 2345-2373. <https://doi.org/10.1039/D0EM00291G>

Goswami, M., Chakraborty, P., Mukherjee, K., Mitra, G., Bhattacharyya, P., Dey, S., Tribedi, P. (2018). Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. *J Microbiol Exp.*, 6(5), 223–231. <https://doi.org/10.15406/jmen.2018.06.00219>

Goutam, J., Sharma, J., Singh, R., Sharma, D. (2021). Fungal-Mediated Bioremediation of Heavy Metal–Polluted Environment. Panpatte, D.G., Jhala, Y.K. (eds) *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment. Microorganisms for Sustainability*, 26. Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7455-9_3

Gupta, P., Kumar, V. (2017). Value added phytoremediation of metal stressed soils using phosphate solubilizing microbial consortium. *World J Microbiol Biotechnol*, 33(9). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2176-3>

Hach veebilehekülg. (2026). *Diegesdahl Digestion Apparatus 115 Vac*. Kasutatud 08.04.2026, <https://www.hach.com/p-digesdahl-digestion-apparatus-115-vac/2313020>

Herco Pollet Water Group veebilehekülg. (i.a). *Sum parameters PFAS 20 and PFAS 4*. Kasutatud 14.05.2026, <https://hercowater.com/en/waterguide-water-technology/pfas-20-and-4>

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.*, 7(2), 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>

Junier, P., Cailleau, G., Palmieri, I., Vallotton, C., Trautschold, O. C., Junier, T., Paul, C., Bregnard, D., Plamieri, F., Estoppey, A., Buffi, M., Lohberger, A., Robinson, A., Kelliher, J.

M., Davenport, K., House, G. L., Morales, D., Gallegos-Graves, L. V., Dichosa, A. E. K. ... Chain, P. S. G. (2021). Democratization of fungal highway columns as a tool to investigate bacteria associated with soil fungi, *FEMS Microbiology Ecology*, 97(2).

<https://doi.org/10.1093/femsec/fiab003>

Kensa, V. M. (2011). Bioremediation – an Overview. *Jr. of Industrial Pollution Control*, 27(2), 161-168.

Kriipsalu, M., Maastik, A., Truu, J. (2016). Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamine. *Pinnase tervendamine* (287-328), Tallinn: TTÜ kirjastus.

Kuppan, N., Padman, M., Mahadeva, M., Srinivasan, S., Devarajan, R. (2024). A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: Eco friendly solutions for waste and pollution management. *Waste Management Bulletin*, 2(3), 154-171.

<https://doi.org/10.1016/j.wmb.2024.07.005>

Lenka, S. P., Kah, M., Padhye, L. P. (2021). A review of the occurrence, transformation, and removal of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS) in wastewater treatment plants. *Water Research*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117187>

Maitra, S. (2018). In situ bioremediation—An overview. *Responsibility of Life Science Informatics Publications*, 4(6), 576-598. <https://doi.org/10.26479/2018.0406.45>

Meharg, A. A. (2003). The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol Res.*, 107, 1253–1265.

<https://doi.org/10.1017/S0953756203008608>

Manea, E. E., Bumbac, C., Dinu, L. R., Bumbac, M., Nicolescu, C. M. (2024). Composting as a Sustainable Solution for Organic Solid Waste Management: Current Practices and Potential Improvements. *Sustainability*, 16(15). <https://doi.org/10.3390/su16156329>

Mohamadhasani, F., Rahimi, M. (2022). Growth response and mycoremediation of heavy metals by fungus *Pleurotus sp.*. *Sci Rep*, 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24349-5>

Noman, M.A., Feng, W., Zhu, G., Hossain, M. B., Chen, Y., Zhang, H., Sun, J. (2022). Bioaccumulation and potential human health risks of metals in commercially important fishes and shellfishes from Hangzhou Bay, China. *Sci Rep*, 12.

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-08471-y>

Park, S., Lee, L. S., Medina, V. F., Zull, A., Waisner, S. (2016). Heat-activated persulfate oxidation of PFOA, 6:2 fluorotelomer sulfonate, and PFOS under conditions suitable for in-situ groundwater remediation. *Chemosphere*, 145, 376-383.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.097>

Quasem, N. A. A., Mohammed, R. N. & Lawal, R. H. (2021). Removal of heavy metal ions from wastewater: a comprehensive and critical review. *npj Clean Water*, 4(36).

<https://doi.org/10.1038/s41545-021-00127-0>

Reoveesette kasutamise direktiiv (31.07.2019). *Riigi Teataja*. Kasutatud 13.05.2026,

<https://www.riigiteataja.ee/akt/117122025012>

Sharma, I. (2021). Bioremediation Techniques for Polluted Environment: Concept, Advantages, Limitations, and Prospects. *Trace Metals in the Environment - New Approaches and Recent Advances*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90453>

Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., & Gupta, R. (2011). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian journal of pharmacology*, 43(3), 246–253.

<https://doi.org/10.4103/0253-7613.81505>

Singh, V. K., Singh, R. (2024). Role of white rot fungi in sustainable remediation of heavy metals from the contaminated environment, *Mycology*, 15(4), 585-601,

<https://doi.org/10.1080/21501203.2024.2389290>

Zhang, Z., Sarkar, D., Biswas, J. K., Datta, R. (2022). Biodegradation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A review. *Bioresource Technology*, 344.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126223>

Tang, K.H.D., Kristanti, R.A. (2022). Bioremediation of perfluorochemicals: current state and the way forward. *Bioprocess Biosyst Eng*, 45, 1093–1109, <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02694-z>

Tseng, N. S. (2012). Feasibility of Biodegradation of Polyfluoroalkyl and Perfluoroalkyl Substances. UCLA. Kasutatud 14.05.2026, <https://escholarship.org/uc/item/2x47296b>

Vaksmaa, A., Guerrero-Cruz, S., Ghosh, P., Zeghal, E., Hernando-Morales, V., Niemann, H. (2023). Role of fungi in bioremediation of emerging pollutants. *Front. Mar. Sci.*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1070905>

Xiang, H., Min, X., Tang, C-J., Sillanpää, M. & Zhao, F. (2022). Recent advances in membrane filtration for heavy metal removal from wastewater: A mini review. *Journal of Water Process Engineering*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.103023>

Lisad

Lisa 1. Katsepakkide koostised

Katse number	Kompost/ muda	Lisatud vesi (g)	Lisatud tuhk (g)	pH
1	Muda	200	0	7
2	Muda	200	20	7
3	Muda	200	20	7,8
4	Kompost	400	0	5
5	Kompost	400	20	7,5
6	Kompost	400	40	7,2
7	Kompost	400	0	4,7
8	Kompost	400	40	7,3
9	Kompost	400	20	7,4
10	Kompost	200	0	4,5
11	Kompost	200	0	4,6
12	Kompost	400	40	12,3
13	Kompost	400	40	12,3
14	Kompost	400	20	11,2
15	Kompost	400	20	11,2
16	Muda	50	0	7,8
17	Muda	50	0	7,8
18	Muda	300	0	7,3
19	Muda	300	20	7,4
20	Muda	300	40	7,8
21	Muda	300	20	11,3
22	Muda	300	20	11,3
23	Muda	350	40	12,3
24	Muda	350	40	12,3

Lisa 2. PFAS analüüside tulemused enne ja peale seenkäitlust

PFAS nimetus	Mudas enne (µg/kg KA)	Mudas peale (µg/kg KA)	Kompostis enne (µg/kg KA)	Kompostis peale (µg/kg KA)	LOQ (µg/kg KA)
4:2 FTS (4:2 fluorotelomeer-sulfonaat)	<0,085	<0,069	<0,11	<0,069	0,03
6:2 FTS (6:2 fluorotelomeer-sulfonaat)	<0,085	1,7	0,26	0,57	0,03
8:2 FTS (8:2 fluorotelomeer-sulfonaat)	<0,29	0,26	<0,36	<0,23	0,1
EtFOSA (N-etüül-perfluorooktaan-sulfoonamiid)	<0,57	<0,46	<0,71	<0,46	0,2
EtFOSAA (N-etüülperfluorooktaansulfoon-amidoäädikhape)	0,76	0,36	0,77	<0,23	0,1
EtFOSE (N-etüülperfluorooktaansulfoon-amidoetanool)	<0,29	<0,23	<0,36	<0,23	0,1
FOSAA (perfluorooktaan-sulfoonamido-äädikhape)	0,32	0,26	<0,36	<0,23	0,1
HPFHpA (vesinik-asendatud perfluorheptaan-hape)	<0,29	<0,23	<0,36	<0,23	0,1
MeFOSA (N-metüül-perfluorooktaan-sulfoonamiid)	<0,085	<0,069	<0,11	<0,069	0,03
MeFOSAA (N-metüül-perfluorooktaan-sulfoonamido-äädikhape)	0,45	0,26	0,54	<0,069	0,03

MeFOSE (N-metüül- perfluorooktaan- sulfoonamido- etanool)	0,4	0,19	0,29	<0,069	0,03
P37DMOA (perfluoro-3,7-di- metüülloktaanhape)	<1,4	<1,2	<1,8	<1,1	0,5
PFBA (perfluoro- butaanhape)	<0,29	0,66	0,56	0,4	0,1
PFBS (perfluoro- butaansulfoonhape)	<0,085	<0,069	0,23	<0,069	0,03
PFDA (perfluoro- dekaanhape)	0,81	0,58	0,89	<0,23	0,1
PFDoA (perfluoro- dodekaanhape)	0,29	<0,23	<0,36	<0,23	0,1
PFDoS (perfluoro- dodekaan- sulfoonhape)	<2,8	<2,3	<3,6	<2,3	1
PFDS (perfluoro- dekaan- sulfoonhape)	<0,085	<0,069	<0,11	<0,069	0,03
PFHpA (perfluor- heptaanhape)	0,1	0,12	0,83	<0,069	0,03
PFHpS (perfluorheptaan- sulfoonhape)	1,3	0,54	0,38	<0,069	0,03
PFHxA (perfluor- heksaanhape)	1,3	2,5	2,3	1,6	0,03
PFHxDA (perfluor- heksadekaanhape)	<0,085	<0,069	<0,11	<0,069	0,03
PFHxS (perfluorheksaan- sulfoonhape)	<0,085	<0,069	<0,11	<0,069	0,03
PFNA (perfluor- nonaanhape)	0,11	0,11	0,18	<0,069	0,03
PFNS (perfluornonaan- sulfoonhape)	<0,57	<0,46	<0,71	<0,46	0,2

PFOA (perfluorooktaanhape)	0,18	0,46	0,46	0,43	0,03
PFOS (perfluorooktaan-sulfoonhape)	1,1	0,85	1,3	0,21	0,03
PFOSA (perfluorooktaan-sulfoonamiid)	<0,29	<0,23	<0,36	<0,23	0,1
PFPeA (perfluor-pentaaanhape)	0,37	0,89	3	0,83	0,03
PFPeS (perfluorpentaaan-sulfoonhape)	<0,29	<0,23	<0,36	<0,23	0,1
PFTeDA (perfluor-tetradekaanhape)	0,1	0,1	0,21	<0,069	0,03
PFTrDA (perfluor-trideekaanhape)	<0,29	<0,23	<0,36	<0,23	0,1
PFTrDS (perfluortridekaan-sulfoonhape)	<2,8	<2,3	<3,6	<2,3	1
PFUdA (perfluor-undekaanhape)	<0,29	<0,23	<0,36	<0,23	0,1
PFUnDS (perfluorundekaan-sulfoonhape)	<2,8	<2,3	<3,6	<2,3	1

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anette Merivee,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Mükoremediatsiooni kasutamine saasteainete eemaldamiseks reoveekäitluse liigmudast ja kompostist“ mille juhendaja on Ergo Rikmann, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Anette Merivee

Tartus, 25.05.2026