

Tartu Ülikool  
Loodus- ja täppisteaduste valdkond  
Ökoloogia ja maateaduste instituut  
Geograafia osakond

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogias

## **Naftareostus ja naftasaaduste biolagunemine meres**

**Marite Blankin**

Juhendajad: prof Jaak Truu

MSc Kertu Tiirik

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

Osakonna juhataja:

Tartu 2018

# **Kokkuvõte**

## **Naftareostus ja naftasaaduste biolagunemine meres**

Töö teoreetilises osas antakse ülevaade järgmistest teemadest: naftareostuste allikad meres, naftareostus merekeskkonnas, naftareostuse mõju mereelustikule ning naftareostuse likvideerimise meetodid. Lisaks kirjeldatakse täpsemalt nafta biolagunemist meres – seletatakse lahti protsessi olemus ning tuuakse välja erinevad tegurid, mis seda mõjutavad. Käesoleva töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli hinnata nafta biolagunemist arktilises merevees ning analüüsida, kas NPK väetise lisamine suurendab nafta biolagunemise efektiivsust. Katse läbiviimisel valmistati Teravmägede lähedalt, Põhja-Jäämerest kogutud mere pinnaveest erinevaid mikrokosme (naftamikrokosmid, kontrollmikrokosmid ja biostimuleeringuga mikrokosmid) ning analüüsiti arhede ja bakterite arvukuse muutust mikrokosmides 4 ja 8 kuu jooksul. Arhede ja bakterite üldarvukus määrati kasutades qPCR (kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon) meetodit. Töö tulemustest selgus, et NPK väetise lisamine suurendas bakterite üldarvukust, kuid stimuleeris nafta biolagunemist vaid vähesel määral. Katsest järeldus, et naftareostuse biolagunemine sõltub oluliselt lisaks toitainete kättesaadavusele ka muudest faktoritest (näiteks temperatuur ja nafta lahustuvus).

**Märksõnad:** naftareostus meres, arktiline kliima, nafta biolagunemine, mikrobikoosluse arvukus.

**CERCS:** T270 – Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll.

## **Abstract**

### **Oil spills and biodegradation of oil products in the sea**

The theoretical part of the paper provides an overview of the following topics: oil spills in the sea, oil spills in the marine environment, oil spill effects on marine life and oil spill response methods. In addition, the process of oil biodegradation is explained in more detail. The goal of this bachelor work was to investigate biodegradation of oil products in the Arctic seas and analyze if the addition of NPK fertilizer increases the efficiency of oil biodegradation. The experiment was conducted with surface seawater from Svalbard, Arctic Ocean. The collected seawater was used to prepare different microcosms (oil microcosms, control microcosms and biostimulation microcosms). The changes in the total population of archaea and bacteria in

microcosms was monitored during 4 and 8 months of incubation. The total population of archaea and bacteria was determined using the qPCR (quantitative polymerase chain reaction) method. The results showed that the addition of NPK fertilizer increased the total population of bacteria but affected the efficiency of oil biodegradation only slightly. It was concluded that in addition to the availability of nutrients there are other factors (for example temperature and solubility of oil) that also have a great influence on oil biodegradation.

**Keywords:** oil pollution, Arctic seas, oil biodegradation, microbial community abundance

**CERCS:** T270 – Environmental technology, pollution control

# Sisukord

1. Sissejuhatus .....	5
2. Kirjanduse ülevaade .....	6
2.1 Naftareostuse allikad meres .....	6
2.2 Naftareostus meres.....	7
2.3 Naftareostuse mõju mereelustikule.....	10
2.4 Merekeskkonna naftareostuse likvideerimise meetodid .....	11
2.5 Nafta biolagunemine meres .....	14
3. Materjal ja metoodika.....	17
3.2 Mere pinnavee proovide võtmine .....	17
3.2 Mikroosmide ja biodegradatsiooni proovide ettevalmistamine.....	17
3.3 Mikroobikoosluse DNA eraldamine .....	18
3.4 Kvantitatiivne PCR .....	18
3.5 qPCR andmete kvaliteedikontroll ja grupeerumine.....	19
3.6 Märklaudgeenide koopiaarvude leidmine.....	20
4. Tulemused .....	21
4.1 Merevee ja mikroosmide keemilised näitajad .....	21
4.2 Nafta biolagunemise tulemused.....	21
4.3 Bakterite ja arhede üldarvukuse muutus ajas.....	22
4.4 Bakterite ja arhede osakaal mikroosmides.....	24
5. Arutelu .....	25
6. Kokkuvõte .....	27
7. Summary.....	28
8. Tänuavaldused .....	29
9. Kirjandus .....	30
LISA 1 .....	32

# 1. Sissejuhatus

Nafta omab tänapäevases ühiskonnas väga olulist rolli nii energiaallikana, kui poliitilise mõjuvahendina. Kasvava rahvaarvuga ning elukvaliteedi tõusuga kaasneb suurenev nõudlus energia järgi. Nafta tarbimise suurenemisega, suureneb ka tõenäosus naftareostuste tekkeks. Naftareostus on tõsine keskkonnaprobleem, mis võib mõjutada kahjulikult ümbritsevat keskkonda ja reostusega kokku puutunud elusorganisme aastaid (National Academy of Sciences 2003).

Käesolevas töös keskendutakse naftareostusele merekeskkonnas. Merekeskkond on dünaamiline ökosüsteem erinevate elupaikade ja liikidega. Inimene kasutab erinevaid mereökosüsteemi teenuseid ning saab sellest kasu. Naftareostuste likvideerimine on oluline, et kaitsta mereökosüsteemi. Teadmised sellest, kuidas naftareostus käitub meres või mis ökosüsteemid on kõige ohustatumad on vajalikud, et kasutada õigeid meetodeid ja strateegiaid naftareostuse likvideerimiseks ning sellega seoses vähendada võimalikult palju naftareostusega tekkivat kahju (IPIECA-IOGP 2015, Wilkinson *et al.* 2017).

Mikroorganismidel on oluline roll mereökosüsteemis. Üks tähtis protsess, mida mikroorganismid läbi viivad on süsivesinike lagundamine. Juba miljoneid aastaid on mikroorganismid lagundanud naftat, mis on sattunud merekeskkonda looduslikest naftaallikatest. Lisaks looduslikele naftaallikatele meres satub tänapäeval suurtes kogustes naftat merevette ka läbi inimtegevuse. Mikroorganismid on need, kes lõplikult eemaldavad reostuse merest (Hazen, Prince 2015). Käesoleva töös pööratakse tähelepanu nafta biolagunemise protsessile ning mikroorganismide rollile nafta lagundamisel meres.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli käsitleda nafta biolagunemist arktilistes meredes. Antud töö esimeses osas antakse ülevaade naftareostuste ja nafta biolagunemise kohta merekeskkonnas. Töö eksperimentaalses osas analüüsitakse nafta biolagunemist arktilises merevees laboris läbiviidud katse põhjal.

## 2. Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Naftareostuse allikad meres

Nafta kui energiaallikas on olnud oluline läbi inimajaloo. Nafta tootmisel, transportimisel ja kasutamisel tuleb arvestada reostusega, mis sellega paratamatult kaasneb. Järgnevalt on välja toodud peamised naftareostuse allikad meres. Laias laastus on naftareostuse allikad võimalik jagada nelja suurde gruppi: looduslikud nafta väljaimbumise kohad, nafta ammutamine, nafta transportimine ja nafta tarbimine (National Academy of Sciences 2003).

Merepõhjas on olemas naftamaardlad, kus looduslikult nõrgub naftat vette. On teada, et neist kohtadest imendub aastas merre märkimisväärses koguses naftat. Hinnanguliselt eraldub kogu maailmas looduslikult merepõhjast merre üle 600 000 tonni toornaftat aastas. Teisisõnu, üle 45% toornaftast, mis satub merre pärineb looduslikest naftamaardlatest. Selline nafta nõrgumine merekeskkonda toimub väga aeglaselt. Kuna see protsess on võrdlemisi aeglane, on ümbritsev elustik suutnud keskkonda eralduva nafta kogusega kohaneda (National Academy of Sciences 2003).

Nafta ja temaga koos esineva gaasi ammutamise ning leiukoha otsimise tagajärjena satub aastas merre hinnanguliselt 38 000 tonni naftat. Antropogeensetest allikatest moodustab see 5% naftareostustest meres. Nafta ammutamise käigus tekkiva reostuse ulatus varieerub suuresti. Näiteks võib reostus esineda väiksemates kogustes, nafta pideva välja nõrgumisena või suurte ulatuslike leketena (National Academy of Sciences 2003).

Kui nafta puurimisel on reostused koondunud pigem ühte piirkonda, siis nafta transportimine võib reostust tekitada igal pool, kus naftat tarnitakse. Peale toornafta transporditakse ka erinevaid nafta produkte, mille erinevaid omadusi tuleb arvestada naftareostuse likvideerimisel. Transportimisel ja tarnimisel satub iga aasta merre 150 000 tonni naftat. Antropogeensetest allikatest moodustab see natuke vähem kui 22% naftareostustest meres (National Academy of Sciences 2003).

Umbes 70% naftast satub merekeskkonda selliste tegvuste kaudu, mida hõlmab nafta tarbimine. Kuna nafta tarbimine toimub peamiselt maismaal, siis jõuab nafta enamasti merre mööda jõgede, reovee ja sademete äravoolu. Nafta satub keskkonda nii autode ja laevade kütusepaagi täitmisel tekkivate lekete kui ka tänavate äravoolude kaudu. Sellistest allikatest

koguneb pidevalt, kuid aeglaselt merre aastas keskmiselt umbes 480 000 tonni naftat (National Academy of Sciences 2003).

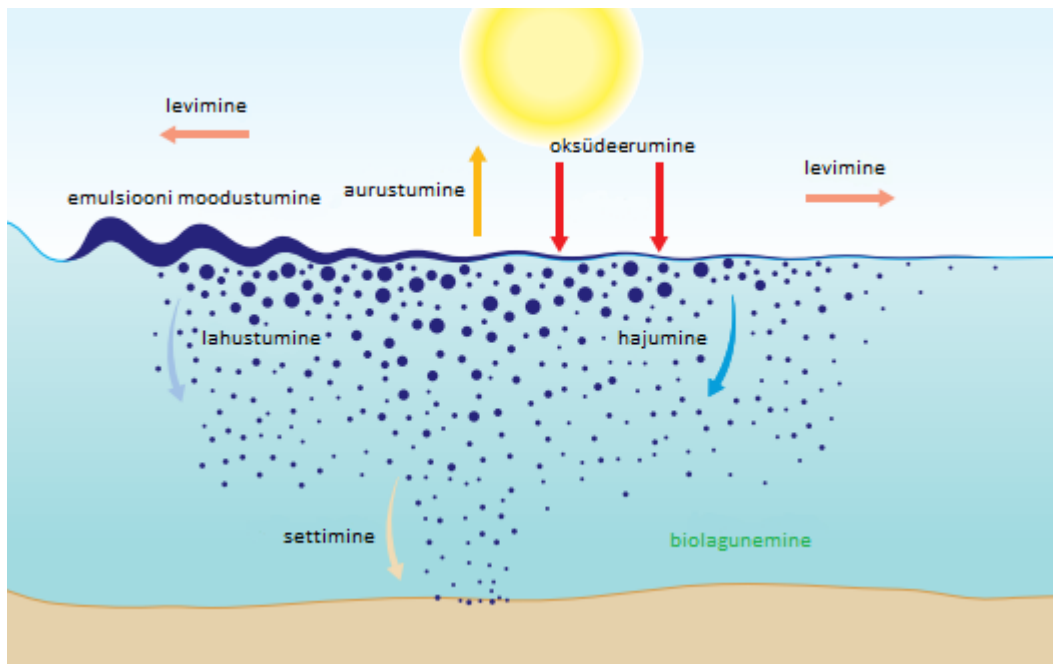
Nafta tootmisel, transportimisel ja tarbimisel vabanevad lenduvad orgaanilised ühendid (edaspidi: LOÜ), mis samuti suurendavad süsivesinike hulka meres. Kuna aga LOÜ-d aurustuvad kiiresti atmosfääri, siis nende püsivus merekeskkonnas on lühiajaline (National Academy of Sciences 2003).

## **2.2 Naftareostus meres**

Naftareostusena mõistetakse igasuguse toornafta või naftasaaduste sattumist keskkonda, kusjuures keskkonda sattunud kogused võivad olla erinevad (Environmental Pollution Centers 2017). Siinses töös keskendutakse naftareostusele merekeskkonnas.

Kuna nafta keemilised ja füüsikalised omadused varieeruvad, siis sellest tulenevalt erinevad ka naftareostused (Talvari 2011). Peamiselt koosneb nafta erinevate süsivesinike segust. Põhilised süsivesinikud naftas on alkaanid, tsükloalkanid ning aromaatsed ühendid. Samuti leidub nafta koostises rasvhappe-, väävli- ja lämmastikuühendeid (Muizis 2013). Nafta käitumise ja lagunemise meres määravad osaliselt nafta füüsikalised omadused, nagu tihedus, keemispunkt ja keemistemperatuuride vahemik, viskoossus, voolavuspunkt, leekpunkt ning lahustuvus. Lisaks sellele mõjutavad naftareostuse käitumist meres ilmastikutingimused ja merevee enda omadused (tihedus, hoovused, temperatuur, vees olevad mikroorganismid, vee toitainete ja hapnikusisaldus). Erinevate naftade ja naftasaaduste eripärasusi ning keskkonna tegureid tuleb arvestada, et reostuse likvideerimine toimuks võimalikult korrektselt ja efektiivselt (Talvari 2011).

Kui nafta satub merre hakkavad toimuma erinevad lagunemisprotsessid, mille tulemusena muutuvad omakorda nafta keemilised ja füüsikalised omadused (IPIECA-IOGP 2015, Talvari 2011). Joonisel 1 on välja toodud protsessid, mis toimuvad naftaga peale merre sattumist. Üldiselt on nafta vees halvasti lahustuv, kuid teatud aromaatsed süsivesinikud on vees osaliselt lahustuvad. Sellised ühendid on näiteks benseen ja toluen (IPIECA-IOGP 2015). Nafta tihedusest oleneb see, kas nafta jääb vee pinnale ning hakkab edasi levima või vajub sügavamale. Mereveest väiksema tihedusega nafta jääb veepinnale ja suurema tihedusega nafta vajub mere põhjasetetesse (Talvari 2011).



**Joonis 1.** Nafta lagunemisprotsessid meres (IPIECA-IOGP 2015).

Esmalt merepinnale sattudes levib naftalaik ilma kõrvaliste tegurite, nagu näiteks tuulte ja hoovuste, abita. Levikukiirus oleneb nafta viskoossusest ja voolavuspunktist (IPIECA-IOGP 2015). Mida väiksem on nafta viskoossus, seda suurem on tema levikukiirus. Madalamate temperatuuride juures on nafta viskoossus kõrgem, seega reostus hajub aeglasemalt. Voolavuspunkt iseloomustab temperatuuri piiri, millest madalamal hakkab nafta oma voolavuse kaotama. Loetud tundide möödudes, naftalaigu levimisel muutub selle viskoossus järjest vähem oluliseks ning reostuse levimisel kasvab vee pinnakihtide liikumise, turbulentsuse, vee hoovuste ja tuulte mõju. Mida suuremale pindalale reostus suudab levida, seda raskemaks muutuvad koristustööd (Talvari 2011).

Nafta aurustumine meres on oluline protsess, mille käigus suureneb naftalaigu tihedus ja viskoossus, kuid väheneb tema maht ning toksilisus (IPIECA-IOGP 2015, Talvari 2011). Aurustumise kiirus ja ulatus sõltuvad mitmetest asjaoludest, kuid peamiselt sõltub see madalatel temperatuuridel keevate komponentide osakaalust õli koostises (Talvari 2011). Sellisteks komponentideks naftas on väikse molekulmassiga süsivesinikud, mis aurustuvad kiiresti atmosfääri (IPIECA-IOGP 2015). Protsessi kiirendab kõrge temperatuur, tugev tuul ning suur lainetus. Samuti oleneb aurustumise intensiivsus nafta esialgsest levikust vee pinnal. Mida kiirmini nafta suuremale pindalale levib seda intensiivsem on aurustumine (Talvari 2011).



Suurem osa naftareostusest hajub väikeste piiskadena merre lainete ja vee turbulentsuse mõjul. Selline segunemine suurendab nafta bioloogilist lagunemist, sest veesambas hajutatud naftapiiskadele pääsevad mikroorganismid kergemini ligi (IPIECA-IOGP 2015). Nafta bioloogiline lagunemine toimub meres olevate mikroorganismide vahendusel, kellel on võime lagundada nafta süsivesinikke (Atlas 1995). Nafta hajumisel segunevad väiksemad tilgad vertikaalselt ja horisontaalselt kergemini kui suuremad tilgad, mis tõusevad tagasi vee pinnale. Suurematesse naftapiiskadesse jääb pinnale tõustes vesi kinni ning selle tulemusena moodustub vee-õli emulsioon. Lõksu jäänud vee arvelt kasvab naftareostuse ruumala. Mida suurem on vee osakaal naftas, seda stabiilsem on moodustuv emulsioon. Erialsed nafta omadused võivad emulsiooni moodustumise käigus muutuda. Vees hajunud naftatilgad võivad seonduda ka tahkete osakestega ning settida mere põhja. Selliselt võib nafta püsida setetes aastaid ning omada pikaajalist mõju mere ökosüsteemile (IPIECA-IOGP 2015).

Väike osa sellest naftast, mis on merre sattunud, laguneb päikesekiirguse toimele. Seda protsessi, kus süsivesiniku molekulid fotokeemiliselt oksüdeeritakse UV-kiirguse toimele, nimetatakse fotooksidatsiooniks (IPIECA-IOGP 2015).

Mida rohkem naftat erinevate protsesside tulemusena meres laguneb, seda vähem reostust jõuab rannikualadele. Naftareostus mis ei setti põhja või ei lagune, jõuab lõpuks rannikualadele, kus selle edasine lagunemiskiirus sõltub suuresti lainetest ja kokkupuutest veega. Kohtades, kus õli on varjatud ja eraldatud, võib lagunemine toimuda väga aeglaselt ning reostus võib püsida rannikul pikka aega (IPIECA-IOGP 2015).

Eelnimetatud protsessid toimuvad palju aeglasemalt külmemate piirkondade meredes. Eriti aeglaselt toimuvad madalamatel temperatuuridel aurustumine, lahustumine ja bioloogiline lagunemine. Külma merevesi mõjutab nafta viskoosust – see suurendab ja soodustab naftaklompide teket (Muizis 2013). Olenevalt aastaajast valitsevad arktilistes meredes erinevad jääolud. Jääoludest sõltuvalt võib naftareostus esineda jää all, peal ja jää sees ning levida edasi võrdlemisi erinevalt (Wilkinson *et al.* 2017). Jää olemasolu võib osaliselt aidata kaasa puhastustöödele kuna jää isoleerib nafta ja peatab selle leviku. Juhul kui aga nafta satub jää alla või jääb jää sisse lõksu, siis muutuvad koristustööd palju keerulisemaks (Muizis 2013).

## 2.3 Naftareostuse mõju mereelustikule

Merekeskkond on kompleksne süsteem, kus mitmed üksikud ökosüsteemid on omavahel tugevalt seotud. Kui kahjustada saab üks mereökosüsteemi osa, siis mõjutab see ka teisi mereökosüsteeme. See, kuidas meres elutsevad organismid naftaga kokku puutuvad ja kuidas naftareostus neile mõjub, oleneb organismide elupaigast ning eluviisist (IPIECA-IOGP 2015).

Ökotoksikoloogia seisukohalt on nafta keeruline ja mitmest komponendist koosnev mürk, mille mõju organismidele on mittespetsiifiline. Ühelt poolt on lahustunud süsivesinikel kahjustav toime elusorganismide füsioloogilistele ja bioloogilistele süsteemidele. Teisalt on nafta kleepuv substraat ja kahjustab organisme seeläbi ka füüsiliselt. Viimane on eriti kahjulik mereimetajate ja lindude seisukohalt (Patin 2013).

Nafta mõju mere elustikule võib olla nii otsene kui kaudne. Otsesteks mõjudeks on näiteks füüsiline lämbumine, nafta sisse söömine toiduga, lenduvate süsivesinike sisse hingamine või läbi naha absorbeerumine. Naftareostuse tagajärjel võib liikide arvukus langeda ka nii, et ei olda reostusega otseselt kokku puutunud. Kui liigid on omavahel läbi toiduahela seotud, siis võib ühe liigi arvukuse suur langus mõjutada ka teisi toiduahelas olevaid liike. Samuti kui naftareostuse tõttu langeb ühe liigi arvukus teatud asukohas, võib teine liik sisse tungida esialgse liigi asemele (IPIECA-IOGP 2015).

Naftareostuse mõju elustikule ei olene ainult sellest, kui suur hulk naftat on vette sattunud. Naftareostusest tulenev mõju loomadele oleneb suuresti ka nende hooajalistest käitumismustritest. Kindlad liigid või teatud eluetappides loomad kogunevad kokku ühte piirkonda teatud ajahetkel aastas ja seetõttu võib naftareostuse puhul saada kahjustada palju suurem arv loomi kui muul ajal. Organismide taastumine reostusest tekitatud kahjustustest oleneb mitmetest liigispetsiifilistest faktoritest. Liigid, kelle eluiga on pikk, kes on aeglase kasvuga, väheste järglastega ning kelle geograafiline levik on väike, on vähem vastupidavad naftareostusele. Mõnedel liikidel on tähtsamad rollid kui teistel. Näiteks mõned liigid pakuvad teistele elusorganismidele elupaiku. Suur sõltuvus teisest liigist tähendab, et ka väiksem mõju nendele võtmeliikidele võib kaasa tuua muutusi ülejäänud koosluses. Populatsioonidele, organismidele või ökosüsteemidele, mille algne seisund on juba halb on naftareostuse mõju väga tõsine (IPIECA-IOGP 2015).

## 2.4 Merekeskkonna naftareostuse likvideerimise meetodid

Antud alapeatükis antakse ülevaade naftareostuse likvideerimise meetoditest, mida rakendatakse merekeskkonnas. Tuuakse välja viis erinevat likvideerimismeetodite rühma: mehaaniline puhastamine, keemiline puhastamine, sorbendid, termiline puhastamine ja biotervendamine (Muizis 2013).

Mehaaniline puhastusviis on tõhus ja keskkonnasõbralik. Mehaaniline puhastus meres viiakse läbi laia valiku poomidega, *skimmer*'itega ja laevadega. Poomide peamiseks ülesandeks on piirata naftareostuse levikut meres. Levinud on kaks disainitüüpi, kus ühel juhul on poomil olemas veealune seeliku osa ning poomi ristlõige on ümar. Teisel juhul on poomi ristlõige lamedakujuline ja see asetseb vees vertikaalselt. Poome saab kasutada siis, kui meri on rahulik. Tormise mere, tugevate tuulte ja hoovuste korral ei toimi poomid efektiivselt. Poomidega koos kasutatakse tihti *skimmer*'eid. Nende abil kogutakse nafta veepinnalt kokku ja pumbatakse laeva peal olevatesse mahutitesse. On mitmete disainilahendustega *skimmer*'eid, kuid kõige levinumad on need, mis kasutavad nafta eraldamiseks veepinnalt kas gravitatsiooni või liikuvat seadet (näiteks pöörlevad harjad). Samuti kuulub mehaanilise koristuse alla spetsiaalsete puhastustehnoloogiatega laevad, mis suudavad individuaalselt koguda kokku suurtes kogustes naftat (Muizis 2013). Mehhaanilise puhastuse miinuseks on aeglane koristusprotsess. Nafta võib levida kiiremini, kui seda jõutakse ära likvideerida (Wilkinson *et al.* 2017).

Keemilisel meetodil kasutatakse naftareostuse eemaldamiseks dispersante ja tahkestajaid. Dispersandid lagundavad nafta väiksemateks piiskadeks, mis segunevad ja hajuvad sügavamale veekihti. Seda meetodit kasutatakse, et takistada reostuse jõudmist rannikualadele. Dispersandid soodustavad looduslikku biolagunemist, kuna väiksemad naftapiisad on mikroorganismide poolt lihtsamini lagundatavad. Dispersandi molekul koosneb oleofiilsest ja hüdrofiilsest osast. Molekul paigutub nafta-vee piirpinnal selliselt, et oleofiilne osa jääb naftasse ja hüdrofiilne osa veekeskonda. Tulemusena nafta-vee pindpinevus väheneb ja lainete toimele laguneb nafta kergemini väiksemateks piiskadeks. Naftatilkade segunemisel veemassi on võimalus, et see avaldab negatiivset mõju mereelustikule, mis muidu oleks jäänud reostusest puutumatuks. Meetodi efektiivsus sõltub nafta tihedusest, see tähendab, et suure tihedusega naftade puhul ei ole dispersandid tõhusad. Tahkestajad on oleofiilsed polümeerid, mis suurendavad nafta viskoossust ja sellega seoses piiravad ka

reostuse levikut. Tahkestatud nafta ei vaju vette ning pärast tahkestajate lisamist korjatakse nafta kokku (Muizis 2013).

Eraldi meetodina käsitletakse sorbente. Sorbendid on materjalid, mis koguvad naftat endasse või enda pinnale ja eemaldavad merest reostuse. Sorbendid jagunevad kahte rühma: adsorbentideks ja absorbentideks. Adsorbentide kasutamise puhul kogutakse nafta materjali pinnale. Absorbentide puhul imendub nafta materjalisse läbi pooride. Tõhusamate tulemuste saavutamiseks peab kasutatav materjal olema oma omaduselt hüdrofoobne. On olemas looduslike orgaanilisi, looduslike anorgaanilisi ja sünteetilisi sorbente. Looduslikeks orgaanilisteks sorbentideks on näiteks turbasammal ja suled. Savi ja liiv on looduslikud anorgaanilised sorbendid. Sünteetilised sorbendid on näiteks nailon ja polüetüleen. Merereostuse likvideerimise meetodites on sorbentide puuduseks see, et neid on keeruline transportida ja raske kütteõli puhul on nad ebatõhusad (Muizis 2013).

Termilise puhastuse puhul on tegemist naftareostuse *in situ* põletamisega, kus nafta piiratakse tulekindlate poomidega ning põletatakse kohapeal. Selline meetod on kiire, majanduslikult säästlik ja eemaldab suurema osa naftast veepinnal. Meetodi negatiivseks küljeks on nafta põletamisel atmosfääri vabanevad kasvuhoonegaasid (peamiselt CO<sub>2</sub>) ja tahm, mis on keskkonnale kahjulikud (Muizis 2013). Nafta põletamiseks peab naftakiht olema piisavalt paks. Värske toornafta puhul on põletamiseks vajalik minimaalne naftakihi paksus 1 mm. Mida rohkem on nafta emulgeerunud ja merel laguneda saanud, seda paksem peab olema kokku korjatud naftakiht, et seda põletada (emulgeerunud nafta põletamiseks on minimaalne paksus 2–5 mm) (Muizis 2013, Wilkinson *et al.* 2017). Emulgeerunud nafta mõjutab meetodi efektiivsust, sest esmalt peab moodustunud emulsioonis olev vesi ära keema ning alles seejärel on võimalik saavutada selline temperatuur, kus saaks toimuda nafta põlemine. Peale põlemist jääb järgi umbes 5% algsest mahust, viskoosne tõrvataoline jääkaine, mis võib jääda kas veepinnale või vajuda veepõhja (Wilkinson *et al.* 2017). *In situ* põletamise meetodit on keeruline kasutada tormiste ilmade puhul, sest nafta piiramine poomidega muutub ebatõhusaks (Muizis 2013).

Biotervendamise meetod on biolagunemise kiirendamine, loodusliku protsessi limiteerivate tegurite parandamise kaudu (Atlas 1995). Biolagunemist viivad läbi mikroorganismid, kes lagundavad nafta vähem ohtlikeks ühenditeks, kuid selline looduslik protsess on aeglane (Doerffer 1992, Obi *et al.* 2014). Tähtsamad nafta lagunemist limiteerivad tegurid on hapniku kontsentratsioon, temperatuur ja toitainete kättesaadavus vees (Doerffer 1992). Enamasti

merevee pinnakihi ja kõrge energiaga merealadel nagu näites rannikualadel ei ole hapnikupuudus probleemiks. Peamiselt on nafta biolagunemist limiteeriv tegur meres erinevate toitainete, nagu fosfori ja lämmastiku väga väike kontsentratsioon merevees (Atlas 1995). Loodusliku biolagunemisprotsessi kiirendamiseks lisatakse merevette juurde lämmastikku ja fosforit, et soodustada naftat lagundavate mikroorganismide kasvu (Obi *et al.* 2014). Vee temperatuur on oluline tegur, kuna see mõjutab bioloogilist aktiivsust. Veetemperatuuri alanemisel hapniku kogus meres tõuseb (Doerffer 1992). Biolagunemist saab samuti kiirendada lisades naftaga reostunud alale juurde süsivesinike lagundavaid mikroorganisme. Enamus külvamiseks kasutatavaid mikroorganisme saadakse asukohtadest, kus on eelnevalt juba toimunud naftareostus ning, mis on seetõttu rikastunud naftat lagundavate mikroorganismide kooslustega. Kuna aga süsivesinike lagundavad mikroorganismid on niigi laialt levinud mere-, magevees ja pinnases, ei näita nende kultuuride lisamine naftareostustele nii suurt efektiivsust kui toitainete lisamine ning hapniku olemasolu tagamine (Atlas 1995).

Jahedamas kliimas on osade puhastusmeetodite kasutamine piiratud jää tõttu, kuid efektiivseteks meetoditeks on loetud mehaanilist puhastust (*skimmer*'ite ja poomidega), dispersande ja *in situ* põletamist. Nafta käitumine jäätingimustes sõltub suuresti valitsevast aastaajast ja jää kontsentratsioonist. Nii sula kui jäätumise korral on liikuva jää tõttu koristustööd meres raskendatud. Südatalvel, kui valitseb stabiilne ühtne jääkate, on naftareostus kontsentreeritud ühte piirkonda. Triivjää võib aga nafta transportida lekkekohast kaugele. Meetodi sobivus ja efektiivsus olenevad sellest, millised jääolud meres valitsevad (Wilkinson *et al.* 2017).

Arktilises kliimas peab silmas pidama nafta voolavuspunkti. Kui nafta voolavuspunkt on madalam kui vee temperatuur, jääb nafta veepinnale. Kui nafta voolavuspunkt on paar kraadi (5–10°C) kõrgem kui veetemperatuur, võib nafta tahkuda. Sellest sõltub missuguseid mehhaanilisi meetmeid on vajalik kasutusele võtta (Wilkinson *et al.* 2017).

Mehhaaniliste likvideerimismeetoditena on *skimmer*'ite ja poomide kasutus arktilistes meredes teatud tingimustes võimalik. Näiteks on olemas spetsiaalseid poome, mis on mõeldud kasutamiseks sellistes tingimustes, kus on vähene jääkate. Poomide kasutamist arktilistes meredes takistab see, et naftareostuse piiramisel jääb piiramissüsteemi sisse ka jää, mis võib poome lõhkuda. *Skimmer*'eid on tõhusaim kasutada avavees jäätükkide vahel. Jää tingimustes

eelistatakse selliseid tehnoloogiaid, mis ei ummistaks likvideerimisvahendeid jäätükkidega (Wilkinson *et al.* 2017).

Dispersandide kasutus arktilistes meredes on võimalik katkise jää puhul, kusjuures aine lisatakse otse naftale. Selle meetodi kasutusel jahedamas kliimas on nii miinuseid kui plusse. Ühelt poolt, arktilistes meredes on lagunemisprotsessid madalate temperatuuride tõttu (näiteks aurustumine ja emulgeerumine) aeglasemad, mistõttu sobilik ajavahemik dispersandide efektiivseks kasutamiseks on laiem. Seevastu jälle madalamad temperatuurid hoopis suurendavad nafta viskoossust ning teatud viskoossusest alates hakkab dispersandide efektiivsus kahanema. Selle meetodi puhul peab arvestama, et jää tõttu on summutatud ülemise veekihi lainete tegevus, mis muidu aitaks hajutada naftat väikeste piiskadena merre. Pärast segunemist võib osa naftast tõusta uuesti vee pinnale ja jääda jää alla (Wilkinson *et al.* 2017).

*In situ* põletamise meetodi rakendamine sõltub jää kontsentratsioonist. Kui jää osakaal on suurem kui 7/10, siis käitub jää ise loodusliku poolina ning põletamise läbiviimisel mehaanilist abi tarvis pole. Jää kontsentratsiooni puhul 3/10 on vajalik kasutada tulekindlaid poome. Vahepealsete jää kontsentratsioonide puhul pole jääd piisavalt, et käituda isoleerimisbarjäärina, kuid samas on jää kontsentratsioon piisavalt kõrge, et vähendada mehhaaniliste isoleerimissüsteemide tõhusust (Wilkinson *et al.* 2017).

## **2.5 Nafta biolagunemine meres**

Nafta bioloogiline lagunemine saab toimuda tänu mikroorganismidele (bakterid, seened ja vetikad), kellel on võime lagundada nafta ühendeid. Nafta kompleksse koostise tõttu on selle lagundamiseks vajalik eri liikidest koosnevad mikroorganismide kooslused, sest igal liigil on võime lagundada eri süsivesikuid (Atlas 1995). Seetõttu toimub nafta lagundamise käigus mikroorganismide koosluste suksessioon. Kindlatele substraatidele spetsialiseerunud mikroorganismide arvukus väheneb peale nende substraatide lõpptarbimist ära ja asemele tulevad uued mikroobiliigid, mis suudavad metaboliseerida järelejäänud ühendeid (Hazen, Prince 2015).

Mikroorganismid lagundavad süsivesinikke peamiselt oksüdeerimise teel. Algse oksüdeerimise viivad läbi ensüümid oksüdaas ja peroksüdaas. Sellise lagunemisreaktsiooni puhul on vajalik hapniku olemasolu, mis tavaliselt ei ole pinnavees piiravaks teguriks.

Hapnikupuudus võib esineda põhjasetetes ja teatud tingimustes ka alumistes veekihtides (Hazen, Prince 2015). Hapnikusisaldus põhjasettes oleneb sette tüübist, vee küllastatusest, mikroobide hapniku tarbest ja substraatide olemasolust. Üldjuhul, peale õhukese pealmise kihi, valitsevad veesetetes siiski anaeroobsed tingimused (Leahy, Colwell 1990). Anaeroobsetes tingimustes on naftaühendite lagunemine võimalik juhul, kui hapniku asendavad teised elektronaktseptorid. Sellisteks elektronakseptoriteks võivad olla näiteks  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  ja  $\text{NO}_3^-$  (Hazen, Prince 2015). Hapniku puudumisel on nafta biolagunemine tavaliselt palju aeglasem kui hapniku olemasolul (Harayama1 *et al.* 2004, Hazen, Prince 2015). Tavaliselt jääb nafta bioloogilisel lagundamisel alles kõrge asfalteensete komponentide sisaldusega inertne jääkaine, mille toksilisus ja biokättesaadavus on madal. Kui jääkaine ei kata suuremat ala seda lämmatades, siis see ei mõjuta see ümbritsevat keskkonda. Naftasaaduste täieliku biolagunemise puhul on lõpp-produktideks süsihappegaas ja vesi (Atlas 1995).

Nafta biolagundamisel merevees ja setetes on peamine roll bakteritel (GRACE 2017). Merevees on leitud mitmeid bakterite liike, kes suudavad naftat lagundada. Kuigi osa liike on juba kirjeldatud, on suur osa naftat lagundavaid baktereid mittekultiveeritavad. Ühed tähtsamad bakterite perekonnad, mis mängivad olulist rolli nafta lagundamisel, on *Alcanivorax* ja *Cycloclasticus*. *Alcanivorax* suudab lagundada alkaane ja *Cycloclasticus* on tähtis aroomaatsete süsivesinike lagundaja (Harayama1 *et al.* 2004). Veel võib näiteks tuua perekondi *Acinetobacter*, *Pseudomonas* ja *Rhodococcus*, mis kannavad samuti tähtsat rolli nafta biolagundamisel (GRACE 2017).

Nafta biolagunemine sõltub mitmetest keemilistest, füüsikalistest ja bioloogilistest asjaoludest (Hazen, Prince 2015). Olulised on nii nafta enda omadused kui ka ümbritseva keskkonna iseloomulikud jooned, kus reostus on aset leidnud (Atlas 1995). Peale hapnikupuuduse mõjutab mikroorganismide võimet nafta ühendeid lagundada, selliste anorgaaniliste toitainete, nagu näiteks lämmastiku ja fosfori kättesaadavus. Lahendusena saab aga biolagunemist stimuleerida puuduvate toitainete lisamisega (Leahy, Colwell 1990). Lisaks on oluline ka lagundatavate süsivesinike ehitus. Keerukamate struktuuridega süsivesinikel on väiksem biolagunemise kiirus, sest neid lagundavate mikroorganismide arvukus on väiksem. Sellisteks ühenditeks loetakse näiteks mitme haruga või kondenseeritud rõngaga molekule (Atlas 1995). Keskkonnategurid nagu keskkonnatemperatuur ja lainete aktiivsus mõjutavad nafta olekut merevees, mis omakorda mõjutab nafta kättesaadavust mikroorganismidele. Kui lainete ja

tuulte mõjul hajub nafta väikeste tilkadena veesambasse, moodustades õli-vee emulsiooni, siis tilga suurenenud eripindala tõttu soodustab see mikroorganismide tegevust. Suured emulsioonimassid aga võivad olla vastupidise efektiga. Temperatuur mõjutab nii naftasaaduste viskoossust kui ka mikroorganismide kooslust ja biolagundamise kiirust. Madalam temperatuur tähendab üldiselt suuremat viskoossust ja väiksemat biolagunemise aktiivsust (Leahy, Colwell 1990).

Mikroorganismide kohanemisvõimest tulenevalt võib biolagunemine kiiremini toimuda piirkondades, kus mikroorganismid on eelnevalt naftaga kokku puutunud (Hazen, Prince 2015, Leahy, Colwell 1990). Biolagunemist läbiviivatel mikroorganismidel on olemas kolm võimalikku kohanemise mehhanismi, mis on omavahel seotud: 1) kindlate ensüümide induktsioon või deduktsioon, 2) geneetilised muudatused (millega kaasnevad uued metaboolsed võimed), 3) spetsiifilist ühendit lagundavate mikroorganismide arvukuse suurenemine. Lisaks võib kohanemisel oluline roll olla ka plasmiididel. Plasmiidid on eriti liikuvad DNA vormid, mille abil on võimalik edasi kanda mikroobirakkude vahel uusi fenotüüpe, kaasaarvatud süsivesinike lagundamise suutlikkust (Leahy, Colwell 1990).



### 3. Materjal ja metoodika

#### 3.2 Mere pinnavee proovide võtmine

Antud töös kasutatud merevee proovid koguti 13. aprillil 2016. aastal Teravmägede lähedalt, Põhja-Jäämerest. Kolmest erinevast kohast koguti laevaga umbes 100 liitrit mere pinnavett. Merevesi säilitati temperatuuril 4°C kuni laboris kasutamiseni. Täpsemad kogumispunktid on väljatoodud joonisel 2. Proovide kogumisel töö autor ei osalenud.



**Joonis 2.** Mere pinnavee kogumispunktid Teravmägedel.

#### 3.2 Mikrokosmide ja biodegradatsiooni proovide ettevalmistamine

Kogutud mereveest valmistati kolm erinevat mikrokosmi varianti kahes korduses: merevee ja nafta mikrokosm, biostimulatsiooni mikrokosm ning kontrollmikrokosm. Mikrokosmide valmistamisel kasutati 1 liitriseid Schott Duran tüüpi pudeleid, mis suleti pealt puuvillase korgiga. Iga pudel täideti 900 ml mereveega (kontrollmikrokosmide jaoks merevesi eelnevalt steriliseeriti). Iga mikrokosmile lisati juurde 9 g Troll B toornaftat, mida enne kuumutati steriliseerimiseks 3 päeva järjest 30 minutit temperatuuril 70 °C. Biostimulatsiooni mikrokosmidele lisati pudelitesse täiendavalt juurde NPK väetist (22-3-10) kontsentratsiooniga 4,5 g/ 900 ml (130 mg/l P, 500 mg/l NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 580 mg/l NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Kõiki proove inkubeeriti 4°C juures pimedas ilma segamiseta. Mikroobikoosluse DNA eraldati

mikrokosmidest 4 ja 8 kuu möödudes ning samuti algsest korjatud mereveest. Kogutud mereveeproovides (proovid kogumispunktist 1, 2 ja 3) ning valmistatud mikrokosmides määrati vee pH, lahustunud hapniku sisaldus (mg/l), temperatuur (°C), soolsus (ppt), nitraadi sisaldus (mg/l), ammooniumi sisaldus (mg/l), üldlämmastiku sisaldus (mg/l), orgaanilise süsiniku üldsisaldus (mg/l), ortofosfaadi sisaldus (mg/l) ja üldfosfori sisaldus (mg/l).

Paralleelselt valmistati proovid Troll B toornafta bioloogilise lagunemise kineetika määramiseks. Proovide valmistamine viidi läbi analoogselt mikrokosmi proovidega. Ainukesena muudeti merevee kogust, mida vähendati 200 ml-ni. Antud töö autor ei osalenud eelnevalt nimetatud katsete läbiviimisel.

### **3.3 Mikroobikoosluse DNA eraldamine**

Mikroobikoosluse DNA eraldati neljateistkümnest veeproovist kasutades *DNeasy PowerWater Sterivex Kit*’i (QIAGEN Group, CA, USA) vastavalt tootjapoolsele juhendile.

DNA eraldamise protsessi edukust kontrolliti *Infinite M200* (Tecan Group Ltd, Männedorf, Šveits) spektrofotomeetrit kasutades.

Antud töö autor ei osalenud eelnevalt nimetatud katsete läbiviimisel.

### **3.4 Kvantitatiivne PCR**

Antud töös kasutati qPCR-i (kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon) läbiviimiseks masinat *Rotor Gene® Q* (QIAGEN Group, CA, USA). qPCR segu lõppmahuga 10 µl sisaldas vastavaid praimeritepaare (Tabel 1) lõppkontsentratsiooniga 0,0006 mM, 5 µl *Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ning 1 µl vastava proovi DNA-d. Kõiki proove amplifitseeriti kolmes korduses. Võimaliku DNA saastatuse vältimiseks kasutati igas qPCR reaktsioonis negatiivset kontrolli, mis koosnes kõigist reaktsiooni komponentidest peale märklaud DNA. 16S rRNA geenide amplifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks kasutatud qPCR programmid on toodud tabelis 2.

**Tabel 1.** Arhede ja bakterite märklaudgeenid ning vastavad praimerid.

Märklaudgeen	Praimer	Järjestus (5' – 3')	Produkti pikkus	Praimerite seondumistemperatuur	Viide
Arhede 16S rRNA	Arc519F	CAGYCGCCRCGGTAA <sup>A</sup>	393	56	Espenberg <i>et al.</i> 2016
	Arch910R	GAATWGGCGGGGGRGC <sup>A</sup>			
Bakteriaalne 16S rRNA	Bact517F	GCCAGCAGCCGCGGTAA	530	60	Liu <i>et al.</i> 2007
	Bact1028R	CGACARCCATGCASCACCTA <sup>A</sup>			Dethlefsen <i>et al.</i> 2008

<sup>A</sup> – nukleotiidide tähistused: **R** – A või G, **Y** – C või T, **W** – A või T, **S** – G või C.

**Tabel 2.** Kasutatud qPCR programmide parameetrid.

Märklaudgeen	qPCR programm	Sulamiskõverate analüüs
Arhede 16S rRNA	1 tsüklil: 50°C 2 min 1 tsüklil: 95°C 10 min 35 tsükli: 95°C 15 sek, 56°C 30 sek, 72°C 30 sek	70–95°C Samm: 0,35°C
Bakteriaalne 16S rRNA	1 tsüklil: 50°C 2 min 1 tsüklil: 95°C 10 min 35 tsükli: 95°C 30 sek, 60°C 45 sek, 72°C 45 sek	70–95°C Samm: 0,35°C

### 3.5 qPCR andmete kvaliteedikontroll ja grupeerumine

Kõikide proovide qPCR tulemusi analüüsiti arvestades programmi RotorGene® Q (versioon 2.0.2) poolt antud sulamiskõverate kuju ja asukohta ning paralleelide amplifikatsioonikõverate ühtlust. Geenifragmentide amplifikatsiooni efektiivsuse hindamiseks kasutati programmi LinRegPCR (versioon 2017.1). Proove analüüsiti kolme erineva ampliconina.

### 3.6 Märklaudgeenide koopiaarvude leidmine

Proovides sisalduvate arhede ja bakterite 16S rRNA geenifragmentide koopiaarvude arvutamiseks kasutati Rujiter *et al.* (2009) poolt välja pakutud valemit (1) proovi (A) ja iga 10 kordse standardi lahjenduse (B) hinnangulise erinevuse (FD) leidmiseks.

$$FD = N_{0,A}/N_{0,B} = (N_{t,A}/E_A^{C_{t,A}})/(N_{t,B}/E_B^{C_{t,B}}) \quad (1)$$

Kus:

$N_0$  – keskmine amplikonide A ja B algkontsentratsioon (fluorestsentsühikutes)

$E$  – amplifikatsiooniefektiivsus

$N_t$  – fluorestsentsi läviväärtus

$C_t$  – fluorestsentsi läviväärtuseni jõudmiseks vajalik tsükliite arv

Geenikoopiate hinnangulise arvukuse leidmiseks korrutati iga saadud FD väärtus vastava standardi lahjenduse geenikoopiate arvuga. Kõikide uuritud geenide koopiaarvud väljendati iga proovi puhul 1 ml merevee kohta. Kõikides mikrokosmides määrati bakterite ja arhede osakaalud.

## **4. Tulemused**

### **4.1 Merevee ja mikrokosmide keemilised näitajad**

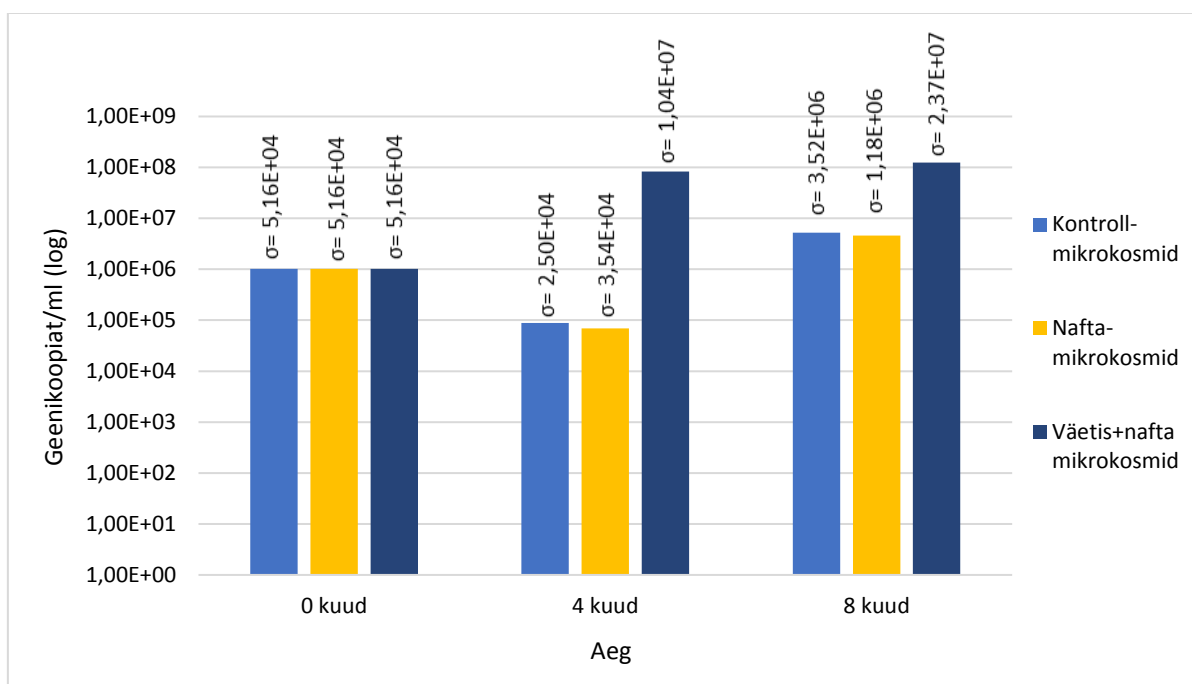
Veeproovide keemilise analüüsi tulemused on välja toodud lisa 1. Tulemused näitasid nitraadi, ammoniumi ja üldfosfori sisalduse vähenemist pärast 4 ja 8 kuu möödumist nii kontrollmikrokosmides, kui ka naftamikrokosmides. Võrreldes teiste mikrokosmidega säilis biostimulatsiooniga mikrokosmides 4 ja 8 kuu möödudes toitainete sisaldus kõrgena. Samuti näitasid NPK väetistega mikrokosmid madalamat pH väärtust (pH=6.8) võrreldes teiste mikrokosmidega (pH=8–8.2). Kolmest erinevast kohast kogutud merevee proovide keemilised näitajad erinesid omavahel väga vähe.

### **4.2 Nafta biolagunemise tulemused**

Analüüsi tulemused näitasid süsivesinike üldsisalduse vähenemist kontrollproovis 4 ja 8 kuu möödudes vastavalt 10% ja 30%. Nii NKP väetisega, kui ka naftaga proovide tulemused näitasid süsivesinike üldsisalduse vähenemist vaid natuke rohkem (20% ja 40% vastavalt 4 ja 8 kuu möödudes). 16 EPA-PAH analüüs näitas kontrollproovis polütsükliliste aromaatsete süsivesinike (edaspidi: PAH) üldkoguse vähenemist 65% ja 70% vastavalt 4 ja 8 kuu möödudes. NPK väetist sisaldava proovi tulemus näitas natuke suuremat PAH vähenemist (70% ja 85%), kui kontrollproov ning naftaproov. Süsiniku üldsisalduse analüüsil määrati abiootilise lagunemise osakaaluks 30% ja 16 EPA-PAH analüüsil 70%.

### 4.3 Bakterite ja arhede üldarvukuse muutus ajas

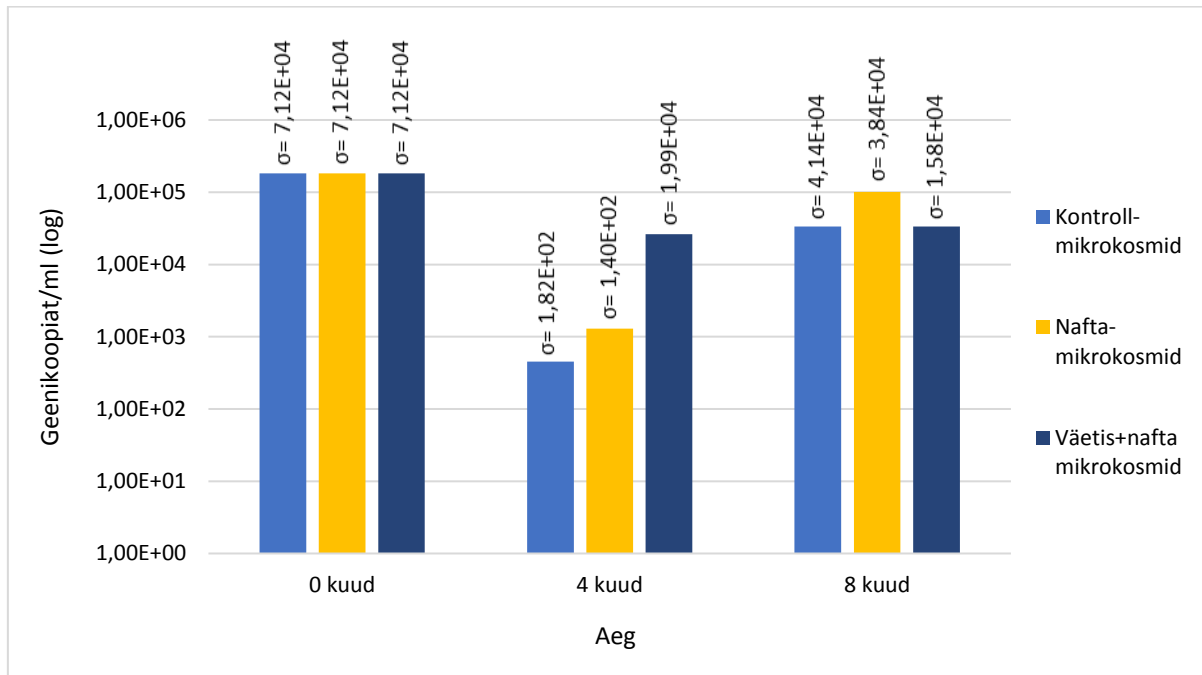
Bakterite üldarvukuse muutust iseloomustab joonis 3, kus on välja toodud bakterite 16S rRNA geenikoopiate arv ühe milliliitri merevee kohta. Kontrollmikrokosmides ja naftamikrokosmides on näha sarnast bakterite üldarvukuse muutuse trendi, kus algselt pärast 4 kuud inkubeerimist on arvukus langenud kuid hiljem (pärast 8 kuud inkubeerimist) tõusnud. Kontrollmikrokosmide geenikoopiate arv 0, 4 ja 8 kuu möödudes oli vastavalt  $1,02E+06$  koopiat/ml,  $8,86E+04$  koopiat/ml ja  $5,23E+06$  koopiat/ml. Naftamikrokosmide 16S rRNA geenikoopiate arv vastavalt  $1,02E+06$  koopiat/ml,  $6,91E+04$  koopiat/ml ja  $4,59E+06$  koopiat/ml. Biostimulatsiooniga mikrokosmides suurenes geenikoopiate arv pärast 4 kuud inkubeerimist umbes kaheksakümne kordselt, edaspidine arvukuse tõus oli aga väike. NKP väetisega mikrokosmides oli bakteriaalse 16S rRNA geenikoopiate arv 4 kuu möödudes  $8,28E+07$  koopiat/ml ning 8 kuu möödudes  $1,24E+08$  koopiat/ml.



**Joonis 3.** Bakterite arvukuse muutus ajas. Y-teljel on bakterite 16S rRNA geenikoopiate arv 1 ml mereveekohta esitatud logaritmilises skaalas.

Arhede arvukuse muutus ajas on esitatud joonisel 4, millel on näidatud arhede 16S rRNA geenikoopiate arv ühe milliliitri merevee kohta. Kõikides mikrokosmides langes arvukus märgatavalt pärast 4 kuud inkubeerimist. Pärast 8 kuud inkubeerimist tõusis arhede arvukus oluliselt kontrollmikrokosmides ja naftamikrokosmides. Kontrollmikrokosmides oli 16S rRNA geenikoopiate arv 0, 4 ja 8 kuu möödudes vastavalt  $1,83E+05$  koopiat/ml,  $4,50E+02$

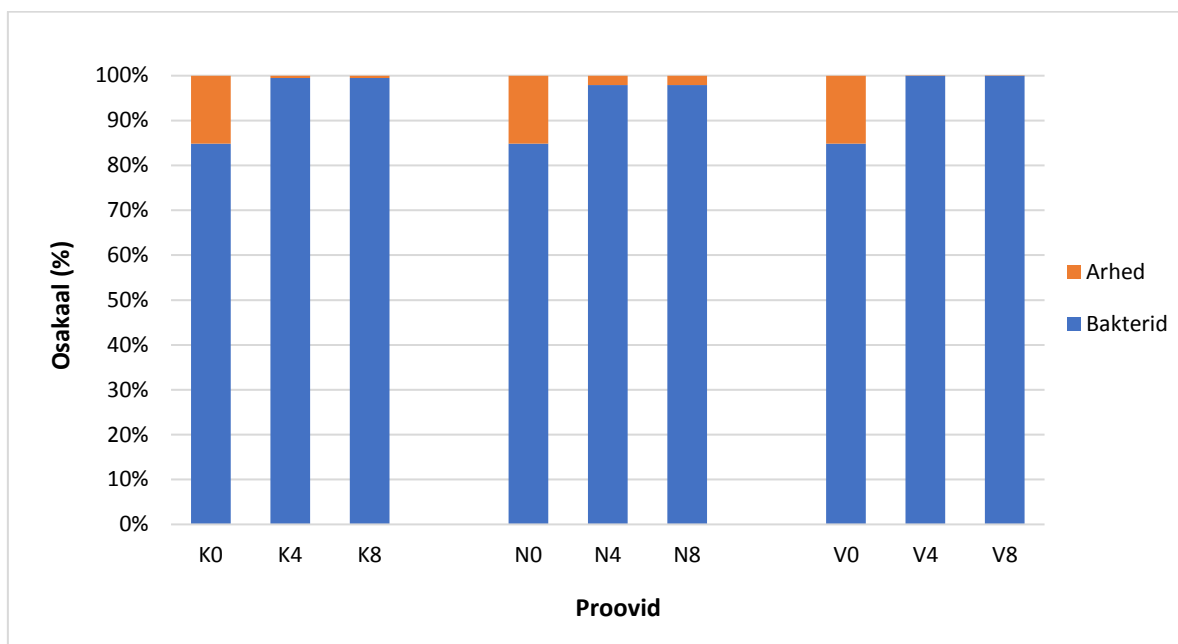
koopiat/ml ning  $3,37E+04$  koopiat/ml. Naftamikroosmides vastavalt  $1,83E+05$  koopiat/ml,  $1,30E+03$  koopiat/ml ja  $1,01E+05$  koopiat/ml. Biostimulatsiooniga mikroosmides jäi arvukus pärast esialgset langust enam-vähem stabiilseks. NKP väetisega mikroosmides oli 16S rRNA geenikoopiate arv pärast 4 kuud  $2,63E+04$  koopiat/ml ning pärast 8 kuud  $3,35E+04$  koopiat/ml.



**Joonis 4.** Arhede arvukuse muutus ajas. Y-teljel on arhede 16S rRNA geenikoopiate arv 1 ml mereveekohta esitatud logaritmilises skaalas.

#### 4.4 Bakterite ja arhede osakaal mikroosmides

Bakterite ja arhede osakaalude muutus mikroosmides on välja toodud joonisel 5. Algselt kogutud merevees oli bakterite osakaal proovis 84,85% ja arhede osakaal 15,15%. Pärast 4 kuud inkubeerimist vähenes kõikides mikroosmides arhede osakaal ning bakterite osakaal jäi mikroosmides vahemikku 97,94%–99,97%. Edaspidi inkubeerimise jooksul arhede ja bakterite vahekorid oluliselt ei muutunud.



**Joonis 5.** Bakterite ja arhede osakaalude muutus mikroosmides (K0, N0 ja V0- merevesi, K4- kontrollmikrokosm 4 kuud, K8- kontrollmikrokosm 8 kuud, N4- naftamikrokosm 4 kuud, N8- naftamikrokosm 8 kuud, V4- väetis+nafta mikrokosm 4 kuud, V8- väetis+nafta mikrokosm 8 kuud).



## 5. Arutelu

Kõikides mikrokosmides tõusis bakterite osakaal peale inkubeerimist. Arhede osakaal langes pärast inkubeerimist naftamikrokosmides peaaegu 2%-ni ning biostimulatsiooniga mikrokosmides ja kontrollmikrokosmides alla 1%, mis näitab, et keskkonnatingimuste muutudes on bakterite kohanemisvõime suurem võrreldes rahedega. Seega on bakterite osatähtsus nafta lagundamisel on palju suurem kui arhedel.

Peaaegu kõikides mikrokosmides langes bakterite ja arhede arvukus peale 4 kuud inkubeerimist, kuid pärast 8 kuud inkubeerimist üldarvukus jälle tõusis. Esialgne üldarvukuse langus ja hilisem tõus viitab mikroorganismide koosluste muutustele ning näitab mikroorganismide kohanemist inkubeerimistingimustega. Erandina tõusis (peale 4 kuud inkubeerimist) hüppeliselt bakterite arvukus biostimulatsiooniga mikrokosmides. Bakterite arvukuse tõus viitab sellele, et toitainete lisamine soodustab bakterite elutegevust. Seda kinnitab ka keemilise analüüsi tulemused, mis näitasid biostimulatsiooniga mikrokosmides madalamat pH võrreldes teiste mikrokosmidega. Madalam pH viitab tugevamale mikroorganismide kasvule. Biostimulatsiooniga mikrokosmides oli arhede üldarvukuse kõikumine väiksem 4 ja 8 kuu jooksul võrreldes teiste mikrokosmidega, kuid üldiselt ei näidanud NPK väetise lisamine erilist mõju arhede arvukusele.

Kontrollproovi eesmärk Troll B toornafta bioloogilise lagunemise kineetika katses oli hinnata abiootilise lagunemise osatähtsust nafta lagundamisel. Kontrollproovi tulemused näitavad, et arvestatav osa naftast laguneb ainult abiootiliste tegurite mõjul. NKP väetise lisamine ei stimuleerinud nafta lagunemist märgataval määral. Võrreldes kontrollprooviga vähenes nii väetise ja nafta proovides süsivesinike üldsisaldus vaid 10% rohkem ning naftaga proovides PAH sisaldus 15% rohkem. Tulemustest järeldub, et nafta biolagunemist võib oluliselt mõjutada peale toitainete kättesaadavuse ka muud abiootilised faktorid, näiteks temperatuur ja nafta lahustuvus. Keemilise analüüsi tulemused näitasid, et väetisega mikrokosmi proovides säilis toitainete sisaldus kõrgel ka pärast 4 ja 8 kuud inkubeerimist, mistõttu ei saanud toitainete kättesaadavus olla piiravaks teguriks nafta biolagunemisel.

Antud töö tulemustest saab järeldada, et NKP väetise lisamine stimuleerib bakterite kasvu, kuid suurendab nafta biolagunemise efektiivsust vaid vähesel määral. Tulemustest selgus, et toitainete olemasolu ei ole ainuke tähtis faktor, mis mõjutab nafta biolagunemist. Lisaks sellele on veel teisi tegureid, mis mõjutavad oluliselt nafta bioloogilist lagundamist. Katsetest saadi teada, et bakterite osatähtsus nafta lagunemisel arktilistes meredes on palju suurem kui arhede.

Antud katsete puhul võiks edasi uurida, kuidas erinevad väetise kontsentratsioonid mikrokosmides ning kaaliumi, lämmastiku ja fosfori vahekorrad väetises mõjutavad nafta biolagunemist. Lisaks võiks analüüsida dispersandide mõju bioloogilisele lagunemisele.

Röling *et al.* (2002) poolt läbi viidud katses analüüsiti, kuidas toitainete lisamine mõjutab nafta biolagunemist naftaga saastunud rannikusetetes. Naftaga saastunud rannikusetete mikrokosme töödeldi erinevates kontsentratsioonides anorgaaniliste toitainetega. Mikroobikoosluse iseloomustamiseks kasutati molekulaarseid meetodeid (16S rRNA geeni PCR-il põhinev denatureeriv gradient geelelektroforees (DGGE) ja kloonide raamatukogud). Kuigi Röling *et al.* (2002) poolt läbi viidud eksperiment ning käesoleva töö katsed erinevad meetodi poolest, seob katseid ühine eesmärk analüüsida biotervendamise mõju nafta biolagundamisele. Vastupidiselt käesoleva töö tulemusele näitasid Röling *et al.* (2002) poolt läbi viidud katsete tulemused, et toitainete lisamine parandas nafta lagunemist oluliselt. Kuid tehti oluline märkus, et pigem oli nafta lagundamisel oluline toitainete lisamine, kui täpne toitainete kogus, mis lisati. Samuti selgus katsest, et lämmastiku ja fosfori toitainete lisamine vähendas drastiliselt bakterikogukonna mitmekesisust, mis osaliselt kajastub ka antud töös. Tulemuste võrdlemisel, tuleb meeles pidada, et ühel juhul uuritakse mikroobikooslust rannikusetetes ning teisel merevees. Lisaks erinevad kahe töö vahel katse tingimused ning uuritav asukoht.

Käesoleva töö tulemuste võrdlemisel teiste avaldatud andmetega on oluline arvestada, et qPCR meetodi puhul sõltub märklaudgeeni koopiite arvukuse määramise lõpptulemus sellest, millist DNA eraldamise meetodit kasutati. Nukleiinhapete ekstraheerimise efektiivsus erineb eri meetodite vahel oluliselt. Samuti sõltuvad tulemused märklaudgeeni amplifikatsiooni efektiivsusest ja analüüsitavaate proovide amplifikatsioonikõverate vastavusest standardkõveraga (Smith, Osborn 2009).

## 6. Kokkuvõte

Nafta sattumisel merre hakkavad seda lagundama ja muutma erinevad lagundamisprotsessid, mis on peamiselt mõjutatud ilmastiku oludest. Olenevalt asukohast ja kliimast on teatud lagunemisprotsessid võimendatud või nõrgendatud. Merre sattunud nafta likvideerimismeetodite valimisel, tuleb arvestada asukoha eripärasustega ning ilmastikuga. Naftareostus koristustöödel on üheks eesmärgiks peatada reostuse levikut rannikualadele, kus naftareostus võib püsida aastaid. Üks oluline viis, kuidas naftareostust looduslikult keskkonnast eemaldatakse on mikroorganismide elutegevuse kaudu. Nafta biolagunemise kiirus ja ulatus oleneb nafta süsivesinike ehitusest. Keerukamate struktuuridega süsivesinikel on väiksem biolagunemise kiirus, sest neid lagundavate mikroorganismide arvukus on väiksem. Lisaks mõjutab biolagunemise efektiivsust toitainete (näiteks lämmastiku ja fosfori) olemasolu, hapniku sisaldus ja temperatuur merevees. Üheks naftareostuse likvideerimise meetodiks on biotervendamine, kus proovitakse suurendada biolagunemise protsessi efektiivsust, loodusliku protsessi limiteerivate tegurite parandamise kaudu. Peamiselt toimub biotervendamine meres toitainete lisamise kaudu.

On teada, et jahedama kliima tõttu on arktilistes meredes teatud nafta lagunemisprotsessid aeglasemad. Antud bakalaureusetöö eesmärk oli uurida nafta biolagunemist arktilises meres ning selle seost arhede ja bakterite arvukusega, Mikroobide arvukuse määramisel kasutati qPCR meetodit. Lisaks analüüsiti, kas NPK väetise lisamine suurendab nafta biolagunemise efektiivsust.

Töö tulemused näitasid, et arktilises merevees on bakterite roll nafta lagundamisel tähtsam kui arhedel. Toitainete lisamine soodustas bakterite kasvu, kuid suurendas nafta biolagunemist vaid vähesel määral. Töö tulemustest selgus, et lisaks toitainete kättesaadavusele mõjutavad nafta biolagunemist arktilises merevees oluliselt ka muud faktorid.

## 7. Summary

When oil is spilled into the marine environment it begins to decompose and change through various natural degradation processes, which are mainly affected by weather conditions. Depending on the location of the oil spill and the climate of the region, certain degradation processes are amplified or weakened. When choosing the right method for the oil spill liquidation the specifics of the location and the weather must be taken into account. One of the goals of the oil spill liquidation is to stop the pollution from spreading to the coastal areas, where the oil pollution can last for years. One of the important ways oil spills are removed from the environment is by biodegradation. Oil biodegradation depends on the structure of hydrocarbons. Complex hydrocarbon structures have a lower rate of biodegradation because the abundance of microorganisms that can degrade those structures is lower. In addition, the effectiveness of biodegradation is influenced by the availability of nutrients (e.g. nitrogen and phosphorus), oxygen concentration and temperature in seawater. One of the oil spill liquidation methods is bioremediation, where the objective is to increase the efficiency of the biodegradation process by improving the factors limiting the natural process. Bioremediation is mainly carried out by adding nutrients to the oil spill.

It is known that in Arctic seas, due to the colder climate, certain petroleum degradation processes are slower. The purpose of this bachelor work was to study the biodegradation of oil in the Arctic Sea and its relation to the number of archaea and bacteria. The total number of archaea and bacteria was determined using the qPCR method. In addition it was analyzed whether addition of NPK fertilizer increases the efficiency of oil biodegradation.

The results of the work showed that in arctic seawater, the role of bacteria in the biodegradation of oil is more important than archaea. The addition of nutrients contributed to the growth of bacteria but only slightly increased oil biodegradation. The results of the work revealed that in addition to the availability of nutrients the biodegradation of oil in arctic seawater is also greatly influenced by other factors.

## **8. Tänuavaldused**

Autor avaldab tänu kõigile, kes aitasid kaasa käesoleva bakalaureusetöö valmimisele.

Eriti suured tänusõnad minu juhendajatele professor Jaak Truule ja Kertu Tiirikule oskusliku juhendamise ning heatahtliku suhtumise eest.

Suur tänu ka Sirli Zuppingule keelelise toimetuse eest.

## 9. Kirjandus

- Atlas, R.M., 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 31: 178–182.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., & Relman, D.A., 2008. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6(11):e280.
- Doerffer, J.W., 1992. *Oil Spill Response In The Marine Environment*. Permagon Press, Great Britain, pp. 398.
- Espenberg, M., Truu, M., Truu, J., Maddison, M., Nõlvak, H., Järveoja, J., Mander, Ü., 2016. Impact of Reed Canary Grass Cultivation and Mineral Fertilisation on the Microbial Abundance and Genetic Potential for Methane Production in Residual Peat of an Abandoned Peat Extraction Area. *PLoS ONE*, 11(9): e0163864.
- Fingas, M., 2012. *The Basics of Oil Spill Cleanup, Third Edition*. CRC Press, USA, pp. 286.
- GRACE, 2017. Oil biodegradation in seawater and impact of dispersants on oil biodegradation characteristics. D2.1, WP2: Oil biodegradation and bioremediation.
- Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A., 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3): 205–214.
- Hazen, T.C., Prince, R.C., 2015. Marine Oil Biodegradation. *Environ. Sci. Technol.*, 50: 2121–2129.
- IPIECA-IOGP, 2015. Impacts of oil spills on marine ecology: Good practice guidelines for incident management and emergency response personnel.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiol Rev.*, 54(3): 305–315.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., Knight, R., 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35(18):e120.

Mitchell, R.B., 1994. International Oil Pollution at Sea: Environmental Policy and Treaty Compliance. The Massachusetts Institute of Technology Press, USA, pp. 361.

Muizis, A., 2013. Evaluation of the Methods for the Oil Spill Response in the Offshore Arctic Region. Bachelor's Thesis. Helsinki Metropolia University of Applied Sciences.

National Academy of Sciences, 2003. Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. The National Academies Press, USA, pp. 277.

Nelson-Smith, A., 1970. The problem of oil pollution of the sea. In: F.S. Russell and M. Yonge (editors), Advances in Marine Biology. Vol 8. Academic Press, London, pp. 215–306.

Obi, E.O., Kamgba, F.A., and Obi, D.A., 2014. Techniques of Oil Spill Response in the sea. IOSR Journal of Applied Physics (IOSR-JAP), 6(1): 36–41.

Patin, S., 2013. Environmental Impact of Crude Oil Spills. In: S.A. Elias (Editor), Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier Inc., Moscow.

Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., Head, I.M., 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. Appl Environ Microbiol, 68: 5537–5548.

Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., Moorman, A. F. M., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. Nucleic Acids Research, 37(6): e45.

Smith, C. J., Osborn, A. M., 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. FEMS Microbial Ecology, 67(1): 6-20

Talvari, A., 2011. Hädaolukorrad Eestis: Merereostus ja metsatulekahjud. Sisekaitseakadeemia, Tallinn, lk 80.

Wilkinson, J., Beegle-Krause, C.J., Evers, K., Hughes, N., Lewis, A., Reed, M., Wadhams, P., 2017. Oil spill response capabilities and technologies for ice-covered Arctic marine waters: A review of recent developments and established practices. Ambio, 46: 423–441

## **Internetiallikad**

Environmental Pollution Centers, 2017. Oil Spill Pollution.

<https://www.environmentalpollutioncenters.org/oil-spill/> (Viimati vaadatud: 11.04.2018)

## LISA 1

Põhja-Jäämerest kogutud merevee proovide ja mikrokosmide keemilised näitajad.

Proov	Kirjeldus	pH	Lahustunud hapnik (mg/l)	Temperatuur (°C)	Soolsus (ppt)	Nitraat (mg/l)	Ammoonium (mg/l)	Üldlämmastik (mg/l)	Orgaanilise süsiniku üldsisaldus (mg/l)	Ortofosfaat (mg/l)	Üldfosfor (mg/l)
M1	Merevesi kogumiskunktist 1	7,9	-	2	35.5	0.4	0.078	<0.5	2,03	< 0.1	0.15
M2	Merevesi kogumispunktist 2	7,95	-	2	34.9	0.3	0.059	<0.5	2,33	< 0.1	0.12
M3	Merevesi kogumispunktist 3	7,88	-	2	35.3	0.4	0.055	<0.5	2,23	< 0.1	0.16
K4	Kontrollmikrokosm 4 kuud	7,96	10,53	4	34.6	0.67	0.036	-	-	-	0.06
N4	Nafta mikrokosm 4 kuud	8	10,5	4	33.8	0.66	0.018	-	-	-	-
V4	NKP väetisega mikrokosm 4 kuud	6,82	8,3	4	35.2	42.8	255	445	18,3	152	-
K8	Kontrollmikrokosm 8 kuud	8,23	11,8	4	35	<0.3	0.033	-	-	0.03	0.05
N8	Nafta mikrokosm 8 kuud	8,16	-	4	34.6	<0.3	0.01	-	-	0.01	0.04
V8	NKP väetisega mikrokosm 8 kuud	6,85	10,55	4	36	22	262	487	18	105	-



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Marite Blankin,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**„Naftareostused ja naftasaaduste biolagunemine meres“**,

mille juhendajad on Jaak Truu ja Kertu Tiirik,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **30.05.2018**