

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
GEOGRAAFIA OSAKOND

Magistritöö keskkonnatehnoloogias

**Seiratava loodusliku tervenemise potentsiaali hindamine
likvideerimaks naftareostust Gröönimaa rannikul**

Edith Simoniš

Juhendajad: Marika Truu, PhD
Hiie Nõlvak, PhD
Angela Peeb, MSc

Tartu 2020

Seiratava loodusliku tervenemise potentsiaali hindamine likvideerimaks naftareostust Gröönimaa rannikul

Naftareostus on probleem, mis mõjutab elukeskkonda nii maismaal kui vees. Kasvav nõudlus toornafta ja selle saaduste järgi, on tekitanud olukorra, kus tarneks võetakse kasutusele ka sellised mereteed, mida varem kliimaatilistel põhjustel on kasutatud vähe või üldse mitte. Sellega seoses suureneb ka risk naftareostusteks, mistõttu tuleb veelgi enam panustada naftareostuse likvideerimise uuringutesse. Seiratav looduslik tervenemine on üks võimalikest vahenditest, millega ära hoida saasteainete edasist levikut ning soodustada nende lagunemist reostunud aladel. Meetodi peamisteks eelisteks on odavus ning keskkonnasäästlikkus. Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli hinnata seiratava loodusliku tervenemise potentsiaali Gröönimaa rannikul toornafta ja laevakütusega reostunud kividel kasvava biokile bakterikoosluse arvukuse, struktuuri ning nafta ja naftasaaduste lagundamise potentsiaali kaudu.

Märksõnad: *naftareostus, biolagunemine, naftareostuse puhastusmeetodid, looduslik tervenemine, Gröönimaa rannik.*

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll.

Potential of monitored natural attenuation to eliminate oil pollution in the Greenland's coast

Oil pollution is a cause of concern because of its' adverse effects on land as well as to the aquatic environment. Because of the increasing demand for crude oil and its' products, the usage of uncommon sea routes in arctic areas has also increased. Therefore, there is a high risk of oil pollution and more research is needed on how to clean it up from seawater and coastline. Monitored natural attenuation is one of the possible tools that prevents oil from the further spread and promotes the degradation of oil compounds. This study aimed to evaluate the potential of monitored natural attenuation through the estimation of abundance, structure and oil degradation potential of the bacterial community of the biofilm on slate slabs contaminated with crude oil and fuel oil to eliminate oil pollution from Greenland's coast.

Keywords: *oil spills, biodegradation, oil spill cleaning methods, monitored natural attenuation, Greenland coast.*

CERCS: T270 Environmental technology, pollution control.

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Toornafta mitmekesisus ja koostis	7
1.2 Naftareostuse allikad meres ja reostuse jõudmine rannikule	8
1.3 Meetodid nafta ja naftasaadustega reostunud mereranniku kaitseks ja puhastamiseks 10	
1.3.1 Keemilised ja füüsikalised meetodid.....	11
1.3.2 Bioloogilised meetodid.....	13
1.3.2.1 Seiratav looduslik tervenemine.....	15
2. Materjal ja metoodika.....	18
2.1 Eksperimendi, proovivõtu ja keemiliste analüüside kirjeldus.....	18
2.2 Mikrobioloogilised analüüsid.....	20
2.2.1 Biokile eemaldamine plaatidelt ja DNA eraldamine	20
2.2.2 Testkatse proovi koguse suurenemise mõju hindamiseks DNA eralduse kvaliteedile	21
2.3 Bakterite 16S rRNA geeni koopiaarvude määramine kvantitatiivse PCR meetodiga .	21
2.4 PCR produktide ettevalmistamine sekveneerimiseks ja ampliconide sekveneerimine	23
2.5 Sekveneeritud geenifragmentide bioinformaatiline analüüs.....	24
2.6 Statistiline analüüs.....	25
3. Tulemused	26
3.1 Toornafta ja laevakütuse vähenemise ja bakterite 16S rRNA geeni arvukuse ajaline dünaamika kiviplaadide pinnal	26
3.1.1 Toornaftaga kaetud kiviplaadid	26
3.1.2 Laevakütusega kaetud kiviplaadid	29
3.2 Bakterikoosluse struktuur ning nafta ja naftasaaduste lagundamise potentsiaal kiviplaadide biokiles	31
3.2.1 Bakterikoosluse struktuur toornaftaga kaetud kiviplaadide biokiles	31
3.2.2 Bakterikoosluse struktuur laevakütusega kaetud kiviplaadide biokiles.....	33
3.3 Nafta ja naftasaaduste lagundamise potentsiaal erineva töötusega kiviplaadide biokiles	35

3.3.1 Naftalagundajate osakaal bakterikoosluses	37
3.3.2 Naftalagundajate hinnanguline arvukus toornaftaga kaetud plaatidel	39
3.3.3 Naftalagundajate hinnanguline arvukus laevakütusega IFO 180 kaetud plaatidel	42
4. Arutelu.....	46
Kokkuvõte	50
Summary	52
Tänuavaldused	54
Kasutatud kirjandus	55
Lisad.....	66

Kasutatud lühendid

- 16S rRNA – prokarüootide ribosoomi väikeses alaühikus sisalduv ribosomaalne RNA
- ABA – autohotoonne bioaugmentatsioon (*Autochthonous Bioaugmentation*)
- API – nafta tiheduse hindamise skaala (*American Petroleum Institute degrees*)
- AVP – aeglaselt vabanevd osakesed (*Slow Release Particles*)
- BA – bioaugmentatsioon (*Bioaugmentation*)
- BTEX – benseen, toluen, etüülbenseen, ksüleen (*Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene*)
- DNA – desoksüribonukleinhape, päriliku informatsiooni kandja
- IFO180 – laevakütus (*heavy bunker fuel oil*)
- LÜ – näidatud seost nafta või naftasaaduse lagunemisega üldiselt
- MNA – seirataav looduslik tervenemine (*Monitored Natural Attenuation*)
- OILMAP DEEP – mudel õlireostuse hindamiseks (*OIL Model Application Package for DEEP water releases*)
- PAH – polütsükliilised aromaarsed ühendid (*PolyAromatic Hydrocarbons*)
- PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase Chain Reaction*)
- qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*Quantitative PCR*)
- rANOVA – korduvmõõtmiste dispersioonanalüüs (*repeated measures Analysis Of Variance*)
- ROV – kaugjuhitav seade (*Remotely Operated Vehicle*)
- SCAT – kaldajoone puhastamise hindamismeetod (*Shoreline Cleanup Assessment Technique*)
- SWA – pinnapesuvahendid (*Surface Washing Agents*)

Sissejuhatus

Naftareostus on püsiv probleem, mis mõjutab nii maismaa kui ka veekogude ökosüsteeme (Muthukamalam et al. 2017). Nafta pumpamisel, transportimisel ja kasutamisel esineb sageli naftalekkeid, mis sõltuvalt keskkonda sattunud nafta kogusest viivad väiksema või suurema naftareostuseni meres või mererannikul (Al-Hawash et al. 2018). Naftareostuseks loetakse nafta süsivesinike juhuslikku või tahtlikku heidet looduskeskkonda inimtegevuse tagajärjel (Doshi et al. 2018). Kõige enam reostatakse merekeskkonda ja -rannikut toornafta ja selle saaduste tootmise ja transportimise käigus (Ismail & Dadrasnia, 2014). Peamiselt kasvav nõudlus nafta järgi on innustanud transporditööstust tarnet suurendama, kasutades selleks ka neid mereteid, mida varem kasutati kliimaatilistel põhjustel vähem või üldse mitte. Sellega seoses on suurenenud ka tõenäosus naftareostusteks õnnetuste või tehniliste puudujääkide (aluste tankimise ebaefektiivsus, lekkivad mahutid ja torud) tõttu (Chen et al. 2017). Viimase 10 aasta jooksul on toornafta ja selle saaduste veomaht mereteedel olnud tõusuteel. Statista hinnangul transporditi 2018. aastal 2 038 miljonit tonni toornaftat, mis on võrreldes 2010. aasta kogusega (1 867 miljonit tonni) märgatavalt kasvanud (Statista, 2019). *Organization of the Petroleum Exporting Countries* prognoosib 2040. aastaks naftatarbimise kasvu 23,1% võrra ehk nafta nõudlus suureneb 111,1 miljoni barrelini (6,23 miljoni tonnini) päevas (Guo et al. 2016). See tähendab, et naftareostusega kaasnevad probleemid (nt. floora ja fauna hävimine, toiduahelate kahjustamine) süvenevad veelgi (Doshi et al. 2018; Xue et al. 2015).

Vees võib naftareostus esineda erinevates vormides, näiteks pinnakilena (nafta süsivesinikud hõljuvad veepinnal ning moodustavad õhukesi pinnakilesid või –laike, mis kanduvad edasi ilmastikuprotsesside toimetel), vesi-õlis ja õli-vees emulsioonidena, õli agregaatide ja klompide kujul, suspendeerituna või akumulatsioonidena veorganismidesse, kuid osa nafta süsivesinikke vajub ka veekogu põhja ning settib (Ossai et al. 2020; Muizis, 2013; Doshi et al. 2018). Õlireostus võib veepinnal kilet moodustades kiiresti laiali valguda ning katta suuri alasid, muutes keeruliseks selle kogumise, kõrvaldamise ning likvideerimise ehk tervendamise protseduuri (Eesti Teaduste Akadeemia Looduskaitse Komisjon, 2002). Tuule ja lainete mõjul võib naftareostus kanduda rannikuvööndisse, kust selle eemaldamine on eriti aeganõudev ja töömahukas protsess (Chen et al. 2019). Olenemata olekust, sisaldavad nafta ja naftasaadused toksilisi ühendeid, mis võivad levida ühest organismist teise toiduahelate ja -võrgustike kaudu. Sellised ühendid põhjustavad kas püsivaid või lühiajalisi kahjustusi organitele, mõjutavad immuunsüsteemi korrektset toimimist ning võivad olla kartsinogeensed ja põhjustada vähirakkude teket nii inimestel kui loomadel (Zhu et al. 2013; Ossai et al. 2020).

Merekeskkonnas toimub naftaga rida füüsikalisi ja keemilisi protsesse, mis kulgevad väga erineva kiirusega, olenedes enamasti naftatüübist ja ilmastikust (National Research Council, 2003; Brakstad et al. 2018). Nafta aurustumine, lahustumine, dispersioon ja emulgeerumine vees sõltuvad välistemperatuurist (Ossai et al. 2020; National Research Council, 2003). Külmas keskkonnas toimuvad eelnimetatud protsessid oluliselt aeglasemalt, kuna külm merevesi suurendab nafta viskoossust, mistõttu võib naftareostus arktilises kliimas püsida aastakümneid (Muizis, 2013; Ferguson et al. 2020). Ilmastikuolud nagu madal temperatuur, tugev tuul, jääkate, halb nähtavus raskendab naftareostuse kõrvaldamist ja ohjamist (Li et al. 2016). Jää olemasolu merevees raskendab õlireostusele reageerimise võimalusi, mis tähendab, et paljud naftareostuse puhastusmeetodid on jääoludes kasutud. Seda demonstreerisid 2001. aastal Alaskal läbiviidud *Clean Seas and Crowley* testid, millest selgus, et füüsikalised tervenemissmeetodid ei ole efektiivsed naftareostuse likvideerimiseks, kui keskkonnas on jääd (Bullock et al. 2019). Ühest küljest võib jääd pidada looduslikuks tõkestajaks, kuna see takistab naftareostuse levikut ning annab reageerimiseks rohkem aega (Muizis, 2013; Vergeynst et al. 2018 (2)). Teisest küljest võib nafta aga jääkilbi alla või sisse minna, muutes puhastusprotsessi äärmiselt keeruliseks kui mitte võimatuks (Muizis, 2013). Aastate vältel on naftareostuse puhastusmeetodikaid täiendatud, kuid sellest hoolimata on nende kasutegur arktilise kliimaga piirkondades jätkuvalt madal (Bullock et al. 2019). Seetõttu leiab kasutust seiratava loodusliku tervenemise (*monitored natural attenuation* – MNA) meetod, mis põhineb hoolikalt jälgitud ja dokumenteeritud looduslike füüsikaliste, keemiliste ja bioloogiliste protsesside (nt. biolagunemine, hajumine, lahjenemine, adsorptsioon ja lendumine) toimel reoaine koguse vähenemisel (Scow & Hicks, 2005; Mapelli et al. 2017).

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli hinnata seiratava loodusliku tervenemise potentsiaali Gröönimaa rannikul toornafta ja laevakütusega reostunud kivil del kasvava biokile bakterikoosluse arvukuse, struktuuri ning nafta ja naftasaaduste lagundamise potentsiaali kaudu.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Toornafta mitmekesisus ja koostis

Nafta süsivesinikud esinevad looduses gaaside (maagaas), pooltahkete ainete (bituumen), tahkete ainete (vaha või asfaltiit) ja vedelike kujul (Ossai et al. 2020). Naftas leiduvaid süsivesinikke võib klassifitseerida parafiinideks (küllastunud süsivesinikud koos hargnemata või hargnenud süsiniku ahelatega), tsükloparafiinideks (küllastunud süsivesinikud, millel on üks või mitu tsüklit koos ühe või mitme parafiini külghelaga) ja aromaatsseteks ühenditeks (ühe või mitme aromaatsse tuumaga süsivesinikud, mis võivad olla seotud asendatud tsükliite ja/või parafiini külghelaga) (Logeshwaran et al. 2018). Nafta süsivesinikke jaotatakse ka erikaalu järgi (Gordon, 2012). Nafta tiheduse hindamiseks kasutatakse API skaalat (*American Petroleum Institute degrees*), mis võrdleb naftatoodete raskust veega – mida väiksem on API väärtus seda raskem on nafta. Viskoossust mõõdetakse sentipoisides (cP), mis tähistab nafta vastupidavust voolule – mida suurem on väärtus seda viskoossem nafta (tabel 1) (Guo et al. 2016).

Toornafta koosneb põhiliselt süsinikust (83% – 87%), vesinikust (10% – 14%) ja heteroelementidest nagu väävel (0,04% – 8%), hapnik (0,1% – 5%), lämmastik (0,1% – 2%) ja raskmetallid (peamiselt vanaadium ja nikkel) (Sama et al. 2018). Toornaftast tehakse üldtuntud fossiilkütuseid, mis sisaldavad erinevate süsivesinike segu (parafiine, hargnenud ja hargnemata ahelaga alkaane, tsükloalkaane, küllastamata alkeene, alküüne, aromaatsed aineid nagu polütsükliilised aromaatsed süsivesinikud (PAH) ja monoaromaatsed, sh BTEX (benseen, toluen, etüülbenseen, ksüleen) ühendid) (Ossai et al. 2020). BTEX ja PAH ühendid on üldiselt toksilised, kantserogeensed, mutageensed (Logeshwaran et al. 2018) ning püsivad, mistõttu lagunevad need keskkonnas väga aeglaselt (Ossai et al. 2020).

Ligikaudu 25% süsivesinikevarudest esineb ebatraditsiooniliste süsivesinikena nagu raske nafta, eriti raske nafta või bituumen. Raske nafta (*heavy (crude) oil*) on suure viskoossuse (>100 cP) ja tihedusega, väikse vesiniku ja süsiniku suhtega ($H/C < 1,5$) süsivesinike segu (tabel 1) (Muraza, 2015). Seda tüüpi naftas on raskete komponentide (vaigud ja asfalteenid) osakaal suurem kui toornaftas (Li et al. 2019). Eriti raske nafta (*extra heavy (crude) oil*) ja bituumen on väga kõrge viskoossusega (>10 000 cP), hästi lagunenu ja madala molekulimassiga küllastunud süsivesinike segu (tabel 1) (Meyer & Attanasi, 2004), mille viskoossus sõltub asfalteeni sisaldusest – mida suurem on asfalteeni mahuprotsent naftas, seda suurem on viskoossus (Muraza, 2015).

Tabel 1. Kerge, raske- ja eriti raske nafta parameetrid (Muraza, 2015).

Nafta tüüp	API tihedus (°)	Viskoossus (cP)
Kerge nafta	22–45	<100
Raske nafta	10–22	>100
Eriti raske nafta	<10	>10 000
Bituumen	7–9	>10 000

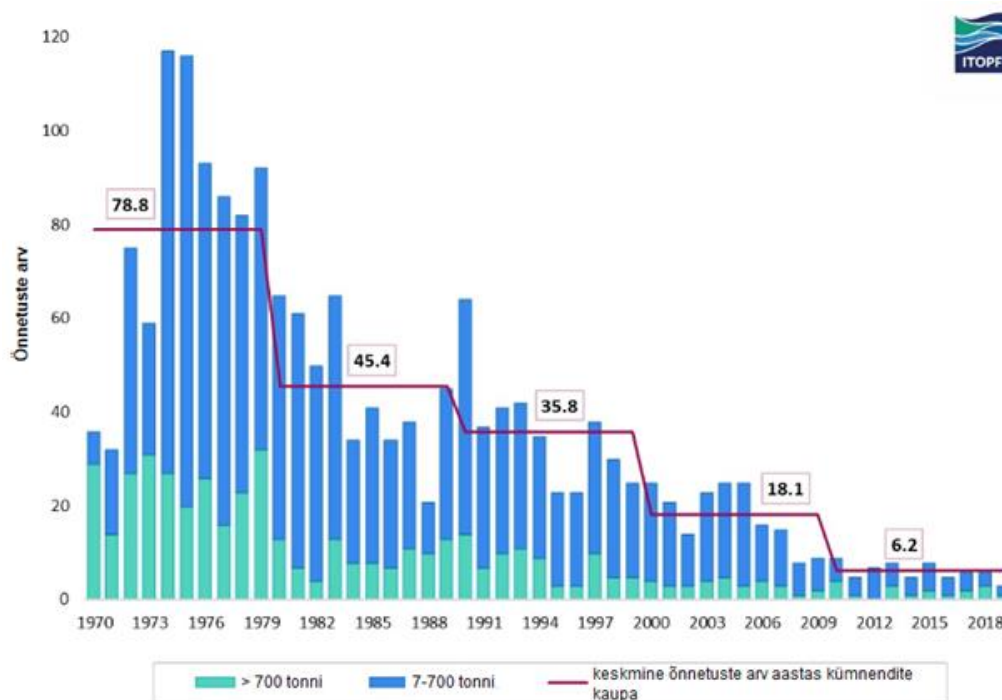
Sarnaselt toornaftale sisaldavad raske nafta, eriti raske nafta ja bituumen heteroelemente nagu väävel, lämmastik ja hapnik ning raskmetalle nagu vanaadium, nikkel ja väga harva ka elavhõbe (Muraza 2015; Li et al. 2019).

1.2 Naftareostuse allikad meres ja reostuse jõudmine rannikule

Toornafta ja selle saadused satuvad merekeskkonda kahel moel: 1) inimtegevuse tagajärjel, mis on seotud nafta uurimise, kaevandamise, transportimise, rafineerimise, ladustamise ja kasutamisega; 2) loodusliku toornafta imbumise fenomeni tõttu (Kvenvolden & Cooper et al. 2003, Ossai et al. 2020). Toornafta imbumine on loodusnähtus, mille korral toornafta immitseb merepõhja all olevatest reservuaaridest läbi geoloogiliste kihtide ja moodustiste vette (National Research Council, 2003). Vastav protsess on tõenäoliselt olnud aktiivne suurema osa geoloogilisest ajast ning ümbritsev veelune elustik on suutnud oludega kohaneda (Kvenvolden & Cooper et al. 2003; National Research Council, 2003). Arvatakse, et umbes 47% merekeskkonnas leiduvatest naftaühenditest pärinevad loodusliku imbumise protsessist (Vergeynst et al. 2018 (2)). Keskmiselt satub igal aastal loodusliku nafta imbumise fenomeni tõttu merre 600 000 tonni naftat (Kvenvolden & Cooper et al. 2003; Ossai et al. 2020). Nafta- ja gaasitootmine ning looduslike maardlate uurimine süvameres on suurendanud juhuslikku nafta- ja gaasiheitmete leket ookeanis (Nissanka & Yapa, 2018).

Antropogeenne naftareostus võib tekkida ning levida merekeskkonnas ja -rannikul mitmesugustel põhjustel: puurimisseadmete rikked, maa-aluste torujuhtmete purunemine, juhuslikud lekked nafta laadimisel ja tühjendamisel, punkerdamine, naftatankerite õnnetused, laevaõnnetused, naftakeemia tööstuse heitvee juhtimine merre ja sealt pärinevate lenduvate naftaosakeste levimine ning sõjaline aspekt (Nissanka & Yapa, 2018; Ossai et al. 2020). Ka maismaal asuvate naftahoidlate rikete korral võib õlireostus kanduda lähedal asuvasse veekogudesse, randadesse ja rannikualadele ning suubuda lõpuks maailmamerre

(Nissanka & Yapa, 2018). *The International Tanker Owners Pollution Federation* statistika andmete kohaselt on viimase 50 aasta jooksul laevaõnnetuste tagajärjel merekeskkonda lekkinud nafta kogus järk-järgult kahanenud (joonis 1). 2019. aastal lekkis merre laevaõnnetuste tõttu umbes 1000 tonni naftat (The International Tanker Owners Pollution Federation, 2019).



Joonis 1. Suurte (700 tonni) ja keskmiste (7 – 700 tonni) naftatankerite registreeritud naftalekete arvukus aastatel 1970 – 2019 (The International Tanker Owners Pollution Federation, 2019).

Tihti peale kandub naftareostus merekeskkonnast tuule ja lainete mõjul ka rannikuvööndisse (Chen et al. 2019; Esquinas et al. 2017). Reostuse jõudmine kaldajoonele sõltub rannareljeefist ning laineenergiast (Lin et al. 2016; Esquinas et al. 2017). Kõige enam haavatavam rannikutüüp naftareostuse kahjustustele on kivirannik, kuna sealne elustik on väga tundlik ning ala on raskesti ligipääsetav tervendamistoimunguteks (National Research Council, 1985). Ka liivarandadesse jõudnud reostus põhjustab probleeme, liiva suure poorsuse tõttu tungib naftareostus sügavale settetesse tekitades pikaajast reostust, mille likvideerimine on keeruline (National Research Council, 1985; Chen et al. 2019).

Erinevatest kohtadest pärinev nafta ei ole ühesuguse koostisega, mistõttu lekete ja õnnetuste korral tekkinud reostuse likvideerimine on alati suur väljakutse (National Research Council, 2014). Selleks, et efektiivselt eemaldada naftareostust merest või rannikult on oluline teada konkreetse reostuse põhjustanud nafta omadusi (viskoossus, tihedus, lahustuvus (National

Research Council, 2003)) ning keskkonnatingimusi (külm või soe kliima) reostunud alal (Vergeynst et al. 2018 (1)). Nafta ja selle saaduste koostis määrab reostuse pikaajalise käitumise, kuna erinevates tingimustes (külm või soe kliima) käituvad nafta komponendid vastavalt oma omadustele erisuguselt (National Research Council, 2019). Viskoossed naftasaadused tavaliselt ei moodusta õhukesi õlilaike ega valgu vees kiiresti laiali, vaid suure tõenäosusega formeerivad klompe, mis võivad koguneda rannikualadele ning püsida keskkonnas pikka aega (National Research Council, 2003). Tavaliselt on nafta ja -saaduste tihedus merevee tihedusest väiksem, mistõttu suurem osa naftaprojekte jääb veepinnale hõljuma, kuid külmas keskkonnas võib täheldada vastupidist olukorda (nafta tihedus on merevee tihedusest suurem) ning sel juhul naftareostus vajub mere põhja (National Research Council, 2003; Muizis, 2013). Lahustuvus on üldiselt olenemata nafta tüübist väga väike (National Research Council, 2003).

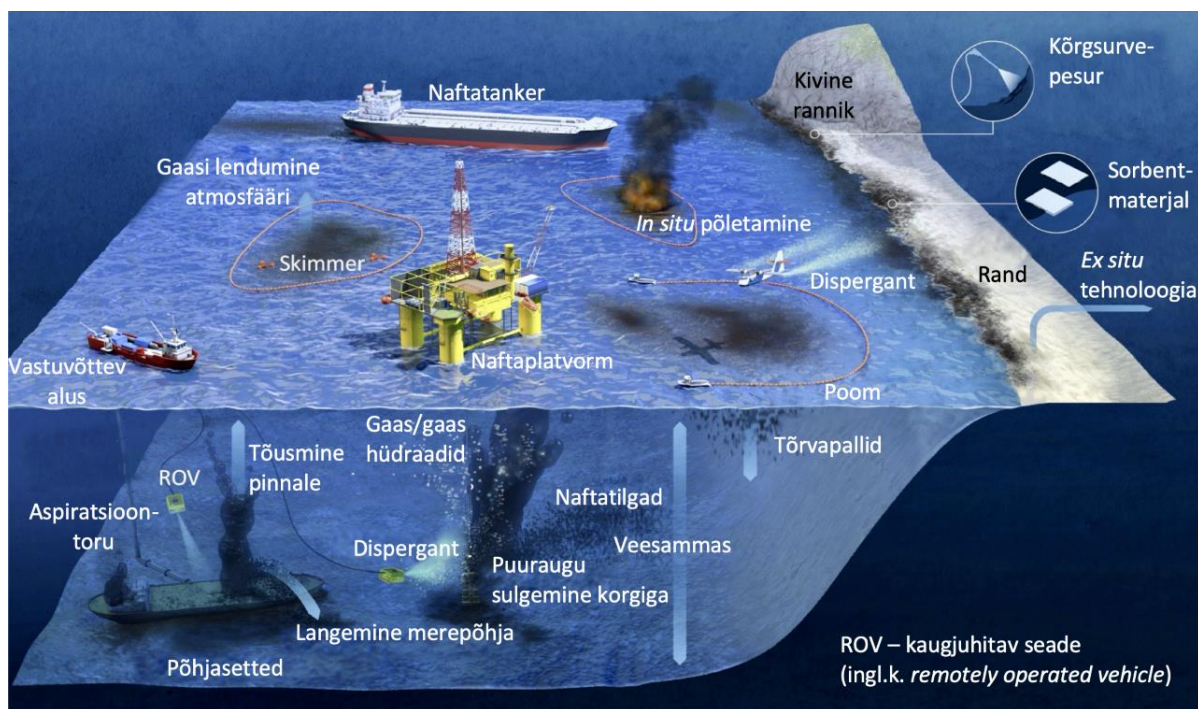
1.3 Meetodid nafta ja naftasaadustega reostunud mereranniku kaitseks ja puhastamiseks

Naftareostuse õigeaegne avastamine ja ulatuse hindamine on oluline. Asjakohased seiremeetodid (nt. SCAT süsteem (*Shoreline Cleanup Assessment Technique*), OILMAP DEEP mudel (*OIL Model Application Package for DEEP water releases*), satelliitvaatlused) aitavad kaasa õlilaidude varajasele avastamisele, võimaldavad hinnata naftalekke suurust ning ennustada nafta liikumise suunda (Bonte et al. 2020; French-McCay et al. 2019; Bayramov et al. 2018). Naftareostuse avastamise järgselt on oluline valida vastavalt olukorrale kõige tõhusam puhastus- ja/või tervendamismeetod. Meetodi valimisel tuleks lähtuda nii nafta tüübist, lekke laadist, ulatusest ja asukohast kui ka keskkonnatingimustest ning vastava tööjõu ja varustuse olemasolust (Bullock et al. 2019).

Naftareostuse puhastusmeetodeid saab liigitada füüsikalisteks ehk mehaanilisteks, keemilisteks ja bioloogilisteks (Doshi et al. 2018). Vastavate meetodite tõhusus merekeskkonnas sõltub paljuski keskkonnatingimustest nagu tuul, hoovused, lainetuse olemus, aga ka reostust põhjustava nafta füüsikalise-keemilistest omadustest (Ossai et al. 2020). Rannikualal sõltub puhastusefektiivsus nafta kogusest ja omadustest, taimestiku olemasolust, ranniku reljeefist, tüübist ja geomorfoloogiast, rannikule juurdepääsetavusest ning kiviranniku puhul kivide fraktsioonist (Chen et al. 2019; Lin et al. 2016; Esquinas et al. 2017). Puhastusmeetodi valikul tuleb arvestada ka teguritega nagu meetodi teostatavus, rahalised ressursid ning ajalised piirangud (Ossai et al. 2020).

1.3.1 Keemilised ja füüsilised meetodid

Rannajoone puhastustoimingud on väga kallid ning aeganõudvad, mistõttu on naftalekke korral oluline likvideerida naftareostust juba veest ning mitte lasta sellele jõuda rannikule (Chen et al. 2019). Selleks on välja töötatud rida füüsilisi ehk mehaanilisi ohjemeetodeid, mida rakendatakse erinevates mere piirkondades (joonis 2).



Joonis 2. Naftareostuse likvideerimise füüsilised ja keemilised meetodid meres ja mererannikul (Mapelli et al. 2017).

Üheks selliseks on poom, millega naftalaik sissepiiratakse, et takistada selle liikumist ning väiksemateks laikudeks disperseerumist (Doshi et al. 2018, Ossai et al. 2020; Prabowo & Bae, 2019). Poome on väga efektiivselt võimalik kasutada reostuse eemale hoidmiseks rannikualadelt ning juhtimiseks piirkondadesse, kus nafta eemaldamine keskkonnast on kergem (Mapelli et al. 2017, Ossai et al. 2020). Lisaks saab poomide abil kogutud naftat taaskasutada (Li et al. 2016). Kombineerides erinevat tüüpi poome (*fences, curtains or inflatable booms*) saab õlireostust koguda paksemate kihtidena, mis tõstab kogu protsessi efektiivsust (Mapelli et al. 2017). Teiseks füüsiliseks puhastusmeetodiks on skimmer, mis on mehaaniline seade ujuva või emulgeerunud nafta eemaldamiseks veepinnalt (joonis 2) (Doshi et al. 2018). Sarnaselt poomile, on seegi meetodika keskkonnasõbralik, sest puhastamise käigus ei kasutata kemikaale (Prabowo & Bae, 2019). Eri tüüpi skimmerid (*weir, oleophillic and suction skimmers*) on välja töötatud erinevate naftatüüpide jaoks

(Mapelli et al. 2017). Nende tööpõhimõtte on sarnane selles osas, et naftareostust kogutakse trumliste või paaki (Prabowo & Bae, 2019) ja kõik skimmerid suudavad tööga toime tulla ka jää ja/või prügi juuresolekul (Mapelli et al. 2017). Skimmeri jõudlust mõjutavad mitmesugused tegurid, sealhulgas nafta paksus ja viskoossus, jää ja/või prügi olemasolu vees ning ilmastikuolud (Li et al. 2016). Seadme kasutamisel tuleb arvestada, et see võib kiiresti ummistuda (Ossai et al. 2020).

In situ põletamine (*in-situ burning*) on termilise puhastamise meetod, mille korral nafta kohapeal põletatakse (joonis 2) (Bullock et al. 2019). Tulekindlate poomide abil piiratakse naftareostus sisse ning veepinnal olev nafta süüdatakse põlema (Doshi et al. 2018). Meetodi kasutamiseks peab nafta olema madala veesisaldusega (20% – 30%) ning naftakihi minimaalne paksus jääma 2 – 3 mm vahele (Bullock et al. 2019). Mitmed uuringud on täheldanud, et vastava meetodi puhastusefektiivsus on väga kõrge, eemaldades kuni 95% süsivesinikke. Põlemata naftajääk jääb veepinnale või vajub merepõhja (Bullock et al. 2019). *In situ* põletamine on odav ja kiire puhastusmeetod, kuid selle negatiivseks pooleks on tekkiv sekundaarne reostus ehk õhku paiskuvad süsinikdioksiid ja looduskeskkonnale kahjulikud tahked osakesed (Doshi et al. 2018).

Naftareostuse likvideerimiseks liivarandadest või kivistelt rannajoontelt kasutatakse füüsilist puhastamist (joonis 2), mille hulka kuuluvad käsitsi korjamise meetod ja naftareostuse uhtumine kuuma kõrgsurveveega tagasi merre, kus seda saab adsorbeerida sorbendiga (Mapelli et al. 2017; Chen et al. 2019). Naftareostuse käsitsi koristamine (labidaga, rehaga) on aeganõudev protsess ning koristajale potentsiaalselt kahjulik (Li et al. 2016). Liiva- ja/või väikse kivi fraktsiooniga randades saab suurema reostuste ohjamiseks rakendada kraavide meetodit, mille korral ekskavaatoritega kaevatakse paralleelselt rannajoonega kraav, kuhu naftareostus koguneb. Sealt eemaldatakse kogunenud nafta pumpade või vaakummasinate abil (The International Tanker Owners Pollution Federation, 2014). Valides sellise puhastusmeetodi, tuleb kõik puhastustööd korraldada mõõna ajal, vastasel korral satub kogutud nafta taas merevette ning selle likvideerimine muutub aina keerulisemaks (The International Tanker Owners Pollution Federation, 2014). Rannikuala füüsilist puhastamist saab rakendada vaid siis kui reostunud ala on ligipääsetav. Koristustöödel osalevad inimesed ja rasked puhastamiseseadmed võivad samuti kahjustada rannikuala ökosüsteemi (Chen et al. 2019).

Keemiliste meetodite hulka liigitatakse pihustatavaid dispergente (segu pindaktiivsetest ainetest ja lahustitest), mille abil naftareostuse laik väikesteks õlitilkadeks (alla 100 mm) laguneb (joonis 2) (Doshi et al. 2018; Mapelli et al. 2017). Väiksemate naftareostuste puhul

on võimalik kasutada erinevaid sorbente (looduslikud või sünteetilised polümeerimaterjalid), mis suudavad endasse või oma pinnale naftat koguda (joonis 2) (Doshi et al. 2018; Mapelli et al. 2017). Neid kasutatakse peamiselt naftareostuste lõplike jääkide puhastamiseks nii vees kui ka maismaal pärast esmast nafta likvideerimist, kuid väiksemate naftareostuste puhul on nende tarvitamine ainsa vahendina samuti võimalik (Mapelli et al. 2017; Li et al. 2016). Sünteetilisi sorbente saab sageli taaskasutada, kuid see ei ole majanduslikult otstarbekas, sest vastav taaskasutamise tehnoloogia on tihtipeale kallim kui uue sorbendi ostmine (Li et al. 2016). Naftareostuse jõudmisel liivarandadesse kasutatakse tihtipeale *ex situ* tehnoloogiat (joonis 2), mille korral rannast korjatakse kokku saastunud liiv, saadetakse see spetsialiseeritud laborisse, kus reostunud liiv puhastatakse keemiliste vahenditega (Mapelli et al. 2017). Lisaks sellele saab rannikualalt eemaldada naftareostust pinnapesuvahenditega (SWA – *Surface Washing Agents*), mis sisaldavad rohkem hüdrofiilse-lipofiilse tasakaaluga pindaktiivseid aineid kui dispergendid. Naftareostusele pihustatakse SWAd ning oodatakse, millal see reageerib reostusega, misjärel uhutakse naftareostus kõrgsurveveega tagasi merre, kus edaspidi ohjatakse reostust füüsikaliste puhastusmeetoditega. Tavaliselt rakendatakse SWA tehnoloogiat väiksemate reostuste korral (Chen et al. 2019).

1.3.2 Bioloogilised meetodid

Toornafta ja selle saaduste reostuse puhul on füüsikalise-keemiliste puhastusmeetodite osas piirangud, mistõttu kasutatakse ka bioloogilisi meetodeid (Doshi et al. 2018). Bioremediatsioon ehk biotervendamine on bioloogiliste meetodite ja protsesside rakendamine reostunud keskkonna puhastamiseks (Jimoh & Lin, 2019). Biotervendamise tehnoloogiat hakati kasutama 1970. aastal ning seda peetakse endiselt üheks kõige keskkonnasõbralikumaks ja odavamaks ohjemeetodiks (Chen et al. 2017). Need on näidanud märkimisväärset edu nii *in situ* (kohapealne) kui ka *ex situ* (väljaspool) puhastamisel (Ossai et al. 2020).

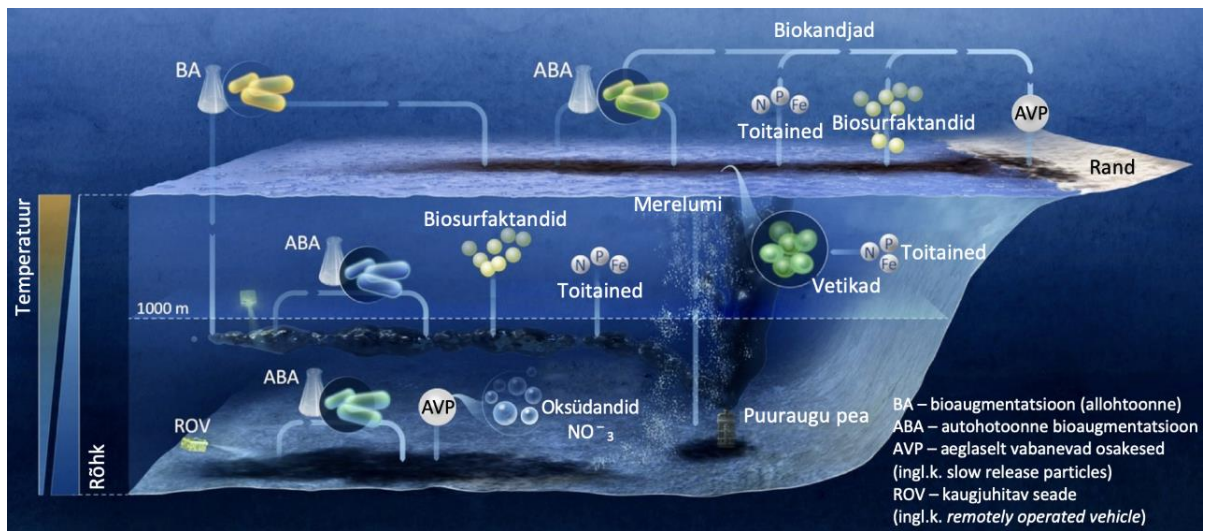
Nafta- ja naftasaaduste reostuse biotervendamine põhineb mõningate mikroorganismide võimel naftas leiduvaid ühendeid lagundada ning osa neist suudavad lagundada ka elusloodusele ohtlikke nafta komponente, nagu näiteks PAH-e (Muthukamalam et al. 2017; Vergeynst et al. 2018 (2); Al-Hawash et al. 2018). Merekeskkonnast on leitud enam kui 200 liiki mikroorganisme enam kui sajast perekonnast, kes naftaühendeid lagundavad: bakterid (79 perekonda sh. tsüanobaktereid 9 perekonda), seeni (103 perekonda) ja vetikad (19 perekonda) (Xue et al. 2015). Tänu tehnoloogia arengule, mis võimaldab mikroorganisme paremini uurida, avastatakse pidevalt uusi liike, kellel on võime naftat lagundada (Vergeynst

et al. 2018 (1)(2); Xue et al. 2015). Enamlevinud ja –uuritud naftaühendeid lagundavad bakterid pärinevad perekondadest *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Nocardia*, (Xue et al. 2015). Külmas merekeskkonnas on tuntuimad naftaühendeid lagundavad bakteriperekonnad *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Colwellia*, *Glaciecola*, *Marinomonas*, *Octadecabacter*, *Oleispira* (Vergeynst et al. 2018 (2)).

Naftas levinud süsivesinike lagundamine on keeruline protsess, mis sõltub süsivesinike kontsentratsioonist ja nende omadustest, aga ka naftaga reostunud keskkonna omadustest. Naftasüsivesinikud lagunevad enamasti ensüümspetsiifiliste biolagundamise mehhanismide abil, mis saavad toimuda nii aeroobses (hapniku olemasolul) kui ka anoksilises (hapniku puudumisel) keskkonnas (Ossai et al. 2020). Lagundamisprotsessis osalevad väga mitmed ensüümid, sealhulgas oksügenaasid, dehüdrogenaasid ja hüdroksülaasid, mis katalüüsivad aromaatsete ja alifaatsete süsivesinike fragmenteerumist (Muthukamalam et al. 2017).

Lisaks on osa mikroorganisme (nt. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Rhodococcus*, *Thiobacillus*, *Leuconostoc*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*) suutelised tootma biosurfaktante (Jimoh & Lin, 2019; Mapelli et al. 2017). Biosurfaktandid on mikroorganismide poolt toodetud amfiifilised ühendid, mis sisaldavad nii hüdrofoobseid kui ka hüdrofiilseid molekule (Jahan et al. 2020; Jimoh & Lin, 2019). Võrreldes sünteetiliste pindaktiivsete ainetega on biosurfaktandid biolagunevad, mitte toksilised, keskkonnasõbralikud ning vastupidavad ekstreemsetes keskkonnatingimustes (äärmuslik temperatuur, pH, soolsus) (Jimoh & Lin, 2019). Biosurfaktandid soodustavad naftasüsivesinike lagundamist, muutes nafta ja selle saadusi mikroorganismidele kättesaadavamaks (vähendavad pinda vee ja naftasüsivesinike vahel) (Jahan et al. 2020; Jimoh & Lin, 2019).

Bioloogilised meetodid nagu bioaugmentatsioon ja biostimulatsioon hõlmavad mikroorganismide ja/või toitainete ja/või hapniku lisamist reostunud kohale, et stimuleerida mikroorganismide kasvu ja sellest tulenevalt saasteainete biolagundamise võimet (joonis 3) (Doshi et al. 2018). Seiratava loodusliku tervenemise rakendamisel toetutakse looduslike isepuhastumisprotsesside detailsele jälgimisele ja hindamisele (Kriipsalu et al. 2016). Sarnaselt füüsikalistele ja keemilistele puhastusmeetoditele rakendatakse erinevaid bioloogilisi *in situ* meetodeid erinevates mere- ja rannikupiirkondades (joonis 3).



Joonis 3. Naftareostuse bioloogilised puhastusmeetodid (Mapelli et al. 2017).

Üks kõige enam kasutust leidv biotervendamise alaliike on bioaugmentatsioon, mille puhul suurendatakse saastunud keskkonna mikrobikoosluse biolagundamise võimekust lisades keskkonda laboris kultiveeritud spetsiaalsete metaboolsete omadustega (nt. kindla reoaine lagundamise võimega) mikroorganisme (joonis 3) (Mapelli et al. 2017). Kultiveeritud mikroorganismide lisamine reostuskohale suurendab bakterite populatsiooni, parandab puhastusprotsessi tõhusust ning vähendab biolagunemise ajalist kulu (Mapelli et al. 2017; Chaudhary et al. 2019). Biostimulatsiooni korral ergutatakse looduslike mikroorganismide lagundamisaktiivsust pumbates reostunud pinnasesse või vette hapnikku, toitaineid (lämmastik, fosfor) ja süsinikuallikaid (Mapelli et al. 2017). Hapniku olemasolul toimub süsivesinike biolagunemine kiiresti, sest hapniku redutseerimine annab mikroorganismidele palju energiat (Mapelli et al. 2017). Merevette lämmastiku ja fosfori lisamine soodustab naftat lagundavate mikroorganismide kasvu, kuna toitainerikas keskkond stimuleerib mikroorganismide aktiivsust (Vergeynst et al. 2018 (2)). Samuti lisatakse loodusliku biolagunemise protsessi kiirendamiseks vette biosurfaktante (joonis 3). Kombineerides erinevaid biotervendusmeetodite liike (nt. bioaugmentatsioon, biostimulatsioon) saab naftareostuse likvideerimise tõhusust tõsta (Chaudhary et al. 2019). Mitmed uuringud on täheldanud, et ka külmas keskkonnas on biotervendamisel põhinevad saastuse ohjemeetodid efektiivsed (Chaudhary et al. 2019).

1.3.2.1 Seiratav looduslik tervenemine

Looduslikku biotervenemist kasutatakse naftareostuse puhul eelkõige selleks, et ära hoida saasteainete edasist levikut ning soodustada nende lagunemist reostunud aladel võimalikult keskkonnahoidlikult (Mulligan & Yong, 2004). Seiratav looduslik tervenemine (*monitored*

natural attenuation – MNA) on tunnustatud ja laialt rakendatav keskkonnatervendusmeetod, mis tugineb hoolikalt juhitud ja seiratud looduslikele protsessidele reostunud pinnase või vee tervendamisel (Kriipsalu et al. 2016). Seda meetodit iseloomustavad igal pool rakendatavus, odavus, paindlikkus ja keskkonnasäästlikkus, sest mürgised ained lagundatakse ja jääkaineid ei teki ning seda on võimalik kasutada ka külmas kliimas (Ferguson et al. 2020; Kriipsalu et al. 2016). Näiteks on MNAd edukalt rakendatud Prantsusmaal põhjavee (Blessing et al. 2018), Hispaanias kivise rannikuala (Esquinas et al. 2017), Brasiilias reoveesette (Mazzeo et al. 2016) ja Eestis naftasaadustega reostunud pinnase (Nõlvak et al. 2012) tervendamisel. Lisaks on võimalik vastavat meetodit kombineerida muude puhastusmeetoditega, mistõttu rakendatakse seda tihti just jääkreostusest vabanemiseks (Novakovic et al. 2012; Ferguson et al. 2020; Gruiz et al. 2019).

Looduslikku tervenemist tuleb seirata pikka aega veendumaks, et mikrobioloogilised protsessid toimuvad piisavalt kiirelt ja reoaine mass väheneb, samuti peavad laboratoorsed analüüsid tõestama, et reostuspaigas olevatel mikroorganismidel on olemas võime reoaineid lagundada (Kriipsalu et al. 2016). Eelistatud loodusliku tervenemise seiremeetodiks on viimastel aastatel osutunud molekulaarsed markergeenide kasutamisel põhinevad (nt. polümeraasi ahelreaktsioon, kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon, mikrobikoosluse DNA-põhine kirjeldamine) meetodid (Kriipsalu et al. 2016; Ferguson et al. 2020).

Seiratava loodusliku tervenemise efektiivsus sõltub paljuski keskkonnaparameetritest (merevee temperatuur, hapniku, toitainete olemasolu), mis mõjutavad bakterite bioloogilist aktiivsust naftas leiduvate ühendite lagundamisel (Vergeynst et al. 2018 (2); Mulligan & Yong, 2004). Vee temperatuuri langus suurendab naftasaaduste viskoossust ning nafta lagundamise efektiivsus langeb, sest viskoosemat substraati on bakteritel raskem kätte saada (Vergeynst et al. 2018 (2); Giudice et al. 2010). Samuti võib lagundamisaktiivsus langeda külmas keskkonnas, kuna bakterite saasteainete lagundamise võimekus sõltub temperatuurist (Mocali et al. 2017). Uurimused on näidanud, et Gröönimaa vetes, kus temperatuur jääb vahemikku $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, on õli lagundamise kiirus tunduvalt madalam, kui Mehhiko lahes, kus vee temperatuur on $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $31\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Giudice et al. 2010; Vergeynst et al. 2018 (2)). Kui troopilistes piirkondades (nt. Indoneesia saarestiku ümbruses) domineerivad meres naftat lagundavaid liike sisaldavad perekonnad *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, siis arktilistes meredes (nt. Gröönimaa ümbruses) on enamlevinud naftalagundajaid sisaldavad perekonnad *Arthrobacter*, *Agreia*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Shewanella* (Syakti et al.

2019; Vergeynst et al. 2018 (2)). Bioloogilise tervenemise kahjuks räägib võimalik suur ajakulu, mis võib ulatuda kuudest aastateni. Aeglase protsesside peamiseks põhjuseks peetakse mikroorganismide madalat aktiivsust saasteainete kõrge kontsentratsioon tõttu (Ossai et al. 2020).

2. Materjal ja meetoodika

2.1 Eksperimendi, proovivõtu ja keemiliste analüüside kirjeldus

Käesoleva magistritöö eksperimentaalne osa viidi läbi 95 päeva jooksul kahe Gröönimaa linna (Narsaq ja Nuuk) lähedal mererannikul, kuhu 02.06.2017 paigaldati kokku 240 toornafta ja laevakütusega töödeldud kiltkivi plaati mõõtmetega 5×5×0,5 cm. Uurimisalade asukohad Gröönimaal on näidatud joonisel 4.



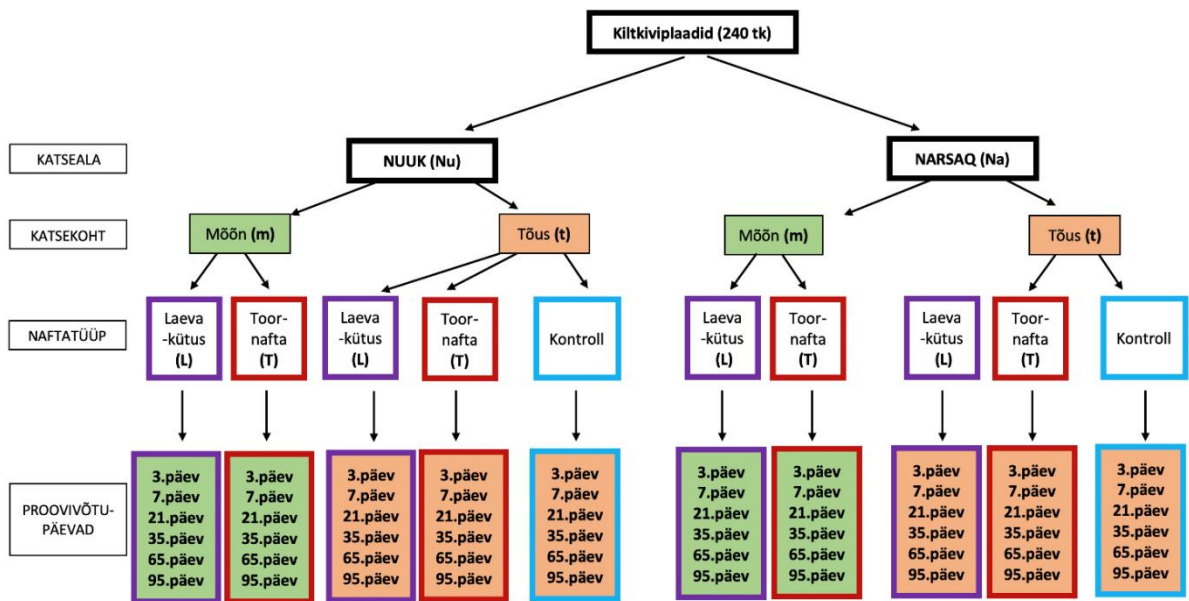
Joonis 4. Gröönimaa kaart. Uurimisalad paiknesid Nuuk'i (64°16'57"N 51°72'52"E) ja Narsaq'i (60°91'86"N 46°04'29"W) lähedal mererannikul (Gustavson & Wegeberg, 2018).

Eksperimendis kasutati Põhjamerere tüüpi toornaftat ja laevakütust IFO 180. Mõlemale uurimisalale paigaldati 120 plaati, millest 48 plaadile oli ühtlase kihina kantud 200 µl toornaftat ja 48 plaadile 400 µl laevakütust IFO 180 (keskmine toornafta või laevakütusega IFO 180 kaetud pind $42 \pm 2 \text{ cm}^2$) ning 24 olid kontrollplaadid. Plaadid kinnitati puitalustele ning asetati mererannikule maksimaalse mõõna ja maksimaalse tõusu piirile nii, et pooled plaatidest olid veest väljas vastavalt 30% ning ülejäänud pooled 70% ööpäevast (joonis 5).



Joonis 5. Puitalusele kinnitatud laevakütusega (IFO 180) kaetud katseplaadid Narsaq katsealal maksimaalse mõõna piiril (Gustavson & Wegeberg, 2018).

Kontrollplaadid olid mõlemal katsealal asetatud tõusuvee piirile 50 m õliga töödeldud kiviplaatidest eemale. Katse skeem on näidatud joonisel 6.



Joonis 6. Katse skeem.

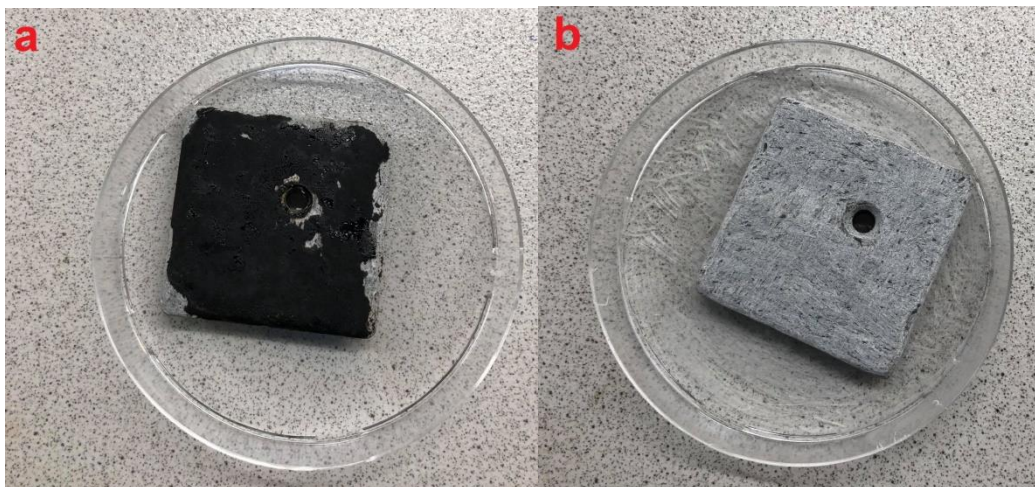
Proove võeti kuus korda (3., 7., 21., 35., 65. ja 95. päeval) katseperioodi jooksul. Igal proovivõtu korral võeti igast katsevariandist (ka kontrollplaadid) kaks plaati keemilisteks ja kaks plaati mikrobioloogilisteks analüüsideks. Prooviplaadid asetati Rilsan'i kottidesse, proovid külmutati ning transporditi laborisse külmutatuna. Proove säilitati kuni mikrobioloogiliste ja keemiliste analüüside läbiviimiseni laboris sügavkülmikus -20 °C juures.

Üks päev peale kiviplaatide katsekohale asetamist mõõdeti plaatidele kinnitunud toornafta ja IFO 180 kogus, mis oli vastavalt 10% ja 50% algsest plaatidele kantud kogusest. Kiviplaatidele kinnitunud toornafta ja laevakütuse kogused loeti 100%-ks ning edaspidised kogused on näidatud kui % esimesel päeval kivile jäänud nafta või laevakütuse kogusest. Toornafta ja IFO 180 kogus kiviplaatidel määrati Taanis Aarhushi Ülikooli laboris, kasutades diklorometaaniga ekstraheerimist ning lahuses oleva nafta ja laevakütuse kogused määrati fluorestsents spektroskoopiaga.

2.2 Mikrobioloogilised analüüsid

2.2.1 Biokile eemaldamine plaatidelt ja DNA eraldamine

Biokile eemaldamiseks asetati iga külmunud plaat eraldi steriilsesse petri tassi ning lasti sulada 5 – 10 minutit. Steriilset meislit kasutades kraabiti biokile nii kivi pinnalt kui külgedelt (joonis 7), kogu saadud materjal kanti otse DNA eralduse esimeses etapis kasutatavasse tuubi. Saadud materjali kogus varieerus 0,082 – 0,918 grammi vahel. Eemaldatud biokilet säilitati kuni DNA eralduseni -20 °C juures.



Joonis 7. Laevakütusega IFO 180 kaetud plaat (95. katsepäeva Nuuk’i katsealal) (a) ja sama plaat peale biokile eemaldamist (b).

DNA eraldamiseks kasutati biokile-spetsiifilist *Dneasy PowerBiofilm Kit*’i (QIAGEN, Foster City, CA, USA), mis varasema katse tulemusel andis kõige suurema saagise ning kvaliteetsema DNA (Uisk, 2018). Lisaks tehti eraldi katse määramaks, kas proovides, mille mass ületab kasutatud eralduskiti protokollis ettenähtud maksimaalse proovi massi (0,2 g) väheneb DNA eraldamise efektiivsus ja/või langeb DNA kvaliteet (kirjeldatud peatükis 2.2.2).

Üldiselt järgiti DNA eraldusel eralduskiti tootja juhendit. Erandiks oli proovide homogeniseerimise etapp, mis viidi läbi 20 sekundi jooksul 5000 rpm juures, kasutades homogenisaatorit *Precellys*® 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa). Lisaks kasutati DNA saagikuse suurendamiseks DNA filtritelt välja pesemiseks kaheetapist protseduuri: esmalt lisati filtrile 50 µl elueerimispuhvrit ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 60 sekundit 11000 x g juures ning seejärel kanti filtrile veel 30 µl puhast elueerimispuhvrit ja tsentrifuugiti uuesti 60 sekundit 11000 x g juures. Eraldatud DNA kontsentratsiooni määramiseks ja DNA kvaliteedi hindamiseks kasutati fluoromeetrit Qubit 3 (ThermoFisher Scientific Inc., MA, Waltham, USA). Eraldatud DNA-d säilitati järgnevale analüüsideni -20 °C juures. Biokile eemaldamise, DNA eralduse katse ning kõik DNA eraldused viis läbi töö autor.

2.2.2 Testkatse proovi koguse suurenemise mõju hindamiseks DNA eralduse kvaliteedile

Katses kasutati kommertsiaalset teadaoleva koostise ja kontsentratsiooniga bakteriliikide segu *ZymoBIOMICS Microbial Community Standard D6300*, millele lisati erinevas hulgas toornaftat või eksperimendis kasutatud laevakütust IFO 180. Valmistati kokku viis erinevat katsevarianti:

- Kontroll: rakususpensioon (kogus 37,5 µl)
- 0,3 g materjali: rakususpensioon (37,5 µl) + IFO 180 (612 µl)
- 0,3 g materjali : rakususpensioon (37,5 µl) + toornafta (296 µl)
- 0,6 g materjali: rakususpensioon (37,5 µl) + IFO 180 (1310 µl)
- 0,6 g materjali : rakususpensioon (37,5 µl) + toornafta (kogus 633 µl)

Igast katsesegutüübist eraldati DNA kahes korduses kasutades *Dneasy PowerBiofilm Kit'i* (QIAGEN) ning rakendades peatükis 2.2.1 kirjeldatud protseduuri. Eraldatud DNA kogus mõõdeti ja kvaliteeti hinnati samuti eelmises peatükis kirjeldatud meetoditega.

2.3 Bakterite 16S rRNA geeni koopiaarvude määramine kvantitatiivse PCR meetodiga

Eraldatud DNA proovidest määrati bakterite 16S rRNA geenide arvukused kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni meetodiga (*qPCR, quantitative Polymerase Chain Reaction*).

QPCR reaktsioonid viidi läbi *RotorGene*[®] *Q* (Qiagen) masinas kasutades tarkvara *RotorGene Series Software version 2.0.2* (Qiagen). qPCR segu (lõppmahus 10 µl) sisaldas: 5 µl *Maxima SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc.) reagenti, 0,2 µl optimeeritud kontsentratsiooniga mõlemat märklaudeenispetsiifilist praimerit (Bact517F ja Bact1028R), 1 µl eraldatud DNAd ja 3,6 µl steriilset destilleeritud vett. Info kasutatud praimerite ja qPCR tingimuste kohta on leitav tabelis 2. Kõik proovid amplifitseeriti kolmes korduses ja igale mõõtmisele lisati negatiivne kontroll, mis sisaldas kõiki reaktsioonisegu komponente (qPCR segu) välja arvatud proovi DNA, mis asendati DNA vaba veega. Pärast qPCR amplifikatsioonireaktsiooni määrati sulamiskõver vahemikus 72 °C kuni 90 °C (0,35 °C/3 s) pideva fluorestsentssignaali mõõtmisega.

Saadud tulemuste kvaliteeti hinnati *RotorGene Series Software version 2.0.2* tarkvaraga, arvestades sulamiskõverate paiknemist ja kuju ning amplifikatsioonikõverate ühtsust. Hälbivate amplifikatsiooni- ja sulamiskõveratega proovid elimineeriti edasisest analüüsist. Seejärel analüüsiti iga proovi individuaalset amplifikatsiooni efektiivsust programmi *LinRegPCR version 2017.4* abil (Ruijter et al. 2009).

Uuritud proovides geenikoopiate arvukuse leidmiseks kasutati standardvahemikku, mis kattus proovide C_t väärtustega ning mille puhul proovide tehniliste paralleelide amplifikatsioonide koopiaarvude standardhälbe väärtus oli vähim. Esmalt leiti proovi märklaudeeni kontsentratsiooni (A) ja vastava standardi erinevate punktide kontsentratsioonide (B) vaheline kordusaste vastavalt valemile (1) (Ruijter et al. 2009).

$$\text{Kordusaste} = N_{0,A}/N_{0,B} = (N_{t,A}/E_{ACt,A}) / (N_{t,B}/E_{BCn,B}), \quad (1)$$

kus:

$N_{0,A}$ – märklaudeeni kontsentratsioon proovis fluorestsentsühikutes

$N_{0,B}$ – märklaudeeni järjestuse kontsentratsioon standardlahjenduses

E – amplifikatsiooni efektiivsus

N_t – fluorestsentsi läviväärtus

C_t – läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsükli arv

Bakterikoosluse arvukuse leidmiseks korrutati saadud kordusaste vastava standardlahjenduse kontsentratsiooniga. Lõplik arvukus proovis leiti kvantifitseerimisstandardi erinevate punktide alusel saadud koopiaarvude aritmeetilisel keskmistamisel. Mikroobikoosluse

arvukuse koopiaarvud on esitatud ühe ruutmeetri pinnauhiku kohta (geenikoopiat/m²). Kõik qPCR reaktsioonid, andmete kvaliteedikontrolli ja arvutused teostas töö autor.

Tabel 2. qPCR ja sekveneerimise praimerid ning amplifikatsiooni tingimused.

Meetod	Praimer	Praimeri järjestus (5'-3')	Amplikoni suurus (aluspaari)	Praimeri kontsentratsioon (µM)	Praimeri kirjandusviide	Amplifikatsiooniprogramm
qPCR	Bact 517F	GCCAGCAGCCGCG GTAA	530	0,6	Liu, et al. 2007	50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 35 tsükli: 95 °C 30 s, 60 °C 45 s, 72°C 45 s
	Bact 1028R	CGACARCCATGCA SCACCT			Dethlefsen, et al. 2008	
PCR (amplikonide sekveneerimine)	Bact 515F	GTGYCAGCMGCC GCGGTAA	434	0,4	Parada et al. 2015	98 °C 30 s, 30-35 tsükli: 98 °C 10 s, 60 °C 20 s, 72 °C 15 s. Lisasüntees 72 °C 8 min.
	Bact 926R	CCGYCAATTYMTT TRAGTTT				

2.4 PCR produktide ettevalmistamine sekveneerimiseks ja amplikonide sekveneerimine

Mikroobikoosluse iseloomustamiseks kasutati amplikonipõhist DNA sekveneerimist rakendades universaalseid 16S rRNA geenile seonduvaid praimereid Bact515F ja Bact926R (tabel 2). Selleks, et proove oleks võimalik eristada edaspidises analüüsis, kasutati iga proovi jaoks unikaalset F ja R praimerite kombinatsiooni, kus mõlema praimerid 5'otsas oli unikaalne kuue aluspaari pikkune ribakoodjärjestus (*barcode*).

Igast proovist tehti polümeraasi ahelreaktsioon (*PCR, Polymerase Chain Reaction*) kolmes korduses. Reaktsioonisegu (lõppmahus 40 µl) sisaldas: 20 µl *Phusion Master Mixi* (ThermoFisher Scientific, Inc.), 1,0 µl mõlemat praimerit, 4 – 18 µl eraldatud DNAd ning 0 – 14 µl steriilset destilleeritud vett. PCR produktide õigsust kontrolliti elektroforeetilisel 1,5%-sel agarosgeelil kasutades 1 kb DNA suurusmarkerit (*Gene Ruler 1 kb DNA ladder*, ThermoFisher Scientific, Inc.). Agarosgeeli valmistamiseks kasutati 1xTAE [50 mM Tris-

atsetaat; 1 mM EDTA; pH 8,2] puhvrit, agarooosi (1,5%, w/v) ja etiidiumbromiidi (0,6 µg/ml). Enne geelile kandmist segati 3 µl PCR produkti *Smart 6x Loading Dye Blue* värviga. Järgnes PCR-i produktide 25-minutiline elektroforees 1xTAE puhvris 100 V pinge juures. DNA fragmendid visualiseeriti UV valguses.

PCR produktide kontsentratsioon mõõdeti fluoromeetriga Qubit™ 3 järgides tootja juhendit.

Sekveneerimiseks segati võrdsetes kontsentratsioonides kokku kõikide proovide PCR produktid ning saadud segu puhastati *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Saksamaa) komplektiga. Amplikonid valmistas sekveneerimiseks ette töö autor.

Amplikonide sekveneerimine teostati Microsynth AG (Šveits) poolt Illumina MiSeq platvormil.

2.5 Sekveneeritud geenifragmentide bioinformaatiline analüüs

Sekveneerimisel saadud algjärjestuste (15 761 371 järjestust) esialgne analüüs ning kvaliteedi kontroll viidi läbi programmiga FastQC (v. 0.11.5) (Brown et al. 2017). Paarislugemid (*paired-end reads*) assambleeriti programmiga PEAR (v. 0.9.11) (Zhang et al. 2014). Eelnimetatud programmide puhul kasutati ainult vaikimisi sätteid. Järjestuste edasiseks töötlemiseks ning analüüsimiseks kasutati programmi Mothur (v. 1.43.0) (Schloss et al. 2009). Esmalt teostati lugemitele kvaliteedikontroll, mille käigus eemaldati ribakoodid ja praimerid lähtuvalt järgmistest parameetritest:

- lugemite keskmine kvaliteediskoor > 25;
- minimaalne lugemi pikkus 100 aluspaari;
- määramata nukleotiididega lugemid pole lubatud;
- maksimaalne lubatud homopolümeeride pikkus 8 aluspaari.

Järgmise sammuna eemaldati kimäärsed järjestused programmiga VSEARCH (v 2.14) (Rognes et al. 2016) *denovo* meetodil. Pärast kvaliteedikontrolli ja kimäärade eemaldamist jäi alles 9 338 842 järjestust, millest 96,4% olid bakterijärestused. Need järjestused klassifitseeriti perekonna tasemel (sarnasus 95%) kasutades SILVA andmebaasi (v132) (Quast et al. 2013). Järjestuste esmase analüüsi teostasid Angela Peeb ja Kristjan Oopkaup.

Bakterihõimkondade ja -perekondade osakaalud koosluses arvutati vastavate rühmade järjestuste osakaaludena (%) kõikidest bakterispetsiifilistest järjestustest proovis. Selliste bakteriperekondade, millesse kuuluvatel organismidel on kirjeldatud võimekust lagundada nafta komponente, arvukusi kiviplaatide biokile pinnaühikul (m^2) hinnati hinnanguliste arvukuste kaudu, mis arvutati võttes arvesse proovis leitud vastavate perekondade osakaale koosluses ja kogu koosluse arvukust (16S rRNA geeni järgi) selles proovis. Saadud hinnangulisi arvukusi kasutati proovikohtade naftalagundajate koosluste sarnasuste analüüsil. Selleks kasutati klasteranalüüsi, mis teostati kasutades Ward'i meetodit ja Pearsoni korrelatsioonikordajat ja soojuskaardid (*heatmaps*) visualiseeriti programmiga ClustVis (Metspalu & Vilo, 2015). Analüüsi valiti iga ajapunkti 15 kõige arvukamat naftalagundajate perekonda ning nende arvukused logaritmiti enne sarnasuskordaja arvutamist. Klassifitseeritud järjestuste edasine analüüs on tehtud töö autori poolt.

2.6 Statistiline analüüs

Toornafta ja IFO 180 lagunemise ajalise dünaamika hindamiseks kasutati teist järku polünoomi $f=y_0+(a/x)+(b/x^2)$. Kogu bakterite 16S rRNA geeni arvukuste ja naftat lagundavate bakteriperekondade 16S rRNA geeni hinnanguliste arvukuste ajalise dünaamika erinevusi proovikohtade vahel hinnati kasutades korduvmõõtmiste dispersioonanalüüsi (rANOVA) ja naftalagundajate osakaalude erinevust katsevariantide bakterikooslustes hinnati t-testi abil. Seoste olulisust toornafta ja laevakütuse koguse ja kogu bakterite 16S rRNA geeni ja naftalagundajate 16S rRNA geeni arvukuste vahel hinnati kasutades Pearsoni korrelatsioonikordajat.

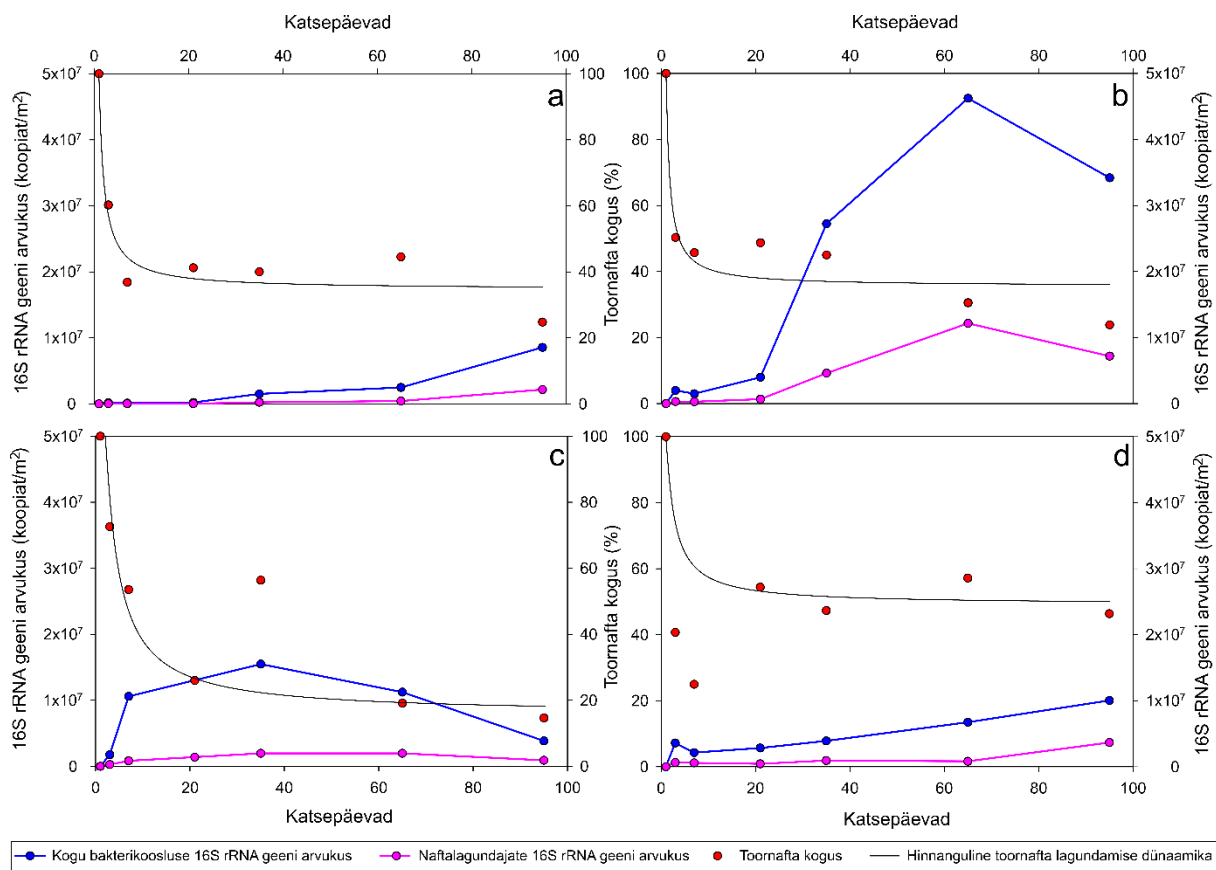
3. Tulemused

3.1 Toornafta ja laevakütuse vähenemise ja bakterite 16S rRNA geeni arvukuse ajaline dünaamika kiviplaadide pinnal

DNA eralduse testkatse tulemused näitasid, et eraldatava proovi koguse suurenemine üle tootja soovitatud koguse (0,2 g) ei mõjuta eraldatud DNA kvaliteeti ega kogust. Seega kasutati DNA eralduseks kõikidelt plaatidelt kogu plaadilt mehaaniliselt eemaldatud materjali (biokile, kütuse- ja kiltkivijäägid).

3.1.1 Toornaftaga kaetud kiviplaadid

Katseplaatidele kinnitunud toornafta kogus vähenes oluliselt (ligi 60%) esimese seitsme katsepäeva jooksul mõlema katseala mõõnapiiril (joonis 8a ja 8b) ja 21. päeva jooksul mõlema katsekoha tõusupiiril (joonis 8c ja 8d). Narsaq'i tõusupiiril oli vähenemine oluliselt väiksem kui Nuuk'i vastavas katsekohas. Kiirele langusele järgnes aeglane, kuid pidev vähenemine kõikides kohtades kuni katseperioodi lõpuni. 95. katsepäevaks oli mõlema katseala mõõnapiiri plaatidelt eemaldunud ligi 75% kinnitunud toornaftast. Sama ajaga oli eemaldunud Nuuk'i tõusupiiri plaatidelt 80% ning Narsaq'i tõusupiiril ligi 50% kinnitunud toornafta kogusest.

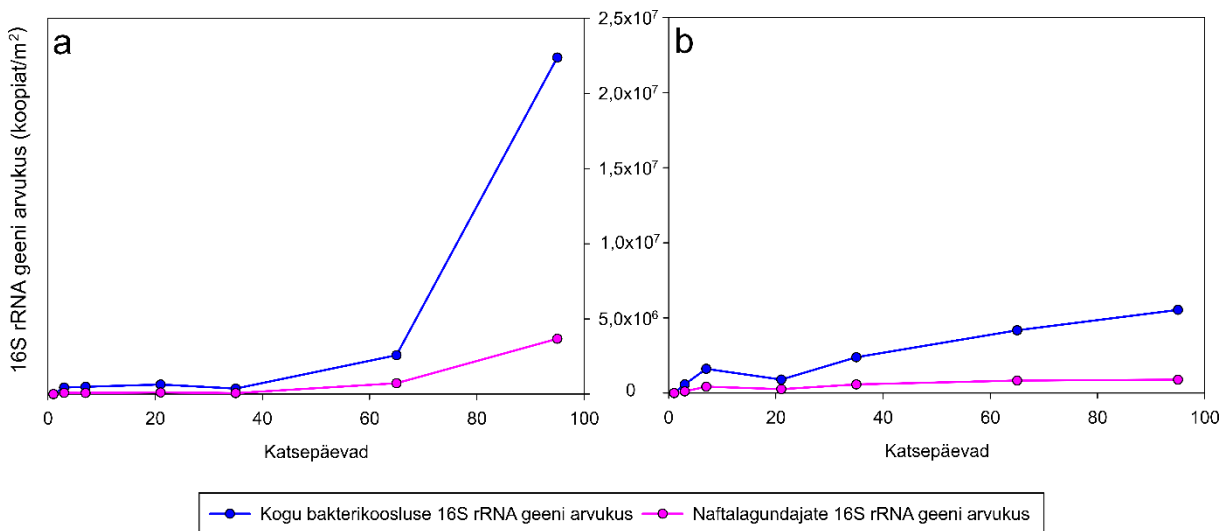


Joonis 8. Bakterite 16S rRNA geeni keskmiste arvukuste ja keskmise toornafta koguse (% esimese päeva kogusest) ajaline dünaamika ning hinnanguline toornafta lagunemise dünaamika kiviplateid pinnal katsealade meretaseme tõusu- ja mõõnapiiril katseperioodi jooksul (n=2). Alajoonised: a – Nuuk’i mõõnapiiril; b – Narsaq’i mõõnapiiril; c – Nuuk’i tõusupiiril; d – Narsaq’i tõusupiiril.

Bakterite 16S rRNA geeni arvukus toornaftaga töödeldud kiviplateid biokiles varieerus suuresti katsevariantide korduste vahel ning oli katseperioodi kestel vahemikus $1,1 \times 10^5$ – $1,5 \times 10^8$ geenikoopiad/m² (Lisa 1). Võrreldes katse algusega olid katse lõpuks arvukused suurenenud kõikides katsekohtades (sealhulgas ka kontrollplaatidel), kuid arvukuste dünaamika oli erinevates kohtades erinev (joonis 8 ja 9).

Nuuk’i mõõnapiiril paigaldatud plaatidel kasvas bakterite 16S rRNA geeni arvukus kogu katseperioodi vältel ning oli suurema osa katseperioodist oluliselt madalam kui tõusupiiril paigutatud plaatide arvukused (joonis 8a ja 8c). Ka tõusupiiril olnud plaatidel oli 16S rRNA geeni arvukus tõusvas trendis kuni 35. katsepäevani, millest edasi järgnes aga ühtlane arvukuse langus (ligi neli korda) kuni katseperioodi lõpuni. Katse lõpuks ületas bakterite 16S rRNA geeni arvukus Nuuk’i mõõnapiiril tõusupiiril olevate plaatide arvukusi üle kahe korra. Tõusupiiril paiknenud kontrollplaatide arvukused tõusid aeglaselt kuni 65. katsepäevani, millest edasi järgnes kiire tõus ning 95. päeval ületas kontrollplaatide arvukus toornaftaga

töödeldud plaatide arvukusi pea kuus korda (joonis 9a). Olulist erinevust kahe proovikoha (mõõna- ja tõsupiir) arvukuste dünaamikas kinnitas ka statistiline analüüs (rANOVA, $p < 0,05$), samas kui tõsupiiril paiknenud kontrollplaatide ja toornaftaga kaetud plaatide arvukuste dünaamikas statistiliselt olulist erinevust ei leitud.



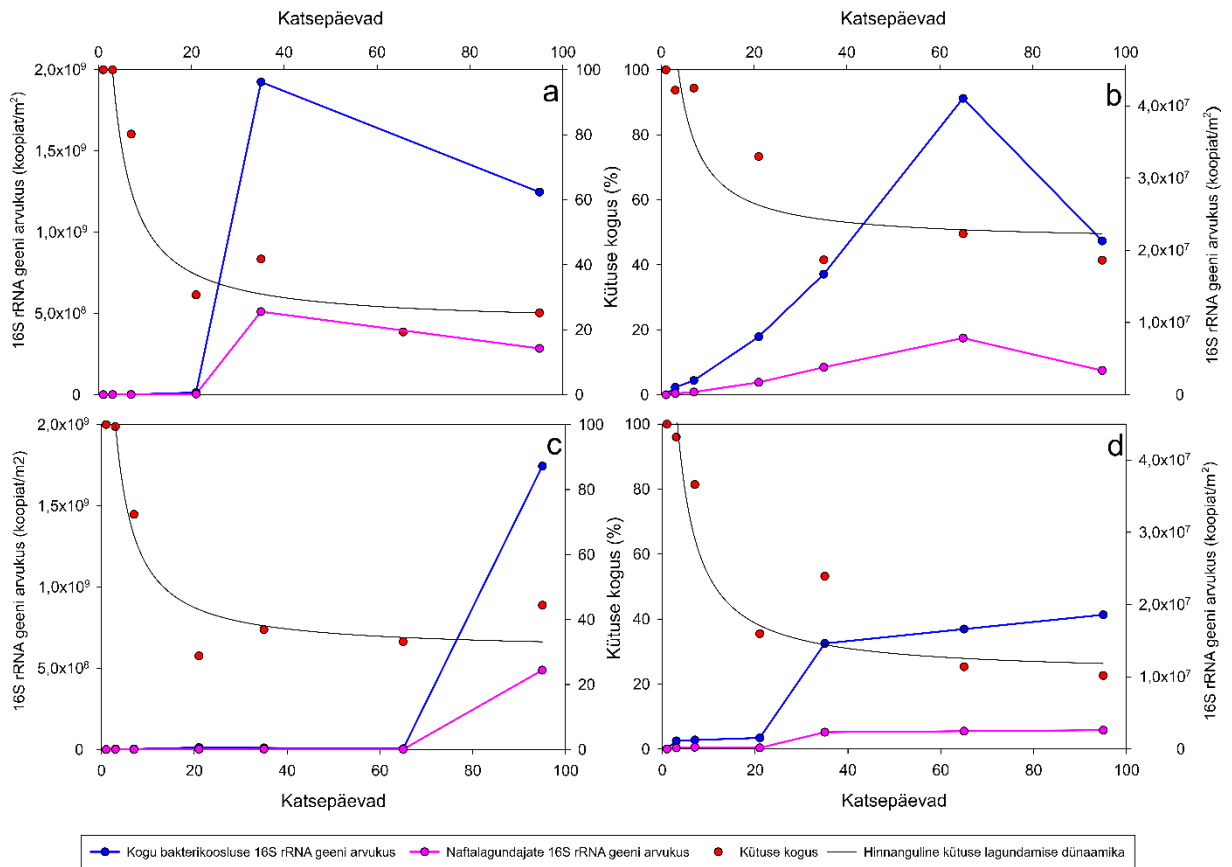
Joonis 9. Kogu bakterite 16S rRNA geeni ja naftat lagundavate bakteriperekondade 16S rRNA geeni keskmiste arvukuste ($n=2$) ajaline dünaamika kiviplaadide pinnal Nuuk'i ja Narsaq'i kontrollkiviplaadidel katseperioodi jooksul (vastavalt alajoonised a ja b).

Teise katseala, Narsaq'i, mõõnapiiril paiknenud kiviplaadide biokile bakterite 16S rRNA geeni arvukus suurenes kiiremini võrreldes Nuuk'i mõõnapiiril olevatel plaatide arvukusega ning eriti kiiret kasvu täheldati Narsaq'is 21. katsepäevast alates (joonis 8a ja 8b). Vahe kahe katseala mõõnapiiri plaatide vahel suurenes (erinevus 12 kuni 19 korda) kuni 21. katsepäevani, kuid siis hakkas geeni arvukus vähenema ja katse lõpuks edestas arvukus Narsaq'i mõõnapiiril Nuuk'i vastavaid arvukusi vaid neli korda. Olulist erinevust bakterite 16S rRNA geeni arvukuse dünaamikas nende kahe koha vahel kinnitas ka statistiline analüüs (rANOVA, $p < 0,001$). Erinevalt Nuuk'ist, oli Narsaq'i tõsupiiril paiknenud plaatidel näha ühtlaselt aeglast arvukuse tõusu kogu katseperioodi vältel ning katse lõpuks ületasid arvukused Narsaq'is Nuuk'i vastavaid arvukusi 2,6 korda (joonis 8c ja 8d). Erinevus bakterite 16S rRNA geeni arvukustes Narsaq'i tõusu- ja mõõnapiiri plaatide vahel oli märkimisväärne peale 21. katsepäeva, mil mõõnaplaadid ületasid oluliselt (3,4 – 7 korda) tõusuplaatide arvukusi. Narsaq'i kontrollplaatidel oli arvukus ühtlaselt pisut madalam kui toornaftaga kaetud tõusuplaatide arvukus, kuid muutuse dünaamika ajas ei erinenud oluliselt ($p > 0,05$) naftaga töödeldud kiviplaadide dünaamikast.

3.1.2 Laevakütusega kaetud kiviplaadid

Nuuk'i katseala kummaski katsekohas esimese kolme päeva jooksul olulist kütuse kadu ei fikseeritud, kuid kiire langus toimus mõlemas kohas peale kolmandat päeva kuni 21. katsepäevani, mil kütuse kogus vähenes ligi 60% võrra (joonis 10a ja 10c). Edaspidi toimus sellel katsealal kütuse koguse ühtlane aeglane langus, mille tõttu 95. katsepäevaks oli mõõnapiiril eemaldatud ligi 75% ja tõusupiiril ligi 65% algsest kividele kinnitunud kütuse kogusest. Narsaq'i mõlemas katsekohas täheldati vähest, alla 10%-list kütuse vähenemist juba 3. katsepäevaks (joonis 10b ja 10d). Kiirem langus toimus mõlemas Narsaq'i katsekohas esimese 21. katsepäeva jooksul, kuid tõusupiiril vähenes kütuse kogus selle aja jooksul ligi 70% ja mõõnapiiril vaid 45%. Edasi võis täheldada aeglast kütuse kadu kuni katse lõpuni ning 95. katsepäevaks oli mõõnapiiri plaatidelt eemaldatud pisut üle 50% ja tõusupiiril ligi 75% kinnitunud kütusest.

Bakterite 16S rRNA geeni arvukus laevakütusega kaetud kiviplaatidel varieerus samuti suuresti katsevariantide korduste vahel ning jäi vahemikku $3,8 \times 10^5 - 3,8 \times 10^9$ geenikoopiat/m² (Lisa 1). Võrreldes katse algusega olid katseaja lõpuks arvukused suurenenud kõikides katsekohtades (sealhulgas ka kontrollplaatidel), kuid arvukuste dünaamika oli erinevates kohtades erinev (joonis 9 ja 10).



Joonis 10. Bakterite 16S rRNA geeni keskmiste arvukuste ja keskmise laevakütuse (IFO 180) koguse (% esimese päeva kogusest) dünaamika katsealade meretaseme mõõna- ja tõusupiiril katseperioodi jooksul (n=2). Alajoonised: a – Nuuk’i mõõnapiiril; b – Narsaq’i mõõnapiiril; c – Nuuk’i tõusupiiril; d – Narsaq’i tõusupiiril.

Laevakütusega töödeldud kiviplaatide bakterite 16S rRNA geeni arvukuste ajalises dünaamikas oli katsealade ning katsealade mõõna- ja tõusupiiri plaatide vahel olulisi erinevusi. Nuuk’i mõõnapiiril paigaldatud plaatidel kasvas geeni arvukus väga aeglaselt kuni 21. katsepäevani, (1×10^7 geenikoopiat/ m^2), millest edasi toimus hüppeline tõus rohkem kui kaks suurusjärku kuni 35. katsepäevani ning edasi järgnes ühtlane arvukuse langus (ligi 1,5 korda) kuni katseperioodi lõpuni (joonis 10a). Tõusupiiri plaatidel tõusis geeni arvukus ühtlaselt kuni 65. katsepäevani (4×10^7 geenikoopiani/ m^2) ning siis toimus kiirem tõus mõõnapiiriga sarnasele tasemele ligi 2×10^9 geenikoopiat/ m^2 (joonis 10c). Ehkki nii tõusupiiril paiknenud kontrollplaatide kui IFO 180-ga töödeldud kiviplaatide geenide arvukused järgisid kasvavat trendi, tuvasas statistiline analüüs olulise erinevuse (rANOVA, $p < 0.05$) selle katseala laevakütusega töödeldud plaatide ja kontrollplaatide arvukuste ajalise dünaamika vahel. Kütusega töödeldud plaatide arvukus ületas 95. päeval kontrollplaatide arvukust ligi kaks suurusjärku (joonis 9b ja 10a, c).

Teise katseala, Narsaq'i, mõõnapiiril paiknenud kiviplaadide biokile bakterite 16S rRNA geeni arvukus hakkas kasvama erinevalt Nuuk'i mõõnapiiril olevatest plaatidest kohealt (3. katsepäevast), saavutades arvukuse maksimumi võrreldes Nuuk'i mõõnapiiriga 65. katsepäevaks (joonis 10a ja 10b). Kahe koha arvukuste haripunktide erinevus oli ligi 47 korda. Olulist erinevust bakterite 16S rRNA geeni arvukuse dünaamikas nende kahe koha vahel kinnitas ka statistiline analüüs (rANOVA, $p < 0,001$). Erinevalt Nuuk'ist, oli Narsaq'i tõusupiiril paiknenud kiviplaatidel täheldatud kuni 21. katsepäevani ühtlast aeglast arvukuse kasvu, millele järgnes hüppeline tõus (9,5 korda) ning alates 35. katsepäevast kuni katse lõpuni arvukuse ühtlane suurenemine (joonis 10d ja 10c). Katse lõpuks Narsaq'i arvukused ei ületanud Nuuk'i vastavaid arvukusi. Erinevus bakterite 16S rRNA geeni arvukustes Narsaq'i tõusu- ja mõõnapiiri plaatide vahel oli märkimisväärne peale 7. katsepäeva, mil mõõnaplaadid ületasid märgatavalt (1,6 – 12 korda) tõusuplaatide arvukusi. Statistiline analüüs näitas, et laevakütuse kogus Narsaq'i mõõna- ja tõusupiiri plaatidel oli negatiivselt seotud bakterite 16S rRNA geeni arvukusega nende plaatide biokiles (vastavalt Pearson $r = -0,80$; $p < 0,05$ ja $r = -0,77$; $p < 0,05$). Narsaq'i kontrollplaatide arvukus oli ühtlaselt madalam (erinevus kuni 6 korda) kui IFO 180-ga kaetud tõusuplaatide arvukus (joonis 9b, 10d) ning kontrollplaatide arvukuste ajaline muutus erines oluliselt ($p < 0,05$) laevakütusega töödeldud kiviplaadide arvukuste dünaamikast.

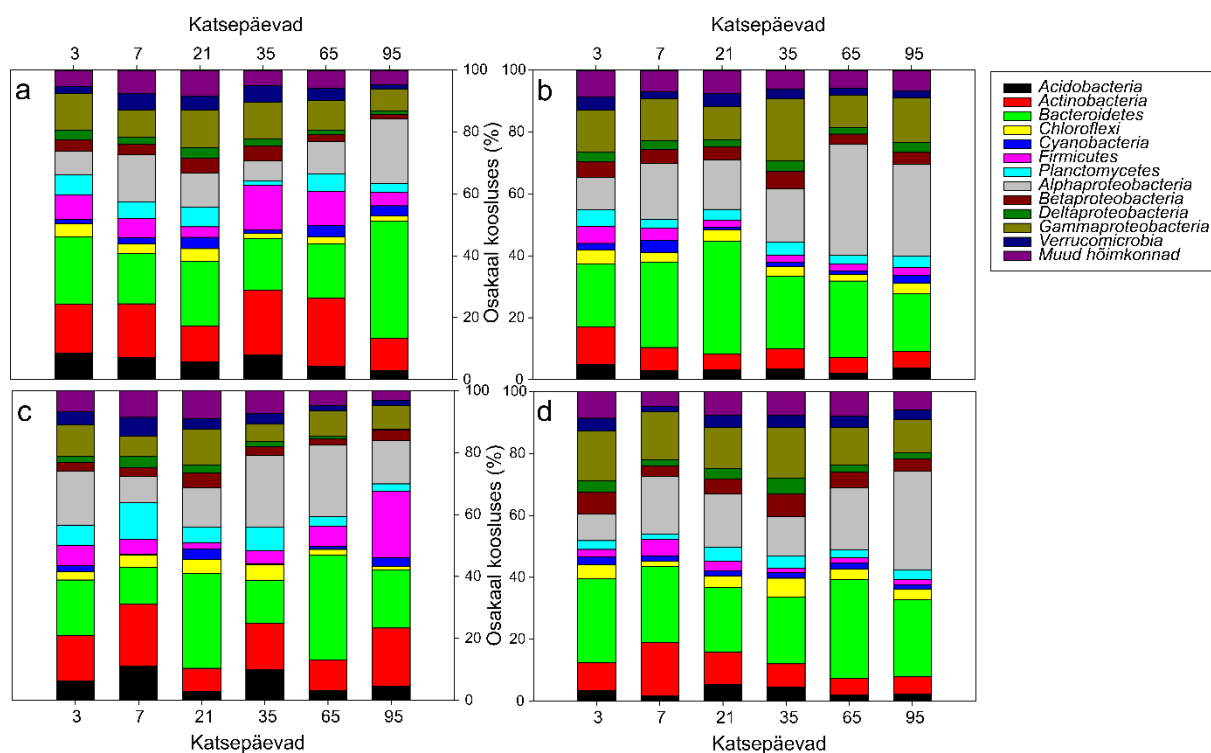
3.2 Bakterikoosluse struktuur ning nafta ja naftasaaduste lagundamise potentsiaal kiviplaadide biokiles

Sekveneritud bakterite 16S rRNA geeni järjestuste klassifitseerimisel tuvastati analüüsitud biokilede bakterikooslustes kokku 60 hõimkonna esindajaid ja ehkki üldiselt domineerisid erinevates katsekohtades samad bakterihõimkonnad, oli olulisi erinevusi nende hõimkondade proportsioonides ja osakaalude ajalises dünaamikas nii erinevalt töödeldud plaatide kui ka katsekohtade vahel.

3.2.1 Bakterikoosluse struktuur toornaftaga kaetud kiviplaadide biokiles

Toornaftaga töödeldud kiviplaadide biokile bakterikooslustes oli kõige arvukamalt hõimkondade *Bacteroidetes* (11,7% – 37,8%), *Actinobacteria* (5,0% – 22,0%) ning hõimkonna *Proteobacteria* klasside *Alphaproteobacteria* (6,4% – 35,9%) ja *Gammaproteobacteria* (5,6% – 20,0%) esindajad (joonis 11). Arvukamate rühmade osakaalud erinesid suuresti erinevate katsekohtade kooslustes ning nende ajalises

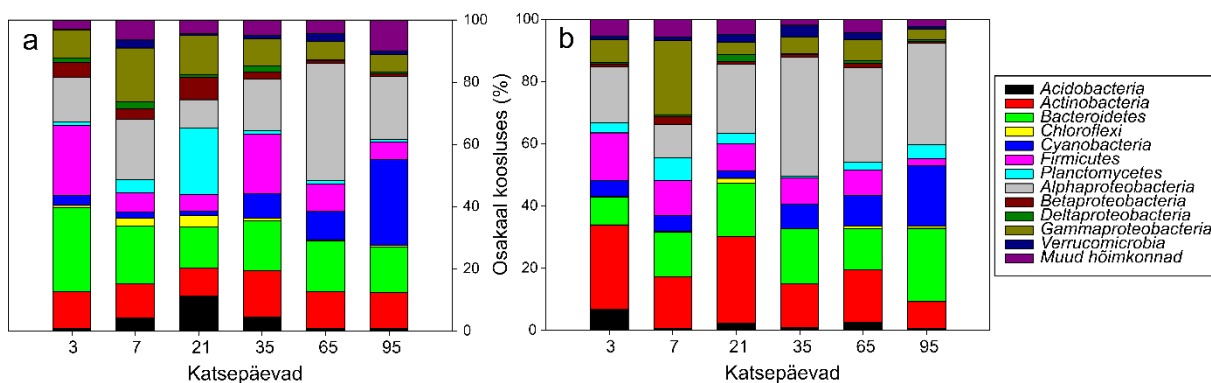
dünaamikas oli samuti olulisi erinevusi nii katsealade kui mõõna- ja tõusupiiri plaatide koosluste vahel. Näiteks *Actinobacteria* (Nuuk'is 10,4% – 22,0%, Narsaq'is 5,0% – 12,1%), *Acidobacteria* (Nuuk'is 2,9% – 8,5%, Narsaq'is 1,9% – 4,9%) ja *Firmicutes* (Nuuk'is 3,4% – 14,3%, Narsaq'is 2,3% – 5,5%) olid arvukamalt ja *Alphaproteobacteria* (Nuuk'is 6,4% – 20,8%, Narsaq'is 10,5% – 35,9%) vähem arvukalt esindatud Nuuk'i mõõnapiiril võrreldes Narsaq'i mõõnapiiri kooslustega (joonis 11a ja 11b). *Acidobacteria* (Nuuk'is 2,8% – 11,1%, Narsaq'is 1,8% – 5,3%), *Verrucomicrobia* (Nuuk'is 1,7% – 6,0%, Narsaq'is 1,7% – 4,0%) ja *Planctomyces* (Nuuk'is 2,5% – 11,8%, Narsaq'is 1,7% – 4,3%) olid aga Nuuk'i tõusupiiri kooslustes arvukamad kui Narsaq'i vastava katsekoha koosluses (joonis 11c ja 11d).



Joonis 11. Domineerivate bakterihõimkondade ja arvukamate hõimkonna *Proteobacteria* klasside osakaalud (keskmised, n=2) toornaftaga kiviplaadide biokile koosluses proovivõtupäevadel. Alajoonised: a – Nuuk'i mõõnapiiril; b – Narsaq'i mõõnapiiril; c – Nuuk'i tõusupiiril; d – Narsaq'i tõusupiiril.

Hõimkonna *Bacteroidetes* osakaal oli pisut suurem nii Nuuk'i kui Narsaq'i mõõnapiiri plaatide koosluses ning maksimaalsed selle rühma osakaalud määrati Nuuk'is 95. katsepäeval (37,8%) ja Narsaq'is 21. katsepäeval (36,5%). Oluliselt erines *Firmicutes* dünaamika kahe katseala tõusupiiril. Nuuk'is vähenes selle rühma osakaal koosluses kuni 21. päevani (2,2%), millest edasi toimus oluline suhtelise arvukuse kasv kuni katse lõpuni (21,5%). Narsaq'is oli selle rühma osakaal kõige suurem (3,3%) 21. katsepäeval, millest

edasi osakaal vähenes kuni katseperioodi lõpuni (1,5%). Olulist erinevust biokile bakterikooslustes võis näha ka toornafta- ja kontrollplaatide vahel (joonis 12).



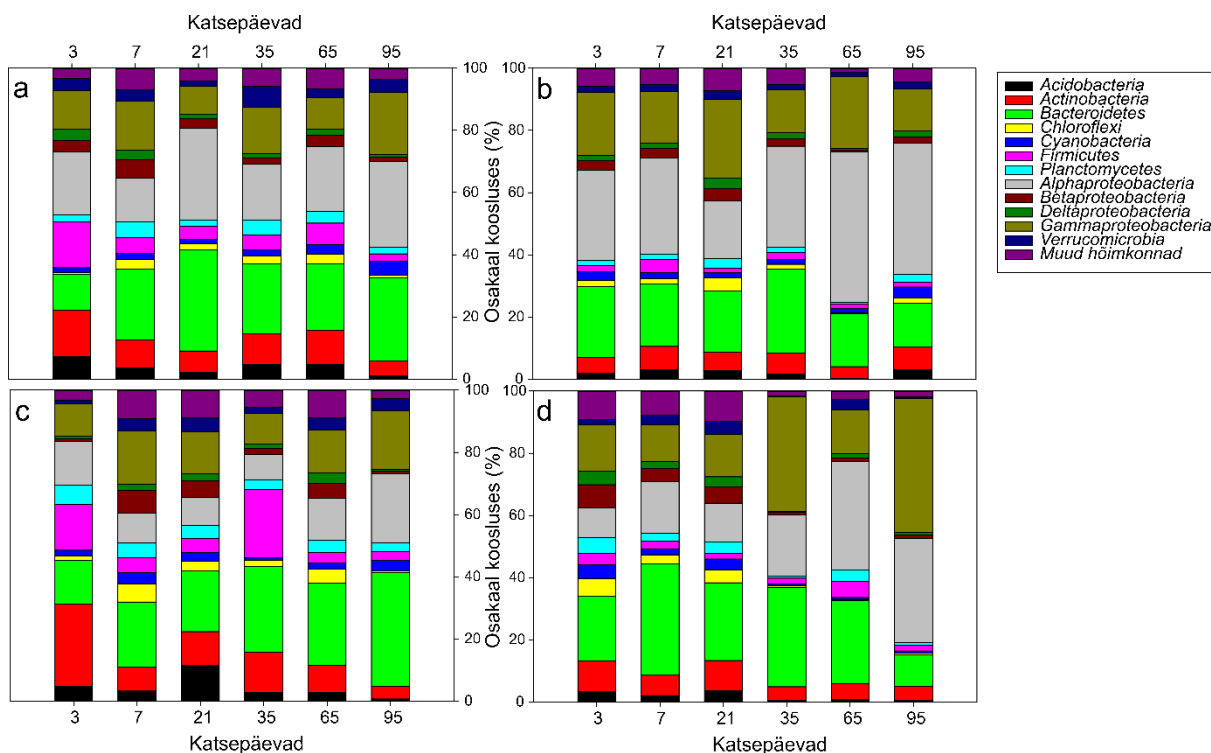
Joonis 12. Domineerivate bakterihõimkondade ja arvukamate hõimkonna *Proteobacteria* klasside osakaalud (keskmised, n=2) Nuuk'i ja Narsaq'i kontrollplaatide biokile koosluses proovivõtupäeval (vastavalt alajoonised a ja b).

Kui kontrollplaatidel domineerisid enamasti toornaftaga sarnased hõimkonnad ja *Proteobacteria* klassid, siis kontrollplaatide kooslustes oli oluliselt suurem osakaal hõimkonna *Planctomycetes* (Nuuk'is 0,9% – 21,5%, Narsaq'is 0,7% – 7,2%), *Firmicutes* (Nuuk'is 5,2% – 22,7%, Narsaq'is 2,1% – 15,3%) ja *Cyanobacteria* (Nuuk'is 1,5% – 27,5%, Narsaq'is 2,4% – 19,5%) esindajatel ja väiksem osakaal *Cloroflexi* (<1,6%) esindajatel kui mõlema katsekoha toornaftaga kaetud plaatide kooslustes tõusupiiril (*Planctomycetes* Nuuk'is 2,5% – 11,8%, Narsaq'is 1,7% – 4,3%; *Firmicutes* Nuuk'is 2,2% – 21,5%, Narsaq'is 1,5% – 5,4% ja *Cyanobacteria* Nuuk'is 0,3% – 3,3%, Narsaq'is 1,5% – 2,5%) (joonis 12a, 12b, 11c, 11d). Oluliselt erinesid ka kontroll- ja toornaftaplaatide osakaalude muutused ajas, kuna suurimaid kõikumisi täheldati just kontrollplaatidel, osakaalud muutusid ajas ligi 25 korda (*Planctomycetes*) Nuuk'i kontrollis ja ligi 11 korda (*Acidobacteria*) Narsaq'i kontrollis. Mõlema kontrollala *Proteobacteria* arvukamalt esinadatud klasside osakaalud muutusid ajas üsna sarnaselt, välja arvatud *Gammaproteobacteria* klassi osakaal, mis muutus Nuuk'i kontrollis üle kolme ja Narsaq'i kontrollis üle kuue korra kogu katseperioodi jooksul samal ajal kui toornaftaga plaatidel oli see muutus Nuuk'is ja Narsaq'i tõusupiiri kooslustes vastavalt üle kahe ja üle ühe korra.

3.2.2 Bakterikoosluse struktuur laevakütusega kaetud kiviplaatide biokiles

Sarnaselt toornaftaga töödeldud kiviplaatidele oli laevakütusega kaetud kiviplaatide biokiles kõige arvukamalt hõimkondade *Bacteroidetes* (10,2% – 35,7%), *Actinobacteria* (3,8% – 14,9%) ning hõimkonna *Proteobacteria* klasside *Alphaproteobacteria* (9,6% – 48,5%) ja

Gammaproteobacteria (11,8% – 43,2%) esindajad (joonis 13). Arvukamate rühmade osakaalud erinesid kogu katseperioodi jooksul 3,5 – 5,0 korda. Samuti ilmnisid erisused nii mõlema katseala mõõna- ja tõusupiiri plaatide koosluste vahel kui ka kahe katseala vastavate asukohtade vahel. Näiteks *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* ja *Firmicutes* olid arvukamad ja *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* ning *Verrucomicrobia* vähemarvukamad Nuuk'i mõõna kohas võrreldes Narsaq'i mõõna kohaga (joonis 13a ja 13b). *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* ja *Verrucomicrobia* oli aga Nuuk'i tõusu kohas arvukamad kui Narsaq'i vastavas katsekohas (joonis 13c ja 13d).



Joonis 13. Domineerivate bakterihõimkondade ja arvukamate hõimkonna *Proteobacteria* klasside osakaalud (keskmised, n=2) laevakütusega (IFO 180) plaatide biokile koosluses proovivõtupäevadel. Alajoonised: a – Nuuk'i mõõnapiiril; b – Narsaq'i mõõnapiiril; c – Nuuk'i tõusupiiril; d – Narsaq'i tõusupiiril.

Võrreldes Nuuk'iga, oli hõimkonna *Proteobacteria* klass *Alphaproteobacteria* palju arvukam Narsaq'i mõlema katsekoha plaatide koosluses: maksimaalsed selle rühma osakaalud määrati mõlema katseala mõõnapiiril (Nuuk'is 21. katsepäeval (29,5%) ja Narsaq'is 65. katsepäeval (48,5%)). Analoogselt toornaftaga erines ka IFO 180 korral kõige rohkem *Firmicutese* dünaamika kahe katseala tõusupiiril. Nuuk'is vähenes selle rühma osakaal koosluses kuni 21. päevani (4,7%), seejärel toimus järsk suhtelise arvukuse kasv kuni 35. päevani (22,0%), millest edasi arvukus langes katse lõpuni (2,8% 95. katsepäeval).

Narsaq'is oli selle rühma osakaal kõige kõrgem 65. katsepäeval (5,1%) ning madalaim 21. katsepäeval (1,8%). Samuti võis täheldada olulist erinevust biokile bakterikoosluses IFO 180 ja kontrollplaatide vahel (joonis 12).

Mõlema katsekoha kontrollplaatide kooslustes oli oluliselt suurem osakaal *Proteobacteria* klassil *Alphaproteobacteria* (Nuuk'is 9,2% – 37,9%, Narsaq'is 10,9% – 38,4%) ja väiksem osakaal hõimkonnal *Bacteroidetes* (Nuuk'is 13,2% – 27,0%, Narsaq'is 8,8% – 23,6%) esindajal kui mõlema katseala IFO 180-ga kaetud plaatide kooslustes tõusupiiril (*Alphaproteobacteria* Nuuk'is 8,2% – 22,1%, Narsaq'is 9,6% – 35,1%) ja *Bacteroidetes* Nuuk'is 13,9% – 36,6%, Narsaq'is 10,2% – 35,7%). Samuti erinesid oluliselt kontroll ja IFO 180 plaatide osakaalude muutused ajas. Suurimat osakaalu kõikumist IFO 180 plaatide koosluses oli näha Nuuk'is *Acidobacteria* esindajate puhul (~17 korda) ning vähimat *Gammaproteobacteria* esindajate puhul (~2 korda), sama koha kontrollplaatide kooslustes muutus kõige enam hõimkonna *Planctomycetes* osakaal (~25 korda) ja kõige vähem *Actinobacteria* osakaal (~2 korda) kogu katseperioodi jooksul. Narsaq'i tõusupiiril oli aga kõige muutlikum *Chloroflexi* osakaal (~14 korda), püsivaim aga *Actinobacteria* suhteline arvukus (~2 korda). Sama koha kontrollplaatidel oli kõige muutlikum hõimkonna *Acidobacteria* osakaal (~11 korda) ning kõige vähem muutus ajas hõimkonna *Bacteroidetes* osakaal (~3 korda). Vaatamata sellele esines kontroll- ja töödeldud plaatide vahel ka sarnasusi. Nuuk'i kontroll ja IFO 180-ga kaetud plaatide *Firmicutes* osakaal langes kuni 21. päevani, seejärel kasvas kuni 35. päevani, millest edasi osakaal langes katse lõpuni. Sarnaselt käitusid ka *Gammaproteobacteria* osakaalud nii Nuuk'i kontrollplaatide koosluses kui ka IFO 180 töötusega plaatide kooslustes. Narsaq'i tõusujoone plaatide puhul oli näha sarnast *Acidobacteria* osakaalu muutust nii IFO 180-ga töödeldud kui kontrollplaatide puhul.

3.3 Nafta ja naftasaaduste lagundamise potentsiaal erineva töötusega kiviplaatide biokiles

Üle kõikide proovide identifitseeriti kokku 1853 bakteriperekonda, millest 38 perekonnas on liikmeid, kellel kirjanduse andmetel on võimekus lagundada erinevaid nafta komponente. Iga sellise perekonna hinnanguline arvukus vähemalt ühes proovis oli vähemalt 5×10^4 16S rRNA geenikoopiat m² kohta. Kogu katseperioodi vältel varieerus naftat lagundavatesse perekondadesse kuuluvate geenijärjestuste osakaal kõikides analüüsitud proovide kooslustes vahemikus 6% kuni 45%. Suur osa katseplaatide biokile bakterikooslustes tuvastatud naftalagundajate perekondadest kuulusid *Proteobacteria* klassidesse *Alpha-* ja

Gammaproteobacteria ning hõimkonda *Flavobacteria*, kuid leiti ka mitmeid hõimkondadesse *Firmicutes* ja *Actinobacteria* kuuluva perekonna esindajaid (tabel 3).

Tabel 3. Naftat lagundavad bakteriperekonnad analüüsitud kiviplatide biokile bakterikooslustes ja vastavate ühendite lagundamise potentsiaal kirjanduse alusel. Hõimkond *Proteobacteria* puhul on esitatud kuuluvus klassi tasemel. Lühendid: PAH – polüaromaatsed süsivesinikud; LÜ – näidatud seost nafta või naftasaaduse lagunemisega üldiselt.

Naftalagundajad		Lagundatav	Kirjanduse viited
Perekond	Hõimkond/klass	Ühend	
<i>Acinetobacter</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	LÜ	Mishara et al. 2004
<i>Actinomyces</i>	<i>Actinobacteria</i>	PAH	Olowomofe et al. 2019
<i>Algoriphagus</i>	<i>Bacteroidetes</i>	LÜ	Wang et al. 2014
<i>Anoxybacillus</i>	<i>Firmicutes</i>	LÜ	Xia et al. 2015
<i>Bacillus</i>	<i>Firmicutes</i>	PAH LÜ	Olowomofe et al. 2019 Parthipan et al. 2017
<i>Bergeyella</i>	<i>Bacteroidetes</i>	LÜ	Kwon et al. 2019
<i>Chryseobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i>	LÜ	Wang et al. 2015 Gontikaki et al. 2018
<i>Cloacibacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i>	PAH	Jurelevicius et al. 2013
<i>Corynebacterium</i>	<i>Actinobacteria</i>	LÜ	Kumari et al. 2012
<i>Croceibacter</i>	<i>Bacteroidetes</i>	PAH	Capello et al. 2012
<i>Enterococcus</i>	<i>Firmicutes</i>	LÜ	Boontawam & Boontawan, 2011
<i>Erythrobacter</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	PAH LÜ	Röling et al. 2002 Liu & Liu, 2013
<i>Exiguobacterium</i>	<i>Firmicutes</i>	PAH, LÜ	Kumar et al. 2014
<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i>	LÜ	Chaudhary et al. 2019
<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacteria</i>	LÜ	Gutierrez et al. 2016
<i>Gillisia</i>	<i>Bacteroidetes</i>	LÜ	Guibert et al. 2012
<i>Granulosicoccus</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	LÜ	Ramirez et al. 2020
<i>Haemophilus</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	PAH	Tyagi et al. 2011
<i>Kocuria</i>	<i>Actinobacteria</i>	PAH LÜ	Ahmed et al. 2010 Lalevic et al. 2014
<i>Loktanella</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	PAH	Berthe-Corti & Nachtkamp, 2010

Naftalagundajad		Lagundatav	Kirjanduse viited
Perekond	Hõimkond/klass	ühend	
<i>Luteimonas</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	PAH	Vila et al. 2015
<i>Micrococcus</i>	<i>Actinobacteria</i>	LÜ	Khan & Singh, 2011
<i>Nocardioides</i>	<i>Actinobacteria</i>	LÜ	Schippers et al. 2005
<i>Paracoccus</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	PAH LÜ	Antoniou et al. 2015 Wang et al. 2010
<i>Pedobacter</i>	<i>Bacteroidetes</i>	LÜ	Chang et al. 2017
<i>Pirellula</i>	<i>Planctomycetes</i>	LÜ	Wang et al. 2019 Glöckner et al. 2003
<i>Polaribacter</i>	<i>Pirellula</i>	LÜ	Wang et al. 2014
<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	PAH, LÜ	Kumar et al. 2014
<i>Pseudomonas</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	PAH	Olowomofe et al. 2019 Tyagi et al. 2011
<i>Psychrobacter</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	LÜ	Giudice et al. 2010
<i>Roseobacter</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	LÜ	Yakikov et al. 2007
<i>Shewanella</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	LÜ	Gerdes et al. 2004
<i>SMIA02</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	LÜ	Uribe-Flores et al. 2019
<i>Sphingobacterium</i>	<i>Bacteroidetes</i>	LÜ	Izmalkova et al. 2018
<i>Sphingorhabdus</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	LÜ	Vergeynst et al. 2018 (1)
<i>Streptococcus</i>	<i>Firmicutes</i>	LÜ	Al-Kindi & Abed, 2016
<i>Sulfitobacter</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	LÜ	Gontikaki et al. 2018
<i>Ulvibacter</i>	<i>Bacteroidetes</i>	LÜ	Giudice et al. 2010

Enamus kirjandusallikaid on näidanud vastavate perekondade esindajate seost nafta ja selle saadustes sisalduvate ühendite lagundamisega üldiselt ning konkreetsete ühendite lagundamisega seoseid ei ole välja toodud. Erandiks on PAH-id, mille lagundamist on näidatud mitmete käesolevas uurimuses tuvastatud *Alpha*- ja *Gammaproteobacteria* klassi ning hõimkondade *Firmicutes*, *Flavobacteria* ja *Actinobacteria* perekondade puhul.

3.3.1 Naftalagundajate osakaal bakterikoosluses

Toornaftaga kaetud plaatidel varieerus suuresti naftalagundajate osakaal proovides kogu katseperioodi jooksul ning madalaim (6%) ja kõrgeim osakaal (53%) leiti just selle töötusega plaatide kooslustes (tabel 4). Narsaq'i töödeldud plaatide kooslustes oli naftalagundajate osakaal keskmiselt oluliselt suurem (t-test, $p < 0,05$) kui Nuuk'i katseala

naftaga töödeldud plaatide kooslustes (vastavalt $19\pm 5\%$ ja $16\pm 4\%$). Mõõna- ja tõusupiiri plaatide vahel statistiliselt olulist erinevust naftalagundajate osakaaludes ei leitud kummaski katsekohas eraldi ega ka üle kahe katseala kokku. Samuti ei erinenud töödeldud plaatide naftalagundajate osakaalud kummagi katseala tõusupiiril oluliselt naftalagundajate osakaaludest kontrollplaatide kooslustes.

Tabel 4. Naftat lagundavate bakteriperekondade osakaalud (keskmised ja standardhälbed, $n=2$) erinevalt töödeldud katseplaatide (variant) biokile bakterikooslustes proovivõtupäevadel. Asukoht tähistab proove katsealade meretaseme maksimaalse mõõna ja tõusu piiril.

Variant	Katseala	Asukoht	Naftalagundajate osakaal koosluses (%)					
			3.päev	7.päev	21.päev	35.päev	65.päev	95.päev
Toornafta	Narsaq	Mõõn	15±1	17±2	17±4	17±1	25±4	19±4
		Tõus	17±3	25±9	16±4	12±1	16±5	29±24
	Nuuk	Mõõn	15±8	13±0	10±1	16±2	17±4	22±15
		Tõus	15±2	8±2	16±6	13±2	18±4	23±5
IFO180	Narsaq	Mõõn	18±0	19±0	28±10	22±1	19±1	16±0
		Tõus	19±1	19±1	13±6	16±1	18±3	14±4
	Nuuk	Mõõn	18±7	19±2	25±7	22±6	18±1	23±0
		Tõus	19±1	16±1	15±6	24±2	18±7	28±1
Kontroll	Narsaq	Tõus	21±6	25±2	23±11	25±3	21±2	16±1
	Nuuk	Tõus	18±1	14±2	16±1	16±3	31±12	17±1

IFO 180-ga töödeldud plaatide kooslustes oli naftalagundajate osakaal erinevate proovide kooslustes suhteliselt ühtlasem (9% – 38%) ja ületas (keskmiselt 4%) mõõnapiiril oluliselt samas piirkonnas paiknenud toornaftaga töödeldud plaatide osakaalusid (t-test, $p<0,05$). Mõõnapiiril paiknenud IFO 180-ga kaetud plaatide naftalagundajate osakaal ($21\pm 3\%$) oli oluliselt suurem kui tõusupiiril olnud plaatidel ($17\pm 2\%$; t-test, $p<0,05$), kuid katsealade vahel olulist erinevust tõusu- ja mõõnapiirkonna plaatide koosluste osakaaludes ei ilmnenud. Samas näitas statistiline analüüs, et Narsaq'i tõusupiirkonna IFO 180-ga töödeldud plaatide biokile koosluses oli naftalagundajate osakaal aga oluliselt väiksem (keskmiselt 5%) kui sama koha kontrollplaatide koosluses (t-test, $p<0,01$).

3.3.2 Naftalagundajate hinnanguline arvukus toornaftaga kaetud plaatidel

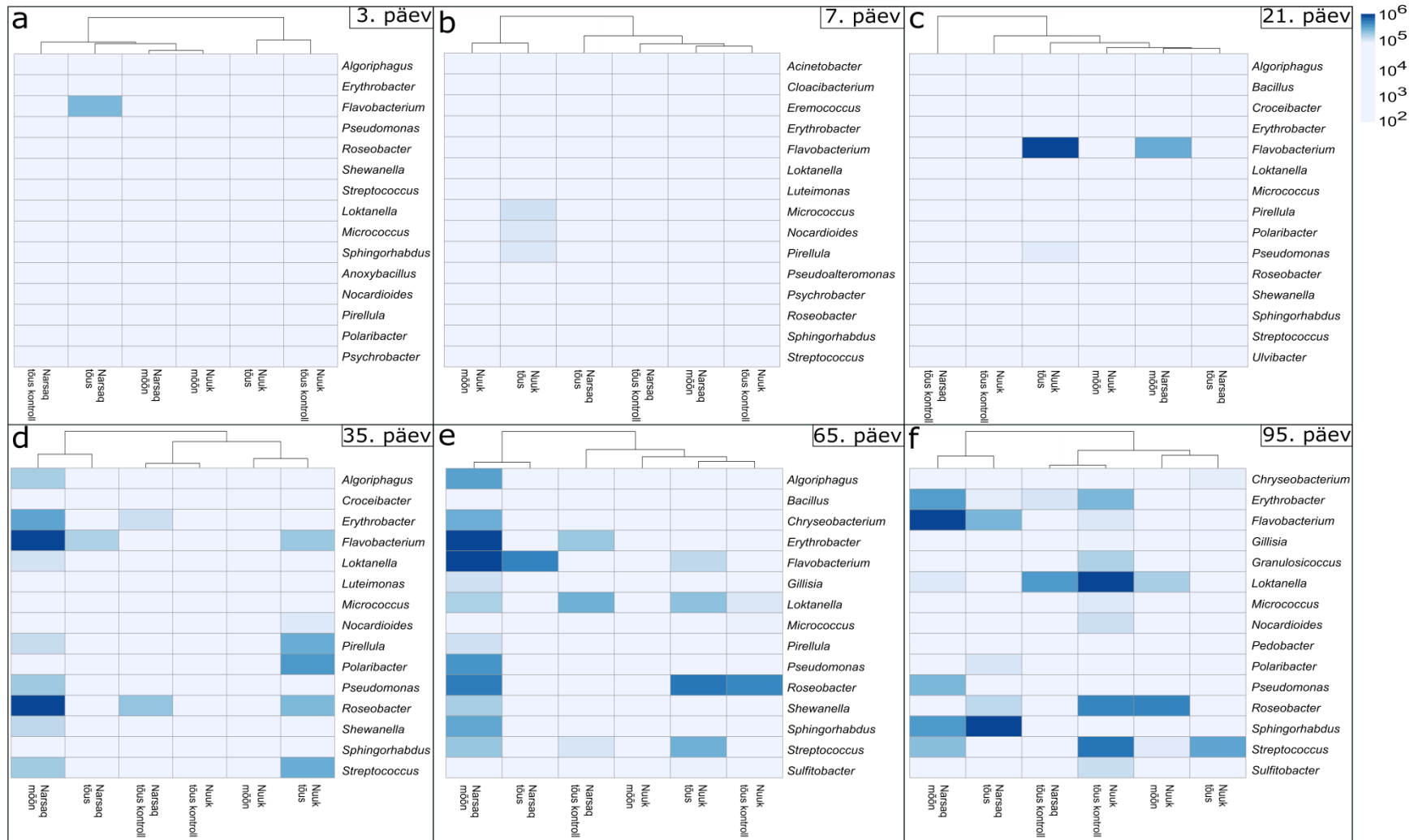
Tuvastatud naftat lagundavate perekondade esindajaid leidis peaaegu kõikides proovides, kuid nende organismide 16S rRNA geeni hinnangulised arvukused olid enamasti väga madalad (alla 10^5 geenikoopia/m²). Naftalagundajate arvukus suurenes toornaftaga töödeldud kiviplaatidel katseperioodi jooksul kõikides katsekohtades, kuid arvukuse dünaamika erinevates kohtades oli erinev. Nuuk'i mõõnapiiiril tõusis arvukus ühtlaselt kuni katse lõpuni ning jõudis 95. päevaks tasemele 2×10^6 geenikoopiat/m². Selle katseala tõusupiiiril oli aga naftalagundajate 16S rRNA geeni hinnanguline arvukus mõõnapiiiri 95. päeva tasemel juba 35. katsepäevaks ning püsis sellel tasemel kuni 65. katsepäevani (joonis 8a ja 8c). Edasi oli näha aga arvukuse langust selles kohas kuni katseperioodi lõpuni. Dünaamikate olulist erinevust Nuuk'i katsekohtade vahel kinnitas ka statistiline analüüs (rANOVA, $p < 0.05$). Ka Nuuk'i kontrollplaatidel toimus ühtlaselt aeglane naftalagundajate 16S rRNA geeni hinnangulise arvukuse tõus kogu katseperioodi jooksul ja 95. katsepäeval ületas kontrollplaatide naftalagundajate 16SrRNA geeni hinnanguline arvukus pisut nii mõõna kui tõusupiiiri naftaga töödeldud plaatide arvukusi (joonis 9a). Narsaq'i mõõnapiiiril oli naftalagundajate arvukuse dünaamika oluliselt erinev Nuuk'i vastava koha dünaamikast (rANOVA, $p < 0,05$). Seal võis näha aeglast arvukuse tõusu kuni 21. katsepäevani, millest edasi toimus tunduvalt kiirem kasv 65. katsepäevani tasemele 1×10^7 geenikoopiat/m², millele järgnes arvukuse mõningane langus kuni katseperioodi lõpuni (joonis 8b). Narsaq'i tõusupiiiril tõusis naftalagundajate 16S rRNA geeni hinnanguline arvukus aeglaselt kuid suhteliselt ühtlaselt kuni 95. katsepäevani, mil ületas Nuuk'i tõusupiiiri naftalagundajate geeni arvukust neli korda (hinnanguline arvukus 4×10^6 geenikoopiat/m²) kuid jäi ligi kaks korda alla Narsaq'i mõõnapiiiri arvukusele. Ka Narsaq'is suurenes naftalagundajate 16S rRNA geeni hinnanguline arvukus kontrollplaatide biokile bakterikoosluses katseperioodi jooksul, kuid 95. katsepäevaks ületasid arvukused naftaga töödeldud plaatidel tunduvalt kontrollplaatide arvukusi (üle nelja korra tõusupiiiri ja ligi 8 korda mõõnapiiiri plaatidel) (joonis 9b). Statistiliselt olulisi seoseid plaatidel toornafta koguse ja naftalagundajate 16S rRNA geeni hinnangulise arvukusega kiviplaatidel ei leitud üheski katsekohas.

Andmeanalüüsi tulemused näitasid, et erinevate naftalagundajate perekondade proportsioonid ning hinnangulised arvukused kiviplaatide biokile koosluses erinesid oluliselt katsekohtade vahel erinevatel katsepäevadel (joonis 11). Katse 3. päeval olid naftalagundajate arvukused madalad kõikides proovides (joonis 14a). Klasteranalüüsi tulemusel grupeerusid Nuuk'i ja Narsaq'i tõusupiiiri naftaga töödeldud plaatide naftalagundajate kooslused kokku kontrollplaatide kooslustega ning katsealade grupid eristusid üksteisest (joonis 14). Samas olid kahe katseala mõõnaproovid suhteliselt sarnase

lagundajate struktuuri ja arvukusega ning klasterdusid kokku. Katse 7. päevaks eristusid Nuuk'i töödeldud plaatide kooslused Narsaq'i ja kontrollplaatidest ning 21. päevaks klasterdusid kokku kõik töödeldud plaatide kooslused ning eristusid kontrollplaatide kooslustest. Selleks päevaks oli tõusnud perekonna *Flavobacterium* arvukus nii Nuuk'i tõusu kui Narsaq'i mõõnapiiril (vastavalt $1,1 \times 10^7$ ja $3,3 \times 10^6$ geenikoopiat/m²) (joonis 14c). Katse 35. päevast kuni katse lõpuni klasterdusid Narsaq'i mõlema katsekoha töödeldud plaadid kokku ning eristusid Nuuk'i ja kontrollplaatide kooslustest ning 95. katsepäevaks moodustasid ka kontrollplaatide kooslused eraldi klatri.

Nuuk'is olid nii mõõna- kui ka tõusupiiril olevate toornaftaga töödeldud kiviplaatide biokiles naftat lagundavate bakterite 16S rRNA geeni hinnangulised arvukused üldiselt väga madalad ($0 - 1,1 \times 10^7$ geenikoopiat/m²) (joonis 8a ja 8c). Mõõnapiiril oli hinnanguline arvukus $>10^6$ geenikoopia/m² vaid 95. katsepäeval kolmel perekonnal: *Loktanella* (hinnanguline arvukus $2,0 \times 10^6$ geenikoopiat/m²), *Roseobacter* (hinnanguline arvukus $5,4 \times 10^6$ geenikoopiat/m²) ja *Streptococcus* (hinnanguline arvukus $1,1 \times 10^6$ geenikoopiat/m²) (joonis 14f) ning tõusu korral erinevatel katsepäevadel üheksal perekonnal: *Chryseobacterium*, *Flavobacterium* (hinnanguline arvukus 21. katsepäeval $1,1 \times 10^7$ geenikoopiat/m²), *Loktanella*, *Micrococcus*, *Nocardioides*, *Pirellula*, *Pseudomonas*, *Roseobacter* ning *Streptococcus* (joonis 14b-14f).

Narsaq'i mõõnapiiril olevatel kiviplaatidel oli naftat lagundavate bakterite 16S rRNA geeni hinnanguline arvukus 1,7 korda kõrgem kui sama koha tõusupiiril paiknenud plaatidel (joonis 8b ja 8d). Mõõnapiiri kõige arvukamad perekonnad olid: *Algoriphagus*, *Flavobacterium*, *Erythrobacter*, *Pseudomonas*, *Roseobacter*, *Shewanella*, *Sphingorhabdus*, *Streptococcus* (joonis 14). Näiteks perekonna *Flavobacterium* hinnanguline arvukus selles katsekohas oli 21. – 95. katsepäevani vahemikus $3,3 \times 10^6$ kuni $1,9 \times 10^7$ geenikoopiat/m² (joonis 14c-14f) ning perekonna *Erythrobacter* hinnanguline arvukus 35. – 95. katsepäevani vahemikus $3,6 \times 10^6$ kuni $1,4 \times 10^7$ geenikoopiat/m² (joonis 14d-14f). Sama koha tõusupiiril oli valdavas enamuses perekondade *Flavobacterium* (hinnanguline arvukus 65. – 95. katsepäeval oli vahemikus $2,9 \times 10^6$ kuni $5,5 \times 10^6$ geenikoopiat/m²) ja *Sphingorhabdus* (hinnanguline arvukus 95. katsepäeval oli $1,4 \times 10^7$ geenikoopiat/m²) esindajad.



Joonis 14. Soojakaardid (*heatmap*), mis põhinevad naftat ja naftaprojekte lagundavate bakteriperekondade hinnangulisel arvukusel ja näitavad erinevates tingimustes asunud toornaftaga kaetud kiviplatide grupeerumist lagundajakoosluste struktuuri ja arvukuse alusel katse 3., 7., 21., 35., 65. ja 95. päeval (vastavalt alajoonis a, b, c, d, e ja f). Skaala näitab naftalagundajate hinnangulisi arvukusi (geenikoopiat/m²) uuritud proovides.

Mõlema katsekoha kontrollproovide naftalagundajate hinnangulised arvukused olid väga madalad, välja arvatud Nuuk'is 95. katsepäeval (joonis 14f) perekondade *Erythrobacter*, *Gillisia*, *Granulosicoccus*, *Loktanella* ($1,2 \times 10^7$ geenikoopiat/m²), *Micrococcus*, *Nocardioides*, *Roseobacter*, *Streptococcus* ja *Sulfitobacter* suhtelised arvukused ning Narsaq'is perekondade *Erythrobacter*, *Loktanella*, *Roseobacter* ja *Streptococcus*, mille hinnangulised arvukused olid vastavalt $<1,0 \times 10^5$ kuni $2,2 \times 10^6$ geenikoopiat/m², $1,0 \times 10^5$ kuni $4,1 \times 10^6$ geenikoopiat/m², $1,0 \times 10^5$ kuni $2,3 \times 10^6$ geenikoopiat/m² ning $3,0 \times 10^5$ kuni $1,2 \times 10^6$ geenikoopiat/m² kogu katseperioodi jooksul.

3.3.3 Naftalagundajate hinnanguline arvukus laevakütusega IFO 180 kaetud plaatidel

IFO 180-ga töödeldud kiviplaatide naftalagundajate 16S rRNA geeni hinnanguliste arvukuste dünaamika erines toornaftaga töödeldud plaatide arvukuste dünaamikast. Oluline erinevus ilmnis just Nuuk'i mõõnapiiril (rANOVA, $p < 0.05$), kus IFO 180-ga plaatidel püsis arvukus madal (alla 4×10^6 geenikoopiat/m²) esimesed 21 katsepäeva ja siis toimus järsk kasv kahe suurusjärgu võrra 35. katsepäevaks (joonis 10a). Katseperioodi lõpuks oli aga arvukus selle koha plaatidel jälle kahanenud 2,5 korda. Nuuk'i tõusupiiril oli naftalagundajate 16S rRNA geeni hinnanguline arvukus madal (kuni 2×10^5 geenikoopiat/m²) kuni 65. katsepäevani, kuid siis ilmnis järsk tõus ja 95. katsepäevaks ületas naftalagundajate hinnanguline arvukus tõusupiiril mõõnapiiri arvukust 2,5 korda ja kontrollplaatide arvukust ligi kaks suurusjärku (joonis 10c). Statistiline analüüs tõi välja olulise erinevuse selle katseala kontroll- ja töödeldud plaatide vahel tõusupiiril (rANOVA, $p < 0.05$).

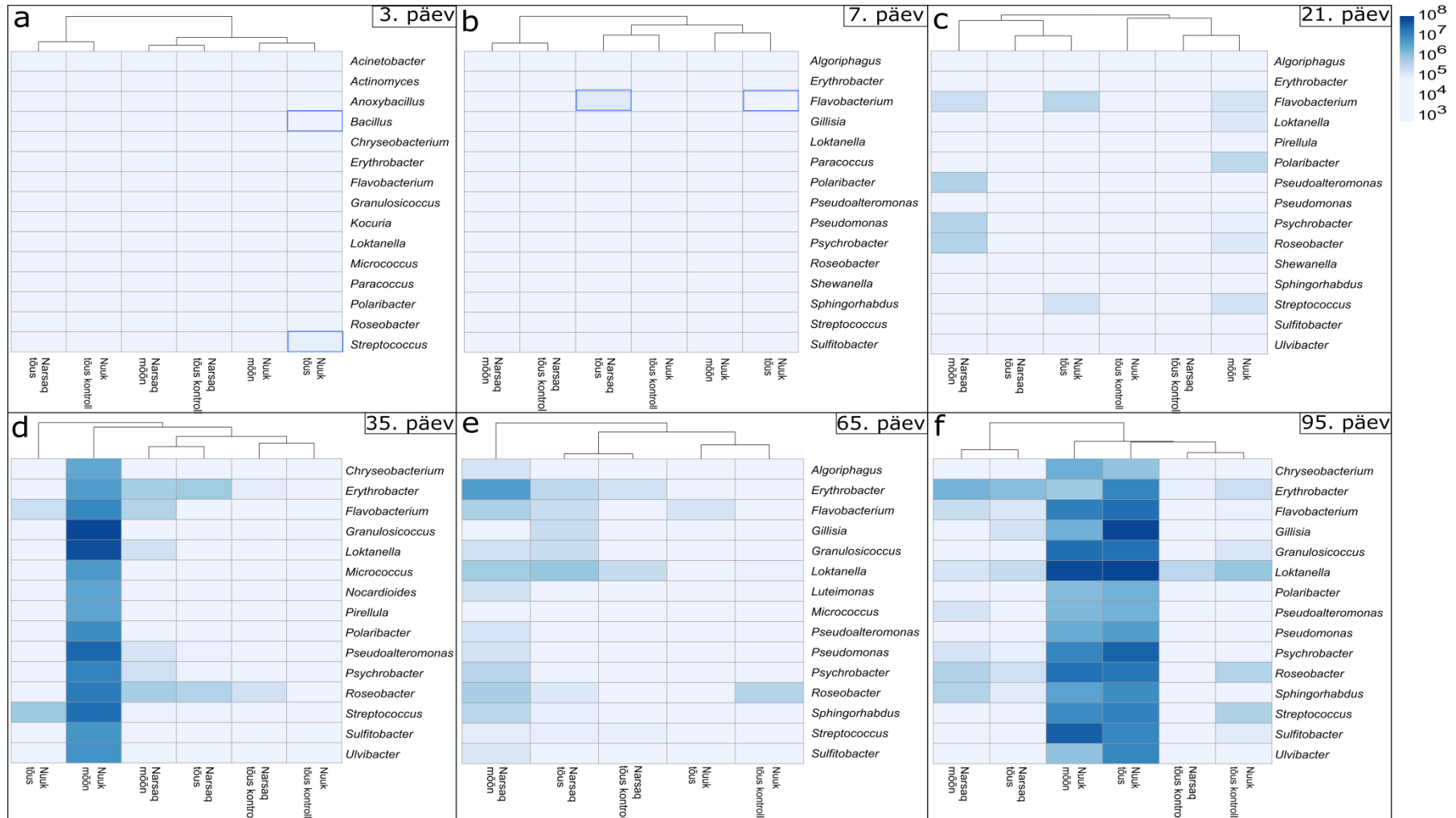
Narsaq'i mõõnapiiril toimus ühtlane, kuid kiirem tõus kuni 65. katsepäevani (hinnanguliselt kuni tasemeni 8×10^6 geenikoopiat/m²) ning edasi võis näha ligi kolmekordset arvukuse langust (joonis 10b). Samal ajal tõusupiiril oli arvukuse tõus esimesed 21 päeva väga aeglane, kuid 35. katsepäevaks oli toimunud hüpe ligi suurusjärgu võrra (joonis 10d). Edasi võis näha nõrka (1,3 kordset) suurenemist katseperioodi lõpuni, mil Narsaq'i tõusu- ja mõõnapiiri plaatide hinnangulised arvukused olid suhteliselt sarnased ($\sim 3 \times 10^6$ geenikoopiat/m²) ja ületasid ligi kolmekordselt kontrollplaatide vastavat arvukust. Statistiline analüüs leidis negatiivse seose järelejäänud kütuse koguse ja naftat lagundavate bakteriperekondade 16S rRNA geeni hinnangulise arvukuse vahel Narsaq'i mõõnapiiri plaatidel ($r = -0.80$; $p < 0.05$).

Katse esimese 21 päeva jooksul olid naftat lagundavate bakteriperekondade arvukused madalad kõikides proovides ning proovide selget klasterdumist katsealade või loodete kaupa

soojakaartidel ei olnud võimalik tuvastada (joonis 15a – 15c). Katse 35. päevaks grupeerusid kokku kontrollplaatide ning Narsaq'i laevakütusega töödeldud plaatide kooslused ning eristusid Nuuk'i töödeldud plaatide kooslustest (joonis 15d). Selleks ajaks oli Nuuk'i mõõnapiiril perekonna *Granulosicoccus* ja *Loktanella* arvukus tõusnud vastvalt $9,0 \times 10^8$ ja $7,2 \times 10^8$ geenikoopiat/m² tasemeni. Katse 65. päevaks klasterdusid kokku katseala tõusu ja kontrollproovid (joonis 15e), mis katse lõpuks eristusid mõlema katsekoha töödeldud plaatidest (joonis 15f).

Narsaq'i katsealal mõõna piiri kõige arvukamad bakteriperekonnad olid: *Algoriphagus*, *Flavobacterium*, *Erythrobacter*, *Granulosicoccus*, *Loktanella*, *Luteimonas*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Roseobacter*, *Sphingorhabdus*, *Streptococcus* ja *Sulfitobacter* (joonis 15d - 15f). Näiteks perekonna *Erythrobacter* hinnanguline arvukus 65. – 95. katsepäeval oli vahemikus $2,6 \times 10^7$ kuni $6,4 \times 10^7$ geenikoopiat/m² ning perekonna *Roseobacter* hinnanguline arvukus 21. – 35. katsepäeval oli vahemikus $2,1 \times 10^6$ kuni $7,5 \times 10^6$ geenikoopiat/m². Sama koha tõusupiiril oli kõige arvukamad enamasti samad perekonnad, välja arvatud *Algoriphagus* ja *Sulfitobacter*, ning tõusupiiril oli kõige arvukam perekond *Erythrobacter* (hinnanguline arvukus 65. – 95. katsepäeval oli vahemikus $4,2 \times 10^6$ kuni $1,7 \times 10^7$ geenikoopiat/m²).

Nii Nuuk'i mõõna- kui ka tõusupiiril paiknenud IFO 180-ga töödeldud kiviplaatide biokiles mõõdeti katse kõige kõrgemad naftat lagundavate bakterite hinnangulised arvukused. Mõõnapiiri plaatidel tuvastati 35. ja 95. katsepäeval kõik 38 naftat lagundavat perekonda (vt. tabel 3). Kõige arvukamad ($>10^8$ geenikoopiat/m²) perekonnad olid: *Flavobacterium*, *Granulosicoccus*, *Loktanella*, *Polaribacter*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Roseobacter*, *Streptococcus* ning *Sulfitobacter* (joonis 15). Tõusupiiril ületasid naftat lagundavate bakterite perekondade hinnangulised 16S rRNA geeni arvukused sama ala mõõnapiiri arvukusi. Katse 95. päeval tuvastati neis proovides 37 naftat lagundavat perekonda. Samas perekonna *Eremococcus* esindajaid selles katsekohas ei tuvastatud. Kõige arvukamad ($>10^9$ geenikoopiat/m²) perekonnad Nuuk'i tõusupiiri plaatidel olid: *Gillisia* (hinnanguline arvukus 95. katsepäeval oli $1,1 \times 10^9$ geenikoopiat/m²) ja *Loktanella* (hinnanguline arvukus 95. katsepäeval oli $1,3 \times 10^9$ geenikoopiat/m²) (joonis 15).



Joonis 15. Soojakaardid (*heatmap*), mis põhinevad naftat ja naftaprojekte lagundavate bakteriperekondade hinnangulisel arvukusel ja näitavad erinevates tingimustes asuvate laevakütusega IFO 180 kaetud kiviplaadide lagundajakoosluste sarnasusi katse 3., 7., 21., 35., 65. ja 95. päeval (vastavalt alajoonis a, b, c, d, e ja f). Skaala tähistab naftalagundajate hinnangulisi arvukusi (geenikoopiat/m²) uuritud proovides.

Mõlema katsekoha kontrollproovide naftalagundajate hinnangulised arvukused olid madalamad kui IFO 180-ga töödeldud kiviplaatide biokilest saadud naftat lagundavate bakterikoosluste hinnangulised arvukused, välja arvatud Nuuk'is 65. katsepäeval perekondade *Chryseobacterium*, *Erythrobacter Granulosicoccus*, *Loktanella*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Roseobacter*, *Streptococcus* ning Narsaq'is 95. katsepäeval *Loktanella* arvukused (joonis 15).

4. Arutelu

Käesolevas töös uuriti toornafta ja laevakütusega IFO 180 töödeldud Nuuk'i ja Narsaq'i katseala kividel kasvava biokile bakterikoosluse arvukust, struktuuri ning naftas leiduvate ühendite lagundamise potentsiaali Gröönimaa rannikul, kuna uuringud on näidanud, et mere ja rannikualade mikroobikooslused omavad tähtsat funktsiooni toornafta ja selle saadustes sisalduvate ühendite biolagundamise protsessis (Ismail & Dadrasnia, 2015; Prince & Bragg, 1997). Saadud tulemused näitavad, et külmas kliimas asuva mereranniku kividele kinnitunud nafta hulk sõltus ühendi omadustest – toornaftat, mis on tihedam ja viskoossem kui laevakütus (Muraza, 2015), oli esimesel päeval kiviplaatidele kinnitunud oluliselt vähem. Lisaks leiti, et kividele kinnitunud toornafta ja laevakütuse eemaldumise kiirus ja ajaline dünaamika sõltusid nafta liigist ja katsekoha tingimustest (tõusu- või mõõnapiir). Kivide asetus rannikul ja veerežiimi mõju olid näha nii toornafta kui laevakütuse puhul. Narsaq'is olid erinevused tõusu- ja mõõnapiiride vahel tunduvalt suuremad kui Nuuk'is.

Käesolevas töös hinnati nii bakterite üldarvukust kui naftalagundajate arvukusi bakterispetsiifilise 16S rRNA geeni arvukuste kaudu, mis on tänapäeval üheks enamlevinud mikroobide arvukuse määramise näitajaks (Prabakaran et al. 2006). Varasemad uuringud on näidanud, et külm kliima inhibeerib mikroorganismide aktiivsust (Mocali et al. 2017), ometi on avastatud palju bakterite perekondi, kes on võimelised naftaühendeid lagundama ka külmas merekeskkonnas (Vergeynst et al. 2018 (1)). Käesolevas uurimuses näitas kontrollplaatide biokile koosluse arvukuse ja struktuuri võrdlus toornafta ja IFO 180-ga töödeldud plaatide biokilega, et kuigi kahe katseala vahel oli üsna olulisi erinevusi, arenes Gröönimaa rannikul paiknevatel kividel 95 päeva jooksul mitmekesine bakterikooslus ning nafta ja kütuse olemasolu plaatidel mõjutas biokile arengut, koosseisu ja naftalagundamise potentsiaali mõlemal katsealal oluliselt. Rannikut perioodiliselt üleujutava ja mereranniku kivisid mõjutava merevee omadused mõjutavad bakterikoosluse struktuuri merevees. Nuuk'i katseala paiknes Gröönimaa suurima linna (ca 17500 elanikku) ja selle sadama läheduses; sealne rannikulähedane vesi võib olla toitainerikkam tänu merre suunatavale asula reoveele. Reovees leidub ohtralt toitaineid (eriti lämmastikku ja fosforit), mille puudus on sageli nafta ja selle produktide biolagundamisel oluliseks inhibiitoriks. Nuuk'i sadam asub sopilises lahes, mille sissepääs on suurema osa aastast kahanenud tekkiva jää ning mõõnaperioodide tõttu, mis vähendab avamere vee mõju lahele ja sadamapiirkonna rannikule. Lisaks toimub katseala läheduses paiknenud sadamas aktiivne laevaliiklus (sh väikelaevade ja suurte kaubalaevad liiklus) ning kütuse transport (Marine Traffic, 2020), mille tagajärjel vette sattunud naftaproduktid on ilmselt kujundanud nii vee kui ranniku

mikroobikooslust naftalagundajate arvukuse suurenemise suunas. Narsaq on aga pisut üle 1300 elanikuga väikelinn, mille rannik (sh. sadamapiirkond) on tunduvalt rohkem avamerest tuleva vee poolt mõjutatud ning inimtegevuse mõju on selles piirkonnas väiksem. Ühest varasemast uuringust selgus, et inimtegevuse mõju on suurendanud naftaühendite kontsentratsiooni merevees Arktika ja Antarktika piirkondades (Chaudhary et al. 2019), mistõttu oli sealne mikroobikooslus jõudnud kohaneda vastavate muutustega ning suurenenud oli naftalagundajate osakaal koosluses. Seda kinnitas ka Gröönimaa ranniku lähedal läbiviidud uuring (Vergeynst et al. 2018 (2)).

Naftalagundajate üldarvukus suurenes kõikides Gröönimaal uuritud katsevariantides katseperioodi jooksul ning kõikides proovides tuvastati arvukalt bakteriperekondi, mille esindajatel on kirjeldatud võimekust lagundada naftas sisalduvaid ühendeid. Mitmeid nendest (nt. *Pseudoaltermonas*, *Acinetobacter*, *Sulfitobacter*, *Chryseobacterium*, *Erythrobacter*, *Flavobacterium*, *Loktanella*, *Roseobacter*, *Ulvibacter*, *Shewanella*) on ka varasemalt polaarsetes ja lähispolaarsetes keskkondades kirjeldatud (Brakstad et al. 2017; Kumar et al. 2014; Gontikaki et al. 2018; Chaudhary et al. 2019; Giudice et al. 2010; Gerdes et al. 2004, Prabagara et al. 2006, Yakimov et al. 2004), kuid neid organisme on leitud ka soojema kliimaga piirkondadest. Näiteks *Loktanella* esindajaid Indoneesia sadamapiirkondadest (Berthe-Corti & Nachtkamp, 2010), *Flavobacterium* esindajaid Lõuna-Aafrika pinnasest (Mandri & Lin, 2007), *Erythrobacter* esinajaid Mehhiko lahest (Liu & Liu, 2013) ning perekonna *Roseobacter* esindajaid Mehhiko lahest pärast suurt naftareostust (Giebel et al. 2016). Kõige arvukamalt esines Gröönimaa kiviplaadidel perekondade *Erythrobacter*, *Flavobacterium*, *Loktanella* ja *Roseobacter* esindajaid.

Kiviplaatide biokile bakterite üldarvukuse ja naftalagundajate arvukuse muutus ja koosluse struktuuri suksessioon sõltus käesolevas uurimuses oluliselt veerežiimist plaatide asukohas, mis mõjutas ka toornafta ja laevakütuse kadu kiviplaatidelt. Toornaftat eemaldus katseperioodi jooksul oluliselt vähem Narsaq'i tõusupiiril ja laevakütust sama katseala mõõnapiiril võrreldes teiste katsekohtadega, kuid oluline seos IFO 180-e vähenemise ja naftalagundajate kogu arvukuse vahel leiti just Narsaq'i mõõnapiiril.

Nuuk'i tõusujoonel tõusis toornafta juuresolekul bakterite arvukus kiiresti kohe katse algul, mis näitab, et toornafta suur kogus ei pärssinud selles kohas bakterite kasvu. Bakterite arvukuse kasvu merevees toornafta juuresolekul on kirjeldanud ka Prabagaran et al. (2006). Laevakütusega plaatide puhul täheldati kiiret arvukuse kasvu Narsaq'i tõusupiiril. Ülejäänud katsekohtades oli IFO 180-ga plaatidel arvukuse tõus väga aeglane sõltuvalt kohast 21. või

65. katsepäevani ehkki vedela konsistentsi tõttu peaks laevakütuse komponendid olema bakteritele lihtsamini kättesaadavad (Alonso-Gutierrez et al. 2009).

Kuna toornafta ja laevakütus on segud, mis koosnevad põhiliselt erinevatest süsivesinikühenditest (Tissot & Welte, 1984), siis on nende lagundamine mitmeetapiline ja erinevates etappides osalevad ilmselt erinevad organismid. Kiire kütuse kadu, mida täheldati katse esimeste päevadel (toornafta puhul enamasti esimese seitsme päeva jooksul ja laevakütuse puhul esimese 21 päeva jooksul) olid bakterite üldarvukused ja naftalagundajate arvukused madalad kõikides kohtades, mis viitab sellele, et languse põhjuseks võib pidada sellel perioodil pigem füüsikalisi ja keemilisi protsesse. Kiirele langusele järgnenud aeglasem nafta- ja kütusekao periood kattub bakterite ja naftalagundajate arvu suurenemisega, mis lubab eeldada biolagundamist uuritud kiviplaatile sellel perioodil.

Naftalagundajate koosluse analüüsi tulemused näitasid, etlagundamise erinevatel etappidel olid eri kohtades olulised erinevad organismid ja see, millised organismid domineerisid teatud ajahetkel biokile lagundajate koosluses ning kui palju neid organisme sellel hetkel oli, sõltus nii reostuse tüübist kui vastava katsekoha omadustest (sh. veerežiimist). Näiteks toornaftaga plaatidel olid perekonna *Flavobacterium* esindajad arvukamad 21. päeval Nuuk'i tõesupiiril ja Narsaq'i mõõnapiiril 35. katsepäevast kuni katseperioodi lõpuni. Lisaks oli Narsaq'i mõõnapiiril alates 35. päevast arvukalt perekonna *Erythrobacter* esindajaid, mille arvukused teistel selle töötusega plaatidel olid väga väikesed.

Naftareostuse keskkonnasõbralikumaks likvideerimiseks on hakatud üha enam kasutama bioloogilisi puhastusmeetodeid (Doshi et al. 2018). Rannikualalt on reostuse ohjamiseks rakendatud biotervendamist nt. Hispaanias, kus torustiku lõhknemise tõttu valgus vette ning kandus rannikule üle 20 tonni naftat (Esquinas et al. 2017) ning peale suurõnnetust laevaga „Prestige“, kus muude puhasustehnikate madala efektiivsuse tõttu prooviti kasutada biotervendamise ja/või seiratava loodusliku tervenemise meetodit (Gallego et al. 2006). Külmemas kliimas on bioremediatsiooni juba edukalt rakendatud Alaskal 1989. a. toimunud *Exxon Valdezi* naftareostuse likvideerimisel (Prince & Bragg, 1997). Sellest võib järeldada, et bioloogiliste meetodite ja protsesside rakendamine reostunud rannikuala puhastamiseks saab kasutada edukalt nii soojas kui külmas keskkonnas. Käesoleva töö tulemused lubavad järeldada, et ka Gröönimaa kivisel rannikul on potentsiaali bioloogiliseks naftareostuse likvideerimiseks.

Edaspidistes uuringutes oleks vajalik selgitada kui pika aja jooksul kogu toornafta kiviplaatidelt eemaldatakse ning kui suur on toornaftas ja laevakütuses sisalduvate ühendite lagundamise potentsiaal Gröönimaa ranniku kivide biokiles kasutades vastavate ühendite lagundamise võtmeetappide ensüüme kodeerivate märklaudgeenide kvantifitseerimist ja metagenoomidel põhinevat katabolismiradade analüüsi.

Kokkuvõte

Keskkonna reostumine nafta ja selle saadustega on levinud probleem kogu maailmas. Kõige enam satub merekeskonda naftaühendeid nafta tootmise, transportimise, ladustamise, töötlemise või kasutamise käigus. Naftaühendite sattumine merevette ja rannikule põhjustab mitmesuguseid negatiivseid mõjusid nii inimese tervisele kui ka keskkonnale. Mereranniku puhastamismistoimingud on kulukad ning aeganõudvad, mistõttu naftalekke korral on tähtis likvideerida naftareostust juba veest ning mitte lasta sellele jõuda rannikule. Sellele vaatamata võib naftareostus siiski jõuda rannikule, mis eriti polaaraladel on haavatava ökosüsteemiga ning raskesti ligipääsetavad. Seetõttu on üha enam hakatud kasutama bioloogilisi ohjemeetodeid, mis on sellistes tingimustes odavad ja keskkonnasõbralikud.

Käesolevas töös hinnati seiratava loodusliku tervenemise potentsiaali Gröönimaa rannikul toornafta ja laevakütusega reostunud kivilid kasvava biokile bakterikoosluse arvukuse, struktuuri ning nafta ja naftasaaduste lagundamise potentsiaali kaudu. Eksperimentaalses uurimuses kasutati kiltkiviplaate, mis kaeti toornafta ja laevakütusega (IFO 180) ning paigaldati Gröönimaa rannikule Nuuk'i ja Narsaq'i linna lähedale maksimaalse tõusu- ja mõõnapiirile. Katse kestis 95 päeva ja selle aja jooksul võeti kuus korda igast katsekohast üles 2 mõlema töötusega plaati keemilisteks ja 2 plaati mikrobioloogilisteks analüüsideks. Ülesvõetud plaatidel määrati järelejäänud nafta ja kütuse kogused. Mikrobioloogiliste analüüside jaoks võetud plaatidelt eemaldati esmalt biokile ning sellest kogu DNA. Bakterite arvukusi kiviplaatide biokiles hinnati 16S rRNA geenide arvukuste alusel. Lisaks analüüsiti kogu bakterikoosluse ja naftat lagundavate bakterite koosluse struktuuri bakterispetsiifiliste 16S rRNA geenide järjestuste primaarstruktuuri alusel ja naftat lagundavate bakteriperekondade arvukusi kiviplaatidel hinnanguliste arvukuste alusel.

Töö käigus saadud tulemused näitasid, et Gröönimaa ranniku kivilid kasvava biokile bakterikooslusel on potentsiaali lagundada toornaftat ja laevakütust IFO 180 just nende materjalide lagundamise teises (aeglasemas) etapis. Nii toornafta kui laevakütuse lagundamise potentsiaali mõjutasid oluliselt keskkonnatingimused ja kiviplaatide asukoht rannikul (veerežiim). Nuuk'i katsealal (nii mõõna- kui tõusupiiril) oli IFO 180-ga töödeldud plaatidel oluliselt (kaks suurusjärku) suurem nii kogu bakterite kui ka naftat lagundavate bakterite arvukus. Statistiline analüüs tõi välja olulise seose laevakütuse kao ja naftalagundajaid sisaldavate bakteriperekondade 16S rRNA geeni arvukusega Narsaq'i katseala mõõnapiirkonnas. Tuvastatud naftalagundajatest olid domineerivamad perekondade *Erythrobacter*, *Flavobacterium*, *Loktanella*, *Roseobacter* esindajad, keda on ka varem leitud

polaaraladel naftaga reostunud piirkondadest, kuid nende perekondade osakaal koosluses ja arvukus plaadil sõltus oluliselt töötlustest ja plaadi asukohast ning erines katsekohtade ja töötluste vahel erinevatel katse päevadel.

Tulemuste põhjal saab järeldada, et Gröönimaa rannikul on potentsiaali looduslikuks tervenemiseks, kuna sealse keskkonnas on mitmed bakteriperekondade esindajad võimelised naftaühendeid lagundama. Lagundamise potentsiaal sõltub oluliselt reostuse tüübist ja keskkonnatingimustest, ennekõike veerežiimist (tõus ja mõõn) ja toitainete olemasolust ning bakterikoosluse kohastumusest vastavate ainete lagundamiseks. Kuna mikroorganismidel on võtmeroll naftaühendite biolagunemise protsessis, siis teadmised sellest, mis tingimustes ja millised bakterikooslused lagundavad naftat ja selle saaduseid, on vajalikud. Need teadmised aitavad naftareostuse korral valida optimaalset puhastusmeetodit ning seeläbi vähendada negatiivset mõju mere- ja rannikeskkonnale.

Potential of monitored natural attenuation to eliminate oil pollution from the Greenland's coast

Edith Simoniš

Summary

The anthropogenic release of crude oil and its' products has become a worldwide cause of concern. Oil pollution is often a result of oil and gas exploration and production, transportation and storage. Such contamination poses an important issue that requires extensive environmental research due to oil compounds potentially hazardous effects on living organisms. It has been widely discussed that polycyclic aromatic compounds could be toxic, carcinogenic and mutagenic to many living organisms and lead to numerous severe health problems. Besides, oil compounds are known to be very stable in the environment, and even more so in a cold climate, which increases the risk of contaminants becoming into contact with living beings. Seacoast clean-up operations are expensive and time-consuming therefore in the event of an oil spill it is important to eliminate oil pollution straight from the water and not to allow it to reach the coast. Despite seawater cleaning efforts oil pollution could reach vulnerable and hardly accessible coasts in arctic areas. As a result, biological clean-up methods, such as monitored natural attenuation, are increasingly being used since they are effective and environmentally friendly. As microorganisms drive the biodegradation of oil compounds, knowledge about conditions and bacterial communities will help to choose the optimal clean-up method in the event of an oil spill and thus reduce the negative impact on the marine and coastal ecosystems.

This study aimed to evaluate the potential of monitored natural attenuation through the estimation of abundance, structure and oil degradation potential of the bacterial community of the biofilm on slate slabs contaminated with crude oil and fuel oil to eliminate oil pollution from Greenland's coast. The experimental study was conducted in Greenland near settlements Nuuk and Narsaq with crude oil and fuel oil IFO 180. Slate slabs with IFO 180 and crude oil were placed in the maximum high tide and maximum low tide area of the coast. The experiment lasted for 95 days, during which samples were taken from both test sites six times – each time 2 slabs for chemical analysis and 2 slabs for microbiological analysis. Bacterial abundance in the biofilm of slate slabs was assessed based on the quantified number of 16S rRNA genes. The total bacterial community and the structure of

the oil-degrading bacterial community were analyzed based on the primary structure of the bacterial-specific 16S rRNA gene sequences.

The major results of this study were the following:

1. Biofilm forming bacterial community on the slate slabs of Greenland's coast has the potential to degrade crude oil and fuel oil IFO 180.
2. Bacterial community potential to degrade both oil types was significantly affected by environmental conditions (location, tide) as well as oil type:
 - a. IFO 180 treated slabs from Nuuk (both at low and high tide) had significantly higher numbers of total bacteria and hydrocarbon-degrading bacteria;
 - b. statistical analysis indicated a significant association between the loss of fuel oil IFO 180 and the abundance of the 16S rRNA gene count of a bacterial genus containing oil-degrading bacteria in low tide conditions on Narsaq coast.
3. Most abundant known oil-degrading bacteria were from genus *Erythrobacter*, *Flavobacterium*, *Laktonella* and *Roseobacter*. However, abundances varied significantly between treatments and experiment sites.

From the obtained results can be concluded that there was a potential for the natural attenuation on the Greenland coast since many members of the biofilm bacterial community formed on rocky coast have the potential to degrade various compounds of crude oil and fuel oil IFO 180. The potential, however, depended on pollution type and environmental conditions.

Tänuavaldused

Antud magistritöö autor avaldab suurt tänu juhendajatele Marika Truule, Hiie Nõlvakule ja Angela Peebule suure pühendumise ja igakülgse abistamise eest. Tänu kuuluvad ka prof. Jaak Truule, Kertu Tiirikule, ja Kristjan Oopkaupale.

Täna kõiki katses osalenud teadlasi Aahrus Ülikooli Taani keskkonna ja energia keskusest, eriti dr. Kim Gustavsoni ja dr. Susse Wegebergi.

Käesoleva magistritöö on valminud Horisont 2020 projekti GRACE ja Eesti Teadusagentuuri rühmagranti (PRG548) toel.

Kasutatud kirjandus

1. Ahmed, R.Z., Ahmed, N., Gadd, G.M., (2010). Isolation of two *Kocuria* species capable of growing on various polycyclic aromatic hydrocarbons. *African Journal of Biotechnology*, 9(24), 3611-3617.
2. Al-Hawash, A.B., Zhang, X., Ma, F., (2018). Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1. *Microbiology Open*, available online 25 March 2018.
3. Al-Kindi, S., Abed, R.M.M., (2016). Comparing Oil Degradation Efficiency and Bacterial Communities in Contaminated Soils Subjected to Biostimulation Using Different Organic Wastes. *Water Air and Soil Pollution*, 227, article 36.
4. Alonso-Gutierrez, J., Figueras, A., Albaiges, J., Jimenez, N., Vinas, M., Solanas, A.M., Novoa, B., (2009). Bacterial Communities from Shoreline Environments (Costa da Morte, Northwestern Spain) Affected by the Prestige Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 3407-3418.
5. Antoniou, E., Fodelianakis, S., Korkakaki, E., Kalogerakis, N., (2015). Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. *Frontiers in Microbiology*, 6, article 274.
6. Bayramov, E., Knee, K., Kada, M., Buchroithner, M., (2018). Using multiple satellite observations to quantitatively assess and model oil pollution and predict risks and consequences to shoreline from oil platforms in the Caspian Sea. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 24(6), 1501-1514.
7. Berthe-Corti, L., Nachtkamp, M., (2010). Bacterial Communities in Hydrocarbon-Contaminated Marine Coastal Environments. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 2350-2357.
8. Blessing, M., Saada, A., Colombano, S., Hellal, J., Crampon, M., (2018). Monitored natural attenuation of a complex mixture of organochlorines using compound-specific isotope analysis. *HAL archives-ouvertes*, hal-01854144.
9. Bonte, M., Gundlach, E.R., Iroakasi, O., Visigah, K., Giadom, F., Shekwolo, P., Nwabueze, V., Cowing, M., Zabbey, N., (2020). Comparison of chemical sediment analyses and field oiling observations from the Shoreline Cleanup Assessment Technique (SCAT) in heavily oiled areas of former mangrove in Bodo, eastern Niger Delta. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, 53, 19-30.

10. Boontawan, A., Boontawan, P., (2011). Isolation and characterization of *Jatropha* oildegradation by *Enterococcus faecalis* and *Burkholderia cenocepacia* W-1 under anaerobic condition. *African Journal of Biotechnology*, 10(63), 13841-13851.
11. Brakstad, O.G., Lewis, A., Beegle-Krause, C.J., (2018). A critical review of marine snow in the context of oil spills and oil spill dispersant treatment with focus on the Deepwater Horizon oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 346-356.
12. Brakstad, O.G., Lofthus, S., Ribicic, D., Netzer, R., (2017). Biodegradation of Petroleum Oil in Cold Marine Environments. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology, Second edition*, 613-644.
13. Brown, J., Pirrung, M., McCue, L.A., (2017). FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*, 33(19), 3137-3139.
14. Bullock, R.J., Perkins, R.A., Aggarwal, S., (2019). In-situ burning with chemical herders for Arctic oil spill response: Meta-analysis and review. *Science of the Total Environment*, 675, 705-716.
15. Cappello, S., Genovese, M., Torre, C.D., Crisari, A., Hassanshahian, M., Santisi, S., Calogero, R., Yakimov, M.M., (2012). Effect of bioemulsificant exopolysaccharide (EPS₂₀₀₃) on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: A microcosm study. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 2820-2828.
16. Chang, S., Zhang, G., Chen, X., Long, H., Wang, Y., Chen, T., Liu, G., (2017). The complete genome sequence of the cold adapted crude-oil degrader: *Pedobacter steynii* DX4. *Standards in Genomic Sciences*, 12, article 45.
17. Chaudhary, D.K., Kim, D.U., Kim, D., Kim, J., (2019). *Flavobacterium petrolei* sp. nov., a novel psychrophilic, dieseldegrading bacterium isolated from oil-contaminated Arctic soil. *Scientific Reports*, 9(1), 4143.
18. Chen, J., Zhang, W., Wan, Z., Li, S., Huang, T., Fei, Y., (2019). Oil spills from global tankers: Status review and future governance. *Journal of Cleaner Production*, 227, 20-32.
19. Chen, Q., Li, J., Liu, M., Sun, H., Bao, M., (2017). Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. *Plos one*, 12(3), e0174445.
20. Dethlefsen, L., Huse, S., Sorgin, M., & Relman, D., (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLOS Biology*, 6, article 280.

21. Doshi, B., Sillanpää, M., Kalliola, S., (2018). A review of bio-based materials for oil spill treatment. *Water Research*, 135, 262-277.
22. Eesti Teaduste Akadeemia Looduskaitse Komisjon, (2002). Jäätmed ja loodushoid. *Teaduste Akadeemia Kirjastus*, ISBN: 9985-50-344-9.
23. Esquinas, N., Rodriguez-Valdes, E., Marquez, G., Gallego, J.L.R., (2017). Diagnostic ratios for the rapid evaluation of natural attenuation of heavy fuel oil pollution along shores. *Chemosphere*, 184, 1089-1098.
24. Ferguson, D.K., Li, C., Jiang, C., Chakraborty, A., Grasby, S.E., Hubert, C.R.J., (2020). Natural attenuation of spilled crude oil by cold-adapted soil bacterial communities at a decommissioned High Arctic oil well site. *Science of the Total Environment*, 722, 137258.
25. French-McCay, D., Crowley, D., McStay, L., (2019). Sensitivity of model oil fate and exposure from a subsea blowout to oil droplet sizes, depth, dispersant use, and degradation rates. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 779-793.
26. Gallego, J.R., Gonzalez-Rojas, E., Pelaez, A.I., Sanchez, J., Garcia-Martinez, M.J., Ortiz, J.E., Torres, T., Llamas, J.F., (2006). Natural attenuation and bioremediation of *Prestige* fuel oil along the Atlantic coast of Galicia (Spain). *Organic Geochemistry*, 37, 1869-1884.
27. Gerdes, B., Brinkmeyer, R., Dieckmann, G., Helmke, E., (2005). Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice. *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 129-139.
28. Giebel, H.A., Klotz, F., Voget, S., Poehlein, A., Grosser, K., Teske, A., Brinkhoff, T., (2016). Draft genome sequence of the marine *Rhodobacteraceae* strain O3.65, cultivated from oil-polluted seawater of the Deepwater Horizon oil spill. *Standards in Genomic Sciences*, 11, article 81.
29. Giudice, A.L., Bruni, V., Domenico, M.D., Michaud, L., (2010). *Psychrophiles - Cold-Adapted Hydrocarbon-Degrading Microorganisms*. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1897-1921.
30. Glöckner, F.O., Kube, M., Bauer, M., Teeling, H., Lombardot, T., Ludwig, W., Gade, D., Beck, A., Borzym, K., Heitmann, K., Rabus, R., Schlesner, H., Amann, R., Reinhardt, R., (2003). Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8298-8303.

31. Gontikaki, E., Potts, L.D., Anderson, J.A., Witte, U., (2018). Hydrocarbon-degrading bacteria in deep-water subarctic sediments (Faroe-Shetland Channel). *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 1040-1053.
32. Gordon, D., (2012). Understanding Unconventional Oil. *Carnegie Endowment for International Peace, Washington, D.C. 20036*.
33. Gruiz, K., Meggyes, T., Fenyvesi, E., (2019). Risk Reduction Technologies and Case Studies. First Edition. *Taylor & Francis Group, London, UK* , ISBN: 9781315778754.
34. Guibert, L.M., Loviso, C.L., Marcos, M.S., Commendatore, M.G., Dionisi, H.M., Lozada, M., (2012). Alkane Biodegradation Genes from Chronically Polluted Subantarctic Coastal Sediments and Their Shifts in Response to Oil Exposure. *International Society for Microbial Ecology*, 64, 605-616.
35. Gustavson, K., Wegeberg, S., (2018). Report on natural removal of stranded oil in Arctic climatic regimes.
36. Guo, K., Li, H., Yu, Z., (2016). *In-situ* heavy and extra-heavy oil recovery: A review. *Fuel*, 185, 886-902.
37. Gutierrez, T., Berry, D., Teske, A., Aitken, M.D., (2016). Enrichment of *Fusobacteria* in Sea Surface Oil Slicks from the Deepwater Horizon Oil Spill. *Microorganism*, 4(3), 24.
38. Ismail, S., Dadrasnia, A., (2015). Biotechnological Potential of *Bacillus salmalaya* 139SI: A Novel Strain for Remediating Water Polluted with Crude Oil Waste. *Plos One*, 10(4), e0120931.
39. Izmalkova, T.Y., Gafarov, A.B., Sazonova, O.I., Sokolov, S.L., Kosheleva, I.A., Boronin, A.M., (2018). Diversity of Oil-Degrading Microorganisms in the Gulf of Finland (Baltic Sea) in Spring and in Summer. *Microbiology*, 87(2), 261-271.
40. Jahan, R., Bodratti, A.M., Tsianou, M., Alexandridis, P., (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advance in Colloid and Interface Science*, 275, 102061.
41. Jimoh, A.A., Lin, J., (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184, 109607.
42. Jurelevicius, D., Alvarez, V.M., Marques, J.M., Lima, L.R.F.S., Dias, F.A., Seldin, L., (2013). Bacterial Community Response to Petroleum Hydrocarbon Amendments in Freshwater, Marine, and Hypersaline Water-Containing Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 19, 5927-5935.

43. Khan, J.A., Singh, S., (2011). Evaluation of oil degradation potential of *Micrococcus* varians. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(4), 75-79.
44. Kriipsalu, M., Maastik, A., Truu, J., (2016). Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamise. Tallinn: TTÜ Kirjastus, ISBN: 978-9949-23-847-7.
45. Kumar, A.G., Vijayakumar, L., Joshi, G., Peter, D.M., Dharani, G., Kirubakaran, R., (2014). Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. *Bioresource Technology*, 170, 556-564.
46. Kumari, B., Singh, S.N., Singh, D.P., (2012). Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation. *Process Biochemistry*, 47, 2463-2471.
47. Kvenvolden, K.A., Cooper, C.K., (2003). Natural seepage of crude oil into the marine environment. *Geo-Marine Letters*, 23(3), 140-146.
48. Kwon, K., Kwon, Y.M., Kim, S.J., (2019). Aerobic Hydrocarbon – Degrading *Bacteroidetes*. *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*, 73-91.
49. Lalevic, B., Raicevic, V., Atanaskovic, I., Kikovic, D., Talaiekhosani, A., Hamidovic, S., Gkorezis, P., (2014). Biodegradation of Crude Oil by *Kocuria* sp.. *Journal of Environmental Treatment Techniques*, 2(3), 99-101.
50. Li, C., Huang, W., Zhou, C., Chen, Y., (2019). Advances on the transition-metal based catalysts for aquathermolysis upgrading of heavy crude oil. *Fuel*, 257, 115779.
51. Li, P., Cai, Q., Lin, W., Chen, B., Zhang, B., (2016). Offshore oil spill response practices and emerging challenges. *Marine Pollution Bulletin*, 110, 6-27.
52. Lin, Q., Mendelssohn, I.A., Graham, S.A., Hiu, A., Fleeger, J.W., Deis, D.R., (2016). Response of salt marshes to oiling from the Deepwater Horizon spill: Implications for plant growth, soil surface-erosion, and shoreline stability. *Science of the Total Environment*, 557-558, 369-377.
53. Liu, Z., Liu, J., (2013). Evaluating bacterial community structures in oil collected from the sea surface and sediment in the northern Gulf of Mexico after the *Deepwater Horizon* oil spill. *Microbiology Open*, 2(3), 492-504.
54. 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.
55. Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., Naidu, R., (2018). Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of

- environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 175-193.
56. Mandri, T., Lin, J., (2007). Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6(1), 23-27.
 57. Mapelli, F., Scoma, A., Michoud, G., Aulenta, F., Boon, N., Borin, S., Kalogerakis, N., Daffonchio, D., (2017). Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 35(9), 860-870.
 58. Marine Traffic, (2020), viimati vaadatud 30.04.2020. <https://www.marinetraffic.com/en/ais/details/ports/205>
 59. Mazzeo, D.E.C., Fernandes, T.C.C., Marin-Morales, M.A., (2016). Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. *Chemosphere*, 163, 508-515.
 60. Metsalu, T., Vilo, J., (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*, 43, 566-570.
 61. Meyer, R.F., Attanasi, E., (2004). Chapter 4 – Natural Bitumen and Extra-Heavy Oil. *Survey of Energy Resources*, 12, 93-117.
 62. Mishra, S., Sarma, P.M., Lal, B., (2004). Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosm. *FEMS Microbiology Letters*, 235, 323-331.
 63. Mocali, S., Chiellini, C., Fabiani, A., Decuzzi, S., Pascale, D., Parrilli, E., Tutini, M.L., Perrin, E. Bosi, E., Fondi, M., Giudice, A.L., Fani, R., (2017). Ecology of cold environments: new insights of bacterial metabolic adaptation through an integrated genomic-phenomic approach. *Scientific Reports*, 7, article 839.
 64. 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*.
 65. Mulligan, C.N., Yong, R.N., (2004). Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International*, 30, 587-601.
 66. Muraza, O., (2015). Hydrous pyrolysis of heavy oil using solid acid minerals for viscosity reduction. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 114, 1-10.
 67. Muthukamalam, S., Sivagangavathi, S., Dhrishya, D., Rani, S.S., (2017). Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 637-647.

68. National Research Council, (1985). Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects. *The National Academies Press*, ISBN: 978-0-309-03479-1.
69. National Research Council, (2003). Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. *The National Academies Press*, ISBN: 0-309-50551-8.
70. National Research Council, (2014). Responding to Oil Spills in the U.S. Arctic Marine Environment. *National Academies Press*, ISBN: 978-0-309-29886-5.
71. National Research Council, (2019). The Use on Dispersants in Marine Oil Spill Response. *National Academies Press*, ISBN: 978-0-309-47818-2.
72. Nissanka, I.D., Yapa, P.D., (2018). Calculation of oil droplet size distribution in ocean oil spills: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 723-734.
73. Novakovic, M., Ramadan, M.M.A., Knudsen, T.Š., Antic, M., Beškoski, V., Gojgic-Cvijovic, G., Vrvic, M.M., Jovancicevic, B., (2012). Degradation of methylphenanthrene isomers during bioremediation of soil contaminated by residual fuel oil. *Environmental Chemistry Letters*, 10(3), 287-294.
74. Nõlvak, H., Sildvee, T., Kriipsalu, M., Truu, J., (2012). Application of microbial community profiling and functional gene detection for assessment of natural attenuation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. *Boreal Environment Research*, 17, 113-127.
75. Olowomofe, T.O., Oluyeye, J.O., Aderiye, B.I., Oluwole, O.A., (2019). Degradation of poly aromatic fractions of crude oil and detection of catabolic genes in hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Agbabu bitumen sediments in Ondo State. *AIMS Microbiology*, 5(4), 308-323.
76. Ossai, I.C., Ahmed, A., Hassan, A., (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100526.
77. Parada, A.E., Needham, D.M., Fuhrman, J.A., (2015). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403-1414.
78. Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L.L., Rahman, P.K.S.M., Murugan, K., Rajasekar, A., (2017). Biosurfactant and Degradative Enzymes Mediated Crude Oil Degradation by Bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Frontiers in Microbiology*, 8, article 193.
79. Prabakaran, S.R., Manorama, R., Delille, D., Shivaji, S., (2006). Predominance of *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Glaciecola* and *Psychrobacter* in seawater collected off Ushuaia, Argentina, Sub-Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(2), 342-355.

80. Prabowo, A.R., Bae, D.M., (2019). Environmental risk of maritime territory subjected to accidental phenomena: Correlation of oil spill and ship grounding in the Exxon Valdez's case. *Results in Engineering*, 4, 100035.
81. Prince, R.C., Bragg, J.R., (1997). Shoreline Bioremediation Following the *Exxon Valdez* Oil Spill in Alaska. *Bioremediation Journal*, 1(2), 97-104.
82. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, 590-596.
83. Ramirez, D., Vega-Alvarado, L., Taboada, B., Estradas-Romero, A., Soto, L., Juarez, K., (2020). Bacterial diversity in surface sediments from the continental shelf and slope of the North West gulf of Mexico and the presence of hydrocarbon degrading bacteria. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110590.
84. Rognes, T., Flouri, R., Nichols, B., Quince, C., Mahe, F., (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, article 2584.
85. 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), 45-45.
86. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 5537-5548.
87. Sama, S.G., Barrere-Mangote, C., Bouyssiere, B., Giusti, P., Lobinski, R., (2018). Recent trends in element speciation analysis of crude oils and heavy petroleum fractions. *Trends in Analytical Chemistry*, 104, 69-76.
88. Schippers, A., Schumann, P., Spröer, C., (2005). *Nocardioides oleivorans* sp. nov., a novel crude-oil-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1501-1504.
89. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Horn, D.J., Weber, C.F., (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537-7541.

90. Scow, K.M., Hicks, K.A., (2005). Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3), 246-253.
91. Sivagangavathi, S., Dhrishya, D., Rani, S.S., (2017). Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 637-647.
92. Statista, (2019), vaadatud 20.03.2020. <https://www.statista.com/statistics/264013/transport-volume-of-crude-oil-in-seaborne-trade/#statisticContainer>
93. Syakti, A.D., Lestari, P., Simanora, S., Sari, L.K., Lestari, F., Idris, F., Agustyadi, T., Akhlus, S., Hidayati, N.V., (2019). Culturable hydrocarbonoclastic marine bacterial isolates from Indonesian seawater in the Lombok Strait and Indian Ocean. *Heliyon*, 5(5), e01594.
94. Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A., (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614-620.
95. Zhu, L., Zhao, X., Lai, L., Wang, J., Jiang, L., Ding, J., Liu, N., Yu, Y., Li, J., Xiao, N., Zheng, Y., Rimmington, G.M., (2013). Soil TPH Concentration Estimation Using Vegetation Indices in an Oil Polluted Area of Eastern China. *Plos One*, 8(1), e54028.
96. Tissot, B.P, Welte, D.H., (1984). Petroleum formation and occurrence. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
97. The International Tanker Owners Pollution Federation, (2014). Cleanup of Oil From Shorelines. *Technical Information Paper 7*.
98. The International Tanker Owners Pollution Federation, (2019), vaadatud 10.01.2020. <http://www.itopf.org/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>
99. Tyagi, M., Fonseca, M.M.R., Carvalho, C.C.C.R., (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22, 231-241.
100. Uisk, C., (2018). Naftareostuse mõju rannikule ja ranniku puhastamise meetodid. *Bakalaureusetöö. Tartu Ülikool*.
101. Uribe-Flores, M.M., Cerqueda-Garcia, D., Hernandez-Nunez, E., Cadena, S., Garcia-Cruz, N.U., Trejo-Hernandez, M.R., Aguirre-Macedo, M.L., Garcia-Maldonado, J.Q., (2019). Bacterial succession and co-occurrence patterns of an enriched marine microbial community during light crude oil degradation in a batch reactor. *Journal Applied Microbiology*, 127(4), 495-507.

102. Vergeynst, L., Kjeldsen, K.U., Lassen, P., Rysgaard, S., (2018) (1). Bacterial community succession and degradation patterns of hydrocarbons in seawater at low temperature. *Journal of Hazardous Materials*, 353, 127-134.
103. Vergeynst, L., Wegeberg, S., Aamand, J., Lassen, P., Gosewinkel, U., Fritt-Rasmussen, J., Gustavson, K., Mosbech, A., (2018) (2). Biodegradation of marine oil spills in the Arctic with a Greenland perspective. *Science of the Total Environment*, 626, 1243-1258.
104. Vila, J., Tauler, M., Grifoll, M., (2015). Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 95-102.
105. Wang, J., Wang, J., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, B., Zhang, Z., Zhang, G., (2015). Cold-adapted bacteria for bioremediation of crude oil-contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(8), 2286-2297.
106. Wang, M., Deng, B., Fu, X., Sun, H., Xu, Z., (2019). Characterizations of microbial diversity and machine oil degrading microbes in machine oil contaminated soil. *Environmental Pollution*, 255, 113190.
107. Wang, W., Zhong, R., Shan, D., Shao, Z., (2014). Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow sea, China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 7253-7269.
108. Wang, W., Wang, L., Shao, Z., (2010). Diversity and Abundance of Oil-Degrading Bacteria and Alkane Hydroxylase (*alkB*) Genes in the Subtropical Seawater of Xiamen Island. *International Society of Microbial Ecology*, 60, 429-439.
109. Xia, W., Dong, H., Zheng, C., Cui, Q., He, P., Tang, Y., (2015). Hydrocarbon degradation by a newly isolated thermophilic *Anoxybacillus* sp. with bioemulsifier production and new *alkB* genes. *RSC Advances*, 5, 102367.
110. Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L., Wu, Y., (2015). Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. *Current Microbiology*, 71(2), 220-228.
111. Yakimov, M.M., Gentile, G., Bruni, V., Cappello, S., Auria, G.D., Golyshin, P.N., Giuliano, L., (2004). Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 419-432.
112. Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 257-266.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Edith Simoniš

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

„Seiratava loodusliku tervenemise potentsiaali hindamine likvideerimaks naftareostust Gröönimaa rannikul“

mille juhendajateks on Marika Truu, Hiie Nõlvak ja Angela Peeb

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, 30.05.2020

Lisad

Lisa 1. Kiviplaatile biokile bakterite 16S rRNA geeni arvukused (keskmised ja standardhälbed, n=2) katsepäevade kaupa.

Katse - päev	Bakterite 16S rRNA geeni arvukus (geenikoopiat/m ²)									
	Toornafta				Laevakütus				Kontroll	
	Mõõn		Tõus		Mõõn		Tõus		Tõus	
	Nuuk	Narsaq	Nuuk	Narsaq	Nuuk	Narsaq	Nuuk	Narsaq	Nuuk	Narsaq
3	1,7×10 ⁵ (±2,7×10 ⁴)	2,0×10 ⁶ (±1,7×10 ⁶)	1,8×10 ⁶ (±8,4×10 ⁵)	3,6×10 ⁶ (±2,7×10 ⁶)	<1,0×10 ⁴	1,0×10 ⁶ (±4,4×10 ⁴)	3,2×10 ⁶ (±9,0×10 ⁵)	1,1×10 ⁶ (±9,4×10 ⁵)	4,3×10 ⁵ (±2,2×10 ⁵)	5,8×10 ⁵ (±3,1×10 ⁵)
7	1,1×10 ⁵ (±2,7×10 ⁴)	1,5×10 ⁶ (±1,2×10 ⁶)	1,1×10 ⁷ (±2,6×10 ⁶)	2,1×10 ⁶ (±1,0×10 ⁶)	9,8×10 ⁵ (±7,0×10 ⁴)	2,0×10 ⁶ (±3,5×10 ⁵)	2,6×10 ⁶ (±7,5×10 ⁵)	1,3×10 ⁶ (±1,1×10 ⁵)	4,9×10 ⁵ (±3,6×10 ⁵)	1,6×10 ⁶ (±1,8×10 ⁶)
21	2,1×10 ⁵	4,0×10 ⁶ (±1,7×10 ⁶)	1,3×10 ⁷	2,8×10 ⁶ (±2,6×10 ⁵)	1,2×10 ⁷ (±1,7×10 ⁷)	8,0×10 ⁶	1,2×10 ⁷ (±1,6×10 ⁷)	1,5×10 ⁶ (±1,3×10 ⁶)	6,3×10 ⁵	9,0×10 ⁵ (±8,7×10 ⁵)
35	1,5×10 ⁶ (±2,8×10 ⁵)	2,7×10 ⁷	1,5×10 ⁷ (±1,5×10 ⁷)	3,9×10 ⁶	1,9×10 ⁹ (±2,7×10 ⁹)	1,7×10 ⁷	9,3×10 ⁶ (±8,6×10 ⁶)	1,5×10 ⁷ (±1,2×10 ⁷)	3,6×10 ⁵ (±1,3×10 ⁵)	2,4×10 ⁶ (±1,8×10 ⁶)
65	2,5×10 ⁶ (±2,3×10 ⁴)	4,6×10 ⁷ (±3,7×10 ⁷)	1,1×10 ⁷ (±1,3×10 ⁵)	6,7×10 ⁶	-	4,1×10 ⁷ (±1,9×10 ⁷)	4,3×10 ⁶ (±6,2×10 ⁵)	1,7×10 ⁷	2,9×10 ⁶ (±1,6×10 ⁶)	4,2×10 ⁶ (±3,2×10 ⁶)
95	8,5×10 ⁶ (±3,6×10 ⁶)	3,4×10 ⁷	3,8×10 ⁶ (±3,7×10 ⁵)	1,0×10 ⁷ (±6,6×10 ⁶)	1,5×10 ⁹ (±1,7×10 ⁹)	2,1×10 ⁷ (±1,3×10 ⁷)	1,7×10 ⁹ (±9,2×10 ⁸)	1,9×10 ⁷ (±2,2×10 ⁷)	2,2×10 ⁷ (±2,1×10 ⁷)	5,5×10 ⁶ (±5,4×10 ⁶)

- tähistab proovi, mille arvukus tehnilistel põhjustel on andmestikust välja jäetud