

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Ökoloogia ja maateaduste instituut
Geograafia osakond

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogias
12 EAP

**SÜNTEETILISTE HÕBEDA NANOOSAKESTE MÕJU
INTEGRONIDE SISALDUSELE NÕO EKSPERIMENTAALSE
PINNASFILTERSÜSTEEMI VERTIKAALFILTRIS**

Merilin Hoomatalo

Juhendaja: Kärt Kanger, MSc (Tartu Ülikool)

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

Osakonna juhataja:

Tartu 2016

Süntetiliste hõbeda nanoosakeste mõju integronide sisaldusele Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltris

Käesolevas bakalaureusetöös hinnati integroni integraasi geenide *intI1*, *intI2* ja *intI3* sisaldust Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sissevoolus, väljavoolus ning filtermaterjalis. Töö eesmärk oli uurida süntetiliste hõbeda nanoosakeste mõju antud geenide absoluutarvukusele ja osakaalule bakterikoosluses, kasutades võrdlusena hõbenitraadiga töödeldud (AgNO_3) ja töötlemata vertikaalfiltreid. Vee- ja filtermaterjali proovid koguti enne töötluste rakendamist 01.09.2014 ja pärast töötlust 06.10.2014 ning analüüsiti kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooniga. Katsetulemuste põhjal tehti peamised järeldused: (a) Nõo eksperimentaalne pinnasfiltersüsteem vähendas integronide sisaldust reovees; (b) sünteetiline nanohõbe kontsentratsiooniga 0,1 mg-Ag/l ei mõjutanud oluliselt integronide sisaldust vertikaalfiltrite väljavoolus ega filtermaterjalis; (c) absoluutarvukuselt leidis enim *intI1*, siis *intI2* ja kõige vähem *intI3* gene.

Märksõnad: *tehismärgala, integronid, nanoosakesed, kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon, antibiootikumresistentsus.*

T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

The effect of synthetic silver nanoparticles on the abundance of integrons in the vertical flow filter of Nõo constructed wetland

This bachelor thesis evaluates the abundance of integron integrase genes *intI1*, *intI2* and *intI3* in the influent, effluent and filter material of the vertical flow filters of Nõo constructed wetland system. The aim of the thesis was to analyze the effect of synthetic silver nanoparticles in wastewater on the integron genes' abundances and their proportions in the bacterial community. Silver nitrate (AgNO_3) treatment and no treatment controls were included in the study. Samples were collected prior and subsequent to the treatments on 1.09.2014 and 6.10.2014, respectively. Samples were analyzed using quantitative polymerase chain reaction. The main conclusions of the study were: (a) vertical filters of Nõo constructed wetland decreased integron abundance in the wastewater; (b) synthetic silver nanoparticles (0,1 mg-Ag/l) did not significantly affect the integron abundance in the effluent nor in the filter material of the vertical flow filter; (c) *intI1* was the most abundant integron gene, followed by *intI2* and *intI3*.

Keywords: *constructed wetland, integrons, nanoparticles, quantitative polymerase chain reaction, antibiotic resistance.*

T270 Environmental technology, pollution control

Sisukord

Sissejuhatus	5
Kasutatud lühendid.....	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Tehismärgalad	7
1.1.1 Tehismärgalade tüübid.....	7
1.1.2 Puhastusprotsessid tehismärgalades.....	9
1.2 Antibiootikumid ja antibiootikumresistentus (AR)	10
1.2.1 Antibiootikumid.....	10
1.2.2 Antibiootikumresistentsus (AR)	11
1.2.3 Integronid	12
1.3 Nanoosakesed	14
1.3.1 Nanoosakeste bakteritsiidne toime	15
2. Materjal ja meetodika.....	17
2.1 Katsesüsteemi kirjeldus	17
2.2 Proovid.....	18
2.3 DNA eraldamine.....	19
2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ja esmane andmeanalüüs.....	20
3. Tulemused	23
3.1 <i>IntI</i> geenide absoluutarvukused vertikaalfiltris	23
3.1.1 <i>IntI</i> geenide absoluutarvukused sisse- ja väljavoolus	23
3.1.2 <i>IntI</i> geenide absoluutarvukused filtermaterjalis.....	25
3.2 <i>IntI</i> geenide osakaalud vertikaalfiltri bakterikoosluses	26
3.2.1 <i>IntI</i> geenide osakaalud sisse- ja väljavoolus	26
3.2.2 <i>IntI</i> geenide osakaalud filtermaterjalis	28
4. Arutelu ja järeldused	31
Kokkuvõte	33
Tänuavaldused.....	34
Kasutatud kirjandus.....	35
Lisa 1	38

Sissejuhatus

Antibiootikumide liigne ja ulatuslik kasutamine meditsiinis, põllumajanduses, looma- ja linnukasvatustes on viinud antibiootikumresistentsete bakterite arvukuse suurenemisele keskkonnas (Sengupta jt., 2013). Antibiootikumijäägid jõuavad madalas kontsentratsioonis keskkonda, kus nad ei tapa baktereid, vaid stimuleerivad antibiootikumresistentsuse levikut (Allen jt., 2010). Antibiootikumijääkide üheks sisendiks keskkonda on ebaefektiivne reoveepuhastus, mis tingib vajaduse lisa puhastusetapiks, mille alternatiivne võimalus võiks olla tehismärgalade kasutamine (Sharma jt., 2016).

Antibiootikumresistentsuse hindamise üheks indikaatoriks on integronid, mis kujutavad endast bakteriaalseid geneetilisi elemente. Integronid liiguvad bakterite vahel tänu plasmiididele või transposoonidele, mille koostisesse nad võivad kuuluda (Deng jt., 2015). Integroni geenid on heaks antropogeense reostuse indikaatoriks, sest on laialt levinud gramnegatiivsetes bakterites ning neid on kirjeldatud paljudes erinevates looduslikes vee ja maismaa ökosüsteemides, niisamuti ka reovees (Stalder jt., 2012).

Antibiootikumresistentsusgeenide tekkele ja levikule võivad aidata kaasa ka teised toksilised ühendid peale antibiootikumide (Ma jt., 2016). Sünteetiliste nanoosakeste, eriti nanohõbeda puhul on täheldatud bakteritsiidset toimet bakterikooslusele (Durán jt., 2016). Nanoosakeste laialdane kasutuselevõtt viimase kümnendi jooksul erinevates tööstusharudes on tinginud vajaduse uurida nende mõju keskkonnale.

Käesolevas töös määrati integronide integraasi geenide *intI1*, *intI2* ja *intI3* sisaldus Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sissevoolus, väljavoolus ja filtermaterjalis. Töö eesmärk oli leida sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju nimetatud geenide absoluutarvukusele ja osakaalule Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite mikroobikoosluses, võrdlusena kasutati hõbenitraadiga (AgNO_3) töödeldud vertikaalfiltreid ja kontrollina töötlemata vertikaalfiltreid.

Kasutatud lühendid

AR	antibiootikumresistentsus
ARG	antibiootikumresistentsusgeen
<i>attI</i> ja <i>attC</i>	koht-spetsiifilise rekombinatsiooni sait, mille kaudu toimub geenikassetti liitmine integriini
DOC	lahustunud orgaaniline süsinik
FaD	loodete tüüpi tehismärgala (ingl <i>fill and drain</i>)
HF	horisontaalfilter
HSSF	horisontaalvooluline tehismärgala (ingl <i>horizontal subsurface flow</i>)
<i>intI</i>	integraasi valku kodeeriv geen
<i>intI1</i>	klass 1 integraasi valku kodeeriv geen
<i>intI2</i>	klass 2 integraasi valku kodeeriv geen
<i>intI3</i>	klass 3 integraasi valku kodeeriv geen
KA	kuivaine
NH ₄ -N	ammooniumlämmastik
NO ₃ -N	nitraatlämmastik
<i>orf5</i>	teadmata funktsiooniga geen
Pc ja P	promootorid
<i>qacEA1</i>	resistentsusgeen ammooniumühenditele
qPCR	kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (ingl <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
SF	avaveeline tehismärgala (ingl <i>surface flow</i>)
<i>sulI</i>	resistentsusgeen sulfoonamiidile
TIC	üldanorgaaniline lämmastik
TN	üldlämmastik
TOC	üldorgaaniline lämmastik
VF	vertikaalfilter
VV	väljavool
VDF	vertikaalne allavooluline tehismärgala (ingl <i>vertical down flow</i>)
VUF	vertikaalne ülesvooluline tehismärgala (ingl <i>vertical upflow</i>)

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Tehismärgalad

Tehismärgalad on inimese konstrueeritud süsteemid, milles kasutatakse looduslikke protsesse reovee puhastamiseks. Tehismärgalade eeskujuks on looduslikud märgalad seal esineva taimestiku, pinnase ja mikroobikooslusega (Vymazal, 2010). Sellised süsteemid suudavad keskkonnast efektiivselt eemaldada nii tavapäraseid (toitained, mikroorganismid) kui ka mittetavapäraseid reoaineid (raskmetallid, süsivesinikud) ja isegi ravimijääke, hormoone ning biotsiide (Wu jt., 2015). Tehismärgalad on enam levinud Põhja-Ameerikas, Austraalias ja Euroopas (eriti Rootsis, Saksamaal, Norras) ning neid kasutatakse olmereovee, mitmesuguste tööstuslike reovete ja prügila nõrgvee puhastamiseks (Vymazal, 2010).

Tehismärgalad saab klassifitseerida vastavalt seal esinevatele makrofütidele veepinnal vabalt ujuvate, ujulehtedega või veealuste ja juurdunud taimedega süsteemideks. Teine klassifikatsioon toetub märgala hüdroloogiale ja vee voolu suunale, mille alusel saab tehismärgalad jagada avaveelisteks (SF – *surface flow*) ja maa-aluse vooluga tehismärgaladeks (SSF – *subsurface flow*) (Fonder ja Headley, 2013). Maa-aluse vooluga süsteemid jaotatakse eraldi horisontaalvoolulisteks (HSSF – *horizontal subsurface flow*), vertikaalseteks allavoolulisteks (VDF – *vertical down flow*), vertikaalseteks ülesvoolulisteks (VUF – *vertical upflow*) ja loodete tüüpi tehismärgaladeks (FaD – *fill and drain*) (Fonder ja Headley, 2013). Maa-aluse vooluga reoveepuhastussüsteeme, mis on täidetud filtermaterjaliga ja kus puudub makrofütne taimestik, nimetatakse pinnasfiltriteks (Fonder ja Headley, 2013).

1.1.1 Tehismärgalade tüübid

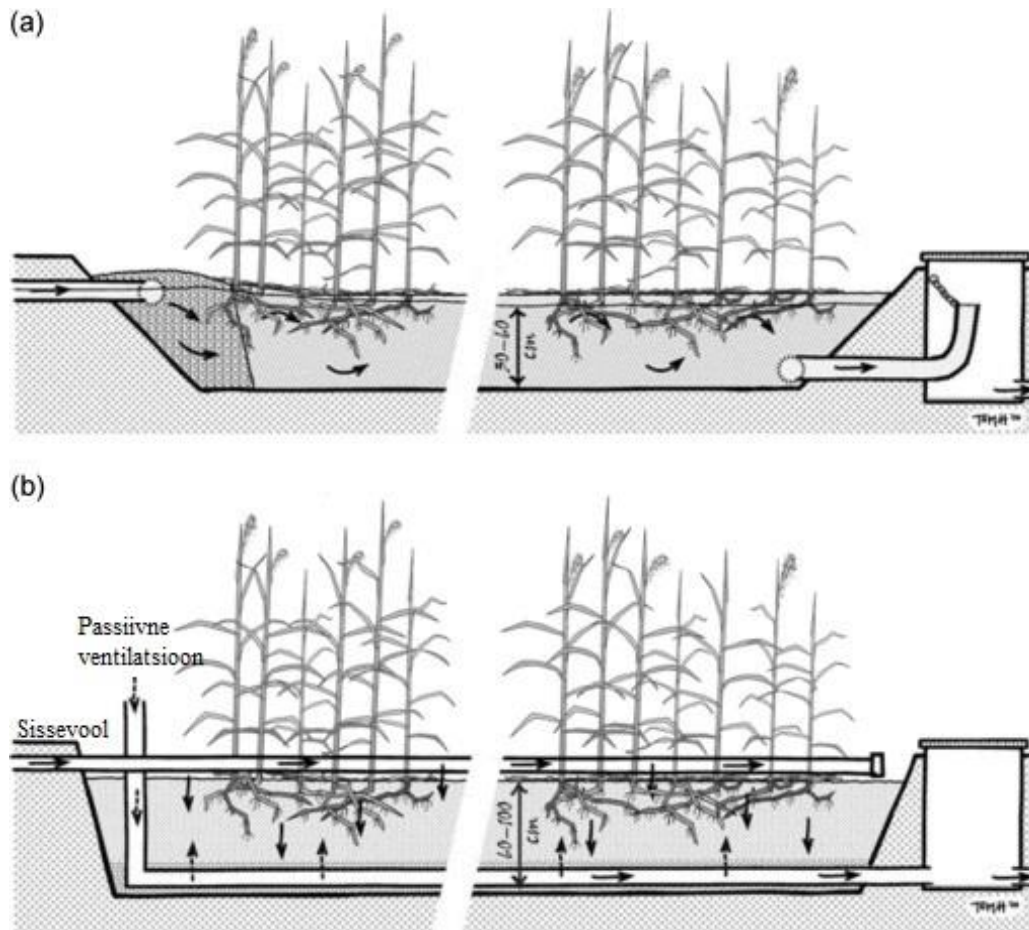
Avaveelised tehismärgalad (SF) on kõrgemate veetaimedega madalad tiigid, mille sügavus jääb 20–40 cm vahele. Märgala põhjas on 20–30 cm paksune mullakiht, mis on vajalik veetaimede kasvuks (Vymazal, 2010). Vesi voolab küllastunud pinnasesubstraadil horisontaalselt. Taimekoosluses domineerivad kõrrelised. Sellist tüüpi tehismärgalad on kõige enam levinud (Fonder ja Headley, 2013).

Avaveelises tehismärgalas eemaldatakse edukalt orgaaniline aine ja heljum, kuid see on ebaefektiivne fosfori sidumisel. Orgaanilise aine lagunemisele ja nitrifikatsioonile aitavad kaasa erineva hapniku kontsentratsiooniga tsoonid, kus ülemistes veekihtides toimuvad valdavalt aeroobsed protsessid ja nitrifikatsioon ning põhjakihtides anaeroobsed protsessid ja denitrifikatsioon. Avaveelised tehismärgalad toimivad ka jaheda kliimaga aladel ning sobivad

kasutamiseks järelpuhastina näiteks olme-, põllumajanduse ja tööstusliku reovee puhastamisel, samuti kaevandus- ja prügilavee puhastamiseks/nõrutamiseks. Avaveeline märgala vajab suurt maa-ala, kuid ülalpidamiskulud on enamasti madalad (Fonder ja Headley, 2013).

Horisontaalvoolulised tehismärgalad (HSSF) koosnevad kruusast või kividest filterkehast, millele on istutatud märgala taimestik (Vymazal, 2010). Reovee juurdevool on reguleeritud sissevoolu ja väljavoolu süsteemi kaudu: sissevooluava paikneb filterkeha ülemise pinna all ja on horisontaalselt vastakuti väljavooluavaga, mis asub filterkeha põhjas. Selle tagajärjel liigub reovesi filterkehas läbi taimede risosfääri (Joonis 1 (a)) (Vymazal, 2010; Fonder ja Headley, 2013). Orgaanilise aine lagundamine toimub aeroobsete ja anaeroobsete mikroobsete protsesside tagajärjel. Kuna hapniku juurdepääs filterkehasse on limiteeritud, on valdavalt ülekaalus anaeroobsed ja anoksilised tingimused. Edukalt ärastatakse heljum ja orgaaniline aine, lämmastiku ja fosfori eemaldamine on vähemefektiivne. Oluline roll on taimejuurtel, mis transpordivad alumistesse kihtidesse hapnikku ja soodustavad bakterite elutegevust (Vymazal, 2010). Enamasti rakendatakse horisontaalvoolulist tehismärgala eelpuhastatud reovee järeltöötlemiseks, kuid antud süsteemi saab kasutada ka iseseisva puhastusetaapina. Üldiselt kasutatakse HSSFi väiksemate vooluhulkade juures kui avaveelisi tehismärgalaid, sest antud süsteem vajab stabiilset vee juurdevoolu (Fonder ja Headley, 2013).

Vertikaalvoolulised tehismärgalad jagunevad allavoolulisteks (VDF), ülesvoolulisteks (VUF) ja loodete tüüpi (FaD) tehismärgaladeks. Vertikaalse allavoolulise tehismärgala puhul juhatakse reovesi filtri pinnale, mis seejärel liigub vertikaalsuunaliselt läbi poorse filterkeha (Joonis 1 (b)). Vertikaalses ülesvoolulises tehismärgalas juhatakse reovesi filtri pinna asemel filterkeha põhja, kust see tõuseb üles ja kogutakse pinna lähedal (Vymazal, 2010). Loodete tüüpi tehismärgalas vahetub vee voolusuund perioodiliselt (Fonder ja Headley, 2013). Erinevalt horisontaalvoolulisest tehismärgalast on vertikaalvooluline tehismärgala enamus ajast veega küllastumata (Fonder ja Headley, 2013). Filtrit koormatakse portsjonite kaupa, nii jõuab hapnik difundeeruda filtermaterjali pooridesse. Tulemuseks on aeroobne keskkond, mis loob sobivad tingimused nitrifikatsiooniks, kuid halvad denitrifikatsiooniks (Vymazal, 2010). VDFis eemaldatakse samuti efektiivselt orgaaniline aine ja heljum. Fosfori ärastus on minimaalne, välja arvatud juhul kui kasutatakse kõrge fosforisidumisvõimega täitematerjali (Vymazal, 2010). Vertikaalvoolulisi tehismärgalaid kasutatakse tihti prügila nõrgvee ja põllumajandusliku heitvee kohapealseks puhastamiseks (Fonder ja Headley, 2013).



Joonis 1. (a) Horisontaalvooluline tehismärgala; (b) vertikaalvooluline tehismärgala (muudetud Fonder ja Headley, 2013).

1.1.2 Puhastusprotsessid tehismärgalades

Reostus eemaldatakse tehismärgalades sarnaselt looduslikele märgaladele, aga protsessid on rohkem kontrollitud. Saasteained eemalduvad erinevate keemiliste, füüsikaliste ja mikroobsete protsesside tagajärjel. Kõik tehismärgala tüübid on efektiivsed eemaldamaks tahkeid osakesi ja heljumit, filtreerides ja setitades seda. Tehismärgalad on ebaefektiivsed fosfori sidumisel, kuid seda on võimalik parandada kasutades kõrge fosforisidumisvõimega täitematerjali. Üldlämmastiku ärastus on samuti enamasti ebaefektiivne, sest nitrifikatsiooniprotsess vajab hapniku olemasolu, mis enamasti on piiratud maa-aluste reoveepuhastussüsteemide puhul ja hapniku juuresolek piirab omakorda denitrifikatsiooni. Nii toimub lämmastiku eraldumise asemel pigem lämmastiku vormi muutumine (Vymazal, 2010).

Tehismärgalade puhastusvõime sõltub suurel määral seal elavast mikroobikooslusest, mida mõjutab erinevate saasteainete sisaldus keskkonnas. Näiteks kõrge antibiootikumide

kontsentratsioon tehismärgalas võib viia muutusteni mikroobikoosluses, mille tagajärjel muutub saasteainete eemaldamise efektiivsus (Berglund jt., 2014). Mikroobide optimaalset kasvukeskkonda silmas pidades on loodud mitmeid edasiarendusi tehismärgaladele: hapniku juurdepääsu tagamine, süsinikuallika lisamine, soojusisolatsioon külmema kliimaga aladel ja erinevate mikroobsete kultuuride lisamine tehismärgaladesse (Wu jt., 2015). Parima puhastusprotsesside efektiivsuse tagab erinevate tehismärgalade kombineerimine koos sobiva täitematerjali ja erinevate edasiarendustega (Vymazal, 2010; Wu jt., 2015).

1.2 Antibiootikumid ja antibiootikumresistentus (AR)

1.2.1 Antibiootikumid

Antibiootikume defineeritakse kui gruppi looduslikke või sünteetilisi ühendeid, millel on bakteritsiidne või bakteriostaatiline toime, olenevalt sellest, kas antibiootikumide tagajärjel bakterid surmataks või pidurdub nende kasv (Chandrashekara ja Yakkaldevi, 2015). Antibiootikumid on keerulised signaalmolekulid, millel võib olla mitu erinevat funktsiooni. Erinevate pH-de juures võib antibiootikum omada erinevaid laenguid, sellest tulenevalt muutuvad antibiootikumide füüsikalised-keemilised ja bioloogilised omadused nagu sorptsioon, fotoreaktiivsus, antibiootiline aktiivsus ja toksilisus. Antibiootikume jagatakse nende keemilise struktuuri (Tabel 1) ja toimemehhanismide alusel (Kümmerer, 2009). Toimemehhanismide alusel jaotuvad antibiootikumid rakukesta sünteesi takistavateks, valgusünteesi takistavateks, nukleiinhapete sünteesi segavateks ja sellisteks antibiootikumideks, mis käituvad substraadi analoogidena (Goldsmith jt., 2012).

Tabel 1. Antibiootikumide klassid keemilise struktuuri järgi (muudetud Kümmerer, 2009).

Antibiootikumi klass	Näide
Beeta-laktaamid	Penitsilliinid, tsefalosporiinid
Tetratsükliinid	Doksütsükliin
Aminoglükosiidid	Gentamütsiin, streptomütsiin
Makroliidid	Erütromütsiin
Glükopeptiidid	Vankomütsiin
Sulfoonamiidid	Sulfametoksasool
Kinoloonid	Tsiprofloksatsiin

Antibiootikume toodavad looduses erinevad seente ja bakterite tüved (Allen jt., 2010). Üle 55% aastatel 1945–1978 avastatud antibiootikumidest toodab perekond *Streptomyces*, mis kuulub aktinomütsetide hõimkonda ja on tänapäevani suurimaks antibiootikumide produtsendiks (Williams ja Vickers, 1986; Emerson de Lima Procopio jt., 2012). Mikroorganismid toodavad antibiootikume hilises statsionaarse kasvu faasis väikestes kogustes. Produtsendi eesmärgiks võib olla ellujäämine, infovahetus või kvoorumi tunnetus (Sengupta jt., 2013). Meditsiinis kasutatakse antibiootikume inimeste ja loomade bakteriaalsete infektsioonide ravis (Allen jt., 2010).

Antibiootikumijäägid satuvad keskkonda reoveepuhastuse, põllumajanduse, looma- ja linnukasvatuse kaudu loomse sõnniku ja läga kasutamisel põllumajandusväetisena. Kasutusel olevad reoveepuhastussüsteemid ei taga reeglina piisavat veepuhastuse efektiivsust ravimitest ning antibiootikumijäägid jõuavad heitveega looduslikku keskkonda (Kümmerer, 2009; Sharma jt., 2016). Heitvee järelpuhastuseta sobiks kasutamiseks tehismärgalad, mis oleks odav lahendus, kuid viib loodusliku mikroobikoosluse kokku heitvees olevate antibiootikumijääkidega. See hõlbustab antibiootikumresistentsete bakterite levikut, sest antibiootikumijäägid põhjustavad selektiivse surve ARe levikuks (Berglund jt., 2014).

1.2.2 Antibiootikumresistentsus (AR)

Bakteritest leitud antibiootikumide biosünteesi ja resistentsust määravad geenid olid olemas juba miljardeid aastaid tagasi (Sengupta jt., 2013). Seda kinnitavad antibiootikumresistentsusgeenide (ARG) leiud looduslikest keskkondadest, kuhu inimtegevuse mõju pole ulatunud (Sengupta jt., 2013). Antibiootikumide ülemäärane ja ettevaatamatu kasutamine on viinud antibiootikumresistentsete bakterite arvu suurenemisele keskkonnas (Sengupta jt., 2013). ARe leviku tingib peamiselt kolm mehhanismi: geneetiline mutatsioon, horisontaalne geeniülekanne ja rekombinatsioon koos antimikroobsete ühendite selektiivse survega (Berendonk jt., 2015).

Geneetilised mutatsioonid bakterites aitavad kaasa bakteri kohanemisele antibiootikumidega ja ARe tekkele (Berendonk jt., 2015). Geneetiline mutatsioon võib seisneda antibiootikumi märklaua modifitseerimises. Samuti võib bakter ARe saavutada takistades antibiootikumide rakku tungimist, neid välja pumbates, modifitseerides või lagundades (Allen jt., 2010). Kuigi mutatsioonid bakteri genoomis aitavad bakteril keskkonnaga kohaneda, on peamiseks ARe leviku viisiks horisontaalne geeniülekanne (Stalder jt., 2012). Horisontaalne geeniülekanne on

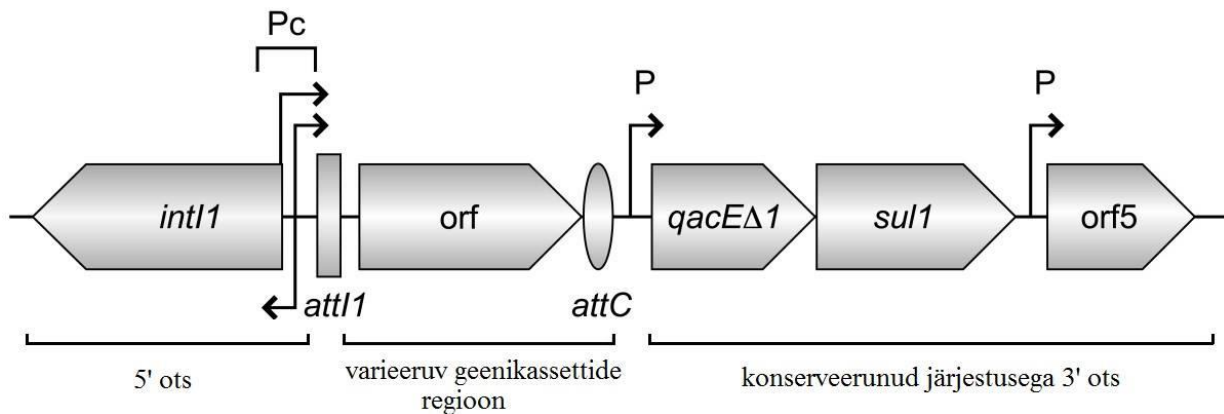
võõra geneetilise informatsiooni kandumine ühest organismist teise mittesuguliselt. See võib toimuda nii taksonoomiliselt lähedaste kui kaugete bakterite vahel vaba DNA omandamisel keskkonnast või mobiilsete geneetiliste elementide kaudu (Aminov, 2009; Fletcher, 2015). ARGid võivad paikneda nii bakteri enda kromosoomis kui ka mobiilsetel geneetilistel elementidel nagu plasmiidid, transposoonid, integronid, geenikassetid ja bakteriofaagid (Sharma jt., 2016).

1.2.3 Integronid

Integronid on bakteriaalsed geneetilised elemendid, mis on võimelised soodustama geenikassetides paiknevate geenide liikumist ja ekspressiooni (Stalder jt., 2012). Integronidel on oluline roll bakteri kohastumisel negatiivsete keskkonnatingimustega. Näiteks antibiootikumide suur kontsentratsioon keskkonnas põhjustab bakteriaalset stressi, mille tagajärjel võib suureneda integronide osakaal mikroobikoosluses, soodustades ARGide levikut (Stalder jt., 2012).

Integroni 5' ots koosneb kolmest põhielemendist: (a) *intI* integraasi valku kodeeriv geen, mille ülesanne on lülitada geenikassette integroni; (b) koht-spetsiifilise rekombinatsiooni sait *attI*, mis on integraasi seondumise koht ja (c) promootor *P_c*, mis vastutab korrektse geeniekspressiooni eest (Joonis 2) (Stalder jt., 2012; Deng jt., 2015). Integrone leidub nii kliinilises kui ka looduslikus keskkonnas bakterite kromosoomide koostises, plasmiididel ja transposoonidel. Eriti palju on neid leitud gramnegatiivsetest bakteritest (Perry ja Wright, 2013). *IntI* geeni poolt toodetud integraasi aminohappelise järjestuse alusel jagatakse integronid nelja klassi (Deng jt., 2015).

Klass 1 integronid on kõige laiemalt levinud integronide klass keskkonnas (Deng jt., 2015). *IntI* geenide levikut on seostatud inimtegevusega, kõige rohkem on määratud neid geene loomasõnnikus, reoveepuhastusjaamades ja tööstuslikus heitvees (Stalder jt., 2012). Klass 1 integronid liiguvad enamasti transposoonide ja konjugatiivsete plasmiidide abil (Gillings, Gaze jt., 2015; Deng jt., 2015). Umbes 9% sekveneeritud bakteri genoomidest on avastatud antud klassi integrone (Deng jt., 2015). Leide on isegi 15 000–40 000 aasta vanusest Siberi igikeltsast isoleeritud bakteritest (Perry ja Wright, 2013). Tänu laialdasele levikule ja reoveepuhastussüsteemide ebaefektiivusele on *intI* geeni olemasolu hea indikaator antibiootikumresistentsuse hindamiseks keskkonnas (Berendonk jt., 2015; Gillings, Gaze jt., 2015).



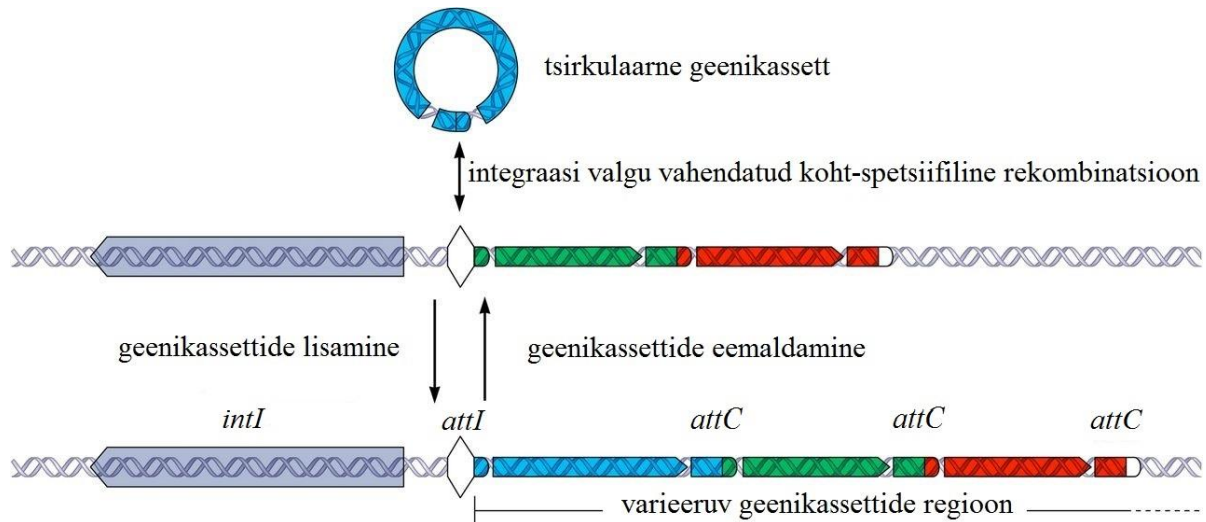
Joonis 2. Integroni struktuur klass 1 integroni näitel. *Pc* ja *P* – promootorid; *intI1* – integraasi geen; *attI* ja *attC* – koht-spetsiifilise rekombinatsiooni saidid, mille kaudu toimub geenikassetti liitmine integroni; *qacEΔ1* – ammoniumühendite resistentsusgeen; *sul1* – sulfoonamiid-resistentsusgeen; *orf5* – teadmata funktsiooniga geen (muudetud Larouche ja Roy, 2011).

Klass 2 integronid on enamasti kirjeldatud transposoon *Tn7* koosseisus. *IntI2* geen on 50% ulatuses homologne *intI1* geeniga, kuid on katkestatud stop-koodoniga, mistõttu kodeeritakse lühem ja mitteaktiivne polüpeptiid. Selline valk ei ole võimeline katalüüsima rekombinatsiooni reaktsiooni. Tänu sellele on klass 2 integronidesse kuuluvad geenikassetid väiksema varieeruvusega, sisaldades enamasti trimetoprim-resistentsusgeeni *dfrA1*, streptotritsiin-resistentsusgeeni *sat2* ja streptomütsiini ning spektinomütsiini resistentsusega seotud geeni *aadA1* (Stalder jt., 2012; Deng jt., 2015). Klass 2 integronid on looduses vähem levinud kui klass 1 integronid, peamiselt on antud klassi integrone leitud merelises keskkonnas elavates gammaproteobakterites (Deng jt., 2015).

Klass 3 integronid on eelnevate klassidega võrreldes kõige vähem levinud, peamiselt pinnase ja magevee proteobakterite hulgas (Deng jt., 2015). Enamasti on *intI3* geene isoleeritud olme- ja tapamaja reoveepuhastitest (Stalder jt., 2012). Geneetiliselt on *intI3* geen 59% ulatuses identne ja 72% ulatuses sarnane *intI1* geeniga (Collis jt., 2002). Analoogselt klass 1 integronidele lülitavad klass 3 integronid geenikassette oma koostisesse (Joonis 3). Tänu sellele sisaldavad klass 3 integronid mitmesuguste antibiootikumide resistentsusgeene, mis määravad resistentsuse muuhulgas aminoglükosiididele, beeta-laktaamidele, trimetoprimile, klooramfenikoolile ja kinoloonidele (Stalder jt., 2012). Sarnaselt teiste klassidega liigub ka *intI3* geen transposoonide abil (Deng jt., 2015).

Klass 4 integronid erinevad eelnevalt kirjeldatud klassidest, sest koosnevad sadadest geenikassettidest, mis kodeerivad bakteris nii ART, virulentsusfaktoreid kui teisi funktsioone.

Selle klassi integrone on leitud perekondadest *Vibrionaceae*, *Shewanella*, *Xanthomonas* ja *Pseudomonas*. Enamasti kannavad klass 4 integronid selliseid geenikassette, mis määravad ARt klooramfenikoolile ja fosfomütsiinile (Deng jt., 2015).



Joonis 3. Geenikassettide liikumine ja ekspressioon integronis. Geenikassetti lisamine integriini toimub integraasi valgu vahendatud koht-spetsiifilise rekombinatsiooni kaudu, kus tsirkulaarse geenikassetti *attC* järjestus rekombineerub integriini *attI* järjestusega. Sellise mehhanismi abil lisab/eemaldab integron geenikassette (muudetud Gillings, 2014).

1.3 Nanoosakesed

Nanoosakesed on ülipeened füüsikalised osakesed, mille ühe mõõtme suurus ulatub kuni 100 nanomeetrini ja mis võivad kujult olla sfäärilised, torujad või ebakorrapäraseks (Nowack ja Bucheli, 2007). Suure eripinna tõttu on nanoosakesed bioloogiliselt aktiivsed ning omadustelt vastupidavad ja hüdrofoobsed, mis mõjutab nende edasikandumist õhus, mullas ja vees. Nanoosakeste pinnale võivad olla seondunud ohtlikud saasteained, mis kanduvad nendega keskkonnas edasi (Borkowska-But jt., 2014).

Keemiliselt jagunevad nanoosakesed süsinikku sisaldavateks ja anorgaanilisteks nanoosakesteks, päritolult võivad need olla looduslikud või antropogeensed. Looduslikud süsinikku sisaldavad nanoosakesed võivad keskkonda sattuda biogeensete, geogeensete, atmosfääri või pürogeensete protsesside tagajärjel. Antropogeense päritoluga nanoosakesed võivad olla toodetud sihilikult või moodustuda kõrvalproduktina, näiteks kütuse põlemisel tekkivad tahmaosakesed. Anorgaanilise koostisega nanomaterjale toodetakse erinevatest metallidest nagu vask, tsink, titaan, magneesium, alginaat, kuld ja hõbe (Nowack ja Bucheli, 2007; Rai jt., 2009).

Nanoosakesi kasutatakse paljudes erinevates tööstusharudes nagu elektroonika, biomeditsiin, ravimitööstus, kosmeetika ja energeetika (Nowack ja Bucheli, 2007). Aastal 2004 toodeti nanoosakesi hinnanguliselt mõnisada tuhat tonni, aastaks 2020 prognoositakse tootmise kasvu üle poole miljoni tonni aastas, järelkult järgmiste aastakümnete jooksul kasvab nanoosakeste kontsentratsioon keskkonnas hüppeliselt, mispärast on oluline juba praegu uurida nende ökoloogilist mõju (Maurer-Jones jt., 2013).

Nanoosakesed satuvad keskkonda oma elutsükli lõpus, pärinedes kas punktreaustusallikatest nagu tehased, prügilad, reoveepuhastid, või tulenedes hajureostusest, mida tingib nanoosakesi sisaldavate materjalide kulumine. Samuti viiakse neid keskkonda tahtlikult, näiteks kloorühenditega reostunud põhjavee puhastamiseks on kasutatud nanoosakestena nullvalentset rauda, mis juhitakse otse põhjavette (Nowack ja Bucheli, 2007). Nanoosakeste edasine teekond keskkonnas on ettearvamatu: nanomaterjalid võivad agregeeruda, lahustuda, osaleda redoksreaktsioonides, reageerida biomolekulidega või muutuvad nende pinna omadused (Maurer-Jones jt., 2013). Enamasti on nanoosakesed vees lahustumatud ja akumulatsioonid eelkõige veekogudes, setetes ja pinnases (Lippmaa ja Kahru, 2010).

Sarnaselt antibiootikumidega võivad nanoosakesed soodustada ARGide levikut looduslikes ja inimese poolt loodud ökosüsteemides (Ma jt., 2016). Reoveepuhastuses kasutatakse ühe puhastusetapina bioloogilisi protsesse ehk mikroorganisme, et eemaldada reoveest orgaanilist ainet ja toitaineid. Nanoosakeste, näiteks nanohõbeda jõudmisel reoveepuhastisse võib see avaldada mõju sealsele mikroobikooslusele ja seeläbi nii puhastusefektiivsusele (Siripattanakul-Ratpukdi ja Fürhacker, 2014) kui ka antibiootikumresistentsusgeenide levikule (Ma jt., 2016).

1.3.1 Nanoosakeste bakteritsiidne toime

Nanoosakeste mõju on uuritud erinevatele bakteriliikidele nagu *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Nitrosomonas europea*, kellest viimasel on oluline roll veepuhastusprotsessides (Maurer-Jones jt., 2013). Enamasti kasutatakse analüüsi meetoditena bakterite kolooniate arvukust enne ja pärast nanoosakestega kokkupuutumist või leitakse minimaalne bakterite kasvukõverat inhibeeriv nanoosakeste kontsentratsioon. Analüüsides kasutatakse kõige sagedamini nanohõbedat, mille puhul on näidatud hõbeiooni Ag^+ toksilisust bakterirakkudele (Maurer-Jones jt., 2013).

Nanohõbe on antibakteriaalsete omadustega ja bakterite arvukuse piiramiseks on hakatud nanohõbedat kasutama kliinilises ravis mikroobide kasvu pärssiva lisandina. Koduses majapidamises leidub seda õhuvärskendajates, toidupakendites, sokkides ja plaastrites (Rai jt., 2009; Lippmaa ja Kahru, 2010). Nanohõbeda bakteritsiidse toime seletamiseks on pakutud erinevaid mehhanisme: elektrostaatiline tõmme bakteri negatiivse laengu ja nanohõbeda positiivse laengu vahel, vabade radikaalide tootmine nanohõbeda poolt, bakterivalkude muutmine ja inhibeerimine, interaktsioonid SH-grupiga ja fosfaati sisaldavate molekulidega, mis bakterirakku difundeerumisel põhjustavad DNA kahjustusi (Durán jt., 2016). Üheks olulisemaks toksilisuse mehhanismiks peetakse hõbeda katiooni Ag^+ teket (Siripattanakul-Ratpukdi ja Fürhacker, 2014).

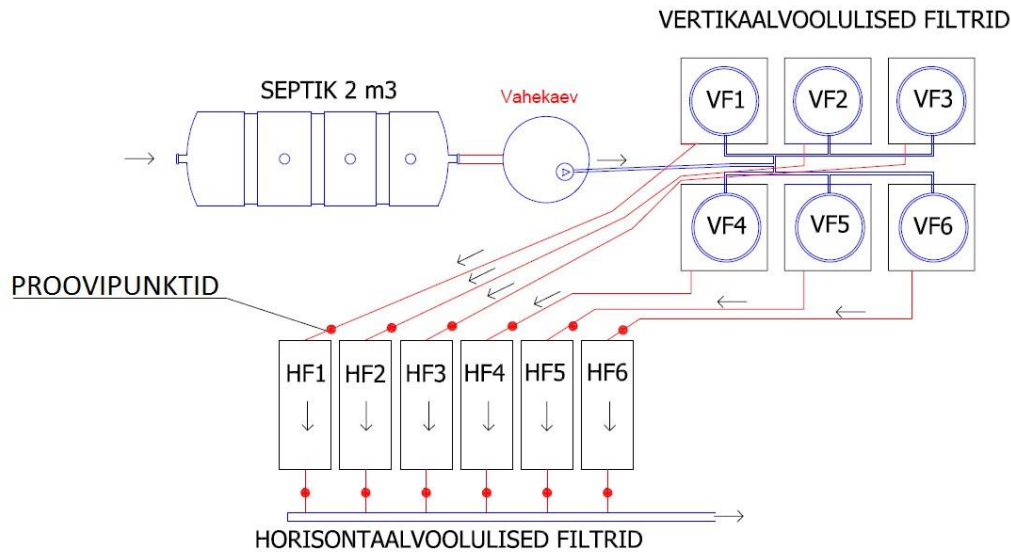
2. Materjal ja metoodika

2.1 Katsesüsteemi kirjeldus

Nõo eksperimentaalne pinnasfiltersüsteem asub Tartumaal Nõo vallas Nõo külas, kus elab umbes 1500 inimest (Nõlvak jt., 2013). Tehismärgala on rajatud AS Emajõe Veevärgile kuuluva Nõo aleviku aktiivmudapuhasti territooriumile, mis puhastab Nõo aleviku reovett, mille hulka kuulub nii olmereovesi kui ka lähedal asuva piima- ja lihatööstuse reovesi (Nõlvak jt., 2013). Katse toimumise ajal 2014. aastal koosnes Nõo eksperimentaalne pinnasfiltersüsteem (a) septikust suurusega 2 m^3 , milles reovee viibeaeg oli umbes kaks ööpäeva; (b) vahekaevust; (c) kuuest vertikaalvoolulisest filtrist (VF) mõõtmetega $1*1*1 \text{ m}$ ja ruumalaga 1 m^3 , mis täideti kihiti LECA kergkruusaga (0–0,2 m sügavusel osakeste diameeter 10–20 mm, 0,2–0,8 m sügavusel osakeste diameeter 2–4 mm, 0,8–1 m sügavusel osakeste diameeter 10–20 mm); (d) kuuest horisontaalvoolulisest filtrist (HF) mõõtmetega $0,6*0,6*1,5$ meetrit (laius*sügavus*pikkus) ja ruumalaga $0,54 \text{ m}^3$, mis täideti LECA kergkruusaga, mille osakeste diameeter oli 2–4 mm (Joonis 4).

Süsteem käivitati 2013. aasta juulis, ööpäevas puhastati 60 liitrit reovett ehk lisati 5 liitrit iga kahe tunni järel. Tehismärgala sissevooluna kasutati aktiivmudapuhastisse sisse voolavat reovett. Septiku läbinud reovesi jaotati võimalikult ühtlaselt vertikaalfiltri pinnale, mis seejärel liikus gravitatsiooniliselt läbi vertikaalfiltri horisontaalfiltrisse. Reovee viibeaeg puhastis oli umbes 2 ööpäeva. Süsteemi läbinud heitvesi juhiti Nõo oja.

Nanoosakeste mõju uurimiseks tehismärgala bakterikooslusele sooritati 1. septembrist kuni 6. oktoobrini 2014 eksperiment, kus esimesse ja neljandasse vertikaalfiltrisse lisati sünteetilisi hõbeda nanoosakesi (kollargooli) lõppkontsentratsiooniga $0,1 \text{ mg-Ag/l}$, teise ja viiendasse vertikaalfiltrisse lisati võrdlusena hõbenitraati (AgNO_3) kontsentratsiooniga $0,1 \text{ mg-Ag/l}$ ja kolmas ning kuues vertikaalfilter jäeti kontrolliks ehk ei lisatud midagi.



Joonis 4. Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi skeem (autor Kuno Kasak). VF – vertikaalfilter; HF – horisontaalfilter.

2.2 Proovid

Kokku koguti 50 proovi kahel erineval kuupäeval, proovivõttudel töö autor ei osalenud. Proovid võeti 01.09.2014 enne hõbeda nanoosakeste ja hõbenitraadi lisamist ning 06.10.2014 peale nanoosakeste lisamist katse lõpus. Mõlemal kuupäeval võeti järgmised proovid:

- veeproov (ruumala 1 l) vertikaalfiltrite sissevoolust pärast septikut asuvast vahekaevust,
- veeproovid (ruumala 1 l) iga vertikaalfiltri väljavoolust,
- filtermaterjali proovid iga vertikaalfiltri filtermaterjalist: igast vertikaalfiltrist võeti kühvliga kolm osaproovi (umbes 200 g) kolmest eri punktist 20–30 cm sügavuselt jaotustoru alt.

Kõikidest kogutud veeproovidest määrati vahetult pärast proovi kogumist pH, temperatuur ja hapnikusisaldus (Multi 3420 SetG, WTW GmbH, Saksamaa) ning OÜ Eesti Keskkonnauuringute Keskuse Tartu laboris üldlämmastiku (TN), ammooniumlämmastiku (NH₄-N), nitraatlämmastiku (NO₃-N), üldorgaanilise süsiniku (TOC), lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) ja üldanorgaanilise süsiniku (TIC) sisaldus (Tabel 2). Kogutud filtermaterjalide proovides määrati kuivaine (KA) sisaldus Geograafia osakonna keskkonnakeemia laboris vastavalt standardmetoodikale. Veeproove säilitati +4°C juures ja filtermaterjali proove –20°C juures kuni DNA eraldamiseni.

Tabel 2. Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sisse- ja väljavoolu füüsikalise-keemilised omadused proovivõtu päeval 1.09.2014 ja 6.10.2014. VV – vertikaalfiltri väljavool, Temp – temperatuur, TN – üldlämmastik, NH₄-N – ammoniumlämmastik, NO₃-N – nitraatlämmastik, TOC – üldorgaaniline süsinik, DOC – lahustunud orgaaniline süsinik, TIC – üldanorgaaniline süsinik.

	Temp (°C)	O ₂ (mg/l)	pH	TN (mg-N/l)	NH ₄ -N (mg/l)	NO ₃ -N (mg/l)	TOC (mg-C/l)	DOC (mg-C/l)	TIC (mg-C/l)
1.09.2014									
Sissevool	15,1	0,18	7,03	81	60	0,07	170	132	97
VV 1	14,7	6,20	7,14	66	4,5	44	51	44	35
VV 2	14,7	6,28	7,10	74	1,8	48	43	40	31
VV 3	14,8	5,81	7,31	74	2,8	48	43	43	33
VV 4	14,9	5,37	7,32	71	7,5	40	52	48	39
VV 5	14,8	6,86	7,27	69	5,5	41	46	45	39
VV 6	14,9	6,33	7,23	79	2,1	49	54	41	27
6.10.2014									
Sissevool	11,5	0,60	6,99	125	90	0,09	202	101	130
VV 1	8,2	5,87	7,22	73	4,7	54	23	20	52
VV 2	7,6	5,65	7,22	84	1,7	61	18	17	38
VV 3	7,9	5,37	7,41	78	5,2	57	21	20	46
VV 4	9,3	5,14	7,59	84	12	51	39	35	55
VV 5	10,3	5,62	7,14	69	10	40	33	32	68
VV 6	8,5	6,63	7,25	84	3,8	57	21	20	45

2.3 DNA eraldamine

Kogutud veeproove (50 ml) tsentrifuugiti 15 minutit 2500 g juures. Tekkinud sademest DNA eraldamiseks kasutati *DNA PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) komplekti vastavalt tootja juhendile, kus proovide homogeniseerimiseks mõeldud 10 minutiline vorteksi tsüklil asendati homogenisaatoriga *Precellys® 24* (Bertin Technologies, Prantsusmaa) 20 sekundit 5000 rpm.

Katsealalt kogutud filtermaterjalist eraldati 10 grammi, mis peenestati uhmrinuiaga. Peenestatud filtermaterjalist eraldati *DNA PowerMax Soil DNA Isolation Kit* (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) komplekti abil, jälgides tootja juhendit. DNA saagise suurendamiseks pesti eraldamise viimases etapis filtrit vastava puhverlahusega kahe korra asemel kolm korda.

Spektrofotomeetriga *Infinite M200* (Tecan AG, Grödig, Austria) määrati eraldatud DNA kontsentratsioon ja kvaliteet. Eraldatud DNA säilitati -20°C juures. Veeproovidest eraldas DNA Ökoloogia ja maateaduste instituudi spetsialist Kertu Tiirik ja filtermaterjalist keskkonnatehnoloogia magistrant Kadri Saare.

2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ja esmane andmeanalüüs

Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR) viidi läbi masinaga *RotorGene® Q* (QIAGEN, Foster City, CA, USA), tarkvaraga *RotorGene Series Software version 2.0.2* (Qiagen). Uuritavates proovides määrasid Kadri Saare ja Hiie Nõlvak bakteriaalse 16S rRNA sisalduse (Lisa 1) ja töö autor määras geenid *intI1*, *intI2* ja *intI3*, mis on indikaatoriteks antibiootikumresistentuse hindamiseks keskkonnas.

Uuritud geenide määramiseks valmistati reaktsioonisegu lõppmahuga 10 μl , mis koosnes 5 μl *Maxima SYBR Green Master Mix* reagentist (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Waltham, USA), optimeeritud kontsentratsiooniga geenispetsiifilistest praimeritest, 1 μl eraldatud DNAST ja ülejäänud mahus steriliseeritud destilleeritud veest. Tabelis 3 on toodud informatsioon kasutatud praimerite kohta, optimeeritud reaktsioonitingimused ja qPCR programmid. Pärast amplifikatsioonireaktsiooni määrati sulamiskõver pideva fluorestsentssignaali mõõtmisega vahemikus 75°C kuni 95°C ($0,35^{\circ}\text{C}/3\text{ s}$). Kõiki proove analüüsiti kolmes korduses. Igale mõõtmisele lisati negatiivkontrollid, mis sisaldasid kõiki reaktsioonisegu komponente peale eraldatud DNA.

Uuritava geeni kvantifitseerimiseks kasutati sünteetilist kaheaahelalist DNA fragmendi lähtelahust kontsentratsiooniga 10^9 geenikoopiat/ μl (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Saksamaa), millest valmistati standardlahjendused vahemikus 10^8 kuni 100 koopiat/ μl (*intI1*), 10^7 kuni 10^3 koopiat/ μl (*intI2*) ja 10^6 kuni 12 koopiat/ μl (*intI3*). Kasutades standardlahjendusi koostati kvantifitseerimisstandard igale geenile optimeeritud tingimustel sarnaselt keskkonnaproovidega. Standardite koostamisel töö autor ei osalenud.

Andmeanalüüsi esimesena etapina hinnati *RotorGene Series Software version 2.0.2* (Qiagen) tarkvaraga amplifikatsiooni- ning sulamiskõverate kuju, kokkulangevust ja paigutust. Amplifikatsiooniefektiivsuse leidmiseks kasutati programmi LinRegPCR version 2016.0 (Ruijter jt., 2009). Proovid rühmitusid amplikonidena vastavalt amplifikatsiooniefektiivsusele: vertikaalfiltri väljavoolud kõigist ajapunktidest, vertikaalfiltri

sissevoolud kõigist ajapunktidest, vertikaalfiltri filtermaterjal 01.09.2014 ja vertikaalfiltri filtermaterjal 06.10.2014. Uuritud geenide absoluutarvukuse leidmiseks kasutati kvantifitseerimisstandardit, leides uuritava proovi (A) ja sellele vastava kvantifitseerimisstandardi erinevate punktide (B) vahelise kordsusastme, kasutades valemit [1] (Ruijter jt., 2009)

$$[1] \text{ Kordsusaste} = N_{0,A} / N_{0,B} = (N_{t,A} / E_A^{Ct,A}) / (N_{t,B} / E_B^{Ct,B}),$$

kus N_0 – tähistab amplikonide A ja B algkontsentratsiooni fluorestsentsühikutes; E – amplifikatsiooniefektiivsus vastavalt amplikonidele; N_t – fluorestsentsi läviväärtus ja C_t – amplifikatsioonitsüklike arv, mis kulus läviväärtuse saavutamiseks.

Uuritava geeni absoluutarvukuse arvutamiseks korrutati saadud kordsusaste vastava standardlahjenduse kontsentratsiooniga. Uuritavate geenide lõplik absoluutarvukus leiti kvantifitseerimisstandardi erinevate punktide alusel saadud absoluutarvukuste ja proovide paralleelide aritmeetilisel keskmistamisel. Absoluutarvukused taandati analüüsitud proovi kogustega ja esitati kujul koopiat/ml (veeproovid) või koopiat/g-KA (filtermaterjali proovid).

Geenide osakaalu arvutamine bakterikoosluses (%) teostati vastavalt valemile [2], kus N_0 tähistab vastava geeni algkontsentratsiooni fluorestsentsühikutes.

$$[2] \text{ Osakaal} = [N_0 (\text{uuritav geen}) / N_0 (16S \text{ rRNA})] * 100\%$$

Tabel 3. Geenide *intI1*, *intI2* ja *intI3* määramiseks kasutatud praimerid (Barraud jt., 2010) ja qPCR programmid.

Geen	Praimerid	Praimerite primaarjärjestus	Praimeri kontsentratsioon (µM)	Amplikoni suurus (bp)	qPCR programm
<i>intI1</i>	intI1-LC1	GCC TTG ATG TTA CCC GAG	0,8	196	50°C 2 min
	intI1-LC5	AG GAT CGG TCG AAT GCG TGT			95°C 10 min
					95°C 15 s
					60°C 30 s
					72°C 30 s
					Sulamine: 75...95°C 0,35°C/3 s
<i>intI2</i>	intI2-LC2	TGC TTT TCC CAC CCT TAC C	0,8	195	50°C 2 min
	intI2-LC3	GAC GGC TAC CCT CTG TTA TCT C			95°C 10 min
					95°C 15 s
					60°C 30 s
					72°C 30 s
					Sulamine: 75...95°C 0,35°C/3 s
<i>intI3</i>	intI3-LC1	GCC ACC ACT TGT TTG AGG A	0,8	138	50°C 2 min
	intI3-LC2	GGA TGT CTG TGC CTG CTT G			95°C 10 min
					95°C 15 s
					60°C 30 s
					72°C 30 s
					Sulamine: 75...95°C 0,35°C/3 sek

3. Tulemused

Hõbeda nanoosakeste mõju uurimiseks tehismärgala mikroobikooslusele määrati integroni integraasi geenide *intI1*, *intI2* ja *intI3* absoluutarvukused ja osakaalud bakterikoosluses Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrites. Nii absoluutarvukuste kui ka osakaalude puhul võrreldi omavahel kahe kuupäeva veeproovide ja filtermaterjalide graafikuid. 01.09.2014 kuupäeva proovid koguti enne töötluste rakendamist ja 06.10.2014 proovid võeti pärast hõbeda nanoosakeste ja hõbenitraadi lisamist.

Geenide *intI2* ja *intI3* puhul olid paljud mõõdetud proovide paralleelid allpool qPCR meetodi määramispiiri, mistõttu kasutati osade kuupäevade ja töötluste jaoks üksikute paralleelproovide väärtusi, mille alusel ei olnud võimalik võtta aritmeetilist keskmist ega arvutada standardhälvet. Vastavad punktid on esitatud tabelis 4. Samuti puudub standardhälve kõikide graafikute sissevoolu proovidel, sest seda võeti mõlemal kuupäeval ühes korduses.

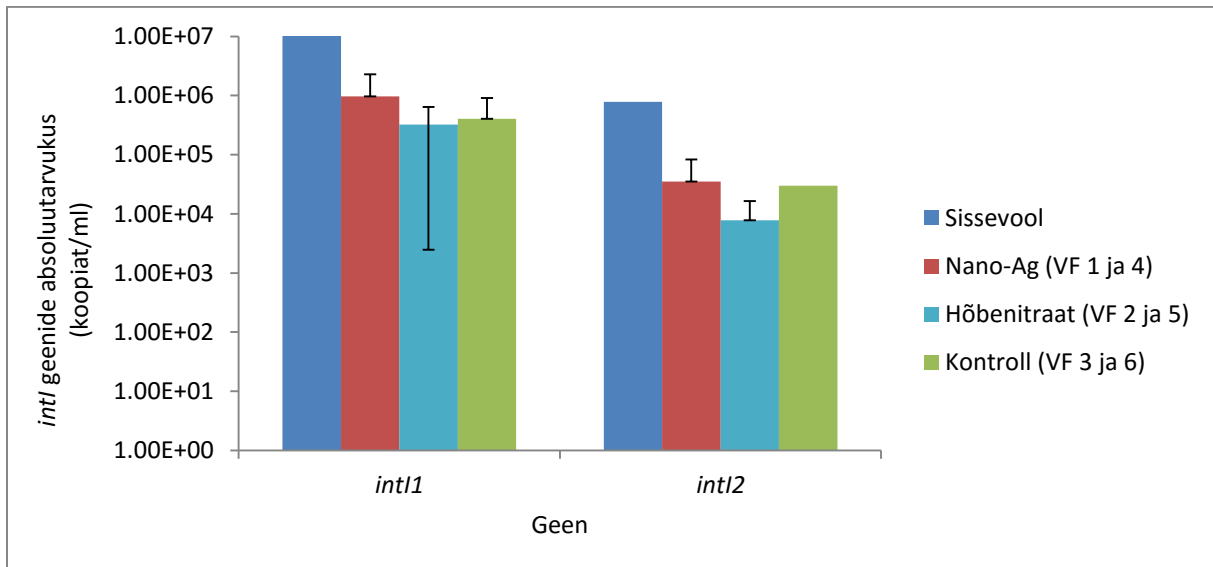
3.1 *IntI* geenide absoluutarvukused vertikaalfiltris

3.1.1 *IntI* geenide absoluutarvukused sisse- ja väljavoolus

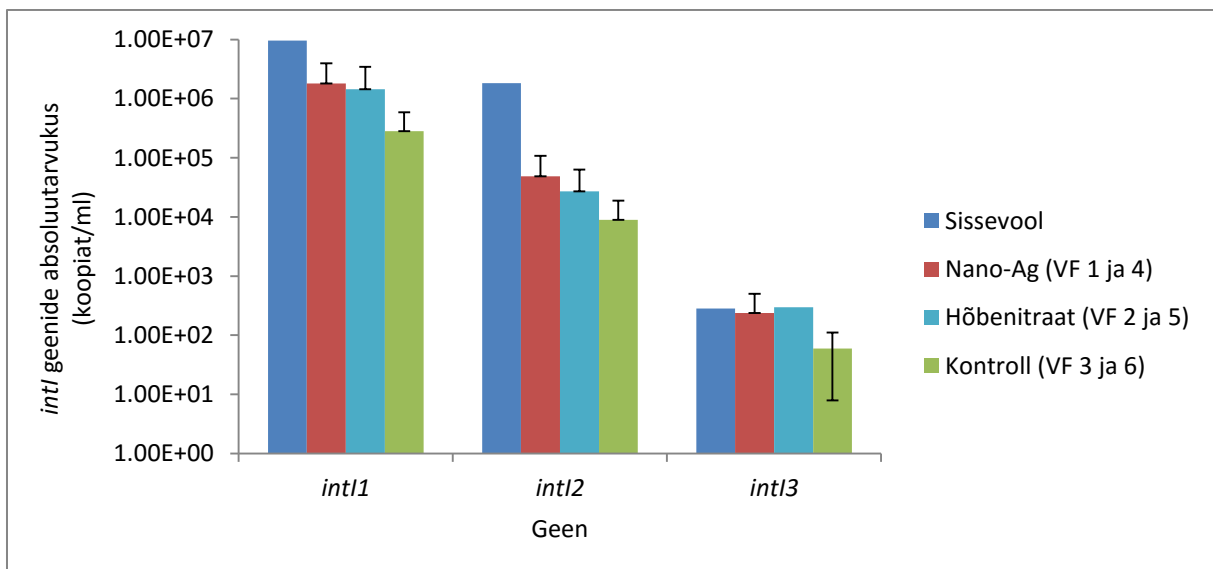
Enne töötluste rakendamist 1.09.2014 kogutud veeproovides oli *intI1* geenide absoluutarvukus sissevoolus $1,11 \cdot 10^7$ koopiat/ml, 1. ja 4. vertikaalfiltri väljavoolus $9,67 \cdot 10^5$ koopiat/ml, 2. ja 5. vertikaalfiltri väljavoolus $3,23 \cdot 10^5$ koopiat/ml ning 3. ja 6. vertikaalfiltri väljavoolus $4,02 \cdot 10^5$ koopiat/ml (Joonis 5). *IntI2* geeni absoluutarvukused olid väiksemad kui *intI1* omad, varieerudes vahemikus $7,76 \cdot 10^3$ kuni $7,80 \cdot 10^5$ koopiat/ml. Sarnaselt *intI1* geeniga oli *intI2* absoluutarvukus vertikaalfiltrite sissevoolus kuni kaks suurusjärku kõrgem kui väljavooludes. 01.09.2014 *intI* geenide absoluutarvukused Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sisse- ja väljavoolu graafikult (Joonis 5) on puudu *intI3* geen, sest enamus selle geeni mõõtmistulemusi jäid allapoole määramispiiri (Tabel 4).

Pärast töötluste rakendamist oli 06.10.2014 kuupäeva (Joonis 6) *intI1* geenide absoluutarvukus tõusnud kuni ühe suurusjärgu võrra, ulatudes nanohõbedaga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus (VF 1 ja 4) kuni $1,81 \cdot 10^6$ koopiani/ml ja hõbenitraadiga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus (VF 2 ja 5) kuni $1,44 \cdot 10^6$ koopiani/ml. Sissevoolus ja kontroll vertikaalfiltri väljavoolus (VF 3 ja 6) oli *intI1* geeni absoluutarvukus veidi väiksem kui 01.09.2014 võetud proovides, vastavalt $9,56 \cdot 10^6$ ja $2,82 \cdot 10^5$ koopiat/ml. *IntI2* geenide absoluutarvukused olid mõlemal kuupäeval analoogsed. Muutust võis täheldada ainult sissevoolus, kus 06.10.2014 (Joonis 6) oli see suurem kui katse alguses, nimelt $1,82 \cdot 10^6$

koopiat/ml. *IntI3* geenide absoluutarvukus oli tunduvalt madalam kui teiste klasside integronidel: 06.10.2014 sissevoolus 281 koopiat/ml, nanohõbedaga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus 237 koopiat/ml, hõbenitraadiga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus 297 koopiat/ml ja kontroll vertikaalfiltrite väljavoolus 59,4 koopiat/ml.



Joonis 5. 01.09.2014 *intI1* ja *intI2* geenide absoluutarvukus Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sisse- ja väljavoolus koos standardhõlbe (n=2).



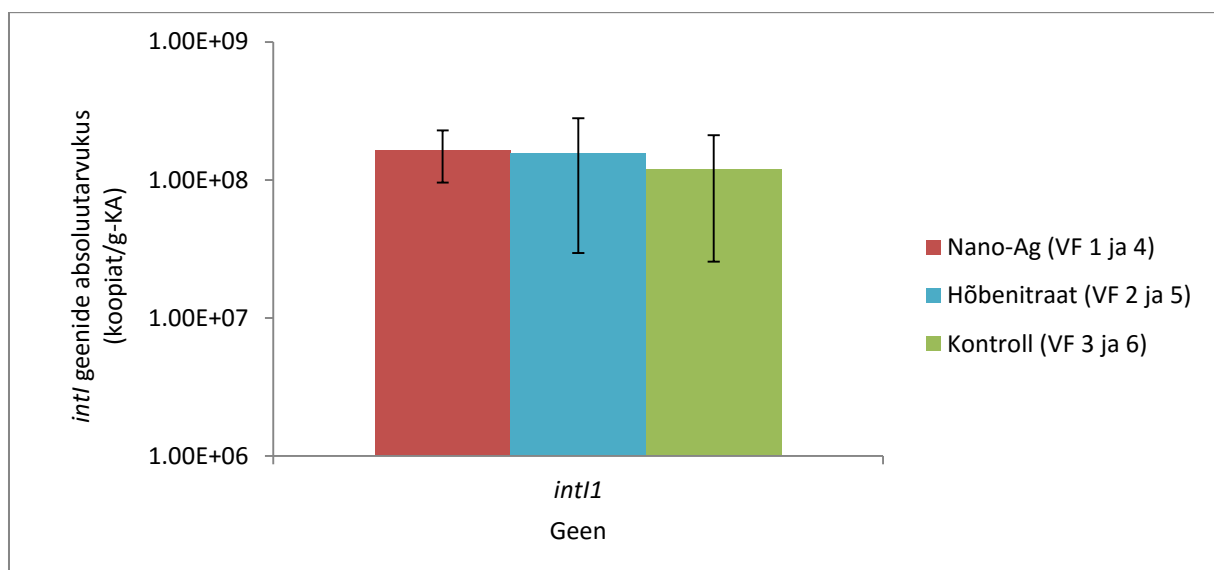
Joonis 6. *IntI1*, *intI2* ja *intI3* geenide absoluutarvukus 06.10.2014 Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sisse- ja väljavoolus koos standardhõlbe (n=2).

Rakendatud töötused nanoosakeste ja hõbenitraadiga ei avaldanud selget mõju *intI* geenide absoluutarvukusele vertikaalfiltrite väljavooludes: 06.10.2014 erinevate tööstustega vertikaalfiltrite väljavoolud ei erinenud teineteisest oluliselt. Kahe kuupäeva võrdluses jäid *intI1* ja *intI2* geenide absoluutarvukused veeproovides enne ja pärast tööstust üsna sarnasteks, erinedes maksimaalselt ühe suurusjärgu võrra.

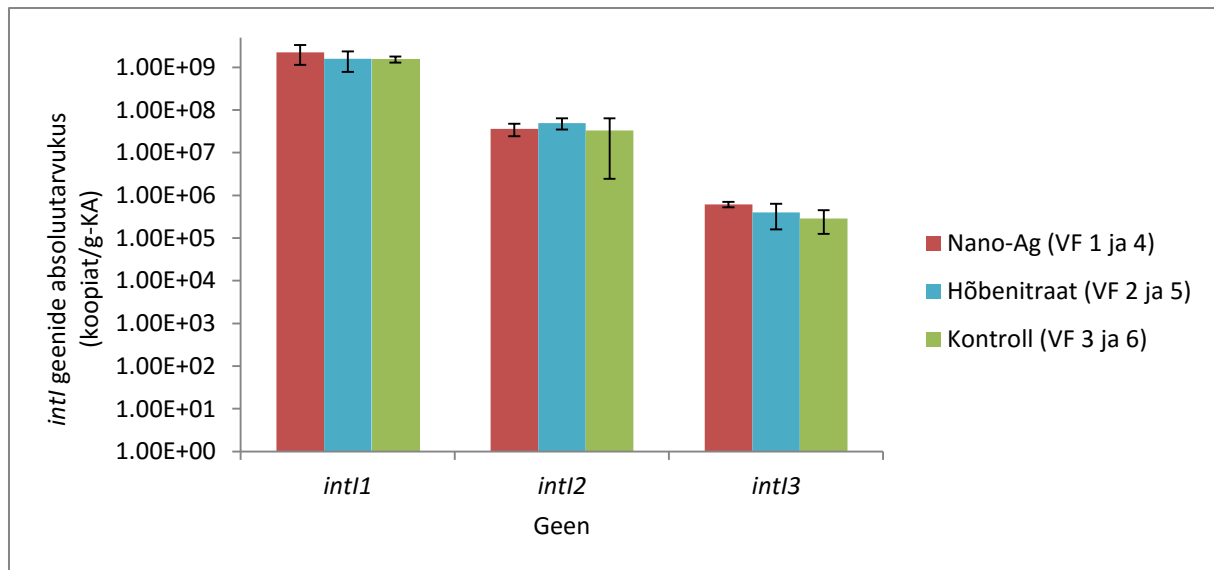
3.1.2 *IntI* geenide absoluutarvukused filtermaterjalis

Enne töötuse rakendamist tuvastati 01.09.2014 kõigis vertikaalfiltri filtermaterjali proovides *intI1* geeni absoluutarvukus suurusjärgus 10^8 koopiat/g-KA (Joonis 7). *IntI2* ja *intI3* sisaldus antud kuupäeva filtermaterjali proovides jäi alla qPCR meetodi määramispiiri. Sarnaselt katse algusega oli ka 06.10.2014 kuupäeval *intI1* geeni absoluutarvukus samas suurusjärgus nii nanohõbedaga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus, hõbenitraadiga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus kui ka kontroll vertikaalfiltrite väljavoolus, varieerudes $1,54 \cdot 10^9$ koopias/g-KA kuni $2,23 \cdot 10^9$ koopiani/g-KA (Joonis 8).

Kummagi kuupäeva filtermaterjali proovides ei täheldatud töötuse olulist mõju *intI* geenide absoluutarvukusele. 06.10.2014 filtermaterjali proovides (Joonis 8) oli *intI1* absoluutarvukus ühe suurusjärgu võrra suurem kui 01.09.2014 võetud proovides (Joonis 7). Sarnaselt sisse- ja väljavoolu graafikutele leidis ka filtermaterjali proovides *intI1* geene kõige enam, järgnesid *intI2* geenid suurusjärgus 10^7 koopiat/g-KA ja kõige vähem leidis *intI3* geene, mille suurusjärg jäi 10^5 koopiat/g-KA juurde.



Joonis 7. *IntI1* geeni absoluutarvukus 01.09.2014 Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite filtermaterjalis koos standardhälbega (n=2).



Joonis 8. *intI1*, *intI2* ja *intI3* geenide absoluutarvukus 06.10.2014 Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite filtermaterjalis koos standardhällbega (n=2).

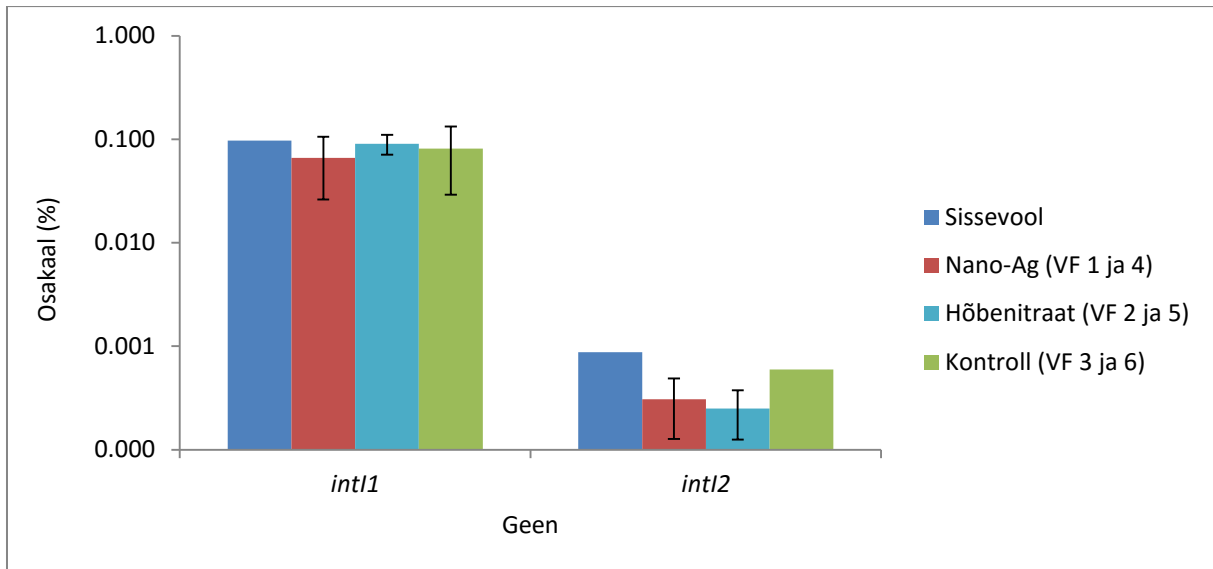
3.2 *IntI* geenide osakaalud vertikaalfiltri bakterikoosluses

3.2.1 *IntI* geenide osakaalud sisse- ja väljavoolus

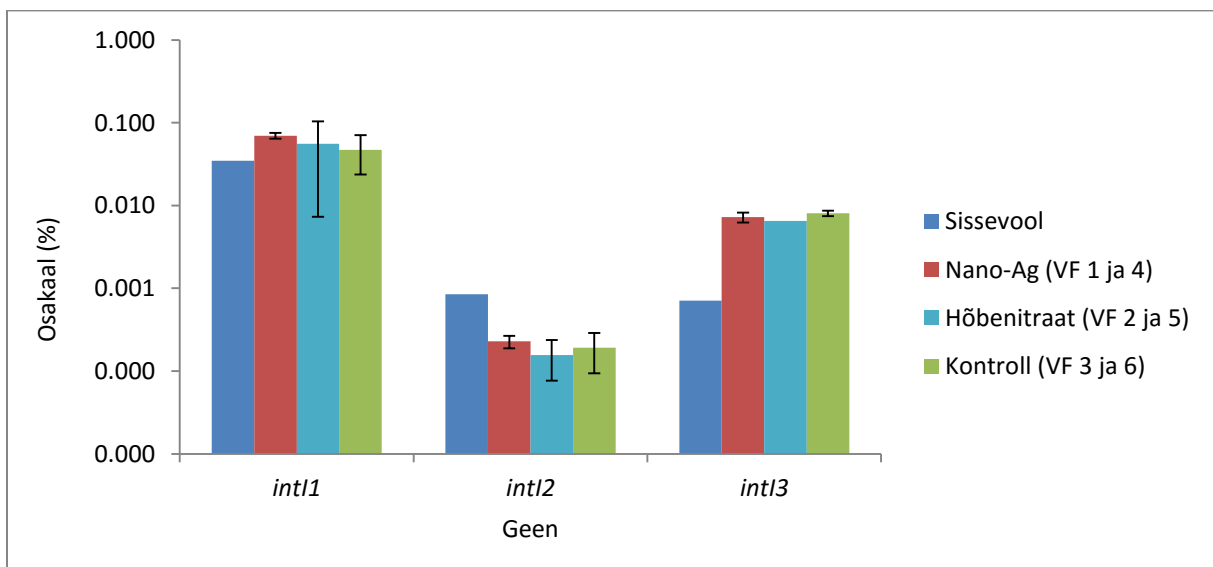
Kasutades bakteriaalse 16S rRNA sisaldust vastavates proovides (Lisa 1), leiti *intI* geenide osakaalud bakterikoosluses. 01.09.2014 veeproovides (Joonis 9) moodustas *intI1* geen kuni 0,097% kogu bakterikooslusest. Erinevalt *intI1* geeni absoluutarvukusest ei olnud osakaalude puhul märgata suurt erinevust sissevoolu ja vertikaalfiltrite väljavoolude vahel. Kõige väiksem oli *intI1* geeni osakaal 1. ja 4. vertikaalfiltri väljavoolus, kus kogu bakterikooslusest moodustas *intI1* geen 0,066%. *IntI2* geeni osakaal oli võrreldes *intI1* geeni osakaaluga tunduvalt väiksem ja sissevoolus ületas antud geeni osakaal vertikaalfiltrite väljavoolu. Sissevoolus oli *intI2* geeni osakaal 0,0009%; 1. ja 4. vertikaalfiltri väljavoolus 0,0003%; 2. ja 5. vertikaalfiltri väljavoolus 0,0003% ja 3. ja 6. vertikaalfiltri väljavoolus 0,0006%. *IntI3* geeni tulemused veeproovidest jäid enamasti allapoole qPCR meetodi määramispiiri (Tabel 4).

06.10.2014 veeproovide puhul (Joonis 9) võis märgata *intI1* ja *intI3* geenide osakaalu väiksust sissevoolus võrreldes vertikaalfiltrite väljavooludega. Kui *intI1* puhul oli nanohõbedaga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus osakaal 0,070%, höbenitraadiga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus 0,056% ja kontroll vertikaalfiltrite väljavoolus 0,047%, siis sissevoolus oli osakaal 0,035%. *IntI3* geeni puhul oli jälgitav sarnane efekt, kuid osakaalu protsendid olid väiksemad, jäädes vertikaalfiltrite väljavoolude puhul 0,007% kuni 0,008% ja

sissevoolu osakaal oli kõigest 0,001%. Kui absoluutarvukuse puhul oli proportsionaalselt kõige rohkem *intI1*, millele järgnes *intI2* ja seejärel *intI3* geen, siis osakaalude puhul moodustas kooslusest kõige suurema osa *intI1*, seejärel *intI3* ja viimasena *intI2*. Viimase puhul oli sissevoolus geeni osakaal kogu bakterikooslusest suurem kui teistes vertikaalfiltrite väljavooludes.



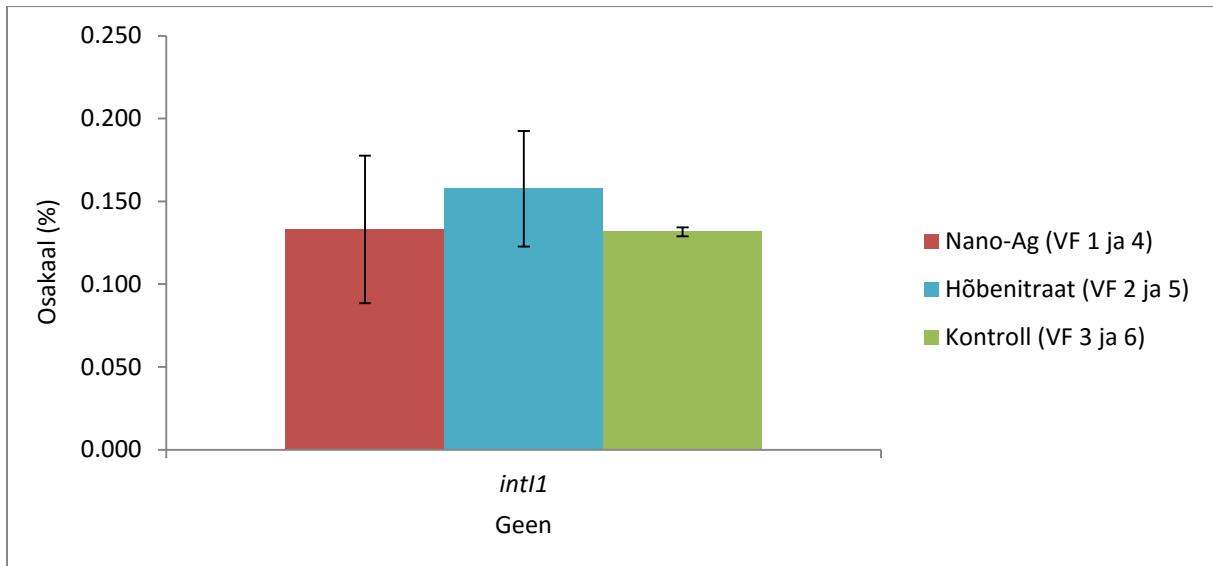
Joonis 9. *IntI1* ja *intI2* geenide osakaal kogu bakterikoosluses 01.09.2014 Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sisse- ja väljavoolus koos standardhälbega (n=2).



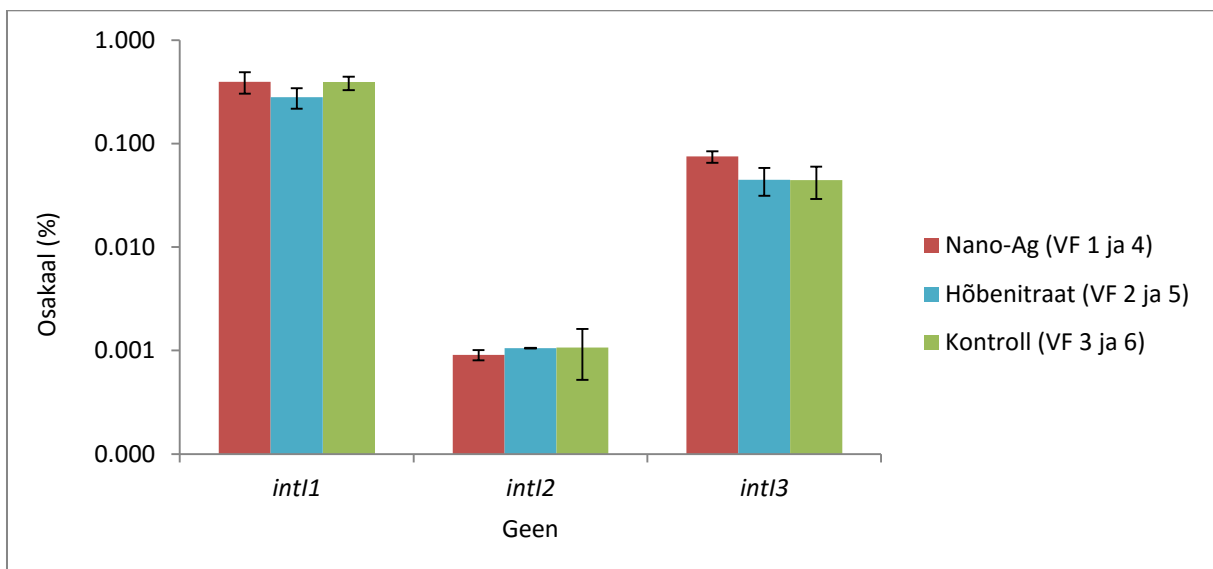
Joonis 9. *IntI1*, *intI2* ja *intI3* geenide osakaal kogu bakterikooslusest 06.10.2014 Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sisse- ja väljavoolus koos standardhälbega (n=2).

3.2.2 *IntI* geenide osakaalud filtermaterjalis

Vertikaalfiltrite filtermaterjali *intI* geenide osakaal ületas suuremasti veeproovide oma. 01.09.2014 filtermaterjali proovidest (Joonis 11) määratud *intII* osakaal oli vahemikus 0,132 kuni 0,158%. 06.10.2014 filtermaterjali proovidest (Joonis 12) määratud *intII* osakaal oli veelgi suurem ulatudes 0,280% kuni 0,396%.



Joonis 11. *IntII* geeni osakaal kogu bakterikooslusest 01.09.2014 Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite filtermaterjalis koos standardhõlbega (n=2).



Joonis 12. *IntI*, *intII* ja *intIII* geenide osakaal kogu bakterikooslusest 06.10.2014 Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite filtermaterjalis koos standardhõlbega (n=2).

Proportsionaalselt oli *intI* geenide omavaheline järjestus sama mis veeproovides, kus *intII* osakaal oli suurim ja järgnesid *intI3* ja *intI2*. *IntI3* osakaal oli nanohõbedaga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus 0,075% ja hõbenitraadiga töödeldud ning kontroll vertikaalfiltrite väljavooludes 0,044%. *IntI2* osakaal oli kõigi vertikaalfiltrite väljavooludes umbes 0,001%. Ühe kuupäeva piires ei olnud nanoosakestega töötlusel suurt mõju *intI* geenide osakaalule filtermaterjali proovide bakterikoosluses. Võrreldes katse algus- ja lõppkuupäeva on näha, et peale töötlust on suurenenud uuritud geenide osakaal bakterikoosluses.

Tabel 4. *intI2* ja *intI3* geenide absoluutarvukused ja osakaalud kvantifitseeritud ja kvantifitseerimata vertikaalfiltrite väljavooludes ja filtermaterjalis 01.09.2014. Alumiseks määramispiiriks oli *intI2* geenil $1,00 \cdot 10^3$ koopiat/g-KA ja *intI3* geenil 12 koopiat/ml või 12 koopiat/g-KA. Proovis 01.09.2014 VF 4.2 puudus *intI2* geen. VF – vertikaalfilter (koopiat/g-KA); VV – vertikaalfiltri väljavool (koopiat/ml).

Geen	Proov	Absoluutarvukus (koopiat/g-KA)	Osakaal (%)	Geen	Proov	Absoluutarvukus (VV - koopiat/ml) (VF - koopiat/g-KA)	Osakaal (%)
<i>intI2</i>	VF 1.1	$8,86 \cdot 10^5$	0,0001	<i>intI3</i>	Sissevool	$2,40 \cdot 10^2$	0,001
	VF 1.2	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VV 1	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 1.3	$2,56 \cdot 10^5$	0,0000		VV 2	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 2.1	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VV 3	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 2.2	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VV 4	$1,19 \cdot 10^2$	0,004
	VF 2.3	$3,13 \cdot 10^6$	0,0004		VV 5	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 3.1	$3,20 \cdot 10^5$	0,0000		VV 6	$2,05 \cdot 10^1$	0,002
	VF 3.2	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VF 1.1	$1,69 \cdot 10^4$	0,009
	VF 3.3	$2,07 \cdot 10^5$	0,0000		VF 1.2	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 4.1	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VF 1.3	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 4.2	-	-		VF 2.1	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 4.3	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VF 2.2	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 5.1	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VF 2.3	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 5.2	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VF 3.1	$1,75 \cdot 10^4$	0,008
	VF 5.3	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VF 3.2	< 12	Allpool määramispiiri
	VF 6.1	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VF 3.3	$2,50 \cdot 10^4$	0,012
	VF 6.2	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VF 4.1	$8,72 \cdot 10^3$	0,003
	VF 6.3	$< 1,00 \cdot 10^3$	Allpool määramispiiri		VF 4.2	< 12	Allpool määramispiiri
					VF 4.3	< 12	Allpool määramispiiri
					VF 5.1	< 12	Allpool määramispiiri
					VF 5.2	< 12	Allpool määramispiiri
					VF 5.3	$1,01 \cdot 10^4$	0,012
					VF 6.1	< 12	Allpool määramispiiri
					VF 6.2	< 12	Allpool määramispiiri
					VF 6.3	< 12	Allpool määramispiiri

4. Arutelu ja järeldused

Integroni geenide määramine reoveepuhastussüsteemis annab aimu seal esinevate ARGide arvukusest, nende levimispotentsiaalid ja puhastussüsteemi efektiivsusest (Stalder jt., 2012). Nanohõbeda juuresolek mõjub bakterikooslusele inhibeerivalt ja võib seeläbi mõjutada ARGide esinemist ning levikut (Ma jt., 2016). Käesolevas töös jälgiti *intI1*, *intI2* ja *intI3* geenide arvukust Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrites enne ja pärast sünteetiliste hõbeda nanoosakestega töötlemist. Võrdlusena kasutati töötlust hõbenitraadiga, mille dissotsiatsioonil tekkival Ag^+ ioonil on bakteritele kahjulik toime, ning töötlemata vertikaalfiltreid.

IntI geenide absoluutarvukused veeproovides olid mõlemal kuupäeval sarnased ja muutusid analoogselt. Sissevoolus olid *intI* geenide absoluutarvukused suuremad kui väljavooludes, seega toimus vertikaalfiltrites *intI* geenide eemaldumine. Sarnane katse viidi läbi 2013. juulis Lõuna-Hiinas, kus konstrueeriti tehismärgala, kuhu suunati reovesi, mis koosnes 70% olme- ja 30% kariloomade kasvatuses kasnevast reoveest. Sealses reovees detekteeriti *intI1* geenide absoluutarvukus sissevoolus $(4,10 \pm 0,33) \cdot 10^5$ koopiat/ml ja väljavoolus $(4,39 \pm 0,27) \cdot 10^4$ koopiat/ml ning *intI2* geenide absoluutarvukus sissevoolus $(6,68 \pm 0,04) \cdot 10^3$ koopiat/ml ja väljavoolus $(2,88 \pm 0,86) \cdot 10^1$ koopiat/ml (Chen jt., 2015). Käesolevas töös olid *intI* geenide absoluutarvukused küll suuremad, kuid puhastusefektiivsus küllaltki sarnane. Nii Chen jt. (2015) kui ka käesoleva töö tulemused näitavad, et tehismärgalad vähendavad integronide absoluutarvukust reovees. Samas tuleb märkida, et vaatamata integronide absoluutarvukuse vähenemisele, ei muutunud integronide osakaal bakterikoosluses vertikaalfiltrite sisse- ja väljavoolus. Seega võis integronide absoluutarvukuse vähenemise tingida bakterite üldarvukuse vähenemine vertikaalfiltrites.

Nanoosakeste ja hõbenitraadi lisamine tõstis 06.10.2014 nanohõbeda ja hõbenitraadiga töödeldud vertikaalfiltrite väljavooludes *intI* geenide arvukust kuni ühe suurusjärgu võrra võrreldes katse algusega. Vertikaalfiltrite väljavoolus oli suurim *intI1* geeni absoluutarvukus nanohõbedaga töödeldud vertikaalfiltrites, millele järgnesid hõbenitraadiga töödeldud vertikaalfiltrid ja töötlemata vertikaalfiltrid. Samasuguseid proportsioone väljavoolus täheldati ka Ma jt. (2016) läbiviidud katses, kus 56 päeva jooksul lisati laboris konstrueeritud reoveepuhastussüsteemile nanohõbedat ja hõbenitraati kontsentratsioonid 0,1 mg-Ag/l kuni 20 mg-Ag/l. Ma jt. (2016) katses olid *intI1* geenide erinevate töötluste vahe paremini jälgitav, tõenäoliselt suuremate nanoosakeste kontsentratsioonide tõttu. Nõo eksperimentaalse

pinnasfiltersüsteemi katse filtermaterjali proovide puhul ei täheldatud olulisi muutusi *intI* geenide absoluutarvukuses, mis võis olla tingitud lisatud nanoosakeste madalast kontsentratsioonist. Kirjanduses on täheldatud nanohõbeda bakteritsiidset mõju bioloogilistele protsessidele alates suurusjärgust 1 mg-Ag/l (Siripattanakul-Ratpukdi ja Fürhacker, 2014), kuid käesolevas töös lisati hõbeda nanoosakesi ja hõbenitraati kontsentratsioonis 0,1 mg-Ag/l, mis on lähedasem keskkonnas leiduvatele kontsentratsioonidele.

IntII geeni osakaal veeproovides enne nanoosakestega töötlust oli sissevoolus 0,097% bakterikooslusest ja väikseim nanohõbedaga töödeldud vertikaalfiltrite väljavoolus 0,066%. Pärast töötlust kasvas nanoosakestega töödeldud filtrite väljavoolus *intII* geenide osakaal sissevoolust suuremaks, mille võis tingida bakteriaalne stress. On näidatud, et ebasobivate keskkonnatingimuste juures, näiteks nanoosakeste juuresolekul, aktiveeruvad mobiilsete geneetiliste elementide levikumechanismid. Sellist tundlikkust on kirjeldatud ka *intII* geenide puhul (Stalder jt., 2012). Seega võib järeldada, et nanoosakeste lisamine suurendas integronide osatähtsust bakterikoosluses. Filtermaterjali osakaalude puhul kasvas pärast töötlust nanoosakestega *intII* geenide arv nanohõbedaga töödeldud vertikaalfiltris võrreldes katse algusega ligikaudu kolm korda, kuid sama kuupäeva erinevalt töödeldud vertikaalfiltrite vahel olulisi erinevusi ei esinenud. Seega võis osakaalude erinevus erinevatel kuupäevadel olla tingitud muudest faktoritest nagu reovee omadused või muutunud keskkonnatingimused.

Absoluutarvukuse ja osakaalude puhul leidis uuritud geenidest kõige enam *intII* geene. Ka Ma jt. (2016) läbiviidud katse reovees leidis *intII* geene kõige arvukamalt, metagenoomika näitas ka *intI3* geeni esinemist (Ma jt., 2016). *IntI* geenide seas ongi enim levinud *intII* geenid, mida seostatakse peamiselt kliiniliste isolaatidega (Deng jt., 2015). *IntII* geenile järgnesid absoluutarvukuselt *intI2* ja *intI3* geenid. Seevastu osakaalult oli rohkem *intI3* kui *intI2* geene. Erinevus absoluutarvukuse ja osakaalude proportsioonide vahel võib tuleneda kasutatud programmi arvutusmetoodiliste vigade suurenemisest madalatel geeni kontsentratsioonidel.

Käesoleva bakalaureusetöö peamised järeldused on: (a) Nõo eksperimentaalne pinnasfiltersüsteem vähendas integronide sisaldust reovees; (b) sünteetiliste hõbeda nanoosakeste lisamine kontsentratsioonis 0,1 mg-Ag/l ei mõjutanud oluliselt integronide sisaldust vertikaalfiltrite väljavoolus ega filtermaterjalis; (c) absoluutarvukuselt leidis Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite väljavoolus ja filtermaterjalis enim *intII* geene, millele järgnesid *intI2* ja *intI3* geenid.

Kokkuvõte

Nanoosakeste mitmekülgsed kasutusvõimalused erinevates tööstusharudes tingivad nende suurema tootmise ja seeläbi jõuab neid aastast aastasse järjest rohkem keskkonda, kus nende käitumist on vähe uuritud. Nanoosakeste bakteritsiidsed omadused võivad mõjutada looduslikku mikroobikooslust ja aidata kaasa ARGide levikule keskkonnas. ARGide levikus on olulise tähtsusega mobiilsed geneetilised elemendid integronid, mida peetakse antropogeense mõju indikaatoriteks. Jälgides integronide sisalduse muutust reovees nanoosakeste juuresolekul, saab hinnata reoveepuhastussüsteemi, näiteks tehismärgala või pinnasfiltersüsteemi, puhastusefektiivsust ja nanoosakeste mõju ARGide levikupotentsiaalile mikroobikoosluses.

Käesolevas töös määrati integronide integraasi geenide *intI1*, *intI2* ja *intI3* sisaldus Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sissevoolus, väljavoolus ja filtermaterjalis kasutades kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni. Antud geenid on heaks indikaatoriks hindamaks antibiootikumresistentsuse levikut keskkonnas. Töö eesmärgiks oli uurida sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju *intI1*, *intI2* ja *intI3* geenide absoluutarvukusele ja osakaalule pinnasfiltersüsteemi bakterikoosluses.

Tulemustes võrreldi omavahel enne nanoosakeste lisamist 01.09.2014 võetud vee- ja filtermaterjali proove ja pärast nanoosakeste lisamist 06.10.2014 võetud vee- ja filtermaterjali proove. Antud töö katsete põhjal jõuti järeldustele, et Nõo reovees leidis absoluutarvukuselt kõige enam *intI1*, millele järgnes *intI2* ja kõige vähem määrati *intI3* geene. Sama jaotus esines nii vertikaalfiltrite väljavoolude kui filtermaterjali proovides. Nõo eksperimentaalne pinnasfiltersüsteem vähendas integronide absoluutarvukust reovees, kuid mitte nende osakaalu bakterikoosluses. Samuti leiti, et sünteetiliste hõbeda nanoosakeste lisamine kontsentratsioonis 0,1 mg-Ag/l, mis on lähedane prognoositavale nanoosakeste kontsentratsioonile reovees, ei avaldanud olulist mõju integronide sisaldusele vertikaalfiltrite väljavoolus ega filtermaterjalis.

ARE levikumehhanismide tundma õppimine on oluline antibiootikumresistentsete bakterite leviku piiramiseks. Nanoosakeste mõju bakterikooslusele on vähe uuritud, kuid arvestades, et nanoosakesed võivad soodustada ARGide levikut, on edasine uurimistöö vajalik. Käesolevas töös uuriti madalate nanoosakeste kontsentratsioonide mõju eksperimentaalse reoveepuhastussüsteemi mikroobikooslusele. Edaspidi võiks uurida eri tüüpi nanoosakeste koosmõju tehismärgala mikroobikoosluse liigilisele koosseisule ja ARGide esinemisele.

Tänuavaldused

Minu südamlik tänu töö juhendajale Kärt Kangerile suure pühendumise ja igakülge abistamise eest. Samuti tänan Jaak Truud bakalaureusetöö teema valiku suunamise ja üleüldise nõustamise eest ning Tartu Ülikooli Ökoloogia ja maateaduste instituudi geograafia osakonna keskkonna mikrobioloogia töögrupi liikmeid toetava suhtumise eest.

Kasutatud kirjandus

- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 8(4), 251–259.
- Aminov, R.I., 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* 11(12), 2970–2988.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(8), 1642–1645.
- Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J.L., 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology* 13(5), 310–317.
- Berglund, B., Khan, G.A., Wiesner, S.E., Ehde, P.M., Fick, J., Lindgren, P.-E., 2014. Efficient removal of antibiotics in surface-flow constructed wetlands, with no observed impact on antibiotic resistance genes. *Science of the Total Environment* 476–477, 29–37.
- Borkowska-But, A., Sionkowski, G., Walczak, M., 2014. Influence of stabilizers on the antimicrobial properties of silver nanoparticles. *Journal of Environmental Sciences* 26, 542–549.
- Chandrashekar, K.N., Yakkaldevi, A., 2015. Basic Concept of Biotechnology, 418 lk. LAXMI BOOK PUBLICATION, Solapur.
- Chen, J., Liu, Y.-S., Su, H.-C., Ying, G.-G., Liu, F., Liu, S.-S., He, L.-Y., Chen, Z.-F., Yang, Y.-Q., Chen, F.-R., 2015. Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in rural wastewater by an integrated constructed wetland. *Environmental Science and Pollution Research* 22(3), 1794–1803.
- Collis, C.M., Kim, M.-J., Patridge, S.R., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2002. Characterization of the Class 3 Integron and the Site-Specific Recombination System It Determines. *Journal of Bacteriology* 184(11), 3017–3026.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., Yu, G., 2015. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 14, 45.
- Durán, N., Durán, M., Bispo de Jesus, M., Seabra, A.B., Fávoro, W.J., Nakazato, G., 2016. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12(3), 789–799.

- Emerson de Lima Procopio, R., Reis da Silva, I., Martins, M.K., Lucio de Azevedo, J., Magali de Araujo, J., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious diseases* 16(5), 466–471.
- Fletcher, S., Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. *Environmental Health and Preventive Medicine* 20(4), 243–252.
- Fonder, N., Headley, T., 2013. The taxonomy of treatment wetlands: A proposed classification and nomenclature system. *Ecological Engineering* 51, 203–211.
- Gillings, M.R., 2014. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78(2), 257–277.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.-G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* 9(6), 1269–1279.
- Goldsmith, L.A., Katz, S.I., Gilchrest, B.A., Paller, A.S., Leffell, D.J., Wolff, K., 2012. Fitzpatrick's *Dermatology in General Medicine*, Eighth Edition, 1376 lk. Volume One, Chapter 230. Antibiotics. The McGraw-Hill Companies, New York.
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere* 75(4), 417–434.
- Larouche, A., Roy, P.H., 2011. Effect of attC structure on cassette excision by integron integrases. *Mobile DNA* 2, 3.
- Lippmaa, E., Kahru, A., 2010. Nanode ilu ja valu. *Horisont* 3, 8–14.
- Ma, Y., Metch, J.W., Yang, Y., Pruden, A., Zhang, T., 2016. Shift in antibiotic resistance gene profiles associated with nanosilver during wastewater treatment. *FEMS Microbiology Ecology* 92, 3.
- Maurer-Jones, M.A., Gunsolus, I.L., Murphy, C.J., Haynes, C.L., 2013. Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Analytical Chemistry* 85(6), 3036–3049.
- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 150(1), 5–22.
- Nõlvak, H., Truu, M., Tiirik, K., Oopkaup, K., Sildvee, T., Kaasik, A., Mander, Ü., Truu, J., 2013. Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships. *Science of the Total Environment* 461–462, 636–644.
- Perry, J.A., Wright, G.D., 2013. The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. *Frontiers in Microbiology* 4, 138.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27(1), 76–83.

- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37(6), e45.
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M.K., Grossart H.-P., 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology* 4, 47.
- Sharma, V.K., Johanson, N., Cizmas, L., McDonald, T.J., Kim, H., 2016. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere* 150, 702–714.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S., Fürhacker, M., 2014. Review: Issues of Silver Nanoparticles in Engineered Environmental Treatment Systems. *Water, Air, & Soil Pollution* 225(4).
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* 3, 119.
- Vymazal, J., 2010. Constructed Wetlands for Wastewater Treatment. *Water* 2(3), 530–549.
- Williams, S.T., Vickers, J.C., 1986. The Ecology of Antibiotic Production. *Microbial Ecology* 12(1), 43–52.
- Wu, H., Fan, J., Zhang, J., Ngo H.H., Guo, W., Liang, S., Hu, Z., Liu, H., 2015. Strategies and techniques to enhance constructed wetland performance for sustainable wastewater treatment. *Environmental Science and Pollution Research* 22(19), 14637–14650.

Lisa 1

Tabel L1. 16S rRNA absoluutarvukus Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltrite sissevoolus, väljavooludes (VV) ja filtermaterjalis (VF) vastavalt rakendatud töötlusele 1.09.2014 ja 6.10.2014 koos standardhällbega (n=2).

	1.09.2014		6.10.2014	
	Absoluutarvukus (VV - koopiat/ml) (VF - koopiat/g-KA)	Standard- hällve (n=2)	Absoluutarvukus (VV - koopiat/ml) (VF - koopiat/g-KA)	Standard- hällve (n=2)
Sissevool	$7,63 \cdot 10^8$		$1,84 \cdot 10^9$	
VV nano-Ag (VV 1 ja 4)	$7,07 \cdot 10^7$	$9,10 \cdot 10^7$	$1,67 \cdot 10^8$	$1,94 \cdot 10^8$
VV hõbenitrat (VV 2 ja 5)	$2,19 \cdot 10^7$	$1,90 \cdot 10^7$	$1,12 \cdot 10^8$	$1,41 \cdot 10^8$
VV kontroll (VV 3 ja 6)	$2,49 \cdot 10^7$	$2,62 \cdot 10^7$	$3,34 \cdot 10^7$	$2,72 \cdot 10^7$
VF nano-Ag (VF 1 ja 4)	$1,14 \cdot 10^9$	$5,31 \cdot 10^7$	$4,56 \cdot 10^9$	$1,26 \cdot 10^9$
VF hõbenitrat (VF 2 ja 5)	$7,51 \cdot 10^8$	$4,63 \cdot 10^8$	$4,54 \cdot 10^9$	$1,44 \cdot 10^9$
VF kontroll (VF 3 ja 6)	$7,98 \cdot 10^8$	$5,36 \cdot 10^8$	$3,22 \cdot 10^9$	$9,16 \cdot 10^8$

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Merilin Hoomatalo,

sünnikuupäev: 10.01.1993

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Sünteesiliste hõbeda nanoosakeste mõju integronide sisaldusele Nõo eksperimentaalses pinnasfiltersüsteemi vertikaalfiltris“, mille juhendaja on Kärt Kanger,
 - 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, 16.05.2016