

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
KEEMIA INSTITUUT
KOLLOID- JA KESKKONNAKEEMIA ÕPPETOOL

Laura Maria Kull

Erinevate reoveesete käitlustehnoloogiate mõju ravimijääkide sisaldusele reoveesetes

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogias (12 EAP)

Juhendajad Markus Raudkivi, MSc

Siiri Velling, PhD

Erinevate reoveesette käitlustehnoloogiate mõju ravimijääkide sisaldusele reoveesettes

Ravimijääkide sisaldus keskkonnas on viimaste aastakümnetega esilekerkinud probleem ja seetõttu on oluline hinnata erinevate allikate mõju keskkonnale. Töödeldud reoveesette potentsiaalne kasutus väetisena on üks võimalikest viisidest, kuidas ravimijäägid jõuavad keskkonda, tekitades sellega resistentsete bakteritüvede ohtu ja muid võimalikke keskkonnaprobleeme. Käesoleva bakalaureusetöö käigus analüüsiti SPE ja ASE meetodil ettevalmistatud erinevate käitlustehnoloogiatega reoveepuhastite setteproove HPLC-MS meetodiga ja määrati neis ravimijääkide hulka. Analüüsiti järgnevate ravimite jääke proovides: SMX, SDM, NOR, CIP, OFL, MFM, DIC ja CBZ.

Märksõnad: reoveesete, ravimijäägid, HPLC-MS

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

Effect of different wastewater treatment technologies on pharmaceutical residues in sewage sludge

The amount of pharmaceutical residues in the environment has emerged as a problem in the last few decades and therefore it is important to assess the effect it has on the environment. Using treated sewage sludge as a fertilizer can be one of potential sources of pharmaceutical residues to the environment, potentially resulting in increased microbial resistance and other environmental problems. As a part of this thesis, samples from various sludge treatment technologies prepared with SPE and ASE methods were analysed for pharmaceutical residues with HPLC-MS method. This work was focused on the following pharmaceuticals: SMX, SDM, NOR, CIP, OFL, MFM, DIC and CBZ.

Keywords: sewage sludge, pharmaceutical residues, HPLC-MS

CERCS: T270, Environmental technology, pollution control

Sisukord

1. Sissejuhatus.....	5
2. Kirjanduse ülevaade.....	6
2.1. Reoveesette kasutamine väetisena	6
2.2. Ravimid ja ravimijäägid.....	7
2.2.1. Antimikroobne resistentsus (AMR).....	8
2.2.2. Uuritavad ravimijäägid	8
2.3. Ravimijääkide jõudmine keskkonda	11
2.3.1. Reoveepuhastite võimekus.....	12
2.4. Ravimijääkide määramine, ravimite muutumine	14
2.4.1. Ravimijäägid Eestis	14
2.5. Varasemad uuringud	15
3. Metoodika	18
3.1 Maatriksiefekt	19
4. Tulemused ja arutelu.....	20
4.1. Üldised tulemused.....	20
4.2. Humifikatsiooni mõju ravimijääkidele.....	23
4.3. Ravimijääkide sisaldused lõpp-produktides.....	24
4.4. Võrdlus varasemate uuringutega ja järeldused.....	25
Kokkuvõte.....	28
Summary	29
Tänuavaldused	30
Kasutatud kirjandus	31
Lisad.....	38
Lisa 1. Analüütide retentsiooniajad HPLC-s kasutatud metoodika puhul.....	38
Lisa 2. SMX-i kalibreerimisgraafik	38

Kasutatud lühendid

AMR – antimikroobne resistentsus (*Antimicrobial Resistance*)

ASE – kiirendatud solvendi ekstraheerimine (*Accelerated Solvent Extraction*)

CBZ – karbamasepiin (*Carbamazepine*)

CIP – tsiprofloksatsiin (*Ciprofloxacin*)

DIC – diklofenak (*Diclofenac*)

HPLC-MS – kõrgefektiivne vedelikkromatograafia-massispektromeetria (*High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

KA – kuivaine (*DS – Dry Solids*)

MFM – metformiin (*Metformin*)

NOR – norfloksatsiin (*Norfloxacin*)

OFL – ofloksatsiin (*Ofloxacin*)

RVP – reoveepuhasti (*WWTP – wastewater treatment plant*)

SDM – sulfadimetoksiin (*Sulfadimethoxine*)

SMX – sulfametoksasool (*Sulfamethoxazole*)

SPE – tahke faasi ekstraheerimine (*Solid Phase Extraction*)

1. Sissejuhatus

Inimkonna arenemise ja ressursside vähenemise valguses on inimesed sunnitud vaatama aina enam ressursside taaskasutuse ja ringmajanduse poole. Ringmajanduse üks olulisemaid lülisid on jäätmete, sealhulgas reovee ja sette, taaskasutus. Juba pikka aega on reoveesetet kasutatud väetisena tänu selle kõrgele fosfori ja lämmastiku sisaldusele. Viimastel aastatel on kasutamist aga hakatud piirama seoses tegevuse võimaliku negatiivse mõjuga keskkonnale. Juba mitukümmend aastat tagasi mõisteti, et kasutatud väetises võis leida murettekitavas sisalduses raskmetalle ja patogeene, mis mõjutasid keskkonda. Praegusel ajal avastatakse aina rohkem seda sama ka ravimijääkide, teiste orgaaniliste mikrosaasteainete ja mikroplastide kohta.

Selleks, et setet saaks siiski kasutada väetisena, on traditsioonilistele saasteainetele kehtestatud piirnormid, millest alla poole jäädes, ei tohiks väetis keskkonnale ohtu valmistada. Mikrosaasteainete eemaldamine või puhta fosfori tootmine on aga keerulised ja kallid protsessid, mis tõttu ei saa väikesed reoveepuhastid endale finantsiliselt selliseid võimalusi luua (Cornel ja Schaum, 2009). Sellepärast on neile tihti tehtud erandeid, nagu näiteks Saksamaal ja Austrias, kus sette otsekasutus on keelatud suurtele reoveepuhastitele, kuid väiksematele see määrus ei kehti (European Sustainable Phosphorus Platform, 2017a).

Uuematele saasteainetele, nagu ravimijäägid, aga puuduvad seaduses kehtestatud piirnormid, kuna riikidel puudub piisav ülevaade ravimijääkide püsivusest ja mõjust keskkonnale. Lisaks on ravimijääkide analüüs kulukas ning keeruline on otsustada, milliseid arvukatest orgaanilistest mikrosaasteainetest tuleks määrata. Kui patogeenide puhul on niinimetatud indikaatororganismideks võetud bakterite jaoks *E. coli* ja parasiitide jaoks helmindid, siis mikrosaasteainete puhul pole suudetud kokku leppida indikaatoreid, mille määramise kaudu saaks hinnata üldist mikrosaasteainete taset (Riigi Teataja, 2019). Piirangute puudumise tõttu nende kogust reovees ja settes igapäevaselt ka ei mõõdeta, seega on raske hinnata ravimijääkide hulka ja ohtlikkust otsekasutusel. Kuna väikeste reoveepuhastite parim võimalus setet kasutada on praegu jätkuvalt selle otsekasutus väetisena, siis on vaja teada, kas ja kui palju on ravimijääke puhastite settes ja kas see võib ohustada keskkonda.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli (1) analüüsida Eestis levinumate settekäitlusmeetodite efektiivsust ravimijääkide eemaldamisel settest ja (2) väikelinna puhastis toodetud reoveesetekomposti ohu hindamine ravimijääkide keskkonda sattumise kontekstis.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Reoveesette kasutamine väetisena

Reoveesete on reovee bioloogilisel käitlemisel tekkinud baktermass, mis reoveepuhastuse lõppfaasis veest eraldatakse ja tihendatakse. Euroopas toodetakse setet üle 10 miljoni tonni KA. Eestis toodeti aastal 2016 rohkem kui 18 tuhat tonni reoveesetet (Eurostat, 2020). Peamised sette utiliseerimismeetodid on otsekasutus (põllumajandusmaal kasutamine, haljastus ja rekultiveerimine), prügilasse või puhasti territooriumile ladestamine ning tuhastamine ja tuha ladestamine. Reoveesette kasutamine põllumajanduses on suure huvi all tänu selle kõrge toitainesisalduse ja mulda parandavate omaduste tõttu, mis on kasulikud taastamiseks ülekasutatud põllumaad ning tõstmaks mulla huumuse sisaldust ja veesidumisvõimet. 53% reoveesetest Euroopa Liidus taaskasutatakse põllumajanduses koheselt või pärast komposteerimist (Verlicchi ja Zambello, 2015).

Üks olulisemaid toitaineid reoveesettes on fosfor – taimede elutegevuseks hädavajalik toitaine, samas aga vesikeskkonda sattudes üks eutrofikatsiooni peamisi põhjustajaid. Fosfor on väga piiratud ja kõrge nõudlusega loodusvara – enamasti Euroopas kasutatud fosforit imporditakse siia väljastpoolt, näiteks Marokost (Hatim, 2020). Nõudlus fosfori järele lähitulevikus ootuste koheselt ainult suureneb ja ressursi piiratuse tõttu muutub aina olulisemaks selle efektiivne kasutamine ja taaskasutus. Euroopas kaob fosfor toiduahelast sõnniku, inimväljaheiteina või orgaaniliste jäätmadena. Nii võib fosfor jõuda veekogudesse ja põhjustada eutrofikatsiooni (European Sustainable Phosphorus Platform, 2017b).

Kuna fosfor on peamine limiteeriv toitaine veekeskkonnas, siis võib lisatud fosfor lüüa paigast veekogu loomuliku tasakaalu, vähendades vee kvaliteeti, liigirikkust ja ohustades inimeste tervist (Schaum, 2018). Seetõttu on reoveepuhastites ranged piirväärtused, kui palju fosforit võib heitvees olla – Eestis suuremate kui 10 000 ie (inimekvivalenti) reoveepuhastite puhul on see 0,5 milligrammi fosforit liitri vee kohta (Riigi Teataja, 2012). Kuna heitvees tohib fosforit olla väga väheses koguses, kasutavad puhastid erinevaid protsesse, et fosfor settesse kas bioloogiliselt siduda või kemikaalidega reoveest välja sadestada. Tänu sellele on settes palju fosforit, mida on potentsiaalselt võimalik uuesti kasutusse võtta (Cornel ja Schaum, 2009).

Varasematel aastakümnetel on suurel hulgal nii töödeldud kui ka töötlemata reoveesetet kasutatud otse põllumaal. Viimastel aastatel on aga inimkonna teadlikkus erinevates anorgaanilistest ja orgaanilistest saasteainetest reovees ja settes tõusnud. Vähendamaks võimalikku keskkonna ohustamist, on vähenenud ka selline sette kasutus (Egle *et al.*, 2016). Potentsiaalsed ohud reoveesettes on teadaolevalt olnud raskmetallid, polüklooritud bifenüülid, naftasaadused, bakterikolooniad ja muud orgaanilised ja anorgaanilised saasteained. Viimastel aastakümnetel on ka mõistetud mikroplastide, ravimijääkide ja teiste orgaaniliste mikrosasteainete ohtlikkust. Otsekasutuse vähenemisel tuleb leida alternatiivseid võimalusi fosfori ärastamiseks reoveesetest. Üks tähtsamaid fosfori ärastusmeetodeid on tuhastamine ja fosfori kätte saamine tuhasta. Teine potentsiaalne võimalus on fosfori sadestamine reoveesetest struviidi või hüdroksüapatiidina. Väiksematel reoveepuhastitel pole aga kasumlik investeerida vastavatesse tehnoloogiatesse (Cornel ja Schaum, 2009). Väiksemate reoveepuhastite parim võimalus reoveesetest vabanemiseks on seetõttu jätkuvalt kompostina kasutus. Seega on vaja teada rohkem saasteainete – sealhulgas ravimijääkide – kohta, mis sette sobilikkust väetisena vähendada võivad.

2.2. Ravimid ja ravimijäägid

Ravimid on igasugused ained või ainete kombinatsioonid, mis avaldavad mõju organismidele (Ravimiamet, 2016). Ravimeid jagatakse nende mõju järgi mitmeteks alarühmadeks, nagu näiteks antibiootikumid, analgeetikumid, mittesteroidsed põletikuvastased, antiepileptilised, depressioonivastased, diabeedivastased ja viirusevastased ravimid (Kümmerer, 2008).

Maailmas on üle 13 000 erineva ravimi, millest umbes pooled on rahvusvaheliselt heakskiidetud (Wishart, 2006). Eestis turustati aastal 2018 üle 4000 erineva ravimipakendi ja kokku üle 1300 erineva toimeainega ravimeid. Ravimite tarbimine on pidevas tõusutrendis tänu ravimite arengule, elatustaseme tõusule, inimeste harjumuste muutumisele ja uutele haigustele (Ravimiamet, 2019a).

Kui ravimid või nende jäägid satuvad mulda, võivad nad mõjutada mulla loomulikke mikroobikooslust ja funktsioone, akumulieruda taimedes, jõuda põhjavette või sattuda toiduahelasse (Thiele-Bruhn, 2003; Monteiro ja Boxall, 2010). Juba väike hulk ravimeid või ravimijääke igapäevases toidus võib tekitada resistentsete mikroorganismide tüvesid inimeste ja loomade organismides (Brillas ja Sirés, 2015).

Ravimijääkide jõudmine toiduahelasse on juba näidanud ohtlikku mõju looma- ja linnuliikidele. Näiteks on täheldatud India ja Pakistani raisakotkaste populatsiooni vähenemist diklofenaki tarbimisest saadud neerukahjustuste tõttu (Oaks *et al.*, 2004). Kõige suurema riskiga ühendid, mida on leitud settega rikastatud mullast, on triklosaan, triklokarbaan, hormoonid ja antibiootikumid (Verlicchi ja Zambello, 2015).

2.2.1. Antimikroobne resistentsus (AMR)

Antibiootikumide liigne tarbimine ja jõudmine keskkonda võib tekitada bakterites antimikroobset resistentsust. AMR on mikroorganismide (nagu nt. bakterite) võime muutuda vastupanuvõimeliseks antimikroobsete ainete vastu, mille suhtes olid nad varem vastuvõtlikud. AMR tekib loodusliku valiku ja geenimutatsiooni tagajärjena ning on geneetiliselt järglastele päranduv. Seda protsessi kiirendab teatud käitumine, nagu vale või liigne antimikroobsete ainete tarbimine inim- ja veterinaarmeditsiinis, poollelijäetud ravimikuurid ning halvad hügieeningimused ja -harjumused tervishoius (Euroopa Komisjon, 2017).

AMR on loomulik protsess, mida on täheldatud juba esimestest antibiootikumidest saati. Viimastel aastakümnetel on see aga muutunud suuremaks probleemiks antimikroobsete ainete ülekasutuse tõttu, kiirendades sellega resistentsuse teket ja levikut. Samal ajal resistentsuse tõusuga ei suudeta aga tulla piisavalt kiiresti välja uute ravimitega. Kuni aastani 2016 oli nimelt viimane uus antibiootikumide klass avastatud 1980ndatel, kuna uute antibiootikumide leidmine on raske ja majanduslikult mittetulutoov tegevus (Hover *et al.*, 2018). Aastal 2020 avastati tehisintellekti abil taas uus antibiootikum (Stokes *et al.*, 2020). Siiski pole avastuste hulk hetkel piisavalt kiire, arvestades resistentsuse laia levikut. AMRi tõusu tõttu on arstid sunnitud kasutusele võtma ravimeid, mida nende halbade kõrvalmõjude tõttu varasemal ajal ei kasutatud. Antimikroobne resistentsus põhjustab Euroopa Liidus aasta üles 25 000 inimese surma ja hinnatakse, et aastaks 2050 võib see põhjustada rohkem surmasid kui vähk (üle 10 miljoni aastas) (O'Neill, 2016).

2.2.2. Uuritavad ravimijäägid

Nagu varasemalt mainitud, on erinevaid ravimite toimeaineid tuhandeid, mis muudab keeruliseks ka nende analüüsi. Paljude eri ravimijääkide hulka korraga proovis määrata on samuti raske, kuna oma eri struktuuride ja omaduste tõttu, võivad need käituda analüüsil väga erinevalt.

Ravimijääkide määramisel kasutatakse tihti ühe indikaatorainena diklofenaki selle laia kasutuse ja leviku tõttu. Sulfoonamiide ja fluorokinoloone on LC-MS meetodil palju uuritud tänu nende heale väljajoonistuvusele vedelikkromatograafis. Samuti on tegu antibiootikumidega, mille saatus keskkonnas pakub töös eelnevalt mainitud põhjustel palju huvi. Järgnevates alapeatükkides on välja toodud mõnede käesoleva töö jaoks oluliste ravimite kirjeldus ja mõju.

Sulfoonamiidid (SDM, SMX)

Sulfoonamiidid ehk sulfaniilamiidid on antibakteriaalse toimega ravimid, mida kasutatakse nii tablettide, haavasalvide, pulbrite kui ka tilkadena. Sulfoonamiidid toimivad bakteriostaatiliselt ehk peatavad mikroobide paljunemise. Suure koguse sulfoonamiidide tarbimine võib kahjustada neere ja vereloomet (Kahn ja Loit, 2009).

- *Sulfametoksasool ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$)*

Sulfametoksasool (SMX) on antibiootikum keemilise nimetusega 4-amino-N-(5-metüül-3-isoksasolüül)-benseensulfoonamiid. SMX on leitav paljudes ravimites tihti koos trimetoprimiga ja kasutatakse enamasti võitlemaks bakterite vastu, mis põhjustavad bronhiiti, prostatiiti ja kuseteede infektsioone. SMX-i kasutatakse peamiselt inimeste raviks, kui on vahel kasutusel ka veterinaarias (Wishart, 2006; Royal Society of Chemistry, 2020h).

- *Sulfadimetoksiin ($C_{12}H_{14}N_4O_4S$)*

Sulfadimetoksiin (SDM) on SMX-ile keemiliselt sarnane ühend nimetusega 4-amino-N-(2,6-dimetoksüpürimidiin-4-üül)-benseen-1-sulfoonamiid. SDM-i kasutatakse bakteriaalsete hingamisteede, kuseteede, pehmete kudede ja sooleinfektsioonide vastu võitlemiseks. Peamiselt kasutatakse seda veterinaarmeditsiinis, aga mõningates riikides, nagu näiteks Venemaal on SDM populaarne käsimüügiravim ka inimestele (Wishart, 2006; Royal Society of Chemistry, 2020g).

Fluorokinolonid (CIP, NOR, OFL)

Fluorokinolonid on grupp sünteetilisi ravimeid, mida kasutatakse nii inim- kui ka veterinaarravis (Lillenberg, *et al.*, 2010). Fluorokinolonid jäävad keskkonda pikaks ajaks. Ühe degradeerumist aeglustava põhjusena tuuakse välja ainete tugev adsorbeerumine sõnnikule ja mullale (Mengozi

et al., 1996). Kõigil kolmel töös uuritud fluorokinoloonil on Eestis müügiluba ja aastas kasutab neid umbes 50 000 inimest (Ravimiamet, 2018).

- *Tsiprofloksatsiin* ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$)

Tsiprofloksatsiini (CIP) ametlik nimetus on 1-tsüklopropüül-6-fluoro-4-okso-7-(piperasiin-1-üül)-1,4-dihüdrokinoliin-3-karboksüülhape. CIP on teise põlvkonna fluorokinoloon, millel on suures koguses derivaate paljude erinevate bakteriaalsete haiguste vastu. Näiteks kasutatakse CIP-i derivaate bakteriaalsete naha, liigeste ja luude, alumiste hingamisteede, raskete kõhusiseste infektsioonide ja sarvkesta haavandite ravimiseks (Wishart, 2006; Royal Society of Chemistry, 2020b). CIP on antibiootikumi enrofloksatsiini metaboliit. Enrofloksatsiini antimikroobne võime muutub tugevamaks tänu sünergismile tsiprofloksatsiiniga (Mengozi *et al.*, 1996; Lillenberg, Litvin, *et al.*, 2010).

- *Norfloksatsiin* ($C_{16}H_{18}FN_3O_3$)

Norfloksatsiin (NOR) on tugev sünteetiline fluorokinoloon, millel on laiatoimeline antibakteriaalne toime. NOR-i IUPAC-i nimetus on 1-etüül-6-fluoro-4-okso-7-(piperasiin-1-üül)-1,4-dihüdrokinoliin-3-karboksüülhape ja seega molekuli poolest sarnane CIP-ile. NOR inhibeerib bakteri DNA replikatsioon sidudes ennast DNA güraasi külge ja on kasutuses nii inim- kui ka veterinaarmeditsiinis bakteriaalsete kuseteede infektsioonide raviks (Wishart, 2006; Royal Society of Chemistry, 2020e).

- *Ofloksatsiin* ($C_{18}H_{20}FN_3O_4$)

Ofloksatsiin (OFL) on nagu NOR sünteetiline fluorokinoloon, mis inhibeerib DNA güraasi ja replikatsiooni. Selle antibiootikumi IUPAC-i nimetus on 9-fluoro-2,3-dihüdro-3-metüül-10-(4-metüülpiperasiin-1-üül)-7-okso-7H-pürido[1,2,3-*d*][1,4]bensoksasiin-6-karboksüülhape. OFL-i kasutatakse bakteriaalsete hingamisteede, maksa, naha, pehmete kudede, kuseteede ja gonorröa infektsioonide raviks. Ofloksatsiin lahkeb kehast 65–80 protsendi ulatuses muutumatul kujul uriinina 48 tunni jooksul pärast ravimi võtmist (Wishart, 2006; Royal Society of Chemistry, 2020f).

Teised paljukasutatud ravimid (MFM, DIC, CBZ)

Ülejäänud käesolevas töös uuritud ravimid ei ole valuvaigistid ja seetõttu erinevad eelnevatest molekuli struktuuri ja omaduste poolest. Nii metformiini, diklofenaki kui ka karbamasepiini puhul on tegu laialt levinud ravimitega nii Eestis kui ka mujal maailmas.

- *Metformiin (C₄H₁₁N₅)*

Metformiin (MFM) on biguaanidide hulka kuuluv ravim nimetusega 1,1-dimetüülbiguaanid. MFM on diabeediravim, mis aitab vähendada glükoosisaldust veres II tüüpi diabeedi puhul. Vahel tarbitakse seda kombinatsioonis insuliiniga (Drugs.com, 2020c; Royal Society of Chemistry, 2020d). Metformiin on massi põhjal üks enim müüdutest ravimitest Eestis (Ravimiamet, 2019a).

- *Diklofenak (C₁₄H₁₁Cl₂NO₂)*

Diklofenak (DIC) on fenüüläädikhape täisnimetusega 2-((2,6-diklorofenüül)amino)fenüüläädikhape. DIC toimib mitteselektiivse tsüklooksügenaasi (COX) inhibiitorina ja tundub inhibeerivat ka bakteriaalse DNA replikatsiooni. Samuti on täheldatud sünergismi antibiootikumidega (Salem-Milani *et al.*, 2013; Royal Society of Chemistry, 2020c). Diklofenak on laialdaselt kasutatud põletikuvastase toimega ja valu leevendav ravim (Drugs.com, 2020b).

- *Karbamasepiin (C₁₅H₁₂N₂O)*

Karbamasepiin (CBZ) on krambivastane karboksamiidi derivaat, mida kasutatakse epilepsia ja kolmiknärv neuralgia raviks. Selle IUPACi nimetus on 5H-dibenso[b,f]asepiin-5-karboksamiid. CBZ-il on analgeetiline mõju ja seda kasutatakse ka bipolaarse häire ravimiseks (Drugs.com, 2020a; Royal Society of Chemistry, 2020a). Karbamasepiin ei ole ise antibiootikum, kuid hiljutine uuring on näidanud, et CBZ võib kiirendada antimikroobset resistentsust bakterites (Wang *et al.*, 2019).

2.3. Ravimijääkide jõudmine keskkonda

Ravimijääkide allikateks reovees on lisaks inimeste väljaheidete veel ravimifirmade, majapidamiste, loomakasvatuse, prügimägede ja haiglate (sh veterinaarmeditsiini) jäätmed. Loomakasvatuses söödetakse loomadele kasvustimulante ja antibiootikume, millest viimased väljuvad loomadest uuringute põhjal 75–90% muutmata kujul või metaboliitidena. Saadud

sõnnikut kasutatakse põldudel tihti töötlemata kujul väetisena ja nii jõuavad väga kõrge kontsentratsiooniga ravimijäägid mulda ja ka põhjavette (Kümmerer, 2008; Lillenberg, Litvin, *et al.*, 2010; O'Neill, 2016).

Väga suur hulk ravimeid satub keskkonda ka kodumajapidamises kasutatavate ravimite vales käitlemisest, kus aegunud ravimitest ei vabaneta nõuetekohaselt. Enamikes riikides on aegunud ravimite jaoks mõeldud spetsiaalsed konteinerid jäätmejaamades ja -keskustes. Samas on uuringud näidanud, et näiteks kolmandik Saksamaal ja neljandik Austrias müüdüd ravimitest visatakse olmejäätmetesse või lastakse kraanist alla, mis omakorda suurendab ka reoveepuhastusjaamade koormust (Kümmerer, 2008).

Nii reovesi kui -sete võib sisaldada suurt hulka orgaanilisi (sealhulgas mikroorganisme ja viiruseid) ja anorgaanilisi ühendeid, mis eemaldatakse vedelast faasist puhastuse käigus (Verlicchi ja Zambello, 2015). Erinevatest uuringutest on selgunud, et ravimijääke reoveepuhastid täielikult eemaldada ei suuda. Ebaefektiivne ravimijääkide eemaldamine võib aga tekitada ravimite ja nende metaboliitide ülekülluse pinnases, taimedes ning põhja-, pinna- ja joogivees, kus ravimijääkide sisaldus võib olla nanogrammidest mikrogrammideni liitri kohta (Lillenberg, Litvin, *et al.*, 2010; Sirés ja Brillas, 2012; Brillas ja Sirés, 2015).

2.3.1. Reoveepuhastite võimekus

Reoveepuhastisse jõudes on ravimite edasisel käekäigul kolm peamist stsenaariumit:

- ühend on kergesti lagundatav ja laguneb reoveepuhastusprotsessi käigus täielikult CO₂-ks ja veeks;
- ühend on lipofiilne ja ei lagune kergelt, vaid akumulereb muutumatuna aktiivmudas;
- ühend metaboliseeritakse hüdrofiilsemaks aineks, kuid ei degradeeru täielikult, vaid liigub muutmata kujul läbi puhastusjaama ja siseneb veekeskkonda (Lillenberg, Litvin, *et al.*, 2010). Olenevalt ravimist, realiseerub viimane stsenaarium 12–90% ravimitest (Stumpf *et al.*, 1999).

Bioloogilised reoveepuhastussüsteemid ei ole efektiivsed ravimijääkide eemaldajad. Joss *et al.* poolt tehtud uuringus tuli välja, et 35-st uuritud ühendist vaid neli degradeerus enam kui 90% ja 17 ravimit suudeti eemaldada vähem kui 50% (Joss *et al.*, 2006).

Saasteainete sisaldused reoveesettes on tugevalt mõjutatud sissevoolu omadustest, sette omadustest (pH, orgaanilise aine ja kationide sisaldus), läbitud reovee- ja settekäitlusest ning puhasti tingimustest. Mikroorganismid moodustavad enamuse liigmuda hõljuvainest, samas kui toormuda sisaldab vähem mikroorganisme ja suuremat rasvafraktsiooni (Ternes *et al.*, 2004).

Nii keemilised kui ka termaalsed sette eeltötlused enne anaeroobset kääritamist ei paranda oluliselt ravimijääkide sorbeerumispotentsiaali. Põhjus võib peituda selles, et eeltötlus võib vähendada uuritud ainete biosaadavust (termaalsete protsesside puhul) või ained on nii tugevalt adsorbeerunud settele, et oksüdeerimine ei mõjutan neid (keemilise töötlemise puhul) (Verlicchi ja Zambello, 2015).

Tähtsaim ravimite eemaldusprotsess reoveesetest on sette anaeroobne lagundamine (tavaliselt metaankääritis). Anaeroobse töötlemise puhul varieerub lagundatus ravimiliigiti ja isegi sama klassi ravimite vahel. Ravimite ärastuse puhul mängib suurt rolli ka metaankäärituse temperatuur. Mesofiilsete (35-37°C) tingimuste juures oli ravimite lagunemine märgatav, samas kui termofiilsetel (55°C) tingimustel oli ravimijääkide eemaldamine peaaegu täielik (Ileleji, Martin ja Jones, 2015). Seega, mida kõrgemal temperatuuril anaeroobne lagundamine läbi on viidud, seda väiksem on saaduse ravimijääkide sisaldus (Youngquist, Mitchell ja Cogger, 2016). Käesolevas töös uuritud sulfametoksasool ja sulfadimetoksiin on varasemates uuringutes näidanud metaankääritusel täielikku lagunemist (Mohring *et al.*, 2009).

Mehhaanilise veetustamise protsessid (tsentrifuug, filterpress) ei mõjuta ravimijääkide sisaldust reoveesettes, kuna need protsessid vähendavad vaid sette veesisaldust ja ei lagunda aineid (Mailler *et al.*, 2015).

Efektiivseks ravimijääkide eemaldamise viisiks peetakse näiteks süvaoksüdatsiooniprotsesse (ingl. k *advanced oxidation processes* ehk AOP), mida peetakse keskkonnasõbralikeks tehnoloogiateks, kuna protsessi käigus ei lisata keskkonnale ohtlikke lisandeid. AOPid on keemilised, fotokeemilised ja elektrokeemilised meetodid, mis genereerivad *in situ* väga tugevalt oksüdeerivat agendi hüdroksüülradikaali ($\bullet\text{OH}$). Hüdroksüülradikaal suudab lõhkuda enamik orgaanilisi struktuure ja seeläbi mineraliseerida ühendid CO_2 -ks, H_2O -ks ja anorgaanilisteks ionideks (Brillas ja Sirés, 2015). Samas on nende protsesside kasutamine reoveepuhastites harv, kuna süvaoksüdatsiooniprotsess nõuab palju energiat ning on seetõttu väga kõrgete ülalpidamiskuludega. Kuna orgaaniliste mikrosaasteainete oht on aina aktuaalsem, võttis näiteks

Šveits vastu otsuse, et kõigile suurematele puhastitele lisatakse nende ainete lagundamiseks tertsiaalne puhastus (näiteks AOP). Ettevõtmise elluviimiseks kehtestati šveitslastele aastani 2040 üheksa šveitsi frangi suurune (umbes 8,5 eurot) reoveemaks, mis rahastab 75% projekti kogumaksumusest (Eawag, 2015).

2.4. Ravimijääkide määramine, ravimite muutumine

Uuringutest on ilmnenu, et antibiootikumide kasutamine on üldiselt korrelatsioonis ravimiresistentsete haigustekitajate levimusega samas riigis. AMR-i esineb vähem maades, kus kasutatakse ka vähem antibiootikume. Fluorokinoloonide suuremat kasutust on seostatud näiteks bakterite *E. coli* ja *K. Pneumoniae* suurema levimusega. Ravimiresistentsete grampositiivsete patogeenide esinemissagedus Euroopas on viimastel aastakümnetel stabiliseerunud ja kohati vähenenud. Samas gramnegatiivsete bakterite puhul on nähtud tõusutrendi nii Euroopas kui ka Eestis (Ravimiamet, 2015).

2.4.1. Ravimijäägid Eestis

Eestis turustati 2018. aastal kokku 4292 erinevat ravimipakendit (Ravimiamet, 2019a). Antibiootikumide kasutus Eestis on viimase paarikümne aasta jooksul olnud üsna stabiilne ja Euroopas üks väiksemaid. Vähenenud on sufoonamiidide, suurenenud aga fluorokinoloonide kasutus. Valuvaigistite kasutamine on sama aja vältel ühtlaselt suurenenud, samas kui diklofenaki kasutamise kõrgaeg tipnes 2000ndete algul, kuid on jätkuvalt populaarne analgeetikum. Kokkuvõttes tarbitakse Eestis siiski valuvaigisteid vähe. Epilepsivastastest ainetest on karbamasepiin Eestis kõige enam kasutatud ravim ja selle kasutuse hulk on viimastel aastakümnetel olnud stabiilne. Diabeediravimite kasutus on tõusnud diabeedihaigete arvu kasvuga. Tableti kujul on neist Eestis selgelt kõige enam kasutusel metformiin ja selle kasutuse trend on läbi aastate olnud tõusvas joones (Ravimiamet, 2015).

Tuhande täisealise Eesti elaniku seas tehtud uuring leidis, et 35% eestlastest tarbib aastas antibiootikume; 56% vastanutest uskus, et antibiootikumid tapavad viiruseid ja 18% ei osanud teema osas seisukohta võtta (Hillep *et al.*, 2015). Võib järeldada, et kuigi Eestis tarbitakse teiste Euroopa riikidega võrreldes vähem antibiootikume, tehakse seda tihti valedel põhjustel (antibiootikumid ei ravi viirushaiguseid) ja seega on kasutus Eesti elanike seas ilmselt liigne.

Ravimiameti statistika põhjal manustavad eestlased aastas 3 kg OFL-i, 60 kg NOR-i, 386 kg DIC-i, 1000 kg CBZ-i, 20 000 kg MFM-i ja 17 liitrit CIP-i. SMX-i kombinatsioonis trimetoprimiga müüdi inimeste raviks 763 liitrit ja veterinaarravimina 218 kg. SDM on Eestis olnud kasutusel pigem veterinaarravimina ja selle kasutuse kohta pole Ravimiamet viimased 15 aastat andmeid avaldanud (Ravimiamet, 2019b, 2019a).

Eestis võib reoveesetest valmistatud toodet kasutada:

- põllumajandusmaal, mida kasutatakse põllumajandustoodete tootmiseks või lühikese raieringiga madalmetsa kasvatamiseks;
- haljastuse rajamiseks või parandamiseks;
- rekultiveerimisel kaevandamise või muuga rikutud maa-alal või prügilate katmiseks.

Maal, kus on kasutatud sellist toodet, ei tohi aasta jooksul kasvatada köögivilja- või marjakultuure ja ravim- või maitsetaimi. Ka ei tohi seal kahe kuu jooksul karjatada loomi või varuda loomasööta (Riigi Teataja, 2017).

Reoveesetele sarnaselt kasutatakse väetisena tihti sõnnikut. Euroopa Liidus on soovitatavad piinormid sõnnikus 100 µg/kg ja sõnnikuga väetatud mullas 10 µg/kg (Lillenberg, 2011). Erinevalt reoveesetest, on sõnniku kasutamise piirangud oluliselt leebemad ja tihti läheb väetisena kasutusse töötlemata sõnnik. Arvestades loomakasvatuses kasutatavate ravimite hulka, on seega võimalik, et läbi sõnniku jõuab pinnasesse palju rohkem ohtlikke ravimijääke kui sette kaudu.

2.5. Varasemad uuringud

Antibiootikumide ja teiste ravimijääkide sisaldust reoveesettes, kompostis, sõnnikus, vees, mullas, taimedes, loomades ja loomatoidus on viimastel aastakümnetel hakatud aina enam uurima, kuid täielik ülevaade tänu valdkonna suurusele ja keerukusele puudub. Reoveesete igas faasis tehtud uuringutes vaadatud ravimijääkide hulgas tulevad kõrgete kontsentratsioonidega esile just antibiootikumid ja valuvaigistid (Verlicchi ja Zambello, 2015). Sulfoonamiidide puhul on täheldatud olenevalt aineast kas peaaegu täielikku või väga head lagunemist reoveepuhastites (Pérez, Eichhorn ja Aga, 2005; Mohring *et al.*, 2009).

Tabelis 1 on toodud erinevates uuringutes leitud antibiootikumide ja valuvaigistite kontsentratsioonid reoveesettes puhastamise eri staadiumites. Ravimijääkide sisalduste vahemikud varieeruvad mitme suurusjärgu võrra.

Tabel 1. Täheldatud ravimijääkide sisalduste vahemikud uuringutes ($\mu\text{g}/\text{kg}$ kuivaine kohta) (Verlicchi ja Zambello, 2015)

Sette tüüp	Toormuda	Liigmuda	Kääritatud	Komposteeritud	Kuivatatud
Antibiootikumid	5–4000	0,1–70000	1–8000	0,8–200	8–100
Analgeetikumid	3–10000	1–1000	4–1000	0,1–1000	5–300

Toormudas on fluorokinoloonide puhul varasemates uuringutes täheldatud norfloksatsiini sisaldust vahemikus 1700–4200 ng/g KA ja tsiprofloksatsiini I vahemikus 2000–4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KA (Lindberg *et al.*, 2006).

Liigmudas on ravimijääkide (sh diklofenak, norfloksatsiin, ofloksatsiin, sulfametoksasool) kontsentratsioonid uuringutes erinenud kuni 3–4 suurusjärgu võrra. Suur erinevus tuleb ilmselt bioloogilise puhastuse etapi erinevatest võimalikest konfiguratsioonidest anoksilistes, aeroobsetes ja anaroobsetes etappides; süsiniku, lämmastiku ja fosfori ärastusmääradest ning muda vanuse (SRT) väärtustest (Verlicchi ja Zambello, 2015). Samuti on täheldatud suurt ravimijääkide sisalduse muutust aastaajati – talvel gripihooajal võib ravimijääkide hulk reovees ja settes olla 3–5 korda kõrgem kui muul ajal (Vieno, Tuhkanen ja Kronberg, 2005). Mudas enne metaankääritust on leitud ravimijääke (sh diklofenak ja ofloksatsiin) sisalduses vahemikus 60–270 ng/g kuivaine kohta (Verlicchi ja Zambello, 2015). Erinevate settekäitlusprotsesside tulemusena on täheldatud enamiku ravimite sisalduse vähenemist. Anaeroobne käitlemine tundub olevat efektiivsem ravimijääkide eemaldaja kui aeroobne käitlus, mis võib olla seetõttu, et paljud ravimid desorbeeruvad anaeroobses faasis ja saavad seega võtta osa biolagunemise reaktsioonidest (Verlicchi ja Zambello, 2015).

Kompostimine on pikemaajalisem protsess, mille jooksul biolagunevad mitmesugused orgaanilised ühendid, sealhulgas uuritavad orgaanilised saasteained. Komposteerimise puhul on leitud, et aeroobsetes tingimustes degradeerub orgaanilise ainega samal ajal ka orgaanilised saasteained, ja seega on täheldatud kõigi uuritud ainete sisalduse vähenemist läbi aja. Komposti analüüsides on suurima sisaldusega leitud tsiprofloksatsiini ja norfloksatsiini (Verlicchi ja Zambello, 2015).

Tabel 2. Antibiootikumide sisaldused varasemas uuringus (Lillenberg, Yurchenko, *et al.*, 2010)

Proov	NOR	CIP	OFL	SMX	SDM
Sete	0,0–162	0,0–426	0,0–39	0,0–6	0,0–20
Kompost	0,0–22	0,0–20	0,0–3	0,0–1	0,0–4

Tabelis 2 on esitatud käesoleva tööga sama metoodikaga mõõdetud antibiootikumide vahemikud Eestis uuritud sette ja komposti proovides, mis võeti aluseks ka töö praktilises osas tulemuste võrdlemisel. Rootsisis tehtud uuringus leiti reoveesetega väetatud põllumaalt nii CBZ-i kui DIC-i jääke, ainete sisaldus oli umbes 50 µg/kg (Magnér *et al.*, 2016). CBZ-i on leitud ka reovesette kompostis sisalduses 20 µg/kg (Ben Mordechay *et al.*, 2018). DIC-i sisaldus reoveesettes on erinevates uuringutes olnud vahemikus 2–140 µg/kg KA (Nei, Kutti ja Lillenberg, 2017).

Euroopa Liidus on soovitatavad ravimijääkide piirnормid sõnnikus on 100 µg/kg ja sõnnikuga väetatud mullas 10 µg/kg, kuigi uuringud on näidanud, et vastavad normid on ilmselt liiga kõrged, sest ei välista ohtu mulla mikroorganismidele. Paremaks ravimite piirnормiks mullas on pakutud 1 µg/kg, kuigi ka see piirnорм ei pruugi välistada ravimiresistentsuse arenemist (Lillenberg, 2011). Kirjanduses on lausa pakutud, et resistentsuse teket välistav ravimisisaldus mullas ei tohiks ületada 0,01–0,1 µg/kg, mille saavutamiseks ei tohiks komposti piirnорм ületada 1 µg/kg KA (Montforts, 2005). Tulemused on lisaks näidanud, et enne reovesette kasutamist väetisena tuleks seda testida paljukasutatavate keemiliselt püsivate ravimijääkide suhtes, mis on võimelised liikuma mullast taimedesse. Läbi taimede võivad ravimijäägid liikuda ka meie toidulauale, mis suurendab veelgi ravimijääkide otsesest riski inimtervisele (Lillenberg, Litvin, *et al.*, 2010).

3. Metoodika

Toimeained, mida käesolevas töös määrati, olid sulfametoksasool (SMX), sulfadimetoksiin (SDM), tsiprofloksatsiin (CIP), norfloksatsiin (NOR), ofloksatsiin (OFL), metformiin (MFM), diklofenak (DIC) ja karbamasepiin (CBZ). Uuritavaid antibiootikume võib kirjanduse andmetel leida reoveesettes, lisaks on need pinnases püsivad ja võivad akumulereuda taimedes.. Lisaks on samu antibiootikume varem määratud sama metoodika alusel (Kipper et al., 2017).

Analüüsi kümnest erineva suuruse ja tehnoloogiaga Eesti reoveepuhastist kogutud reoveesette proove, mida oli kokku 33 proovi. Proovivõtul arvestati iga puhasti tehnoloogiaga ning proovid koguti erinevate settekäitlusetappide lõpust ja algusest. Igast asukohast võeti setteväljakute ja -kuhjade paremaks iseloomustamiseks üks keskmistatud proov, mis koosnes samast settest/kuhjast võetud vähemalt viiest punktproovist. Igat proovi mõõdeti vähemalt kaks korda ja kõiki tulemusi võrreldi proovi maatriksiga. Määratud ainete retentsiooniajad ja väljundsignaalide intensiivsus ja kuju on toodud Lisas 1.

Proovide ettevalmistamisel kasutati varasemalt väljaarendatud metoodikat fluorokinolonide ja sulfoonamiidide samaaegseks mõõtmiseks reoveest, settest ja kompostist HPLC-MS/MS masinaga (Kipper *et al.*, 2017). SPE ja ASE meetodil oli valmistatud ette igast proovist kaks paralleeli – kokku 66 proovi.

Metoodikat kohaldati metformiini, diklofenaki ja karbamasepiini mõõtmiseks samaaegselt eelnevalt mainitud antibiootikumidega. Peamine muudatus oli gradiendi muutmine. Eluendina kasutati 5mM heksafluoroisopropanooli (pH 9) (A) ja metanooli (B). Kasutatud gradiendi programmis (Tabel 3) näitab B metanooli osakaalu muutust ühe tsükli jooksul. Eluendi voolukiirus oli 0,35 ml/min.

Tabel 3.
Gradiendi programm

Aeg (min)	B (%)
0	2
6	2
14	55
19	100
23	100
26	2
41	2

Kalibreerimiseks kasutati kuut standardlahust kontsentratsioonidega 200 ppt, 20 ppb, 40 ppb, 60 ppb ja 100 ppb ning kahte kvaliteedikontrollilahust kontsentratsioonidega 30 ppb ja 70 ppb. Nende põhjal loodi kalibreerimisgraafik, mille näitena on toodud SMX-i kalibreerimisgraafik (Lisa 2). Vabaliikme väärtused saadi proovi signaalidest tühiproovi signaali eraldamisel.

3.1 Maatriksiefekt

Metoodika saagise määramiseks kasutati rikastatud proove, kuhu oli lisatud kindel kogus uuritavaid analüüte. Saagis määrati nii 1:50 (1 osa standardlahust, 50 osa lahjendust) kui ka 1:100 lahjendusega proovides. Proovide lahjendamiseks kasutati MilliQ vett. Tulemustest (Tabel 4) on näha, et 1:100 lahjenduse saagis oli palju esinduslikum. 1:50 lahjendus võimaldas määrata madalamaid ravimijääkide kontsentratsioone näiteks sulfoonamiidide puhul, mille sisaldus paljudes proovides oli 1:100 lahjenduse jaoks liiga väike. Samas võimendus väiksema lahjendusega proovi maatriksist tulenev müraefekt, mis näiteks fluorokinoloonide puhul segas analüüsi tegemist – NOR-i puhul oli väiksema lahjendusega proovi saagis ainult 7%.

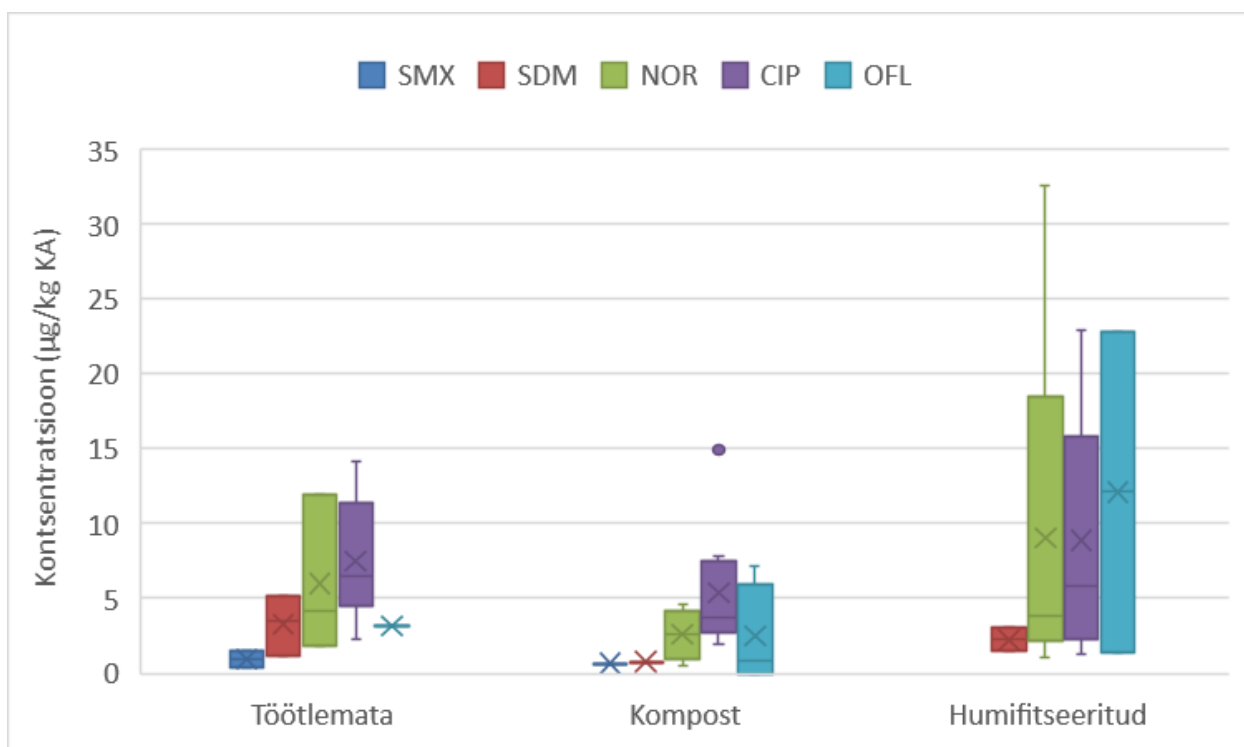
Tabel 4. Analüütide saagised erineva lahjendusega proovides

Lahjendus	SMX	SDM	MFM	NOR	CIP	OFL	DIC	CBZ
1:50	77%	78%	29%	7%	11%	10%	66%	79%
1:100	101%	100%	99%	74%	91%	93%	98%	97%

4. Tulemused ja arutelu

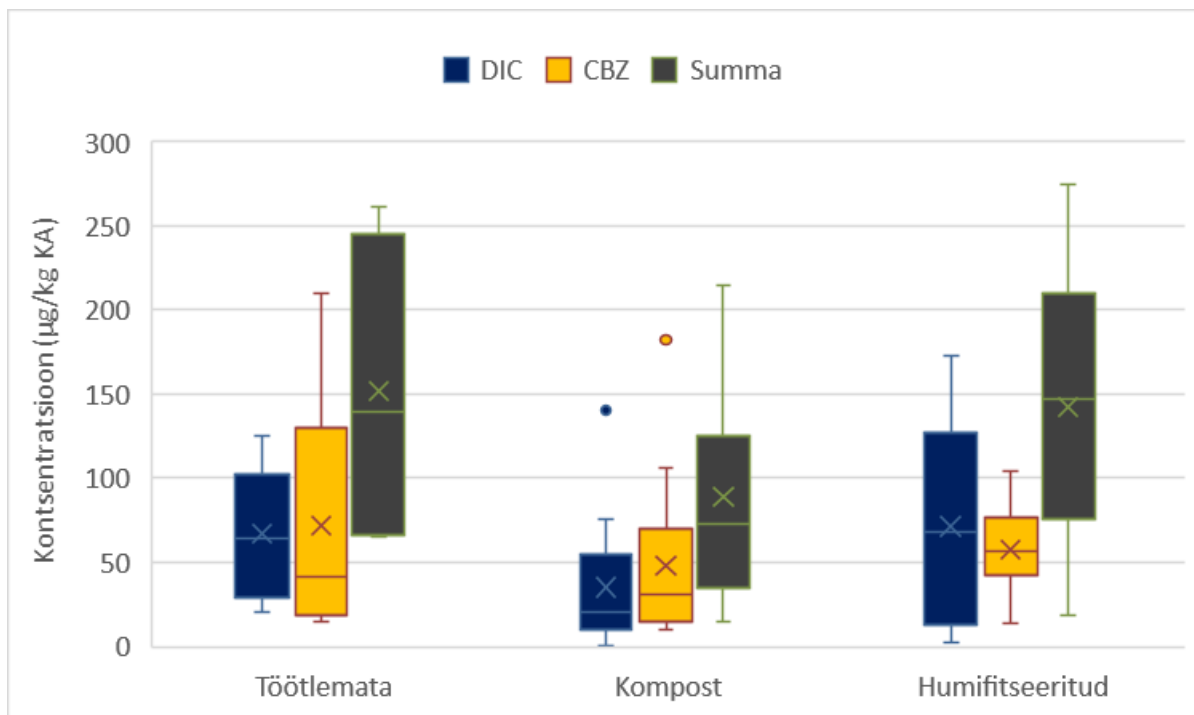
4.1. Üldised tulemused

Ravimijääkide tulemused olid väga erinevad sõltuvalt kasutatud protsessidest, puhastitest ja proovidest. Mõningate proovide puhul oli SMX-i ja SDM-i sisaldused nii madalad, et maatriksiefekti tõttu ei saadud analüüsil kätte kvantitatiivseid andmeid. Sellised tulemused jäeti analüüsist välja, et vähendada taustamürast tulenevat mõju. Lisaks on tulemuste analüüsi osast välja jäetud metformiini väärtused. Kuigi metformiin on uuritud analüütidest Eestis enim kasutatuim ravim, ei moodustunud valitud meetodikaga LC-MS meetodi jaoks sobilikku piiki ja analüüdi retentsiooniaeg kattus tugevalt NOR-iga. Seetõttu ei suudetud seda usaldusväärselt ühestki 66-st analüüsitud proovist tuvastada. MFM-i madalat signaali ja sobimatut kuju on võimalik näha kromatogrammil (Lisa 1). Kuna metformiini struktuur erineb märkimisväärselt ülejäänud analüütidest, võib piigi puudumine tähendada, et valitud meetodika ei ole sobilik selle ravimijäägi määramiseks.



Joonis 1. Antibiootikumide sisaldus protsesside alusel, kriipsuga on märgitud iga seeria mediaan- ja ristiga keskvaartus. Joonisel on toodud 31 proovi tulemused (6 töötlemata, 13 kompostist, 12 humifitseeritud)

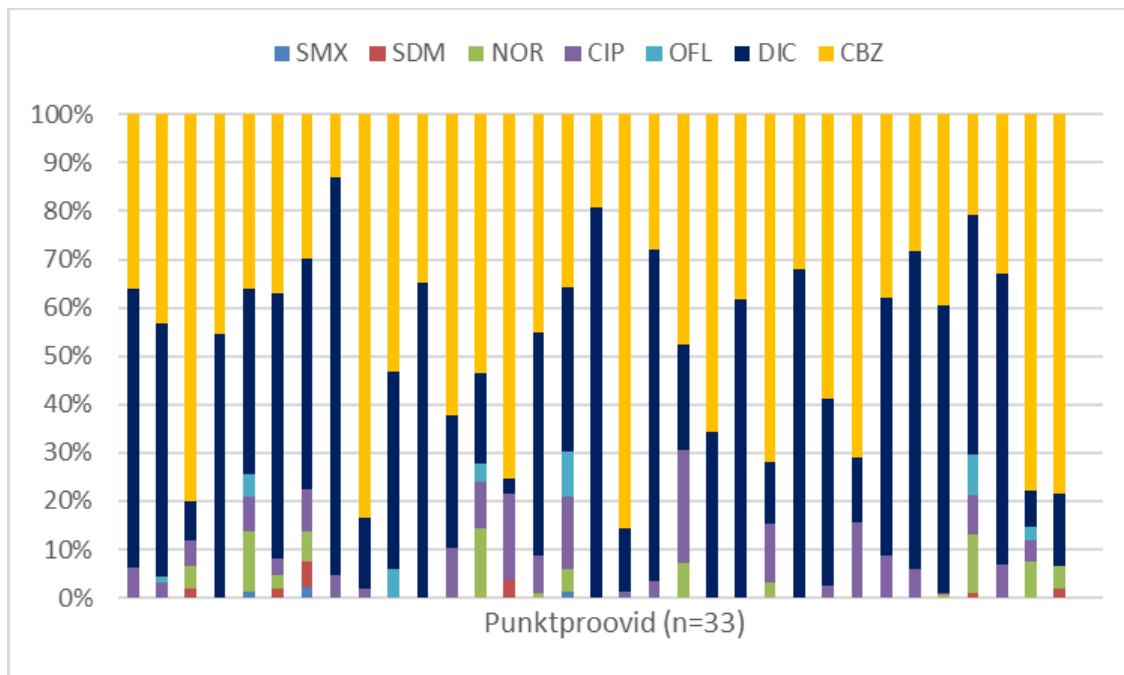
Joonisel 1 on graafiliselt esitatud antibiootikumide sisaldused erinevatest protsessidest võetud proovides. Sulfoonamiidide sisaldus kõigis proovides oli madal – töötlemata proovides leiti SMX-i ja SDM-i mõlemat kolmel korral, kõige kõrgemad analüüside väärtused olid vastavalt 1,6 ja 5,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KA. Kompostist tuvastati mõlemat sulfoonamiidi ühel korral (SMX 0,7 ja SDM 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KA). Ühestki humifitseeritud proovist SMX-i ei tuvastatud ja SDM-i leiti kahel korral (kõrgeim sisaldus 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KA). Fluorokinoloone leidis sulfoonamiididega võrreldes oluliselt rohkem. Graafiku põhjal on näha, et NOR-i sisalduse mediaan on kõrgeim töötlemata, madalam humifitseeritud ja kõige väiksem kompostitud proovides. CIP jälgib NOR-iga sama trendi, kuid arvutatud mediaanväärtused on kõigis settetüüpides kõrgemad. OFL-i tuvastati vähemates setteproovides: töötlemata settes korra, kompostis mitmeid kordi peamiselt madalates kontsentratsioonides ja humifitseeritud sette puhul ühe korra kõrgel sisaldusel (22,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KA) ja teine kord madalal (1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KA). Kõigi fluorokinolonide puhul oli humifitseeritud proovide varieeruvus suurim, mis võib olla tingitud humifitseerimisprotsessi pikemast ajalisest kestvusest. Analüüsitud proovide hulgas oli nii värskeid kui ka mitu aastat humifitseerunud setteid, täpsemalt on humifikatsiooniprotsessi ajalise käigu mõju ravimijääkide lagunemisele analüüsitud alapeatükis 4.2.



Joonis 2. DIC, CBZ ja ravimite summaarne sisaldus protsesside alusel, kriipsuga on märgitud iga seeria mediaan- ja ristiga keskvaartus

DIC-i ja CBZ-i sisaldused kõigis proovides olid mitmeid kordi kõrgemad antibiootikumide kontsentratsioonidest. Seetõttu on diklofenaki ja karbamasepiini tulemused esitatud teistest ravimijääkidest eraldi (Joonis 2). Joonisele on lisatud ka kõigi määratud ravimijääkide kontsentratsioonide summa. DIC-i kontsentratsioonid töötlemata ja humifitseeritud settes ei erinenud oluliselt (mediaanid vastavalt 67,1 ja 71,6 $\mu\text{g/kg KA}$), kompostis leitud sisaldused oli aga umbes 3 korda madalamad. CBZ varieerus sisalduselt nii ühe kui ka kõigi proovide (madalaim kompostis 9,8, kõrgeim töötlemata settes 209,8 $\mu\text{g/kg KA}$) raames enim. Erinevate protsesside CBZ-i mediaanväärtused olulisel määral ei erinenud, millest võib järeldada, et CBZ ei lagune uuritud settekäitlusmeetodite käigus. Ka varasemad uuringud on näidanud, et CBZ ei näita settekäitlusel lagunemismärke (Haiba *et al.*, 2018).

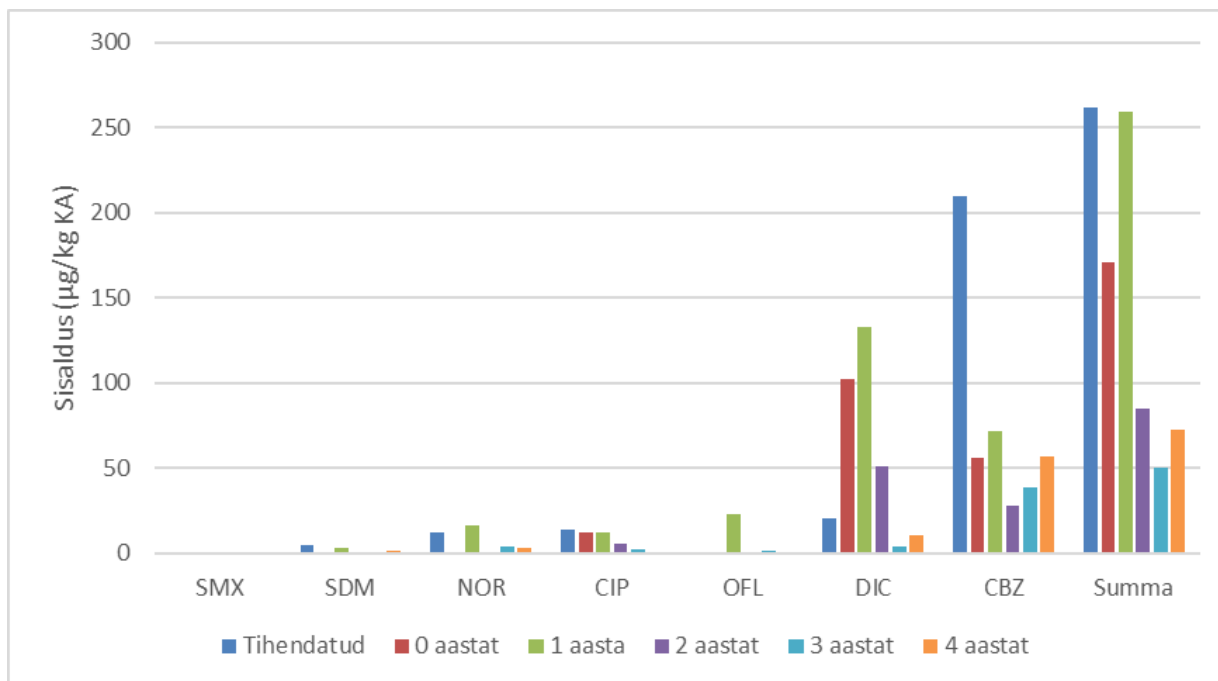
Mõõdetud ravimijääkide summaarne sisaldus oli töötlemata ja humifitseeritud settes keskmiselt 140–150 $\mu\text{g/kg KA}$, kompostis ligikaudu 70 $\mu\text{g/kg KA}$. Töötlemata sette tulemused varieerusid väga suurel määral - 50% neist (kvartiilhaare) jäi vahemikku 66–245 $\mu\text{g/kg KA}$. Komposteeritud proovides oli summaarne ravimijääkide sisaldus märgatavalt madalam kui humifitseeritud settes, mis võib osutada asjalolule, et komposteerimisel saavutatud mesofiilsed tingimused aitavad ravimijääkide lagunemisele kaasa. Samas võib ravimijääkide sisaldus olla madalam ka lahjenduse tulemusel, kuna kompostimisel segatakse sete tugiainega 1:1 ruumala alusel.



Joonis 3. Ravimijääkide summaarne jaotus punktproovides

Joonisel 3 on kujutatud kõigi analüüsi käigus detekteeritud ravimijääkide protsentuaalne jaotus erinevates proovides. Karbamasepiini ja diklofenaki oluliselt kõrgemad kontsentratsioonid teiste ravimijääkidega võrreldes on sellest jaotusest selgelt näha, moodustades 70–100% summaarsest kontsentratsioonist. Fluorokinoloonid moodustavad summaarsest kontsentratsioonist kuni 28% ning suurima osakaaluga on tsiprofloksatsiin, seejärel norfloksatsiin ja siis ofloksatsiin. Sulfoonamiide on proovides kõige vähem, jäädes vahemikku 0–8%.

4.2. Humifikatsiooni mõju ravimijääkidele

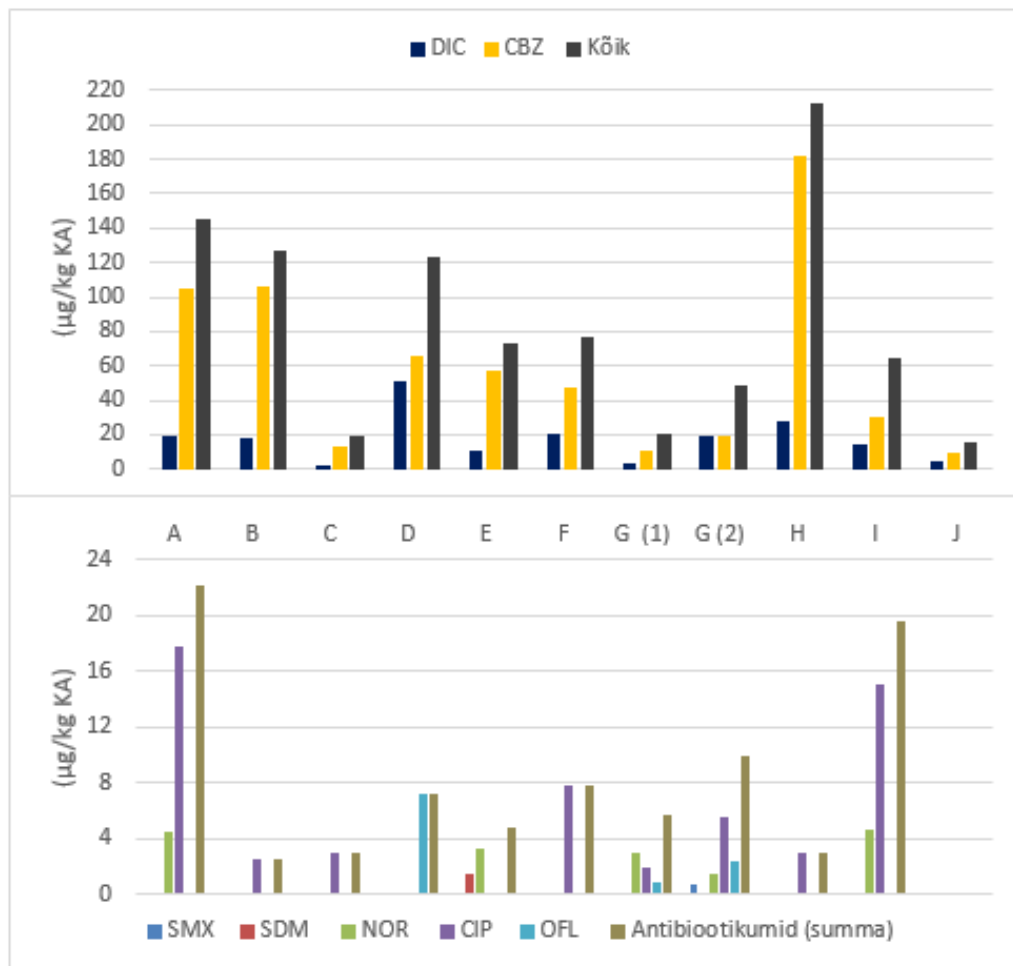


Joonis 4. Puhasti E humifitseerimisväljakute proovide analüütide sisaldus

Humifikatsioonitehnoloogiat kasutava Puhasti E eri vanusega proovide (0-4 aastat) ravimijääkide sisaldusi on graafiliselt kujutatud Joonisel 4. Kuna humifikatsiooniprotsessi käigus sette stabiliseerumine võtab aega mitu aastat, peaks ka protsessi potentsiaalne mõju ravimijääkide lagundamisele olema aastate lõikes tuvastatav. Kuna protsess toimub välistingimustes, on kõige suuremad mõjutegurid ravimijääkide lagundamisele aastaringne temperatuurikäik ja sademed. Lisaks avaldavad mõju humifitseerimisväljakule külvatud taimed, mille kasvamise käigus toimub sette stabilisatsioon. Kirjandusest ei ole leitud viiteid, kas taimede kasvamine mõjutab ka ravimijääkide lagundamist.

Vaadates eraldi igat ravimijääki, võib näiteks diklofenaki puhul väita, et pärast esimest aastat on sisaldus tugevas vähenemistrendis. On võimalik, et diklofenaki sisaldus eri aastate toorsetes on olnud erinev, kuid välistades ravimikasutuse suure muutuse asulas viimaste aastate jooksul, võib kontsentratsiooni vähenemine näidata diklofenaki lagunemist pikaajalise humifitseerimise käigus. Karbamasepiini sisaldus ei näita selget vähenemist (va toorsete, mille kontsentratsioon on teistest oluliselt kõrgem), mis võib olla tingitud suurema temperatuuritõusu puudumisest protsessi käigus. Summaarset ravimijääkide vähenemist on näha ainult pärast esimest aastat, mis tõenäoliselt on tingitud diklofenaki sisalduse vähenemisest. Fluorokinolonide ja sulfoonamiidide sisaldused kõigis setetes on madalad ning kuigi väikest langust on aastate jooksul näha, on tulemusi liiga vähe, et toetada antibiootikumide lagunemise hüpoteesi humifikatsiooniprotsessi käigus.

4.3. Ravimijääkide sisaldused lõpp-produktides



Joonis 5. Komposteeritud ja humifitseeritud reoveesette ravimijääkide sisaldused (järjestatud puhasti suuruse järgi). Iga tähega x-teljel on tähistatud erineva puhasti settekäitluse lõpp-produkt

Joonisel 5 on võrreldud kõigi uuritud puhastite lõpp-produkte ehk viimase aasta komposte ja kõige kauem humifitseeritud setteid. Puhastite A, C ja E käitlusprotsessiks oli humifikatsioon, muude puhastite puhul oli selleks komposteerimine. Puhastil G oli kaks erinevat lõpp-produkti, kus üks (G (1)) oli segatud liivaga, teine (G (2)) turbaga. Vaadeldavad proovid on kõik reoveepuhastite poolt lõplikult töödeldud ja stabiliseeritud ning peaksid vastama seaduses kehtestatud määrustele. See tähendab, et vastavaidprodukte on lubatud piiratult kasutada põllumajanduses, haljastuses ja rekultiveerimisel. Antibiootikumidest on vastavates proovides peamiselt suurima kontsentratsiooniga tsiprofloksatsiin. Nii SMX-i kui ka SDM-i detekteeriti vaid ühes lõpp-produktis ja võrdlemisi madalate sisaldustega. Antibiootikumide summaarne sisaldus oli keskmiselt 7,8 µg/kg KA ja sisalduste mediaan 5,7 µg/kg KA. Kõige suuremas puhastis (Puhasti J) antibiootikume kasutatud meetodikaga ei tuvastatud. Diklofenaki ja karbamasepiini detekteeriti kõigis proovides. CBZ sisaldus varieerus tugevalt ja oli sette ravimijääkide summaarse sisalduse peamine komponent.

Üldiselt on näha, et väiksemate puhastite (Puhastid A kuni E) proovides on summaarselt rohkem ravimijääke kui keskmistes (Puhastil F kuni I). Kõige suuremas puhastis (Puhasti J) olid sisaldused selgelt madalamad kui väiksemates. Puhasti H lõpp-produkt erines teistest kõrge CBZ-i sisalduse tõttu. Võimalik, et tegu oli erakordselt kõrge CBZ-i algsisaldusega kompostiga, kuna sama puhasti nooremad kompostid näitasid palju madalamaid sisaldusi (14–31 µg/kg KA võrreldes lõpp-produkti 182 µg/kg KA).

4.4. Võrdlus varasemate uuringutega ja järeldused

Tabelis 5 on võrreldud käesolevas töös ja kirjanduses leitud vähimaid ja suurimaid analüütide sisaldusi töötlemata settes, reoveesette kompostis ja humifitseeritud settes. Töös saadud ravimijääkide sisaldused on sarnased varasemate uuringute tulemustega. Kõige madalamad sisaldused on olnud SMX-il ja SDM-il, fluorokinolonide puhul on varieeruvus natuke suurem ja DIC ja CBZ-i puhul on varieeruvus teiste analüütidega võrreldes palju suurem. Üldiselt on antud töös saadud tulemuste varieeruvus väiksem kui varasemates uuringutes, mis võib tuleneda väiksemast proovide arvust.

Tabel 5. Käesolevas töös (1) ja varasemates uuringutes (2) saadud ravimijääkide sisalduste vahemikud ($\mu\text{g/kg KA}$) (Lillenberg, Yurchenko, *et al.*, 2010; Magnér *et al.*, 2016; Nei, Kutti ja Lillenberg, 2017; Ben Mordechay *et al.*, 2018)

Tüüp		SMX	SDM	NOR	CIP	OFL	DIC	CBZ
Töötlemata sete	(1)	0,4–1,6	1,2–5,1	1,9–11,9	2,3–14,1	3,2–4,4	20,7–125,5	14,5–209,8
	(2)	0,0–6	0,0–20	0,0–162	0,0–426	0,0–39	2,0–140	20–50
Kompost	(1)	0,7	0,8	0,5–4,6	2,0–15,0	0,0–7,2	0,6–140,2	9,8–182,0
	(2)	0,0–1	0,0–4	0,0–22	0,0–20	0,0–3	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad
Humifitseeritud	(1)	0	1,5–3,0	1,1–32,6	1,3–22,9	1,4–22,8	2,5–172,9	13,4–104,5
	(2)	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad	Andmed puuduvad

Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et kuna fluorokinolonide ja sulfoonamiidide sisaldused lõpp-produktides jäid alla 10 µg/kg KA, ei tohiks EL-i määruste kohaselt nende sisaldused väetisena probleeme valmistada. Samas kui võtta väetise piirmääraks 1 µg/kg kuivaine kohta, et vältida ravimiresistentsuse tekkimist, on olukord teine. Kuigi sulfoonamiidide sisaldus lõpp-produktis jääb keskkonnale ohutule tasemele, ületab fluorokinolonide sisaldus soovitatud normi enamikus proovides mitmekordselt, diklofenak mitmekümnekordselt ja karbamasepiin mõnes proovis rohkem kui sajakordselt. Kuigi karbamasepiin ja diklofenak on sisaldustelt kõige domineerivamad, ei saa selle põhjal kindlalt öelda, et need ka kõige suuremat ohtu keskkonnale kujutavad, kuna ravimitel võib sama sisalduse juures olla väga erineva mastaabiga mõju. Kumbagi ei klassifitseerita antimikroobse ainega; samas on näidatud, et DIC võib käituda antibiootikumina mitmete bakterite suhtes (Riordan *et al.*, 2011). Karbamasepiini sisaldus settes võib aga kiirendada bakteritel resistentsuse tekkimist antibiootikumide suhtes (Wang *et al.*, 2019). Seega ei saa välistada võimalust, et ka analüüsitud proovide kasutamine pinnasel ohustab mulla mikroobikooslust ja tekitab AMR-i.

Autor leiab saadud tulemuste põhjal, et Eesti reoveepuhasites kasutatavad protsessid lagundavad sulfoonamiide piisavas, fluorokinolone peaaegu piisavas ning diklofenaki ja karbamasepiini ebapiisavas hulgas. Humifitseerimise mõju ravimijääkide lagundamisele avaldub selgemalt alates teisest aastast. Nii komposteerimine kui ka humifitseerimine võivad vähendada ravimijääkide hulka settes, kuid analüütide varieeruvus lõpp-produktides on siiski suur. Kuna analüüsitud kompostiproovide tulemuste varieeruvus oli väiksem, saab komposteerimise positiivset mõju ravimijääkide lagundamisele kindlamalt väita.

Kuigi reoveesetetele ei ole seatud ravimijääkide piirnorme, on Euroopa Liit soovitanud vältida üle 10 µg/kg kuivaine kohta ravimijääke sisaldava sõnniku kasutamist põllumajanduses. Antud töös uuritud setteproovides ületasid ravimijäägid sõnnikule soovitatud normi ja arvestada tuleb ka, et ravimijääkide omavahelised reaktsioonid võivad tugevdada nende mõju keskkonnale. Väikelinna puhastite reoveesette kasutamine väetisena võib käesoleva töö autori hinnangul olla potentsiaalselt ohtlik ja vajab kindlasti edaspidist uurimist. Esmajoones tuleks tegeleda karbamasepiini ja diklofenaki vähendamisega settes, kuna mainitud toimeainete sisaldused olid teistest analüütidest oluliselt suuremad ja ainsatena igas analüüsitud proovis tuvastatud.

Kokkuvõte

Ressursside vähenemise tõttu tuleb aina rohkem tegeleda ringmajandusega ja seetõttu ka reoveesette taaskasutusega, kuna sete on kõrgete toitaineväärtuste tõttu hea väetis põllumaal. Inimtegevuse tagajärjel jõuavad settesse aga ka saasteained, mille sattumine väetise läbi keskkonda võib ohustada loodust ja viia antimikroobse resistentsuse tekkimisele mikroorganismides. Reoveesettes sisalduvaid ravimijääke seaduse alusel ei kontrollita ega piirata ja seetõttu puuduvad piisavad teadmised nende hulgast settes ja pikaajalisest mõjust keskkonnale.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli (1) analüüsida Eestis levinumate settekäitlusmeetodite efektiivsust ravimijääkide eemaldamisel settest ja (2) hinnata väikelinna puhastis toodetud reoveesetekomposti ohtu ravimijääkide keskkonda sattumise kontekstis. Töös uuriti proove kümnest Eesti reoveepuhastist nii töötlemata kui ka töödeldud (komposteeritud või humifitseeritud) settest. Komposti ja humifikatsiooni puhul olid proovid võetud ka erinevate aastate lõikes. Töös analüüsiti kokku 33 SPE ja ASE meetodil ettevalmistatud proovi HPLC-MS/MS masinaga. Uuriti järgnevate paljukasutatavate toimeainete jääke: sulfametoksasool, sulfadimetoksiin, tsiprofloksatsiin, norfloksatsiin, ofloksatsiin, metformiin, diklofenak ja karbamasepiin. Metformiini jaoks ei olnud valitud meetodika sobilik ja seega selle ravimi sisalduse kohta proovides andmed puuduvad. Uuritud antibiootikumid (SMX, SDM, CIP, NOR, OFL) olid kõigis proovides pigem madalates kontsentratsioonides, samas DIC ja CBZ kõikusid tugevalt olenevalt proovist, kuid olid siiski kõigis proovides kõrgema sisaldusega. Ka lõpp-produktides oli nende ainete kontsentratsioon kõrge ja nende põllumajandusliku kasutusega võib kaasnedagi suur mõju pinnase mikroobikooslustele ja antimikroobse resistentsuse teke.

Töö autor leiab saadud tulemuste põhjal, et Eesti settekäitlusmeetodid on efektiivsed uuritud ravimijääkide sisalduse vähendamisel, kuid mitte täielikul lagundamisel. Lisaks ei täheldatud humifikatsiooni puhul olulist mõju karbamasepiini lagundamisele. Uuritud ravimijääkide sisaldused olid analüüsitud lõpp-produktides sageli kõrgemad kui kirjanduses väljapakutud ohutu sisaldus antimikroobse resistentsuse tekke vältimiseks (1 µg/kg kuivaine kohta). Seetõttu leiab töö autor, et Eesti väikepuhastite sette kasutamine väetisena võib ohustada keskkonda ja ravimijääkide potentsiaalset mõju ja levikut tuleks edaspidi uurida.

Summary

Due to the depletion of resources, humankind is forced to put more effort than ever into circular economy and therefore also into reusage of sewage sludge as a fertilizer in agriculture because of its high nutrient content. However, because of human activity, pollutants make their way into the sludge and used as a fertilizer they can be a threat to the environment and enhance the emerge of antimicrobial resistance. Pharmaceuticals levels in sewage sludge are not tested nor regulated by law and therefore knowledge is lacking about the amount of pharmaceuticals in sewage sludge and their long-term affects when exposed to the environment.

The purpose of this bachelor work was to analyse the effectiveness of common sludge treatment methods in Estonia in removing pharmaceuticals from the sludge and to evaluate the threat of using sewage sludge from Estonian small town wastewater treatment plants as a fertilizer. Samples were taken from ten Estonian wastewater treatment plants from both unprocessed and processed (composted or humified) sludge. With regards to composted and humified sludge, samples were taken from several years. 33 samples that were prepared using SPE and ASE method were analysed with HPLC-MS/MS. Following common pharmaceuticals were used: sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, metformin, diclofenac, and carbamazepine. Metformin could not be detected with the chosen method and therefore this work does not include results for this pharmaceutical. Analysed antibiotics (SMX, SDM, CIP, NOR, OFL) were in low concentrations in all samples, whereas DIC and CBZ fluctuated strongly depending on the sample while always being the analytes with the highest concentrations. The end products of the treatments had high DIC and CBZ content as well, which, when used as fertilizer, may lead to high impact for microbes in soil and emergence of antimicrobial resistance.

Based on the results of this work, the author of this paper believes that the sludge treatment methods in Estonia are effective in reducing the concentration of observed pharmaceuticals in wastewater sludge, but not entirely degrading them. The effects of degrading carbamazepine via humification were not observed. The concentrations of studied pharmaceuticals in end products were often higher than the suggested safe limits for preventing antimicrobial resistance (1 µg/kg DS). Therefore, using the sludge of small Estonian wastewater treatment plants as fertilizer, could be dangerous for the environment and the potential impact and distribution of pharmaceuticals should be further studied.

Tänuavaldused

Töö autor soovib südamest tänada Markus Raudkivi asjaliku ja kannatliku juhendamise eest ja Siiri Vellingut toetava juhendamise eest peamiselt töö praktilises osa.

Lisaks suur tänu analüütilise keemia õppetooli dotsendile Koit Herodesele abi eest LC-MS masina kasutamisel ja Maico Lechnerile tohutu abi eest proovide ettevalmistamisel ja analüüsil.

Autor tänab ka pere, sõpru ja ülikoolikaaslast igakülgse toetuse eest.

Kasutatud kirjandus

Brillas, E. ja Sirés, I. (2015) „Electrochemical removal of pharmaceuticals from water streams: Reactivity elucidation by mass spectrometry“, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V., 70, lk 112–121. doi: 10.1016/j.trac.2015.01.013.

Cornel, P. ja Schaum, C. (2009) „Phosphorus recovery from wastewater: needs, technologies and costs“, *Water Science and Technology*, 59(6), lk 1069–1076. doi: 10.2166/wst.2009.045.

Drugs.com (2020a) *Carbamazepine Uses, Dosage & Side Effects*. Available at: <https://www.drugs.com/carbamazepine.html> (Vaadatud: 18. mai 2020).

Drugs.com (2020b) *Diclofenac Uses, Dosage & Side Effects*. Available at: <https://www.drugs.com/diclofenac.html> (Vaadatud: 7. mai 2020).

Drugs.com (2020c) *Metformin: Side Effects, Dosage & Uses*. Available at: <https://www.drugs.com/metformin.html> (Vaadatud: 7. mai 2020).

Eawag (2015) *100 Water Treatment Plants must be Upgraded – Eawag Info day 2015*, Eawag: Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology. Available at: <https://www.admin.ch/gov/en/start/documentation/media-releases.msg-id-58567.html> (Vaadatud: 27. mai 2020).

Egle, L. *et al.* (2016) „Phosphorus recovery from municipal wastewater: An integrated comparative technological, environmental and economic assessment of P recovery technologies“, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 571, lk 522–542. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.019.

Euroopa Komisjon (2017) *A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR)*.

European Sustainable Phosphorus Platform (2017a) *Austria opts for mandatory phosphorus recovery from sewage sludge*. Available at: <https://phosphorusplatform.eu/scope-in-print/news/1396-austria-mandatory-p-recovery> (Vaadatud: 31. mai 2020).

European Sustainable Phosphorus Platform (2017b) *The Phosphorus Challenge*. Available at: <https://www.phosphorusplatform.eu/links-and-resources/p-facts#> (Vaadatud: 22. mai 2020).

Eurostat (2020) *Sewage sludge production and disposal*. Available at: https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=env_ww_spd&lang=en (Vaadatud: 12. mai 2020).

Haiba, E. *et al.* (2018) „On the degradation of metformin and carbamazepine residues in sewage sludge compost“, *Agronomy Research*, 16(3), lk 696–707. doi: 10.15159/AR.18.123.

Hatim, Y. (2020) „Morocco Remains World’s Largest Exporter of Phosphate, Phosphoric Acid“, *Morocco World News*.

Hillep, P. *et al.* (2015) *Antibiootikumi kasutamise uuring Eesti elanikkonna seas*.

Hover, B. M. *et al.* (2018) „Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens“, *Nature Microbiology*. Nature Publishing Group, 3(4), lk 415–422. doi: 10.1038/s41564-018-0110-1.

Ileleji, K. E., Martin, C. ja Jones, D. (2015) „Basics of Energy Production through Anaerobic Digestion of Livestock Manure“, *Bioenergy*. Elsevier, lk 287–295. doi: 10.1016/b978-0-12-407909-0.00017-1.

Joss, A. *et al.* (2006) „Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme“, *Water Research*. Elsevier Ltd, 40(8), lk 1686–1696. doi: 10.1016/j.watres.2006.02.014.

Kahn, H. ja Loit, H.-M. (2009) *Tervise ABC*. Toimetanud H. Kahn ja H.-M. Loit. Tallinn: Valgus.

Kipper, K. *et al.* (2017) „Simultaneous Determination of Fluoroquinolones and Sulfonamides Originating from Sewage Sludge Compost“, *Scientific World Journal*, 2017, lk 20–26. doi: 10.1155/2017/9254072.

Kümmerer, K. (toim) (2008) *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*. 3rd edn. Springer Verlag.

Lillenberg, M., Litvin, S., *et al.* (2010) „Enrofloxacin and Ciprofloxacin Uptake by Plants from Soil“, *Agronomy research (Tartu)*, 8(1), lk 807–814.

Lillenberg, M., Yurchenko, S., *et al.* (2010) „Presence of fluoroquinolones and sulfonamides in urban sewage sludge and their degradation as a result of composting“, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7(2), lk 307–312. doi: 10.1007/BF03326140.

Lillenberg, M. (2011) *Residues of some Pharmaceuticals in Sewage Sludge in Estonia, their Stability in the Environment and Accumulation into Food Plants via Fertilizing.*

Lindberg, R. H. *et al.* (2006) „Behavior of fluoroquinolones and trimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge“, *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society, 40(3), lk 1042–1048. doi: 10.1021/es0516211.

Magnér, J. *et al.* (2016) *Fate of pharmaceutical residues - in sewage treatment and on farmland fertilized with sludge.*

Mailler, R. *et al.* (2015) „Study of a large scale powdered activated carbon pilot: Removals of a wide range of emerging and priority micropollutants from wastewater treatment plant effluents“, *Water Research*. Elsevier Ltd, 72, lk 315–330. doi: 10.1016/j.watres.2014.10.047.

Mengozi, G. *et al.* (1996) „Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep.“, *American journal of veterinary research*, 57(7), lk 1040–3.

Mohring, S. A. I. *et al.* (2009) „Degradation and elimination of various sulfonamides during anaerobic fermentation: A promising step on the way to sustainable pharmacy?“, *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society, 43(7), lk 2569–2574. doi: 10.1021/es802042d.

Monteiro, S. C. ja Boxall, A. B. A. (2010) „Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment“, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 202, lk 53–154. doi: 10.1007/978-1-4419-1157-5_2.

Montforts, M. H. M. M. (2005) *The trigger values in the environmental risk assessment for (veterinary) medicines in the European Union: a critical appraisal.*

Ben Mordechay, E. *et al.* (2018) „Composted biosolids and treated wastewater as sources of pharmaceuticals and personal care products for plant uptake: A case study with carbamazepine“, *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 232, lk 164–172. doi: 10.1016/j.envpol.2017.09.029.

Nei, L., Kutti, S. ja Lillenberg, M. (2017) *Degradation of diclofenac and triclosan residues in sewage sludge compost*.

O'Neill, J. (toim) (2016) *Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance*. London.

Oaks, J. L. *et al.* (2004) „Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan“, *Nature*, 427(6975), lk 630–633. doi: 10.1038/nature02317.

Pérez, S., Eichhorn, P. ja Aga, D. S. (2005) „Evaluating the biodegradability of sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, and trimethoprim at different stages of sewage treatment“, *Environmental Toxicology and Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 24(6), lk 1361–1367. doi: 10.1897/04-211R.1.

Ravimiamet (2015) *20 aastat ravimistatistikat Eestis. 20 Years of Estonian Statistics on Medicines*. Toimetanud A. I. Ly Rootslane, Ott Laius, Katrin Kurvits. Tartu: Ravimiamet.

Ravimiamet (2016) *Ravimid*. Available at: <https://www.ravimiamet.ee/ravimid-0> (Vaadatud: 24. mai 2020).

Ravimiamet (2018) *Fluorokinolonide rühma antibiootikumide uued kasutamispäirangud*. Available at: <https://ravimiamet.ee/fluorokinolonide-rühma-antibiootikumide-ued-kasutamispäirangud> (Vaadatud: 7. mai 2020).

Ravimiamet (2019a) *Eesti ravimistatistika 2018*. Available at: <https://www.ravimiamet.ee/ravimistatistika> (Vaadatud: 19. mai 2020).

Ravimiamet (2019b) *Veterinaarravimite statistika*. Available at: <https://www.ravimiamet.ee/veterinaarravimite-statistika> (Vaadatud: 19. mai 2020).

Riigi Teataja (2012) *Reovee puhastamise ning heit- ja sademevee suublasse juhtimise kohta esitatavad nõuded, heit- ja sademevee reostusnäitajate piirmäärad ning nende nõuete täitmise kontrollimise meetmed*. - VVm nr. 99, Lisa 1.

Riigi Teataja (2017) *Reoveesetest toote valmistamise nõuded*. Available at: <https://www.riigiteataja.ee/akt/128072017004?leiaKehtiv> (Vaadatud: 12. mai 2020).

Riigi Teataja (2019) *Haljastuses, rekultiveerimisel ja põllumajanduses kasutatava reoveesete kvaliteedi piirväärtused ning kasutamise nõuded*. Riigi Teataja.

Riordan, J. T. *et al.* (2011) „Alterations in the transcriptome and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of diclofenac“, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. BioMed Central, 10(1), lk 30. doi: 10.1186/1476-0711-10-30.

Royal Society of Chemistry (2020a) *Carbamazepine* | $C_{15}H_{12}N_2O$ | *ChemSpider*. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2457.html> (Vaadatud: 18. mai 2020).

Royal Society of Chemistry (2020b) *Ciprofloxacin* | $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ | *ChemSpider*. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2662.html> (Vaadatud: 12. aprill 2020).

Royal Society of Chemistry (2020c) *Diclofenac* | $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ | *ChemSpider*. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2925.html> (Vaadatud: 13. aprill 2020).

Royal Society of Chemistry (2020d) *Metformin* | $C_4H_{11}N_5$ | *ChemSpider*. Available at: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3949.html?rid=0b8c2dfc-e215-4349-8d76-fda77dcae8e6> (Vaadatud: 13. aprill 2020).

Royal Society of Chemistry (2020e) *Norfloxacin* | $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ | *ChemSpider*. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4380.html> (Vaadatud: 12. aprill 2020).

Royal Society of Chemistry (2020f) *Ofloxacin* | $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ | *ChemSpider*. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4422.html> (Vaadatud: 13. aprill 2020).

Royal Society of Chemistry (2020g) *Sulfadimethoxine* | $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ | *ChemSpider*. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5132.html> (Vaadatud: 13. aprill 2020).

Royal Society of Chemistry (2020h) *Sulfamethoxazole* | $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ | *ChemSpider*. Available at: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5138.html> (Vaadatud: 13. aprill 2020).

Salem-Milani, A. *et al.* (2013) „Antibacterial Effect of Diclofenac Sodium on *Enterococcus faecalis*.“, *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*. Tehran University of Medical Sciences, 10(1), lk 16–22.

Schaum, C. (2018) *Phosphorus: Polluter and Resource of the Future - Removal and Recovery from Wastewater*, *Water Intelligence Online*. IWA Publishing. doi: 10.2166/9781780408361.

Sirés, I. ja Brillas, E. (2012) „Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review“, *Environment International*. Elsevier Ltd, lk 212–229. doi: 10.1016/j.envint.2011.07.012.

Stokes, J. M. *et al.* (2020) „A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery“, *Cell*. Cell Press, 180(4), lk 688-702.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.01.021.

Stumpf, M. *et al.* (1999) „Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil.“, *The Science of the total environment*, 225(1–2), lk 135–41. doi: 10.1016/s0048-9697(98)00339-8.

Ternes, T. A. *et al.* (2004) „A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge“, *Water Research*. Elsevier Ltd, 38(19), lk 4075–4084. doi: 10.1016/j.watres.2004.07.015.

Thiele-Bruhn, S. (2003) „Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review“, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. John Wiley & Sons, Ltd, 166(2), lk 145–167. doi: 10.1002/jpln.200390023.

Verlicchi, P. ja Zambello, E. (2015) „Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil - A critical review“, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 538, lk 750–767. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.108.

Vieno, N. M., Tuhkanen, T. ja Kronberg, L. (2005) „Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water“, *Environmental Science and Technology*. Environ Sci Technol, 39(21), lk 8220–8226. doi: 10.1021/es051124k.

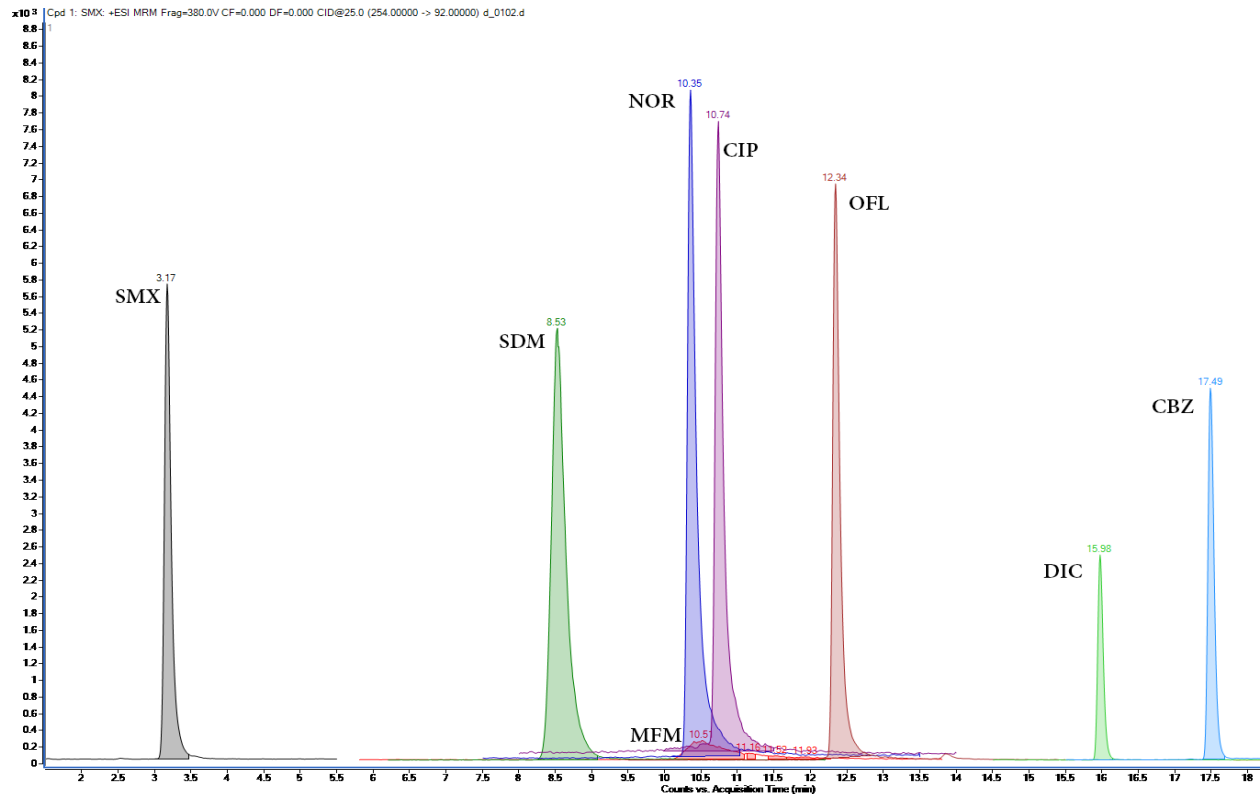
Wang, Y. *et al.* (2019) „Antiepileptic drug carbamazepine promotes horizontal transfer of plasmid-borne multi-antibiotic resistance genes within and across bacterial genera“, *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 13(2), lk 509–522. doi: 10.1038/s41396-018-0275-x.

Wishart, D. S. (2006) „DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration“, *Nucleic Acids Research*, 34(90001), lk D668–D672. doi: 10.1093/nar/gkj067.

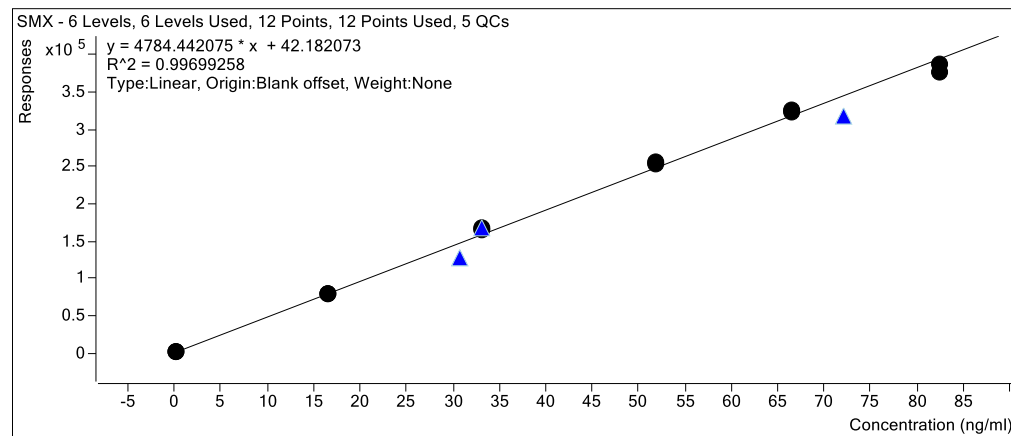
Youngquist, C. P., Mitchell, S. M. ja Cogger, C. G. (2016) „Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistance during Digestion and Composting: A Review“, *Journal of Environmental Quality*, 45(2), lk 537–545. doi: 10.2134/jeq2015.05.0256.

Lisad

Lisa 1. Analüütide retentsiooniajad HPLC-s kasutatud meetodika puhul



Lisa 2. SMX-i kalibreerimisgraafik



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Laura Maria Kull,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
„Erinevate reoveesette käitlustehnoloogiate mõju ravimijääkide sisaldusele reoveesettes“,

mille juhendajad on Markus Raudkivi ja Siiri Velling,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Laura Maria Kull

01.06.2020