

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

**Prügilademest toodetud prügilakatete võrdlemine
antibiootikumiresistentsusgeenide leviku seisukohast**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Dina Levit

Juhendaja Kertu Tiirik

TARTU 2024

Prügilademest toodetud prügilakatete võrdlemine antibiootikumiresistentsusgeenide leviku seisukohast

Prügiladestamine on muutunud pakiliseks keskkonnaprobleemiks, kuna igal aastal suurtes kogustes ladustatud tahked jäätmed, loovad keskkonna, mis soodustab antibiootikumiresistentsusgeenide püsimist ja võib põhjustada terviseriske. Käesolevas uuringus uuritakse antibiootikumiresistentsusgeenide esinemist kolmes prügilas erinevalt sügavuselt ja võrreldakse mehaanilis-bioloogilise töötusega (MBT) prügilakatteid ja biofilter prügilakatteid. Meie analüüs keskendus geenidele, mis kodeerivad multiresistentsust (*acrB*, *mexF*), sulfoonamiidiresistentsust (*sul1*, *sul2*), MLS-resistentsust (*ermF*) ja vankomüsiiniresistentsust (*vanO*).

Märksõnad: antibiootikumiresistentsusgeen, MBT, biofilter-kattekiht, prügilakate.

T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

T490 Biotehnoloogia

Comparison of landfill covers produced from landfill refuse in terms of the spread of antibiotic resistance genes

Landfilling has become a pressing environmental problem, in particular due to large quantities of solid waste that is disposed each year that can create an environment conducive to the persistence of antibiotic resistance genes and can pose health risks. This study investigates the presence of antibiotic resistance genes in three landfills at different depths and compares mechanical-biological treatment (MBT) and biofilter landfill coverings. Our analysis focused on genes coding multidrug resistance (*acrB*, *mexF*), sulfonamide resistance (*sul1*, *sul2*), MLS resistance (*ermF*) and vancomycin resistance (*vanO*).

Keywords: antibiotic resistance gene, MBT, landfill, biofilter coating

T270 Environmental technology, pollution control

T490 Biotechnology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Prügi ladestamine ja sellega kaasnevad keskkonnahäiringud	7
1.2 Prügilate sulgemine	8
1.2.1 Prügikaevandamine	8
1.3 Antibiootikumid ja antibiootikumiresistentsus.....	9
1.3.1 Antibiootikumiresistentsusgeenid ja nende levik mullakeskkonnas	10
1.3.2 Antibiootikumiresistentsuse mehhanismid.....	11
1.3.3 Resistentsuse leviku uurimismeetodid.....	12
2. EKSPERIMENTAALOSA	14
2.1 Töö eesmärgid	14
2.2 Materjal ja meetodika.....	14
2.2.1 Proovialade kirjeldus	14
2.2.2 Pinnaseproovide kogumine ja keemiline analüüs.....	15
2.2.3 DNA eraldamine.....	15
2.2.4 Geenide kvantifitseerimine.....	15
2.2.5 Statistiline analüüs.....	18
2.3 Tulemused ja arutelu	18
KOKKUVÕTE	25
SUMMARY.....	27
KASUTATUD KIRJANDUS.....	29
LIHTLITSENTS.....	34

KASUTATUD LÜHENDID

16S rRNA – prokarüootide ribosoomi väikeses alaühikus sisalduv rRNA

ARG- antibiootikumiresistentsugeen

DNA – desoksüribonukleiinhape (*deoxyribonucleic acid*)

KA – kuivaine

MBT- mehaaniline-bioloogiline töötlemine

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*quantitative polymerase chain reaction*)

rRNA – ribosomaalne ribonukleiinhape (*ribosomal ribonucleic acid*)

SISSEJUHATUS

Prügi ladestamine on muutunud pakiliseks keskkonnaprobleemiks ning üheks eriti murettekitavaks aspektiks on antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) levik. Inimasustuse laienemisel on prügiladestamine, kunagi tavaline tava, seda probleemi süvendanud. Tänapäeval hõlmab prügikäitlus keerukaid tehnoloogilisi lahendusi, kuid probleem püsib. Prügilate poolt tekitatud mitmete keskkonnaprobleemide hulgas paistab silma ARG-de levik (Zhang *et al.* 2021).

Prügilate, mille hinnanguline arv jääb Euroopas vahemikku 150 000 kuni 500 000, levik rõhutab jäätmete käitlemise väljakutsete ulatust (Hogland *et al.*, 2010; Burlakovs *et al.*, 2017). Reguleerimata jäätmete ladestamine on kaasa toonud mitmeid probleeme, sealhulgas prügilagaaside emissiooni, ebameeldivaid lõhnu, õhus hõljuvate osakeste moodustumise ning läbivate vedelike saastumise. Kaasaegsed jäätmete käitluse tavad eelistavad süstemaatilist töötlemist lihtsalt ladestamise asemel, kuid mured lahenevad vähesel määral (Njoku *et al.* 2019).

Kui prügila jõuab oma tööea lõppu, muutub sulgemine vajalikuks. See hõlmab mitmekülgset protsessi, alates projekti planeerimisest, kuni sulgemise järgse hoolduseni. Osa keskkonnamõjudest püsib ka pärast sulgemist (Wiken 2023).

Suureks mureks on ARG-de esinemine prügilates, mis saavad igal aastal suures koguses tahket olmejätmeid, sealhulgas ravimeid ja isikliku hügieeni tooteid. See aitab kaasa antibiootikumide ja raskemetallide kogunemisele, soodustades ARG-de püsimist prügilakeskkonnas, mis kujutab endast tõsist ohtu rahva tervisele ja keskkonnale (Zhang *et al.* 2021).

Prügilate keskkonnamõju mõistmiseks on vaja jälgida mitmesuguseid parameetreid, nagu jäätmete koostis, läheduses asuvate veekogude seisund ning gaaside emissioonid. Prügilateel on lõpmatu elutsükkel, mille keskkonnamõjud ulatuvad sajandite taha (Vasarhelyi 2021).

See uurimus keskendub prügilate sulgemisprotseduuridele antibiootikumiresistentsusgeenide leviku seisukohast. Katsete ja analüüsi kaudu üritati tuvastada ARG-ide esinemine kolmes proovivõtukoahas, kus võeti proove erinevatel sügavustel. Eesmärk oli välja uurida, millised resistentsusgeenid proovides esinevad ning kuidas nende esinemine sügavustes varieerub. Antibiootikumiresistentsus on oluline teema, mis on seotud bakterite võimega vastu seista antibiootikumidele, mis on tavaliselt kasutusel nakkuste raviks. Antibiootikumiresistentsus

võib tekkida looduslike mutatsioonide või geneetilise materjali vahetuse tulemusel bakterite vahel ning see võib levida ka keskkonnas, sealhulgas prügilates, kus elab suur hulk mikroorganisme. See võib põhjustada antibiootikumide ebaefektiivsust ravimisel ning suurendada nakkushaiguste raskust ja ravi pikkust. Seetõttu on oluline jälgida ja uurida antibiootikumiresistentsuse levikut ning selle potentsiaalset mõju keskkonnale ja rahva tervisele.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Prügi ladestamine ja sellega kaasnevad keskkonnahäiringud

Prügiladestamine (ingl. *land filling* ehk maa täitmine) ja inimkond on käinud käsikäes juba tuhandeid aastaid ja isegi enne meie ajaarvamise algust. Prügilate tekkimine oli ainult aja küsimus ja oli seostud inimeste ümberasutamisega asulatesse, kus tekkis suurem jäätmete hulk millest omakorda hakkas kujunema tõsine probleem. Prügiladestamine kui ingliskeelne termin viitab maapinnalohkude ja süvendite kasutamisele prügi ladestamiseks (Kriipsalu *et al.*, 2016). Euroopas on erinevatel andmetel 150 000-500 000 prügilat, mis mahutavad hinnanguliselt 30-50 km³ jäätmeid (Hogland *et al.*, 2010; Burlakovs *et al.*, 2017). Käitlemata prügi ladestamine hakkas ajapikku tekitama mitmeid keskkondlikke ja sotsiaalseid probleeme. Näiteks prügilagaaside ja haisu levik, tolmu ja prügi laiali lendamine, lindude ja kahjurite kogunemine ning nõrgvee sattumine keskkonda (Kriipsalu *et al.*, 2016). Probleemide lahendamiseks tänapäeval ei ole prügi ladestamine enam lihtsalt prügi mägedesse korjamine ja sellisel kujul hoiustamine, tegu on läbimõeldud ja kontrollitud tehnoloogilise lahendusega. Tegemist ei ole enam jäätmete kõrvaldamisega vaid käitlusprotsessiga (Kriipsalu *et al.*, 2016).

Umbes 20. sajandi algusest hakati probleemi lahendamiseks prügilaid hooldama ja tekkis prügi ladestamise protokoll. Prügilademeid hakati tihendama, prügilapõhjad tehti vettpeetavamateks ja prügilatele pandi ümber aedikud. Loodi jäätmekäitlushierarhia ja olulisemateks märksõnadeks osutusid taaskasutus ja ümbertöötlemine, vaatamata millele ladestatakse maailmas suure osa jäätmeid endiselt prügilatesse (Majdinasab & Yuan, 2017).

Keskkonna häiringud võivad olla seotud prügila ladestamisfaasiga, kuid osa ilmneb ja püsib ka pärast prügila aktiivse kasutuse lõppu ja sulgemist (Kriipsalu, *et al.*, 2016). Üheks probleemidest mis tekib prügiladestamise käigus ja hiljem jääb ka peale prügilate sulgemist on antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) levik. Prügilad saavad igal aastal üle 350 miljoni tonni tahkeid olmejäätmeid. Prügilas ladestavad tahked jäätmed hõlmavad köögi-, olme- ja aiapäätmeid. Olmejäätmed moodustavad enam kui 50% prügilatest. Farmaatsiatooted ja isikliku hügieeni tooted (PPCP) on tüüpilised olmejäätmetes leiduvad saasteained, millest saadakse suures koguses antibiootikume ja raskmetalle, mis kogunevad prügilasse (Li *et al.* 2024).

Selleks, et kindlaks teha, kuidas prügila keskkonda mõjutab, tuleb jälgida mitut aspekti – mida prügilasse tuuakse, milline on olukord lähedal olevates veekogudes ning kas ja kui palju gaasi

prügilast lendub. Prügilate olelusiga on määramatu pikkusega ning keskkonnamõjud võivad kesta sadu aastaid (Kriipsalu *et al.*, 2016).

1.2 Prügilate sulgemine

Prügilaid üritatakse kavandada võimalikult pika kasutusajaga. Keskmine sobilik kasutusiga on umbes 25-30 aastat (RTL 2004, 56, 938; Kriipsalu *et al.*, 2016). Prügilaid suletakse, kui selleks on esitatud ametlik nõue, kui lade on jõudnud projekteerimiskõrguseni või kui prügila on saavutanud projektikohase mahu. Prügila sulgemine on tegevus mis koosneb mitmest etapist (Kriipsalu *et al.*, 2016).

Esmalt koostatakse selleks sulgemisprojekt, millele eelneb suletava prügila keskkonnamõju hindamine, mis kehtib prügilatele mis on suuremad kui 1,5 hektarit, väiksematele prügilatele pole see kohustuslik. Prügila sulgemisel tuleb mõelda sulgemistööde ajakavale, selle maksumusele, vastavusele õigusaktidele, tehnilistele lahendustele ning järelhooldusele (RTL 2004, 56, 938).

Eestis on 2024. aastal kuus töötavat tavajäätmeprügilat: Tallinna Jäätmete Taaskasutuskeskus, Uikala, Paikuse, Väätsa prügila, Torma prügila ning Tuhamäe prügila, mis on enamasti kasutuses kui tööstusjäätmete prügila.

Vastavalt jäätmeseadusele lõpetati 2009. aasta 16. juuliks prügi ladestamine keskkonnanõutele mittevastavates prügilates ning kõik mittevastavad prügilad suleti (RT I 2004, Jäätmeseadus). Vastavalt keskkonnaministri määrusele nr 38 (29.04.2004) „Prügila rajamise, kasutamise ja sulgemise nõuded“ (§ 62 lg 2) pidid kõik suletud prügilad olema korrastatud paragrahvides 39–42 sätestatud korras hiljemalt 16. juuliks 2013 (RTL 2004, 56, 938). Prügila sulgemisel tuleb jäätmelade katta. Tavajäätmeprügilal peab olema gaasi kogumise kiht, vettpidav mineraalkiht, drenikiht ning kattepinna (RTL 2004, 56, 938).

1.2.1 Prügikaevandamine

Prügikaevandamise all mõeldakse tavaliste avakaevandusvõtete kasutamist prügilate ümberkujundamiseks, vähendamiseks või kaotamiseks. Eesmärkideks võib olla nii ladestatud materjalide (nt. metallid, klaas, plast, riie) taaskasutus, mulla taaskasutus kui ka lademe all oleva maa-ala vabastamine ja uuesti kasutuselevõtt mõnel muul eesmärgil (Morelli, 1990).

Kaevandus, mille käigus kaevatakse järgneva taaskasutuse eesmärgiga materjale või muid tahkeid looduslikke ressursse maha maetud jäätmetest, võib olla kasutusel nii suletud kui ka veel toimivates prügilates (Rosendal, 2009).

Varasemal ajal, kui prügilatesse ladestamine oli suhteliselt ainus võimalus jäätmetest vabanemiseks ja uute prügilate rajamine keeruline, kuna enamus ümbritsevast elanikkonnast oli vastu, aitas jäätmete kaevandamine, ümbertöötlemine ja taaskasutus vähendada prügilatega seotud probleeme. Need lahendused võimaldasid saada juurde lisaruumi jäätmete ladestamiseks ja tunduvalt vähendada ning edasi lükata prügila sulgemisega seonduvaid kulutusi (Dickinson, 1995).

Prügikaevandamine hõlmab suures osas avamaakaevandamises ja ehituses kasutatavat tehnikat. Levinud on ekskavaatorite, haardkoppekskavaatorite, frontaallaadurite, buldoosrite ja veoautode kasutamine. Lisaks tavapärasele rasketehnikale kasutatakse tänapäevases prügikaevandamises spetsiifilisi seadmeid. Näiteks kaevandamis-sorteerimisliin. Üldjoontes näeb kaevandamis-sorteerimisliini töö välja järgmine: Ekskavaator kaevab lademest jäätmed ja laeb need kas otse või frontaallaaduri vahendusel sõelurisse. Sõelur eraldab jäätmetest mineraalse pinnaselaadse fraktsiooni. Olenevalt sõelaava läbimõõdust ja mineraalse fraktsiooni edasisest kasutuseesmärgist saab materjali kasutada kohe näiteks prügila katmistöödel või suunatakse see edasi peenema sõelaavaga sõelurisse, mis võimaldab saada suurema pinnasesisaldusega materjali. Kuna sorteerimistöde eesmärk on enamasti igal pool erinev, siis varieerub ka seadmete valik ja paigutusjärjekord. Purustit ja magnetit kasutatakse mõnikord enne sõelumist, teistel juhtudel peale sõelumist. Täismahus ja kõrge materjali eraldusvõimega ajutist sorteerimisliini on kaevandatavasse prügilasse keeruline rajada. Tavaliselt on jäätmed määrjad ning materjalide eraldamine raskendatud. Pinnaselaadse peenfraktsiooni eraldamiseks jäätmetest kasutatakse sageli vaid sõelurit (Kriipsalu *et al.*, 2016).

1.3 Antibiootikumid ja antibiootikumiresistentsus

Antibiootikumid on madala molekulmassiga ained, mida toodavad mikroorganismid ja mis tapavad või aeglustavad teiste mikroorganismide kasvu, kuid kahjustavad peremeesorganismi kas vähesel või olematul määral (Davies, 2006). Ehk tegemist on ühe antimikroobsete ainete klassiga ja suurima kas loodusliku, poolsünteetilise või sünteetilise päritoluga ainete rühmaga, mis toimivad bakterite vastu (Rothrock *et al.*, 2016). Enamasti on antibiootikumid kasutusel kui ravimid, mida kasutatakse bakteriaalsete infektsioonide ennetamiseks ja raviks.

Antibiootikumiresistentsus on bakterite omadus muutuda vastupanuvõimeliseks seni toimunud antibiootikumidele. Resistentsust kirjeldatakse bakterite fenotüübiliste (nt kasvumustrid) või genotüübiliste (nt resistentsusgeenide olemasolu ja/või ekspressioon) omadustega ning seda saab liigitada päritolu (looduslik versus omandatud resistentsus) või tüübi (ühe- või mitmekordne resistentsus) alusel (Davison *et al.*, 2000). Resistentseteks muutunud bakter võib edukalt inimest nakatada ning sellise bakteri poolt põhjustatud infektsioone on raskem ravida allesjäänud võimalike kasutatavate antibiootikumide kahanemise tõttu. Sellised haigused põhjustavad kõrgemaid ravikulusid, pikemat haiglasviibimist ja suuremat suremust. Antibiootikumiresistentsus on kõikjal maailmas tõusnud ohtlikult kõrgele tasemele. Peamine resistentsuse tekkimise põhjus on antibiootikumide väärkasutus ja halb utiliseerimine. Lisaks on levitajateks riigid, kus puuduvad standardsed ravijuhised ja inimestele ning loomadele mõeldud antibiootikumid on müügil ilma retseptita. Samuti kirjutavad tervishoiutöötajad ja veterinaararstid antibiootikume liiga palju välja. Juhul kui antibiootikumide väljakirjutamise ja kasutamise viis ei muutu, siis isegi uute ravimite väljatöötamine ei lahenda probleemi ning me jõuame ajastusse, kus tavalised infektsioonid võivad tappa (WHO, 2023).

1.3.1 Antibiootikumiresistentsusgeenid ja nende levik mullakeskkonnas

Antibiootikumiresistentsuse geenid (ARG) on geenid, mis kodeerivad valke või ensüüme, mis võimaldavad bakteritel antibiootikumide mõjule vastu seista. Need geenid võivad olla bakteripopulatsioonides looduslikult esinevad või omandatud erinevate mehhanismide, näiteks mutatsiooni, horisontaalse geeniülekanne või geeniduplikatsiooni, kaudu. ARG-e võib leida erinevates keskkondades, sealhulgas pinnases, vees ja inimese soolestikus, kuid nende leviku ja püsivuse potentsiaali tõttu on need eriti murettekitavad maismaakeskkondades, nagu pinnas ja prügilad (Jian *et al.* 2021). ARG-de olemasolu bakterites võimaldab neil antibiootikumide juuresolekul ellu jääda ja paljuneda, muutes antibiootikumid bakterite hävitamise või kasvu pidurdamise suhtes ebatõhusaks. Selline resistentsus võib esineda väga erinevatel bakteritel, sealhulgas nii patogeensetel kui ka mittepatogeensetel tüvedel, ning see võib levida bakteripopulatsioonides ja erinevate bakteriliikide vahel (Lee *et al.* 2018).

Mullakeskkonda võivad ARG-d sattuda mitmest allikast. Üks levinumaid allikaid on inimeste ja loomade jäätmed ning kasutaud mahaheidetud ained. Mullakeskkonda saabub suures koguses tahked olmejäätmeid, sealhulgas inimeste ja loomade kasutatud esemed, söögitarbed ja fekaalijäätmed. Need jäätmed võivad sisaldada ARG-e kandvaid baktereid, samuti antibiootikumide ja muude inim- ja veterinaarmeditsiinis kasutatavate antimikroobsete ainete

jääke. Ladustatuna loovad need materjalid keskkonna, mis soodustab ARG-de levikut ja püsivust. Teiseks allikaks võib välja tuua ravimijäägid. Mullapinda, eriti prügilatesse, satuvad ka farmaatsiatooted, mis võivad sisaldada antibiootikume või muid antimikroobseid ühendeid. Kasutamata ravimite või ravimitootmisjäätmete ebaõige kõrvaldamine võib põhjustada nende ainete sattumist keskkonda, mis aitab kaasa antibiootikumiresistentsuse tekkele (Symochko *et al.* 2023).

Lisaks ARG-de allikate mõistmisele peab arvestama ka ARG-de leviku ja arengu kiirusega maismaakeskkonnas mis võib sõltuda mitmest tegurist. Üheks tähtsaks teguriks on selektiivne mõju (*selective pressure*), mille puhul antibiootikumide või muude antimikroobsete ainete olemasolu keskkonnas tekitab resistentsusgeene kandvatele bakteritele selektiivset survet. Kõrge antibiootikumijääkide tase võib kiirendada resistentsuse levikut, soodustades resistentsete bakterite ellujäämist ja paljunemist (Kolář *et al.* 2001). Mikroobikogukonna dünaamika on ka üks mõjutavatest teguritest, kuna mikroobikogukonna koosseis ja mitmekesisus mõjutavad ARGde ülekandumist ja püsimist. Sellised tegurid nagu bakterite arvukus, liikide vastastikmõju ja ökoloogilised nišid võivad mõjutada resistentsusgeenide levikut ja olemasolu keskkonnas (Goryluk-Salmonowicz ja Popowska 2022). Viimaseks tähtsaks teguriks võib välja tuua ka keskkonnatingimused kindlal alal. Mullakeskkonna füüsikalised ja keemilised omadused, nagu pH, temperatuur, niiskusesisaldus ja hapniku kättesaadavus, võivad mõjutada ARG-e kandvate bakterite ellujäämist ja aktiivsust kuna need tingimused võivad mõjutada horisontaalse geeniülekanne kiirust ja resistentsusdeterminantide stabiilsust (Bengtsson-Palme *et al.* 2017).

1.3.2 Antibiootikumiresistentsuse mehhanismid

Antibiootikumiresistentsuse mehhanismid on erinevad viisid, kuidas bakterid ja muud mikroorganismid arendavad välja võime antibiootikumidega kokkupuute üle elada, muutes ravimid nende vastu ebatõhusaks. Need mehhanismid võivad olla loomulikud protsessid või omandatud geneetiliste mutatsioonide või horisontaalse geenisiirde kaudu (Jian *et al.* 2021).

Antibiootikumiresistentsuse mehhanisme on palju, kuid võib välja tuua kõige tuntumad. Üheks meetodiks võib välja tuua ensümaatilise inaktiveerimise. Mõned bakterid on suutelised tootma ensüüme, mis mõjutavad antibiootikumide keemilist koostist muutes need inaktiivseks. Näiteks β -laktamaasi ensüümid võivad lagundada β -laktaami antibiootikume, nagu penitsilliinid ja tsefalosporiinid, muutes need bakterite suhtes ebatõhusaks (De Pascale ja Wright 2010). Teiseks meetodiks võib tuua eflukspumpade süsteemid, mis nende olemasolul eemaldavad

antibiootikumide aktiivselt bakterist, vähendades ravimi kontsentratsiooni rakus ja piirates seeläbi selle tõhusust. See mehhanism on eriti levinud Gram-negatiivsete bakterite puhul (Jian *et al.* 2021). Veel üheks kaitsemehhanismiks bakteritel võib tuua bakterite võime muuta oma rakumembraane või rakuseina struktuure, et vähendada antibiootikumide sisenemist rakku, vähendades seega ravimite võimet avaldada oma antimikroobset toimet. Seda mehhanismi täheldatakse ka sageli Gram-negatiivsete bakterite puhul, millel on täiendavaks barjääriks välismembraan (Delcour 2008).

Paljude bakterite kaitsemehhanismiks on ka võime moodustada biokilesid, mis on rakuväliste polümeerse ainete maatriksi sisse põimitud keerulised bakterite kogukonnad. Biokiled pakuvad kaitset antibiootikumide ja peremeesorganismi immuunvastuse eest, muutes biokilede sees olevad bakterid antibiootikumide suhtes vastupidavamaks (Michaelis ja Grohmann 2023). Lisaks mõnede bakterite kaitsemehhanismiks võib tuua kvoorumtundlikkust, mida bakterid kasutavad et koordineerida geeniekspressiooni vastusena rakupopulatsiooni tihedusele. See võib viia antibiootikumiresistentsusega seotud geenide üle reguleerimiseni. Bakterid, saavutades teatud tiheduse, suurendavad resistentsust antibiootikumide suhtes (Raju *et al.* 2022). Ja viimaseks, üheks kõige levinumaks meetodiks võib tuua horisontaalse geeniülekanne, tänu millele bakterid võivad omandada ARG-e teistelt bakteritelt horisontaalse geenisiirde mehhanismide, nagu konjugatsioon, transformatsioon ja transduktsioon, kaudu. See võimaldab resistentsuse tunnuste kiiret levikut bakteripopulatsioonides ja eri liikide vahel (Lee *et al.* 2018).

1.3.3 Resistentsuse leviku uurimismeetodid

Kliinilises mikrobioloogias kõige laialdasemalt kasutatavad antibiootikumide tundlikkuse testimise meetodid põhinevad antibiootikumiresistentsuse fenotüüpilisel tuvastamisel, mõõtes bakterite kasvu testitava antibiootikumi juuresolekul. Nende tavapäraste meetodite tulemuste saamiseks kulub tavaliselt 24 tundi (March ja Rosello 2017).

Fenotüüpiliste meetodite alla kuuluvad näiteks lahjendamine, difusioon, gradiendi test, kromogeensed söötmed ja automatiseeritud seadmed kasvu mõõtmiseks (Gajic *et al.* 2022). Kasutatakse seeriaviisilisi lahjendusi (logaritmilised lahjendused), et vähendada bakterite kontsentratsiooni konkreetse katsemetodi jaoks vajaliku kontsentratsioonini või kontsentratsioonini, mida on lihtsam loendada, kui see kantakse agarplaadile (Sapkota 2023). Difusiooni meetod, ehk ketas difusiooni test seisneb selles, et antimikroobsete ainetega küllastatud paberzettad asetatakse agar-substraadi pinnale külvatud bakterite murule, plaati

inkubeeritakse üleöö ja mõõdetakse inhibeerimistsooni olemasolu või puudumist ketaste ümber (Prusty 2022).

Gradiendi meetod kasutab tundlikkuse määramise vahendina kontsentratsioonigradiendi loomist agaris. Selles kasutatakse õhukesi plastist testribasid, mille alumine pool on immutatud kuivatatud antibiootikumide kontsentratsioonigradiendiga ja mille ülemisele pinnale on märgitud kontsentratsiooniskaala (Reller *et al.* 2009).

Kromogeensete söötmete meetodil kasutatakse ära sihtorganismidele iseloomulikke spetsiifilised ensüümsüsteemid, mis metaboliseerivad substraate, et vabastada kromogeeni. Kromogeeni saab seejärel visuaalselt tuvastada, vaadeldes otseselt selget värvimuutust söötmes. Seega võimaldavad need selektiivsed ja diferentseeritud söötmed sihtpatogeenidel kasvada värviliste kolooniatena (Siegrist 2024).

Lisaks saab resistentsust uurida ka molekulaarsete meetodite ja mass spektromeetria abil. Molekulaarsete meetodite alla kuuluvad PCR, qPCR, tsükli sekveneerimine ja NGS (Gajic *et al.* 2022)

Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) on laboratoorne nukleiinhappe amplifikatsioonimeetod, mida kasutatakse desoksüribonukleiinhappe (DNA) või ribonukleiinhappe (RNA) järjestuste lühikeste segmentide denatureerimiseks ja renatureerimiseks, kasutades DNA-polümeraasi ensüümi. PCR-meetodi puhul hübridiseerub praimerite paar proovi-DNAga ja määratleb piirkonna, mida amplifitseeritakse, mille tulemuseks on miljonid ja miljonid koopiad väga lühikese aja jooksul. Praimerid on alati kindla geeni või järjestuse spetsiifilised, seega saab kasutada ka ARG-ide tuvastamisel (Khehra *et al.* 2023). QPCR ehk kvantitatiivne PCR määrab kindlaks märklaua DNA tegeliku koguse proovis. QPCR reaktsioonis kasutatakse fluorestseeruvat värvi, mis võimaldab jälgida DNA paljundamist reaalajas (Dymond 2013).

Tsükli sekveneerimine on meetod mida kasutatakse Sanger'i sekveneerimisel, et suurendada fragmentide fluorestsentsseerumise intensiivsust. Taq-polümeraas võimaldab sekveneerimisega seotud praimerite sidumist ja pikendamist mitmes voorus. Nii nagu PCR-i puhul, ainult et kahe praimeriga asemel on ainult üks praimer. Ainult ühe praimeriga jääb märklaua kogus samaks (Blakesley 2011).

Järgmise põlvkonna sekveneerimine (NGS) on sekveneerimistehnoloogia, mis pakub ülikõrget läbilaskevõimet, skaleeritavust ja kiirust. Seda tehnoloogiat kasutatakse nukleotiidide järjestuse määramiseks terves genoomis või DNA või RNA sihtpiirkondades (Qin 2019)

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö peamine eesmärk oli võrrelda erinevaid prügilakatteid, biofilter-kattekiht ja MBT, antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) leviku seisukohast pinnases.

Konkreetsed eesmärgid olid järgmised:

- võrrelda prügila pinnakihist ja prügilademest võetud proovide ARG-ide sisaldust,
- hinnata prügist valmistatud prügilakatete ARG-ide sisaldust,
- hinnata ARG-ide arvukust ja osakaalu erinevates prügilakatetes.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Proovialade kirjeldus

Prügila 1 on suletud prügila, kuhu on peamiselt ladestatud olmejäätmeid. Prügila on kaetud metaani oksüdeerimiseks vajaliku biofilter-kattekihiga. Biokattesüsteem koosneb prügila kaevandamisel saadud materjali peenfraktsioonist (osakeste suurus <40mm), mis on kokku segatud laagerdunud reoveesette komposti ja kohalikku pinnasega suhtes 3:1:1. Kattekihi paksus on 1,50-1,80 m. Prügila sulgemise käigus haljastati ladestusala ning hetkel on loodud mäele mitmed vaba aja veetmise võimalused.

Prügila 2 on hetkel töötav prügila. Prügilas kasutatakse jäätmekütuse tootmiseks mehaanilis-bioloogilist töötlust (MBT), mis hõlmab tahkete olmejäätmete mehaanilist töötlemist (purustamine, metalljäätmete eraldamine) koos bioloogilise töötlemise vormiga, nagu näiteks kompostimine või anaeroobne käärivamine. MBT-tehnoloogia kasutab bioloogilise lagunemise käigus looduslikult tekkivat soojust, et kuivatada ja stabiliseerida segaolmejäätmeid (HSE 2024). Selline jäätmete käitlus on Euroopas kehtestatud käitlusnormide põhine ja on parem viis kui jäätmete ladestamine või masspõletamine. Prügilas on kasutusel metaani oksüdatsiooni biokattesüsteem mis koosneb kahest 150x80 m alast. MBT fraktsiooni suurus on 80 mm ning kattekihtide paksus aladel on 2,25 m (MBT80/2.25m) ja 1,5 m (MBT80/1,5m).

Prügila 3 on samuti hetkel töötav prügila, kus kasutatakse MBT töötlust. Prügilas on kasutusel metaani oksüdatsiooni biokattesüsteem mis koosneb kahest 10x10 m platsist katte paksusega 1,5 m ja MBT fraktsiooni suurusega 0-40 mm (MBT40/1,5m) ja 0-20 mm (MBT20/1,5m).

2.2.2 Pinnaseproovide kogumine ja keemiline analüüs

Kõigis kolmes prügilas asuvad statsionaarsed gaasimõõtmispunktid (prügilas 1 kolm tükki ning teistes kummaski kaks tükki), mille juurest koguti pinnaseproovid. Pinnaseproovide võtmiseks kaevati prügila kattekiht gaasimõõtmispunkti juures kuni prügilademeni lahti ja proovid võeti vahetult peale kattepinnase lahti kaevamist. Käesolevas töös kasutatakse proove iga kaeve pinnaskihist ning prügilademest. Igas punktis võeti 5 osaproovi, mis segati kokku kilekotis ning suleti õhukindlalt, kuni laborisse jõudmiseni hoiti proove külmakastides. Laboris segati proovid läbi ja jaotati keemiliste analüüside (1000 g) ja DNA eraldamis proovideks (60 g), mida säilitati vastavalt +4 ja -20 °C juures. Antud töö autor pinnaseproovide kogumises osa ei võtnud.

Kuivaine osakaalu (KA) määramiseks kuumutati proove 105°C juures, mis viidi läbi Eesti Maaülikooli põllumajandus- ja keskkonnainstituudi bio- ja keskkonnakeemia laboris Kaja Orupõllu (PhD) poolt.

2.2.3 DNA eraldamine

Pinnaseproovidest DNA eraldamiseks kasutati DNeasy PowerSoil Pro Kit-i (Qiagen, USA) ja lähtuti tootja protokollist. DNA eraldati 250 mg pinnaseproovist. Homogeniseerimisetapis kasutati TissueLyzerII (Qiagen) homogenisaatorit vastavalt tootjapoolsele protokollile (2x5 min sagedusel 25 Hz). Eraldatud DNA kontsentratsioonide mõõtmiseks kasutati Qubit 4 fluoromeetrit (Thermo Fisher Scientific, USA). Eraldatud DNA proovid pandi säilivuse tagamiseks sügavkülmikusse -20°C juurde.

2.2.4 Geenide kvantifitseerimine

Geenide kvantifitseerimiseks kasutati kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR). QPCR abil määrati eraldatud DNA proovidest bakterite ja arhede 16S rRNA ning kuue erineva antibiootikumiresistentsusgeeni arvukused – MLS (makroliid-linkosamiid-streptogramiin) vastast resistentsust kodeeriv *ermF*, sulfonamiidiresistentsust kodeerivad *sul1* ja *sul2*, vankomüsiiniresistentsust kodeeriv *vanO* ning multiresistentsust kodeerivad *acrB* ja *mexF*.

Tabel 1. qPCR sekveneerimise praimerid ja amplifikatsiooni tingimused.

Märklaudgeen	Praimer	Praimeri järjestus (5'-3')	Viide	Praimeri kontsentratsioon (µM)	Fragmendi pikkus (aluspaari)	Määramispiir (koopiat reaktsioonis)	Amplifikatsiooni programm
Bakterite 16S rRNA	Bact517F	GCCAGCAGCCGCGGTAA	Liu <i>et al.</i> , 2007	0,6	530	100	50°C 2 min, 95°C 10 min; 35 tsükli: 95°C 30 s; 60°C 45 s; 72°C 45s
	Bact1028R	CGACARCCATGCASCACCT ¹	Dethlefsen <i>et al.</i> , 2008				
Arhede 16S rRNA	A519F	CAGCCGCCGCGGTAA	Øvreås <i>et al.</i> , 1997	0,6	395	25	50°C 2 min, 95°C 10 min; 35 tsükli: 95°C 15 s; 56°C 30 s; 72°C 30s
	A915R	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	Stahl & Amann, 1991				
<i>mexF</i>	mexF-F1	CAGGACAAGCARTACCTGGTGGC ¹	Nõlvak <i>et al.</i> , 2023	0,8	566	6	50°C 2 min, 95°C 10 min; 40 tsükli: 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s
	mexF-R2	AGGTARAYCTGCAGGGTGTGCGAA ¹					
<i>acrB</i>	acrB-F	ATATCCTACGATTGCACCGC	Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009	0,8	160	6	50°C 2 min, 95°C 10 min; 40 tsükli: 95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s
	acrB-R	GGTACCCGTGGAGTCACTGT					
<i>sul1</i>	sul1-F1	CTGAACGATATCCAAGGATTYCC ¹	Heuer <i>et al.</i> , 2008	0,8	239	50	50°C 2 min, 95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s, 54°C 30 s, 72°C 30 s
	sul1-R1	AAAAATCCCATCCCCGGRTC ¹					
<i>sul2</i>	sul2-F	CTCAATGATATTCGCGGTTTYCC ¹	Heuer & Smalla, 2007	0,6	245	50	50°C 2 min, 95°C 10 min; 45 tsükli: 95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s
	sul2-R	AAAAACCCCATGCCGGRTC ¹					
<i>vanO</i>	F	CAGGAGGACTAACCCGAAAC	Simoniš, 2018	0,6	303	12	50°C 2 min, 95°C 10 min; 40 tsükli: 95°C 15 s, 59°C 30 s, 72°C 30 s
	7R	CTTCTTCCCGTGCATTGTCA					
<i>ermF</i>	ermF-F	TTTTCTGGGAGGTTCCATTG	Szczepanowski <i>et al.</i> , 2009	0,8	323	6	50°C 2 min, 95°C 10 min; 40 tsükli: 95°C 15 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s
	ermF-R	TTTCCGAAATTGACCTGACC					

¹ – Nukleotiidide tähistused: **R** – A või G; **S** – C või G; **Y** – C või T

QPCR reaktsioonid olid läbi viidud RotorGene® Q (Qiagen) masinas kasutades RotorGene Series Software version 2.0.2 (Qiagen) tarkvara. QPCR segu, mille lõppmaht oli 10 µl, sisaldas 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix reagenti (Thermo Fisher Scientific), 0,2 µl optimeeritud kontsentratsiooniga geenispetsiifilisi praimereid (praimer F ja praimer R), 1 µl eraldatud DNAd ja 3,6 µl steriliseeritud destilleeritud vett. QPCR programmid ja geenispetsiifilised praimerid on toodud tabelis 1. Kõik proovid olid amplifitseeritud kolmes korduses ja igale mõõtmisele oli lisatud negatiivne kontroll. Negatiivne kontroll sisaldas kõiki reaktsioonisegu komponente peale proovi DNAd. Pärast qPCR amplifikatsioonireaktsiooni oli määratud sulamiskõver vahemikus 70 °C kuni 90 °C (0,35 °C/3 s) pideva fluorestsentssignaali mõõtmisega. Märklaudgeenide amplifikatsiooniefektiivsuse iga proovi jaoks individuaalselt analüüsiti programmiga LinRegPCR version 2021.2 abil (Ruijter *et al.* 2009).

Märklaudgeenide koopiaarvude kvantifitseerimiseks analüüsiti esmalt sulamiskõverate asukohta ja kuju ning amplifikatsioonikõverate ühtsust. Hälbivate amplifikatsiooni- ja sulamiskõveratega proovid elimineeriti edasisest analüüsist.

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

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

kus:

- $N_{0,A}$ – märklaudgeeni kontsentratsioon proovis fluorestsentsühikutes
- $N_{0,B}$ – märklaudgeeni järjestuse kontsentratsioon standardlahjenduses
- E – amplifikatsiooni efektiivsus
- N_t – fluorestsentsi läviväärtus
- C_t – läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsükli arv

Märklaudgeenide arvukuse leidmiseks korrutati saadud kordusaste vastava standardlahjenduse kontsentratsiooniga. Lõplik arvukus proovis leiti kvantifitseerimisstandardi erinevate punktide alusel saadud koopiaarvude aritmeetilisel keskmistamisel. Mikroobikoosluse arvukuse koopiaarvud on esitatud ühe grammi kuiva pinnase kohta (geenikoopiat/g KA). Funktsionaalsete geenide osakaalude arvutamiseks prokarüootide koosluses määrati nende protsent bakterite ning arhede 16S rRNA geenide summast.

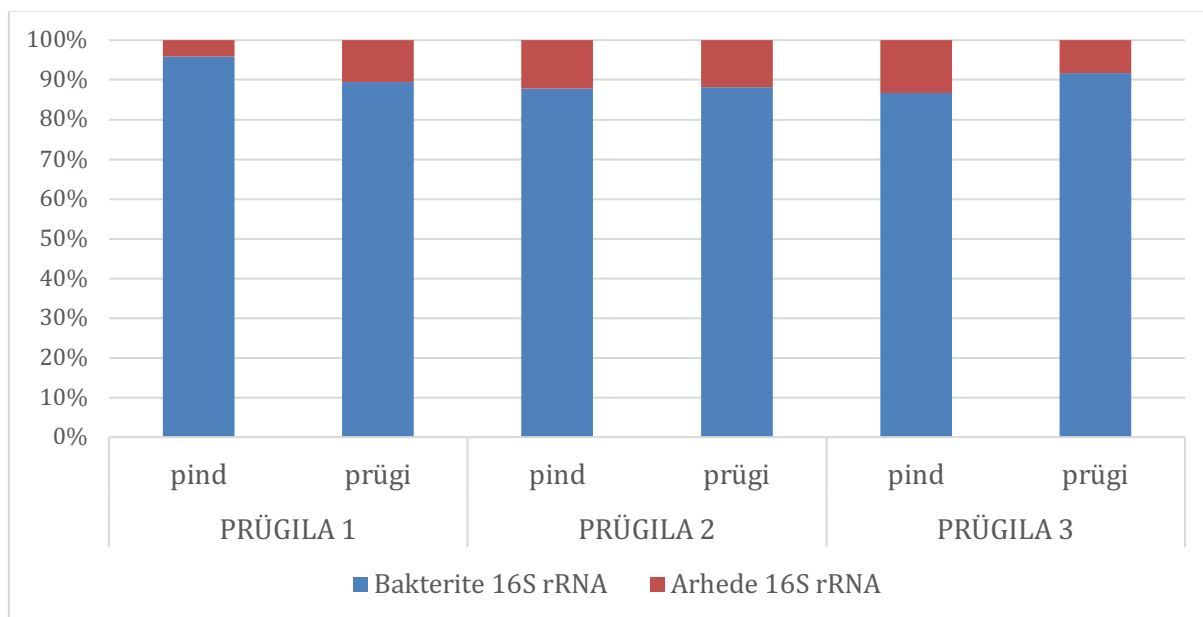
2.2.5 Statistiline analüüs

ARG-ide üldarvukuste ning osakaalude statistiliselt oluliste erinevuste määramiseks erinevate prügilakattematerjalide ning pinnakihi ja prügilademe vahel kasutati Studenti t-testi.

2.3 Tulemused ja arutelu

Uuringus määrati ARG-ide üldarvukused ja osakaalud mikroobikooslusest. Määratud resistentsusgeenid kodeerisid multiresistentsust (*acrB* ja *mexF*), sulfonamiidiresistentsust (*sull* ja *sul2*), MLS resistentsust (*ermF*) ja vankomüsiiniresistentsust (*vanO*). Geene kvantifitseeriti kolmel proovivõtukohtal kahel erineval sügavusel – pinnakihis ja prügilademes. Saadud geenikoopiate arvukusi ning osakaalusid võrreldi omavahel sügavuse ja kattematerjali tüübi järgi.

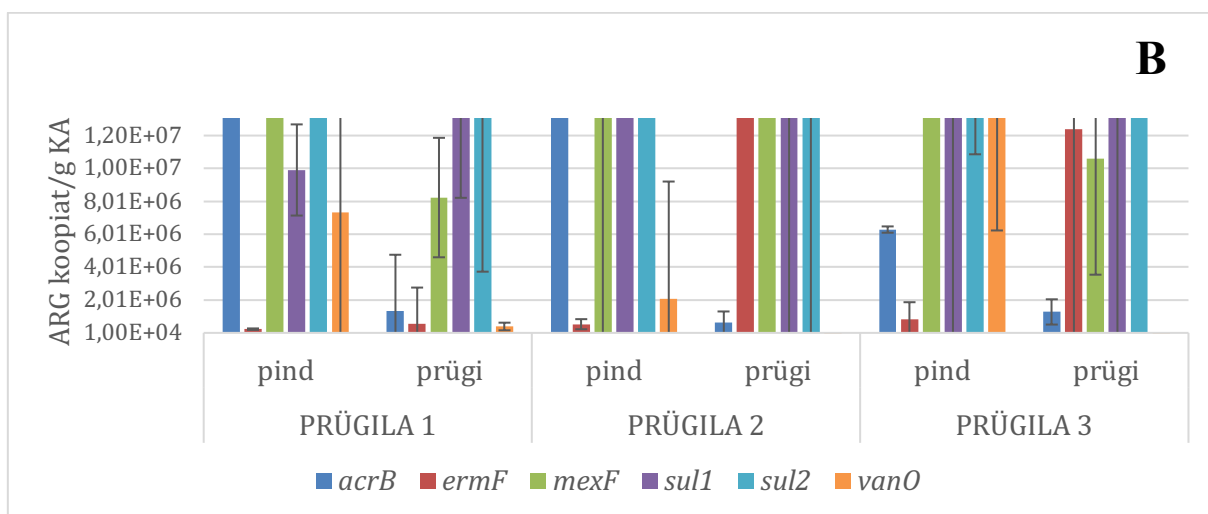
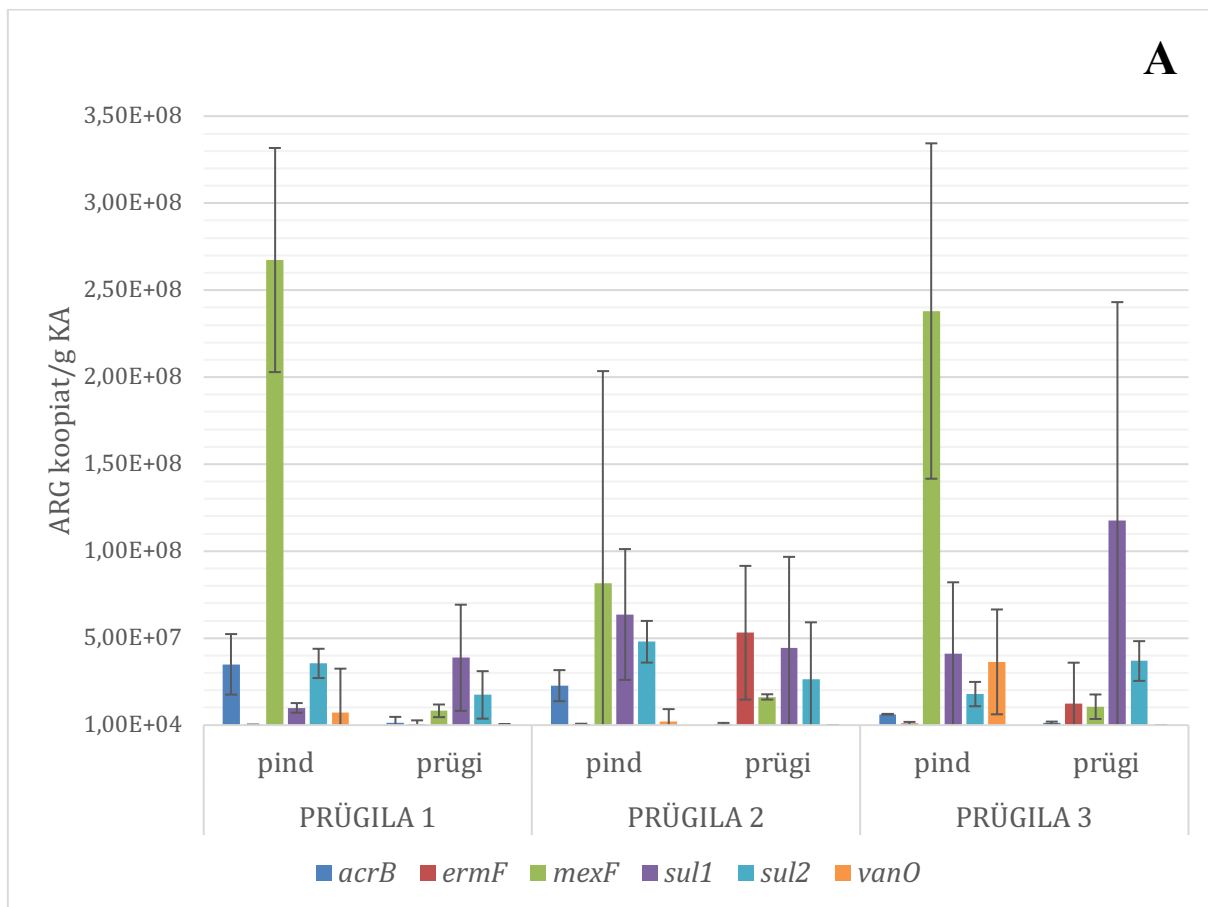
Kogu mikroobikoosluse hindamiseks kvantifitseeriti nii bakterite kui ka arhede 16S rRNA geenid (Joonis 1). Pinnakihis jäi bakterite üldarvukus vahemikku $2,51 \times 10^{10}$ kuni $8,35 \times 10^{10}$ geenikoopiat/g KA ja arhede oma vahemikku $3,56 \times 10^9$ kuni $3,83 \times 10^9$ geenikoopiat/g KA. Prügilademes vastavalt $7,54 \times 10^9$ kuni $1,78 \times 10^{10}$ geenikoopiat/g KA ja $8,88 \times 10^8$ kuni $1,60 \times 10^9$ geenikoopiat/g KA.



Joonis 1. Arhede osakaal mikroobikoosluses prügilate pinnakihis ja prügilademes.

Arhede osakaal oli MBT kattega prügilates kõrgem kui biofilter-kattekihiga prügilas 1. Kõige kõrgem oli arhede osakaal prügilas 2.

Järgmisena kvantifitseeriti prügilates ARG-id (Joonis 2), mille järgi selgus, et *acrB*, *mexF* ja *vanO* geenide arvukused olid kõikides prügilates kõrgemad pinnakihis ning *ermF* geeni arvukus oli kõikides prügilates kõrgem prügilademes. *Sul1* geeni arvukus oli prügilas 1 ja prügilas 3 kõrgem prügilademes, kuid prügilas 2 oli arvukus kõrgem pinnakihis. *Sul2* oli kõrgema arvukusega pinnakihis prügilas 1 ja prügilas 2, kuid prügilas 3 oli arvukus suurem prügilademes.



Joonis 2. Antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) üldarvukus prügilate pinnakihis ja prügilademes (A) ning sama joonise skaala alumine osa suurendatult (B).

Pinnakihi jäi *acrB* geeni arvukus vahemikku $6,16 \times 10^6$ kuni $5,67 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA, *ermF* arvukus vahemikku $1,92 \times 10^5$ kuni $1,85 \times 10^6$ geenikoopiat/g KA, *mexF* arvukus vahemikku $3,25 \times 10^7$ kuni $3,40 \times 10^8$ geenikoopiat/g KA, *sull* arvukus vahemikku $9,05 \times 10^6$ kuni $9,55 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA, *sul2* arvukus vahemikku $1,36 \times 10^7$ kuni $5,71 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA ja *vanO* arvukus vahemikku $4,08 \times 10^5$ kuni $6,35 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA.

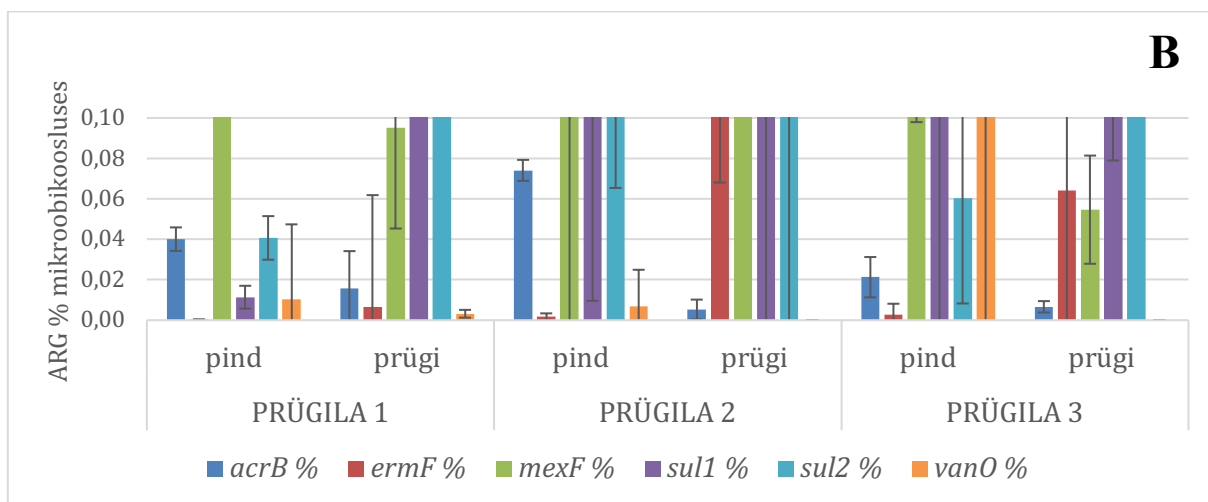
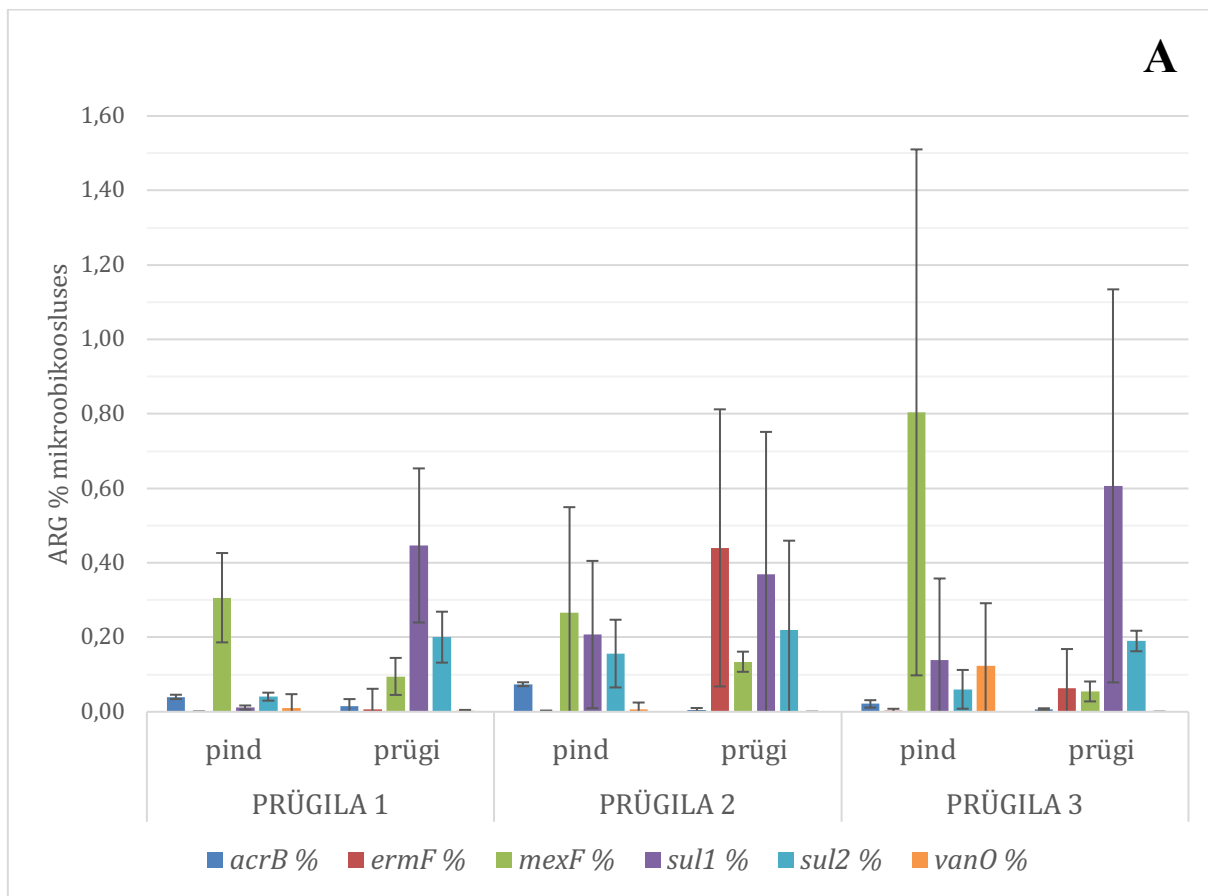
Prügilademes jäi *acrB* geeni arvukus vahemikku $3,18 \times 10^5$ kuni $1,94 \times 10^6$ geenikoopiat/g KA, *ermF* arvukus vahemikku $7,34 \times 10^4$ kuni $8,68 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA, *mexF* arvukus vahemikku $6,61 \times 10^6$ kuni $1,73 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA, *sull* arvukus vahemikku $1,35 \times 10^7$ kuni $2,36 \times 10^8$ geenikoopiat/g KA ja *sul2* arvukus vahemikku $6,04 \times 10^6$ kuni $5,82 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA (Joonis 2). *VanO* geen oli tuvastatav ainult prügila 1 prügilademest ($3,72 \times 10^5$ kuni $4,27 \times 10^5$ geenikoopiat/g KA), MBT kattematerjaliga prügilate prügilademes jäi vastava geeni arvukus alla määramispiiri (Tabel 1).

Prügila 1 biofilter-kattekihi pinnakihi olid *acrB* ($p < 0,05$) ja *mexF* ($p < 0,001$) geenide arvukused statistiliselt oluliselt suuremad kui prügilademes. MBT tüüpi prügilakatte pinnakihi olid *acrB* ($p < 0,01$), *mexF* ($p < 0,05$) ja *vanO* ($p < 0,001$) geenide arvukused statistiliselt oluliselt suuremad kui prügilademes ning *ermF* arvukus statistiliselt oluliselt väiksem ($p < 0,01$) kui prügilademes. Erinevat tüüpi prügilakattematerjalide pinnakihtide vahel oli statistiliselt oluline erinevus ($p < 0,05$) *sull* geeni arvukuses, mida oli MBT tüüpi kattematerjalis rohkem. Erinevate prügilate prügilademetel vahel puudusid statistiliselt olulised erinevused.

Erinevad uuringud haritavate põllumaade kohta on näidanud, et *sull* geeni arvukus jääb Austrias vahemikku $1,31 \times 10^4$ kuni $1,84 \times 10^5$ geenikoopiat/g KA (Radu 2021), USA-s $1,6 \times 10^5$ geenikoopiat/g KA (Dungan 2019) ja Eestis $4,19 \times 10^2$ kuni $1,25 \times 10^3$ geenikoopiat/g KA (Nõlvak *et al.*, 2016). Eestis on leitud looduslikel rohumaaal *sull* geeni arvukuseks $4,87 \times 10^2$ kuni $6,31 \times 10^2$ (Nõlvak *et al.*, 2016) ja Austria metsamuldades $1,68 \times 10^3$ kuni $1,90 \times 10^4$ geenikoopiat/g KA (Radu 2021). Antud uuringus jäi *sull* geeni arvukus pinnakihi vahemikku $9,05 \times 10^6$ kuni $9,55 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA ja prügilademes vahemikku $1,35 \times 10^7$ kuni $2,36 \times 10^8$ geenikoopiat/g KA, mis on oluliselt kõrgemad, kui looduslik taust.

Lisaks üldarvukusele uuriti ka ARG-ide osakaalu mikroobikooslusest pinna ja prügilademe kihtides (Joonis 3). Prügila 1 biofilter-kattekihi pinnakihi oli *sul2* geeni osakaal statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$) väiksem kui prügilademes. Ülejäänud geenide osakaaludes statistiliselt olulised erinevused puudusid.

Kõige suurema osakaaluga kõikides prügilates kokku osutus olema *sul1* geen ja kõige väiksema osakaaluga *vanO*. *AcrB* geeni osakaal oli kõige suurem prügilas 2 ja kõige väiksem prügilas 3, *ermF* geeni osakaal kõige suurem prügilas 2 ja väiksem prügilas 1, *mexF* geeni osakaal kõige suurem prügilas 3 ja väiksem prügilas 2, *sul1* geeni osakaal suurem prügilas 3 ja väiksem prügilas 1, *sul2* geeni osakaal suurem prügilas 2 ja väiksem prügilas 1 ning *vanO* geeni osakaal suurem prügilas 3 ja võrdse osakaaluga prügilas 1 ja 2.



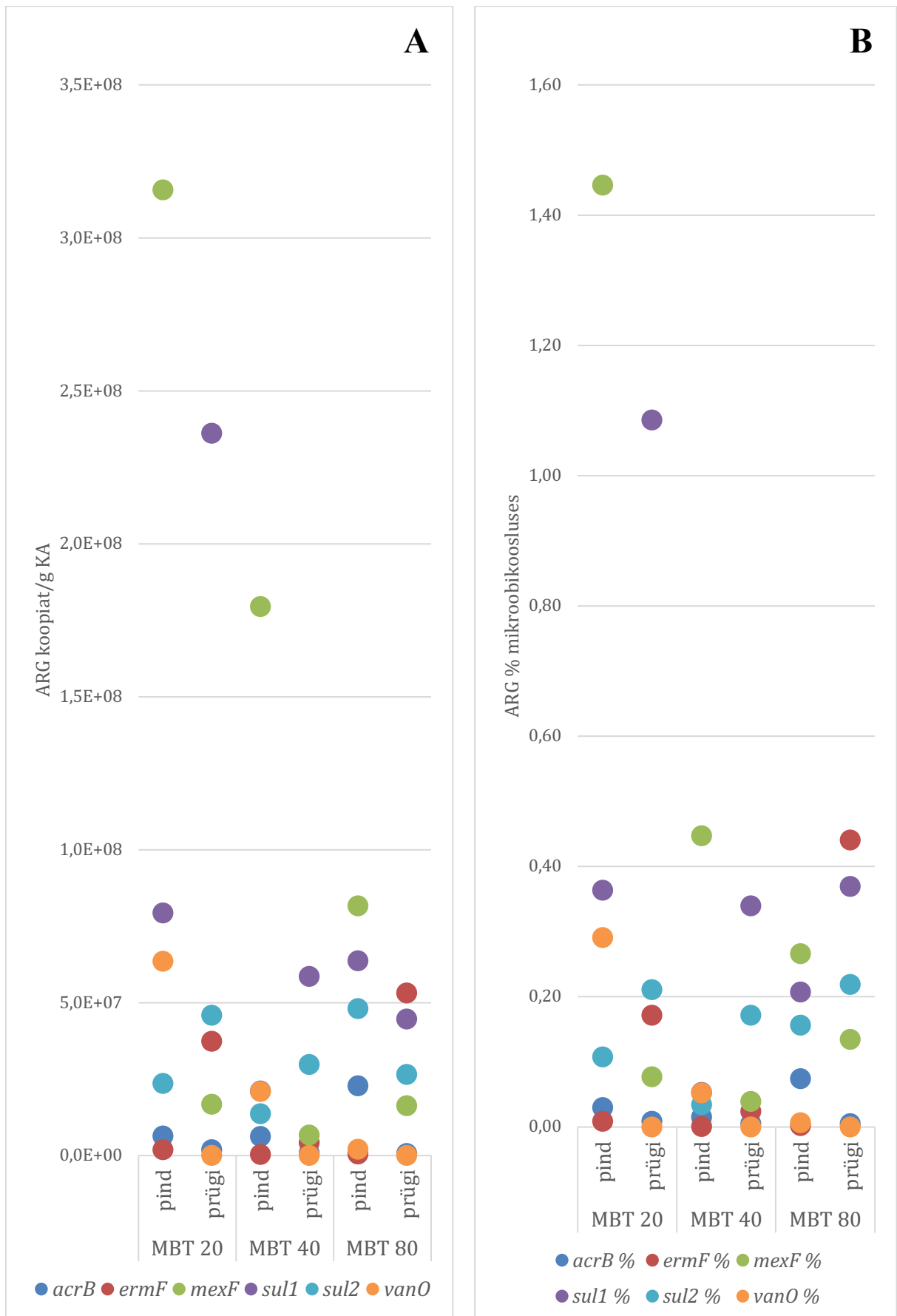
Joonis 3. Antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) osakaal mikroobikoosluusest prügilate pinnakihis ja prügilademes (A) ning sama joonise skaala alumine osa suurendatult (B).

Kõige rohkem võrdluseks sobivaid uuringuid on tehtud sulfonamiidiresistentsust kodeerivate geenide kohta. Hiina prügilate prügilademeid uurides on leitud, et *sul1* geeni osakaal jääb vahemikku 0,002-0,104% ning *sul2* geeni osakaal vahemikku 0,005-0,288% (Yao 2020). Samas uuringus leiti, et *mexF* geeni keskmine arvukus prügilademes oli 0,04%. Ka (Chen 2021) on näidanud, et hiina prügilate prügilademes on *sul1* ja *sul2* geenide osakaalud vastavalt 0,01-0,15% ja 0,03-0,49%. Käesolevas uuringus jäi *sul1* geeni osakaal prügilademes vahemikku 0,19-1,09%, *sul2* oma vahemikku 0,11-0,28%, ning *mexF* oma vahemikku 0,04-0,16%. Kuna *sul* geenid on sünteetilise päritoluga võib nende olemasolu ja suurem osakaal käesolevas uuringus viidata suuremale inimese mõjule resistentsusgeenide levikus. Küll aga selle kindlaks tegemiseks oleks vajalik edasine uurimine suurema proovi valimiga, kuna *sul* geenidel on ka palju looduslikke homolooge ja osa baktereid kohanevad keskkonnaga kiiremini ja kergemini kui teised. Lisaks osa baktereid kasutab looduses antibiootikume ka energia allikana ja seega suudavad kiiremini muutuda, ka selliste bakterite prevaleerimine uuritud pinnases võib olla põhjuseks. Sulfoonamiidiresistentsus on üks kõige levinumaid resistentsuse tüüpe ja seda on väga raske kõrvaldada, kuna sulfoonamiidiresistentsust kodeeriv *sul1* geen asub alati plasmiidil (Poey *et al.*, 2019). Oluline erinevus tulemustes erinevate uuringute vahel võib tulla ka erinevast qPCR meetodikast – erinevad praimerid võivad töötada erineva efektiivsusega ning alati ei pruugi ka qPCR tingimused olla optimeeritud (õige praimerite kontsentratsioon, seondumistemperatuur ja inhibiitorite olemasolu reaktsioonis).

Võrreldi ka MBT kattega prügilates erinevate fraktsioonisuurusega MBT katematerjale omavahel ARG-de arvukuses ja osakaalus (Joonis 4). Kokku oli 3 erineva fraktsioonisuurusega MBT katteid – 20, 40 ja 80 mm. Prügilas 2 oli MBT katte fraktsiooni suurus 80 mm ja prügilas 3 oli kaks ala fraktsioonisuurustega 20 mm ühes ja 40 mm teises.

Pinnakihis olid *mexF* ja *sul1* geenide arvukused ja ka osakaalud kõige suuremad. *MexF* geeni arvukus jäi vahemikku $8,16 \times 10^7$ kuni $3,16 \times 10^8$ geenikoopiat/g KA ning osakaal vahemikku 0,3-1,4%. *Sul1* geeni arvukus jäi pinnakihis vahemikku $2,11 \times 10^7$ kuni $7,93 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA ning osakaal vahemikku 0,05-0,26%. Prügilademes olid kõige kõrgemad *sul1* ja *sul2* geenide arvukused, vastavalt $4,46 \times 10^7$ kuni $2,36 \times 10^8$ ja $2,64 \times 10^7$ kuni $4,58 \times 10^7$ geenikoopiat/g KA, ning osakaalud vastavalt 0,37-1,09% ja 0,17-0,22%.

Erineva fraktsioonisuurusega MBT materjalide omavahelisel võrdlemisel ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi ARG-ide koguarvukuses ega osakaalus mikroobikooslusest, seega ei saa tõestada MBT fraktsioonisuuruse olulisust ARG-de seisukohast.



Joonis 4. Antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) üldarvukus (A) ja osakaal mikroobikoosluses (B) erineva fraktsioonisuurusega MBT katematerjalides.

Kõigi kolme prügila puhul oli ARG-ide osakaal suurem pigem pinnakihis ning ka sellele võib leida mitu põhjust. Üheks põhjuseks võib olla, et ARG-e kannavad pigem aeroobsed bakterid, kelle puhul sügav anaeroobne kiht ei osutu kasvusoodsaks keskkonnaks. Teiseks, pinnakiht on rohkem mõjutatud loomade orgaanilisest ainest, mida bakterid lagundavad. Kuna loomad võivad siiski antud aladele pääseda, toob see kaasa lisatoitainete voolu pinnasesse, mis võib bakterite kasvu ja geenide levikut soodustada. Veel üheks põhjuseks võib olla see, et pinnakihti satub ja seal säilib rohkem niiskust, mis on bakterite tegevuseks soodne keskkond, ja taimejuured aitavad seda niiskust säilitada. Suuremad bakterite tihedused põhjustavad rohkem konkurentsi ja koostoimeid, mis ajendavad antibiootikumiresistentsusgeenide ülekandmist ja levikut. Põhjuste kindlaks tegemiseks ja ka MBT fraktsioonisuuruste mõju täpsemaks väljaseletamiseks vajab teema edasist uurimist.

KOKKUVÕTE

Prügi ladestamine ja prügilate sulgemine on ajapikku muutunud tõsiseks keskkonnaprobleemiks, eriti seoses antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) levikuga. Kaasaegsed jäätmekäitlustehnoloogiad on kaasa arenenud ja prügilate sulgemised on samuti arenenud, kuid vaatamata sellele püsivad ARG-ide levikuga seotud ohud endiselt.

Oluliseks põhjuseks võib tuua prügilatesse ladestatud olmejätmed, mis võivad sisaldada inimese ja loomajätmeid ning ravimijääke, soodustades ARG-ide püsimist ja levikut, olles ohuks rahvatervisele ja keskkonnale.

Antibiootikumiresistentsus, mis muudab bakterid antibiootikumide suhtes vastupidavaks, levib kiiremini antibiootikumide väärkasutuse ja halva utiliseerimise tõttu. ARG-de leviku mehhanismid hõlmavad ensümaatilist inaktiveerimist, eflukspumpasid, rakumembraani muutusi, biokilede moodustumist ja horisontaalset geeniülekanne. Antibiootikumiresistentsuse uuringud kasutavad peamiselt fenotüüpilisi meetodeid, mis mõõdavad bakterite kasvu antibiootikumide juuresolekul. Samas peab välja tooma, et osad antibiootikumid võivad ka looduslikult keskkonnas esineda ja võivad olla bakterite energiaallikaks.

Käesolev uuring keskendus erinevate prügilakatete (MBT ja biofilter-kattekiht) võrdlemises antibiootikumiresistentsusgeenide (ARG) leviku seisukohast pinnases kahel erineval sügavusel. Mikroobikoosluse kvantifitseerimise tulemustest selgus, et bakterite arvukus jäi vahemikku $7,54 \times 10^9$ kuni $8,35 \times 10^{10}$ ja arhede arvukus jäi vahemikku $8,88 \times 10^8$ kuni $3,83 \times 10^9$ geenikoopiat/g KA ning osutus suuremaks pinnakihis. Arhede osakal oli MBT kattega prügilates suurem. ARG-ide analüüsil selgus, et ARG-id olid keskmiselt kõrgema arvukuse ja osakaaluga prügilate pinnakihis võrreldes prügilademega.

ARG-ide üldarvukused varieerusid olenevalt geenist ja proovi sügavusest. Tulemuste statistilise analüüsimise järgselt selgus et biofilter-katte prügila pinnakihis olid statistiliselt oluliselt kõrgemad *arcB* ja *mexF* geenide arvukused ning MBT kattega prügilas *arcB*, *mexF* ja *vanO* geenide arvukused. Statistiliselt oluliselt väiksemaks osutus *ermF* geeni arvukus MBT kattega prügilas. Kahte erinevat tüüpi prügila võrdlus näitas, et *sull* geeni arvukus oli statistiliselt oluliselt suurem MBT tüüpi prügilate pinnakihis. Prügilademes olulised erinevused puudusid.

ARG-ide osakaalud jäid pinnakihis vahemikku 0,0001 kuni 1,45%, samas kui prügilademes oli see vahemikus 0 kuni 1,09%. Statistiliselt oluliselt suurem oli *sul2* geeni osakaal biofilter-

kattekihiga prügilademes võrreldes pinnakihiga, ülejäänud geenid statistiliselt olulisi erinevusi ei näidanud.

MBT katte siseselt oli tehtud fraktsioonisuuruste võrdlev analüüs mis ei näidanud fraktsioonisuuruse olulisust ARG-ide seisukohast.

Nii geenide osakaalud kui ka arvukused olid suuremad pinnakihis, ning geen mis näitab statistiliselt olulist erinevust kahe pinnakatte võrdlusel on *sulI* pinnakihis. Suuremad erinevused kahe pinnakatte vahel puuduvad.

Kokkuvõttes näitavad nii ARG osakaalude kui ka arvukuste uurimistulemused suuremat antibiootikumiresistentsuse levikut pinnakihis võrreldes prügilakihiga. Lisaks ilmnes, et prügilate kattematerjalidel on mõju ARG-ide levikule ja jaotusele pinnases sulfonamiidiresistentsust kodeerivate geenide puhul, mis on olemuselt sünteetilise päritoluga geenid ja nende suurem osakaal võib näidata inimõju ARG-de tekkes ja levikus uuritud aladel. Kuid peab märkama et ka sünteetilistel geenidel on looduses palju analooge ja geeni levik võib olla ka teine põhjus. Selle täpseks välja uurimiseks ja ka paremaks prügilakatete võrdlemiseks tasub teha suurem analüüs. Võrdlus teiste uurimistega näitas et tulemust saab tõlgendada erinevalt, kuid pigem antud uuring ei näita elule ja ümbrusele ohtlike resistentsusgeenide suurt levikut.

Comparison of landfill covers produced from landfill refuse in terms of the spread of antibiotic resistance genes

Dina Levit

SUMMARY

Landfilling and landfill closures have over time become a serious environmental problem, especially with the spread of antibiotic resistance genes (ARG). Modern waste management technologies have advanced and landfill closures have progressed step by step, however, the risks associated with the spread of ARGs remain.

An important reason for this can be found in municipal waste landfilling, which may contain human and animal waste and pharmaceutical residues, contributing to the persistence and spread of ARGs, posing a threat to public health and the environment.

Antibiotic resistance, which makes bacteria resistant to antibiotics, spreads more rapidly due to misuse and poor disposal of antibiotics. Mechanisms of ARGs spread include enzymatic inactivation, efflux pumps, cell membrane modifications, biofilm formation and horizontal gene transfer. Studies on antibiotic resistance mainly use phenotypic methods that measure the growth of bacteria in the presence of antibiotics. However, it should be pointed out that some antibiotics can also occur naturally in the medium and can be a source of energy for bacteria.

The present study focused on the comparison of different landfill coatings (MBT and biofilter-coating) in terms of antibiotic resistance gene (ARG) spreading in soil at two different depths. To obtain the results, microbial quantification had been performed and showed bacterial abundance ranging from $7,54 \times 10^9$ to $8,35 \times 10^{10}$ and the abundance of archaea ranging from $8,88 \times 10^8$ to $33,83 \times 10^9$ gene copies/g DW and proved to be higher in the surface layer. The fraction of archaea was higher in MBT coated landfills. Analysis of ARGs revealed that ARGs were on average more abundant and at higher percentage in the surface layer of landfills compared to the deeper landfill layers.

The overall abundances of ARGs varied depending on the gene and the depth of the sample. Analysis of the results revealed that the surface layer of the biofilter-coated landfill had statistically significantly higher abundance of the *arcB*, *mexF* gene and the MBT-coated landfill had higher abundance of *arcB*, *mexF* and *vanO*. *ErmF* was found to be statistically lower in the MBT-coated landfill. Comparison of the two types of dumps showed that there was a significant

difference in the abundance of *sul1* gene in the surface layer in MBT coated landfill. There were no significant differences in deeper landfill layers.

ARGs in the surface layer ranged from 0.0001 to 1.45%, while in the deeper landfill layer it ranged from 0 to 1.09%. A statistically significant difference was found for the *sul2* gene in the dumps, while the remaining genes showed no statistically significant differences.

Within the MBT coating, fractional sizes were compared which did not show the significance of fraction size for ARGs.

Both gene proportions and abundances were higher in the surface layer, and the gene that shows a statistically significant difference between the two surface layers is *sul1* in the surface layer.

Overall, the results of both the proportions and abundances show a higher prevalence of antibiotic resistance in the surface layer compared to the landfill layer. In addition, landfill coatings were found to have an effect on the distribution and abundance of ARGs in the soil for genes encoding sulfonamide resistance, which are genes of synthetic origin in nature, and their higher abundance may indicate a human influence on the emergence and distribution of ARGs in the studied sites. However, it should be noted that synthetic genes also have many analogues in nature, and the spread of the gene may have another reason. A larger analysis is worthwhile to investigate this more precisely and also to better compare the landfill sites. Comparison with other studies has shown that the results can be interpreted in different ways, but rather this study does not show the proportions and abundances of resistance genes that are dangerous to life and health.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Blakesley, R.W. (2001). Cycle Sequencing. In: Graham, C.A., Hill, A.J.M. (eds) DNA Sequencing Protocols. Methods in Molecular Biology™, vol 167. Humana Press.
- Burlakovs, J., Jani, Y., Kriipsalu, M., ... Klavins, M. (2018). On the way to 'zero waste' management: Recovery potential of elements, including rare earth elements, from fine fraction of waste. vol 186. *Journal of cleaner production*, 186, 81–90.
- Davies, J. (2006). Are antibiotics naturally antibiotics? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 496–499.
- Davison, H. C., Low, J. C., Woolhouse, M. E. (2000). What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends Microbiol.*, 8(12), 554–559.
- De Pascale, G., & Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance by enzyme inactivation: From mechanisms to solutions. *ChemBioChem*. Wiley-VCH Verlag.
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*.
- Dethlefsen, L.; Huse, S.; Sogin, M.L.; Relman, D.A. (2008) The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota. as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PloS biol.*, 6(11), 2383–2400.
- Dickinson, W. (1995). Landfill mining comes of age. *Solid Waste Technologies* 9, 42-47.
- Dungan, R. S., Strausbaugh, C. A., & Leytem, A. B. (2019). Survey of selected antibiotic resistance genes in agricultural and non-agricultural soils in south-central Idaho. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(6).
- Dymond, J. S. (2013). Explanatory chapter: Quantitative PCR. In *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 279–289). Academic Press Inc.
- Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Mitic Culafic, D., ... Opavski, N. (2022). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics*, 11,427.

- Goryluk-Salmonowicz, A., & Popowska, M. (2022). Factors promoting and limiting antimicrobial resistance in the environment – Existing knowledge gaps. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.
- Heuer, H.; Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ. Microbiol.* 9(3), 657-666.
- Heuer, H.; Fockes, A.; Lamshöft, M.; Smalla, K.; Matthies, M.; Spiteller, M. (2008) Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biol. Biochem.* 40(7), 1892- 1900.
- Hogland, W., & Marques, M. (2010). Enhanced landfill mining: material recovery, energy utilisation and economics in the EU (Directive) perspective. In: *Enhanced Landfill Mining and the Transition of Sustainable Materials Management.: Proceedings of the International Academic Symposium on Enhanced Landfill Mining, Houthalen-Helchteren, Belgium*, pp. 209–222.
- Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., ... Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology*, 61,1049-1070.
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1749-1755.
- Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023). Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Kolář, M., Urbánek, K., & Látal, T. (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(5), 357–363.
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D.G.J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 42, 68–80.
- Kriipsalu, M., Maastik, A., Truu, J., (2016). Jäätmekäitlus ja pinnase tervendamise. Tallinn: TTÜ Kirjastus.
- Lee J. H., Park K. S., Jeon J. H., Lee S. H. (2018). Antibiotic resistance in soil. *Lancet Infect. Dis.* 18, 1306–1307.
- Li, Y. J., Yuan, Y., Tan, W. B., Xi, B. D., Wang, H., Hui, K. L., ... Li, R. F. (2024). Antibiotic resistance genes and heavy metals in landfill: A review. *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V.

- Liu, Z.; Lozupone, C.; Hamady, M.; Bushman, F.D.; Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* 35(18), e120.
- Majdinasab, A., & Yuan, Q. (2017, July 1). Performance of the biotic systems for reducing methane emissions from landfill sites: A review. *Ecological Engineering*. Elsevier B.V.
- March-Rosselló, G. A. (2017). Rapid methods for detection of bacterial resistance to antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.)*, 35(3), 182–188.
- Michaelis, C., & Grohmann, E. (2023). Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms. *Antibiotics*, 12.
- Morelli, J. (1990). Landfill reuse strategies. *Biocycle*, 31 (4), 60–61.
- Njoku, P. O., Edokpayi, J. N., & Odiyo, J. O. (2019). Health and environmental risks of residents living close to a landfill: A case study of thohoyandou landfill, Limpopo province, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(12).
- Nõlvak, H., Truu, M., Tiirik, K., Devarajan, A. K., Peeb, A., & Truu, J. (2023). The effect of synthetic silver nanoparticles on the antibiotic resistome and the removal efficiency of antibiotic resistance genes in a hybrid filter system treating municipal wastewater. *Water Research*, 237.
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F. L., & Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3367–3373.
- Poey, M. E., Azpiroz, M. F., Laviña, M. (2019). On sulfonamide resistance, sul genes, class 1 integrons and their horizontal transfer in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.*, 135, 103611.
- Prusty, J. S. (2022). Antifungal discovery from plant sources. In *Phytoconstituents and Antifungals* (pp. 15–33). Elsevier.
- Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*, 16(1), 4–10.
- Radu, E., Woegerbauer, M., Rab, G., Oismüller, M., Strauss, P., Hufnagl, P., ... Kreuzinger, N. (2021). Resilience of agricultural soils to antibiotic resistance genes introduced by agricultural management practices. *Science of the Total Environment*, 756.

- Raju, D., Veerabhadra, A., Nagarajan, A., Pandit, S., Nag, M., Lahiri, D., Upadhye, V. (2022). „Effect of bacterial quorum sensing and mechanism of antimicrobial resistance.“ *Biocatalysis and Agricultural biotechnology*, 43.
- Rosendal, R.M. (2009). Landfil mining. Process, Feasibility, Economy, Benefits and Limitations. Copenhagen, Denmark: RenoSam.
- Rothrock, M. J., Keen, P. L., Cook, K. L., Durso, L. M., Franklin, A. M., Dungan, R. S. (2016). How Should We Be Determining Background and Baseline Antibiotic Resistance Levels in Agroecosystem Research? *J. Environ. Qual.*, 45(2), 420–431.
- RT I (2004), 9. 52. Riigikogu seadus: Jäätmeseadus. Hetkel kehtiv.
- RTL (2004), 56. 938. Keskkonnaministri määrus: Prügila rajamise, kasutamise ja sulgemise nõuded. Hetkel kehtiv.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), 45-45.
- Sapkota Anupama. (2023). Serial Dilution: Formula, Calculator, Method, Uses, Examples. *Microbe Notes*, 1, 1–12.
- Siegrist, J. (2018). *Overview of Chromogenic Media. AnalytiX Reporter*. Retrieved from MERCK.
- Simoniš, E. (2018). Sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju vankomütsiini resistentsusgeenide esinemisele ja arvukusele Nõo kombineeritud tehismärgalapuhasti vertikaalfiltris ja väljavoolus. Bakalaureusetöö.
- Stahl, D.A., & Amann, R. (1991). Development and application of nucleic acid probes. *Nucleic Acid Tech. Bact. Syst.*, 205–248
- Symochko, L., Demyanyuk, O., Symochko, V., Grulova, D., Fejer, J., & Mariychuk, R. (2023). The Spreading of Antibiotic-Resistant Bacteria in Terrestrial Ecosystems and the Formation of Soil Resistome. *Land*, 12(4).
- Szczepanowski, R.; Linke, B.; Krahn, I.; Gartemann, K.-H.; Gützkow, T.; Eichler, W.; Pühler, A.; Schlüter, A. (2009). Detection of 140 clinically relevant antibiotic resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology*, 155, 2306-2319.

- Kayla Vasarhelyi. (2021). The Hidden Damage of Landfills. *Environmental Center, University of Colorado*, 1–2.
- WHO. (2023). "Antimicrobial resistance." *World health organization*.
- Wiken, K. (2023). Landfill closure. *wsp*.
- Yao, L., Li, Y., Li, Z., Shen, D., Feng, H., Zhou, H., and Wang, M. (2020). Prevalence of fluoroquinolone, macrolide and sulfonamide-related resistance genes in landfills from East China, mainly driven by MGEs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190.
- Zhang, R., Yang, S., An, Y., Wang, Y., Lei, Y., & Song, L. (2022). Antibiotics and antibiotic resistance genes in landfills: A review. *Science of the Total Environment*, 806.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Dina Levit,

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

Dina Levit

26.05.2024