

TARTU ÜLIKOOL  
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT

Kadri Kurg

**SÜNTEETILISTE HÕBEDA NANOSOSAKESTE MÕJU  
DENITRIFIKATSIOONI GENEETILISELE POTENTSIAALILE NÕO  
EKSPERIMENTAALSE PINNASFILTERSÜSTEEMI  
HORISONTAALFILTRIS**

BAKALAUREUSETÖÖ

Keskkonnatehnoloogia

12 EAP

Juhendaja:

Teele Ligi (PhD)

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

---

Osakonna juhataja:

---

Tartu 2016

# **Sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju denitrifikatsiooni geneetilisele potentsiaalile Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltris**

Tehismärgalades on denitrifikatsioon peamine protsess, mille käigus toimub lõplik lämmastikuühendite eemaldamine reoveest ning horisontaalvoolulistes pinnasfiltrites on selleks loodud parimad tingimused. Nanoosakeste, eriti sünteetiliste hõbeda nanoosakeste, laienenud kasutuse tõttu jõuab neid üha rohkem reovette, kuid vähe on teada nende mõjust reovee puhastusprotsessidele sealhulgas denitrifikatsioonile.

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju denitrifikatsiooni geneetilisele potentsiaalile Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltris. Katses kasutatud nanoosakeste kontsentratsioon (0,1 mgAg/L) on vastavuses tulevikus ennustatud nanohõbeda hulga reovees. Filtermaterjali proovid kogutid enne katse algust ja viis nädalat hiljem. 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate (*nirS*, *nirK*, *nosZI* ja *nosZII*) arvukused määrati kasutades kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni.

Töö tulemused näitasid, et valitud sünteetiliste hõbeda nanoosakeste kontsentratsioon ei mõjutanud filtermaterjalis bakterite üldarvukust ega denitrifikatsiooniga geneetilist potentsiaali uuritud ajahetkel. Lisaks ei tuvastatud selget nanoosakeste mõju horisontaalfiltri lämmastiku- ja süsinikuühendite puhastusefektiivsustele.

*tehismärgala, denitrifikatsioon, nanoosakesed, sünteetilised hõbeda nanoosakesed*

T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll

# **The impact of synthetic silver nanoparticles on the genetic potential of denitrification in Nõo experimental horizontal subsurface flow constructed wetland**

Denitrification is the main process in constructed wetlands, which eliminates nitrogen from wastewater and horizontal flow subsurface constructed wetlands are known to offer optimal conditions for this process. Nanoparticles, including synthetic silver nanoparticles, are widely used and the amount of nanoparticles released into wastewater is increasing constantly. However, the effect of silver nanoparticles on the microbial mediated processes such as denitrification is still unknown.

The aim of the thesis was to study the effect of synthetic silver nanoparticles on the genetic potential of denitrification in Nõo horizontal subsurface flow filter. The concentration of silver nanoparticles used in this study (0,1 mgAg/L) were chosen according to the estimated amount of nanosilver in wastewater in the future.

Filter material samples were collected before the beginning of the experiment and five weeks later from horizontal subsurface flow filters. Abundances of 16S rRNA and denitrification associated (*nirS*, *nirK*, *nosZI*, and *nosZII*) gene copies were assessed using quantitative polymerase chain reaction.

The results of the study indicated, that the chosen concentration of synthetic silver nanoparticles did not affect the abundance of microorganisms, as well as the genetic potential of denitrification five weeks after the beginning of the experiment. In addition, no change was detected in the treatment efficiencies of the nitrogen and carbon compounds in horizontal filter.

*constructed wetland, denitrification, nanoparticles, nanosilver*

T270 Environmental technology, pollution control

# Sisukord

Lühendite nimekiri.....	5
Sissejuhatus .....	6
1 Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1 Tehismärgalad.....	7
1.2 Denitrifikatsioon .....	9
1.2.1 Denitrifikatsioonis osalevad ensüümid ja neid kodeerivad geenid .....	10
1.2.2 Denitrifikatsiooni mõjutavad faktorid.....	12
1.3 Nanoosakesed .....	13
2 Materjal ja meetodika.....	16
2.1 Prooviala kirjeldus .....	16
2.2 Vee- ja filtermaterjali proovide kogumine.....	17
2.3 DNA eraldamine filtermaterjali proovidest .....	18
2.4 Geenikoopiate arvukuse määramine qPCR meetodil .....	18
2.5 QPCR andmete analüüs .....	19
3. Tulemused.....	21
3.1 Nõo horisontaalvooluliste pinnasfiltrite veeproovide keemilised parameetrid ja puhastusefektiivsused .....	21
3.2 qPCR tulemuste kvaliteedikontroll.....	22
3.3 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukused Nõo horisontaalvoolulistes pinnasfiltrites .....	23
3.3.1 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukused enne katse algust	25
3.3.2 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukused erinevate töötluste võrdluses.....	26
4. Arutelu.....	29
4.1 Nõo horisontaalvoolulise pinnasfiltri keemilised parameetrid ning geenide arvukused enne katse algust .....	29
4.2 Nõo horisontaalvoolulise pinnasfiltri keemilised parameetrid ning 16S rRNA ja denitrifikatsiooga seotud geenide arvukused katse lõppedes.....	30
Kokkuvõte .....	33
Tänuõnad.....	35
Kasutatud kirjandus .....	36
Lisad 1–6. ....	42
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks .....	46

## Lühendite nimekiri

- 16S rRNA – prokariotide ribosoomi väikeses alaühikus sisalduv ribosomaalne RNA
- ANOVA – dispersioonianalüüs (*Analysis Of Variance*)
- DOC – lahustunud orgaaniline süsinik (*Dissolved Organic Carbon*)
- HF – horisontaalse läbivooluga filter (*Horizontal subsurface flow Filter*)
- KA – kuivaine
- Nap – periplasmaatiline nitraadi reduktaas
- Nar – membraanseoseline nitraadi reduktaas
- Nir – nitriti reduktaas
- nirK* – vaske sisaldavat nitriti reduktaasi (Cu-Nir) kodeeriv geen
- nirS* – tsütokroom cd-1 sisaldavat nitriti reduktaasi (cd1-Nir) kodeeriv geen
- Nor – lämmastikoksiidi reduktaas
- Nos – dilämmastikoksiidi reduktaas
- nosZ* – dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeeriv geen
- nosZI* – klaad I dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeeriv geen
- nosZII* – klaad II dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeeriv geen
- PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase Chain Reaction*)
- qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)
- TC – üldsüsinik (*Total Carbon*)
- TN – üldlämmastik (*Total Nitrogen*)
- TOC – orgaaniline süsinik (*Total Organic Carbon*)
- VF – vertikaalse läbivooluga filter (*Vertical subsurface flow Filter*)

## Sissejuhatus

Inimtegevuse tulemusena on märkimisväärselt tõusnud keskkonnas bioloogiliselt kättesaadavate lämmastikuvormide hulk, mis koos teiste toitainetega on põhjustanud laiaulatuslikku eutrofeerumist. Peamisteks lämmastikuallikateks on keemiliselt sünteetiliselt saadud väetised, lämmastiku fikseerivate taimede massiline kasvatamine, märgalade kuivendamine, fossiilsete kütusete ja biomassi põletamine (Fields, 2004). Lisaks on kiire linnapiirkondade laienemise ning tööstuse arengu tõttu märkimisväärselt suurenenud lämmastikühendeid sisaldava reovee hulk, mis vajab põhjalikku puhastamist enne keskkonda suunamist.

Lämmastiku ning muude toitainete eemaldamiseks reoveest kasutatakse üha rohkem looduslikel protsessidel põhinevaid tehismärgalaid. Tehismärgalade eelisteks laialdaselt kasutatavate aktiivmudapuhastite ees on lihtsus, tõhusus, minimaalne energiatarve ning madalad rajamis- ja hoolduskulud.

Kuigi tehismärgalades toimub reovees sisalduvate saasteainete kontsentratsioonide vähendamine keemiliste, füüsikaliste ning bioloogilistest protsesside koosmõjul, siis lämmastikühendite eemaldamisel on väga oluline roll mikroobsetel protsessidel. Üheks olulisemaks lämmastikuühendite eemaldamise protsessiks tehismärgalades on mikroorganismide poolt vahendatud denitrifikatsioon ja seetõttu on oluline luua tehismärgalades optimaalsed tingimused eelkõige denitriifitseerijatele.

Järjest enam on hakatud ravimitööstuse, kosmeetika, veepuhastuse, tekstiili, elektroonika ning energiaga seotud valdkondades kasutama nanotehnoloogial põhinevaid rakendusi. Hoolimata nanoosakeste toksilisest mõjust elusorganismidele, ennustatakse nende kasutusmahtude tõusu ja üha laialdasemat rakendamist erinevates eluvaldkondades. Juba praegu on nanoosakeste kasutamine toonud endaga kaasa nende kontsentratsiooni tõusu reovees (Chen *et al.*, 2014). Seetõttu on väga oluline uurida, kuidas mõjutavad nanoosakesed reovee puhastamisega seotud mikroobikooslusi ja nende poolt läbiviidavaid protsesse. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukusele Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalvoolulises filtris.

# 1 Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Tehismärgalad

Aina rohkem kasutatakse üle maailma reovee puhastamiseks tehismärgalaid. Tehismärgalade puhastusvõime põhineb samadel bioloogilistel, füüsikalistel ja keemilistel protsessidel, mis toimuvad looduslikes märgalades taimede, pinnase ja mikroorganismide koostoimel, kuid kõrgema kontrollitavuse ja efektiivsusega (Vymazal, 2007). Nende rajamis- ja hoolduskulud on madalad ning neid peetakse keskkonnasõbralikeks tänu madalale fossiilsete kütuste vajadusele (Saeed ja Sun, 2012).

Alates esimeste tehismärgalade rajamisest ligi viiskümmend aastat tagasi on konstrueeritud väga erinevaid tehismärgalaid, kuid kõigi tehismärgalade ühiseks jooneks on reostunud vee sissevool ning küllastunud või küllastumata substraadi, taimestiku ja mikroobikoosluse olemasolu (Kadlec ja Knight, 1996; Vymazal, 2011). Hüdroloogia alusel jagatakse tehismärgalad vabaveelisteks (*free water surface*) ja läbivoolulisteks (*subsurface flow*) tehismärgaladeks (Scholz ja Lee, 2005).

Vabaveelised tehismärgalad sarnanevad kõige rohkem looduslikele märgaladele tänu püsivale substraadist üleulatuvale veepinnale ning märgaladele iseloomulikule taimestikule. Tavaliselt vahelduvad avaveelistes tehismärgalades taimestatud alad taimestamata aladega ning tüüpiline veesügavus on 0,1–0,5 m (Fonder ja Headley, 2013). Taimed omastavad toitaineid, loovad mikrokliimaatilisi tingimusi, pakuvad elupaika erinevatele organismidele, neid saab kasutada bioindikaatoritena, jne (Shelef *et al.*, 2013). Kõige rohkem kasutatakse vabaveelistes tehismärgalade taimestamisel perekondade *Typha*, *Scirpus*, *Phragmites*, *Juncus* ja *Eleocharis* esindajaid (Vymazal, 2013a). Kui madalamates vabaveelistes tehismärgalades on taimed enamasti põhja kinnitunud, siis sügavamates märgalades võivad taimed kasvada ka vabalt ujuvatena (Shelef *et al.*, 2013). Vabaveelised tehismärgalad sobivad kasutamiseks väga erinevates kliimavöötmes. Külmematel perioodidel on teatud puhastusprotsessid (eriti lämmastiku transformatsioon) aeglustunud madala veetemperatuuri tõttu. Lisaks takistab jääkate hapniku ligipääsu, mistõttu on hapnikust sõltuvad protsessid aeglustunud või inhibeeritud (Kadlec ja Wallace, 2009). Vabaveelisi tehismärgalaid kasutatakse kõige sagedamini reostunud veekogude (Maniquiz *et al.*, 2012; Ockenden *et al.*, 2012; Dzakpasu *et al.*, 2015), aktiivreoveepuhastite väljavoolude (Erler *et al.*, 2011, Mulling *et al.*, 2013, Mander *et al.*, 2014) ning tööstuste (nt tselluloosi- ja paberitööstuste, pruulikodade ja toiduainetööstuste) reovee puhastamiseks (Vymazal, 2014). Vabaveelised tehismärgalad on

võimelised toime tulema reovee suuremahulise ning kiire sissevooluga ning seetõttu kasutatakse neid ka linnades, põllumajanduses ja tööstuses tekkiva sadevee puhastuseks (Beutel *et al.*, 2009; Fonder ja Headley, 2013; Lai, 2014). Tänu sarnasusele looduslikele märgaladega pakuvad vabaveelised tehismärgalad elupaiku väga erinevatele organismidele ning mitmekesistavad keskkonda (Kadlec ja Wallace, 2009).

Läbivoolulised tehismärgalad koosnevad enamasti vettpidavast süngist või kraavist, mis on täidetud vett läbilaskva filtermaterjaliga (Kadlec ja Knight, 1996). Erinevalt vabavoolulistest tehismärgaladest jääb läbivoolulistes tehismärgalades reovesi kogu puhastusprotsessi käigus filtermaterjali ülapinnast madalamale voolates taimejuurte ning risoomide vahel, mistõttu on puhastusprotsessi käigus väiksem risk kokkupuuteks võimalike patogeenidega. Filtermaterjalidena on kasutusel looduslikud (nt muld, liiv, savi ja killustik) ja inimtekkelised (nt paisutatud ja põletatud savi) materjalid ning tööstuslikud kõrvalproduktid (nt lendtuhk, räbu, puukoor ja merekarbid) (Ballantine ja Tanner, 2010; Vohla *et al.*, 2011). Tehismärgala reoainete ärastamisvõime sõltub suuresti filtermaterjalist, eelkõige tema sorptsioonivõimest ning osakeste suurusel. Filtermaterjal peaks olema peene tekstuoriga ja suure eripinnaga, kuid samas piisavalt vett läbilaskev. Enamasti jääb tehismärgalades kasutatavate täitematerjalide osakeste suurus vahemikku 10–20 mm (Ballantine ja Tanner, 2010).

Läbivoolulised tehismärgalad võivad olla nii taimestatud kui taimestamata. Taimestamata läbivoolulisi tehismärgalasi nimetakse pinnasfiltriteks (Fonder ja Headley, 2013). Läbivoolulised tehismärgalad on võimelised eemaldama reoveest väga erinevat tüüpi saasteaineid, sealhulgas orgaanikat, lämmastik- ja fosforühendeid, metalle ning ka patogene (Chen, 2011) ning seetõttu on neid erinevalt vabaveelistest tehismärgaladest võimalik kasutada ka reovee esmaseks puhastamiseks (Kadlec ja Wallace, 2009). Läbivoolulisi tehismärgalad leiavad rakendamist näiteks munitsipaal- ning tööstusliku (tekstiili-, veini-, piima- ja keemiatööstuste) reovee puhastamiseks (Vymazal, 2014).

Läbivoolulised tehismärgalad jagatakse kahte suurde gruppi sõltuvalt veevoolusuunast läbi filtri: horisontaalse läbivooluga (HS, *Horizontal Subsurface Flow*) ja vertikaalse läbivooluga (VF, *Vertical Flow*) tehismärgalad (Lee *et al.*, 2009). Vertikaalfiltrites voolab vesi läbi substraadi vertikaalsuunaliselt kas ülevalt alla või alt üles. Tänu sellisele veevoolu suunale saavutatakse kõrgem hapnikuga varustatus, mille tõttu on vertikaalvoolulistes tehismärgalades soodustatud eelkõige aeroobsed protsessid. Horisontaalvoolulistes tehismärgalades voolab vesi aga horisontaalselt läbi poorse materjali kuni väljalaskeni. Hapniku kontsentratsioon on horisontaalvoolulistes filtrites piiratud ning valdavad on eelkõige anaeroobsetes ja

anoksilistes tingimustes toimuvad protsessid (Vymazal, 2005). Tehismärgala redokspotentsiaal on mõjutatud märgala ehituslike parameetrite poolt (pikkus ja sügavus) ning enamasti kahaneb see sügavuse suurendes (Faulwetter *et al.*, 2009). Kõrgema puhastusefektiivsuse saavutamise eesmärgil kasutatakse tihti hübriidseid tehismärgalasid, kus omavahel on kombineeritud vertikaalse ja horisontaalse veevooluga süsteemid (Vymazal, 2013b).

Reovee koostis sõltub selle päritolust, kuid kõige levinumad saasteained reovees on erinevad lämmastikühendid. Lämmastik võib reovees esineda nitraadi ( $\text{NO}_3^-$ ), nitriti ( $\text{NO}_2^-$ ), ammoniumi ( $\text{NH}_4^+$ ), gaasilise ammoniaagi ( $\text{NH}_3$ ), lämmastioksiidi (NO), dilämmastikoksiidi ( $\text{N}_2\text{O}$ ), dilämmastikgaasi ( $\text{N}_2$ ) või orgaaniliste ühendite vormis. Lämmastikuühendid osalevad pidevalt tehismärgalades toimuvates erinevates keemilistes, füüsikalistes ja bioloogilistes protsessides. Enamike füüsikalise-keemiliste protsesside (osakeste settimine ja resuspensioon, difusioon, taimede poolne translokatsioon, varise teke, ammoniaagi lendumine ja sorptsioon substraadile) tulemusena ei muutu lämmastikühendi vorm. Samas bioloogiliste protsesside tulemusena muutub ka lämmastikühendi vorm. Peamisteks bioloogilisteks lämmastikühendite transformatsiooni radadeks tehismärgalades on ammonifikatsioon, nitrifikatsioon, denitrifikatsioon, assimilatsioon ja lagundamine (Kadlec ja Wallace, 2009). Hetkel on teada kolm protsessi, mille tulemusena toimub lämmastikühendite eemaldamine süsteemist ehk lõpp-produktideks on gaasilised lämmastikühendid – denitrifikatsioon, anaeroobne ammoniumi oksüdeerimine ja nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdeerimine. Kuigi kõigi kolme protsessi olemasolu on tuvastatud ka tehismärgalades, siis valdav lämmastikühendite eemaldamine toimub denitrifikatsiooni vahendusel (Ligi *et al.*, 2014; Vymazal, 2011).

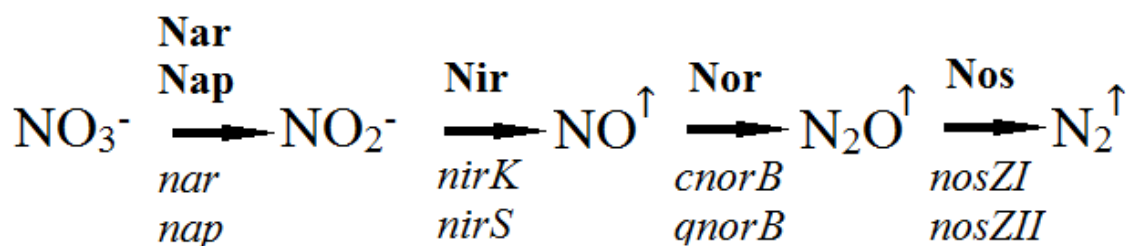
## 1.2 Denitrifikatsioon

Denitrifikatsioon on mikroorganismide vahendatud protsess, mille käigus toimub nitraadi või nitriti redutseerimine üle vaheühendi lämmastikoksiidi dilämmastikoksiidiks või molekulaarseks lämmastikuks. Denitrifitseerijad on heterotroofsed fakultatiivsed anaeroobid, seega hapniku olemasolul keskkonnas kasutakse elektronide aktseptorina energeetiliselt rohkem kasu toovat hapniku, kuid viimase puudumisel lämmastikoksiide (Zumft, 1997). Kuigi enamik teadaolevatest denitrifitseerijatest kasutavad elektronide doonorina orgaanilisi süsinikuühendeid, siis lisaks heterotroofidele on leitud ka autotroofseid denitrifitseerijaid, kes tarvitavad elektronide doonorina hoopis anorgaanilisi aineid, näiteks väävlit (Oh *et al.*, 2000), arseeni (Rhine *et al.*, 2006) või vesinikku (Benedict *et al.*, 1998).

Enamik denitrifikatsiooni võimet omavad bakterid kuuluvad peamiselt *Proteobacteria* (klassid *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* ja *Betaproteobacteria*), *Actinobacteria* ja *Bacteroidetes* hõimkondadesse, kuid denitrifikatsiooniga seotud geene on tuvastatud kaheksateistkümne erineva bakterithõimkonna esindajate hulgas (Graf *et al.*, 2014). Lisaks bakteritele on denitrifitseerijaid leitud ka arhede (nt hõimkonnad *Euryarchaeota* ja *Crenarchaeota*) ja seente (nt hõimkond *Ascomycota*) hulgast (Offre *et al.*, 2013; Graf *et al.*, 2014). Denitrifitseerijad kuuluvad väga erinevatesse metaboolsetesse rühmadesse. Näiteks on leitud denitrifitseerijaid organotroofide (nt *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Propionibacterium* ja *Vibrio*), kemolitotroofide (nt *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* ja *Nitrosomonas*), fotolitotroofide (nt *Rhodopseudomonas*) ja lämmastiku fikseerijate (nt *Rhizobium* ja *Azospirillum*) seast (Shapleigh, 2006). Denitrifikatsiooni võime esinemine fülogeneetiliselt väga kaugetel liikidel võib olla põhjustatud nii horisontaalsest geeniülekandest kui denitrifikatsiooniga seotud geenide kaotamisest evolutsiooni käigus (Jones *et al.*, 2008; Saggari *et al.*, 2013).

### 1.2.1 Denitrifikatsioonis osalevad ensüümid ja neid kodeerivad geenid

Täielik denitrifikatsiooni rada on kodeeritud nelja eraldiseisva ensüümi poolt: nitraadi (Nar, Nap), nitriti (Nir), lämmastikoksiidi (Nor) ja dilämmastikoksiidi (Nos) reduktaas (Joonis 1). Denitrifikatsiooni läbiviivad ensüümid sünteesitakse vaid siis, kui hapniku hulk keskkonnas ei ole piisav aeroobseks metabolismiks või puudub hapnik täielikult. Hapniku kontsentratsiooni tõusmisel keskkonnas toimub denitrifikatsiooni inhibitsioon nii transkriptsiooni kui ka post-transkriptsioonilisel tasemel (van Spanning *et al.*, 2006). Anaeroobsetes tingimustes ja piisava süsiniku olemasolul toimub denitrifikatsiooniga seotud geenide ekspressioon järk-järguliselt. Näiteks Nar ensüüm aktiveerub 2–3 h, Nir 2–12 h ja Nor 24–48 h jooksul (Holtan-Hartwig *et al.*, 2000; Tavares *et al.*, 2006)



**Joonis 1.** Denitrifikatsiooni rada koos reaktsioone läbiviivate reduktaasidega (rasvases kirjas) ning neid kodeerivate geenidega (kursiivis). Ülesse suunatud nooltega on tähistatud atmosfääri vabanevad gaasilised ühendid.

Nitraadi redutseerimist nitritiks katalüüsitakse vastavalt *nar* või *nap* geeni poolt kodeeritud membraanseoselise või periplasmaatilise nitraadi reduktaasi poolt (Zumft, 1997). Ühest organismist on leitud mõlemat tüüpi nitriti reduktaase kodeerivaid geene (Roussel-Delif *et al.*, 2005). Kuna nitraadi reduktsioon toimub lisaks denitrifikatsioonile ka dissimilatoorsel nitraadi redutseerimisel ammooniumiks, siis ei kasutata *nar* ega *nap* geene molekulaarsete markeritena denitrifikatsiooni uurimisel.

Nitriti redutseerimine lämmastikoksiidiks on protsess, mille abil on võimalik eristada denitrifitseerijaid teistest nitraatsetest hingajatest. Looduses on leitud kahte erinevat tüüpi nitraadi reduktaasi: vaske sisaldav Nir reduktaas, mida kodeerib *nirK* geen ja tsütokroom-cd1 sisaldav Nir reduktaas, mida kodeerib *nirS* geen (Zumft, 1997). Täispikkade genoomijärjestuste analüüs on näidanud, et enamik sekveneeritud genoomidega denitrifitseerijaid omavad *nirK* geeni poolt kodeeritud nitriti reduktaasi. Lisaks on leitud organisme, kellel on mõlemat tüüpi *nir* geen, kuid ka neid, kellel esineb kaks *nirS* või kuni neli *nirK* geenikoopiat (Graf *et al.*, 2014). Nir ensüümid esinevad bakterites kahes struktuurselt erinevas, kuid funktsiooni poolest identses vormis. Samas on mitmed uuringud näidanud, et *nir* geenid ei ole üksteist välistavad, kuna *nirS* või *nirK* geeni omavad organismid eelistavad erinevaid ökoloogilisi nišše ning *nirK* geeni omavad denitrifitseerijad on tundlikumad keskkonnamuutusele (Graf *et al.*, 2014; Ligi *et al.*, 2014).

Lämmastikoksiidi reduktsiooni lämmastikdioksiidiks viivad läbi kaks erinevat Cu-heemi sisaldavat reduktaasi, mis on kodeeritud *cnorB* või *qnorB* geenide poolt. *NorB* geenide homolooge on leitud ka teistest mitte denitrifitseerivatest patogeenide liikidest ja seetõttu ei sobi need geenid denitrifikatsiooni uurimiseks (Graf *et al.*, 2014).

Täieliku denitrifikatsiooni raja lõpp-produktiks on N<sub>2</sub>, mis tekib N<sub>2</sub>O redutseerimisel dilämmastikoksiidi reduktaasi poolt. Teadaolevalt on see ainukene ensüüm, millel on võime redutseerida kasvuhoonegaasina tuntud dilämmastikoksiidi. Nos ensüüm on kodeeritud *nosZI* või *nosZII* geenide poolt (Sanford *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013). Kuigi mõlema *nosZ* geeni poolt kodeeritud dilämmastikoksiidi reduktaas on sama funktsiooniga, siis *nosZI* geeni alusel sünteesitud ensüümi viimine periplasmasse on energeetiliselt kulukam võrreldes *nosZII* geeni poolt kodeeritud dilämmastikoksiidi reduktaasi transpordiga. Kui *nosZI* geen esineb valdavalt *Proteobacteria* hõimkonna ja arhede esindajate hulgas, siis *nosZII* geeni omavaid organisme leidub rohkemates hõimkondades ( Jones *et al.*, 2013). Sarnaselt Nir ensüümi kodeerivatele geenidele kasutatakse ka Nos ensüümi kodeerivaid geene denitrifitseerijate uurimiseks (Saggar *et al.*, 2013; Correa-Galeote *et al.*, 2013).

Denitrifikatsiooniraja lõpp-produktiks ei ole alati keskkonnale ohutu  $N_2$ . Mõnedel denitrifitseerijatel puudub *nosZ* geen ning denitrifikatsiooni rada lõppeb ohtliku kasvuhoonegaasi  $N_2O$  sünteesiga. Seega on denitrifikatsioon oluline protsess lämmastiku eemaldamisel Maa biosfäärist, kuid samal ajal on see ka üks suurimaid kasvuhooneefekti põhjustajaid (IPCC, 2007). Hetkel ei ole veel teada, mis tingimusi eelistavad täielikku denitrifikatsiooni rada omavad denitrifitseerijad ning millest sõltub *nosZ* geeni esinemine organismis. Hiljutine uuring (Graf *et al.*, 2014) näitas, et kui *nirS*, *nor* ja *nos* geenid jagavad samu reguleerivaid mehhanisme, siis *nirK* geeni regulatsioon on sõltumatu ülejäänud denitrifikatsiooniraja geenidest ning seetõttu on *nirS* tüüpi denitrifitseerijatel suurema tõenäosusega täielik denitrifikatsiooni rada.

### 1.2.2 Denitrifikatsiooni mõjutavad faktorid

Denitrifikatsiooni mõjutavad väga mitmed keskkonnafaktorid, kuid kõige olulisemateks on sobivate elektronaktseptorite (oksüdeeritud lämmastikuühendid) ja doonorite (kergesti lagundatavad orgaanilised süsinikuühendid) kättesaadavus ning keskkonna temperatuur, hapniku kontsentratsioon ja pH (Butterbach-Bahl ja Dannenmann, 2011).

Nitraadi kättesaadavus keskkonnas sealhulgas tehismärgalades sõltub mineralisatsiooni ja nitrifikatsiooni kiirusest, taimede ja mikroorganismide poolsest omastamisest ning  $NO_3^-$  difusioonist ja leostumisest. Samas on kõrgemal nitraadi kontsentratsioonil denitrifikatsiooni lõpp-produktiks valdavalt  $N_2O$  ning nitraadi toksilist toimet denitrifikatsioonile on täheldatud alates 2 mM kontsentratsioonist (Saggar *et al.*, 2013).

Orgaanilise süsiniku olemasolu ja kättesaadavus on samuti väga oluline denitrifikatsiooni kiirust määrav faktor. Tehismärgalades on süsiniku allikateks sissevoolav reovesi, lagunev biomass ja taimejuurete eksudaadid. Samas mitte kõik süsinikuvormid ei ole denitrifitseerijatele kasutatavad ning oluline on ka süsiniku ja lämmastiku suhe, mis peaks olema vähemalt 5:1 (Kaldec ja Wallace, 2009).

Denitrifikatsiooniga seotud ensüümid on aktiivsed kui hapniku kontsentratsiooni keskkonnas on alla 5 mg/L, kuid sellest kõrgemal hapniku kontsentratsioonil on ensüümide ekspressiooni inhibeeritud. Dilämmastikoksiidi reduktaasi ekspressioon on alla surutud juba 0,2 mg/L hapniku kontsentratsiooni juures (Maier *et al.* 2009). Madala  $O_2$  kontsentratsiooni korral on nitrifikatsiooni lõpp-produktiks valdavalt nitrit mitte nitraat. (Bernet *et al.*, 2001), seetõttu algab denitrifikatsiooni protsess nitriti redutseerimisega ning seda protsessi nimetatakse osaliseks nitrifikatsioon-denitrifikatsiooniks (Vymazal, 2007).

Denitrifikatsiooniks optimaalne pH on vahemikus 6 kuni 8, kuid denitrifikatsiooni toimumist teatud tasemel on täheldatud ka pH 5 juures. Kuigi denitrifitseerijad on aktiivsemad kõrgematel temperatuuridel, toimub protsess ka jahedamates tingimustes (minimaalselt 5 °C juures), aga siis on lõpp-produktideks enamasti N<sub>2</sub>O ja NO (Holtan-Hartwig *et al.*, 2002).

Lisaks eelpoolnimetatud keskkonnaparameetritele mõjutavad denitrifitseerijaid koosluse mitmekesisus, toiduahelas toimuvad muutused, interaktsioonid ning keskkonnahäiringud (Butterbach-Bahl ja Dannenmann, 2011).

### 1.3 Nanoosakesed

Nanoosakesed on üliväikesed osakesed, mille vähemalt üks mõõde on väiksem kui 100 nm, kuid enamasti jäävad osakeste mõõtmed vahemikku 0,1–100 nm. Nanoosakestel on suur eripind võrreldes nende ruumalaga, mille tõttu on nad keemiliselt ja bioloogiliselt väga reageerimisvõimelised (Cameotra ja Dhanjal, 2010). Olenevalt esinemise keskkonnast, nimetatakse õhus leiduvaid nanoosakesi ultrapeeneks materjaliks, samal ajal pinnases ja vesikeskkonnas sisalduvaid nanoosakesi kolloidosakesteks (Klaine *et al.*, 2008).

Nanoosakesed jagunevad tekke järgi kolmeks: looduslikud (vulkaanilises tuhas, ookeani kohal aerosoolidena ning mineraalide koostises), inimtegevuse käigus kõrvalproduktina tekkinud (keevitamise, diiselmootorite või söe põletamise käigus) ja sihtotstarbeliselt sünteesitud nanoosakesed (Cameotra ja Dhanjal, 2010). Kõige levinumad sihtotstarbeliselt sünteesitud nanoosakesed on süsinikupõhised (nt süsinik-nanotorud, grafeen ja fullereenid) ja metallilised (nt nanohõbe ja -kuld, TiO<sub>2</sub>, ZnO, CeO<sub>2</sub>, CuO ja SiO<sub>2</sub>). Lisaks kasutatakse veel orgaanilisi polümeere (nt dendrimeerid) ja metallisooli (nt CdS ja CdSe) (Lippmaa ja Kahru, 2010). Kui loodusliku ja antropogeense tekkega nanoosakesed võivad olla nii korrapärase kui korrapäratu kujuga, siis sünteetilistel nanoosakestel on alati korrapärane kuju (sfääri-, varda-, traadi- või torukujulised) (Cameotra ja Dhanjal, 2010).

Oma suurusest tulenevatele omadustele on nanoosakestel võrreldes samast ainest koosnevate mikro- või makroosakestega mitmeid unikaalseid kasutusalasid (Cameotra ja Dhanjal, 2010). Tänu antimikroobsele toimele on nanomaterjalid leidnud kasutust ravimi, kosmeetika, elektroonika ning energiaga seotud valdkondades. Viimasel ajal on hakatud aina rohkem tähelepanu pöörama keskkonna nanotehnoloogiale. Näiteks saab kasutada nanomaterjale anorgaaniliste ainetega, õliga või pestitsiididega reostunud reovee puhastamiseks. Lisaks omavad teatud nanomaterjalid (nt 0-valentne raud) häid redutseerivaid omadusi ja neid saab kasutada toksiliste reoainete muutmisel vähem toksilisteks (Ghasemzadeh *et al.*, 2014).

Juba ammu ajast on teada, et hõbeda ioonid ja hõbedal baseeruvad tooted on toksilised mikroorganismidele. Väga levinud on hõbenitraadi kasutamine antimikroobse mõju saavutamise eesmärgil, kuid nüüd on avastatud, et nanohõbeda kasutamisel on võimalik hõbeda negatiivset mõju veelgi suurendada. Seetõttu ongi tehislikult toodetud nanomaterjalidest kõige laialdasema kasutusala just nanohõbeda osakesed ja seda eelkõige tänu nende antimikroobsetele omadustele (Yang *et al.*, 2013).

Tänapäeval ei ole veel täpselt selge, kuidas nanohõbeda toksilisus väljendub, kuid välja on pakutud erinevaid teooriaid. Arvatakse, et nanohõbeda osakesed on võimelised läbima rakukestasid, mille tulemusena muutub rakumembraanide struktuur. Läbilaskva membraani tõttu toimub DNA replikatsiooni katkestamine, rakud kaotavad energiat, väheneb prootoneid liikumapanev jõud, toimub organellide vabanemine keskkonda ning lõpuks rakk sureb. Teiseks võimalikuks mehhanismiks on nanoosakeste poolt põhjustatud vabade radikaalide teke, mis on võimelised kahjustama rakukesta muutes selle poorseks ning põhjustama raku surma. Samuti on välja pakutud, et nanoosakesed vabastavad hõbedaione, mis inhibeerivad mitmeid eluliselt olulisi rakufunktsioone. Hõbe on nõrk hape, mis reageerib rakkudes koostises sealhulgas DNA-s sisalduva väävli ja fosforiga (nõrgad alused) hävitades raku (Prabhu ja Poulouse, 2012). Samas on näidanud bakterite puhaskultuuride katsed, et nanohõbeda mõju bakteritele sõltub bakteri liigist (Ghasemzadeh *et al.*, 2014; Siripattanakul ja Fürhacker, 2014; Ruparelia *et al.*, 2008).

Tänapäeval lisatakse hõbeda nanoosakesi laialdaselt hügieenitoodetesse, toiduainete pakenditesse, pesuvahenditesse, riietesse, mänguasjadesse ning kodutehnikasse. Samuti on nad leidnud kasutamist pestitsiidide ja bakteritsiididena veepuhastuses, ravimitööstuses, molekulaartehnoloogias ning biosensorites (Yang *et al.*, 2013). Laialdane hõbeda nanoosakesi sisaldavate toodete kasutamine suurendab nende kontsentratsiooni prügimägedel, reovees ja atmosfääris, kus nad lõpuks aineringete kaudu jõuavad igale poole keskkonnas ning juba lähitulevikus võivad tekitada laialdasi keskkonnaprobleeme (Blaser *et al.*, 2008; Lapresta-Fernández *et al.*, 2012; Siripattanakul ja Fürhacker, 2014). Ameerika Ühendriikides läbiviidud ainetevoogude statistilistele uurimustele põhinedes oletatakse, et tulevikus on nanohõbeda kontsentratsioon pinnavees umbes 0,0001 mg/L, reovees 9 mg/L (enamasti sulfiidse kujul) ning reovee settes 1550 mg/L (Yang *et al.*, 2013). Gottschalk *et al.* (2009) uuringu alusel arvatakse, et igal aastal satub keskkonda 30,3 tonni nanoosakesi ning sellest 10,7 tonni koguneb pinnasesse.

Nanoosakesed satuvad reoveepuhastitesse olme- või tööstusliku reovee kaudu ning peale puhastusprotsesside läbimist võivad nad aktiivmuda jääkide kasutamise (nt väetisena) või töötlemise (bioremediatsioon) kaudu edasi kanduda keskkonda (Schlich *et al.*, 2013). Lisaks ei suudeta kõiki nanoosakesi puhastusprotsessi käigus reoveest eemaldada ning osa nendest jõuab keskkonda ka puhastite väljavoolude kaudu. Füüsiliste protsesside tulemusena suudetakse eemaldada vaid suuremad nanohõbeda osakesed (kuni 10%) (Brar *et al.*, 2010) ning keemilised protsesside nagu sorptsioon, sulfidiseerumine või komplekside moodustamise tulemusena võib väheneda nende toksilisus. Nanohõbeda osakesed mõjutavad reoveepuhastuse keemilisi ning bioloogilisi protsesse, kuid see on sõltuv nii kooslusest kui nanoosakeste kontsentratsioonist. Näiteks nanohõbe põhjustab nitrifikatsiooni inhibitsiooni alates 0,025 mg/L (Yang *et al.*, 2013), samas denitrifikatsiooni inhibitsioon tuvastati kontsentratsioonil 0,5 mg/L (Chen *et al.*, 2014).

## 2 Materjal ja metoodika

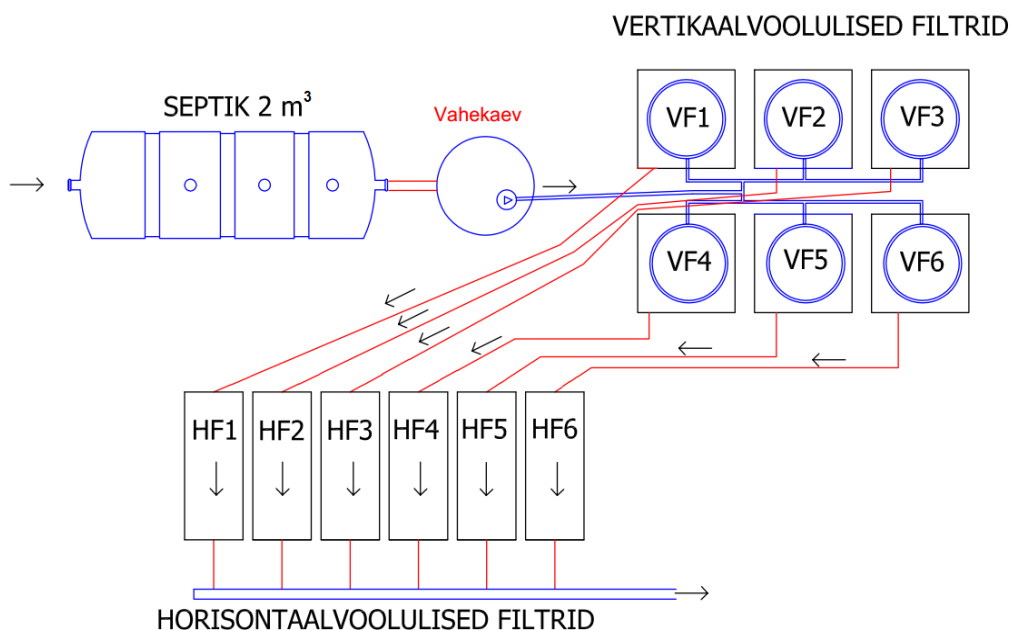
### 2.1 Prooviala kirjeldus

Käesoleva bakalaureusetöö uurimismaterjal koguti projekti „Ravimijäägid ja sünteetilised nanoosakesed reovees: mõju reoveepuhastusprotsessile ja ravimiresistentsusele geenide levikule keskkonnas (3.2.0801.11 -0026)“ raames korraldatud eksperimendi käigus vahemikul 1. september kuni 6. oktoober 2014.

Uuring viidi läbi 2013. aasta suvel käivitatud hübriidses tehismärgalasüsteemis, mis asus AS Emajõe veevärgile kuuluva Nõo aleviku aktiivmudaprotsessil põhineva reoveepuhasti territooriumil (Nõo vald, Tartu maakond). Katsesüsteemi sisenev reovesi pärines Nõo aktiivpuhasti sissevoolust. Aktiivpuhastis töödeldakse nii Nõo alevikus tekkivat olme- ning läheduses asuva AS Nõo Lihatoöstuse reovett.

Katsesüsteem koosnes septikust ( $2 \text{ m}^2$ , vee viibeag 2 ööpäeva), vahekaevust ning kuuest paralleelsest vertikaalse veevooluga pinnasfiltrist ning neile järgnevast kuuest paralleelsest horisontaalse veevooluga pinnasfiltrist (Joonis 2). Vertikaalfiltrid (pikkus, laius ja sügavus 1 m) olid täidetud kergkruusaga (ülevalt alla): 20 cm kiht 10–20 mm fraktsiooniga, 60 cm kiht 2–4 mm fraktsiooniga ning 20 cm kiht 10–20 mm fraktsiooniga. Reovee jaotustoru asetses ülemises kergkruusa kihis. Horisontaalfiltrid (pikkus 1,5 m ja laius ning sügavus 0,6 m) olid täidetud 4–10 mm kergkruusa fraktsiooniga. Iga vertikaalfiltri pinnale jaotati võimalikult ühtlaselt iga 5 tunni järel 2 L reovett, mis vertikaalfiltri läbimise järgselt voolas gravitatsiooni mõjul edasi vastavasse horisontaalfiltrisse, kus viibis 2 ööpäeva.

Eksperiment algas ligi aasta aega peale pinnasfilter süsteemi käivitamist 1. septembril 2014. Alamsüsteemidesse 1. ja 4. sisenenud reovette lisati sünteetilisi nanohõbeda osakesi (kollargool  $0,1 \text{ mgAg/L}$ ), 2. ja 5. hõbenitraati ( $\text{AgNO}_3$   $0,1 \text{ mgAg/L}$ ). Hõbenitraadi lisamise eemärk oli kontrollida tavauuruses olevate hõbedaosakeste mõju ning katse kontrollina kasutati alamsüsteeme 3. ja 6., kuhu ei lisatud kollargooli ega  $\text{AgNO}_3$ .



**Joonis 2.** Nõo eksperimentaalse pinnasfilterüsteemi skeem. Lühendid: VF – vertikaalvoolulised filtrid, HF – horisontaalvoolulised filtrid. Numbrid tähistavad omavahel ühenduses olevaid alamsüsteeme.

## 2.2 Vee- ja filtermaterjali proovide kogumine

Vee ja filtermaterjali proovid koguti Nõo eksperimentaalsest pinnasfilterüsteemist vahetult enne kollargooli ja hõbenitraadi lisamist (1. septembril 2014) ja viis nädalat hiljem (6. oktoobril 2014) Tartu Ülikooli Ökoloogia ja maateaduste instituudi Geograafia osakonna töötajate poolt.

Filtermaterjali proovid (kokku 36 proovi) võeti kasutades mullapuuri (pikkus 0,5 m ja läbimõõt 5 cm) iga horisontaalfiltri sissevoolu, keskosa ja väljavoolu piirkonna 20–40 cm sügavusest kihist. Filtermaterjali proove säilitati DNA eraldamiseni  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures.

Veeproovid (kokku 26 proovi) koguti iga horisontaalfiltri sisse- ja väljavoolust ning septikust. Koheselt määrati vee pH, temperatuur ja  $\text{O}_2$  kontsentratsioon (Multi 3420 SetG, WTW GmbH, Saksamaa). OÜ Eesti Keskkonnauuringute Keskuse Tartu laboris mõõdeti veeproovide ammonium- ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) ning nitraatlämmastiku ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) kontsentratsioonid. Veeproovide üldlämmastiku (TN), üldsüsiniku (TC), üldorgaanilise süsiniku (TOC) ja lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) väärtused ning filtermaterjalide kuivaine (KA) sisaldused määrati Geograafia osakonna keskkonnakeemia laboris. Reovees sisalduvad hõbeda (Ag) kontsentratsioonid määrati Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis.

Erinevate mõõdetud parameetrite (O<sub>2</sub>, pH, TC, TOC, DOC, TN, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, Ag) muutuste (%) väljendamiseks horisontaalfiltrites kasutati valemit (1):

$$\text{Muutus} = \left( \frac{C_{\text{sissevool}} - C_{\text{väljavool}}}{C_{\text{sissevool}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

kus,

C<sub>sissevool</sub> – parameetri väärtus sissevoolus

C<sub>väljavool</sub> – parameetri väärtus väljavoolus

### 2.3 DNA eraldamine filtermaterjali proovidest

Filtermaterjali mikroobikoosluse DNA eraldati magistrant Kadri Saare poolt 10 g uhmerdatud filtermaterjalist kasutades *PowerMax Soil Kit*-i (MoBio Laboratories Inc., USA) vastavalt tootja juhendile. Eraldatud DNA kvaliteedi hindamiseks ja kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati spektrofotomeetrit Infinite M200 (Tecan AG, Austria) ning DNA-d säilitati edasiste analüüsideni –20 °C juures.

### 2.4 Geenikoopiate arvukuse määramine qPCR meetodil

Filtermaterjali proovide bakteriaalsete 16S rRNA geenikoopiate arvu ja seeläbi bakterite arvukuse hindamiseks kasutati kvantitatiivset PCR (qPCR, *quantitative Polymerase Chain Reaction*) meetodit (määratud Kadri Saare poolt). Filtermaterjali bakterikoosluse denitrifikatsiooni protsessist tulenevat N<sub>2</sub>O ja N<sub>2</sub> emissiooni geneetilist potentsiaali hinnati vastavalt cd1- ja Cu-tüüpi nitriti reduktaasi kodeerivate *nirS* ja *nirK* geenide ning dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeerivate *nosZI* ja *nosZII* geenide kvantifitseerimise alusel qPCR meetodil.

Bakteriaalsete 16S rRNA geenikoopiate kvantifitseerimiseks kasutati Geograafia osakonna töötajate poolt valmistatud standardit, mis põhines *Pseudomonas mendocina* tüve NK-01 fragmenti sisaldava plasmidi lahjendusseriaal (Eurofins MWG Operon, Germany).

qPCR-i reaktsioonisegu (10 µl) sisaldas: 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix-i (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), optimeeritud kontsentratsioonidega päri- ja vastassuunalisi primereid (Tabel 1), 1 µl genoomset DNA-d ja steriilset vett. Kõiki proove mõõdeti kolmes korduses ning iga geeni kvantifitseerimisel kasutati kolme negatiivset kontrolli, mis sisaldasid kõiki eelpool nimetatud komponente peale genoomse DNA. qPCR reaktsioonid viidi läbi kasutades RotorGene® Q (QIAGEN, USA) masinat ning tabelis 1 toodud programme. Amplifitseeritud geeniproductide spetsiifilisuse kontrollimiseks viidi vahetult peale qPCR

programmi lõppu läbi qPCR produktide sulamiskõverate analüüs vahemikus 60°C–95°C (samm 0,35°C/3 s).

**Tabel 1.** Bakteriaalse 16S rRNA ja funktsionaalsete geenifragmentide kvantifitseerimiseks kasutatud qPCR praimerid ja programmid.

Märklau- geen	Praimer	Amplikoni pikkus (bp)	Primeri kontsentrat- sioon (µM)	Praimeri allikas	qPCR programm
16S rRNA	Bact517F Bact1028R	530	0,6 0,6	Liu <i>et al.</i> , 2007 Dethlefsen <i>et al.</i> , 2008	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 30 s; 60°C 45 s; 72°C 45 s <sup>a</sup>
<i>nirS</i>	nirS C-1 nirSR3d	432	0,8 0,8	Wei <i>et al.</i> , 2015 Kandeler <i>et al.</i> , 2006	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 30 s <sup>a</sup>
<i>nirK</i>	876F 1040R	165	0,8 0,8	Henry <i>et al.</i> , 2004	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 30 s <sup>a</sup>
<i>nosZI</i>	nosZ2F nosZ2R	256	0,8 0,8	Henry <i>et al.</i> , 2006	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 15 s; 60°C 30 s; 72°C 30 s, 80 °C 30 s <sup>2</sup>
<i>nosZII</i>	nosZIIF nosZIIR	690–720	0,8 0,8	Jones <i>et al.</i> , 2013	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 30 s, 54°C 45 s, 72°C 45 s, 80°C 30 s <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Fluoresents signaali mõõtmine

## 2.5 QPCR andmete analüüs

Proovide qPCR tulemusi analüüsiti kasutades RotorGene Series Software version 2.0.2 tarkvaraga (QIAGEN, USA), võttes arvesse amplifikatsioonikõverate ühtsust ning sulamiskõverate asukohti ja kuju. Iga proovi individuaalset amplifikatsiooni efektiivsust hinnati programmi LinRegPCR version 2012.3 (Ruijter *et al.*, 2009) abil.

Kõigi kvantifitseeritud geenide puhul kontrolliti proovide grupeerumist amplifikatsiooni efektiivsuste alusel kasutades ühefaktorilist dispersioonanalüüsi (*one-way ANOVA, post hoc test Unequal N HSD*). Võrreldud gruppide vastavust normaaljaotusele kontrolliti kasutades Shapiro-Wilk testi. Kõik statistilised analüüsid viidi läbi programmis STATISTICA version 7.1.

Filtermaterjali proovide bakteriaalsete 16S rRNA geenikoopia arvude leidmiseks kasutati Ruijter *et al.* (2009) esitatud valemit uuritava proovi (A) ja standardi iga kümnekordse lahjenduse (B) hinnangulist erinevuse (FD) leidmiseks (2):

$$FD = N_{0,A} / N_{0,B} = (N_{t,A} / E_A^{Ct,A}) / (N_{t,B} / E_B^{Ct,B}) \quad (2)$$

Kus:

$N_0$  – amplikonide A ja B algkontsentratsioon fluorestsentsühikutes

E – amplifikatsiooni efektiivsus

$N_t$  – fluorestsentsi läviväärtus

$C_t$  – läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsükli arv

Bakteriaalsete 16S rRNA geenikoopiate hinnangulise arvukuse leidmiseks korrutati iga proovi FD väärtus vastava standardilahjenduse geenikoopiate kontsentratsiooniga. Lõpliku 16S rRNA geenikoopiate kontsentratsiooni arvutamiseks proovis kasutati vähima hajuvusega kvantifitseerimisstandardi vahemiku ( $10^3$ - $10^7$ ) alusel leitud 16S rRNA arvukusehinnangu keskmist. 16S rRNA geenikoopiate arvukused väljendati iga proovi puhul 1g KA kohta.

Nitriti (*nirS%* ja *nirK%*) ja kahte tüüpi dilämmastikoksiidi (*nosZI%* ja *nosZII%*) reduktaase kodeerivate geenide osakaalude leidmiseks filtermaterjali bakterikoosluses kasutati vastavate geeniväärtuste normaliseerimist bakterite 16S rRNA geeni suhtes. Proportsioonide arvutamiseks kasutati eespool kirjeldatud valemit (2), kus iga proovi FD väärtuse leidmiseks kasutati funktsionaalse (A) ja 16S rRNA geeni (B) vastavaid  $N_0$  väärtusi.

*nirS*, *nirK*, *nosZI* ja *nosZII* geenide koopiaarvud arvutati suhteliste arvukustena referentsgeeni 16S rRNA suhtes ning väljendati 1 g kuivaine kohta (koopiat/g KA). Geenide individuaalsete arvukuste kaudu leiti nitriti ja dilämmastikoksiidi reduktaase kodeerivate geenide üldine arvukus (vastavalt *nir* ja *nosZ*) ja omavahelised suhted (*nirK/nirS*, *nosZI/nosZII* ja *nir/nosZ*).

## 3. Tulemused

### 3.1 Nõo horisontaalvooluliste pinnasfiltrite veeproovide keemilised parameetrid ja puhastusefektiivsused

Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi sisse- ja väljavoolust määratud parameetrite väärtused on toodud lisas 1. Enne katse algust 1. septembril 2014 (alljärgnevalt september) oli keskmine hapniku kontsentratsioon horisontaalfiltritesse (alljärgnevalt filter) sissevoolavas vees  $6,14 \pm 0,51$  mg/L ja pH väärtus  $7,23 \pm 0,09$ . Kui TOC ja DOC keskmised kontsentratsioonid sissevooludes olid peaaegu võrdsed üle terve filtrite süsteemi (vastavalt  $48,2 \pm 4,8$  ja  $43,5 \pm 2,9$  mgC/L), siis TC sisaldus ( $82,7 \pm 6,3$  mgC/L) näitas kõrgemat varieerivust erinevate paralleelide võrdluses. Valdav osa filtrite sissevooludes sisalduvast TN (keskmine  $72,2 \pm 4,5$  mgN/L) oli  $\text{NO}_3\text{-N}$  vormis ( $45,0 \pm 3,9$  mg/L) ning  $\text{NH}_4\text{-N}$  moodustas sellest vaid väikse osa ( $4,0 \pm 2,2$  mg/L). Hõbeda taustkontsentratsioon filtrite sissevooludes oli  $0,44$   $\mu\text{Ag/L}$ .

Tabelis 2 on toodud Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltrite keemiliste parameetrite muutude ja puhastusefektiivsuste väärtused. Enne katse algust septembris toimus reovees filtri läbimise tulemusena märgatav hapniku kontsentratsiooni langus ning võis täheldada ka väikest pH väärtuse tõusu. Kui filtrite TC puhastusefektiivsus oli varieeruv ja küllaltki madal, siis TOC ja DOC eemaldamine oli mõnevõrra efektiivsem. Enamik filtritest olid võimelised reovees vähendama TN sisaldust, välja arvatud filtris 1 ( $-4,6\%$ ). Katse käigus määratud lämmastikioonidest olid filtrid võimelised eemaldama reoveest kõige efektiivsemalt  $\text{NH}_4\text{-N}$ , kuid  $\text{NO}_3\text{-N}$  eemaldamiseefektiivsus oli paralleelide lõikes varieeruv ja küllaltki madal. Reovees sisalduva hõbeda puhastusefektiivsus oli  $77,3\%$ .

Viis nädalat peale katse algust ehk 6. oktoobril 2014 (alljärgnevalt oktoobris) olid filtritesse sissevoolava vee  $\text{O}_2$  ja pH väärtused sarnased enne katse algust mõõdetud tulemustele ( $5,71 \pm 0,5$  mg/L ja  $7,31 \pm 0,2$ ) ning varieerusid vähe erinevate filtrite lõikes (Lisa 1). Lisaks ei esinenud erinevust oktoobris töötluste ja kontroll-filtritesse sisenevas reovees erinevate süsiniku- ja lämmastikuühendite kontsentratsioonides. Kuid võrreldes septembris kogutud veeproovidega oli filtrite sissevooludes oktoobris märgatavalt madalamad TOC ( $25,8 \pm 8,3$  mgC/L) ja DOC ( $24,0 \pm 7,5$  mgC/L) ning teatud määral kõrgemad  $\text{NO}_3\text{-N}$  ( $53,3 \pm 7,3$  mgN/L) ja TN ( $78,7 \pm 6,5$  mgN/L) kontsentratsioonid, samas TC ( $76,2 \pm 17,3$  mgC/L) ja  $\text{NH}_4\text{-N}$  ( $6,23 \pm 3,9$  mg/L) kontsentratsioonid olid suhteliselt sarnased viie nädala tagastele näitajatele. Hõbeda kontsentratsioon kontroll-filtritesse sissevoolavas vees oli  $0,57 \pm 0,78$   $\mu\text{g/L}$  ning kõrgem

kollargooli ja hõbenitraadi töötusega filtrites (vastavalt  $3,36 \pm 2,61$  ja  $4,33 \pm 3,88$   $\mu\text{g/L}$ ) (Lisa 1).

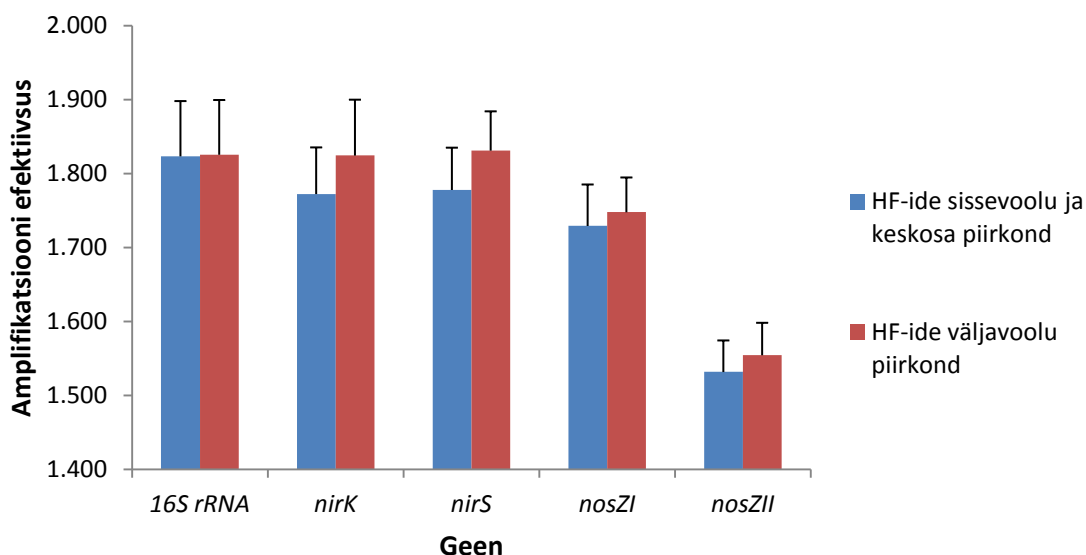
**Tabel 2.** Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalse veevooluga pinnasfiltrite (HF) keemiliste parameetrite keskmised puhastusefektiivsused ning  $\text{O}_2$  ning pH muudud (%) koos standardhälvetega.

Aeg	Filter	$\text{O}_2$	pH	TC	TOC	DOC	TN	$\text{NH}_4\text{-N}$	$\text{NO}_3\text{-N}$	Ag
1.09.2014	HF 1 ja 4	82,8 $\pm 0,9$	-2,4 $\pm 0,7$	0,6 $\pm 2,4$	8,8 $\pm 4,2$	7,4 $\pm 7,2$	6,2 $\pm 15,2$	31,8 $\pm 5,3$	7,6 $\pm 14,0$	77,3
	HF 2 ja 5	80,9 $\pm 1,1$	-2,2 $\pm 1,5$	0,6 $\pm 0,8$	4,5 $\pm 0,2$	4,6 $\pm 3,0$	7,2 $\pm 6,3$	67,9 $\pm 8,5$	-1,9 $\pm 6,1$	
	HF 3 ja 6	90,9 $\pm 3,7$	-2,8 $\pm 0,8$	-0,2 $\pm 7,2$	11,1 $\pm 15,7$	4,7 $\pm 3,2$	1,9 $\pm 0,8$	80,9 $\pm 23,5$	-5,1 $\pm 1,4$	
6.10.2014	HF 1 ja 4 (kollargool)	72,9 $\pm 14,2$	0,2 $\pm 1,8$	11,0 $\pm 4,2$	40,0 $\pm 19,6$	39,6 $\pm 20,7$	17,0 $\pm 16,3$	77,8 $\pm 5,2$	14,4 $\pm 4,6$	83,6 $\pm 14,8$
	HF 2 ja 5 ( $\text{AgNO}_3$ )	82,7 $\pm 1,2$	-2,0 $\pm 1,3$	5,4 $\pm 20,3$	28,5 $\pm 32,5$	39,7 $\pm 14,6$	11,0 $\pm 7,1$	86,1 $\pm 17,1$	-4,1 $\pm 1,2$	92,8 $\pm 8,9$
	HF 3 ja 6	84,4 $\pm 12,6$	-1,2 $\pm 1,3$	2,3 $\pm 3,2$	31,0 $\pm 3,4$	30,0 $\pm 0,0$	9,8 $\pm 1,2$	84,4 $\pm 10,6$	7,0 $\pm 5,0$	89,5
	(kontroll)									

Erinevate töötluste võrdlemine näitas, et viis nädalat peale eksperimendi algust oli kollargooli sisaldavates filtrite TC puhastusefektiivsustes toimunud teatud kasv võrreldes kontrollfiltritega (Tabel 2). Lisaks olid kollargooli sisaldusega reovett puhastavates filtrites viie nädalaga tõusnud TC, TOC, DOC, TN ja  $\text{NH}_4\text{-N}$  ja  $\text{AgNO}_3$  sisaldavat reovett puhastavates filtrites DOC puhastusefektiivsused võrreldes vastavate filtrite näitajatega septembris, samas kontrollfiltrites oli tõusnud samuti TOC, DOC, TN ja  $\text{NO}_3\text{-N}$  puhastusefektiivsused. Hõbeda puhastusefektiivsused olid oktoobris natuke kõrgemad kui septembris kõigi töötluste ja kontrolli korral.

### 3.2 qPCR tulemuste kvaliteedikontroll

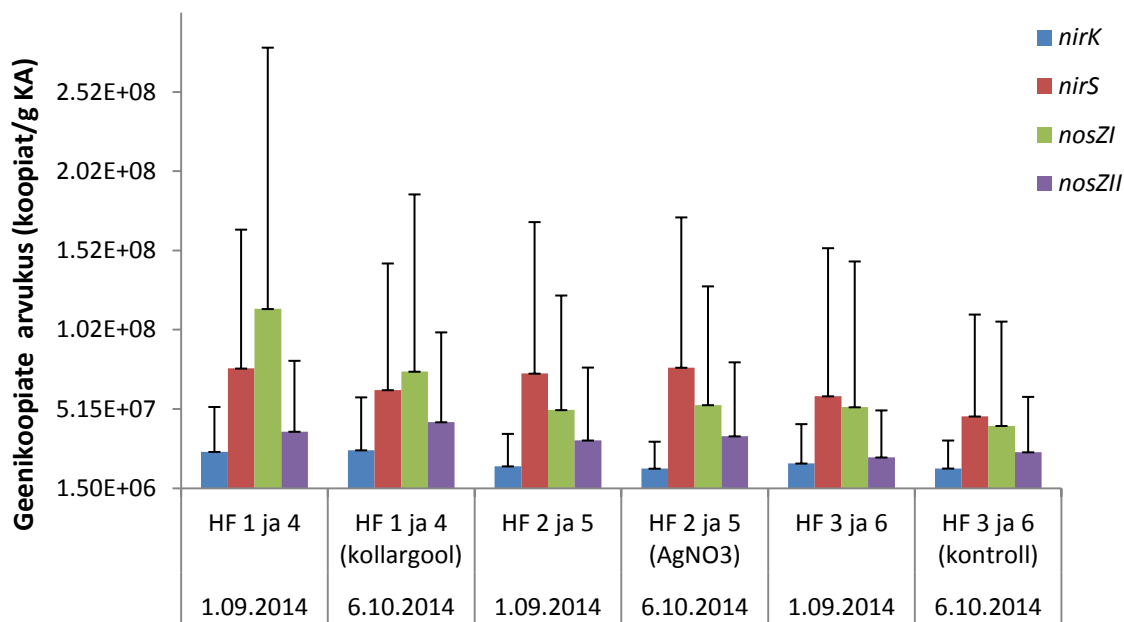
ANOVA alusel tehtud analüüs näitas, et väljavoolu lähedalt kogutud filtermaterjali proovide *nirS* ja *nirK* geenide amplifikatsiooni efektiivsused olid statistiliselt kõrgemad sissevoolu ja keskosa piirkonnast kogutud proovide efektiivsustest (vastavalt  $p < 0,05$  ning  $p < 0,01$ ), mistõttu analüüsiti kõiki uuritud gene kahes amplikonis. Amplikonide keskmised amplifikatsiooni efektiivsused iga geeni korral on toodud joonisel 3. 16S rRNA, *nirK* ning *nirS* geenide amplifikatsioon toimus suhteliselt sarnaste efektiivsustega, kuid mõnevõrra madalama efektiivsusega oli *nosZI* geeni amplifikatsioon. Kõikidest kvantifitseeritud geenidest oli kõige madalam amplifikatsiooni efektiivsus *nosZII* geeni korral.



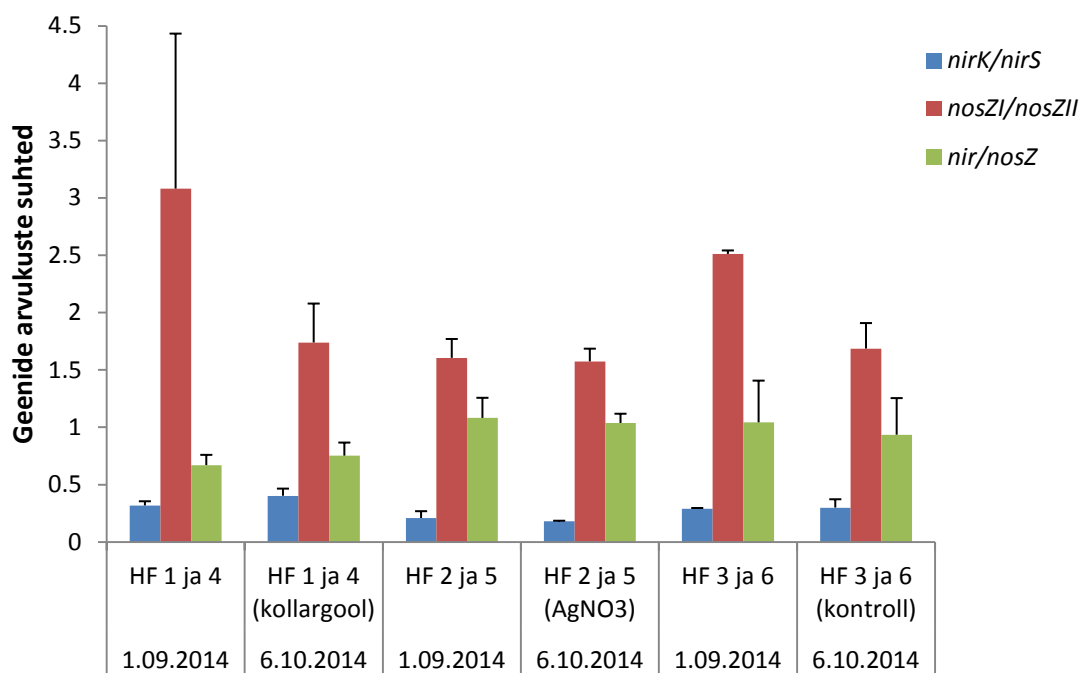
**Joonis 3.** Horisontaalfiltritest (HF) pärinevatest proovidest kvantifitseeritud geenide ampliconide keskmised amplifikatsiooni efektiivsused koos standardhälvetega kvantifitseeritud geenide kaupa.

### 3.3 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukused Nõo horisontaalvoolulistes pinnasfiltrites

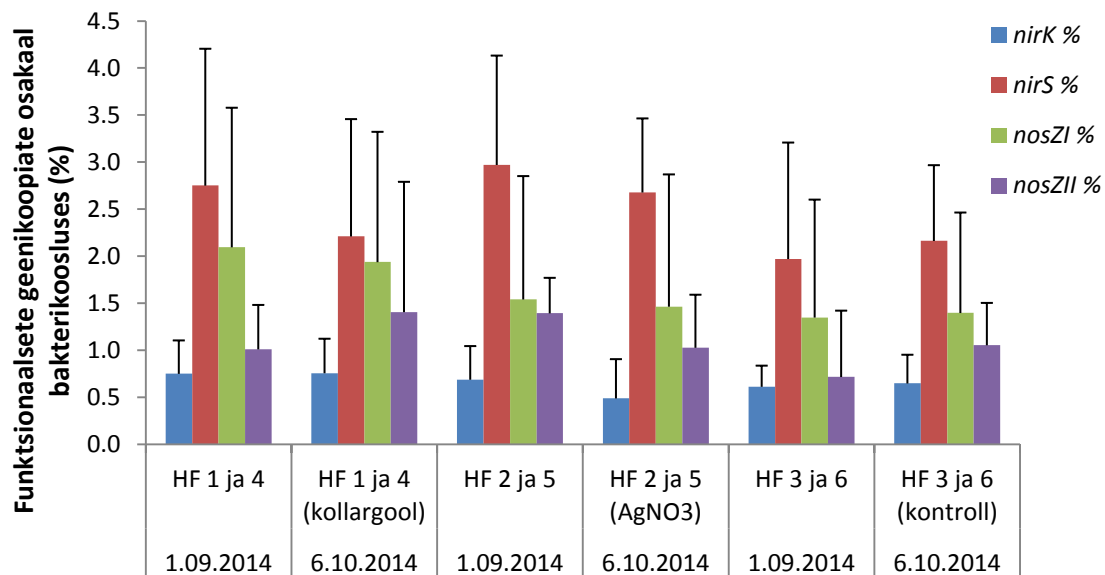
Kõikides uuritud filtrite filtermaterjali proovides tuvastati uuritud märklaudgene (Lisa 2 ja Joonis 4). Määratud geenidest oli kõige kõrgema geenikoopiate arvukusega 16S rRNA geen, mille arvukus üle kõigi proovide oli  $1,86 \cdot 10^8$ – $1,66 \cdot 10^{10}$  koopiat/g KA. *nosZI*, *nirS* ja *nosZII* geenide arvukused varieerusid vastavalt  $1,59 \cdot 10^6$ – $3,68 \cdot 10^8$ ,  $3,62 \cdot 10^6$ – $2,38 \cdot 10^8$  ning  $1,29 \cdot 10^6$ – $1,27 \cdot 10^8$  koopiat/g KA. Kõige madalama arvukusega oli *nirK* geen, mille väärtused olid vahemikus  $5,44 \cdot 10^5$ – $7,12 \cdot 10^7$  koopiat/g KA. *NirK/nirS* väärtused varieerusid suhteliselt vähe proovide lõikes (0,13–0,42), samas *nosZI/nosZII* ja *nir/nosZ* väärtused varieerusid vastavalt 0,28–4,58 ning 0,55–2,70 (Joonis 5). Kui *nosZI* ja *nosZII* geenide osakaalud bakterikoosluses olid sarnases suurusjärgus (vastavalt 0,28–4,75% ja 0,31–3,08%), siis *nirK* geenide osakaalud koosluses olid väiksemad kui *nirS* geeni omad (vastavalt 0,12–1,37% ja 0,51–5,03%) (Joonis 6).



**Joonis 4.** Denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate keskmised arvukused koos standardhälbega erinevates horisontaalfiltrites (HF) enne katse algust (1.09.14) ja viis nädalat hiljem (6.10.14).



**Joonis 5.** Denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate keskmised arvukuste suhted koos standardhälbega erinevates horisontaalfiltrites (HF) enne katse algust (1.09.14) ja viis nädalat hiljem (6.10.14).



**Joonis 6.** Denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate keskmised osakaalud bakterikoosluses koos standardhälbega erinevates horisontaalfiltrites (HF) enne katse algust (1.09.14) ja viis nädalat hiljem (6.10.14).

### 3.3.1 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukused enne katse algust

Enne kaste algust septembris olid 16S rRNA geenide arvukused suhteliselt võrdsed erinevates filtrites. Erandiks olid filter 1, milles esines natukene kõrgem 16S rRNA geenide arvukus (Lisa 2). Denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukused olid septembris natukene väiksemad filtris 3. võrreldes teiste horisontaalfiltritega (Joonis 4). Kõige rohkem varieerusid filtrite lõikes enne katse algust *nosZI* geenide arvukused, mis olid kõrgemad filtrites 1 ja 4, samas *nirS* ja *nirK* geenide arvukused olid suhteliselt ühtlased erinevate filtrite võrdluses.

Septembris ületas *nirS* geenide arvukus *nirK* geenide oma kõikides filtermaterjali proovides ning *nirK/nirS* osakaal oli suhteliselt ühtlane kõigis filtrites (Joonis 5). Enne katse algust domineerisid *nosZI* geeni omavad organismid *nosZII* gene omavate üle kõikides filtrites, kuid *nosZI/nosZII* osakaal oli väga varieeruv filtrite lõikes ning kõrgemad väärtused esinesid filtris 4. *Nir* ja *nosZ* geenide arvukused olid suhteliselt võrdsed erinevates filtrites, kuid *nir/nosZ* väärtused olid natukene madalamad filtrites 1 ja 4 võrreldes teiste filtritega septembris.

Kui vaadeldi denitrifikatsiooniga seotud geenide osakaalusid horisontaalfiltri filtermaterjali bakterikooslustes enne katse algust, siis *nirK%* väärtused olid suhteliselt võrdsed filtrite lõikes, samas *nirS%* korral esines suuremaid kõikumisi (Joonis 6). *NosZI%* väärtused olid

natukene kõrgemad filtris 4, samas kõrgemaid *nosZII*% osakaalusid võis näha filtrite 2 ja 5 bakterikooslustes septembri proovivõtu ajal.

Kui võrreldi määratud geenikoopiate arvukusi filtrite erinevatel positsioonidel enne katse algust, siis kõrgemad geenikoopiate arvukused esinesid sissevoolule kõige lähemal asuvas punktis, millele järgnes arvukuste alusel keskosa ja seejärel väljavoolu piirkonna proovivõtupunktid (Lisa 3 ja Lisa 4). Ainukesed erandid olid filtrid 1 ja 4, mille keskosa ja väljavoolu proovipunktide geenikoopiate arvukused olid septembris peaaegu võrdsed.

Geenide omavaheliste suhete võrdlemine filtrite erinevatel positsioonidel enne katse algust (Lisa 5) näitas, et kui *nirK/nirS* väärtused olid ühtlased kõikide filtrite lõikes, siis *nosZI/nosZII* väärtused oli kõrgemad sissevoolu lähedal olevas proovipunktis. *Nir* ja *nosZ* geenide omavaheline suhe oli aga kõrgem pigem filtrite keskmistel positsioonidel võrreldes sisse- ja väljavoolu piirkondadega.

Sarnaselt absoluutsete arvukustega oli septembris näha ka *nirS*%, *nirK*% ja *nosZI*% väärtuste langemist väljavoolu suunas (Lisa 6). Erandiks olid filtrid 1 ja 4, kus toimus *nir* geenide osakaalude tõus filtri keskosa bakterikooslustes ja seda eriti *nirS*% korral.

### **3.3.2 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukused erinevate töötluste võrdluses**

Viis nädalat peale katse algust (oktoobris) ei esinenud kollargooli ega  $\text{AgNO}_3$  sisaldavat reovett töötlevates filtrites suuri erinevusi 16S rRNA geenide arvukustes võrreldes kontroll-filtritega 3 ja 6 (Lisa 3) Võrreldes septembris tuvastatud 16S rRNA geenide arvukustega oli langus toimunud vaid kollargooli töötlusega filtrites (eelkõige filtris 1).

Oktoobris olid denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukused kollargooli sisaldavat reovett puhastavates filtrites võrdsed või natukene kõrgemad kui kontroll-filtrites, kuid kõige suurem erinevus esines *nosZI* geeni arvukustes, mida ei olnud nii selgelt näha  $\text{AgNO}_3$  korral (Joonis 4).  $\text{AgNO}_3$  sisaldavat reovett töötlevates filtrites olid näha teatud tõusu *nirS* geeni arvukustes võrreldes kontroll-filtritega. Võrreldes katse algusele eelnenud ajaga oli kollargooli töötlusega filtrites langenud teatud määral *nirS* ja *nosZI* geenide arvukused ning sarnast langust ajas võis näha ka kontroll-filtrites, samas  $\text{AgNO}_3$  sisaldavat reovett puhastavates filtrites oli *nirS* ja *nosZI* geenide arvukus jäänud suhteliselt samaks.

*Nir* ja *nosZ* geenide arvukused olid üldiselt samad  $\text{AgNO}_3$  ja kollargooli töötlusega filtrites võrreldes kontroll-filtriga, teatavat erinevust põhjustasid natukene madalamad näitajad filtris

3. Kui võrrelda oktoobri tulemusi katse algusele eelnenud tulemustega, siis AgNO<sub>3</sub> sisaldavat reovett puhastavad filtrid olid ainukesed, kus *nir* ja *nosZ* geenide arvukused jäid samale tasemel või tõusid teatud määral, kuid nii kollargooli töötusega kui kontroll-filtrite *nir* ja *nosZ* geenide arvukused pigem langesid veidi.

*NirK/nirS* ja *nosZI/nosZII* väärtused ei erinenud märgatavalt erinevate töötuste võrdlemisel kontrollfiltritega, kuid *nir/nosZ* väärtused olid kollargooli sisaldavat reovett puhastavates filtrites teatud määral väiksemad kui kontroll- ja AgNO<sub>3</sub> töötusega filtrites (Joonis 5). Võrreldes enne katse algust kogutud proovidega, ei olnud vastavates filtrites muutunud *nirK/nirS* ja *nir/nosZ* väärtused, samas *nosZI/nosZII* väärtustes oli toimunud viie nädala jooksul väike langus nii kontrollfiltrites kui kollargooli töötusega filtrites.

*NirK* geenikoopiate osakaalud bakterikoosluses ei olnud märgatavalt muutunud töötuste võrdlemisel kontroll-filtritega oktoobris (Joonis 6). *NirS*% korral võis näha teatud väärtuse kasvu AgNO<sub>3</sub> sisaldava reovett puhastavas filtris ning *nosZI*% ja *nosZII*% korral kollargooli töötuse võrdlemisel kontroll-filtritega. Samas võrreldes septembri ja oktoobri proovide denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate osakaalusid vastavates filtrites võis tuvastada väikest *nirS*% langust filtrites 1. ja 4 (kollargooli töötus). Lisaks võis täheldada väikest *nosZII*% väärtuste langust filtrites 2. ja 5. ning tõusu filtrites 1. ja 4. ning 3. ja 6. võrreldes katsele eelnenud proovivõtuga.

Geenikoopiate arvukuste võrdlemine filtrite erinevates osades näitas, et 16S rRNA geeni arvukused ei olnud töötuste tulemusena muutunud filtermaterjalis võrreldes kontrolliga ning jätkuvalt olid kõige kõrgema geenide arvukusega sissevoolu piirkonna bakterikooslused (Lisa 3). Samas oktoobris oli võrreldes septembriga langenud filtrite 1. ja 4. sissevoolu piirkonna 16S rRNA geenide arvukused.

Samas enamik denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate arvukused olid viis nädalat peale katse algust kollargooli ja AgNO<sub>3</sub> sisaldavat reovett puhastavates filtrite sissevoolude lähedal asuvas filtermaterjalis tõusnud võrreldes kontroll-filtritega, kuid kontroll-filtrite paralleelides esines suurem tulemustes varieerumine võrreldes töötustega. Kui võrrelda aga enne ja pärast töötust kogutud proovide geenide arvukusi, võib näha teatud langust *nosZI* geeni väärtustes filtri 1 ja 4 sissevoolule kõige lähemal olevas positsioonis.

*NosZI/nosZII* ja *nir/nosZ* väärtused filtri erinevates positsioonides järgisid oktoobris samasugust mustrit nagu septembris: langus väljavoolus suunas *nosZI/nosZII* (sealhulgas filtrites 1. ja 4.) ning kõrgemad väärtused filtri keskosas *nir/nosZ* väärtuste korral.

Denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate osakaaludes ei olnud viis nädalat peale katse algust toimunud suuri muutusi tööstustes võrreldes kontroll-filtritega. Võrreldes septembriga oli toimunud väike langus *nirS%* väärtustes kollargooli sisaldava filtri teises positsioonis võrreldes septembriga.

## 4. Arutelu

### 4.1 Nõo horisontaalvoolulise pinnasfiltri keemilised parameetrid ning geenide arvukused enne katse algust

Enne katse algust septembris olid horisontaalfiltrite sissevoolud sarnased keemiliste parameetrite alusel, mis näitab vertikaalfiltrite ühtlast toimimist ning võimaldas alustada katset. Kui septikust väljuvas reovees oli lämmastik valdavalt ammooniumiooni kujul, siis peale vertikaalfiltri läbimist ja horisontaalfiltritesse sisenedes oli valdavaks lämmastikuvormiks nitraat ning ammooniumi kontsentratsioon oli väga madal, mis viitab nitrifikatsiooni toimumisele vertikaalfiltris.

Lisaks võis sarnaseid puhastusefektiivsuseid näha ka horisontaalfiltrite lõikes, mis kinnitas ka horisontaalfiltrite ühtlast võimet eemaldada erinevaid reoaineid. Horisontaalfiltrid näitasid kõrget orgaaniliste süsinikuvormide ja ammooniumi eemaldamise efektiivsust, samas üldsüsiniku korral oli filtrite puhastusvõime natukene erinev, mis võis olla tingitud selle mõnevõrra kõrgemast varieeruvusest vertikaalfiltrite väljavooludes. Nitraatide eemaldamise efektiivsus oli suhteliselt varieeruv ja madal horisontaalfiltrite lõikes, samas on võimalik, et teatud tsoonides (nt filtri sissevoolus või ülemises kihtis) toimus ka nitrifikatsioon, mille käigus tekkinud nitraat tarbiti denitriifitseerijate poolt. Sellele viitab ka üldlämmastiku kontsentratsiooni langus. Lisaks langes reovees horisontaalfiltrite läbimise käigus hapniku kontsentratsioon, mis viitab, et reovees olnud hapnik tarbiti mikroorganismide poolt ära ning filtris ei toimunud edasist reovee aereerimist.

Bakterite üldarvukust iseloomustava 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukustes esines üksikuid väiksemaid kõikumisi enne katse algust, kuid üldiselt olid geenide arvukused suhteliselt võrdsed enamikes horisontaalfiltrites enne katse algust.

Septembris olid horisontaalfiltri 16S rRNA geenide arvukused võrreldavad varasemas horisontaalfiltrit käsitlevas uurimuses toodud 16S rRNA geenide arvukustega, kus puhastati samuti Nõo aleviku reovett (Nõlvak *et al.*, 2013). *NirS* geeni omavad denitriifitseerijad domineerisid ülekaalukalt *nirK*-tüüpi denitriifitseerijate üle, mis kinnitab varasemalt väljapakutud teooriat, et erinevat nitriti reduktaasi kodeerivaid gene omavatel organismidel on erinev keskkonnatingimuste eelistus (Ligi *et al.*, 2014; Graf *et al.*, 2014). Arvatakse, et *nirK* gene kandvad organismid taluvad paremini hapniku taseme kõikumisi võrreldes *nirS* gene omavate organismidega, seega võib horisontaalfiltri püsivalt anaeroobne keskkond olla eelistatum just *nirS*-tüüpi denitriifitseerijatele (Ligi *et al.*, 2014). *NosZII* gene kandvaid

organisme on seostatud eelkõige ekstreemsemate elukeskkondadega (Sanford *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013) ning seetõttu oli suhteliselt ootuspärane, et dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeerivate *nosZI* geenide arvukus oli kõrgem *nosZII* geenide arvukusest. *NosZI* geeni omavate organismide domineerimist *nosZII* geeni omavate üle on näidanud tehismärgalades ka Jones *et al.* (2013). Nitriti reduktaasi ja dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeerivate geenide omavahelist suhet võib kasutada denitrifikatsioonist tuleneva potentsiaalse N<sub>2</sub>O emissiooni hindamiseks. Enamikes Nõo horisontaalfiltri paralleelides olid *nir* geenide arvukused peaaegu võrdsed või isegi natukene kõrgemad *nosZ* geenide arvukustes, mis viitab väga väiksele denitrifikatsioonist tulenevale potentsiaalsele N<sub>2</sub>O emissioonile Nõo horisontaalsetest pinnasfiltritest.

Kui võrreldi horisontaalfiltrite erinevaid positsioone, siis sissevoolu lähedal oli kõige kõrgem bakterite ja denitrifitseerijate üldarvukus võrreldes filtri keskosa ja väljavoolu piirkonnaga. Bakterite kõrgem arvukus sissevoolu lähedal võib olla seotud reovee kõrgema toitainete kontsentratsiooniga ning lisaks võisid seal esineda nii aeroobsed (horisontaalfiltrisse sisenevas reovees oli suhteliselt kõrge hapniku hulk) kui hapniku kontsentratsiooni langedes ka anaeroobsed bakterid (sh denitrifitseerijad), kes kasutasid ära sissevoolu piirkonna soodsamaid tingimusi. Kõrgemale mikroorganismide arvukusele viitavad ka disüsinikoksiidi emissioonide mõõtmised, mille alusel oli sissevoolu piirkonnas CO<sub>2</sub> emissioon 16,5±5,9 mgC/m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> ja väljavoolus 4,9±2,4 mgC/m<sup>2</sup> h (avaldamata andmed).

Kui *nirS*- ja *nirK*-tüüpi denitrifitseerijate suhe oli suhteliselt võrdne filtri erinevatel positsioonidel, siis *nosZI* geeni omavad denitrifitseerijad domineerisid selgemalt *nosZII* denitrifitseerijate üle just sissevoolu piirkonnas, mis võib ka viidata sellele, et *nosZI*-denitrifitseerijate jaoks oli soodsam just sissevoolu piirkond võrreldes *nosZII* geeni omavate organismidega. Lisaks tuvastati filtri keskosas koosluses rohkem *nir* gene kui *nosZ* gene omavaid organisme, mis võib viidata kõrgemale N<sub>2</sub>O emissiooni potentsiaalile filtri keskosa piirkonnast. Lisaks absoluutsetele arvukustele tuvastati ka enamike denitrifikatsiooniga seotud geenide osakaalude langus bakterikoosluses, mis võib viidata sellele, et denitrifitseerijate jaoks olid filtri tagumistes osades halvemad tingimused.

#### **4.2 Nõo horisontaalvoolulise pinnasfiltri keemilised parameetrid ning 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenide arvukused katse lõppedes**

Antud katses kasutati reovett, kuhu oli lisatud vastavalt sünteetilisi nanohõbeda osakesi (kollargool) ja hõbenitraati lõpp-kontsentratsiooniga 0,1 mgAg/L. Lisandite kontsentratsiooni

valimisel lähtuti kirjanduses avaldatud nanohõbeda võimalikule kontsentratsioonile reovees tulevikus (Gottschalk et al., 2009).

Viis nädalat peale katse käivitamist oli horisontaalfiltritesse sissevoolav reovee keemilised näitajad suhteliselt sarnased erinevate töötluste ja kontroll-filtrite lõikes. Seega võib järeldada, et kollargoolil ja  $\text{AgNO}_3$  ei olnud märgatavat mõju vertikaalfiltrite puhastusefektiivsustele. Samas võrreldes septembrikuuga oli oktoobris langenud kõikide vertikaalfiltrite väljavooludes orgaanilise ja lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioonid, kuigi septikust väljuvas reovees oli nende kontsentratsioonid tõusnud. Lisaks oli tõusnud nii kollargooli kui kontroll-filtrites orgaanilise süsiniku, lahustunud orgaanilise süsiniku ja üldlämmastiku puhastusefektiivsused, mis viitavad pigem teatud ajaliste muutustele kui töötluste mõjule. Ainukese erinevusena võib välja tuua üldsüsiniku puhastusefektiivsuse väikse tõusu kollargooli sisaldavat reovett töötlevates filtrites võrreldes kontroll-filtritega. Kümnepäevases reaktorkatses nanohõbedaga (0,5 mgAg/L) näidati, et sellisel kontsentratsioonil ei avalda nanohõbe mõju keemilisele hapnikutarbele ega ammoniumi eemaldamisele (Hou et al., 2012).

Horisontaalfiltri filtermaterjalide bakterite üldarvukuses ei täheldatud muutusi viis nädalat peale töötluste algust, pigem oli toimunud filtrite ühtlustumine geenikoopiate arvukuste alusel. Erinevate töötluste võrdlemisel kontroll-filtritega võis näha natukene kõrgemat *nosZI* geenide arvukust kollargooli ning *nirS* geenide arvukust  $\text{AgNO}_3$  korral, kuid muutused olid väikesed ning filtrite paralleelide kõikumised küllaltki suured ning samade geenide puhul oli toimunud ka teatud langus kontroll-filtrites võrreldes septembri vastavate näitajatega. Lisaks võis näha väikest langust ka *nir* ja *nosZ* geenide omavahelises suhtes kollargooli töötlustega filtris võrreldes kontroll-filtriga, mis võis samuti olla põhjustatud eelkõige natukene kõrgemast *nosZ* geenide arvukusest kollargooli töötlustega filtrites. Väikeseid muutuseid võis täheldada lisaks kollargooli ja kontrolli võrdluses ka kollargooli ja  $\text{AgNO}_3$  töötluste võrdluses, kuid need muutused võisid ka olla suuresti mõjutatud pigem filtriparalleelide loomulikust varieerivusest kui hõbeda mõjust mikroorganismidele.

On võimalik, et nanohõbeda või hõbenitraadi toksiline mõju avaldus juba katse varasemas etapis ning viiendaks nädalaks oli toimunud kohanemine kollargooli ja hõbenitraadiga. Samas ei täheldatud muutusi nitriifitseerijate arvukuses membraan-bioreaktorikatses, kus kasutati samuti 0,1 mgAg/L nanohõbeda kontsentratsiooniga sünteetilist reovett ning tulemusi mõõdeti 25, 41 ja 65 päeva möödudes (Zhang et al., 2014). Chen et al. (2014) uurimustöös leiti, madala nanohõbeda kontsentratsiooni korral (0,1 mgAg/L) tõusid teatud bakterite (nt

*Bacteroidetes* ja *Candidatus Accumulibacter phosphatis*) arvukused, samas nanohõbeda kõrgemal kontsentratsioonil (0,5 mgAg/L) samade liikide arvukus kahanes.

Lisaks on võimalus, et Nõo eksperimendi käigus toimus nanoosakeste agregeerumine või moodustasid nanoosakesed keskkonnas leiduva orgaanilise ainega stabiilseid komplekse, mille tulemusena vähenes nende bioloogiline kättesaadavus ja toksilisus (Fabrega *et al.*, 2009). Lisaks on näidatud, et anaeroobses keskkonnas ei toimu hõbedaioonide vabanemist nanohõbedast (Yang *et al.*, 2012).

Nõo reovees sisaldub vähesel määral hõbedat, kuid selle kontsentratsioon on tunduvalt väiksem kui katses kasutatud nanohõbeda ja kollargooli kontsentratsioonid. Samas on vertikaalfiltritest, millesse juhitas reovette lisati kollargooli ja hõbenitraati, väljuvas reovees hõbeda kontsentratsioonid väga madalad (mõni µg/L) ning enamik hõbedast võib jääda vertikaalfiltrisse ning horisontaalfiltrisse jõuab väga väike osa katses kasutatud hõbedast.

## Kokkuvõte

Tehismärgalad on keskkonnasõbralik, odav ja tõhus alternatiiv rohkesti ressursse nõudvale aktiivmudal põhinevale reoveepuhastustehnoloogiale. Peamine protsess, mille käigus toimub lõplik lämmastikuühendite eemaldamine reoveest on denitrifikatsioon ning tehismärgade hulka kuuluvates horisontaalvoolulistes pinnasfiltrites on võimalik luua sobilikud tingimused just denitrifikatsioonile. Nanoosakeste sealhulgas sünteetiliste hõbeda nanoosakeste üha laialdasema kasutuse tõttu jõuab neid järjest rohkem reovette, kuid väga vähe on teada nanoosakeste mõjust denitrifitseerivale mikroobikooslusele.

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju denitrifikatsiooni geneetilisele potentsiaalile Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltris. Katses kasutatud hõbeda nanoosakeste kontsentratsioon (0,1 mgAg/L) on vastavuses tulevikus ennustatud nanohõbeda hulgale reovees. Lisaks kasutati tavasuures hõbeda mõju kontrollimiseks hõbenitraati sisaldavat reovett (0,1 mgAg/L) ning töötluseta kontroll-filtreid.

Filtermaterjali proovid koguti enne katse algust ja viis nädalat hiljem horisontaalvooluliste filtrite 20–40 cm sügavusest kihist. 16S rRNA ja denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate (*nirS*, *nirK*, *nosZI* ja *nosZII*) arvukused ja funktsionaalsete geenide osakaalud bakterikoosluses määrati kasutades kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni. Lisaks määrati enne katse algust ja viie nädala pärast filtrite sisse- ja väljavoolude keemilised parameetrid ning arvutati nende muutused.

Horisontaalfiltrid näitasid kõrget orgaaniliste süsinikuvormide ja ammooniumi eemaldamise efektiivsust nii enne katse algust ja viis nädalat hiljem ning kollargooli ega hõbenitraadi lisamine ei mõjutanud horisontaalfiltrite erinevate reoainete puhastusvõimeid.

Enne katse algust oli bakterite üldarvukus ning nitriti ja dilämmastikoksiidi redutseerimise potentsiaal kõrgem horisontaalfiltrite sissevoolude piirkonnas. Filtrite kõigis positsioonides olid soodsamad tingimused *nirS* geeni poolt kodeeritud nitrite reduktaasi omavatele denitrifitseerijatele võrreldes *nirK* geeni omavatele ning kooslustes olid levinumad *nosZI* geeni omavad organismid võrreldes *nosZII* geeni kandvate organismidega. Nitriti redutseerimise potentsiaal oli võrdne või isegi natukene madalam dilämmastikoksiidi redutseerimise geneetilisest potentsiaalist, mille alusel väib järeldada, et Nõo horisontaalvoolulistes filtritel on väga väike potentsiaal denitrifikatsioonist tulenevale N<sub>2</sub>O emissioonile.

Seega sarnaselt reoainete eemaldamise efektiivsustele ei tuvastatud selget kollargooli ega hõbenitraadi reoveele lisamise mõju bakterite üldarvukusele ega denitrifikatsiooni geneetilisele potentsiaalile uuritud horisontaalfiltrites peale viie nädalast katseperioodi. Antud tulemusest võib järeldada, et tulevikus ennustatud nanohõbeda kontsentratsioon reovees ei pruugi mõjuda kombineeritud pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltril puhasuseefektiivsusi ega denitrifikatsiooni geneetilist potentsiaali. Tulevikus tuleks uurida lisaks nanohõbedale ka teist tüüpi nanoosakeste mõju ja eri tüüpi nanoosakeste koosmõju pinnasfiltersüsteemide mikroobikooslusele ja selle poolt läbiviidavatele protsessidele.

## Tänuõnad

Antud bakalaureusetöö autor soovib sügavalt ja siiralt tänada oma juhendajat, Teele Ligi, kelle vastutulelikkuse ning heatahtlikkuse tõttu poleks antud töö õigel ajal ilmavalgust näinud. Samuti soovib autor oma juhendajat tänada tema suure mõistvuse ning kannatlikkuse eest töö tegemise käigus.

Töö autor tänab projekti meeskonda prof. Jaak Truud, dr. Teele Ligi, Kuno Kasakut, Kristjan Oopkaupa, Mikk Espenbergi ja Kertu Tiirikut ning Mae Uri TÜ geograafia osakonna biogeokeemia laborist ja dr. Kaja Kasemetsa KBFI -st.

Käesoleva magistritööga seotud kulutused on kaetud projekti „Ravimijäägid ja sünteetilised nanoosakesed reovees: mõju reoveepuhastusprotsessile ja ravimresistentsuse geenide levikule keskkonnas“ (3.2.0801.11-0026) ja IUT2-16 "Gloaalne soojenemine ja maastike aineriing".

## Kasutatud kirjandus

- Ballantine, D. J., & Tanner, C. C. (2010). Substrate and filter materials to enhance phosphorus removal in constructed wetlands treating diffuse farm runoff: a review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 53(1), 71–95.
- Benedict, S. W., Ahmed, T. & Jahan, K. (1998). Autotrophic denitrification using hydrogen oxidizing bacteria in continuous flow biofilm reactor, *Toxicological and Environmental Chemistry*, Vol. 67, pp. 197–214.
- Bernet, N., Dangcong, P., Delgenès, J.-P., & Moletta, R. (2001). Nitrification at Low Oxygen Concentration in Biofilm Reactor. *Journal of Environmental Engineering*, 127(3), 266–271.
- Beutel, M. W., Newton, C. D., Brouillard, E. S., & Watts, R. J. (2009). Nitrate removal in surface-flow constructed wetlands treating dilute agricultural runoff in the lower Yakima Basin, Washington. *Ecological Engineering*, 35(10), 1538–1546.
- Blaser, S. A., Scheringer, M., Macleod, M., & Hungerbühler, K. (2008). Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *The Science of the Total Environment*, 390(2-3), 396–409.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge--evidence and impacts. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 30(3), 504–20.
- Butterbach-Bahl, K., & Dannenmann, M. (2011). Denitrification and associated soil N<sub>2</sub>O emissions due to agricultural activities in a changing climate. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 3(5), 389–395.
- Cameotra, S. S., & Dhanjal, S. "Environmental nanotechnology: nanoparticles for bioremediation of toxic pollutants." *Bioremediation Technology*. Springer Netherlands, 2010. 348-374.
- Chen, H. (2011). Surface-Flow Constructed Treatment Wetlands for Pollutant Removal: Applications and Perspectives. *Wetlands*, 31(4), 805–814.
- Chen, J., Tang, Y.-Q., Li, Y., Nie, Y., Hou, L., Li, X.-Q., & Wu, X.-L. (2014). Impacts of different nanoparticles on functional bacterial community in activated sludge. *Chemosphere*, 104, 141–8.
- Correa-Galeote, D., Marco, D. E., Tortosa, G., Bru, D., Philippot, L., & Bedmar, E. J. (2013). Spatial distribution of N-cycling microbial communities showed complex patterns in constructed wetland sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(2), 340–51.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., & Relman, D.A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6:e280.

- Dzakpasu, M., Scholz, M., McCarthy, V., & Jordan, S. N. (2015). Assessment of long-term phosphorus retention in an integrated constructed wetland treating domestic wastewater. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(1), 305–13.
- Erler, D. V, Tait, D., Eyre, B. D., & Bingham, M. (2011). Observations of nitrogen and phosphorus biogeochemistry in a surface flow constructed wetland. *The Science of the Total Environment*, 409(24), 5359–67.
- Fabrega, J., Fawcett, S. R., Renshaw, J. C., & Lead, J. R. (2009). Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology*, 43(19), 7285–7290.
- Faulwetter, J. L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M. D., Brisson, J., ... Stein, O. R. (2009). Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering*, 35(6), 987–1004.
- Fonder, N., & Headley, T. (2013). The taxonomy of treatment wetlands: A proposed classification and nomenclature system. *Ecological Engineering*, 51, 203–211.
- Fields. Global Nitrogen: Cycling out of Control Environ Health Perspect. 2004 Jul; 112(10): A556–A563.
- Ghasemzadeh, G., Momenpour, M., Omid, F., Hosseini, M. R., Ahani, M., & Barzegari, A. (2014). Applications of nanomaterials in water treatment and environmental remediation. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 8(4), 471–482.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., & Nowack, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology*, 43(24), 9216–22.
- Graf, D. R. H., Jones, C. M., & Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PloS One*, 9(12), e114118.
- Henry, S., Baudoin, E., López-Gutiérrez, J. C., Martin-Laurent, F., Brauman, A., & Philippot, L. (2004). Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3), 327–35.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5181–9.
- Holtan-Hartwig, L., Dörsch, P., & Bakken, L. R. (2000). Comparison of denitrifying communities in organic soils: kinetics of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and N<sub>2</sub>O reduction. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(6), 833–843.
- Holtan-Hartwig, L., Dörsch, P., & Bakken, L. (2002). Low temperature control of soil denitrifying communities: kinetics of N<sub>2</sub>O production and reduction. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1797–1806.

- Hou, L., Li, K., Ding, Y., Li, Y., Chen, J., Wu, X., & Li, X. (2012). Removal of silver nanoparticles in simulated wastewater treatment processes and its impact on COD and NH(4) reduction. *Chemosphere*, 87(3), 248–52.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 2007. In: Metz, B., Davidson, O.R., Bosch, P.R., Dave, R., Meyer, L.A. (Eds.), *Climate Change 2007: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA.
- Jones, C. M., Graf, D. R. H., Bru, D., Philippot, L., & Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrous oxide-reducing microbial community: a potential nitrous oxide sink. *The ISME Journal*, 7(2), 417–26. <http://doi.org/10.1038/ismej.2012.125>
- Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M., & Hallin, S. (2008). Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular Biology and Evolution*, 25(9), 1955–66.
- Kadlec, R. H.; Knight, R. L. *Treatment Wetlands*; CRC Press/ Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1996.
- Kadlec, R. H., & Wallace, S. (2008). *Treatment Wetlands, Second Edition*. CRC Press.
- Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tschirko, D., Bru, D., & Philippot, L. (2006). Abundance of narG, nirS, nirK, and nosZ genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5957–62.
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., ... Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1825.
- Lai, D. Y. F. (2014). Phosphorus fractions and fluxes in the soils of a free surface flow constructed wetland in Hong Kong. *Ecological Engineering*, 73, 73–79.
- Lapresta-Fernández, A., Fernández, A., & Blasco, J. (2012). Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 32, 40–59.
- Lee, C., Fletcher, T. D., & Sun, G. (2009). Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Engineering in Life Sciences*, 9(1), 11–22.
- Ligi, T., Truu, M., Truu, J., Nõlvak, H., Kaasik, A., Mitsch, W. J., & Mander, Ü. (2014). Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes (nirS, nirK, and nosZ) abundances in a created riverine wetland complex. *Ecological Engineering*, 72, 47–55.
- Lippmaa, E., Kahru, A. (2010). Nanode ilu ja valu. *Horisont* 3, lk 8–14 <http://labor.horisont.ee/fb5/?q=node/1392>
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D., & Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35(18), e120.

- Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. P. (2009). Environmental Microbiology 2nd Edition. Elsevier, Academic Press, lk. 309
- Mander, Ü., Dotro, G., Ebie, Y., Towprayoon, S., Chiemchaisri, C., Nogueira, S. F., ... Mitsch, W. J. (2014). Greenhouse gas emission in constructed wetlands for wastewater treatment: A review. *Ecological Engineering*, 66, 19–35.
- Maniquiz, M. C., Choi, J., Lee, S., & Kim, L.-H. (2012). Performance comparison between infiltration and non-infiltration type of structural stormwater treatment systems. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 66(2), 363–9.
- Mulling, B. T. M., van den Boomen, R. M., van der Geest, H. G., Kappelhof, J. W. N. M., & Admiraal, W. (2013). Suspended particle and pathogen peak discharge buffering by a surface-flow constructed wetland. *Water Research*, 47(3), 1091–100.
- Nõlvak, H., Truu, M., Tiirik, K., Oopkaup, K., Sildvee, T., Kaasik, A., ... Truu, J. (2013). Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships with system treatment efficiency in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *The Science of the Total Environment*, 461-462, 636–44.
- Ockenden, M. C., Deasy, C., Quinton, J. N., Bailey, A. P., SurrIDGE, B., & Stoate, C. (2012). Evaluation of field wetlands for mitigation of diffuse pollution from agriculture: Sediment retention, cost and effectiveness. *Environmental Science & Policy*, 24, 110–119.
- Offre, P., Spang, A., & Schleper, C. (2013). Archaea in biogeochemical cycles. *Annual Review of Microbiology*, 67, 437–57.
- Oh, S. E., Kim, K. S., Choi, H. C., Cho, J., Kim, I. S. Kinetics and physiological characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying sulfur bacteria. Published August 2000, 42 (3–4) 59–68
- Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(1), 32.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), e45.
- Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttgupta, S. P., & Mukherji, S. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4(3), 707–16.
- Rhine, E. D., Phelps, C. D., & Young, L. Y. (2006). Anaerobic arsenite oxidation by novel denitrifying isolates. *Environmental Microbiology*, 8(5), 899–908.
- Roussel-Delif, L., Tarnawski, S., Hamelin, J., Philippot, L., Aragno, M., & Fromin, N. (2005). Frequency and diversity of nitrate reductase genes among nitrate-dissimilating *Pseudomonas* in the rhizosphere of perennial grasses grown in field conditions. *Microbial Ecology*, 49(1), 63–72.

- Saeed, T., & Sun, G. (2012). A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: dependency on environmental parameters, operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management*, *112*, 429–48.
- Saggar, S., Jha, N., Deslippe, J., Bolan, N. S., Luo, J., Giltrap, D. L., ... Tillman, R. W. (2013). Denitrification and N<sub>2</sub>O:N<sub>2</sub> production in temperate grasslands: processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *The Science of the Total Environment*, *465*, 173–95.
- Shapleigh, J. P. (2006). The Denitrifying Prokaryotes. The Prokaryotes, Third Edition, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry, Vol 2, lk 769-792.
- Shelef, O., Gross, A., & Rachmilevitch, S. (2013). Role of Plants in a Constructed Wetland: Current and New Perspectives. *Water*, *5*(2), 405–419.
- Scholz, M., & Lee, B. (2005). Constructed wetlands: a review. *International Journal of Environmental Studies*, *62*(4), 421–447.
- Sanford, R. A., Wagner, D. D., Wu, Q., Chee-Sanford, J. C., Thomas, S. H., Cruz-García, C., ... Löffler, F. E. (2012). Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(48), 19709–14.
- Siripattanakul-Ratpukdi, S., & Fürhacker, M. (2014). Review: Issues of Silver Nanoparticles in Engineered Environmental Treatment Systems. *Water, Air, & Soil Pollution*, *225*(4), 1939.
- Schlich, K., Klawonn, T., Terytze, K., & Hund-Rinke, K. (2013). Effects of silver nanoparticles and silver nitrate in the earthworm reproduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, *32*(1), 181–8.
- Van Spanning, R. J. M., Richardson, D. J., Ferguson, S. J. Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. *Biology of the Nitrogen Cycle*. (2006). Elsevier, 3–20.
- Zhang, C., Liang, Z., & Hu, Z. (2014). Bacterial response to a continuous long-term exposure of silver nanoparticles at sub-ppm silver concentrations in a membrane bioreactor activated sludge system. *Water Research*, *50*, 350–8.
- Zumft, W. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, *61*(4), 533–616.
- Tavares, P., Pereira, A. S., Moura, J. J. G., & Moura, I. (2006). Metalloenzymes of the denitrification pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *100*(12), 2087–100.
- Vohla, C., Kõiv, M., Bavor, H. J., Chazarenc, F., & Mander, Ü. (2011). Filter materials for phosphorus removal from wastewater in treatment wetlands—A review. *Ecological Engineering*, *37*(1), 70–89.

- Vymazal, J. (2005). Removal of Heavy Metals in a Horizontal Sub-Surface Flow Constructed Wetland. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40(6-7), 1369–1379.
- Vymazal, J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *The Science of the Total Environment*, 380(1-3), 48–65.
- Vymazal, J. (2011). Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience. *Environmental Science & Technology*, 45(1), 61–9.
- Vymazal, J. (2013a). Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: A review. *Ecological Engineering*, 61, 582–592.
- Vymazal, J. (2013b). The use of hybrid constructed wetlands for wastewater treatment with special attention to nitrogen removal: a review of a recent development. *Water Research*, 47(14), 4795–811.
- Vymazal, J. (2014). Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review. *Ecological Engineering*, 73, 724–751.
- Wei, W., Isobe, K., Nishizawa, T., Zhu, L., Shiratori, Y., Ohte, N., Koba, K., Otsuka, S., Senoo, K., 2015. Higher diversity and abundance of denitrifying microorganisms in environments than considered previously. *ISME J.*, 9(9), 1954–1965.
- Yang, Y., Chen, Q., Wall, J. D., & Hu, Z. (2012). Potential nanosilver impact on anaerobic digestion at moderate silver concentrations. *Water Research*, 46(4), 1176–84. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.024>
- Yang, Y., Wang, J., Xiu, Z., & Alvarez, P. J. J. (2013). Impacts of silver nanoparticles on cellular and transcriptional activity of nitrogen-cycling bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 32(7), 1488–94.

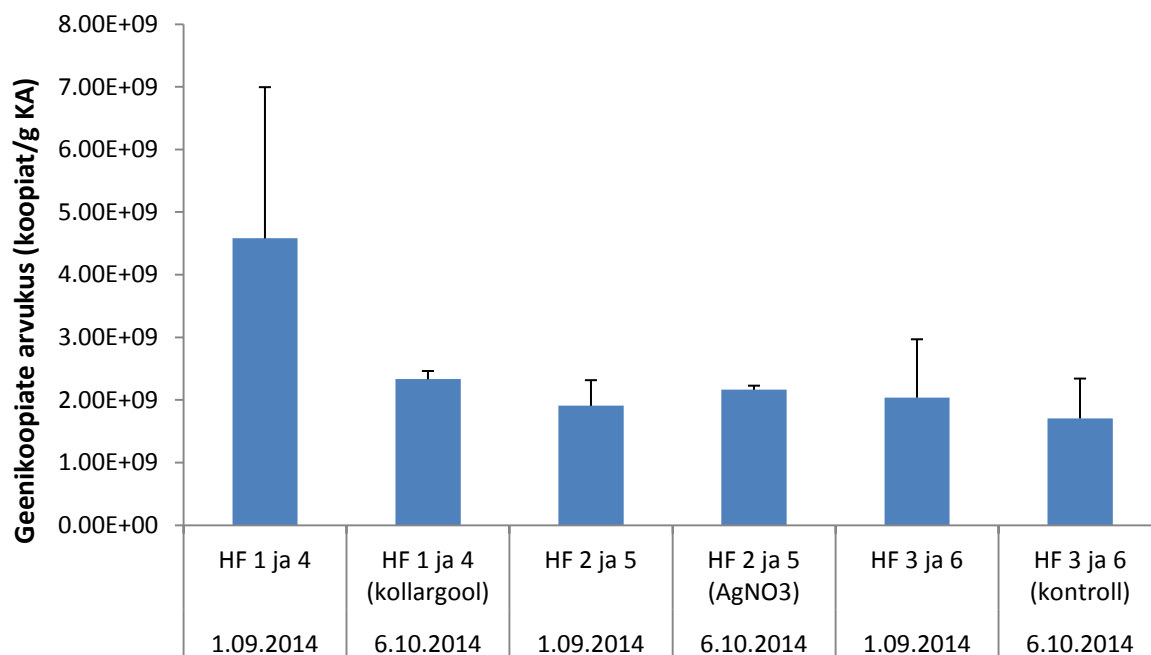
## Lisa 1. Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi VF ja HF sisse- ja väljavoolude parameetrite väärtused.

Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalse (HF) ja vertikaalse (VF) veevooluga pinnasfiltrite ning vahekaevu sissevoolu keemiliste parameetrite väärtused enne katse algust (1.09.14) ja viis nädalat hiljem (6.10.14).

Proov	O <sub>2</sub> mg/l	pH	TC mgC/l	TOC mgC/l	DOC mgC/l	TN mgN/L	NH <sub>4</sub> -N mg/l	NO <sub>3</sub> -N mg/l	Ag µg/L
<b>Sissevool</b>	0,18	7,03	251	170	132	81	60	0,07	1,46
<b>1.09.2014</b>	<b>1 VF</b>	6,20	7,14	86	51	44	66	4,5	44
	<b>4 VF</b>	5,37	7,32	91	52	48	71	7,5	40
	<b>2 VF</b>	6,28	7,1	75	43	40	74	1,8	48
	<b>5 VF</b>	6,86	7,27	86	46	45	69	5,5	41
	<b>3 VF</b>	5,81	7,31	76	43	43	74	2,8	48
	<b>6 VF</b>	6,33	7,23	82	54	41	79	2,1	49
	<b>1 HF</b>	1,11	7,35	84	45	43	69	2,9	45
	<b>4 HF</b>	0,89	7,46	92	49	42	59	5,4	33
	<b>2 HF</b>	1,25	7,33	75	41	39	72	0,47	51
	<b>5 HF</b>	1,26	7,35	85	44	42	61	2,1	40
	<b>3 HF</b>	0,68	7,47	80	43	40	73	1	50
	<b>6 HF</b>	0,41	7,47	78	42	40	77	0,051	52
<b>Sissevool</b>	0,60	6,99	332	202	101	125	90	0,09	1,14
<b>6.10.2014</b>	<b>1 VF</b>	5,87	7,22	75	23	20	73	4,7	54
	<b>4 VF</b>	5,14	7,59	93	39	35	84	12	51
	<b>2 VF</b>	5,65	7,22	56	18	17	84	1,7	61
	<b>5 VF</b>	5,62	7,14	101	33	32	69	10	40
	<b>3 VF</b>	5,37	7,41	67	21	20	78	5,2	57
	<b>6 VF</b>	6,63	7,25	66	21	20	84	3,8	57
	<b>1 HF</b>	2,18	7,3	69	17	15	69	0,87	48
	<b>4 HF</b>	0,88	7,48	80	18	16	60	3,1	42
	<b>2 HF</b>	0,93	7,3	61	17	12	79	0,032	63
	<b>5 HF</b>	1,02	7,35	81	16	16	58	2,6	42
	<b>3 HF</b>	0,36	7,43	67	15	14	71	1,2	51
	<b>6 HF</b>	1,63	7,4	63	14	14	75	0,31	55

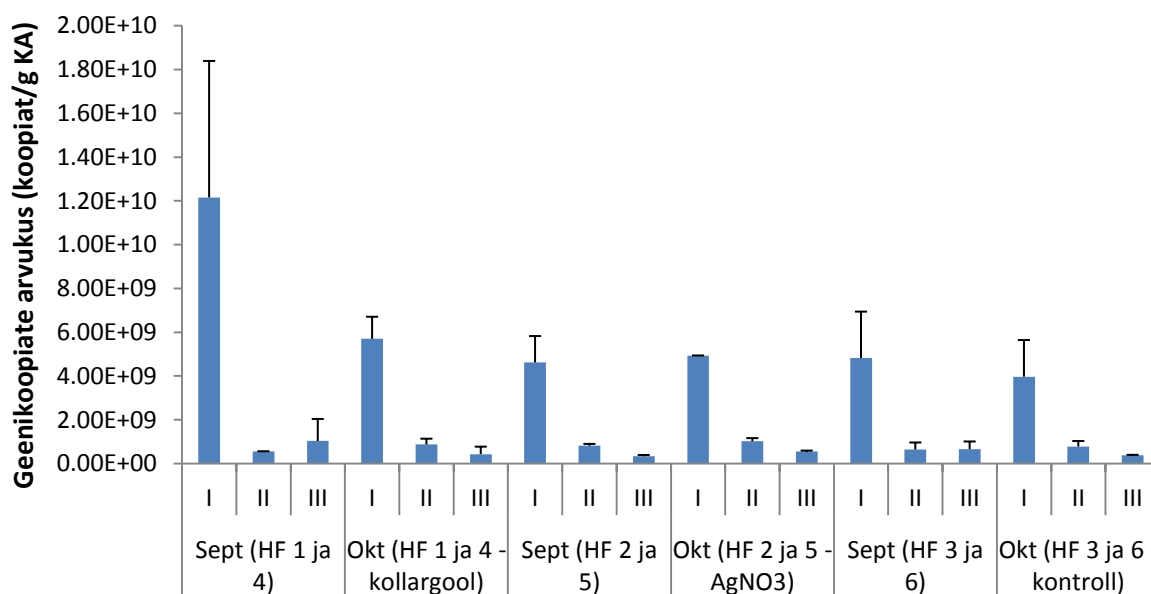
ND - allpool määramispiiri

## Lisa 2. Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltri 16S rRNA geenikoopiate arvukused



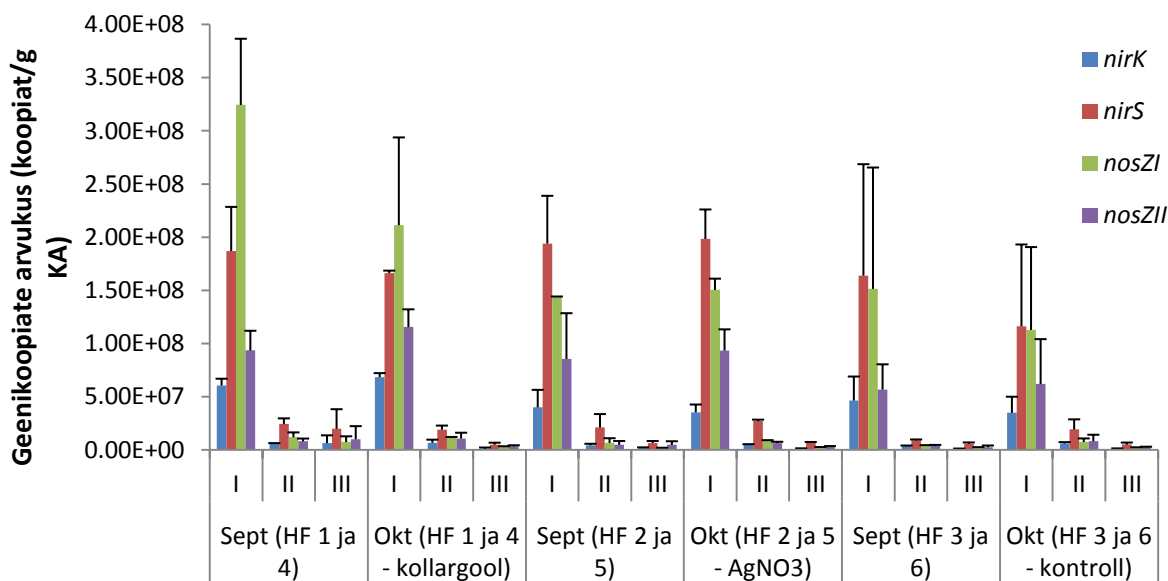
Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltri 16S rRNA geenikoopiate arvukused koos standardhällbega enne katse algust (1.09.14) ja viis nädalat hiljem (6.10.14).

## Lisa 3. Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi 16S rRNA geenikoopiate arvukused horisontaalfiltri erinevatel filtri positsioonidel



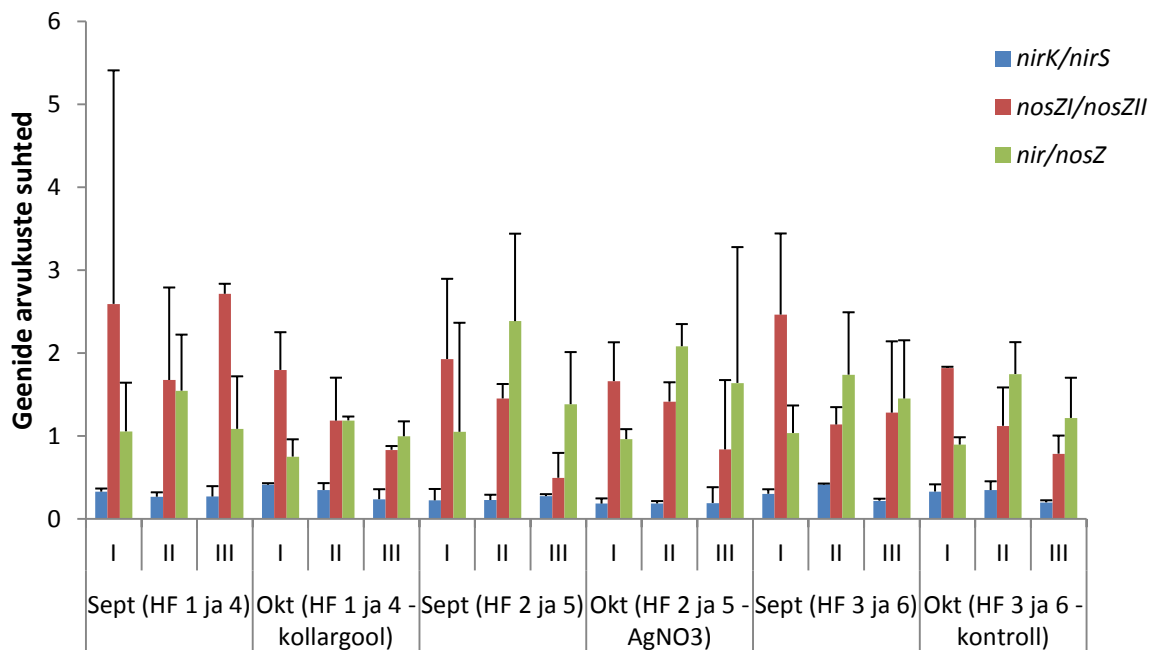
Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltri 16S rRNA geenikoopiate arvukused filtri sissevoolu (I), keskosa (II) ning väljavoolu (III) piirkonnas koos standardhällbega enne katse algust (1.09.14) ja viis nädalat hiljem (6.10.14).

#### Lisa 4. Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi geenikoopiate arvukused horisontaalfiltri erinevatel positsioonidel



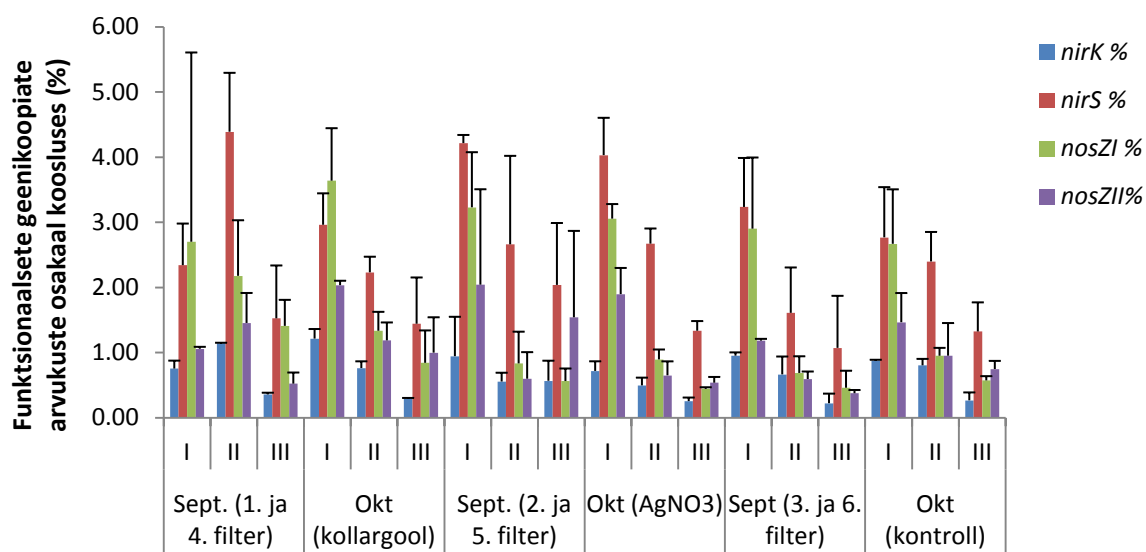
Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltri geenikoopiate arvukused filtri sissevoolu (I), keskosa (II) ning väljavoolu (III) piirkonnas koos standardhälbega enne katse algust (1.09.14) ja viis nädalat hiljem (6.10.14).

#### Lisa 5. Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi geenikoopiate arvukuste suhted horisontaalfiltri erinevatel positsioonidel



Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltri geenikoopiate arvukuste suhted filtri sissevoolu (I), keskosa (II) ning väljavoolu (III) piirkonnas koos standardhälbega enne katse algust (1.09.14) ja viis nädalat hiljem (6.10.14).

**Lisa 6. Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate osakaalud koosluses horisontaalfiltri erinevatel positsioonidel**



Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltri geenikoopiate arvukuste osakaalud 16S rRNA suhtes filtri sissevoolu (I), keskosa (II) ning väljavoolu (III) piirkonnas koos standardhålbega enne katse algust (1.09.14) ja viis nadalat hiljem (6.10.14).

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

Mina, Kadri Kurg

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju denitrifikatsiooni geneetilisele potentsiaalile Nõo eksperimentaalse pinnasfiltersüsteemi horisontaalfiltris

mille juhendaja on Teele Ligi

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
  3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **16.05.2016**