

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Ökoloogia- ja maateaduste instituut

Geograafia osakond

Kadri Saare

**Arhede arvukuse ja mitmekesisuse iseloomustamine Paistu
hübriidse tehismärgala pinnasfiltrites**

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogia erialal

Juhendajad: Kristjan Oopkaup (MSc)

Mikk Espenberg (MSc)

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

Osakonna juhataja:

Tartu 2014

Sisukord

Sissejuhatus	4
1. Tehismärgalappuhastid ning neis toimuvad protsessid	6
1.1 Tehismärgalappuhastite tüübid	6
1.1.1 Horisontaalvooluga pinnasfilter	6
1.1.2 Vertikaalvooluga pinnasfilter	6
1.1.3 Kombineeritud tehismärgalappuhasti	7
1.2 Mikroobsed protsessid tehismärgalappuhastites	7
1.2.1 Aineriingid tehismärgalappuhastis	7
1.2.2 Arhed keskkonnas	9
1.2.3 Meetodid mikroobikoosluste uurimiseks	11
1.2.4 Mikroobikooslust mõjutavad mikroreoaained tehismärgalappuhastis	13
2. Materjal ja metoodika	15
2.1 Prooviala kirjeldus	15
2.2 Vee- ja filtermaterjali proovide kogumine ning puhastusefektiivsuse arvutamine	16
2.3 DNA eraldamine filtermaterjali proovidest	18
2.4 Geenikoopiate arvu leidmine qPCR meetodil	18
2.5 qPCR andmete kvaliteedi analüüs ja grupeerumine	19
2.6 DNA raamatukogu valmistamine ja sekveneerimine	19
2.7 Järjestusandmete analüüs	20
3. Tulemused	21
3.1 Vee- ja filtriproovide keemilised näitajad	21
3.2 Arhede üldarvukus	22
3.3 Arhede liigiline koosseis pinnasfiltrites	23
4. Arutelu	25
4.1 Puhastusefektiivsus	25
4.2 Arhed	26

5. Kokkuvõte	29
Summary	30
Tänuõnad	32
Kasutatud kirjandus:.....	33
Lisad	36

Sissejuhatus

Tehismärgalad on kunstlikult loodud märgalad, mis ei toimiks inimõjuta nagu kaevetööd või veesüsteemi manipulatsioon. Enamasti on need ehitatud looduslike märgalade tingimuste ja protsesside imiteerimiseks (Fonder & Headley 2013).

Tehismärgalapuhastid on reovee käitlemiseks konstrueeritud märgalad, mille eesmärk on jäljendada looduslike märgalade neid füüsikalisi või biokeemilisi protsesse, mis eemaldavad reo- või heitveest saasteaineid (Fonder & Headley 2013). Esimesed katsed tehismärgalade abil reovett puhastada tehti 20. sajandi keskel Saksamaal. Viimase 20 aastaga on tehnoloogia muutunud rahvusvaheliseks ning praeguseks on tehismärgalapuhasti sobiv mitmesugustest allikatest pärit reovee käitlemiseks (Vymazal 2011).

Tehismärgalapuhastites toimuvate protsesside parem mõistmine on võimaldanud luua hulgaliselt eriotstarbelisi süsteeme, mis võivad näiteks soodustada ühe reoaine (nt nitraatide) või kindlast allikast (nt kaevandusvesi või olmereovesi) pärit reoainete käitlemist. Käitlusviise nagu sedimentatsioon, filtratsioon, adsorptsioon ning taimedesse sidumine on põhjalikult uuritud, kuid tehismärgalade puhastusprotsessid põhinevad pigem mikroobide elutegevusel (Faulwetter *et al.*, 2009).

Tehismärgalapuhastites toimuvad mikroobide aktiivsusel põhinevad keemilised, bioloogilised ja füüsikalised protsessid, mille mõjul väheneb reoainete ja toitainete hulk (Vymazal 2007; Truu *et al.*, 2009). Biogeokeemilised tsüklid kirjeldavad aine muutumist ökosüsteemis ning olulisemad on süsiniku-, lämmastiku- ja fosforiringe. Süsinikuringes seovad taimed õhust CO₂ ning mikroobid kasutavad reovees olevat ja taimede lagunemisel tekkivat orgaanilist süsinikku. Taimestamata puhastis kasutatakse valdavalt reoveega saabuvat süsinikku.

Lämmastikuringe olulisemad osad on lämmastiku sidumine, nitrifikatsioon ja denitrifikatsioon ning mikroobid vahendavad enamiku täielikust lämmastikuärastusest. Fosforiringe tähtsamad osad on immobilisatsioon taimedesse, leostumine ning mikroobide vahendusel toimuv mineralisatsioon (Vymazal 2007; Truu *et al.*, 2009).

Erinevad tehismärgalapuhasti omadused nagu kasutatud filtermaterjal, taimede olemasolu või puudumine ning keskkonnatingimused tööperioodi kestel mõjutavad mikroobikoosluse struktuuri, aktiivsust ning nende vahendatud protsesside suunda ja intensiivsust (Truu *et al.*, 2009). Tehismärgalapuhasti tööd mõjutavad ka olmereovees leiduvad ravimijäägid ning erinevatest toodetest pärit nanoosakesed (Brar *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2014).

Antud teema on oluline, kuna praegused teadmised arhede täpsemast levikust ning mõjust aineringetes on üsna tagasihoidlikud. Lisaks aitaks arhede struktuuri ning rolli väljaselgitamine tehismärgalapuhastis luua neile soodsamaid elupaiku ning seega optimeerida tehismärgalapuhasti tööd.

Käesoleva töö eesmärk on uurida ning kirjeldada arhede arvukust ning liigilist koosseisu hübriidse tehismärgalapuhasti pinnasfiltrites ja seostada saadud tulemused süsteemi puhastusefektiivsusega.

1. Tehismärgalapuhastid ning neis toimuvad protsessid

1.1 Tehismärgalapuhastite tüübid

Tehismärgalapuhastid on ehitatud, et jäljendada looduslike märgalade kindlaid protsesse, mille eesmärk on eemaldada reo- või heitveest saasteaineid. Veevoolu järgi jagunevad tehismärgalapuhastid vabaveelisteks ning pinnasfiltriteks, mis omakorda jaotatakse horisontaalse ning vertikaalse vooluga süsteemideks. Vabaveelise tehismärgalapuhasti veesügavus on enamasti kuni 0,4 m, vesi liigub põhjasubstraadi kohal ning taimestik kinnitub põhja või ujub pinnal. Süsteemi avatud veepind meenutab sood või raba (Truu *et al.*, 2009; Fonder & Headley 2013).

1.1.1 Horisontaalvooluga pinnasefilter

Horisontaalvooluga pinnasfiltris voolab suurem osa vett läbi poorse filtri (liiv või kruus), kus toimub ka enamik puhastusprotsesse. Süsteemi iseloomustab horisontaalvool, pinnasfiltri katte all paiknev sissevool ning sellega vastastikku asetsev väljavooluava. Mehaaniliselt puhastatud reovesi juhitakse süsteemi, kus see liigub aeglaselt läbi pinnasfiltris oleva täitematerjali ja risosfääri ning juhitakse lõpuks välja. Filtris puutub vesi kokku aeroobsete, anaeroobsete ning anoksiliste (puudub vaba hapnik, kuid see võib olla seotud keemilistesse ühenditesse, nt sulfaatidesse, nitraatidesse) aladega. Pideva veega küllastuse tõttu on suurem osa pinnasefiltrist anoksiline või anaeroobne. Aeroobne tsoon on taimede juurestiku ümber, kus on ka palju baktereid (Vymazal 2011). Horisontaalvooluga pinnasfilter töötab ka külmates tingimustes, kuna filtri pealmine pind on soojust isoleeritav (Fonder & Headley 2013).

1.1.2 Vertikaalvooluga pinnasfilter

Vertikaalvooluga pinnasfiltris imbub vesi vertikaalselt läbi poorse filtri (liiv või kruus), mille kihid on erineva hüdraulilise juhtivusega. Alumise kihi veejuhtivus on suurem, et tagada puhasti alaosasse imbunud vee kiire äravool, pealmise kihi hüdrauliline juhtivus on kõige madalam. Filtris võib olla ka torustik, mille kaudu saab süsteemi õhutada. Parema

aereerimisvõime tõttu kasutatakse sellist süsteemi sageli prügila nõrgvee ning põllumajanduse heitvee puhastamiseks (Fonder & Headley 2013).

1.1.3 Kombineeritud tehismärgalapuhasti

Kombineeritud tehismärgalapuhastid koosnevad enamasti vertikaal- ja horisontaalvoolulistest pinnasfiltritest, kuid üldiselt saab hübriidsüsteemides kasutada kõiki tehismärgalapuhastite tüüpe. Kombineeritud süsteemide eesmärk on saavutada suurem puhastusefektiivsus, eriti lämmastiku puhul. Vertikaalvoolulistes pinnasfiltrites toimub nitrifikatsioon ning orgaanilise aine ja lahustunud tahke aine eemaldamine, horisontaalses pinnasfiltris toimub denitrifikatsioon ning orgaanilise aine ning tahke aine eemaldamine jätkub (Vymazal 2011).

1.2 Mikroobsed protsessid tehismärgalapuhastites

Kuigi põhiliselt on uuritud reoainetega toimuvaid protsesse nagu sedimentatsioon, filtreerumine, adsorptsioon ning taimedesse sidumine, põhinevad tehismärgalapuhastite reoainete eemaldamise protsessid mikroobide elutegevusel, mida toetavad viimasel ajal kiiresti arenenud kvantitatiivsed ja kvalitatiivsed molekulaarsed meetodid (Faulwetter *et al.*, 2009). Tehismärgala puhastusefekt tekib mikroobide ja filtermaterjali koosmõjul, mida võivad täiendada ka taimed (Truu *et al.*, 2009).

Tehismärgalapuhastite mikroobikoosluses on autohtoonsed (kohalikud) ning allohtoonsed (võõrliigid) mikroorganismid. Autohtoonsed mikroobid on kohanemisvõimelised, metaboolselt aktiivsed, elavad, kasvavad ja osalevad tehismärgalade puhastusprotsessides. Allohtoonsed mikroobid, sealhulgas reoveega lisanduvad patogeenid, ei suuda keskkonnas enamasti ellu jääda ning neil puudub funktsionaalne tähtsus (Truu *et al.*, 2009).

1.2.1 Aineringed tehismärgalapuhastis

1.2.1.1 Süsinikuringe

Süsinikuringe on aineringetest suurima mahuga ning seetõttu globaalselt ka tähtsaim. Tehismärgalade süsinikuringes seovad taimed õhust fotosünteesil süsinikdioksiidi biomassi ning osa süsinikku on setetes. Mikroorganismid kasutavad reoveega süsteemi sisenevat orgaanilist süsinikku energia- ja süsinikuallikana. Süsinik väljub tehismärgalapuhasti

aineringest süsinikdioksiidina mikroobide aeroobsel hingamisel ja metaanina hapnikuvabas keskkonnas. Osa orgaaniliste ühendite süsinikust võib väljuda puhastist taimede biomassi eemaldamisel (Liu 2013).

1.2.1.2 Lämmastikuringe

Lämmastiku tähtsaimad anorgaanilised vormid tehismärgalapuhastites on ammoniaak (NH_3), ammoonium- (NH_4^+), nitrit- (NO_2^-) ja nitraatioon (NO_3^-). Lämmastiku eri vormid on pidevas ringluses, muutudes orgaanilistest ühenditest anorgaanilisteks ning vastupidi. Olulisemad lämmastikuringe protsessid on lämmastiku fikseerimine, nitrifikatsioon, denitrifikatsioon ning anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine. Lämmastiku fikseerimine on bakterite poolt atmosfääri õhust molekulaarse lämmastiku sidumine mikroobide biomassi. Nitrifikatsiooni käigus oksüdeeritakse ammoonium nitraadiks. Denitrifikatsioonis redutseerivad denitrifitseerijad bakterid NO_3^- ning selle käigus tekivad erinevad lämmastiku gaasilised vormid, peamiselt N_2 , aga ka NO ja N_2O . ANAMMOX on lühend anaeroobsest ammooniumi oksüdatsioonist (*ANAerobic AMMonium OXidation*), mille saadus on N_2 (Vymazal 2007).

Mõnede protsesside (nt ammonifikatsioon ja denitrifikatsioon) tulemusena vabaneb energia, mida on võimalik kasutada kasvuks ja elutegevuseks, teised protsessid (nt lämmastiku fikseerimine) kasutavad energiat. Vaid mõne protsessi tulemus on täielik lämmastikuärastus (denitrifikatsioon, ANAMMOX, taimedesse sidumine biomassi koristamisega ja ammooniumi adsorptsioon), teiste puhul (ammonifikatsioon ja nitrifikatsioon) muudetakse lämmastikku eri vormidesse (Vymazal 2007).

1.2.1.3 Fosforiringe

Fosforiringe erineb lämmastikuringest, kuna fosfori oksüdatsiooniate jääb kogu tsükli vältel samaks. Märgalades leidub nii orgaanilisi (nt fosfolipiidides, nukleiinhapetes) kui anorgaanilisi fosfori vorme (erinevad fosfaadid).

Vees lahustunud fosforit seovad taimed oma kudedesse või see adsorbeerub pinnasesse ja setetesse. Fosfori transformatsioonid märgalades on näiteks taimedesse sidumine, fragmentatsioon, leostumine, mineralisatsioon ning sidumine mullaosakestesse, mis muudab fosforiringe väga aeglaseks. Fosfori sidumist mulda suurendab selle savisisaldus. Mikroorganismidesse sidumine on väga kiire, kuna nad paljunevad ning kasvavad väga kiiresti, kuid enamik fosforist seotakse siiski taimejuurte poolt või tehismärgalapuhasti filtermaterjalis (Vymazal 2007).

1.2.2 Arhed keskkonnas

Arhed sarnanevad raku suuruse ja kuju poolest bakteritele, kuid on evolutsiooniliselt neist siiski küllaltki erinevad. Näiteks puudub arhede rakuseinas peptidoglükaan, esinevad vaid arhede domeenile omased membraanilipiidid ja on muidki biokeemilisi ja geneetilisi erinevusi (Cavicchioli 2011).

Sarnaselt bakteritega on arhedel erinevad energia ainevahetusprotsessid: kasutatakse orgaanilisi või anorgaanilisi elektroni doonoreid ja aktseptoreid ja paljud arhed suudavad siduda anorgaanilist süsinikku. Arhedel on seega globaalsetes aineringetes oluline osa ning nad on biosfääris laialt levinud (Cavicchioli 2011).

Näiteks on metanogenees (metanogeenide poolt metaani ehk CH₄ tootmine) ja anaeroobne metaani oksüdeerimine süsinikuringe olulised osad ning mõlemaid protsesse viivad läbi üksnes anaeroobsed arhed. Arhedel on ka oluline roll orgaanilise aine tootmises ja mineralisatsioonis ning lisaks oksüdeerivad nad süsivesinikke. Lämmastikuringes on arhed põhilised ammoniumist nitriti oksüdeerijad, kuid fikseerivad ka molekulaarset lämmastikku ning on osalised denitrifikatsioonis. Väävliringega seotud arhed on enamjaolt termofiilid (kuumalembesed, kasvutemperatuuri piirid umbes 40 – 70°C) ning osalevad protsessides, mille tulemusena oksüdeeritakse sulfiidseid ühendeid (Offre *et al.*, 2013).

Suurem osa kultiveeritavaid arhesid on pärit ekstreemsetest elupaikadest, kus on kõrge soola kontsentratsioon, kõrge temperatuur, tugev happelisus või anoksiline keskkond. Küll aga on arhed laialt levinud ka tavalistes keskkondades nagu merevesi ning muld (Oren 2010). Rakkude loendamise ja molekulaarsete uuringute põhjal moodustavad arhed enam kui 20% ookeanivee ning umbes 1-5% ülemiste mullakihtide prokarüootidest. 2012. aasta novembri seisuga oli avastatud 116 arhede perekonda, mille hulgas oli kirjeldatud ja kultiveeritud 450 liiki (Offre *et al.*, 2013).

Arhede domeeni hõimkondadest on kõige mitmekesisem *Euryarchaeota*, milles on kaheksa taksonoomilist klassi (*Methanopyri*, *Methanococci*, *Methanobacteria*, *Methanomicrobia*, *Archaeoglobi*, *Halobacteria*, *Thermococci* ja *Thermoplasmata*) ning mille hulgas on kõik arhede hulgas teadaolevad metanogeenid ja halofiilid (suudavad elada suure soolasisaldusega keskkonnas), lisaks metaanioksüdeerijad, denitriifitseerijad, sulfaadi redutseerijad, raua oksüdeerijad ja organotroofid. *Euryarchaeota* hõimkonna arhesid leidub merevees, mullas ja setetes, kuid ka ekstreemsetes elupaikades (Allers & Mevarech, 2005.; Offre *et al.*, 2013).

Crenarchaeota hõimkonnas on vaid üks taksonoomiline klass *Thermoprotei*. Hõimkonna esindajate optimaalne kasvutemperatuur on 75 – 105°C ning neid on praeguseks leitud happelistest kuumaveeallikatest, veealustest hüdrotermaalsetest lõõridest ning hõõguvatest prügi-hunnikutest. Metagenoomika ning kultiveerimise abil on ka välja selgitatud *Crenarchaeota* mitte-termofiilide roll lämmastikutsüklis ammooniumi oksüdeerijana ning lisaks osalemine süsinikuringes (Nicola & Schleper 2006; Oren 2010; Offre *et al.*, 2013).

Hiljuti avastatud hõimkonna *Thaumarchaeota* puhul on suudetud kultiveerida vaid mõnda liiki. Hõimkond tuvastati, kui jõuti järeldusele, et kõik *Crenarchaeota* esindajad pole ekstremofiilid (eelistavad äärmuslikke keskkondi, nt madal või kõrge temperatuur, äärmuslik pH, väga soolane keskkond jne). Kõik hõimkonna avastatud esindajad saavad energiat ammooniumi oksüdeerimisest ning neid leidub suurel hulgal mere- ja magevees, lisaks mullas, setetes ning ekstreemsetes elupaikades nagu kuumaveeallikad (Oren 2010; Offre *et al.*, 2013).

Nanoarchaeota hõimkonnal on seni üks teadaolev liige, mis on sümbioosis *Euryarchaeota* hõimkonnast pärit *Thermococcusega*. 16S rRNA analüüsil selgus, et muude hõimkondade hulka avastus kindlasti ei kuulu, kuid fülogeneetiline paiknevus ei ole sellegipoolest kindel. Vastavaid 16S rRNA järjestusi on leitud kõrgtemperatuurilistest biotoopidest, kuid ka mesofiilsetest (eelistavad kasvamiseks mõõdukat temperatuuri, umbes 15 – 40°C) ja halofiilsetest keskkondadest (Oren 2010).

Hiljuti on 16S rRNA andmestiku põhjal leitud veel *Korarchaeota* hõimkond, mida on esinenud kuumaveeallikates ning mille täpsema klassifikatsiooni kohta ei ole veel infot (Oren 2010).

Tehismärgalapuhastitest on praeguseks võrdlemisi vähe mikroobide, eriti arhede arvukusi ja mitmekesisust käsitlevaid uuringuid.

Baptista *et al.*, 2008 uuris mikroobikooslusi kahe horisontaalfiltriga laborikatses geel-elektroforeesi meetodil ning leidis mõlemas filtris nii arhesid, baktereid, kui sulfaadi redutseerijaid.

Adrados *et al.*, 2014 uuris Taanis majapidamistes tekkiva reovee puhastamiseks kasutatavate horisontaal-, vertikaal- ja biofiltrite mikroobikooslusi PCR ning geel- elektroforeesi meetodeil. Kõigis süsteemides leiti selgelt erinevad kooslused, arhede arvukus jäi bakterite

arvukusele kõigis katsetes alla ning jõuti järeldusele, et mikroobikoosluse täpsem koosseis oleneb hapniku sisaldusest ning orgaanilise aine juurdevoolust.

Bouali *et al.*, 2012 uuris arhesid horisontaalfiltris, kasutades 16S rRNA klooniraamatukogusid. Leitud järjestusi analüüsides leiti, et 96,2% kooslusest kuulub *Thaumarchaeota* hõimkonda ning 3,7% olid klassifitseerimata arhed. Tulemustest selgus ka, et nitrifitseerijatele mikroobidele võivad risosfääris sobida mikroaeroofiilsed tingimused ning filtri põhja ning risosfääri ümbruse arhede kooslused erinevad üksteisest selgelt.

Atreyee *et al.*, 2012 uuris ammooniumi oksüdeerivaid arhesid ja baktereid tehismärgalapuhastis qPCR (kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni) meetodil *AmoA* gene detekteerides. Kaheaastase katseperioodi vältel olid arhede arvukused igal aastaajal üldiselt kõrgemad kui bakterite arvukused.

1.2.3 Meetodid mikroobikoosluste uurimiseks

Ajalooliselt on mikroobid analüüsimiseks isoleeritud laboris söötmele puhaskultuuri. Selline lähenemine tekitas ökosüsteemide mitmekesisusest kitsa maailmapildi, kuna vaid umbes 5% või vähem ökosüsteemis olevatest mikroobidest on tavaliste kultiveerimistehnikatega laboris kasvatatavad. Teadlased on mikroobide tõelisele arvukusele lähemale jõudnud tänu sekveneerimistehnoloogiate hiljutisele arengule, mis on võimaldanud mikroobikooslusi sügavuti uurida, määrates väiksemate kuludega suure hulga järjestusi (Zarraonaindia *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2013).

1.2.3.1 Kvantitatiiv-PCR

Kvantitatiiv-PCR (qPCR – *quantitative* PCR) on lihtne, korratav ja tundlik meetod, mida kasutatakse mikrobiökoloogias keskkonnast taksonoomiliste ja funktsionaalsete geenimarkerite leidmiseks ja kvantifitseerimiseks ning mis aitab mõista mikroobikoosluste keerukust (Smith & Osborn 2008).

Teoreetiliselt on qPCR-iga võimalik otsida ükskõik, millist järjestust. Usaldusväärseks analüüsiks on oluline kasutada võimalikult kvaliteetseid praimereid ja fluorestseeruvaid ühendeid (Kim *et al.*, 2013). Sihtmärgi spetsiifilisuse määravad kasutatavad praimerid, mille abil saab kvantifitseerida taksonoomiliste ja funktsionaalsete geenide hulka hõimkonna või

isegi liigi ja fülotüübi tasemel. QPCR võimaldab jälgida ampliconide arvukuse kasvu reaalsajas ning mõõdab fluorestsentsi intensiivsust pärast iga tsükli lõppu. Amplikatsioonikõverate abil saab hiljem hinnata algse märklaudgeeni koguse proovis (Smith & Osborn 2008).

Tihedamini kasutatakse kaht fluorestseeruvat ühendit: mittespetsiifiliselt seonduvat värvi nagu SYBR Green või järjestusspetsiifilisi proove, nt Taqman. Kaheahelalise DNA-ga seostuv SYBR green hakkab pärast valgusega ergastamist fluorestsentsignaali kiirgama ning kuna ampliconide arv kasvab pärast iga PCR tsükli, suureneb ka fluorestsents (Smith & Osborn 2008).

1.2.3.2 Metagenoomika

Metagenoomika uurib kogu keskkonnast pärit DNA-d ning on alates mõiste kasutuselevõtmisest 1998. aastal olnud mikroobiökoloogia üks põhilisi uurimismeetodeid. Metagenoomne info aitab põhjalikumalt mõista uuritavas ökosüsteemis elavate mikroobide ökoloogilist rolli, metabolismi ja evolutsioonilist ajalugu, analüüsides DNA-d otse eelneva mikroorganismide kultiveerimiseta (Kim *et al.*, 2013).

Metagenoomikal põhinevad uuringud püüavad kirjeldada mikroobikooslust, kasutades taksonoomilisi markereid/tunnuseid nagu 16S rRNA (ampliconipõhine metagenoomika) või juhuslikke *shotgun* järjestusmeetodeid (kogu genoomi fragmenteerimine juhuslikeks kindla pikkusega lõikudeks ja nende nukleotiidide või aminohapete järjestuste kindlaksmääramine). Sihtmärk/ampliconipõhine-metagenoomika uurib huvipakkuvaid geene või genoomipiirkondi sihtmärk-meetoditel (aktiivsus- ja järjestusepõhised meetodid). Ampliconipõhine metagenoomika tähendab enamasti keskkonnast pärit genoomse DNA PCR meetodil amplifitseeritud kindlate genoomipiirkondade järjestamist. Mikroobiliikide identifitseerimiseks on taksonoomiliste markerite/tunnustena kasutatud ribosomaalse RNA geene. Kõrgkonserveerunud ning muutlike regioonide omadused võimaldavad täpset mikroorganismide taksonoomilist identifitseerimist ning on lihtsustanud praimerite loomist huvipakkuvate liikide jaoks (Zarraonaindia *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2013).

Shotgun-metagenoomika jaguneb kaheks tehniliselt erinevaks rühmaks. Esimene kasutab kloonimisel põhinevat lähenemist, mis kasutab vektoreid nagu fosmiidid (bakteriaalne unikaalne tsirkulaarne DNA vektor, mis suudab iseseisvalt paljuneda), kosmiidid

(bakteriaalne korduv autoreplikatsiooni võimega DNA vektor), bakteriaalsed kunstlikud kromosoomid (BAC – *bacterial artificial chromosomes*), mis sobivad pikkade järjestustega/pikkade sisenditega (10-100 kiloaluspaari) raamatukogude kloonimiseks või plasmiidvektorid lühikeste sisenditega (kuni 5 kiloaluspaari) raamatukogude jaoks (Zarraonaindia *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2013).

Otsese lähenemisega järgmise põlvkonna järjestamise (NGS – *Next-Generation Sequencing*) tehnoloogiad on DNA eraldamiseks paremad kui traditsioonilised kloonimisstrateegiad ning tuginevad hoopis DNA fragmentatsioonile ja eraldamisele erinevate ligatsiooni meetoditega (Gilbert & Dupont 2011).

NGS tehnoloogiate jätkuva edenemise tõttu on DNA raamatukogude sekveneerimine tähelepanuväärselt kiirem ja odavam. Praegune *shotgun*-metagenoomika tippsaavutus on terve bakteriaalsete ja arhede genoomide rekonstruktsioon eelteadmisteta neist organismidest (või nende genoomi järjestusest), kasutades algoritme, mis ühendavad lühikesed kattuvad sekveneeritud DNA fragmendid pikemateks katkestuseta järjestusteks (Zarraonaindia *et al.*, 2012).

1.2.4 Mikroobikooslust mõjutavad mikroreoained tehismärgalapuhastis

1.2.4.1 Mikroreoained

Tehismärgalapuhastid on osutunud efektiivseks erinevate heit- ning reovete puhastamisel. Ravimijääkide reoveest eemaldamine on üsna uus valdkond. Kuna ravimeid kasutatakse ülemaailmselt suhteliselt suurtes kogustes, satuvad need ka vesikeskkonda. Enamasti on ravimijäägid pärit kodusest heitveest, kuid oluline hulk pärineb ka haiglatest. Vesikeskkonnas muutuvad ravimid ning nende ainevahetuse produktid vee-elustikule potentsiaalseks riskiks (Li *et al.*, 2014).

Antibiootikumid võivad häirida veepuhastussüsteemide mikroobikooslust, mis võib vähendada orgaanilise aine lagundamise intensiivsust. Ka nitrifikatsiooni teine etapp, nitriti oksüdeerimine nitraadiks on antibiootikumidele tundlik ning protsessi häirimine võib põhjustada toksiliste nitraatide kuhjumist tehismärgalapuhastis väljavoolus (Kümmerer 2009).

1.2.4.2 Sünteetilised nanoosakesed

Nanoosakesed on suurusjärgus 1-100 nm ning võivad koosneda paljudest alusmaterjalidest, näiteks süsinik, silikoon ja metallid (kuld, kaadmium, seleen) (Farré *et al.*, 2009). Sünteetiliste nanomaterjalide laieneva kasutamisega satuvad nanoosakesed veepuhastite väljavoolu kaudu paratamatult ka looduslikesse vesikeskkondadesse. Seal hakkavad need tõenäoliselt mõjutama veepindu ja elusorganisme ning moodustama agregate (Hou *et al.*, 2012).

Tehismärgalapuhastites olevate mikroorganismide puhul on oht, et nanoosakesed kinnituvad mikroobide rakuseintele või mikroobidega seotud rakuvälisele substraadile. Sellise biokile moodustumine võib kahjustada ainevahetuse protsesse, näiteks võib raku suhtlus ümbritseva keskkonnaga olla häiritud. Lisaks võivad nanoosakesed ummistada biofilmi membraane, mis suurendab vedeliku voolamisest põhjustatud pingeid. Nanomaterjalide saaste juures tuleb lisaks osakeste enda toksilisusele arvestada ka koosmõju teiste reoainetega, näiteks inhibeerivad nanoosakesed nitrifikatsiooniprotsessi (Zheng *et al.*, 2011, Brar *et al.*, 2010).

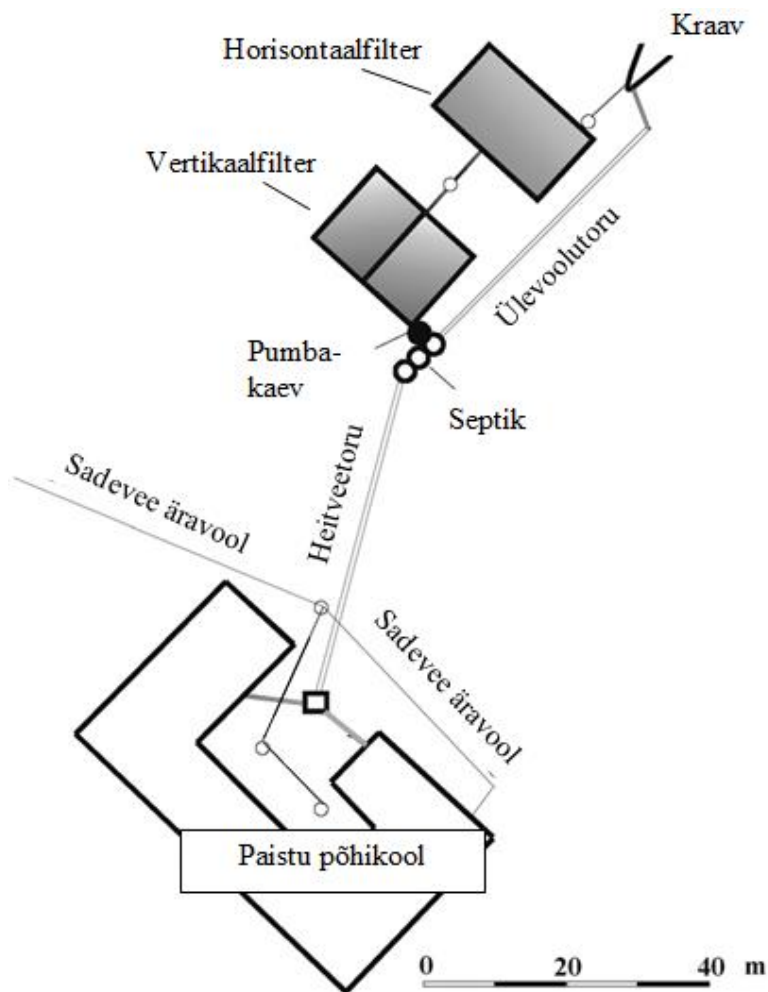
2. Materjal ja metoodika

2.1 Prooviala kirjeldus

Paistu põhikooli hübriidne ehk kombineeritud tehismärgalapuhasti asub Sultsi külas Paistu vallas Viljandimaal. Puhasti kogupindala on 432 m² ning see koosneb kahekambrilisest vertikaalfiltrist (2x108 m²) ja 216 m² horisontaalfiltrist (joonis 1) (Mander *et al.*, 2007). Pinnasfiltersüsteemi projekteeris OÜ Bionext dr. Tõnu Muringu juhendamisel ning see ehitati 2002. aastal. 2012/2013 õppeaastal puhastas see 148 inimese (Koger 2013) reovett, mis annab kirjanduse andmetel (Kuusik, 1995) reostuskoormuseks ca 59 ie (inimekvivalent ehk ühe inimese põhjustatud keskmine ööpäevane reostuskoormus), ja 5,9 m³/d suuruse vooluhulga (OÜ Bionext 2002).

Vertikaalfiltrites on filterkangal 0,5 m Fibro kruusa ning selle peal 0,3 m peenema kruusa kiht, mis suurendab hapnikutransporti filtrisse. Filter on kaetud filterkanga, 0,2 m mullakihi ning muruga, et vältida talvisel perioodil külmumisohtu. Horisontaalfilter sügavusega 0,9 m ja ruumalaga 172 m³ on täidetud peenema kergkruusaga ning algselt kaetud pillirooga (*Phragmites australis*). Mõlemad pinnasfiltrid on ümbritsevast pinnasest ning teineteisest eraldatud geomembraaniga, mis takistab vee sattumist süsteemi ja vastupidi.

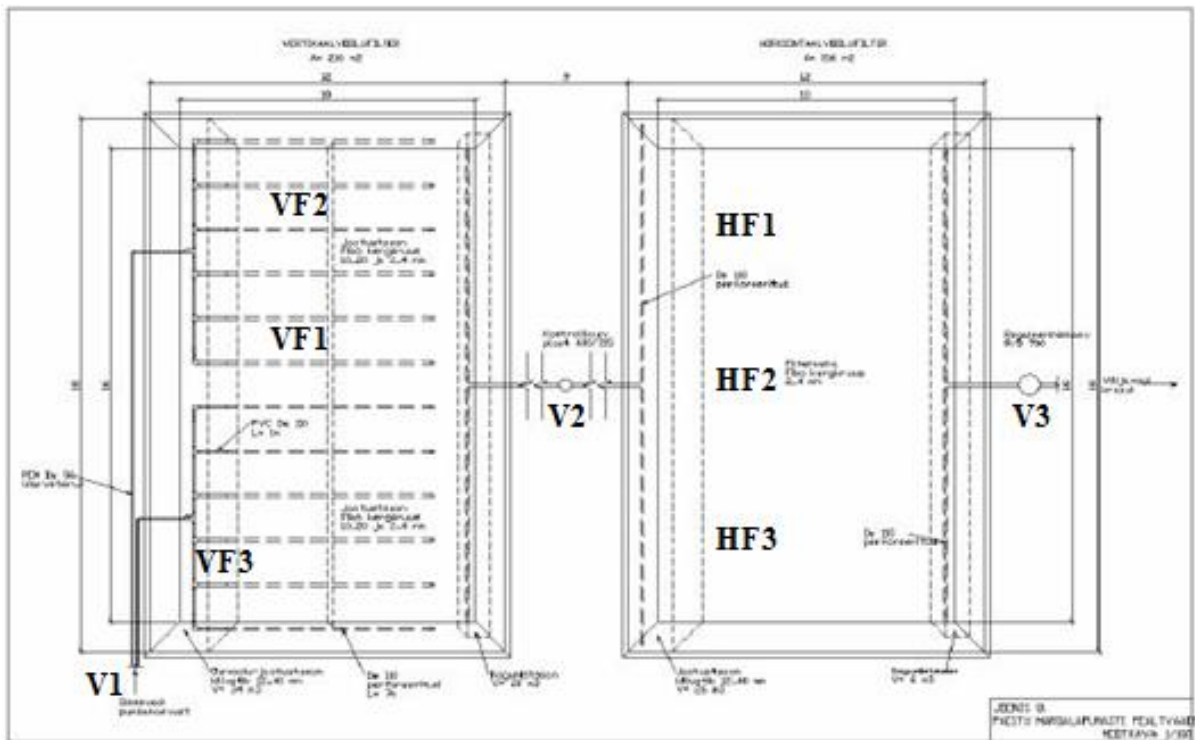
Reovesi puhastatakse esmalt mehaaniliselt rasvapüüdjas jõudlusega 1 l/s ning seejärel septikus mahuga 22 m³ (Koger 2013; Tooming 2005). Edasi pumbatakse vesi kaheosalisse vertikaalfiltrisse, mille peenraid koormatakse kordamööda, ning seejärel läbi kontrollkaevu horisontaalfiltrisse. Sealt juhitakse vesi läbi kontrollkaevu väljavoolukraavi, kust puhastatud reovesi imendub pinnasesse.



Joonis 1. Viljandimaa, Paistus asuva kombineeritud tehismärgalapuhasti skeem (Mander 2007).

2.2 Vee- ja filtermaterjali proovide kogumine ning puhastusefektiivsuse arvutamine

Reovee ja filtermaterjali proovid koguti 7. detsembril 2012 (töö autor ei osalenud proovivõtul). Veeproove võeti tehismärgalapuhasti sissevoolukaevust, vertikaal- ja horisontaalfiltri vahelisest kaevust ning väljavoolukaevust (tähistatud vastavalt V1, V2, V3). Kolm filtriproovi koguti vertikaalfiltri (tähistatud VF1, VF2, VF3) aktiivsest kihist sügavusel 0-10 cm ja kolm proovi horisontaalfiltrist (tähistatud HF1, HF2, HF3) vahemikust 40-50 cm, kasutades mullapuuri (joonis 2). Proove säilitati edasiste analüüsideni temperatuuril -20°C.



Joonis 2. Paistu põhikooli taimestik-pinnafilter pealtvaates (Tooming 2005) ning proovivõtu punktid. Veeproovid: V1 – sissevool vertikaalfiltrisse, V2 – vahekaev kahe filtri vahel, V3 – väljavool horisontaalfiltrist. Filtriproovid: VF1 – VF3 vertikaalfiltrist, HF1 – HF3 horisontaalfiltrist.

Veeproovidest määrati akrediteeritud Eesti Keskkonnauuringute Keskuse Tartu laboris pH, hõljuvaine, biokeemiline hapnikutarve (BHT_7), keemiline hapnikutarve (KHT_{Cr}) (dikromaatne), kaltsium (Ca^{2+}), magneesium (Mg^{2+}), ammoniumlämmastik (NH_4^+-N), nitraat ($NO_3^- -N$), nitrit ($NO_2^- -N$), üldlämmastik ($N_{\text{üld}}$), fosfaat ($PO_4^{3-} -P$), üldfosfor ($P_{\text{üld}}$), sulfaat (SO_4^{2-}), raud (Fe), üldorgaaniline süsinik (TOC), lahustunud orgaaniline süsinik (DOC) (Lisad Tabel 1).

Paistu tehismärgalapuhasti kohta esitatavad puhastusefektiivsused (PE, %) on leitud järgmise valemi abil:

$$\text{Puhastusefektiivsus} = \frac{C_{\text{sisse}} - C_{\text{välja}}}{C_{\text{sisse}}} \times 100 \quad (1);$$

kus,

- C_{sisse} – sissevoolu keskmine väärtus ($mg\ l^{-1}$);
- $C_{\text{välja}}$ – väljavoolus mõõdetud tulemuste keskmine väärtus ($mg\ l^{-1}$).

2.3 DNA eraldamine filtermaterjali proovidest

Filtermaterjali mikroobikoosluse DNA eraldati 10 g eelnevalt uhmerdatud filtermaterjalist, kasutades *PowerMax Soil Kit*-i (MoBio Laboratories, California, USA) vastavalt tootja protokollile. Eraldatud DNA puhastati ja kontsentreeriti, kasutades 5M NaCl ja 100% etanooli ning resuspendeeriti 80µl 10 mM Tris puhvriga. Kõikidest filtermaterjali proovidest eraldati DNA kahes korduses ja edaspidistes analüüsides kasutati DNA koondproove.

Veeproovide mikroobikoosluse DNA eraldati 50 ml veeproovi tsentrifuugimisel (15 min 4000 rpm) saadud biomassist. DNA eraldati *PowerSoil DNA Isolation Kit*-iga (MoBio Laboratories, California, USA) järgides tootjapoolset juhendit, välja arvatud rakkude lüüsimise etapp, milles kasutati vorteksi töötluse asemel Precellys® 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa) kiirusega 5000 rpm 20 s vältel.

DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks ja kvaliteedi hindamiseks kasutati spektrofotomeetrit Infinite 200M (Tecan AG, Austria).

2.4 Geenikoopiate arvu leidmine qPCR meetodil

Kvantitatiivseks polümeraasi ahelreaktsiooniks (qPCR) kasutati termotsüklerit Rotor Gene® Q (QIAGEN Group, CA, USA). Arhede 16S rRNA geenifragmenti sisaldavast standardlahusest valmistatud lahustereast (kümnekordsed lahjendused 10^3 - 10^9 geenikoopiat mikrolitris) tehti kaliiberkõver. Järgnev proovide analüüs toimus sarnastes reaktsioonitingimustes ning sama qPCR programmiga. Antud töös kasutati kaliibri lahjendust 10^6 geenikoopiat/µl.

PCR-i reaktsioonisegu maht oli 10µl ning see sisaldas 3,4 µl vett, 0,3 µl Arc519F praimerit (järjestus 5' – 3' CAGYCGCCRCGGTAA [Espenberg 2013]), 0,3µl arc910R praimerit (järjestus 5' – 3' GAATWGGCGGGGGRGC [Espenberg 2013]), 5 µl SYBR Green segu ja 1 µl uuritava proovi DNA-d.

16S rDNA amplifikatsiooni programmi parameetrid: kõigepealt 50°C 2 minutit, seejärel esmane denaturatsioon 95°C 10 minutit, millele järgnes 45 tsüklit 95°C 15 sekundit denaturatsiooni, 56°C 30 sekundit seondumise, 72°C 30 sekundit ekstensiooni etappidega ning programmi lõpuks ahelate sulatamise etapp 65-95°C (tõsteti 0,35°C kaupa). Kõiki proove ja kaliiberlahuseid mõõdeti kolmes korduses ning lisaks tehti negatiivne kontroll.

2.5 qPCR andmete kvaliteedi analüüs ja grupeerumine

Pärast qPCR protsessi analüüsiti iga proovi amplifikatsiooni efektiivsusi programmiga LinRegPCR 2014.0, mille tulemusi analüüsides eemaldati võõrväärtused. Lisaks analüüsiti qPCR tulemusi programmidega Microsoft Office Excel 2010 ning STATISTICA V 7.1. Mõne prooviga testides valiti välja standardi lahjenduste vahemik, kus proovi paralleelide arvukuse standardhälvete summa oleks vähim ehk proovi paralleelide vahel esineb väikseim hajuvus. Prooviti ka proovide rühmitamist amplifikatsiooniefektiivsuse põhjal, kuid need ei osutunud ANOVA *post hoc* testi Unequal N HSD järgi vajalikuks.

Pinnase- ja veeproovide arhede 16S rRNA geenikoopiate arvude arvutamiseks kasutati Ruijter et al. (2009) artiklil põhinevat valemit (2) proovi (A) ja iga kümnekordse standardi lahjenduse (B) vahelise erinevuste hinnangu (FD) leidmiseks:

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

kus N_0 on A ja B amplikonide algkontsentratsioon (fluorestsentsi ühikutes), E on amplifikatsiooni efektiivsus, N_t on fluorestsentsi lävi joone väärtused ja C_t on tsükli lävi ehk vajalik tsükli arv saavutamaks fluorestsentsi lävi joone väärtust. Arhede 16S rRNA geenikoopiate arvu leidmiseks korrutati iga leitud FD väärtus vastava standardilahjenduse (10^7 - 10^5) geenikoopiate arvuga ning lõplik geenikoopiate arv iga proovi jaoks saadi kolme arvukuse aritmeetilise keskmise arvutamise järel, mis esitati geenikoopiate arvuna 1 g kuivaine kohta ning veeproovide puhul geenikoopia arvuna 1 ml vee kohta.

2.6 DNA raamatukogu valmistamine ja sekveneerimine

Vertikaal- ja horisontaalfiltri filtermaterjali mikroobikoosluse DNA sekveneerimiseks kasutati mõlema filtri kolmest DNA proovist moodustatud koondproove. DNA raamatukogud valmistati Tartu Ülikooli Eesti geenivaramus kasutades *TruSeq DNA Sample Prep Kit*-i (Illumina, California, USA) vastavalt tootjapoolsele juhendile. Sekveneerimine viidi läbi Illumina MiSeq platvormil.

2.7 Järjestusandmete analüüs

Illumina sekvenerijast saadud paarisjärjestused assambleeriti Pear v 0.9.1 (Zhang *et al.*, 2013) kasutades. Kvaliteedikontrollis eemaldati alla 100 aluspaari pikkused, 10 ja enam pikkade homopolümeeridega ning määramata nukleotiididega järjestused tarkvaraga Mothur v 1.32 (Schloss *et al.*, 2009). Kontrolli läbinud järjestustest määrati arhede taksonoomiline profiil, kasutades markergeenide tuvastamisel põhinevat tarkvara Amphora v 2 (Wu & Scott 2012). Edasisel analüüsil vaadeldi arhede rühmi, mille usalduspiir jäi üle 80%.

3. Tulemused

3.1 Vee- ja filtriproovide keemilised näitajad

Paistu tehismärgalapuhasti veeproovide keemilise analüüsi põhjal arvutatud puhastusefektiivsus protsentides hõljuvaine, BHT, KHT, Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{N}_{\text{üld}}$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, $\text{P}_{\text{üld}}$, SO_4^{2-} , Fe, TOC ja DOC puhul on esitatud tabelis 1. Puhastusefektiivsuste arvutamisel on kasutatud valemit 1.

Veeproovide analüüsi tulemustest selgub, et süsteem on olnud üsna tõhus: lõplik pH oli 7,7, hõljuvaine lõplik sisaldus oli 21 mg/l ning puhastusefektiivsus 74,7% ning KHT puhastusefektiivsus >80%. Lisaks oli BHT_7 puhastusefektiivsus 96,36%, üldlämmastiku puhul 80% ja üldfosfori osas 41,51%. Vertikaalfiltri sissevoolust võetud veeproovi üldfosfori sisaldus oli 5,3 mg/l, vahekaevust võetud proovis 3,1 mg/l ning horisontaalfiltri väljavoolust kogutud proovis 3,1 mg/l.

Tabel 1. Eesti Keskkonnauuringute Keskuse Tartu laboris määratud veeproovide keemiliste näitajate põhjal arvutatud puhastusefektiivsused.

Näitaja	Vertikaalfiltri sissevool	Puhastusefektiivsus %
pH	7,5	Δ 0,2
Hõljuvaine (mg/l)	83	74,70
BHT_7 (mg/l)	140	96,36
KHT_{Cr} (mg/l)	250	>80,00
$\text{NH}_4^+\text{-N}$ (mgN/l)	64,0	78,13
$\text{NO}_3^-\text{-N}$ (mgN/l)	< 0,02	>99,00
$\text{NO}_2^-\text{-N}$ (mgN/l)	0,040*	84,50
$\text{N}_{\text{üld}}$ (mg/l)	75	80,00
$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (mgP/l)	5,2	42,31
$\text{P}_{\text{üld}}$ (mg/l)	5,3	41,51
TOC (mg/l)	79	92,78
DOC (mgC/l)	49	88,78

* - Mõõdetud vahekaevust

Tehismärgalapuhasti vertikaal- ja horisontaalvoolufiltritest määratud kuivaine, lämmastiku, fosfori ja süsiniku kogused on esitatud tabelis 2.

Tabel 2. Filtriproovidest määratud keemilised näitajad. VF – vertikaalfiltri proov, HF – horisontaalfiltri proov.

Proovi kood	Kuivained (g/kg)	N (mg/kg)	P (mg/kg)	C (%)
VF1	663	380	260	<1
VF2	616	590	250	<1
VF3	532	990	580	<1
HF1	536	460	460	<1
HF2	552	330	350	<1
HF3	554	510	490	<1

3.2 Arhede üldarvukus

Arhede üldarvukust kirjeldab tabel 3, milles on esitatud arhede geenikoopiate arv 1 g filtriproovi kuivaine ning 1 ml veeproovi kohta. qPCR tulemuste analüüsi põhjal on vertikaalfiltri arhede keskmine arvukus 2,5 korda kõrgem kui horisontaalfiltris, kus kõigi proovide tulemused jäävad samasse suurusjärku vahemikus $5,88 \cdot 10^7$ (HF2) kuni $9,11 \cdot 10^7$ (HF1). Vertikaalfiltri arvukused on aga võrdlemisi kõikuvad vahemikus $6,55 \cdot 10^6$ (VF1) kuni $5,13 \cdot 10^8$ (VF3).

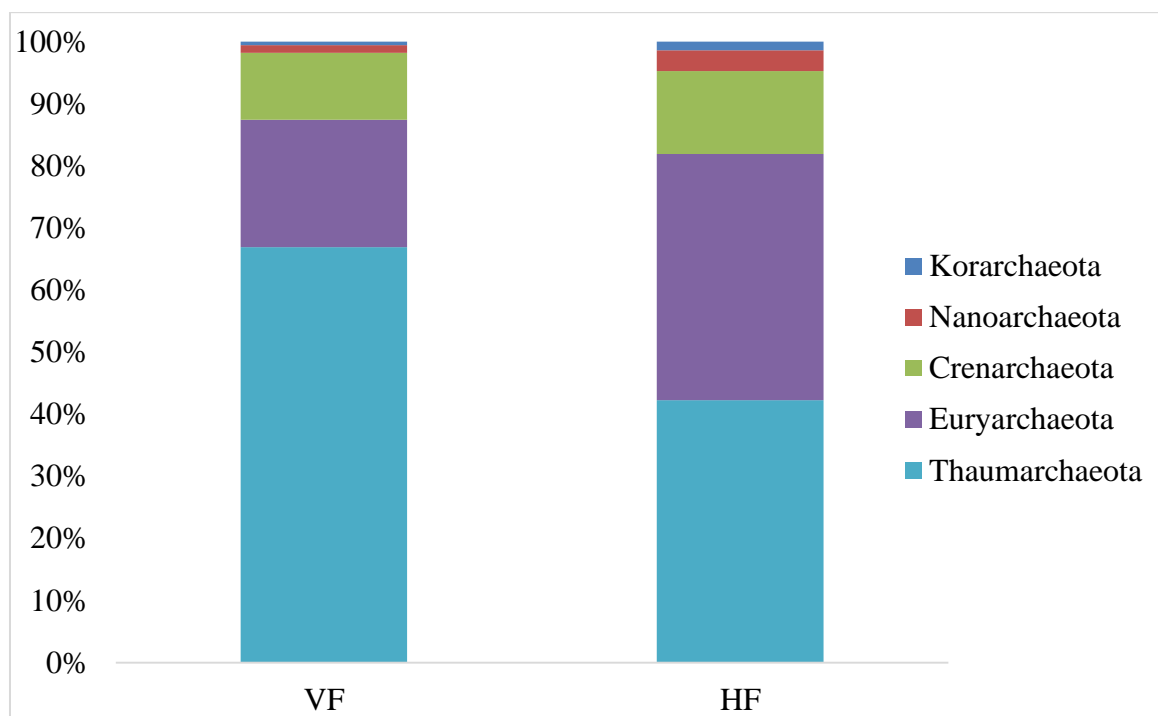
Tabel 3. Geenikoopiate arvud filtermaterjalis ja veeproovides. VF – vertikaalfiltri proov, HF – horisontaalfiltri proov, V – veeproov.

Filtri proovid	Geenikoopiate arv 1 g kuivaine kohta
VF1	$6,55 \cdot 10^6$
VF2	$1,17 \cdot 10^7$
VF3	$5,13 \cdot 10^8$
HF1	$9,11 \cdot 10^7$
HF2	$5,88 \cdot 10^7$
HF3	$6,23 \cdot 10^7$

Veeproovid	Geenikoopiate arv 1 ml vee kohta
V1	$2,47 \cdot 10^5$
V2	$4,32 \cdot 10^4$
V3	$1,62 \cdot 10^5$

3.3 Arhede liigiline koosseis pinnasfiltrites

Esialgse kvaliteedikontrolli käigus jäeti välja tulemused, mille usalduspiir jäi alla 80%, ning seega eemaldati kuni 12% järjestustest. Joonisel 3 on esitatud arhede hõimkondade jaotus vertikaal- ja horisontaalfiltris.



Joonis 3. Arhede hõimkondade jaotus vertikaal (VF)- ja horisontaalfiltris (HF).

Thaumarchaeota hõimkonna osakaal horisontaalfiltris on ainsana väiksem vertikaalvoolufiltri osakaalust: 1,6 korda. Horisontaalfiltri arvukus ületab 1,9 korda vertikaalfiltri arvukust *Euryarchaeota* ning 1,2 korda *Crenarchaeota* hõimkonna puhul. Samuti on vähem uuritud hõimkondadega *Korarchaeota* ning *Nanoarchaeota*, mille osakaalud horisontaalfiltris on vastavalt 2,5 ning 2,6 korda suuremad.

Arhede klasside protsentuaalne jaotus vertikaal- ja horisontaalfiltris on ära toodud tabelis 4.

Vertikaalfiltri proovides leidus rohkem arhesid klassidest *Nitrosopumilales* ning *Thermoprotei*. Horisontaalfiltri proovides leidus teistest enam klasse *Thermoprotei*, *Nitrosopumilales* ning *Methanomicrobia*. Võrdluses vertikaalfiltriga on metanogeenide osakaal horisontaalfiltris 5 korda suurem. Samuti kasvab horisontaalfiltris anaeroobset keskkonda eelistava *Thermoprotei* osakaal. Küll aga on horisontaalfiltris väiksem nitrifikatsioonis osalevate ammooniumi oksüdeerivate arhede (*Nitrosopumilales*) osakaal, mis väheneb umbes kaks korda.

Tabel 4. Arhede klasside jaotus vertikaal (VF)- ja horisontaalfiltris (HF).

Klass	VF järjestuste arv	VF osakaal	HF järjestuste arv	HF osakaal
<i>Aciduliprofundum</i>	2	0,15%	26	0,59%
<i>Archaeoglobi</i>	10	0,73%	56	1,28%
<i>Candidatus Korarchaeum</i>	12	0,88%	88	2,01%
<i>Cenarchaeales</i>	24	1,75%	49	1,12%
<i>Halobacteria</i>	8	0,58%	51	1,16%
<i>Methanobacteria</i>	69	5,03%	187	4,26%
<i>Methanococci</i>	50	3,65%	203	4,63%
<i>Methanomicrobia</i>	63	4,60%	1133	25,82%
<i>Methanopyri</i>	19	1,39%	63	1,44%
<i>Nanoarchaeum</i>	27	1,97%	206	4,69%
<i>Nitrosopumilales</i>	830	60,54%	1362	31,04%
<i>Thermococci</i>	11	0,80%	49	1,12%
<i>Thermoplasmata</i>	18	1,31%	86	1,96%
<i>Thermoprotei</i>	228	16,63%	829	18,89%

4. Arutelu

4.1 Puhastusefektiivsus

Kõik Paistu süsteemi vertikaalfiltri heitvee proovide näitajad (tabel 1), mis on toodud välja määruse „Reovee puhastamise ning heit- ja sademevee suublasse juhtimise kohta esitatavad nõuded, heit- ja sademevee reostusnäitajate piirmäärad ning nende nõuete täitmise kontrollimise meetmed“ lisa 1-s (RT I, 13.06.2013, 13), jäävad alla riiklikke piirnorme (v.a. pH) <300 ie puhasti jaoks. Proovid ei ületa heitvee reostusnäitajate piirnormi horisontaalfiltri väljavoolus ning puhastusefektiivsus on piisav olnud juba pärast viibeaga vertikaalfiltris, kuna ka vahekaevust võetud veeproovi analüüsi tulemused jäävad alla piirnormide.

Eespool mainitud Riigi Teataja määruises toodud parameetrite puhastusefektiivsus oli üsna heal tasemel. pH oli ka enne filtrite läbimist normi piires ning muutus üsna minimaalselt. Lisaks jäi lubatud pH vahemikku 6–9 horisontaalfiltri sissevoolust ning vertikaalfiltri väljavoolust võetud proovide pH, mille väärtus oli 7,7. Vahekaevust võetud proovi hõljuvaine sisaldus oli 17 mg/l, mis oli kaks korda väiksem piirnormist 35 mg/l.

Orgaanilise aine tase <50 mg/l jäi 3 korda väiksemaks piirnormist ning süsteemi puhastusefektiivsus saadi arvutamisel >80%. Nii üldorgaanilise süsiniku kui lahustunud süsiniku koguhulgad vähenesid peamiselt vertikaalfiltris.

Üldlämmastik vähenes 75 mg/l-lt 15 mg/l-le ning selle puhastusefektiivsus oli 80%. Võrdluseks Bouali *et al.*, 2008 artiklis uuritud horisontaalfiltri üldlämmastiku vähenemine oli 78%, mis on Paistu tulemustega üsna sarnane. Nitraatlämmastiku suurenemine vertikaal- ja horisontaalfiltri vahekaevus näitab, et vertikaalfiltris toimus nitrifikatsioon, kus mikroobid muudavad ammooniumi nitritiks ja seejärel nitraadiks. Horisontaalfiltris toimub anaeroobsetes tingimustes denitrifikatsioon, mida näitab nitraatlämmastiku vähenemine.

Vertikaalfiltri proovidest määratud suuremad lämmastiku kogused on põhjustatud reovee kõrgest lämmastikuisaldusest, horisontaalfiltris väheneb lämmastiku kogus seal aset leidva denitrifikatsiooni tõttu.

Üldfosfori puhastusefektiivsus oli vaid 41,51%. Käesolevast tööst ning lisaks Kogeri (2013) ja Toomingu (2005) magistritöödest on näha, et horisontaalfiltri fosforiärastusvõime on aastatega üha vähenenud ning selle põhjus on tõenäoliselt filtermaterjali fosforiga küllastus.

Fosfori kogused filtriproovides erinevad üle 2 korra, mis on samuti tõenäoliselt tingitud filtermaterjali osalisest fosforiga küllastatusest. Põhilised fosfori eemaldajad tehismärgalapuhastis on taimed, kuid kuna proovid on kogutud talvel, siis ei saa antud proovide juures taimestiku mõju arvestada. Ka filtermaterjalide proovidest on näha, et horisontaalfiltri proovide fosforisisaldus on kohati suuremgi kui vertikaalfiltri proovides.

4.2 Arhed

qPCR tulemuste analüüsi põhjal on vertikaalfiltri arhede keskmine arvukus 2,5 korda kõrgem kui horisontaalfiltris, kus kõigi proovide tulemused jäävad samasse suurusjärku. Vertikaalfiltri arvukused on aga võrdlemisi kõikuvad vahemikus $6,55 \cdot 10^6$ (VF1) kuni $5,13 \cdot 10^8$ (VF3). Vertikaalfiltri VF3 proovi tulemus on märgatavalt kõrgem ilmselt põhjusel, et proovivõtupunkt asub lähemal sissevoolule, kus on rohkem toitaineid ja seega mikroobidele soodsam elukeskkond. Baptista *et al.*, 2008 artikli laborikatses on arhede arvukus võrreldes bakteritega üsna kõrge: taimedega horisontaalfiltri bakterite arvukus $1.1 \cdot 10^6$ ning arhede oma $4.7 \cdot 10^5$, mis on lähedal Paistu filtriproovidest leitud arhede madalamatele arvukustele.

Thaumarchaeota hõimkonna osakaal horisontaalfiltris on väiksem kui vertikaalvoolufiltris, kuna hõimkonna arhed eelistavad aeroobset keskkonda. Neid on leitud hapnikurikastest keskkondadest ning eriti palju ookeani fotosünteesivast eufootilisest tsoonist, lisaks leidub neid oksilistes setetes, muldades ning neid on leitud ka kuumaveeallikatest (Offre *et al.*, 2013). Mullas ja hapnikurikastes setetes leidumise tõttu võib oletada, et hõimkonna arhed osalevad ka süsinikuringes. Kuna horisontaalfilter on suuremas osas anaeroobne, et seal saaks toimuda hapnikuvaba keskkonda vajavad protsessid, on seal vähem *Thaumarchaeota* hõimkonna esindajatele sobivaid elukeskkondi, mistõttu leidub neid õhustatavas vertikaalfiltris rohkem.

Samuti on vertikaalfiltris kõrgem nitrifikatsioonis osalevate ammooniumi oksüdeerivate arhede (*Nitrosopumilales*) osakaal. Ammooniumi oksüdeerijate puhul on tegu samuti *Thaumarchaeota* hõimkonna arhedega, mis eelistavad hapnikurikast keskkonda ning selliseid arhesid on leitud nii reoveepuhastusjaamadest, kui ka reoveepuhastuse juures olevatest bioreaktoritest (Das *et al.*, 2009). Ka Bouali *et al.*, 2008 uuris arhesid horisontaalfiltris ning analüüsil leiti, et 96,2% kooslusest kuulub *Thaumarchaeota* hõimkonda. Sellest järeldati, et

nitrifitseerijad mikroobid võivad ammooniumi oksüdeerimiseks eelistada mikroaerofiilset keskkonda.

Võrdluses vertikaalfiltriga on *Euryarchaeota* osakaal horisontaalfiltris 1,9 korda ning metanogeenide osakaal 5 korda suurem. *Euryarchaeota* hõimkonna arhede hulgas võib olla nii aeroobset kui anaeroobset keskkonda eelistavaid klasse (Offre *et al.*, 2013), mida näitab ka arvukas esinemine vertikaalfiltri proovides. Aeroobset keskkonda eelistab näiteks *Thermoplasmata*, anaeroobset *Archaeoglobi*, *Thermococci*, *Thermoplasmata* ja *Halobacteria*. *Euryarchaeota* hõimkond on ainus, mille hulgas on metanogeneesi läbi viivad anoksilist keskkonda eelistavad arhed (nt klassid *Metahopyri*, *Methanobacteria*, *Methanococci* ja *Methanomicrobiales*). Neile sobivam elukeskkond on horisontaalfiltris. Põhjus on metanogeenide lai levik anoksilistes elupaikades: neid on leitud geotermaalsetest, hüpersaliinsetest, ja leeliselistest keskkondadest, kuid lisaks ka oksilistest keskkondadest nagu aereeritud muld ja oksilised järveveed (Offre *et al.*, 2013). Seetõttu leidub metanogeneene ka vertikaalfiltris, kus on hapnikuga rikastatud keskkond. Nii üldorgaanilise süsiniku kui lahustunud süsiniku koguhulgad vähenevad peamiselt vertikaalfiltris, mille üheks põhjustajaks võivad olla *Euryarchaeota* hõimkonna aeroobset keskkonda eelistavad arhed.

Märkimisväärne on ka neljandiku horisontaalfiltri arhedest kuulumine *Methanomicrobia* klassi, mille arhed on seni teadaolevalt kõik metanotroofid (Offre *et al.*, 2013) ehk saavad energiat metaani anaeroobsest oksüdeerimisest. *Euryarchaeota* muid esindajaid on seni leitud leeliselistest, geotermaalsetest, hüpersaliinsetest keskkondadest ja meresügavustest (Offre *et al.*, 2013), kuid Paistu proovides leidumine vihjab ka levikule mesofiilsemas keskkonnas.

Horisontaalfiltri arvukus ületab vertikaalfiltri arvukust ka *Crenarchaeota* hõimkonna puhul. *Crenarchaeota* anaeroobseid tingimusi eelistavaid seltse *Sulfolobales*, *Desulfococcales* ja *Thermoproteales* on leitud leeliselistest, geotermaalsetest ja hüpersaliinsetest keskkondadest ning meresügavustest (Offre *et al.*, 2013). Erinevus tuleneb tõenäoliselt sellest, et koosluses on rohkem anaeroobset keskkonda eelistavaid arhesid, kuid jääb siiski üsna väikeseks, kuna osad *Crenarchaeota* hõimkonna arhed osalevad ammooniumi oksüdeerimises, milleks on vaja aeroobset keskkonda.

Samuti kasvab horisontaalfiltris anaeroobset keskkonda eelistava *Thermoprotei* osakaal. Kuigi *Thermoprotei* esindajaid on seni leitud ekstreemsetest keskkondadest nagu happelised kuumaveeallikad ja hüdrotermaalsed lõõrid (Offre *et al.*, 2013), leidis hõimkonna esindajaid ka analüüsitud Paistu proovides, mistõttu võib oletada, et *Thermoprotei* hõimkonna arhed

võivad ka mesofiilsetes keskkondades laiemalt levida. Samas võib nende leidumine olla küsitav, kuna määramine on komplitseeritud liigse sarnasuse tõttu teiste hõimkondadega.

Korarchaeota hõimkonna esindajate osakaal horisontaalfiltris on umbes 2,5 korda suurem kui vertikaalfiltris. *Korarchaeota* esindajaid on samuti leitud leeliselistest, geotermalsetest, hüpersaliinsetest keskkondadest ja meresügavustest (Offre *et al.*, 2013) ning nende esinemine Paistu proovides viitab levikule ka mesofiilsetes tingimustes.

Nanoarchaeota osakaal horisontaalfiltris on umbes 2,6 korda suurem. *Nanoarchaeota* täpsemate elupaikade kohta kirjanduses infot ei olnud, kuid tehismärgalapuhastis leidumise tõttu võib oletada, et muuhulgas sobivad *Nanoarchaeota* hõimkonna liikmete ka mesofiilsed tingimused.

Korarchaeota ning *Nanoarchaeota* hõimkondade osakaal Paistu filtrites on väga väike. Hetkel on nende täpse fülogeneetilise kuuluvuse osas erimeelsused ning tegu võib olla teiste hõimkondade alamhõimkondadega.

5. Kokkuvõte

Tehismärgalapuhasti arhede koosluse uurimine annab olulist infot nende seotusest aineringetega ning laiemat infot arhede võimalike avastamata elupaikade kohta. Senised tehismärgalapuhastites olevate arhede kohta tehtud uuringud on käsitletud mõnd konkreetset huvipakkuvat aineringet ning sellega seotud protsesse, arhede arvukuse võrdlust bakteritega või on leitud äärmiselt vähe hõimkondi.

Käesolevas bakalaureusetöös analüüsiti tehismärgalapuhasti puhastusefektiivsust ning arhede arvukust ja mitmekesisust molekulaarsetel meetoditel nagu qPCR ning metagenoomika. Praktilises osas kasutatud proovid koguti Viljandi maakonnas 2002. aastal rajatud Paistu põhikooli tehismärgalapuhastist.

Arhede arvukus horisontaal- ja vertikaalfiltrites on keskmiselt suurusjärgus 10^7 , olles vertikaalfiltris 2,5 korda suurem kui horisontaalfiltris. Määratud arhede hõimkondade puhul olid nii horisontaal- kui vertikaalfiltris domineerivad *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota* ning veidi vähem *Crenarchaeota*. Vähemal määral leidis *Korarchaeota* ning *Nanoarchaeota* hõimkonna arhesid. Mikroobikoosluse struktuuri ja puhastusefektiivsuse vahel on eelkõige seos orgaanilise aine ning lämmastikühendite ärastuse puhul. Vertikaalfiltri proovides domineerisid klassid *Nitrosopumilales* ning *Thermoprotei*. Horisontaalfiltri proovides leidis teistest enam klasse *Thermoprotei*, *Nitrosopumilales* ning *Methanomicrobia*. Klass *Nitrosopumilales* liigid osalevad lämmastikuringes ammooniumi oksüdeerijana. Klass *Thermoprotei* liigid võivad osaleda süsinikuringes ning samuti osaleb süsinikuringes klass *Methanomicrobia* liigid, kes on metanogeenid.

Paistu tehismärgalapuhasti kõikide parameetrite väärtused vastavad määruhes välja toodud kuni 300 ie suuruste reoveepuhastite veekvaliteedi nõuetele ning saadud tulemused kinnitasid tehismärgalapuhasti sobivust väikesemahuliseks veepuhastuseks.

Characterisation of the population and diversity of Archaea in Paistu hybrid constructed treatment wetland

Kadri Saare

Summary

Examining the community structure of archaea in constructed wetland gives important information about the archaea in biogeochemical cycles in these systems and provides general knowledge about possible undiscovered habitats. Previous studies about the archaea in constructed wetlands have targeted archaea in some particular geochemical cycle and the connected processes, numeral comparison of bacteria and archaea, or there has been very few phyla found.

This study examined the purification efficiency and the population and community structure of archaea in the hybrid constructed wetland in Paistu, Viljandi county, built in 2002.

The purification efficiency of the Paistu hybrid constructed wetland was analysed based in the following aspects: the change of the pH, chemical oxygen demand, suspended solids, biochemical oxygen demand and concentrations of total organic carbon, total phosphorus, and total nitrogen of the inlet and outlet of the constructed wetland.

The water and filter samples were also used to analyse the population and community structure of the archaea. The samples were afterwards analysed using molecular methods such as qPCR and metagenomics.

The analysis of the water samples showed that the purification level of the Paistu hybrid constructed wetlands is relatively efficient: the pH level was 7,7, the purification efficiency of suspended solids was 74,7%, COD >80%, BOD 96,36%, total nitrogen 80% and total phosphorus 41,51%, the latter efficiency being quite low. Overall the purification efficiencies of the Paistu hybrid constructed wetland corresponded to requirements, therefore the system is suitable for small-scale water purification.

The total quantity of archaea in the horizontal sub-surface and in the vertical flow systems was 10^7 on average, being 2.5 times higher in the latter. The dominant phyla both in the horizontal sub-surface flow and in the vertical flow systems were *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota* and *Crenarchaeota*. To a lesser extent *Korarchaeota* and *Nanoarchaeota*

phyla were also found. There is a particular connection between the microbial community structure and the purification of total organic carbon and total nitrogen. The dominating archaeal classes in the samples of the vertical flow system were *Nitrosopumilales* and *Thermoprotei* and for the horizontal subsurface flow *Thermoprotei*, *Nitrosopumilales* and *Methanomicrobia*. The *Nitrosopumilales* are involved in nitrogen cycle, the *Methanomicrobia* and the *Thermoprotei* are participating in carbon cycle.

Tänuõnad

Käesoleva bakalaureusetööga seotud kulutused on kaetud projektiga 3.2.0801.11-0026 „Ravimijäägid ja sünteetilised nanoosakesed reovees: mõju reoveepuhastusprotsessile ja ravimiresistentsuse geenide levikule keskkonnas“.

Soovin avaldada tänu kõigile, kes aitasid kaasa käesoleva bakalaureusetöö valmimisele.

Suured tänud keskkonnatehnoloogia doktorandile Teele Ligile ning professor Jaak Truule abistavate märkuste ja soovitude eest.

Eriti soovin tänada keskkonnatehnoloogia doktorante Kristjan Oopkaupi ja Mikk Espenbergi oskusliku juhendamise ning heatahtliku suhtumise eest.

Kasutatud kirjandus:

1. Adrados, B., Sánchez, O., Arias, C.A., Becares, E. Garrido, L. Mas, J., Brix, H. Morató, J. 2014. Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. *Water Research* 55, 304-312
2. Allers, T., Mevarech, M., 2005. Archaeal genetics - the third way. *Nature Reviews Genetics* 6, 58-73
3. Baptista, J. de C, Davenport, R. J., Donnelly, T., Curtis, T. P., 2008. The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. *Water Research* 42, 3182– 3190
4. Bouali, M., Zrafi-Nouira, I., Bakhrouf, A., Le Paslier, D., Chaussonnerie, S., Ammar, E., Sghir, A., 2012. The structure and spatio-temporal distribution of the Archaea in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Science of the Total Environment* 435–436, 465–471
5. Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Surampalli R.Y., 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. *Waste Management* 30, 504–520
6. Cavicchioli, R., 2011. Archaea — timeline of the third domain. *Nature Reviews Microbiology* 9, 51
7. Das, A., Dolan, E., M., Hu, Z., You, J. 2009 Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Research* 43, 1801–1809
8. Espenberg, M., 2013. Päiderooga kultiveerimise ja väetamise mõju mulla arhede kooslusele ja selle metaanootmise potentsiaalile mahajäetud freesturba tootmisalal. Magistritöö keskkonnatehnoloogias, TÜ Ökoloogia ja Maateaduste Instituut, Tartu
9. Farré, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., Barceló, D., 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 81–95
10. Faulwetter, J. L., Gagnon V., Sundberg C., Chazarenc, F., Burr, M. D., Brisson J., Camper A. K., Stein, O. R., 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering* 35, 987–1004
11. Fonder N., Headley T., 2013. The taxonomy of treatment wetlands: A proposed classification and nomenclature system. *Ecological Engineering* 51, 203-211

12. Gilbert, J. A., Dupont, C. L., 2011. Microbial metagenomics: beyond the genome. *Annual Review of Marine Science*, 3, 347-371
13. Hou, L., Li, K., Ding, Y., Li, Y., Chen, J., Wub, X., Li, X., 2012. Removal of silver nanoparticles in simulated wastewater treatment processes and its impact on COD and NH₄ reduction. *Chemosphere* 87, 248–252
14. Kim, J., Lim, J., Lee, C. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies, in wastewater treatment systems: Applications and considerations *Biotechnology Advances* 31, 1358-1373
15. Kim, M., Lee, K.-H., Yoon, S.-W., Kim, B.-S., Chun, J., Yi, H., 2013. Analytical Tools and Databases for Metagenomics in the Next-Generation Sequencing Era. *Genomics Informatics* 11, 102-113
16. Koger, H., 2013. *Kombineeritud tehismärgalapuhasti puhastusefektiivsus veetaseme muutmisel Paistu Kooli pinnasfiltri näitel*. Magistritöö keskkonnatehnoloogia erialal, TÜ Ökoloogia ja Maateaduste Instituut, Tartu
17. Kuusik, A., 1995. *Reoveeväikepuhastid Eestis*. Tallinna Tehnikaülikool, Keskkonnatehnika Instituut, Tallinn
18. Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75, 417–434
19. Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J., Tan, S.K., 2014. A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of the Total Environment* 468–469, 908–932
20. Liu, Z., 2013. Review on the role of terrestrial aquatic photosynthesis in the global carbon cycle. *Procedia Earth and Planetary Science* 7, 513 – 516
21. Mander, Ü., Tooming, A., Muring, T., Öövel, M., 2007. Performance dynamics of a LWA-filled hybrid constructed wetland in Estonia. *Ecohydrology & hydrobiology* 7, 297-302
22. Nicola, G. W., Schleper, C. 2006. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trend in Microbiology* 14, 207–212
23. Offre, P., Spang, A., Schleper, C., 2013. Archaea in Biogeochemical cycles. *Annual Review of Microbiology* 67, 437–57
24. Oren, A, 2010, Archaea. *Encyclopedia of Life Sciences*.
25. OÜ Bionext., 2002. *Paistu Põhikooli taimestik-pinnasfilter reoveepuhasti (tehniline projekt)*. Tartu

26. Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Weber, C. F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75, 7537-7541
27. Sims, A., Gajaraj, S., Hu, Z. 2012. Seasonal population changes of ammonia-oxidizing organisms and their relationship to water quality in a constructed wetland. *Ecological Engineering* 40, 100–107
28. Smith, C. J & Osborn, A. M, 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 67, 6–20
29. Zarraonaindia, I., Smith, D. P., Gilbert, J. A., 2012. Beyond the genome: community-level analysis of the microbial world. *Biology & Philosophy* 28, 261-282
30. Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A., 2013. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 593
31. Zheng, X., Wu, R., Chen, Y., 2011. Effects of ZnO Nanoparticles on Wastewater Biological Nitrogen and Phosphorus Removal. *Environmental Science & Technology* 45, 2826–2832
32. Tooming, A., 2005. Kergkruusatäitega hübriidse tehismärgalapuhasti puhastusefektiivsus Paistu Põhikooli pinnasfiltri näitel. Magistritöö keskkonnatehnoloogia erialal, TÜ Ökoloogia ja Maateaduste Instituut, Tartu
33. Truu, M., Juhanson, J., Truu, J., 2009. Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 407, 3958-3971
34. Wu, M., Scott, AJ., 2012. Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2. *Bioinformatics*, 28, 1033–1034
35. Vymazal, J., 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment* 380, 48–65
36. Vymazal, J., 2011. Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: Five Decades of Experience. *Environmental Science & Technology* 45, 61–69.

Internetiallikad:

https://www.riigiteataja.ee/aktiivisa/1041/2201/2001/VV_99m_lisa1.pdf#

Riigi Teataja I, 13.06.2013, 13 - Reovee puhastamise ning heit- ja sademevee suublasse juhtimise kohta esitatavad nõuded, heit- ja sademevee reostusnäitajate piirmäärad ning nende nõuete täitmise kontrollimise meetmed. Lisa 1 (2013).

Lisad

Tabel 1. Eesti Keskkonnauuringute Keskuse Tartu laboris määratud veeparameetrid

Näitaja	Vertikaalfiltri sissevool	Horisontaalfiltri sissevool	Horisontaalfiltri väljavool	Ühik
pH	7,5	7,7	7,7	
Hõljuvaine	83	17	21	mg/l
BHT ₇	140	7,9	5,1	mg/l
KHT _{Cr}	250	50	< 50	mg/l
Ca ²⁺	76	81	77	mg/l
Mg ²⁺	30	26	25	mg/l
NH ₄ ⁺ -N	64,0	31,0	14	mgN/l
NO ₃ ⁻ -N	< 0,02	4,2	< 0,02	mgN/l
NO ₂ ⁻ -N	< 0,003	0,040	0,0062	mgN/l
N _{üld}	75	36	15	mg/l
PO ₄ ³⁻ -P	5,2	3,1	3,0	mgP/l
P _{üld}	5,3	3,1	3,1	mg/l
SO ₄ ²⁻	17	12	5,7	mg/l
Fe	0,48	1,0	4,7	mg/l
TOC	79	14	5,7	mg/l
DOC	49	12	5,5	mgC/l

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadri Saare (sünd. 03.01.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„Arhede arvukuse ja mitmekesisuse iseloomustamine Paistu hübriidse tehismärgala
pinnasfiltrites“,
mille juhendajad on Mikk Espenberg ja Kristjan Oopkaup
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 alates **27.05.2014** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27. mail 2014. a