TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
GEOGRAAFIA OSAKOND

Ott-Kaarel Kalm

PAISTU PÕHIKOOLI HÜBRIIDSE PINNASFILTERSÜSTEEMI DENITRIFIKATSIOONI JA ANAEROOBSE AMMOONIUMI OKSÜDEERIMISE GENEETILINE POTENTSIAAL

BAKALAUREUSETÖÖ

Juhendajad:
Teele Ligi (MSc)
vanemteadur Marika Truu (PhD)

Kaitsmisele lubatud:
Juhendaja: _____
Osakonna juhataja: _____

Tartu 2014

SISUKORD

SISSEJUHATUS 4
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE 5
1.1 Tehismärgalad ja neis toimuvad protsessid 5
1.2 Denitrifikatsioon 7
1.2.1 Denitrifikatsiooniga seotud ensüümid ja neid kodeerivad geenid 8
1.2.2 Denitrifikatsiooni mõjutavad tegurid 10
1.3 Anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine ja seda mõjutavad tegurid 12
1.4 Denitrifikatsiooni ja anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise uurimise meetodid 13
1.4.1 Polümeraasi ahelreaktsioonil põhinevad meetodid 13
1.4.2 Sekveneerimisel põhinevad meetodid 14
2 MATERJAL JA METOODIKA 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 reaalaja PCR meetodil 19
2.5 Reaalaja PCR andmete analüüs 20
3 TULEMUSED 22
3.1 Paistu pinnasfiltri puhastusefektiivsused ning vee-ja filtermaterjali keemilised parameetrid. 22
3.2 qPCR tulemuste kvaliteedikontroll 23
3.3 Bakterite 16S rRNA geeni üldarvukus vee- ja filtermaterjali proovides 24
3.4 Denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate osakaalud pinnasfiltrites 24
3.5 ANAMMOX protsessiga seotud 16S rRNA geenikoopiate osakaalud pinnasfiltrites 26
4 ARUTELU 27
KOKKUVÕTE 32
SUMMARY 33
KASUTATUD KIRJANDUS 36
LISA 1. 43
LIHTLITSENTS 44

LÜHENDID

ANAMMOX – anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine

ANOVA - ühefaktoriline dispersioonanalüüs

BHT_7 – biokeemiline hapnikutarve 7 päeva jooksul

DNRA – dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks

DOC – lahustunud orgaaniline süsinik

HA – hõljuvaine

HF – horisontaalse läbivooluga pinnasfilter

KHT_{Cr} – dikromaatne keemiline hapnikutarve

Nap – periplasmaatiline nitraadi reduktaas

Nar – membraaniseoseline 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

qPCR – kvantitatiivne (reaalaja) polümeraasi ahelreaktsioon

SF – vabaveeline tehismärgalapuhasti

SSF – läbivooluline tehismärgalapuhasti

TOC – orgaaniline süsinik

VF – vertikaalse läbivooluga pinnasfilter

SISSEJUHATUS

Inimtegevuse tagajärjel on looduslike märgalade pindala ajapikku vähenenud, samas kui ökosüsteemidesse jõudvate toitainete, sealhulgas lämmastiku, hulk on märkimisväärselt suurenenud (Gruber ja Galloway, 2008). Lämmastikuühendite hulga tõus keskkonnas on suures osas põhjustatud reo- ja heitvee loodusesse juhtimisest, intensiivsest põllumajandusest (väetised, sõnnik) ning kaevandamisest (Davidson *et al*., 2012). Toitainete liigsusest tingitud eutrofeerumine on muutunud põhiliseks veekvaliteedi halvenemise põhjuseks maailma magevee- ning rannikuökosüsteemides (Smith ja Schindler, 2009).

Vähendamaks loodusesse sattuvate reoainete hulka, oleks vaja tagada lihtsate, odavate ja tõhusate reovee puhastamise meetodite kättesaadavus ka hõredama asustusega piirkondades, kus ei ole võimalik või on majanduslikult ebaotstarbekas rajada suuri traditsioonilistel meetoditel põhinevaid reoveepuhastusjaamasid. Looduslikes märgalades toimuvad protsessid on võimelised märkimisväärselt vähendama toitainete kontsentratsiooni neid läbivates veehulkades ning viimastel aastakümnetel ongi hakatud seda potentsiaali ära kasutama rajades reovee puhastamiseks tehislikke märgalasid.

Tõstmaks tehismärgalade efektiivsust reovee puhastamisel, on kõigepealt vaja mõista märgalades toimuvaid protsesse ning neid läbiviivaid mikroorganisme. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida Viljandi maakonnas asuva Paistu Põhikooli hübriidse pinnasfiltersüsteemi efektiivsust reovee puhastamisel ning iseloomustada puhastis elutseva mikroobikoosluse denitrifikatsiooni ja anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise geneetilist potentsiaali erinevate lämmastikuühendite eemaldamisel reoveest.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Tehismärgalad ja neis toimuvad protsessid

Looduslikud märgalad toimivad biofiltritena eemaldades erinevate bioloogiliste (organismide vahendatud), füüsikaliste ja keemiliste (nt. adsorptsioon, filtratsioon ja sedimentatsioon) protsesside kaudu veest erinevaid saasteaineid (Kadlec ja Wallace, 2009). Tehismärgalad (märgalapuhastid) on disainitud nii, et nendes toimuksid samasugused protsessid nagu looduslikes märgalades, kuid kõrgema kontrollitavuse ja efektiivsusega (Faulwetter *et al.*, 2009). Võrreldes traditsiooniliste reoveepuhastussüsteemidega on reoveepuhastamiseks rajatud tehismärgaladel madalamad rajamis- ja hoolduskulud ning minimaalne energiatarve (Vymazal ja Kröpfelova, 2009).

Märgalapuhasteid võib klassifitseerida nii taimestiku kui ka hüdroloogia alusel. Taimestatud märgalapuhasteid võib jagada kas taimede kinnitumise (kinnitunud või vabalt hõljuvad taimed) või kasvuvormide alusel (täielikult veesisesed, osaliselt veesisesed jne.). Hüdroloogia alusel võib tehismärgalasid klassifitseerida veetaseme, veevoolu suuna, filtermaterjali küllastatavuse astme ja sissevoolu asukoha alusel (Fonder ja Headley, 2013).

Märgalapuhastid jaotatakse veetaseme alusel kahte suurde rühma: vabaveelised (SF, *surface flow*) ja läbivoolulised (SSF, *sub-surface flow)* märgalapuhastid. Vabaveelised märgalapuhastid meenutavad välimuselt looduslikke märgalasid. Põhja kinnitunud taimedega SF märgalapuhastid on madalaveelised (10 - 50 cm) veekogud, samas vabalt ujuvate taimedega SF puhastite sügavus võib ulatuda kuni 3 meetrini (Fonder ja Headley, 2013). SF märgalad sobivad kasutamiseks peaaegu kõigis kliimatingimustes, kuid jää tekkimine võib raskendada hüdraulilist opereerimist ja aeglustada bioloogilisi protsesse (Kadlec, Wallace 2009). SSF märgalapuhastid on umbes 30 - 60 cm sügavused vettpidava kihiga ümbritsetud ja filtermaterjaliga täidetud basseinid. Filtermaterjal püüab kinni reoveega märgalasse sisenevad lahustumatud osakesed, seob saasteained ning tagab optimaalsed kasvutingimused mikroorganismidele (Truu, *et al.*, 2009; Fonder ja Headley, 2013). Filtermaterjalidena on kasutusel väga erinevaid looduslike (nt. turvas, liiv, paekivi) ja spetsiaalselt valmistatud tehislike materjale (nt. paisutatud ja põletatud savi) kui ka tööstuslike jääkmaterjale (nt. kivisöetuhk, lendtuhk, šlakk) (Vohla *et al.*, 2011). Läbivoolulised märgalapuhastid võivad olla nii taimestatud kui ka taimestamata ning viimaseid nimetatakse pinnasfiltriteks (Kadlec, Wallace 2009; Fonder ja Headley, 2013). Filtermaterjali vahele kinnitunud taimede juured on nii kinnitussubstraadiks kui ka hapniku ja toitainete allikaks filtermaterjalis elavatele mikroorganismidele (Lee *et al.*, 2009). Kui taimejuurte ümbruses elutsevad peamiselt

aeroobsed mikroorganismid, siis risosfäärist kaugemal asuval filtermaterjalil on ülekaalus (fakultatiivsed) anaeroobid. Mõlemat tüüpi organismid on olulised vee puhastamise seisukohast (Dong ja Reddy, 2010).

Läbivoolulisi märgalapuhasteid saab hüdroloogia alusel omakorda jaotada horisontaal- (HF) ja vertikaalvoolulisteks (VF) pinnasfiltriteks. VF-is liigub reovesi vertikaalselt läbi filtermaterjali puhasti alaosasse, kus see süsteemi põhjas olevate torude abil puhastist välja juhitakse (Fonder ja Headley, 2013). Tänu vertikaalsele veevoolu suunale on VF-is parem aeratsioon ning seetõttu soodsamad tingimused nitrifikatsiooniks ja kõrgema efektiivsusega orgaanilise aine lagundamiseks. HF-is liigub reovesi läbi filtermaterjali horisontaalselt ning kuigi veetase on filtris allpool filtermaterjali pinda, on enamus filtrist pidevalt veega küllastunud. Taimestatud HF-is toimub aeratsioon enamasti risosfääri kaudu ning seetõttu esinevad aeroobsed protsessid valdavalt taimejuurtelähedases piirkonnas, samas anaeroobsed protsessid (sealhulgas denitrifikatsioon) domineerivad pinnasfiltri sügavamas osas (Vymazal, 2007). Maksimaalse efektiivsuse tagamiseks reovee puhastamisel on loodud hübriidseid märgalapuhasteid, mis koosnevad nii horisontaal- kui ka vertikaalvoolulistest filtritest (Vymazal, 2013).

SSF tüüpi märgalapuhastite eelisteks SF ees on kõrgem lahustunud ja lahustumatute saasteainete ning patogeenide eemaldamise efektiivsus, väiksem minimaalse pindala vajadus inimese kohta (vastavalt 4 - 5 m^2 ja 20 m^2 inimekvivalendi kohta), töökindlus ka jahedama kliimaga piirkondades ning lõhna- ja kahjuriprobleemide puudumine (vabaveelised märgalapuhastid võivad olla kasvukohaks näiteks sääskedele). Miinustena võib esile tuua pideva vajaduse elektrienergia ja reovee eeltöötluse (vältimaks ummistumist) järele (Saeed ja Sun 2012; Fonder ja Headley, 2013).

Reoveega satub märgaladesse mitmeid erinevaid toitaineid, sealhulgas erinevaid lämmastikuühendid. Lämmastik on üks peamisi reovee komponente, mis võib põhjustada veekogude eutrofeerumist, mõjutada hapniku kontsentratsiooni keskkonnas ning sõltuvalt ühendis olla isegi toksiline (Saeed ja Sun, 2012). Lämmastik võib esineda märgalades väga erinevate orgaaniliste ja anorgaaniliste ühenditena. Viimaste hulka kuuluvad ammoonium (NH_4-N), nitraat (NO_3-N) ja nitrit (NO_2-N), lisaks gaasilised dilämmastikoksiid (N_2O), lämmastikoksiid (NO), ammoniaak (NH_3) ja dilämmastikgaas (N_2). Lämmastikul on keeruline biogeokeemiline ringe, milles hulka kuuluvad väga erinevad füüsikalis-keemilised (nt. ammooniumi adsorbtsioon, lämmastiku mattumine, ammoniaagi lendumine kõrge pH korral)

ja bioloogilised protsessid. Põhilised lämmastikühenditega seotud bioloogilised transformatsioonid on (Vymazal, 2007):

- taimede ja mikroobide vahendatud assimileerimine, mille käigus ammoonium, nitrit ja nitraat seotakse orgaaniliste ühendite koosseisu;
- lämmastiku sidumine, mille käigus gaasiline lämmastik muundatakse ammooniumiks ning viimane viiakse omakorda orgaaniliste ühendite koosseisu;
- nitrifikatsioon, mille tulemusena ammoonium muundatakse nitritiks ja sealt edasi nitraadiks;
- ammonifikatsioon, mille käigus orgaaniline lämmastik muundatakse ammooniumiks;
- dissimilatoorne nitraadi redutseerumine ammooniumiks (DNRA), mille käigus anaeroobsetes tingimustes nitraat või nitrit redutseeritakse ammooniumiks;
- denitrifikatsioon, mille käigus nitraat või nitrit muundatakse gaasiliseks dilämmastikoksiidiks või dilämmastikuks;
- anaeroobne lämmastiku oksüdatsioon, mille käigus anaeroobsetes tingimustes muundatakse ammoonium ja nitrit dilämmastikgaasiks.

Enamiku eelnevalt nimetatud protsesside tulemusena ei eemaldata lämmastiku reoveest lõplikult, sest lämmastikuühendid viiakse vaid ühest vormist teise. Seetõttu on reoveepuhastuse suurimaks väljakutseks tagada tehismärgalades optimaalsed tingimused just denitrifikatsiooni ja anaeroobset lämmastiku oksüdeerimist läbiviivatele mikroorganismidele, kuna nende elutegevuse tulemusena muundatakse lämmastik gaasilisteks ühenditeks ning seeläbi eemaldatakse lõplikult reoveest.

1.2 Denitrifikatsioon

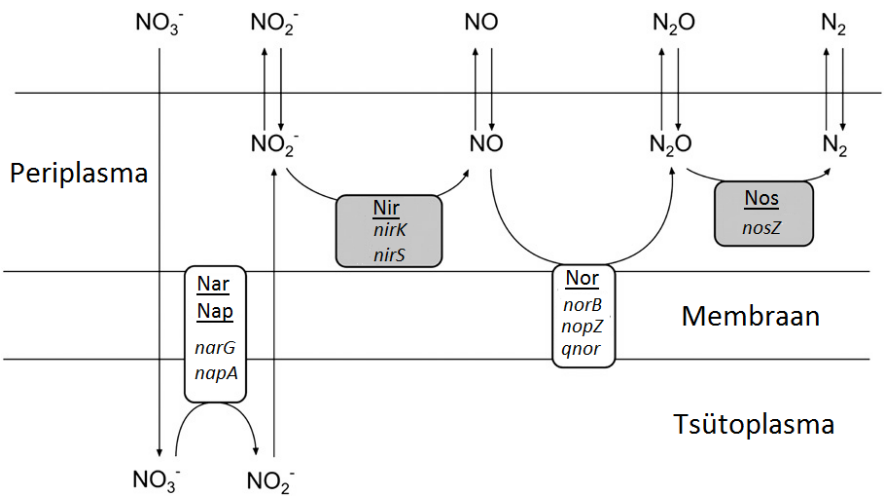
Denitrifikatsioon on mikroorganismide vahendatud protsess, mille käigus toimub nitraadi ja/või nitriti dissimilatoorne redutseerimine üle lämmastikoksiidi dilämmastikoksiidiks või molekulaarseks lämmastikuks (Zumft, 1997). Denitrifikatsiooni viivad läbi fakultatiivsed anaeroobsed bakterid, mis tähendab, et kui keskkonnas on hapniku kontsentratsioon madal või puudub täielikult, võetakse elektronide lõppaktseptorina hapniku asemel kasutusele nitrit või nitraat (Shoun *et al.*, 2012). On näidatud, et mõned bakterid suudavad denitrifitseerida ka hapniku juuresolekul, kuid neid on veel väga vähe uuritud (Baggs, 2011).

Denitrifitseerijaid on lisaks bakteritele leitud ka arhede ja seente esindajate hulgast. Arhede ja bakterite denitrifikatsiooni rada kodeerivad geenid pärinevad ilmselt ühiselt eellaselt ajast, mil prokarüoodid ei olnud veel bakteriteks ja arhedeks jagunenud (Zumft, 1997).

Denitrifikatsioonivõime on tuvastatud fülogeneetiliselt üsnagi erinevatel bakteritel ja arhedel, mis viitab denitrifikatsiooni võime kaotamisele ja taaskordsele omandamisele evolutsiooni käigus, kuid ka horisontaalse geeniülekande võimalikkusele (Jones *et al.*, 2008). Enamik denitrifitseerivatest bakteritest kuuluvad *Proteobacteria* hõimkonna *α-, β-* ja *γ-Proteobacteria* klassidesse, kuid ka näiteks hõimkonna *Deferribacteres* ja *Aquificae* esindajate seas on tuvastatud denitrifitseerijaid (Jones *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2013). Arhedest denitrifitseerijaid leidub näiteks perekondades *Pyrobaculum* ja *Haloarcula* (Blum, 2008) ning seente hulgas on denitrifikatsioonivõime tuvastatud näiteks perekonna *Fusarium* ja *Cylindrocarpon* esindajatel (Shoun *et al.*, 2012) ja mitmetel pärmseentel (Tsuruta *et al.*, 1998).

1.2.1 Denitrifikatsiooniga seotud ensüümid ja neid kodeerivad geenid

Denitrifikatsiooni viivad läbi neli eraldiseisvat intratsellulaarset ensüümi: nitraadi reduktaas (Nar ja Nap), nitriti reduktaas (Nir), lämmastikoksiidi reduktaas (Nor) ja dilämmastikoksiidi reduktaas (Nos). Denitrifikatsiooni raja skeem koos erinevaid etappe läbiviivate ensüümide ja neid kodeerivate geenidega on kujutud joonisel 1. Lisaks eelpool nimetatud ensüümidele osaleb denitrifikatsiooni protsessis väga palju regulatsiooniga seotud ensüüme (Torres *et al.*, 2011).



Joonis 1. Denitrifikatsiooni raja erinevad etapid koos katalüüsivate ensüümide (allajoonitud) ja neid kodeerivate geenidega (kursiivis) (Saggar *et al.*, 2012 alusel).

Nitraadi reduktaas on membraaniseoseline ensüüm, mis võib esineda kahes vormis (Nar ja Nap) ning mille ekspressiooni reguleerib nitraati detekteeriv valk. Mõlemat tüüpi ensüümid võivad esineda ühes bakterirakus ning olla aktiivsed samaaegselt (Pittman ja Kelly, 2005). Nar ja Nap on kodeeritud vastavalt *narG* ja *napA* geenijärjestuste poolt (Saggar *et al.*, 2012).

Papaspyarau *et al.* (2014) näitasid, et Colne jõe suudmelahe ülemistes settekihtides oli madala nitraadi sisalduse (50 µM) korral aktiivsem Nap ja kõrgema kontsentratsiooni korral (200 µM) Nar ensüüm, kuid sügavamates kihtides domineerisid Nar-i aktiivsused. Nitraadi redutseerimine ei ole ainuomane protsess denitrifikatsioonile, kuna *narG* ja *napA* geene omavad ka DNRA-d läbiviivad bakterid (Rubol *et al*., 2013) ning seetõttu antud geene enamasti denitrifitseerivate mikroobikoosluste iseloomustamiseks ei kasutata.

Järgmist denitrifikatsiooni raja etappi läbiviivat nitriti reduktaasi esineb denitrifitseerivates bakterites kahes struktuurselt erinevas, kuid funktsiooni poolest identses vormis. Vaske sisaldavat nitriti reduktaasi (Cu-Nir) kodeeritakse *nirK* geeni poolt ning tsütokroom cd-1 sisaldavat cd1-Nir kodeeritakse *nirS* geenijärjestuse alusel. Teadaolevalt võib bakterites olla kas *nirS* või *nirK* geen (1 - 3 koopiat), kuid mitte mõlemad geenid korraga (Zumft, 1997; Jones *et al*., 2008). Cu-Nir on bakterites ja seentes analoogne, asudes bakterite periplasmas ning seente mitokondrite intermembraanses ruumis (Zumft, 1997). Nir geene kasutatakse laialdaselt denitrifitseerijate üldarvukuse hindamiseks ja koosluste mitmekesisuse kirjeldamiseks (Saggar *et al*., 2012; Ligi *et al*., 2013).

Lämmastikoksiidi reduktaas (Nor) võib olla kodeeritud erinevate *nor* geenide poolt ning osal denitrifitseerijatel on see denitrifikatsiooni raja viimaseks ensüümiks, mistõttu raja lõpp-produktiks on kasvuhoonegaasina tuntud N_2O. Tänu NO toksilisusele on väga erinevatel bakteriliikidel olemas lämmastikoksiidi reduktaasi kodeerivad geenid, et vajadusel kaitsta ennast antud ühendi kahjulike mõjude eest (Shiro, 2012). Seetõttu ei ole *nor* geenid denitrifitseerijate uurimise markergeenidena väga laialdasel kasutusel (Saggar *et al*., 2012).

Denitrifikatsiooni täispika raja viimast etappi viib läbi *nosZ* geeni poolt kodeeritud dilämmastikoksiidi reduktaas (Nos). Kui looduses on teada väga mitmeid protsesse (nt. nitrifikatsioon, DNRA, NO redutseerimisega lõppev denitrifikatsioon), mille käigus tekib N_2O, siis denitrifikatsiooni protsessis osalev Nos on teadaolevalt ainukene N_2O redutseerimisvõimega ensüüm (Thomson *et al*., 2012). Kui veel suhteliselt hiljuti omistati N_2O redutseerimisvõime vaid eelkõige *Proteobacteria* hulka kuuluvatele denitrifitseerijatele, siis viimastel aastatel ilmunud uurimused on näidanud *nosZ* geeni olemasolu ka teistes bakteri ja arhede hõimkondades (Sanford *et al*., 2012; Jones *et al*., 2013). Erinevate bioinformaatiliste ja fülogeneetiliste analüüside alusel on tänaseks päevaks *nosZ* geenide teadaolevad järjestused jaotatud kahte klaadi: *nosZI* ja *nosZII*. Kui *nosZI* geeni omavad bakterid kuuluvad täielikult *Proteobacteria* hulka, siis *nosZII* geeni omavad baktereid on leitud tunduvalt rohkematest hõimkondadest (nt. *Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Spirochaetae*), mis näitab et N_2O

redutseerimise võimet omab tunduvalt rohkem erinevaid organisme kui varem arvati. *NosZI* ja *nosZII* geenid erinevad teineteisest eelkõige Nos ensüümi transpordiga seotud signaalpeptiidi kodeerivate järjestuste poolest (Sanford *et al*., 2012; Jones *et al*., 2013). Näiteks Sanford *et al.* (2012) näitasid, et *Anaeromyxobacter dehalogenans* ja *Bradyrhizobium japonicumi* (omavad vastavalt *nosZII ja nosZI* geeni) *nosZ* geenide primaarstruktuuridevaheline homoloogia aminohappelise järjestuse alusel oli vaid 33% ning vaid 44% uuritud *nosZII* geeni omavate mikroorganismide genoomides leidus teisi denitrifikatsiooniga seotud geene. Vähesed olemasolevad uuringud *nosZ* geeni esimese ja teise klaadi arvukuste esinemise kohta keskkonnas on näidanud, et *nosZ* geenide omavaheline suhe sõltub keskkonnatingimustest, kuid nende geenide summaarne arvukus on madalam kahte erinevat tüüpi *nir* geenide arvukusest (Kandeler *et al*., 2006; Knapp *et al*., 2009; Jones *et al*., 2013; Ligi *et al*., publitseerimiseks esitatud).

Denitrifikatsioonil eralduva N_2O ja N_2 suhe võib olla mõjutatud nii keskkonnatingimustest kui ka denitrifitseerijate geneetilisest võimekusest. Viimasele väitele annab kinnitust asjaolu, et erinevad bakterid võivad omada erinevat denitrifikatsioonil osalevate geenide komplekti (Zumft *et al*., 1997; Sanford *et al*., 2012). Seega enamasti ei suuda üksikud bakteriliigid sünteesida kõiki ensüüme terve denitrifikatsiooni raja jaoks, vaid pigem toimub see protsess bakteripopulatsiooni koostöö tulemusena (Saggar *et al*., 2012).

1.2.2 Denitrifikatsiooni mõjutavad tegurid

Denitrifikatsiooni mõjutavad paljud omavahel keerulistes seostes olevad füüsikalised ja keemilised keskkkonnategurid. Kõige tähtsamateks neist peetakse keskkonna hapniku kontsentratsiooni, lämmastiku ja süsiniku kättesaadavust, temperatuuri ning pH-d (Saggar *et al*., 2012).

Denitrifikatsiooni toimumise eelduseks on anaeroobsed tingimused, seetõttu hapniku hulk keskkonnas on antud protsessi seisukohast väga oluline faktor. Hapnik inhibeerib denitrifikatsiooniga seotud geenide ekspressiooni ning vastavate ensüümide aktiivsust (Giles *et al*., 2012). Hapniku suhtes kõige tundlikum ensüüm on dilämmastikoksiidi reduktaas, mis on inhibeeritud, kui hapniku kontsentratsioon keskkonnas on üle 0,2 mg/l. Ülejäänud denitrifikatsiooni ensüümid on aktiivsed siis, kui hapniku kontsentratsioon keskkonnas on alla 5 mg/l. Samas on näidatud, et denitrifikatsioon võib jätkuda ka teatud aja jooksul pärast anaeroobset faasi, kui hapniku tase süsteemis alles hakkab tõusma. Kuna Nos ensüüm on sellises olukorras kõige rohkem inhibeeritud, võib protsessi lõpp-produktiks olla N_2 asemel pigem N_2O (Morley *et al*., 2008).

Denitrifikatsiooni toimumiseks peab keskkonnas leiduma nitraatset lämmastikku, mida kasutatakse hapniku puudumisel hingamisahelas elektronide lõppaktseptorina (Lee *et al.*, 2009). Seega võib nitraadi kättesaadavust samuti pidada üheks tähtsamaks denitrifikatsiooni määravaks teguriks. Liiga kõrge nitraadi kontsentratsioon mõjub denitrifikatsioonile inhibeerivalt, nagu leiti Senbayram *et al.* (2012) uurimuses, kus nitraadi kontsentratsiooni tõstmisel pinnases alates 2 mM kuni 20 mM täheldati märkimisväärset denitrifikatsiooni aktiivsuse langust.

Tähtis on ka mikroorganismidele kättesaadava süsiniku hulk, sest heterotroofseks denitrifikatsiooniks vajalikud elektronid pärinevad orgaaniliste süsinikühendite oksüdatsioonist (Richardson, 2000). Maismaaökosüsteemides on süsiniku kättesaadavus tihti denitrifikatsiooni limiteerivaks faktoriks, kuna vabale süsinikule konkureerivad mitmed teised organismid. On leitud, et piisava koguse kergesti lagundatava süsiniku olemasolu korral mullas suureneb denitrifikatsiooni aktiivsus ning eraldunud N_2O/N_2 väärtus väheneb (Azam, 2002). Märgaladesse satub orgaanilist ainet rohkem ning limiteerivaks faktoriks on eelkõige nitraadi kättesaadavus (White ja Reddy, 2001).

Denitrifikatsiooniks optimaalne pH vahemik on 6-8 (Beaubien *et al.*, 1995). Arvatakse, et keskkonna pH mõjutab denitrifitseerivate mikroobide metabolismi ja kasvu geenide ekspressiooni ning ensüümide aktiivsust (Saleh-Lakha *et al.*, 2009). Näiteks on leitud, et happelisemates tingimustes on denitrifikatsiooni ensüümide aktiivsus madalam (Cuhel ja Šimek, 2011) ning dilämmastikoksiidi reduktaasi inhibeerituse tõttu neis tingimustes on denitrifikatsiooni produktiks eelistatult N_2O (Van den Heuvel *et al.*, 2011). Samas teistes uurimustes ei ole leitud seost pH ja denitrifikatsiooni ensüümide aktiivsuse vahel (Šimek *et al.*, 2000).

Temperatuur mõjutab denitrifikatsiooniks vajalike substraatide kättesaadavust ja seeläbi ka funktsionaalsete geenide ekspressiooni. Saleh-Lekha *et al.* (2009) leidsid positiivse seose *Pseudomonas mandelii nirS* ja *cnorB* geenide ekspressiooni ja temperatuuri vahel (vahemikus 10 - 30°C). Lisaks on leitud, et madalatel temperatuuridel on keskkonnast eraldunud N_2O/N_2 suurem, kuna N_2O redutseerimise aktivatsioonienergia on suurem kui N_2O tootmise oma (Holtan-Hartwig *et al.*, 2002).

1.3 Anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine ja seda mõjutavad tegurid

Anaeroobne ammooniumi oksüdeerimine (ANAMMOX, *ANaerobic AMMonium OXydation*) on bakterite vahendatud unikaalne protsess, kus ammoonium ja nitrit muundatakse dilämmastikgaasiks ja veeks.

ANAMMOX protsess ning selle läbiviijad avastati 1990. aastate alguses (Mulder *et al*., 1995) ning sellest on saanud oluline lüli lämmastikuringe mudelis (Thamdrup, 2012). Denitrifikatsiooni kõrval on ANAMMOX üks väheseid protsesse, mille lõpp-produktiks on N_2. Kõik teadaolevad ANAMMOX bakterid kuuluvad hõimkonna *Planctomycetes* seltsi *Brocadiales* ning nad jagunevad viide perekonda (*Candidatus* (*Ca.*) *Brocadia, Ca. Kuenenia, Ca. Scalindua, Ca. Anammoxoglobus* ja *Ca. Jettenia)* (Jetten *et al*., 2010). ANAMMOX bakteritel on unikaalne rakustruktuur „anammoksüsoom“, kus toimub ANAMMOX protsess ning arvatakse, et kõik ANAMMOX bakterite metaboolsed protsessid toimuvad just seal (van Niftrik ja Jetten, 2012). Lisaks sisaldavad ANAMMOX bakterite membraanid mujal elusloodusesmitteesinevaid *ladderane*-lipiide. Nimetatud lipiidid võimaldavad membraanide tihedat pakkimist, kuid omavad ka vedelikulaadseid omadusi. Selliste omadustega membraanide ülesandeks võib olla raku kaitsmine ANAMMOX protsessis tekkivate toksiliste vaheühendite eest (Boumann *et al*., 2009). ANAMMOX bakterid kasvavad väga aeglaselt (pooldumisaeg on 10 - 20 päeva), mistõttu nende uurimine on keeruline (Thamdrup, 2012).

Tänaseks päevaks on välja pakutud järgnev ANAMMOX protsessi mudel (Hira *et al*., 2012; Kartal *et al*., 2012):

- nitrit redutseerimine *nirS* või *nirK* geeni poolt kodeeritud nitriti reduktaasi kaudu lämmastikoksiidiks;
- hüdrasiini süntaasi vahendatud ammooniumi ja lämmastikoksiidi reageerimine, mille tulemusena tekib hüdrasiin (N_2H_4);
- hüdrasiini dehüdrogenaas viib läbi hüdrasiini lagunemise dilämmastikgaasiks.

ANAMMOX protsess on mõjutatud mitmete erinevate keskkonnategurite poolt, millest üheks olulisimaks on hapniku kontsentratsioon, kuna ANAMMOX protsess toimub ainult anaeroobsetes tingimustes (<2µM O_2). Oluline on ka substraatide omavaheline suhe (NH_4-N/NO_2-N), mille optimaalseks väärtuseks ANAMMOX bakteritele on 1/1,32 (Li *et al*., 2011). Samas on leitud, et liiga kõrged ammooniumlämmastiku (> sadades milligrammides liitri kohta), nitriti (>70 mg/l) ja orgaanilise süsiniku (>50 mg/l) kontsentratsioonid mõjuvad samuti ANAMMOX bakteritele inhibeerivalt (Li *et al*., 2011; Saeed ja Sun, 2012).

ANAMMOX bakterite elutegevuseks sobivad temperatuurid jäävad vahemikku -2 kuni 43°C ning optimaalne on 37°C (Kartal *et al*., 2011).

ANAMMOX baktereid on leitud nii mere- kui ka maismaaökosüsteemidest, kuid samuti looduslikest ja tehislikest märgaladest (Humbert *et al*., 2012). ANAMMOX bakterite kasutamisel tehismärgalades võib olla märkimisväärne N_2O emissiooni vähendamise potentsiaal. Eelduseks on ANAMMOX bakterite kõrge aktiivsuse ja mitmekesisuse tagamine tehismärgalas. ANAMMOX bakteritega inokuleeritud tehismärgalas täheldati N_2O emissiooni 30%-list kahanemist võrreldes kontrolliga ning 33% N_2 emissioonist pärines ANAMMOX protsessist (Zhu *et al*., 2011).

1.4 Denitrifikatsiooni ja anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise uurimise meetodid

Väga pikka aega põhines denitrifikatsiooni uurimine vaid kultiveerimisel põhinevatel meetoditel. Sellise lähenemise kaudu saadud tulemused on aga puudulikud, sest suuremat osa (~99%) keskkonnaproovidest eraldatud bakteritest ei ole võimalik laboritingimustes kasvatada (Malik *et al*., 2008). Molekulaarsed meetodid põhinevad kogu mikroobikoosluse nukleiinhapete eraldamisel uuritavast materjalist ning seetõttu on võimalik analüüsi kaasata ka mittekultiveeritavaid organisme ning saada tunduvalt täpsemat infot koosluse mitmekesisusest, määrata kindlate organismide arvukust, detekteerida funktsionaalseid geene ja seostada kooslusi erinevate protsessidega (Hirsch *et al*., 2010). Näiteks magevee uurimisel molekulaarse meetodiga (*nirS* geeni kvantifitseerimine) tuvastati kolm korda kõrgem denitrifitseerijate arvukus võrreldes kultiveerimisel põhineva piirlahjenduste meetodiga (Rathsack *et al*., 2014). Kultiveerimisest sõltumatute molekulaarsete meetodite kasutusele võtmine on avanud uued võimalused denitrifikatsiooniga seotud mikroorganismide uurimiseks ning teinud võimalikuks mittekultiveeritavate bakterite poolt läbiviidava ANAMMOX protsessi uurimise.

1.4.1 Polümeraasi ahelreaktsioonil põhinevad meetodid

Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) on üks enim kasutatud molekulaarseid meetodeid. PCR abil on võimalik sünteesida uuritavast DNA järjestusest lühikese aja jooksul miljoneid koopiad. Antud meetod on lihtne ja kõrge tundlikkusega ning sõltuvalt kasutatavatest praimeritest (18-30 aluspaari pikkused sünteetilised DNA järjestused) on võimalik amplifitseerida geenilõike, terveid geene või isegi geeniklastereid. Näiteks on PCR abil detekteeritud erinevate denitrifikatsiooniga seotud funktsionaalsete (*nirS*, *nirK*, *nosZ*) (Hallin ja Lindgren 1999; Kloos *et al*., 2001) ja ANAMMOX spetsiifiliste 16S rRNA (Humbert *et al*., 2010) geenide olemasolu erinevates keskkondades ning uuritud nende

protsessiga seotud geenide mitmekesisust kasutades PCR-il põhinevat denatureeriva gradiendiga geelelektroforeesi (Throbäck *et al*., 2004; Enwall *et al*., 2005).

Reaalaja (või kvantitatiivne) PCR (qPCR, *Real-time PCR*, *Quantitative PCR*) on meetod, mis võimaldab määrata geenikoopiate arvukust keskkonnaproovidest. Antud meetod võeti mikroobiökoloogilistes uurimustes kasutusele 21. sajandi esimestel aastatel ning tänapäevaks on see meetod levinud laialdaselt võimaldades kvantifitseerida erinevate bioloogiliste protsesside toimumise potentsiaali (Smith ja Osborn, 2009). Kui traditsioonilise PCR-i analüüsiobjektiks on lõpp-produkt, siis qPCR-i korral visualiseeritakse amplikoni tekkimine reaalajas tänu DNA märgistamisele fluorestseeruvate molekulidega (nt *SYBR green I*). 100% amplifikatsiooniefektiivsuse korral kahekordistatakse iga amplifikatsioonitsükliga DNA kogus ning sünteesitud DNA hulka hinnatakse sellega proportsionaalse fluorestsentssignaali tugevuse kaudu (Valasek ja Repa, 2005). qPCR-i järgselt läbiviidav produkti sulatamine temperatuurigradiendil võimaldab tänu erineva nukleotiidse koostise ja ahela pikkusega produktide erinevatele sulamistemperatuuridele kontrollida produkti õigsust ja tuvastada ka ebaspetsiifilisi järjestusi (Smith ja Osborn, 2009). Nii qPCR-i kui ka PCR-i tulemused on mõjutatud uuritava DNA eraldamise kvaliteedist, samuti ka keskkonnaproovide ja eraldatud DNA säilitamises meetoditest ning praimerite omadustest (Malik *et al*., 2008; Kim *et al*., 2013a). qPCR on väga laialdaselt kasutusel nii erinevate denitrifikatsiooniga (Kandeler *et al*., 2006; Knapp *et al*., 2009; Graham *et al*., 2010; Jones *et al*., 2013; Ligi *et al*., 2013; Chen *et al*., 2014) ja ANAMMOX (Li *et al*., 2011; Harhangi *et al*., 2012) protsessiga seotud funktsionaalsete geenide analüüsil kui ka ANAMMOX spetsiifiliste 16S rRNA geenide (Wang ja Li, 2011; Humbert *et al*., 2012; Han *et al*., 2013) kvantifitseerimisel erinevatest keskkondadest.

1.4.2 Sekveneerimisel põhinevad meetodid

Sekveneerimise kaudu on võimalik määrata DNA primaarstruktuuri nukelotiidset järjestust. Sõltuvalt vajadusest võib sekveneerida üksikuid DNA fragmente ja geene, kuid isegi terveid genoome (Kim *et al*., 2013b; Zarraonaindia *et al*., 2013).

Mikroobikoosluste uurimisel kasutatakse tavaliselt 16S rRNA geenide konserveerunud regioone, mis võimaldavad luua universaalseid praimereid vastava geeni varieeruvate piirkondade amplifitseerimaks PCR-il. PCR-i produktide sekveneerimisel ning tulemuste kõrvutamisel andmebaasides olevate DNA järjestustega on võimalik määrata uuritavate bakterite taksonoomilist kuuluvust (Kim *et al*., 2013b). Samuti võib sekveneerida ka PCR-i teel amplifitseeritud funktsionaalsete geenide fragmente ning sellist metoodikat on kasutatud

ka denitrifikatsiooni ja ANAMMOX protsessides osalevate geenide mitmekesisuse uurimisel (Knapp *et al*., 2009; Humbert *et al*., 2010; Yoshida *et al*., 2010; Wang ja Li, 2011; Sanford *et al*., 2012; Jones *et al*., 2013).

Üha enam on asutud kasutama otsesel lähenemisel põhinevat *shotgun*-metagenoomikat, mis võimaldab luua tervikliku pildi kõigist koosluses elutsevatest organismidest ning ka nende funktsionaalsetest geenidest. Antud meetodid põhinevad organismidest eraldatud DNA fragmenteerimisel ning sekveneeritud fragmentide assambleerimisel pikemateks järjestusteks, mistõttu on välistatud ka PCR-ist tulenevad probleemid (praimerite universaalsus, amplifikatsiooni efektiivsus jne.) (Zarraonaindia *et al*., 2013). Metagenoomikal põhinevat meetodit on kasutatud näiteks denitrifikatsiooniga seotud mikroobikoosluse uurimiseks naftareostuse poolt mõjutatud meresetetes (Scott *et al*., 2014).

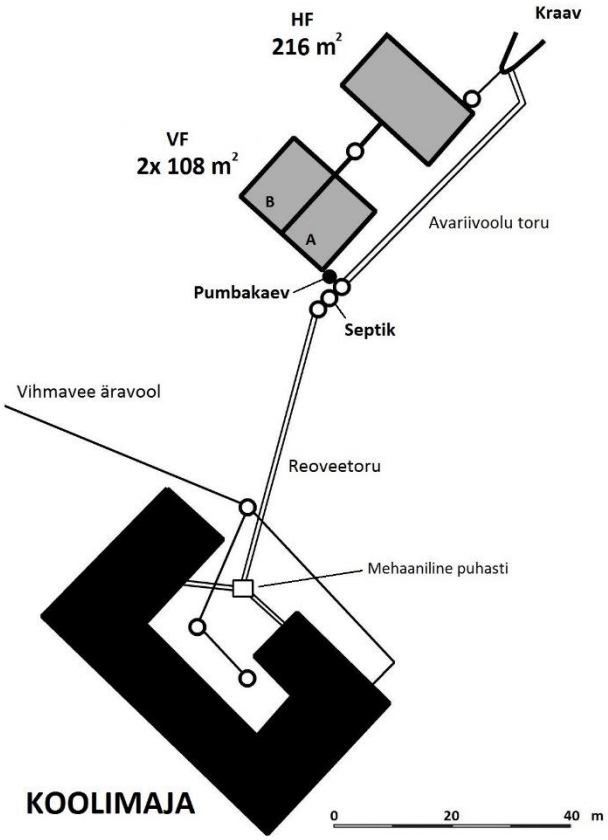
2 MATERJAL JA METOODIKA

2.1 Prooviala kirjeldus

Paistu Põhikooli hübriidne pinnasfiltersüsteem asub Viljandimaal Paistu vallas Sultsi külas. Pinnasfilter valmis 2002. aasta suvel OÜ Bionext projekti alusel ning selle rajamist rahastas Paistu Põhikool ja Keskkonnainvesteeringute Keskus. Paistu Põhikooli pinnasfilter on disainitud puhastama 140 inimese (120 õpilast ja 20 õpetajat) olmereovett ning selle reostuskoormus on 64 inimekvivalenti (Tooming, 2005).

Paistu puhasti kogupindala on 432 m^2 ning see koosneb kahest erinevast võrdse pindalaga filtrist: kahekambrilisest (A ja B) vertikaalvoolulisest pinnasfiltrist (VF) ning ühest horisontaalvoolulisest tehismärgalast (HF) (Joonis 2). Filtrid on täidetud Eestis toodetud FIBO kergkruusaga (AS Maxit Estonia, Eesti). VF-i (sügavus 1,2 m) põhjas asetseb 0,5 m paksune kiht jämedamat kergkruusa (10 - 20 mm) ning selle kohal omakorda 0,3 m paksune peenemateraline (2 - 4 mm) kergkruusa kiht tagades optimaalsed tingimused aeroobsetele protsessidele (Öövel, 2007). VF on kaetud 0,2 m paksuse mullakihiga, mis on filtermaterjalist eraldatud vett läbilaskva geotekstiiliga ning millel kasvab muru (Mander *et al.*, 2007). Mullakiht kaitseb filtrit külmumise eest, eriti talvisel koolivaheajal, kui puhasti koormus on väiksem. Samas takistab mullakiht hapniku ligipääsu filtermaterjalile ning seega alandab aeratsioonivõimet. HF-is (sügavus 0,8 m) kasutati 2-4 mm fraktsiooniga kergkruusa ning filter taimestati hariliku pillirooga (*Phragmites australis*). Filtrid on eraldatud ümbritsevast pinnasest vettpidava geomembraaniga (Tooming, 2005).

Enne tehismärgalasse sisenemist läbib olmereovesi mehaanilise rasvapüüdja (jõudlus 1 l/s) ja kolmekambrilise septiku (22 m^3). Aeratsiooni tagamiseks pumbatakse VF-i reovett 2-3 tunniste intervallidega ning filtrikambreid koormatakse kordamööda kolmepäevaste tsüklitena. Külmumisohu vähendamiseks talvisel perioodil koormatakse korraga mõlemat VF-i. Pärast VF ja HF ning nendevahelise vahekaevu läbimist suunatakse puhastatud reovesi kontrollkraavi ning seejärel pinnasesse (Tooming, 2005).

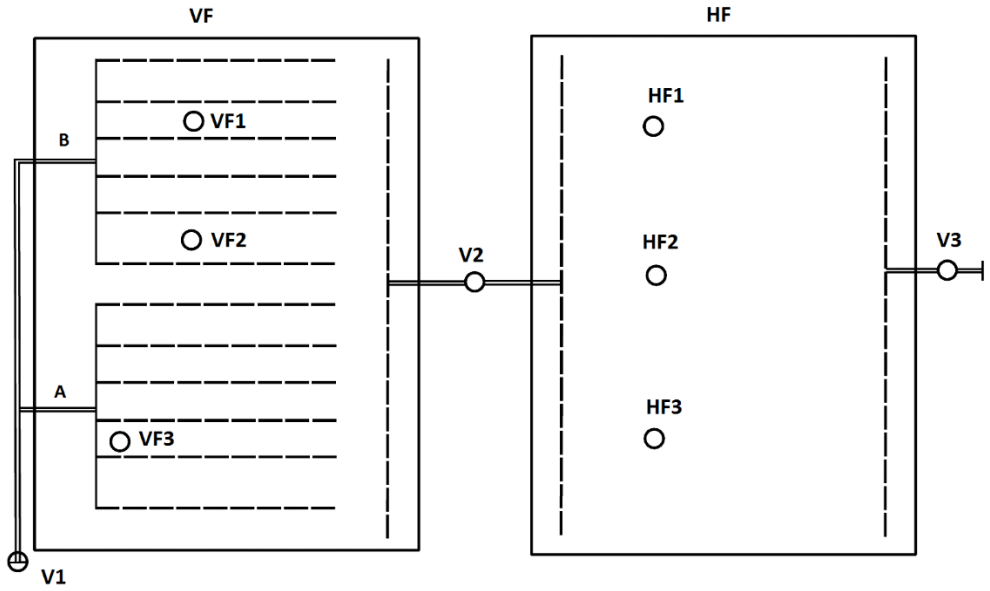


Joonis 2. Paistu hübriidse pinnasfiltersüsteemi skeem (Mander *et al*., 2007).

2.2 Vee- ja filtermaterjali proovide kogumine

Vee- ja filtermaterjali proovid koguti Paistu hübriidsest pinnasfiltersüsteemist (Joonis 3) 2012. aasta detsembris Tartu Ülikooli Loodus- ja tehnoloogiateaduskonna Ökoloogia ja maateaduste instituudi Geograafia osakonna töötajate poolt. Veeproovid võeti puhasti sissevoolust (V1), filtrite vahelisest kaevust (V2) ning puhasti väljavoolust (V3). Lisaks koguti kuus filtermaterjali proovi: kolm proovi VF-ist (VF1, VF2 ja VF3) ja kolm proovi HF-ist (HF1, HF2 ja HF3). Filtermaterjali proovid koguti VF-is jaotustorustiku all asuvast peenfiltermaterjali 0 - 10 cm kihist ja HF-ist 30 - 40 cm sügavusest kihist kasutades mullapuuri ning iga proov koosnes kuuest lähestikku asuvast osaproovist. Proove säilitati kuni edasiste analüüsideni temperatuuridel +4°C (keemilised analüüsid) ja -20°C (molekulaarsed analüüsid). Eesti Keskkonnauuringute Keskuse Tartu laboris määrati veeproovide pH, hõljuvaine (HA), biokeemilise hapnikutarve (BHT_7), dikromaatse keemilise hapnikutarve (KHT_{Cr}), kaltsiumi (Ca^{2+}), magneesiumi (Mg^{2+}), ammooniumlämmastiku (NH_4-N), nitraatlämmastiku (NO_3-N), nitritlämmastiku (NO_2-N), üldlämmastiku ($N_{üld}$), fosfaatse fosfori (PO_4-P), üldfosfori ($P_{üld}$), sulfaadi (SO_4^{2-}), raua (Fe), üldsüsiniku ($C_{üld}$), üldorgaanilise

süsiniku (TOC) ja lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) väärtused ning filtermaterjalide kuivaine (KA), $P_{üld}$, $N_{üld}$ ja $C_{üld}$ sisaldused.



Joonis 3. Paistu hübriidse pinnasfiltersüsteemi proovivõtu skeem. Veeproovid: V1 - sissevool märgalapuhastisse, V2 - filtritevaheline kaev, V3 - väljavool märgalapuhastist; filtermaterjali proovid: VF1, VF2 ja VF3 - vertikaafiltri (VF) proovid, HF1, HF2 ja HF3 - horisontaalfiltri (HF) proovid.

Erinevate parameetrite (HA, BHT_7, KHT_{Cr}, NH_4-N, NO_3-N, NO_2-N, $N_{üld}$, TOC ja DOC) muutused (%) pinnasfiltersüsteemi eri osades ja kogu süsteemi puhastusefektiivsused (PE) arvutati järgmise valemi (1) järgi:

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

kus,

- C_{sisse} -sissevoolu parameetri väärtus (mg/l)
- $C_{välja}$ -väljavoolu parameetri väärtus (mg/l)

2.3 DNA eraldamine filtermaterjali proovidest

Veeproovide mikroobikoosluse DNA eraldati Teele Ligi poolt 50 ml põhjafuugitud (15 min 4000 rpm) rakkude biomassist kasutades PowerSoil DNA Isolation Kit-i (MoBio Laboratories, California, USA). DNA eraldati järgides tootja juhendit välja arvatud rakkude

lüüsimise etapp, kus vorteksi asemel kasutati homogenisaatorit Precellys® 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa) (5000 rpm 20 s).

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

Eraldatud DNA kvaliteedi hindamiseks ja kvantiteedi mõõtmiseks kasutati spektrofotemeetrit Infinite M200 (Tecan AG, Austria). Võimalike DNA lahuses sisalduvate PCR reaktsiooni inhibiitorite mõju välistamiseks proovide VF3, HF1, HF2 ja HF3 DNA-d lahjendati vastavalt 200, 50, 20 ja 20 korda.

2.4 Geenikoopiate arvukuse määramine reaalaja PCR meetodil

Filtri- ja veeproovide 16S rRNA geenikoopiate arvu ja seeläbi bakterite hulga hindamiseks kasutati kvantitatiivset PCR meetodit. Filtermaterjali bakterikoosluse denitrifikatsiooni protsessist tulenevat N_2O ja N_2 emissiooni potentsiaali hinnati vastavalt cd1- ja Cu-tüüpi nitriti reduktaasi kodeerivate *nirS* ja *nirK* geenide ning dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeerivate *nosZI* ja *nosZII* geenide osakaalude alusel bakterikoosluses. Lisaks hinnati ANAMMOX protsessiga seotud N_2 produtseerimise potentsiaali filterproovide bakterikooslustes ANAMMOX-spetsiifiliste bakterite 16S rRNA geenikoopiate kvantifitseerimise teel.

16S rRNA geenikoopiate kvantifitseerimiseks kasutati Teele Ligi poolt valmistatud standardit, mis põhines *Pseudomonas mendocina* tüve PC1 fragmenti sisaldava plasmiidi lahjendusseerial.

Kõikide qPCR-i reaktsioonisegude maht oli 10 µl ning see sisaldas 5 µl Maxima SYBR Green Master Mix-i (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), optimeeritud kontsentratsioonidega päri- ja vastassuunalisi praimereid (Tabel 1), 1 µl genoomset DNA-d ja steriilset vett. Kõik amplifikatsioonid viidi läbi kasutades RotorGene® Q (QIAGEN, CA, USA) masinat ning tabelis 1 toodud programme. Proove mõõdeti kolmes korduses ning iga geeni kvantifitseerimisel kasutati kahte negatiivset kontrolli, mis sisaldasid kõiki komponente peale genoomse DNA. Vahetult peale amplifikatsiooni lõppu viidi läbi qPCR produktide sulamiskõverate analüüs (60°C - 95°C, samm; 0,35°C/3 s), kontrollimaks amplifitseeritud geeniproduktide spetsiifilisust.

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

Märklaud-geen	Praimer	Amplikoni suurus (bp)	Primeri kontsentrat-sioon (µM)	Praimeri allikas	qPCR programm
16S rRNA	L-V6 R-V6	112	0,4 0,4	Gloor *et al*., 2010	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 15 s; 54°C 30 s; 72°C 30 s[a]
nirS	nirSCd3aF nirSR3d	426	0,8 0,8	Kandeler *et al*., 2006	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 15 s, 51°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 15 s[a]
nirK	FlaCu R3Cu	473	0,8 0,8	Hallin ja Lindgren, 1999	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 15 s[a]
***nosZ*I**	nosZF nosZ1622R	453	0,9 0,9	Kloos *et al*., 2001; Throbäck *et al*., 2004	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 15 s; 60°C 30 s; 72°C 30 s[a]
***nosZ*II**	nosZIIF nosZIIR	690-720	0,9 0,9	Jones *et al*., 2013	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 15 s, 52°C 30 s, 72°C 30 s, 80°C 30 s[a]
ANAMMOX 16S rRNA	A438F A684R	248	0,9 0,9	Humbert *et al*., 2012	95°C 10 min; 45 tsüklit: 95°C 15 s, 51°C 30 s, 72°C 30 s[a]

[a] Fluoresents signaal fikseerimine

2.5 Reaalaja PCR andmete analüüs

qPCR tulemuste analüüsil võeti arvesse RotorGene® Q programmi poolt väljastatud proovide sulamiskõverate asukohad ja kuju ning paralleelide amplifikatsioonikõverate ühtlus. Iga proovi geenifragmentide individuaalse paljundamise efektiivsuse hindamiseks kasutati programmi LinRegPCR (versioon 2014.0) (Ruijter *et al*., 2009).

Kõikide geenide puhul kontrolliti proovide grupeerumist amplifikatsiooni efektiivsuste alusel kasutades ühefaktorilist dispersioonanalüüsi (*one-way* ANOVA) ning andmete vastavust normaaljaotusele kontrolliti Shapiro-Wilk testiga (STATISTICA, versioon 7.1).

Vee- ja filtermaterjali proovide 16S rRNA geenikoopiate arvukuse leidmiseks kasutati proovi (A) ja standardi iga 10 kordse lahjenduse (B) hinnangulist erinevust (FD), rakendades Ruijter *et al.* (2009) väljatoodud valemit (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 keskmine algkontsentratsioon fluorestsentsühikutes

- N_t - fluorestsentsi läviväärtus
- E - amplikoni keskmine amplifikatsiooni efektiivsus
- C_t - fluorestsentsi läviväärtuseni jõudmiseks vajalike tsüklite arv

16S rRNA geenikoopiate arvukuste hinnangud arvutati korrutades iga proovi FD väärtus vastava standardilahjenduse geenikoopiate (10^4 - 10^8) arvuga. Lõplik 16S rRNA geenikoopiate arvukus igas proovis leiti kasutades viie erineva standardlahjenduse alusel leitud 16S rRNA arvukusehinnangu keskmist. 16S rRNA geenikoopiate arvukused esitati filtermaterjali proovides grammi kuivaine ning veeproovides milliliitri kohta.

Denitrifikatsiooniga seotud nitriti reduktaaside (*nirS%* ja *nirK%*) ja kahte tüüpi dilämmastikokskiidi reduktaasi (*nosZI%* ja *nosZII%)* ning ANAMMOX spetsiifiliste 16S rRNA geenikoopiate (AMX%) osakaalude leidmiseks bakterikoosluses kasutati vastavate geeniväärtuste normaliseerimist bakterite üldarvukust iseloomustava 16S rRNA geeni suhtes. Proportsioonide arvutamiseks kasutati eespool kirjeldatud valemit (2), kus iga proovi FD väärtuse leidmiseks kasutati funktsionaalse geeni (A) ja 16S rRNA geeni (B) vastavaid N_0 väärtusi.

Individuaalsete geenide osakaalude väärtusi kasutati nitriti reduktaasi ja dilämmastikoksiidi kodeerivate geenide üldiste osakaalude (vastavalt *nir%* ja *nosZ%)* ja omavaheliste suhete (*nirS%/nirK%* ja *nosZI%/nosZII%*) leidmiseks mikroobikoosluses ning dilämmastikoksiidi kodeerivate geenide osakaalu leidmiseks nitriti reduktaasi kodeerivatest geenidest (*nosZ%/nir%*).

Kõikide geeniparameetrite väärtuse korral testiti nende erinevust VF-is ja HF-is kasutades ühefaktorilist dispersioonanalüüsi ning andmete vastavust normaaljaotusele kontrolliti kasutades Shapiro-Wilk testi (STATISTICA, versioon 7.1).

3 TULEMUSED

3.1 Paistu pinnasfiltri puhastusefektiivsused ning vee-ja filtermaterjali keemilised parameetrid

Paistu kombineeritud pinnasfiltersüsteemi sissevoolu keemilised parameetrid, veeproovide keemiliste parameetrite muutused puhasti eri osades ja puhasti puhastusefektiivsused on toodud tabelis 2. Kõige kõrgema efektiivsusega (96 - 80%) eemaldati pinnasfiltrite süsteemist BHT_7, TOC, DOC, KHT_{Cr}, ja $N_{üld}$ parameetrite poolt iseloomustatud süsiniku ja lämmastiku ühendeid, millele järgnesid NH_4-N ja HA vastavalt 78% ja 75%. Puhastatava reovee pH muutus puhasti piires suhteliselt vähe, vähenedes vaid 0,2 ühiku võrra puhasti läbimisel. BHT_7, TOC ja DOC kontsentratsioonid vähenesid rohkem VF-is, samas NH_4-N ja $N_{üld}$ kontsentratsioonid vähenesid suhteliselt võrdselt mõlemat tüüpi filtris. KHT_{Cr} ja HA puhul võis näha kontsentratsiooni vähenemist ainult VF-is ning HA kontsentratsioon isegi tõusis HF-i läbimise käigus. NO_3-N ja NO_2-N kontsentratsioonid tõusid VF-is, kuid seejärel toimus antud ühendite kõrge efektiivsusega eemaldamine HF-is. Veeproovidest määratud kõikide keemiliste parameetrite väärtused on toodud lisas 1.

Tabel 2. Paistu pinnasfiltersüsteemi sissevoolu keemilised parameetrid (mg/l, välja arvatud pH) ning keemiliste parameetrite muutused pinnasfiltersüsteemi eri osades ning kogu puhasti puhastusefektiivsused (pH korral on esitatud väärtuse muut).

Parameeter	pH	HA	BHT_7	KHT_{Cr}	NH_4-N	NO_3-N	NO_2-N	$N_{üld}$	TOC	DOC
Sissevool	7,5	83	140	250	64	< 0,02	< 0,003	75	79	49
VF (%)	-2,67	80	94	80	52	-20900	-1233	52	82	76
HF (%)	0	-24	35	50	55	100	85	58	59	54
Puhasti PE (%)	0,2	75	96	90	78	0	-107	80	93	89

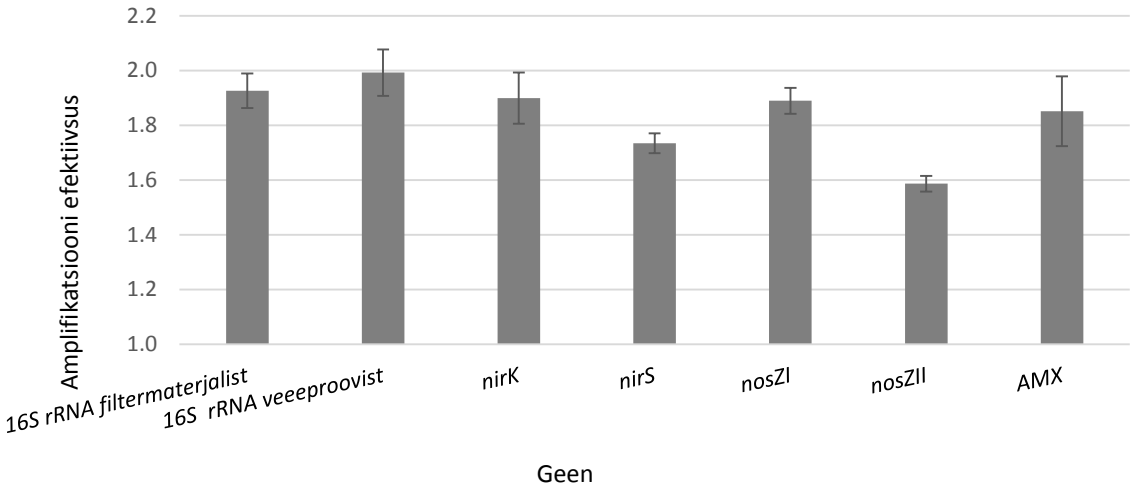
Paistu VF ja HF proovide KA, $N_{üld}$, $P_{üld}$ ja $C_{üld}$ näitajad on toodud tabelis 3. Filtermaterjali KA ja $P_{üld}$ väärtused jäid vastavalt vahemikku 552 - 663 mg/kg ja 250 - 580 mg/kg. Kui HF proovide KA ja $P_{üld}$ näitajad olid suhteliselt sarnased, siis VF proovide VF1 ja VF2 KA väärtused olid kõrgemad ja $P_{üld}$ näitajad madalamad võrreldes prooviga VF3. $N_{üld}$ kontsentratsioonid puhasti filtermaterjalis erinesid kohati kolmekordselt (330 - 990 mg/kg) ning kõige kõrgem $N_{üld}$ kontsentratsioon oli VF proovis VF3. Kõikide filtermaterjali proovide $C_{üld}$ väärtused jäid alla 1%.

Tabel 3. Paistu pinnasfiltersüsteemi vertikaal- (VF) ja horisontaalfiltri (HF) filtermaterjali keemilised parameetrid.

Proovi tähistus	KA (mg/kg)	$N_{üld}$ (mg/kg)	$P_{üld}$ (mg/kg)	$C_{üld}$ (%)
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 qPCR tulemuste kvaliteedikontroll

Uuritud funktsionaalsete ja 16S rRNA geenifragmentide qPCR keskmised amplifikatsiooniefektiivsused LinReg programmi alusel on toodud joonisel 4.



Joonis 4. Amplifikatsiooniefektiivsuste keskväärtused koos standardhälvetega kvantifitseeritud geenide kaupa.

Kõige kõrgemad olid vee ja filtermaterjali proovide 16S rRNA geenifragmentide amplifikatsiooni efektiivsused, vastavalt 2,0 ja 1,9. Kõige madalama efektiivsusega toimus *nosZII* geeni amplifikatsioon, mille keskväärtus oli 1,6. ANAMMOX spetsiifiliste 16S rRNA geenide amplifikatsiooniefektiivsuste keskväärtus oli keskmiste hulgas (1,8), aga antud geeni puhul oli proovide efektiivsuste standardhälve kõige suurem (±0,128). Kõige ühtlasema efektiivsusega toimus *nosZII* geeni amplifikatsioon (±0,028).

Kuna amplifikatsiooni efektiivsuste alusel ei tuvastatud ühegi analüüsitud geeni korral statistiliselt olulist erinevust HF ja VF proovide vahel (p>0,05), siis kõigi filtermaterjali proovide qPCR tulemusi analüüsiti iga geeni korral ühtse amplikonina.

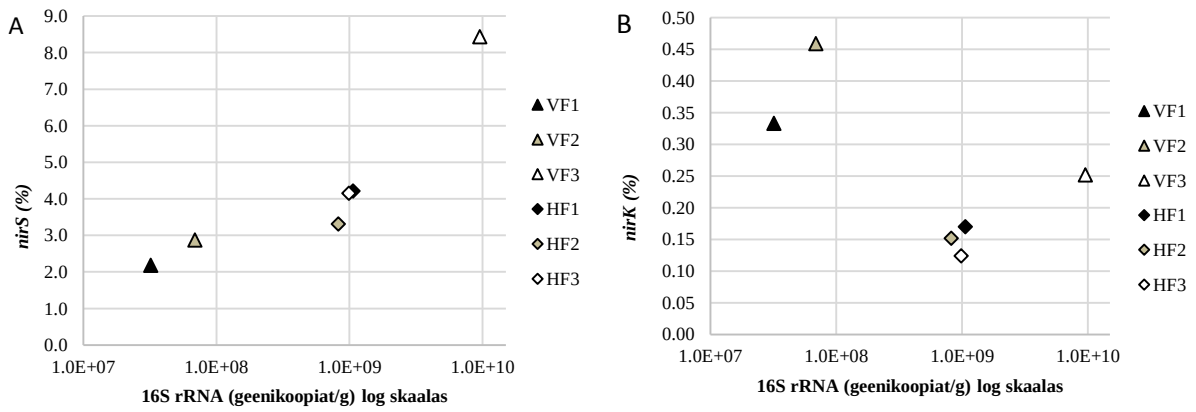
3.3 Bakterite 16S rRNA geeni üldarvukus vee- ja filtermaterjali proovides

Veeproovide bakterite 16S rRNA geeni üldarvukus oli Paistu puhasti sissevoolus $1{,}43 \times 10^8$ geenikoopiat/ml, VF ja HF vahelises kaevus $1{,}11 \times 10^6$ geenikoopiat/ml ning puhasti väljavoolus $2{,}72 \times 10^5$ geenikoopiat/ml.

Puhasti filtermaterjali proovide 16S rRNA geeni arvukused jäid vahemikku $3{,}2 \times 10^7$ kuni $9{,}53 \times 10^9$ geenikoopiat/g kuivaines (Joonised 5 - 7) ning nende väärtused ei erinenud kahe filtri võrdluses (p>0,05). Bakterite 16S rRNA geeni arvukuse varieeruvus proovide vahel oli märkimisväärselt suurem VF-is, kus kõige suurema (VF3) ja kõige väiksema (VF1) arvukusega proovi erinevus oli ligi 300 kordne, samas HF-is oli vastav väärtus 1,3.

3.4 Denitrifikatsiooniga seotud geenikoopiate osakaalud pinnasfiltrites

Paistu pinnasfiltrite filtermaterjali proovide mikroobikooslustes olid nitriti reduktaasi kodeerivate *nirS* ja *nirK* geenide osakaalud 16S rRNA geenikoopiate suhtes vastavalt vahemikus 2,12 - 8,43% (Joonis 5A) ja 0,12 - 0,46% (Joonis 5B). Kui *nirS*% ei erinenud kahe filtri võrdluses (p>0.05), siis *nirK* geenide osakaal oli kõrgem VF-is (p<0.05). HF proovides oli *nirS%* väärtused suhteliselt sarnased, kuid VF3 erines teistest VF proovidest 3 - 4 korda kõrgemate *nirS%* väärtuste poolest.



Joonis 5. *nirS* (A) ja *nirK* (B) geenikoopiate osakaal 16S rRNA geenikoopiate suhtes Paistu pinnasfiltersüsteemi vertikaal- (VF) ja horisontaalfiltri (HF) filtermaterjali proovides.

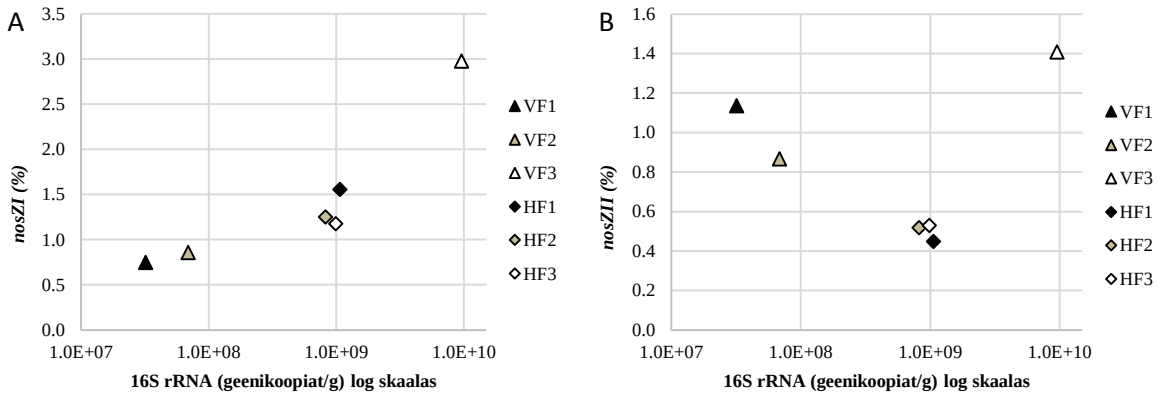
Kõikides filtermaterjali proovides domineerisid nirS-tüüpi denitrifitseerijad nirK-tüüpi denitrifitseerijate üle (*nirK/nirS* 0,03 - 0,16, Tabel 4). Kõige kõrgemad *nirK/nirS* väärtused

esinesid proovides VF1 ja VF2, samas kahe erineva filtritüübi vahel *nirK/nirS* väärtustes erinevusi ei leitud (p>0,05). Nitriti reduktaasi kodeerivate geenide summa *nir*% varieerus vahemikus 2,51 - 8,68 (Tabel 4). Sarnaselt *nirS*% olid *nir%* väärtused ühtlasemad HF-is proovides võrreldes VF proovidega ning erinevusi *nir%* väärtustes kahe filtri tüübi vahel ei tuvastatud (p>0,05).

Tabel 4. Paistu pinnasfiltersüsteemi vertikaal- (VF) ja horisontaalfiltri (HF) filtermaterjali proovide denitrifikatsiooniga seotud geeniparameetrite väärtused.

Proovi tähistus	***nir%***	***nirK/nirS***	***nosZ)***	***nosZI/nosZII***	***nosZ/nir***
VF1	2,51	0,15	1,89	0,66	0,75
VF2	3,33	0,16	1,73	0,99	0,52
VF3	8,68	0,03	4,39	2,12	0,51
HF1	4,38	0,04	2,01	3,47	0,46
HF2	3,46	0,05	1,77	2,42	0,51
HF3	4,28	0,03	1,71	2,23	0,40

Dilämmastikoksiidi reduktaasi *nosZ* geeni kahte erinevat klaadi kodeerivate *nosZI* ja *nosZII* geenide osakaalud jäid puhasti lõikes vastavalt vahemikku 0,75 – 2,98% (Joonis 6A) ja 0,45-1,41 % (Joonis 6B). Kui *nosZI*% ei erinenud kahe filtri võrdluses (p>0,05), siis *nosZII*% olid kõrgemad VF-i mikroobikooslustes (p<0,01). HF-is proovide lõikes varieerusid *nosZI%* ja *nosZII%* väärtused suhteliselt vähe. Dilämmastikoksiidi reduktaasi üldist potentsiaali iseloomustava *nosZ%* väärtused ja *nosZ* geeni kahe erineva klaadi suhte *nosZI/nosZII* väärtused varieerusid pinnasfiltris vastavalt vahemikus 1,71 - 4,39% ning 0,66 - 3,47 (Tabel 4) ning antud väärtuste alusel ei tuvastatud erinevusi kahe erineva filtri mikroobikooslustes (p>0,05). Kõige kõrgem N_2O redutseerimise potentsiaal oli proovis VF3, kus *nosZ%* väärtus ületas ligi kahekordselt teiste proovide väärtusi, samas teistes proovides olid *nosZ%* väärtused suhteliselt sarnased. Klaad II tüüpi *nosZ* geenid ületasid klaad I osakaalusid vaid VF1 ja VF2 proovide mikroobikooslustes.

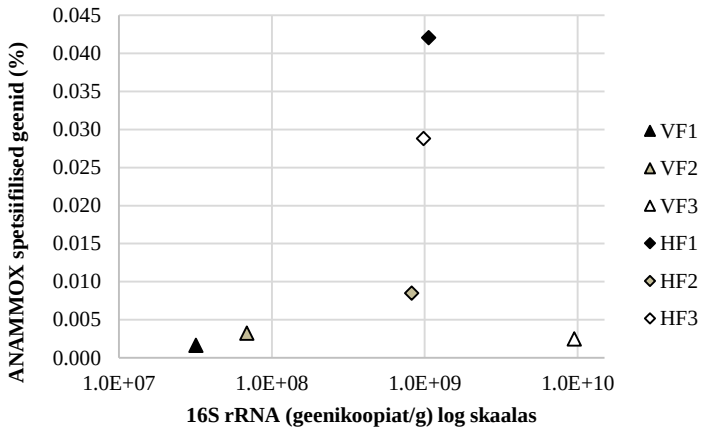


Joonis 6. *nosZI* (A) ja *nosZII* (B) geenikoopiate osakaal 16S rRNA geenikoopiate suhtes Paistu pinnasfiltersüsteemi vertikaal- (VF) ja horisontaalfiltri (HF) filtermaterjali proovides.

Nitriti reduktaasi kodeerivate *nir* geenide osakaal oli kõikide proovide mikroobikooslustes kõrgem dilämmastikosiidi reduktaasi kodeerivast *nosZ* geeni osakaalust (*nosZ/nir*) jäädes vahemikku 0,40 - 0,75 (Tabel 5). *nosZ/nir* väärtused ei erinenud väga palju kahe filtri võrdluses (p>0,05), kuid teistes kõrgem *nosZ/nir* väärtus esines proovis VF1.

3.5 ANAMMOX protsessiga seotud 16S rRNA geenikoopiate osakaalud pinnasfiltrites

ANAMMOX spetsiifiliste 16S rRNA geenikoopiate osakaalud jäid uuritavas puhastis vahemikku 0,002 - 0,042% (Joonis 7) ning kõrgemad AMX% väärtused esinesid HF-is võrreldes VF-iga (p<0,05). Kõige kõrgem AMX% tuvastati proovides HF1 ja HF3, mis oli vastavalt 5 ja 3,4 korda kõrgem kui kõige väiksema ANAMMOX spetsiifiliste 16S rRNA geenide osakaaluga horisontaalfiltri proov HF2.



Joonis 7. ANAMMOX spetsiifiliste 16S rRNA geenikoopiate osakaalud kogu 16S rRNA geenikoopiate suhtes Paistu pinnasfiltersüsteemi vertikaal- (VF) ja horisontaalfiltri (HF) filtermaterjali proovides.

4 ARUTELU

Paistu kombineeritud pinnasfiltri veeproovide analüüs näitas, et bakterite üldine arvukus hinnatuna 16S rRNA alusel väheneb heitvees puhasti läbimisel ligikaudu kolme suurusjärgu võrra. Bakterikoosluste suuruse hindamisel 16S rRNA geenide kvantifitseerimise kaudu tuleb silmas pidada, et geenikoopiate arv ei ole võrdne rakkude arvuga ning ühest rakust on leitud kuni 15 16S rRNA geenikoopiat (Vetrovsky ja Baldrian, 2013). 16S rRNA geeni arvukuse langus käesolevas reoveepuhastussüsteemis võib olla tingitud reovees kohastunud bakterite (sealhulgas patogeenide) võimetusest jääda ellu puhasti keskkonnatingimustes (aeratsioon, vähenev toitainete sisaldus jne.) (Truu *et al*., 2009). Samas suurusjärgus bakterite üldarvukusi VF väljavoolus saadi ka asula reovett puhastava märgalafiltri käivitamist uurinud katse 150. päeval kasutades qPCR-i, samas antud katse HF väljavoolu bakterite üldarvukused olid paar suurusjärku kõrgemad (Nõlvak *et al*., 2013). Bakterite arvukuse vähenemist puhastit läbimisel täheldati ka laborikatses veega lahjendatud õlut puhastava HF tüüpi märgalafiltri mudeli põhjal, kus bakterite arvukuse hindamisel kasutati FISH meetodit (Babtista *et al*., 2008).

VF filtermaterjali proovide puhul tuvastati märkimisväärselt kõrgem bakterite arvukus VF kambrist A kogutud VF3 proovis võrreldes kahe teise VF kambrist B pärineva prooviga. Kahe suurusjärgu suurune erinevus bakterite üldarvukuses võis olla tingitud VF kahe kambri erinevast koormamisest reoveega, kuigi talvisel perioodil peaks mõlema kambri koormus olema võrdne. Erinevus reoveekoormustes võis tuleneda ka kambri B reoveetorude osalisest ummistumisest. Keskkonnatingimuste erinevusele VF-i kambrites A ja B viitavad ka kõrgemad $N_{üld}$ ja $P_{üld}$ väärtused VF3 proovis võrreldes kambri B proovidega. Proovivõtu hetkel rohkem reovett saanud kambris A võis arvukamalt olla ka reoveest pärinevaid baktereid, kuid bakterite kasvuks vajalike toitainete kõrgem kontsentratsioon võis luua tunduvalt paremad tingimused ka filtermaterjalil kasvavatele bakteritele. HF-i proovides oli bakterite üldarvukus suhteliselt ühtlane, mis võib viidata sarnastele tingimustele kogu HF-i ulatuses. Sarnaseid bakterite üldarvuksi saadi qPCR meetodiga ka HF filtermaterjalis puhasti käivitumist uurinud katse 150. päeval peale katse käivitamist (Nõlvak *et al*., 2012).

Denitrifikatsioonialastes uuringutes kasutatakse tihiti denitrifitseerijate arvukuse hindamisel nitriti reduktaasi kodeerivate *nirS* ja *nirK* geenide summat, sest bakteritel võib esineda nii *nirS* kui ka *nirK* geen, kuid seni pole leitud mõlemat geeni omavat organismi (Jones *et al*., 2013). Samas tuleb *nir* geenide osakaalude kasutamisel denitrifitseerijate üldarvukuse hindamisel arvestada Sanford *et al*., (2012) uuringu tulemusega, mille alusel kõik *nosZ* geeni kandvad organismid ei oma *nir* geeni, mistõttu võib üksnes *nir* geenide alusel hinnatud

denitrifitseerijate arvukus olla alahinnatud. Siiski võimaldab *nir* geenide arvukus kaudselt hinnata bakterikoosluse N_2O produtseerimise potentsiaali keskkonnas. Hiljutised uuringud on näidanud *nir* geenide esinemist ka ANAMMOX protsessi läbiviivatel bakteritel (Hira *et al.*, 2012; Kartal *et al.*, 2012). Tuginedes varasema uuringu tulemustest tehtud järeldustele võib oletada, et käesolevas töös kasutatud *nir* geenidele spetsiifilised praimerid võivad amplifitseerida ka ANAMMOX bakterite *nir* gene (Ligi *et al.*, 2013; Ligi *et al.*, publitseerimiseks esitatud). Samas olid ANAMMOX organismide osakaalud Paistu filtersüsteemis suhteliselt madalad ning seetõttu ei tohiks nende osakaal võrreldes denitrifitseerijate *nir* geenidega olla väga suur. Paistu kombineeritud pinnasfiltri analüüsid näitasid, et denitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal oli VF-is ja HF-is suhteliselt sarnane välja arvatud teistest kõrgema *nir* osakaaluga proov VF3. Kuigi denitrifikatsiooni toimumiseks peaks olema loodud kõige soodsamad tingimused HF-is, siis suhteliselt kõrge *nir* geenide osakaal ka VF-is võib olla põhjustatud väga intensiivsest hapniku tarbimisest antud filtris. VF-is toimunud reovee KHT, BHT_7, HA, TOC ja DIC näitajate vähenemine viitab kõrgele orgaanilise aine oksüdeerimisele antud filtris ning NH_4-N vähenemine ning NO_3-N ja NO_2-N kontsentratsioonide tõus aktiivsele nitrifikatsioonile. Nitrifikatsioon toimub aeroobsetes tingimustes ning orgaanilise aine mineraliseerumine on samuti efektiivsem hapniku juuresolekul (Vymazal, 2007; Truu *et al.*, 2009). Seega mõlema protsessi tulemusena võivad tekkida denitrifikatsiooniks sobilikud anaeroobsed mikrokeskkonnad (nt. filtermaterjali poorides). Lisaks võivad denitrifitseerijad kasutada VF-is koheselt ära ka teatud osa nitrifitseerijate poolt toodetud nitraatsest lämmastikust. Teiste lämmastikuringe protsesside toimumisele lisaks nitrifikatsioonile VF filtris viitab ka VF-i väljavoolu NO_3-N ja NO_2-N väiksem summa võrreldes VF-is eemaldatud NH_4-N kontsentratsiooniga. Lisaks toimus märkimisväärne $N_{üld}$ kontsentratsiooni vähenemine VF-i läbinud reovees, mis näitab, et lämmastik ei muundunud vaid ühest vormist teise (nt. nitrifikatsioon, DNRA, ammonifikatsiooni käigus), vaid selle hulk puhastis vähenes arvatavasti lämmastiku assimileerimise, kuid ka denitrifikatsiooni käigus tekkinud gaasiliste lämmastikuühendite emissiooni tulemusena. Samas on denitrifitseerijad fakultatiivsed anaeroobid, kes suudavad elektronide aktseptorina kasutada nii nitraatset lämmastikku kui ka hapniku. Seetõttu võivad denitrifitseerijad hapnikurikka faasi üle elada nitraatset lämmastiku redutseerimata ning aktiivselt denitrifitseerida anaeroobsete tingimuste esinemisel keskkonnas. Erinevalt VF-ist oli denitrifikatsiooni potentsiaal HF-is jaotunud üsnagi ühtlaselt, olles natukene kõrgem VF kambri B kahe proovi näitajatest. Arvatust mõnevõrra madalam denitrifikatsiooni geneetiline potentsiaal võib olla tingitud sellest, et HF-i ei jõua denitrifikatsiooniks piisavalt nitraatset lämmastikku ja orgaanilist ainet, millele viitab antud ühendite kõrge eemaldamise efektiivsus

VF-is. Lisaks on varasem antud puhastit käsitlenud uuring toonud välja, et VF ja HF vahelise kaevu konstruktsiooni eripära põhjustab vabalangemise tõttu reovee taaskordset aereerumist (Koger, 2013) ja seetõttu siseneb HF-i suhteliselt kõrge hapnikusisaldusega reovesi, mis ei soodusta aga denitrifikatsiooni, vaid loob soodsa keskkonna nitrifikatsioonile.

Paistu kombineeritud pinnasfiltersüsteemis domineerisid *nirS* geeni omavad denitrifitseerijad *nirK* geeni omavate üle kõikides uuritud filtermaterjali proovides, seega puhastis on kujunenud paremad tingimused *nirS* geene omavatele organismidele. *nirS* geenide kõrgemaid arvukusi võrreldes *nirK* geenidega on näidatud ka vabaveelistes märgalades (Correa-Galeote, *et al*., 2013; Ligi *et al*., 2013). Samas nirK-tüüpi denitrifitseerijad arvatakse olevat vastupidavamad hapnikutaseme kõikumise suhtes (Knapp *et al.* 2009; Graham *et al*., 2010, Ligi *et al*., 2013), mis võib seletada ka *nirK* geenikoopiate kõrgemat osakaalu aeroobsemates VF1 ja VF2 proovides.

Dilämmastikoksiidi reduktaasi kodeeriva *nosZ* geeni üldine osakaal oli sarnaselt *nir* geenidega suhteliselt ühtlane kogu puhasti ulatuses (välja arvatud proovis VF3), viidates ka ühtlasele N_2O redutseerimise potentsiaalile üle kogu puhasti. Kuigi *nosZ* geeni poolt kodeeritud Nos ensüüm on hapniku suhtes kõige tundlikum denitrifikatsiooniga seotud ensüüm (Morley *et al*., 2008), võib arvata, et mõlemat tüüpi filtrites on ikkagi piisavalt anaeroobseid piirkondi N_2O redutseerimiseks. Lisaks tuvastati käesolevas uuringus kõrgem *nosZII* geeni osakaal just VF-is, mis viitab ka *nosZII* geeni omavate organismide erinevatele keskkonnaeelistusele võrreldes *nosZI* geeni omavatega. *nosZII* geeni kõrgemat osakaalu aeroobsemates keskkondades on näidatud ka avaveelistes tehismärgalades tehtud uuringud (Ligi *et al*., 2013; Ligi *et al*., publitseerimiseks esitatud).

nosZ geeni kahest klaadist oli filtermaterjali proovides domineerivam klaad I. *nosZ* klaad I geeni domineerimist täheldati ka Ekeby SF tehismärgala setetes, kuid mõlema klaadi geenide osakaalud 16S rRNA geenide suhtes olid mõnevõrra väiksemad võrreldes käesoleva uurimusega (Jones *et al*., 2013). Samas uuringus käsitletud aktiivmudapuhastite setete puhul ei leitud ühtset trendi, kuid mõlema *nosZ* geeni klaadi osakaalud jäid samasse suurusjärku Paistu puhasti *nosZ* geenide osakaaludega. Sarnaselt *nirK* geeni kõrgemale osakaalule *nirS* geeni suhtes võis näha *nosZII* geeni kõrgemat osakaalu *nosZI* geeni suhtes VF1 ja VF2 proovides, mis viitab sellele, et geene *nirK* ja *nosZII* ning *nirS* ja *nosZI* kandvad denitrifitseerijad eelistavad sarnaseid keskkonnatingimusi.

Kui eeldada, et *nir* ja *nosZ* geenide osakaalud iseloomustavad kaudselt vastavalt N_2O produtseerimise ja redutseerimise geneetilist potentsiaali, siis võib nende geenide omavahelise

suhte alusel hinnata N_2O emissiooni potentsiaali antud keskkonnast. Paistu tehismärgala puhul oli näha, et *nir* arvukus ületas *nosZ* geenide arvukust kõikides proovipunktides ning nende omavaheline suhe oli küllaltki sarnane, mis viitab ka N_2O emissiooni võimalikkusele mõlemat tüüpi pinnasfiltrist. N_2O emissiooni olemasolu HF-ist kinnitasid ka 2012 a. oktoobris - novembris läbi viidud HF-i gaasimõõtmised samas puhastisüsteemis (Koger 2013). Käesoleva tööga sarnaseid *nir* ja *nosZI* geenide osakaalude suhteid näitasid ka Chon *et al.* (2011) uurides denitrifikatsiooniga seostatud funktsionaalsete geenide arvukusi Damyangi SF tüüpi tehismärgalas. Samuti on näidatud N_2O emissioone ka sünteetilist reovett puhastavates vähendatud mõõtkavaga pinnasfiltrites (mikro- ja mesokosmides) (Jia *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011).

Lisaks denitrifikatsioonile võivad reovees oleva lämmastiku gaasiliseks ühendiks muuta ka ANAMMOX bakterid, kuid seda protsessi on alles väga vähe uuritud ning suhteliselt vähe on selle kohta teada tehismärgalades. Paistu puhastis tuvastati ANAMMOX spetsiifilis 16S rRNA järjestusi kõikidest filtermaterjali proovidest, mis viitab antud protsessi geneetilise potentsiaali olemasolule Paistu reoveepuhastis. ANAMMOX bakterite (*Ca. Kuenenia*) esinemist on kinnitanud ka samadest Paistu filtermaterjali proovidest tehtud metagenoomika analüüs (avaldamata tulemused). ANAMMOX spetsiifiliste 16S rRNA geenikoopiate arvukuse osakaal oli suurem HF-is võrreldes VF-iga, mis võib olla tingitud anaeroobsematest tingimustest HF-is, kuna ANAMMOX protsess on hapniku juuresolekul pärsitud (Kartal *et al.*, 2012). Lisaks võivad VF-i anaeroobsed mikrosaidid olla ANAMMOX bakteritele ebasoodsad elukeskkonnad kõrgema orgaanilise aine sisalduse tõttu, sest aeglase kasvuga ANAMMOX bakterid ei suuda konkureerida elukeskkonna pärast orgaanilist ainet kasutavate organismidega (Jin *et al.*, 2012). Võttes arvesse bakterite 16S rRNA geeni üldarvukusi, võib järeldada, et Paistu HF-is oli ANAMMOX bakterite arvukus võrreldav Wang ja Li (2011) asula reovett puhastava taimestatud horisontaalfiltri katses saadud tulemustega.

Geenikoopiate arvukuse määramise puhul keskkonnaproovidest tuleb alati arvestada võimalusega, et kasutatud praimerid ei suuda puuduliku universaalsuse tõttu amplifitseerida kõiki võimalike koosluses esinevaid geenivariante ning teatud osa geenidest jääb seetõttu detekteerimata (Fredriksson *et al.*, 2013). Käesolevas töös uuriti vaid erinevate protsesside geneetilist potentsiaali, mis ei näita antud geenide poolt kodeeritud funktsiooni tegelikku avaldumist antud ajahetkel (Bulow *et al.*, 2008). Siiski on leitud positiivne seos *nir* geenide arvukuse ja denitrifikatsiooni aktiivsuse vahel (Chen *et al.*, 2014).

Paistu kombineeritud pinnasfiltersüsteem suudab efektiivselt eemaldada reoveest lämmastikühendeid ka külmemal aastaajal, mil arvatakse toimuvat puhastusefektiivsuse vähenemine bioloogiliste protsesside aeglustumise tõttu (Wallace, 2000). Kuigi $N_{üld}$ kontsentratsiooni piirväärtust on alla 300 inimekvivalentse reostuskoormusega puhastite puhul seadusega sätestamata (määrus "Heitvee veekogusse ja pinnasesse juhtimise kord"), on Paistu märgalapuhastist väljuva heitvee $N_{üld}$ kontsentratsioon vastav ka kuni 99999 inimekvivalentse reostuskoormusega puhastile ettenähtud normidele. Lisaks vastavad seadusega sätestatud normidele ka selle puhasti läbinud heitvee BHT_7, KHT ja HA kontsentratsioonid, mis kinnitab filtersüsteemi efektiivsust ka orgaaniliste ühendite eemaldamisel reoveest.

KOKKUVÕTE

Tehismärgalad on suhteliselt lihtsad, odavad ja tõhusad vahendid puhastamaks reovett ka piirkondades, kus traditsiooniliste reoveepuhastusjaamade rajamine on võimatu või majanduslikult ebaotstarbekas. Selleks, et rajada võimalikult efektiivseid tehismärgalasid, tuleb kõigepealt mõista märgalades toimuvaid protsesse ning neid läbiviivaid mikroorganisme.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida Paistu Põhikooli hübriidse pinnasfiltersüsteemi mikroobikoosluse denitrifikatsiooni ja anaeroobse ammooniumi oksüdeerimise geneetilist potentsiaali.

Vertikaal- ja horisontaalvoolulise pinnasfiltri filtermaterjalist ja puhastatava reovee proovidest määrati keemilised parameetrid ning reaalaja-PCR meetodil kvantifitseeriti bakterikoosluse üldarvukus. Filtermaterjali proovidest määrati denitrifikatsiooniga ja ANAMMOX protsessiga seotud geenide osakaalud mikroobikooslustes ning arvutati erinevad geeniparameetrite väärtused.

Denitrifikatsioonis osalevaid ensüüme kodeerivate funktsionaalsete geenide kvantifitseerimisel saadud tulemused viitasid denitrifikatsiooni suhteliselt sarnasele potentsiaalile nii Paistu horisontaal- kui vertikaalfiltris. Paistu mõlemad pinnasfiltrid on potentsiaalsed N_2O allikad *nir* geenide suurema osakaalu tõttu *nosZ* geenide suhtes. Lisaks tuvastati anaeroobse ammooniumi oksüdeerimisega seotud geene, mille osakaalud olid kõrgemad horisontaalfiltris viidates antud protsessi jaoks sobivamatele tingimustele just antud tüüpi filtris. Seetõttu võib järeldada, et Paistu pinnasfiltersüsteemis võib lämmastikühendite eemaldamisel olla lisaks denitrifikatsioonile oluline roll ka anaeroobsel ammooniumi oksüdeerimisel. Veeproovide analüüsitulemuste alusel võis järeldada, et Paistu kombineeritud pinnasfiltri efektiivsus reovee puhastamisel on hea, kuna puhasti läbinud heitvesi vastas kõigile seadusega kehtestatud normidele.

Käesolevas töös iseloomustati mitmete lämmastikuringe protsesside toimumise geneetilist potentsiaali. Rohkem informatsiooni puhastis toimuvate protsesside kohta võiks anda mRNA tasemel kvantifitseerimine, mille abil saaks hinnata koosluses olevate funktsionaalsete geenide reaalset ekspressiooni. Metagenoomika abil oleks võimalik uurida amplifitseerimisest sõltumatult koosluses eksisteerivad metaboolseid ja sealhulgas lämmastikuringega seotud radu kodeerivaid DNA järjestusi ning nende mitmekesisust.

The genetic potential of denitrification and anaerobic ammonium oxidation in a Paistu hybrid sub-surface flow constructed wetland

Ott-Kaarel Kalm

SUMMARY

Eutrophication has become one of the most common problems in freshwater and coastal ecosystems. In order to reduce the amount of nutrients entering into natural ecosystems, it is important to develop effective and affordable systems for wastewater treatment. One solution is to use constructed wetlands for removement of excess nutrients from water. Microbial communities play a key role in the biogeochemical cycles of wetlands. Therefore, the understanding of the microbially mediated processes and factors affecting them in constructed wetlands is crucial in order to improve the design and management of constructed wetlands.

The aim of the current work was to evaluate the genetic potential of denitrification and anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) in the Paistu hybrid constructed wetland by quantifying the proportions of genes associated with those processes.

Wetland media and wastewater samples were collected in December 2012. Altogether, six wetland media samples were collected from vertical (3 samples) and horizontal (3 samples) sub-surface flow filters. Wastewater samples were taken from the inflow and outflow of the system and from the well between two filters. Quantitative PCR (qPCR) was applied to evaluate the bacterial community size in wetland media and water samples by quantifying the abundance of the 16S rRNA gene. Bacterial community potential of emitting N_2O and N_2 by denitrification and N_2 by ANAMMOX in the samples of different filters was estimated by determining the proportions of *nirS*, *nirK*, *nosZI*, and *nosZII* genes and ANAMMOX-specific 16S rRNA genes within the community, respectively.

The results of the experiment indicated that the denitrification potential was similar in both types of wetland filters; however, the potential was more evenly distributed in the horizontal flow filter. The difference in the potential of denitrification in the vertical flow filter was most likely caused by unevenly distributed wastewater. Based on the higher proportions of *nir* genes compared to *nosZ* genes, it can be concluded that both types of wastewater treatment filters are potential sources of N_2O.

The potential of the ANAMMOX process was found to be higher in the horizontal flow filter probably due to the anaerobic conditions and a lower concentration of organic substances in this filter. The presence of ANAMMOX organisms indicates that in addition to denitrification, ANAMMOX might also have a role in the removal of nitrogen compounds from the wastewater in this treatment system.

Overall, the treatment efficiency of the Paistu hybrid constructed wetland is sufficient as the chemical parameters of the effluent are all within Estonian regulations.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada kõiki, kes on käesoleva töö valmimisel toeks olnud. Minu suurimad tänusõnad kuuluvad juhendajatele, keskkonnatehnoloogia doktorandile Teele Ligile ja vanemteadur Marika Truule, kelle positiivne suhtumine ja oskuslik juhendamine olid töö valmimisel suureks abiks.

Käesoleva bakalaureusetööga seotud kulutused on kaetud projekt 3.2.0801.11-0026 "Ravimijäägid ja sünteetilised nanoosakesed reovees: mõju reoveepuhastusprotsessile ja ravimiresistentsuse geenide levikule keskkonnas" ning Eesti Vabariigi haridus- ja teadusministeeriumi institutsionaalse uurimistoetuse (IUT2-16) arvelt.

KASUTATUD KIRJANDUS

Azam, F., Müller, C., Weiske, A., Benckiser, G., Ottow, J. (2002). Nitrification and denitrification as sources of atmospheric nitrous oxide – role of oxidizable carbon and applied nitrogen. *Soil Biology and Fertility of Soils,* 35:54–61

Babtista, J. 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

Baggs, E. M., (2011). Soil microbial sources of nitrous oxide: recent advances in knowledge, emerging challenges and future direction. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 3:321–327

Beaubien, A., Hu, U., Bellahcen, D., Urbain, V., Chang, J. (1995). Monitoring metabolic activity of denitrification processes using gas production measurements. *Water Research*, 29:2269–2274

Blum, P. (2008). Archaea: New Models for Prokaryotic Biology. Horizon Scientific Press

Boumann, H. A., Longo, M. L., Stroeve, P., Poolman, B., Hopmans, E., Stuart, M., Sinninghe Damsté, J., Schouten, S. (2009). Biophysical properties of membrane lipids of anammox bacteria: I. Ladderane phospholipids form highly organized fluid membraanes. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1788:1444–1451

Bulow, S. E., Francis, C. A., Jackson, G. A., Ward, B. B. (2008). Sediment denitrifier community composition and *nirS* gene expression investigated with functional gene microarrays. *Environmental Microbiology*, 10:3057–3069

Chen, Y., Wen, Y., Zhou, Q., Vymazal, J. (2014). Effects of plant biomass on denitrifying genes in subsurface-flow constructed wetlands. *Bioresource Technology*, 157:341–345

Chon, K., Chang, J., Lee, E., Lee, J., Ryu, J., Cho, J. (2011). Abundance of denitrifying genes coding for nitrate (*narG*), nitrite (*nirS*), and nitrous oxide (*nosZ*) reductases in estuarine versus wastewater effluent-fedconstructed wetlands. *Ecological Engineering*, 37:64–69

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. *Federation of European Microbiological Societies*, 83:340–351

Cuhel, J., Šimek, M. (2011). Effect of pH on the denitrifying enzyme activity in pasture soils in relation to the intrinsic differences in denitrifier communities. *Folia Microbiologica*, 56(3):230–235

Davidson, E. A., David, M. B., Galloway, J. N., Goodale, C. L., Haeuber, R., Harrison, J. A., Howarth, R. W., Jaynes, D. B., Lowrance, R. R., Nolan, B. T., Peel, J. L., Pinder, R. W., Porter, E., Snyder, C. S., Townsend, A. R., Ward, M. H. (2012). Excess nitrogen in the U.S. environment: Trends, risks, and solutions. *Issues in Ecology*, Report Number 15

Dong, X., Reddy, G. B. (2010). Nutrient removal and bacterial communities in swine wastewater lagoon and constructed wetlands, *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 45(12):1526–1535

Enwall, K., Philippot, L., Hallin, S. (2005). Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:8335–8343

Faulwetter, J. L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarneck, 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

Fonder, N., Headley, T. (2013). The taxonomy of treatment wetlands: A proposed classification and nomenclature system. *Ecological Engineering,* 51:203–211

Fredriksson, N. J., Hermansson, M., Wilen, B. M. (2013). The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant. *PLoS ONE,* 8(10):e76431

Giles, M., Morley, N., Baggs, E. M., Daniell, T, J. (2012). Soil nitraate reducing processes–drivers, mechanisms for spatial variation, and significance for nitrou soxide production. *Frontiers in Microbiology*, 3(407)

Gloor, G, B., Hummelen, R., Macklaim, J. M., Dickson, R. J., Fernandes, A. D., MacPhee, R., Reid, G. (2010). Microbiome profiling by Illumina Sequencing of combinatorial sequence-tagged PCR products. *PLoS ONE,* 5(10):e15406

Graham, D. W., Trippett, C., Dodds, W. K., O'Brien, J. M., Banner, E. B. K., Head, I. M., Smith, M. S., Yang, R. K., Knapp, C. W. (2010) Correlations between *in situ* denitrification activity and *nir*-gene abundances in pristine and impacted prairie streams. *Environmental Pollution,* 158:3225–3229

Gruber, N., Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective on the global nitrogen cycle. *Nature*, 451:293–296

Hallin, S., Lindgren, P-E. (1999). PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4):1652–1657

Han, P., Huang, Y. T., Lin, J. G., Gu, J. D. (2013). A comparison of two 16S rRNA gene-based PCR primer sets in unraveling anammox bacteria from different environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24):10521–10529

Harhangi, H. R., Le Roy, M., van Alen, T., Hu, B.-I., Groen, J., Kartal, B., Tringe, S. G., Quan, Z.-X., Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. (2012). Hydrazine synthase, a unique phylomarker to study the presence and biodiversity of anammox bacteria. *Applied and Environmental Microbiology,*doi: 10.1128/AEM.07113-11

Hira, D., Toh, H., Migita, C. T., Okubo, H., Nishiyama, T., Hattori, M., Furukawa, K., Fujii, T. (2012). Anammox organism KSU-1 expresses a NirK-type copper-containing nitrite reductase instead of a NirS-type with cytochrome cd1. *FEBS Letters*, 586(11):1658–1663

Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., Clarck, I. M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry,* 42:878–887

Holtan-Hartwig, L., Dörsch, P., Bakken, L. R. (2002). Low temperature control of soil denitrifying communities: kinetics of N_2O production and reduction. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1797–1806

Humbert, S., Tarnawski, S., Fromin, N., Mallet, M.-P., Arango, M., Zopfi, J. (2010). Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. *The ISME Journal*, 4:450–454

Humbert, S., Zopfi, J., Tarnawski, S.-E. (2012). Abundance of anammox bacteria in diferent wetland soils. *Environmental Microbiology Reports*, 4(5):484–490

Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. J. M., Kuenen, J. G., Strous, M. (2010). Description of the order *Brocadiales*. In Krieg, N. R., Staley, J. T., Hedlund, B. P., Paster, B. J., Ward, N.,

Ludwig, W., Whitman, W. B., (Eds.). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. Springer, Heidelberg

Jia, W., Zhang, J., Li, P., Xie, H., Wu, J., Wang, J. (2011). Nitrous oxide emissions from surface flow and subsurface flow constructed wetland microcosms: Effect of feeding strategies. *Ecological Engineering*, 37:1815–1821

Jin, R.-C., Yang, G.-F., Yu, J.-J., Zheng, P. (2012). The inhibition of the Anammox process: A review. *Chemical Engineering Journal*, 197:67–79

Jones, C. M., Graf, D., Bru, D., Philippot, L., Hallin, S. (2013). The unaccounted yet abundant nitrousoxide-reducing microbial community:a potential nitrous oxide sink. *The ISME Journal*, 1–10

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):1955–1966

Kadlec, R. H., Wallace, S. D. (2009). Treatment Wetlands, Second edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Kandeler, E., Deiglmayr, K., Tscherko, 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):5957–5962

Kartal, B., Almeida, N. M., Maalcke, W. J., Op den Camp, H. J. M., Jetten, M. S. M., Keltjens, J. T. (2012). How to make a living from anaerobic ammonium oxidation. *FEMS Microbiology Reviews*, 1–34

Kartal, B., Keltjens, J. T., Jetten, M. S. M. (2011). Metabolism and genomics of anammox bacteria. In Ward, B. B., Arp, D. J., Klotz, M. G. (Eds.) Nitrification. Amer Society for Microbiology

Kim, J., Lim, J., Lee, C., (2013a). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances*, 31(8):1358–1373

Kim, M., Lee, K.-H., Yoon, S.-W., Kim, B.-S., Cun, J., Yi, H. (2013b) Analytical tools and databases for metagenomics in the next-generation sequencing Era. *Genomics and Informatics*, 11(3):102–113

Kloos, K., Mergel, A., Rösch, C., Bothe, H. (2001). Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28(9):991–998

Knapp, C. W., Dodds, W. K., Wilson, K. C., O´Brien, J. M., Graham, D. W. (2009). Spatial heterogeneity of denitrification genes in a highly homogenous urban stream. *Environmental Science and Technology*, 43:4273–4279

Koger, H. (2013). Kombineeritud tehismärgalapuhasti puhastusefektiivsus veetaseme muutmisel Paistu Kooli pinnasfiltri näitel. Magistritöö keskkonnatehnoloogias. Loodus- ja Tehnoloogiateaduskond, Tartu Ülikool

Lee, C., Fletcher, T. D., Sun, G. (2009). Nitrogen removal in constructed wetland systems. *Engineering in Life Sciences*,1:11–22

Li, Z., Ma, Y., Hira, D., Fujii, T., Furukawa., K. (2011). Factors affecting the treatment of reject water by the anammox process. *Bioresource Technology*, 102:5702–5708

Ligi, T., Truu, M., Oopkaup, K., Nõlvak, H., Mander, Ü., Mitsch, W. J., Truu, J. (201X). Genetic potential of N_2 emission via denitrification and ANAMMOX from the soils and sediments of a created riverine treatment wetland complex. publitseerimiseks esitatud

Ligi, T., Truu, M., Truu, J., Nõlvak, H., Kaasik, A., Mitsch, W. J., Mander, Ü. (2013). Effects of soil chemical characteristics and water regime on denitrification genes (*nirS, nirK,* and *nosZ*) abundances in a created riverine wetland complex. *Ecological Engineering,* avaldamisel

Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R. (2008) The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International,* 34:265–276

Mander, Ü., Tooming, A., Mauring T., Öövel, M. (2007). Performance dynamics of a LWA-filled hybrid constructed wetland in Estonia. *Ecohydrology and Hydrobiology,* 7(3-4): 297–302

Morley, N., Baggs, E. M., Dörsch, P., Bakken, L. (2008). Production of NO, N_2O and N_2 by extracted soil bacteria, regulation by NO_2 and O_2 concentrations. *FEMS Microbiology Ecology,* 65:102–112

Mulder, A., van der Graaf, A. A., Roberson, L. A., Kuenen, J. G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology,* 16:177–84

Nõlvak, H., Truu, M., Tiirik, K., Oopkaup, K., Sildvee, T., Kaasik, A., Mander, Ü., Truu, J. (2013). Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships with system treatment efficiency in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Science of the Total Environment,* 461:636– 644

Papaspyarau, S., Smith, C. J., Dong, L. F., Whitby, C., Dumbrell, A. J. (2014). Nitrate reduction functional genes and nitrate reduction potentials persist in deeper estuarine sediments. Why? *PLoS ONE,* 9(4):e94111

Pittman, M. S., Kelly, D. J. (2005). Electron transport through nitrate and nitrite reductases in *Campylobacter jejuni. Biochemical Society Transactions,* 33(1):190-192

Rathsack, K., Böllmann, J., Martiensen, M. (2014). Comparative study of different methods for analyzing denitrifying bacteria in fresh water ecosystems. *Journal of Water Resource and Protection,* 6:609-617

Richardson, D. J. (2000). Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology,* 146:551–571

Rubol, S., Manzoni, S., Bellin, A., Porporato, A. (2013). Modeling soil moisture and oxygen effects on soil biogeochemical cycles including dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA). *Advances in Water Resources,* 62:106–124

Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J., Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research,* 37(6):45

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,* 112:429–448

Saggar S., Jha, N., Deslippe, J., Bolan, N. S., Luo, J., Giltrap., D. L., Kim, D.-G., Zaman, M., Tillman, R. W. (2012). Denitrification and N_2O:N_2 production in temperate grasslands: Processes, measurements, modelling and mitigating negative impacts. *Science of the Total Environment,* 465:173–195

Saleh-Lakha, S., Shannon, K. E., Handerson, S. H., Goyer, C., Trevors, J. T., Zebarth, B. J., Burton, D. L. (2009). Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*. *Applied and Environmental Microbiology,* 75(12):3903–3911

Sanford, R. A., Wagner, D. B., Wu, Q., Chee-Sanford, J. C., Thomas, S. H., Cruz-Garcia, C., Rodriguez, G., Massol-Deya, A., Krishnami, K. K., Ritalahti, K, M., Nissen, S., Konstantinidis, K. T., Löffler, F. E. (2012). Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 109(48)

Scott, N. M., Hess, M., Bouskill, N. J., Mason, O. U., Jansson, J. K., Gilbert, J. A. (2014). The microbial nitrogen cycling potential is impacted by polyaromatic hydrocarbon pollution of marine sediments. *Frontiers in Microbiology*, 5:108

Senbayram, M., Chen, R., Budai, A., Bakken. L., Dittert, K. (2012). N_2O emission and the $N_2O/(N_2O+N_2)$ product ratio of denitrification as controlled by available carbon substrates and nitrate concentrations. *Agriculture, Ecosystems and Environment,* 147:4–12

Shiro, Y. (2012). Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: Nitric oxide reductase, anaerobic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1817:1907–1913

Shoun, H., Fushinobu, S., Jiang, L., Kim, S., Wakagi, T. (2012). Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B,* 367:1186–1194

Šimek, M., Cooper, J. E., Picek, T., Santrůcková, H. (2000). Denitrification in arable soils in relation to their physico-chemical properties and fertilization practice. *Soil Biology and Biochemistry,*32:101–110

Smith, C. J., Osborn, M. A. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology,* 67:6–20

Smith, V. H., Schindler, D. W. (2009). Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution,* 24(4):201–207

Zarraonaindia, I., Smith, D. P., Gilbert, J. A. (2013). Beyond the genome: community-level analysis of the microbial world. *Biology and Philosophy*, 28:261–282

Zhu, G., Wang, W., Feng, X., Fan, G., Jetten, M. S. M., Yin, C. (2011). Anammox bacterial abundance, biodiversity and activity in a constructed wetland. *Environmental Science and Technolog*y, 45:9951–9958

Zumft, W.G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 61:533–616

Thamdrup, B. (2012) New pathways and processes in the global nitrogen cycle. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics,* 43:407–28

Thomson, A. J., Giannopoulos, G., Pretty. J., Baggs, E. M., Richardson, D. J. (2012). Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,* 367(1593):1157-1168

Throbäck, I. N., Enwall, K., Jarvis, Å., Hallin, S. (2004). Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE**.** *FEMS Microbiology Ecology,* 49(3):401–417

Tooming, A. (2005). Kergkruusatäitega hübriidse tehismärgalapuhasti puhastusefektiivsus Paistu Põhikooli pinnasfiltri näitel. Magistritöö keskkonnatehnoloogias. Loodus- ja Tehnoloogiateaduskond, Tartu Ülikool

Torres, M. J., Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E. J., Delgado, M. J. (2011). Emerging complexity in the denitrification regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biohemical Society Transactions*, 39(1):284–288

Truu, M., Juhanson, J., Truu, J. (2009). Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 407:3958–3971

Tsuruta, S., Takaya, N., Zhang, L., Shoun, H., Kimura, K., Hamamoto, M., Nakase, T. (1998). Denitrication by yeasts and occurrence of cytochrome P450nor in *Trichosporon cutaneum*. *FEMS Microbiolgy Letters*, 168:105–110

Valasek, M. A., Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29:151–150

Van den Heuvel, R. N., Bakker, S. E., Jetten, M. S. M., Hefting, M. M. (2011). Decreased N_2O reduction by low soil pH causeshigh N_2O emissions in a riparian ecosystem. *Geobiology*, 9:294–300

van Niftrik, L., Jetten, M. S. M. (2012). Anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: unique microorganisms with exceptional properties. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3):585–596

Vetrovsky, T., Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE*, 8(2):e57923

Vohla, C., Kõiv, M., Bavor, J., Chazarnec, F., Mander, Ü. (2011). Filter materials for phosphorus removal from wastewater in treatment wetlands – A review. *Ecological Engineering*, 37:70–89

Vymazal, J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 380:48–65

Vymazal, J. (2013). 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):4795–4811

Vymazal, J., Kröpfelova, L. (2009). Removal of organics in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow: A review of the field experience. *Science of the Total Environment*, 407:3911–3922

Wallace, S. D. (2000). Design and performance of cold climate wetland treatment systems. *Proceedings of the 2000 National Onsite Wastewater Recycling Association (NOWRA) Annual Conference*

Wang, L., Li, T. (2011). Anaerobic ammonium oxidation in constructed wetlands with bio-contact oxidation as pretreatment. *Ecological Engineering*, 37(8):1225–1230

White, J. R., Reddy, K. R. (2001). Influence of selected inorganic electron acceptors on organic nitrogen mineralization in Everglades soils. *Soil Science Society of America Journal*, 65:941–948

Õigusakt: 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). *Riigi Teataja I*, 13.06.2013

Öövel, M., Tooming, A., Mauring, T., Mander, Ü. (2007). Schoolhouse wastewater purification in a LWA-filled hybrid constructed wetland in Estonia. *Ecological Engineering,* 29:17–26

Yoshida, M., Ishii, S., Otsuka, S., Senoo, K. (2010). *nirK*-harbouring denitrifiers are more responsive to denitrification – inducing conditions in rice paddy soil than *nirS*-harbouring bacteria. *Microbes and Environments,* 25:45–48

LISA 1.

Paistu kombineeritud pinnasfiltrite süsteemi veeproovide (V1 - puhasti sissevool; V2 - filtrite vaheline kaev; V3 - puhasti väljavool) keemilised parameetrid

Proovi nimi	pH	HA (mg/l)	BHT_7 (mg/l)	KHT_{Cr} (mg/l)	Ca^{2+} (mg/l)	Mg^{2+} (mg/l)	NH_4-N (mgN/l)	NO_3-N (mgN/l)	NO_2-N (mgN/l)	$N_{üld}$ (mg/l)	PO_4-P (mg/l)	$P_{üld}$ (mgP/l)	SO_4^{2-} (mg/l)	Fe (mg/l)	TOC (mg/l)	DOC (mgC/l)
V1	7,5	83	140	250	76	30	64	< 0,02	< 0,003	75	5,2	5,3	17	0,48	79	49
V2	7,7	17	7,9	50	81	26	31	4,2	0,04	36	3,1	3,1	12	1	14	12
V3	7,7	21	5,1	25	77	25	14	0,02	0,0062	15	3	3,1	5,7	4,7	5,7	5,5

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ott-Kaarel Kalm,

(sünnikuupäev 12.03.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Paistu Põhikooli hübriidse pinnasfiltersüsteemi denitrifikatsiooni ja anaeroobse oksüdeerimise geneetiline potentsiaal“,

mille juhendajad on Teele Ligi ja Marika Truu,

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 , 27.05.2014